

Die Bedeutung von ZO-1 in Melanomzellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Mutiha A. T. Pandjaitan

aus Hamburg

Hamburg 2016

Datum der Disputation: 07.10.2016

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Johanna Maria Brandner
2. Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester

1	Einleitung	1
1.1	Haut	1
1.2	Malignes Melanom	3
1.2.1	Epidemiologie	3
1.2.2	Diagnose und Klassifizierung	4
1.2.3	Therapie	7
1.3	Melanom und das mehrstufige Modell der Krebs-Entstehung	8
1.4	Invasion und Metastasierung bei Melanom	10
1.5	ZO-1	14
1.5.1	ZO-1 und Zellverbindungen	16
1.5.2	Die physiologische Rolle von ZO-1 in normalen Geweben und Zellen	17
1.5.3	ZO-1 in der Tumorgenese	18
1.6	Zielsetzung der Doktorarbeit	20
2	Material	21
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	21
2.2	Chemikalien und Medien	24
2.2.1	Zusammensetzung der Zell-Kulturmedien und der verwendeten Trypsin- EDTA-Lösungen	26
2.3	Kits	27
2.4	Primer-Sonde-Sets	28
2.5	Plasmide	28
2.6	Antikörper	29
2.7	Zell-Linien	30
2.8	<i>E. coli</i>-Linie für eine bakterielle Transformation	31
2.9	Restriktionsenzyme	31
2.10	Software	31
3	Methoden	32
3.1	Zellkultur	32
3.1.1	Standardkulturbedingungen	32
3.1.2	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	32
3.1.3	Puromycin-Resistenz-Bestimmung durch WST-1-Assay	32
3.1.4	Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände	33
3.1.5	shRNA-Transfer mit Hilfe lentiviraler Zellkulturüberstände	33

3.1.6	Herstellung von Sphäroiden	34
3.1.7	3D-Collagen-Invasionsassay	34
3.1.7.1	Durchführung des Invasionsassays	34
3.1.7.2	Auswertung des Invasionsassays	35
3.1.8	Dissoziationsassay	37
3.1.9	BrdU-Proliferationsassay	38
3.1.10	Boyden-Kammer-Assay	40
3.2	Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	41
3.2.2	Transformation von Bakterien	41
3.2.3	Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab (Mini-Prep)	42
3.2.4	Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab (Maxi-Prep)	42
3.2.5	Restriktionsverdau	42
3.2.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	43
3.2.7	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren	43
3.2.8	Isolierung von RNA	44
3.2.9	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	44
3.2.10	cDNA-Synthese	44
3.2.11	Quantitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung von TaqMan [®] -Sonden	44
3.2.12	Relative mRNA-Quantifizierung	45
3.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	45
3.3.1	Protein-Isolierung aus Zellen	45
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten	46
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.3.4	Wet-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	48
3.3.5	Immunoblot-Analyse	49
3.4	Statistische Analyse	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Maligne Melanom-Zell-Linien exprimierten unterschiedliche Menge von ZO-1	53
4.2	Maligne Melanom-Zell-Linien besaßen unterschiedliche Invasivität, Proliferationsrate und Dissoziationsrate	53
4.3	Etablierung von lentiviralen Knockdown-Melanom-Zellen	60
4.3.1	Bestimmung der Puromycin-Konzentration zur Selektion von transduzierten Melanom-Zellen	60
4.3.2	Herstellung von 1205Lu-Knockdown-Zellen	62

4.3.3	Herstellung von WM35-Knockdown-Zellen	64
4.4	Invasion von Melanom-Sphäroiden in einem Kollagen-Matrix	66
4.4.1	1205Lu-Sphäroidwachstum und Invasion	66
4.4.2	WM35-Sphäroidwachstum und Invasion	86
4.5	Einzel-Zell-Invasion und -Migration von adhärenen Melanom- Zellen	105
4.5.1	Die Invasion von adhärenen WM35-Zellen	105
4.5.2	Die Migration von adhärenen WM35-Zellen	113
4.6	Dissoziation von Melanom-Sphäroiden	119
4.6.1	Dissoziation von 1205Lu-Sphäroiden	119
4.6.2	Dissoziation von WM35-Sphäroiden	136
4.7	Proliferation von Melanom-Zellen	154
4.7.1	Proliferation von 1205Lu-Zellen	154
4.7.2	Proliferation von WM35-Zellen	159
5	Diskussion	164
5.1	Maligne Melanom-Zell-Linien exprimierten unterschiedliche Menge von ZO-1 und besaßen unterschiedliche Invasivität	165
5.2	Etablierung von lentiviralen Knockdown-Melanom-Zellen	167
5.3	Invasion von Melanom-Zellen und ZO-1-Proteinlevel	169
5.3.1	Der Einfluss von ZO-1-Level auf die Sphäroid-Invasion	170
5.3.2	Einfluss des ZO-1-Levels auf die Einzel-Zell-Invasion und –Migration von adhärenen Zellen	172
5.3.3	Der Einfluss der Ursprungs-Gesamtfläche und der Einfluss der Kollagen-Konzentration auf die Sphäroid-Invasion	175
5.4	Dissoziation von Melanom-Sphäroiden	175
5.5	Proliferation von Melanomzellen	177
6	Zusammenfassung	178
6.1	Summary	179
7	Literaturverzeichnis	181
8	Abkürzungverzeichnis	191
9	Anhang	196
9.1	Plasmide	196

9.2	DNA-Molekulargewichts-Marker	200
9.3	Protein-Molekulargewichts-Marker	201
9.4	Verwendete Syntax zur statistischen Auswertung mit der Software IBM-SPSS 22 (Linear-gemischte Modelle)	201
10	Abbildungsverzeichnis	208
11	Tabellenverzeichnis	215
	Danksagung	217
	Eidesstatliche Erklärung	218

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m² und einem Gewicht von 3,5-10 kg ist sie das größte Organ. Die Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel. Die Hauptzellpopulation stellen die Keratinozyten (mehr als 90 Prozent). Außerdem befinden sich in der Epidermis Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten (Moll, 2016).

Im histologischen Bild sind mehrere Schichten zu unterscheiden (siehe Abb. 1.1) :

- Das Stratum basale ist eine Schicht kubischer Zellen, die sogenannten Basalzellen.
- Darüber befindet sich das vielschichtige Stratum spinosum, in dem die Keratinozyten größer, polygonal und in höheren Schichten zunehmend flacher werden. Untereinander sind die Keratinozyten durch multiple „stachelartige“ Interzellularbrücken (Desmosomen) verbunden, weshalb sie auch Stachelzellen heißen.
- Das Stratum granulosum mit seinen Körnerzellen bildet eine bis mehrere Schichten aus. Die Körnerzellen enthalten basophile Keratohyalin granula und sind deutlich abgeflacht.
- Das Stratum corneum ist die äußerste Zellschicht, bestehend aus ganz flachen, fest gepackten, kernlosen Hornzellen, die dicht gefüllt sind mit Tonofilamenten und einer amorphen Matrix. Das Stratum lucidum, ausgeprägt an Palmae und Plantae, ist die unterste Zelllage dieser Schicht (Moll, 2016).

Die Keratinozyten, die im Lauf der terminalen Differenzierung ihre Gestalt wandeln (Basalzelle, Stachelzelle, Körnerzelle, Hornzelle) und schließlich im Stratum corneum kernlose Zellfragmente darstellen, bauen die Epidermis auf. Die Langerhans-Zellen sind dendritische Zellen, die suprabasal in der Epidermis und im Haarfollikel lokalisiert sind. Ihre wesentliche Funktion ist, T-Helferzellen zu aktivieren (siehe Abb. 1.2, Moll, 2016). Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Einleitung primärer Immunreaktion (Fritsch, 2009).

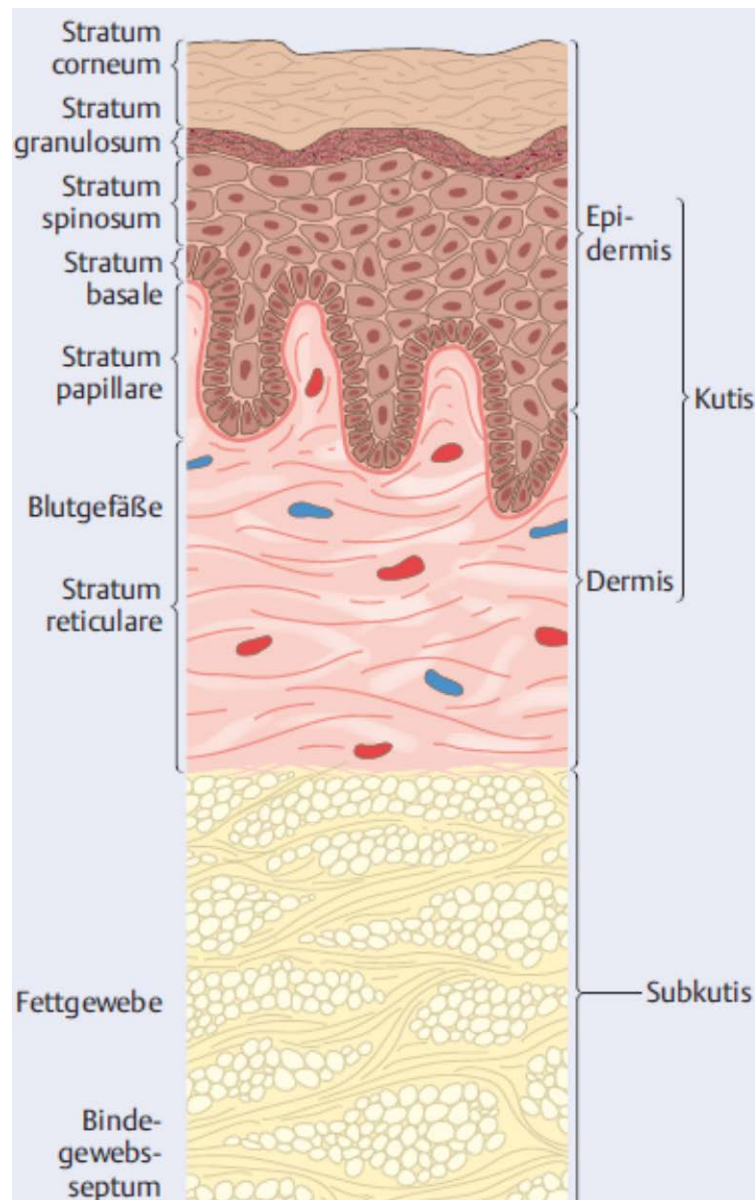


Abb. 1.1: Mikroskopische Struktur der Haut (Moll, 2016)

In der Basalschicht von Epidermis und im Bulbus des Haarfolikels sind die Melanozyten lokalisiert. Ihre Dichte ist individuell und lokalisationsabhängig sehr stark variabel. Durchschnittlich beträgt sie $1100-1500/\text{mm}^2$. Vereinzelte Melanozyten kommen auch in der Dermis vor. Lichtmikroskopisch sind diese großen hellen Zellen mit Dendriten oft nicht sicher zu erkennen. Sie lassen sich jedoch elektronenmikroskopisch anhand der charakteristischen, pigmentierten Organellen, der Melanosomen, oder der pigmentlosen Vorstufen, den Primärmelanosomen, identifizieren (Moll, 2016). Diese Zellen sind Zellen neuroektodermaler Herkunft, die in ihren Melanosomen das Pigment Melanin produzieren und dieses an die Keratinozyten abgeben (siehe Abb. 1.2). Sie sind für die Hautfarbe und die Eigenfarbe von Haaren verantwortlich und dienen vorwiegend dem Schutz der Haut vor der UV-Einstrahlung. Die Melanozyten-Vorläufer (Melanoblasten) entstehen in der Neuralleiste und wandern ab der 8. Schwangerschaftswoche dorsoventral durch das Mesenchym.

Während der Wanderung differenzieren sie und erreichen in der 12. Woche die Haut, wo sie als Melanozyten die Basalschicht besiedeln (Fritsch, 2009).

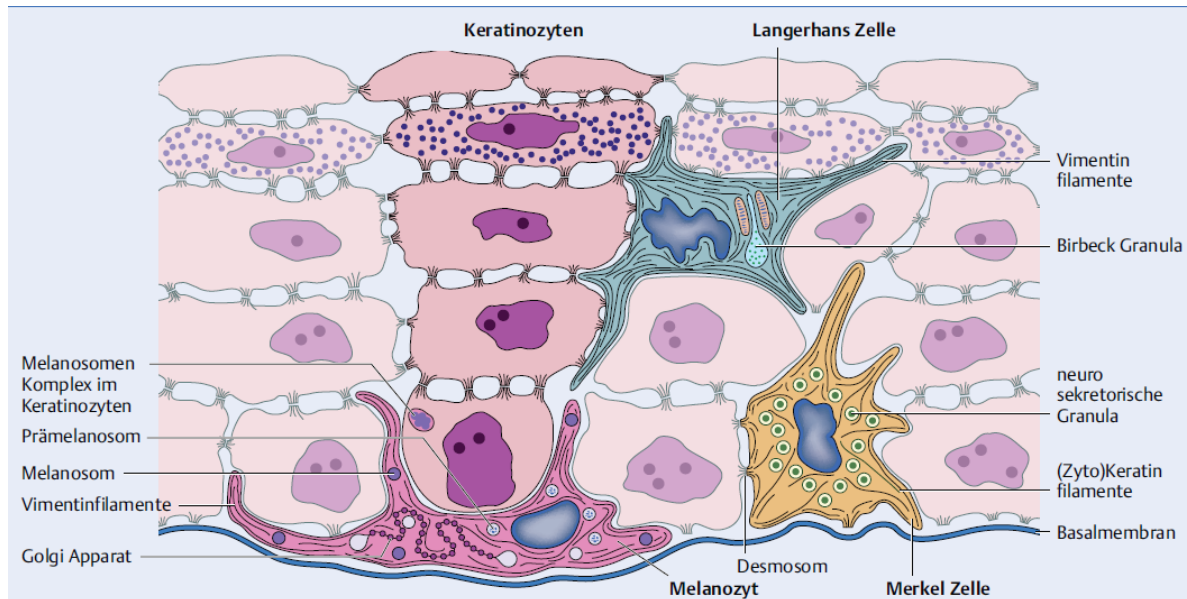


Abb. 1.2: Schematische elektronenmikroskopische Darstellung der dendritischen epidermalen Zellen (Melanozyt, Langerhans-Zelle und Merkel-Zelle (Moll, 2016)

Der Anteil von den jeweiligen Zellarten wird so reguliert, dass die Homöostase aufrechterhalten bleibt. Wenn diese Homöostase nicht etabliert ist, kann Hautkrebs entstehen. Es sind verschiedene Hautkrebsentitäten bekannt. Das maligne Melanom ist ein hochgradig bösartiger Tumor, dessen Ursprungszellen Melanozyten sind. Die Neoplasien der Melanozyten umfassen außerdem die melanozytären Nävi (Fritsch, 2009).

1.2 Malignes Melanom

Das maligne Melanom der Haut (MM), auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist die bösartigste Form von Hautkrebs (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015; American Cancer Society, 2015). Obwohl nur 2 Prozent aller Hautkrebsentitäten MM ist, hat MM die höchste Sterbefällerate (American Cancer Society, 2015). Deshalb ist seine frühe Erkennung und bestmögliche Behandlung wichtig.

1.2.1 Epidemiologie

Etwa 9600 Männer und ebenso viele Frauen erkrankten 2010 in Deutschland an einem malignen Melanom der Haut. Basierend auf der Zahl der Neuerkrankungen ist MM die fünfthäufigste Krebsart sowohl bei Frauen als auch bei Männern. Dazu kommen noch etwa 6000 in situ Melanome, die noch frühzeitiger mehrheitlich bei Frauen entdeckt wurden. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen liegt mittlerweile bei 58 Jahren - niedriger als zuvor. Männer erkranken im Mittel acht Jahre später. Die höchsten Erkrankungsraten in Europa werden aktuell in Dänemark gemessen, innerhalb Deutschlands zeigt sich kein klares

geographisches Muster (Robert Koch Institut, 2013). Das Risiko, im Laufe des Lebens ein Melanom zu entwickeln, beträgt in Deutschland etwa 1:500, in Australien bereits 1:50 (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015). Die Mortalitätsrate in Australien und Neuseeland (4,1 in 100000) ist deutlich höher als die Mortalitätsrate in Europa im Jahr 2012 (1,5 in 100000) (WHO, 2012).

Menschen mit einem hellen Hauttyp, die nicht oder schlecht bräunen, sowie Menschen mit einer großen Anzahl von Pigmentmalen tragen ein höheres Risiko, an einem Melanom zu erkranken. Eine erbliche Veranlagung gilt auch als eine Ursache der Melanom-Entstehung. Als wichtigster exogener Risikofaktor gilt die natürliche oder künstliche UV-Exposition durch Sonne oder Solarien, insbesondere in der Kindheit und Jugend. Besonders wiederkehrende intensive UV-Belastung, wie sie in Sommerurlaube vorkommt, erhöht das Risiko an einem Melanom zu erkranken (Robert Koch Institut, 2013).

1.2.2 Diagnose und Klassifizierung

In der Regel haben Patienten mit einem malignen Melanom der Haut zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Beschwerden. Gelegentlich führen Juckreiz oder eine kleine Blutung aus dem Tumor zu einem Arztbesuch. Es tritt bei Männern am häufigsten am Rücken, bei Frauen bevorzugt an den Unterschenkeln auf. Maligne Melanome der Haut können sich in ihrem Aussehen sehr voneinander unterscheiden. Meist handelt es sich um dunkle oder schwarze Flecken. Sie können flach, erhaben (über die Hautoberfläche hinaus gehend) oder knotig sein (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015). Hier unterscheidet man 4 klassische Wuchstypen (siehe Tabelle 1.1 und Abb. 1.3) und Sonderformen (siehe Tabelle 1.1).

Das Melanom entsteht durch eine neoplastische Transformation von Melanozyten und kann sich in allen Melanozyten-enthaltenden Geweben befinden, z.B. Haut, Nagelbett, Mundschleimhaut, Nasenrachenraum, Aderhaut, und Harntrakt (Fritsch, 2009; Chang, et al., 1998). Die Median-Zeit zwischen der Diagnose des primären Melanoms und dem Befund einer Metastase ist 2,6 Jahre (Kim, et al., 2010). Die Median-Zeit der Diagnose einer Metastase und dem Tod ist weniger als 6 Monate (Sandru, et al., 2014; Fritsch, 2009).

Tabelle 1.1: Klinische Klassifikation der Melanome (Fritsch, 2009).

	Relative Häufigkeit	Lokation
Lentigo-maligna-Melanom	5%	Gesicht, Handrücken
Oberflächlich-spreitendens Melanom	65%	Alle sonnenexponierten Regionen
Noduläres Melanom (Knotiges Melanom)	15%	Alle sonnenexponierten Regionen
Akral-lentiginöses Melanom	5%	Akren, Nagelbett
Unklassifizierbare Melanome	bis 10%	Mund-, Genitalschleimhaut
Schleimhautmelanome		
Melanome innerer Organe		Augen, ZNS, Lymphknoten

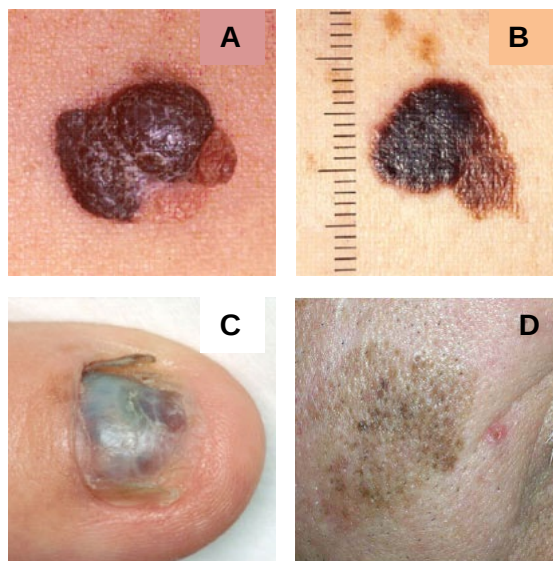


Abb. 1.3: Verschiedene Formen von malignen Melanomen: A. Noduläres Melanom (Knotiges Melanom , B. oberflächlich spreitendes Melanom, C. Melanom unter dem Fingernagel (akral-lentiginöses Melanom), und D. Lentigo-maligna-Melanom (A-C: Deutsche Krebsgesellschaft, 2015; D: Baykal und Yazganoğlu, 2014)

Ist ein Melanom bei seiner Diagnose noch dünn und wächst nur in der Epidermis, sind die Heilungschancen bei 100%. Dringt der Tumor in die Dermis vor, bekommt er möglicherweise Zugang zu den Blut- und Lymphgefäßen und kann sich dadurch ggf. im ganzen Körper ausbreiten. Je tiefer ein Tumor in die Haut eingewachsen ist, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass er Krebszellen gestreut hat. Der weitere Verlauf der

Erkrankung wird dann von der Wachstumsgeschwindigkeit der gestreuten Krebszellen bestimmt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015).

Zur klinisch-makroskopischen Einschätzung eines Pigmentflecks hilft die sogenannte ABCDE-Regel. Treffen diese Kriterien auf einen verdächtigen Pigmentfleck zu, wird in der Regel zu einer vorsorglichen Entfernung des Flecks geraten (Goebeler, et al., 2012) :

- Asymmetrie
- Begrenzung: polyzyklisch, unscharf – Ausbreitung von Tumorzellen innerhalb der Epidermis
- Colour: unterschiedliche Pigmentierung
- Durchmesser: >5 mm
- Erhabenheit und rasche Größenzunahme

Für das maligne Melanom ist die TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) aus dem Jahr 2009 die Leitlinie zur Klassifizierung des Melanom-Status von Patienten. Die TNM-Klassifikation beruht auf einem anatomisch basierten System, das ein Karzinom nach seiner Tumordicke (T), Ausbreitung in die Lymphknoten (N) oder Metastasierung in andere Körperteile (M) differenziert. Im Unterschied zu vorhergehenden Klassifikationen wird bei der aktuellen Klassifikation von 2009 neben der Tumordicke und Ulzeration auch die Mitoserate bei Tumordicke < 1 mm einbezogen. Außerdem deutet ein erhöhtes Level der Laktatdehydrogenase im Serum von Patienten, die bereits eine Fernmetastase haben, auf eine schlechte Prognose hin (Balch et al., 2009). Eingruppierung hinsichtlich des Stadiums nach der AJCC-Klassifikation (Balch et al., 2009):

- Stadium 0: Melanoma in situ (auf das epidermale Kompartiment beschränkt)
- Stadium I und II: Primärmelanome, Unterteilung in Abhängigkeit von zunehmender Tumordicke, Mitoserate, Vorhandensein einer Ulzeration
- Stadium III: zusätzlich Lymphknotenmetastasen, Satelliten- (weniger als 2 cm vom Primärtumor entfernt) oder In-transit-Metastasen (mehr als 2 cm vom Primärtumor entfernt, aber vor dem drainierenden regionalen Lymphknoten)
- Stadium IV: Fernmetastasen (hämatogen vor allem in Lungen, Leber, ZNS (zentralen Nervensystem) und Knochen)

Die Dermatoskopie ist eine Hilfsmaßnahme zur Verbesserung der klinischen Diagnostik. Die entscheidende diagnostische Methode ist die Histologie. Bei einem oberflächlich-spreitenden Melanom ist die Epidermis häufig leicht verbreitert und von großen rundlichen, atypischen Melanozyten mit reichlich hellem Zytoplasma durchsetzt, die den Zellen des Morbus Paget ähneln („pagetoide Melanomzellen“). Ist die Basalmembran durchbrochen, liegt ein invasives Melanom vor. Bei einem anderen Wuchstyp, dem nodulären Melanom, infiltrieren spindelige, epitheliode oder pleomorphe Melanomzellen

Epidermis und Dermis, gelegentlich auch die Subkutis. Ein weiterer Wuchstyp, das Lentigo maligne Melanom ist charakterisiert durch Nester atypischer, stark pigmentierter melanozytärer Zellen, die die Dermis infiltrieren. In der basalen Epidermis eines akrolentiginösen Melanoms finden sich zahlreiche atypische Melanozyten, die nestförmig die Epidermis durchsetzen und invasiv in die Dermis vorwachsen (Moll, 2016).

Die Histologie ist manchmal schwierig. In bestimmten Fällen sind immunohistochemische Marker hilfreich: S-100, HBM45, Nk1-C3, und Transferrin-Rezeptor (PAL-M1). Das wichtigste Kriterium ist aber die Tumordicke. Diese ist die Distanz vom Stratum granulosum zum unteren Tumorrand (Fritsch, 2009).

Außer der oben beschriebenen bösartigen Neoplasie (Malignantes Melanom) gibt es gutartige melanozytäre Neoplasien. Sie sind entweder bei Geburt schon vorhanden (kongenitale melanozytäre Nävi) oder entstehen in den ersten Lebensjahrzenten (erworbene melanozytäre Nävi (Nävus-Zell-Nävi) (Fritsch, 2009). Nävus-Zell-Nävi haben im Gegensatz zu malignen Melanomen eine rund-ovale Begrenzung und eine homogene Farbe (Moll, 2016). Aber manche Nävus-Zell-Nävi besitzen dysplastische oder atypische Eigenschaften, sodass es schwer ist, sie von *in situ* Melanomen zu unterscheiden (Piepkorn und Barnhill, 2014).

1.2.3 Therapie

Ein malignes Melanom muss durch eine Operation vollständig entfernt werden. Ist der Tumor mehr als einen Millimeter dick, sollte zusätzlich der im Lymphabfluss der betroffenen Hautregion erstgelegene Lymphknoten operativ entfernt und untersucht werden. Dieses gilt auch für Tumore zwischen 0,75 und 1,0 mm Dicke, wenn bestimmte weitere Risikofaktoren vorhanden sein sind. In Deutschland wird bei Melanomen von mehr als 2 mm Eindringtiefe eine Immuntherapie mit Interferon-alpha empfohlen, die zusätzlich zur Operation durchgeführt wird. Interferon-alpha regt das körpereigene Abwehrsystem an, eventuell verbliebene, nicht sichtbare Tumorzellen zu bekämpfen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015).

Haben sich bereits Tochtergeschwülste in inneren Organen gebildet, z.B. Lunge, Knochen, Leber, Gehirn, können neben der Operation Strahlentherapie, Immuntherapien und auch unter bestimmten Voraussetzungen, die so genannte „Targeted Therapy“, zielgerichtete Behandlungen, angewendet werden. Vemurafenib kommt aus der Gruppe der so genannten „Targeted Therapy“. Diese Substanz wird bei Patienten angewendet, bei denen in der Melanomzelle eine bestimmte BRAF-Mutation gefunden wird. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung des RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweges, der relevant ist für die Tumorentwicklung und -progression des Melanoms (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015).

Im Zentrum der Melanomforschung stehen insbesondere weitere Immuntherapien, die das Immunsystem gegen die Krebszellen aktivieren sollen. Wirkstoffe in Form monoklonaler Antikörper und kombinierte Therapien mit immunologischen Medikamenten und der „Targeted Therapy“, stehen dieser gezielten Therapie gegen Melanomzellen zur Verfügung. Diese Kombinationstherapien stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine weitere Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten beim fernmetastasierten Melanom dar (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015).

1.3 Melanom und das mehrstufige Modell der Krebs-Entstehung

Krebs ist eine Erkrankung, bei der dynamische Veränderungen des Genoms beteiligt sind, z. B. Mutationen von Onkogenen, die mit einem dominanten Funktionsgewinn assoziiert sind, und von Tumorsuppressorgenen, deren Funktion in der Tumorentstehung verloren geht. Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess von genetischen Veränderungen, die zur progressiven Transformation von normalen Zellen zu einem malignen Derivat führen. Die Genome von Tumorzellen können an mehreren Stellen durch Punktmutation bis hin zu komplexen Chromosomtranslokationen verändert werden (Kinzler und Vogelstein, 1996).

Die Entstehung eines malignen Phänotyps erfordert mindestens eine Veränderung in sechs verschiedenen zellphysiologischen Prozessen: dauerhafte proliferative Signalisierung, Entgehen der Wachstumssuppression, Umgehung der Apoptose, unlimitedes replikatives Potential, kontinuierliche Angiogenese, Invasion in Gewebe und Metastasierung (siehe Abb. 1.4; Hanahan und Weinberg, 2011). In 40% der humanen Melanome wurden Mutationen im B-RAF-Protein gefunden, die zu einer konstitutiven Signalisierung des Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Wegs führt (Davies und Samuels, 2010). Die Überaktivierung dieses Signalwegs verursacht eine stark-erhöhte Proliferation. Ein anderes Protein dieses Signalwegs ist das N-Ras-Protein. Die Mutationen in N-Ras wurden oft bei chronisch sonnenexponierten Bereichen gefunden. Außerdem spielt die Entgehung der Wachstumssuppression auch eine Rolle im Melanom. Sowohl in Melanomzell-Linien als auch bei Melanom-Patienten wurden Deletionen im Gen CDKN2A gefunden. Dieses Gen kodiert zwei Proteine. Das eine Protein, p14ARF, inhibiert Mdm2, welches p53 degradiert. Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Hocker, et al., 2009).

Das Versagen beim Aufrechterhalten des Gleichgewichts zwischen Zellteilung, Zelltod, und Zellen, die eigentlich absterben sollen, führt zur Malignität-Entstehung. Im Krebs gibt es generell zu wenig Apoptose (Wong, 2011). Störungen oder Defekte bei diesem Prozess ermöglichen chemoresistente Melanomen den Zelltod zu umgehen (Hocker, et al.,

2009). APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) spielt eine essentielle Rolle bei der Apoptose in Melanom. In der Anwesenheit von Cytochrome C und dATP wird APAF in ein oligomerisches Apoptosom eingebaut und ist verantwortlich für die Aktivierung von Procaspase-9 und das Aufrechterhalten der enzymatischen Aktivität durch Caspase-9 (Bao, et al., 2007). Soengas, et al. (2001) berichtet, dass die metastasischen Melanome die APAF-1-Expression verloren haben. Ein anderer Vorgang bei der Krebsentstehung, der auch in Melanom stattfindet, ist die unlimitierte Replikation. Humane Telomere beinhalten viele Basen der "TTAGGG"-Sequenz. Ein Teil dieser terminalen Sequenzen war von den Enden der Chromosomen bei jeder S-Phase wegen unvollständiger DNA-Replikation verloren gegangen. Aber die *de novo* Zugabe von TTAGGG-Sequenzen durch Telomerase kompensiert diesen Verlust. Carvalho, et al. (2006) hat die Telomerase-Aktivität (TA) von gutartigen melanozytären Tumoren und von Melanomen untersucht. Während 67% der Melanome eine TA aufwiesen, wurde die TA nur bei 7% der gutartigen Tumore detektiert.

Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass die Angiogenese durch das Protein PTN in Melanomen gefördert wurde. Wu et al. (2005) berichtete, dass innerhalb primären Melanomen die PTN-Immunoreaktivität mit der Metastasierung und verminderter Überlebenszeit assoziiert ist. Es wurde auch über verschiedene Proteine berichtet, die bei der Invasion von Melanomen eine Rolle spielen z. B. E-Cadherin, SLUG, und NEDD1 (Kyrigidis, et al, 2010).

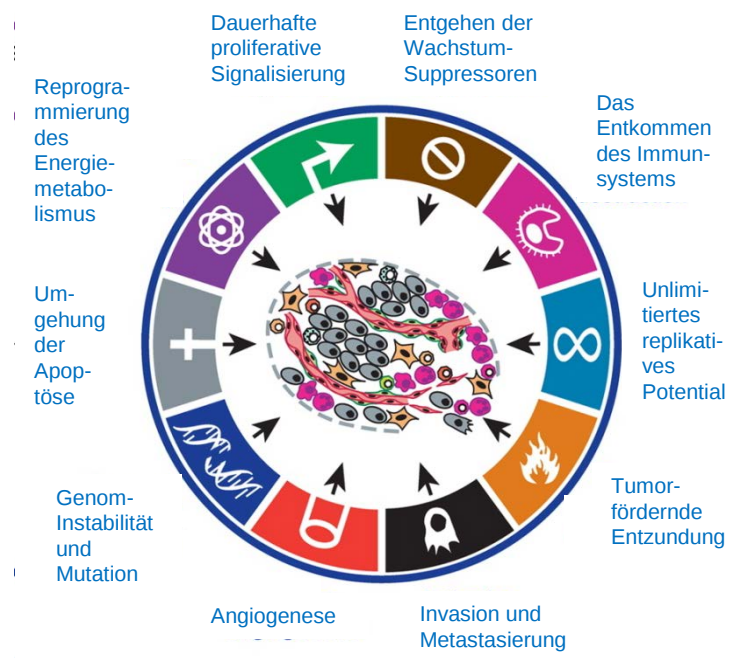


Abb. 1.4: Für die Krebsentstehung sind genetische Alterationen in verschiedenen Mechanismen der Zellphysiologie nötig (Hanahan und Weinberg, 2011, modifiziert).

Die konzeptuellen Fortschritte in der letzten Dekade haben zwei Prozesse zu der Liste hinzugefügt, Reprogrammierung des Energie-Metabolismus und das Entkommen der

Kontrolle des Immunsystems, die in der Krebsentstehung stattfinden. Entscheidend für das Erwerben dieser Tumoreigenschaften sind genomische Instabilität und Inflammation (siehe Abb. 1.4; Hanahan und Weinberg, 2011).

1.4 Invasion und Metastasierung bei Melanom

Trotz neuen Entwicklungen und Fortschritten in der Diagnose, in operativen Techniken, in genereller Patientenbetreuung, und in lokalen und systemischen Therapien, sind die meisten Krebstodesfälle auf die Resistenz der Metastasen gegen die konventionellen Therapien zurück zu führen (Talmadge und Fidler, 2010). Dies betrifft auch Melanom-Patienten (Zbytek, et al., 2008). Etwa 90% der Todesfälle wurden durch Metastasen verursacht (Gupta und Massagué, 2006). Die Median-Zeit zwischen der Diagnose des primären Melanoms und den Befund einer Metastase ist 2,6 Jahre (Kim, et al., 2010). Die durchschnittliche Überlebenszeit bei Auftreten von Fernmetastasen beträgt aber nur 6-7 Monate (Fritsch, 2009).

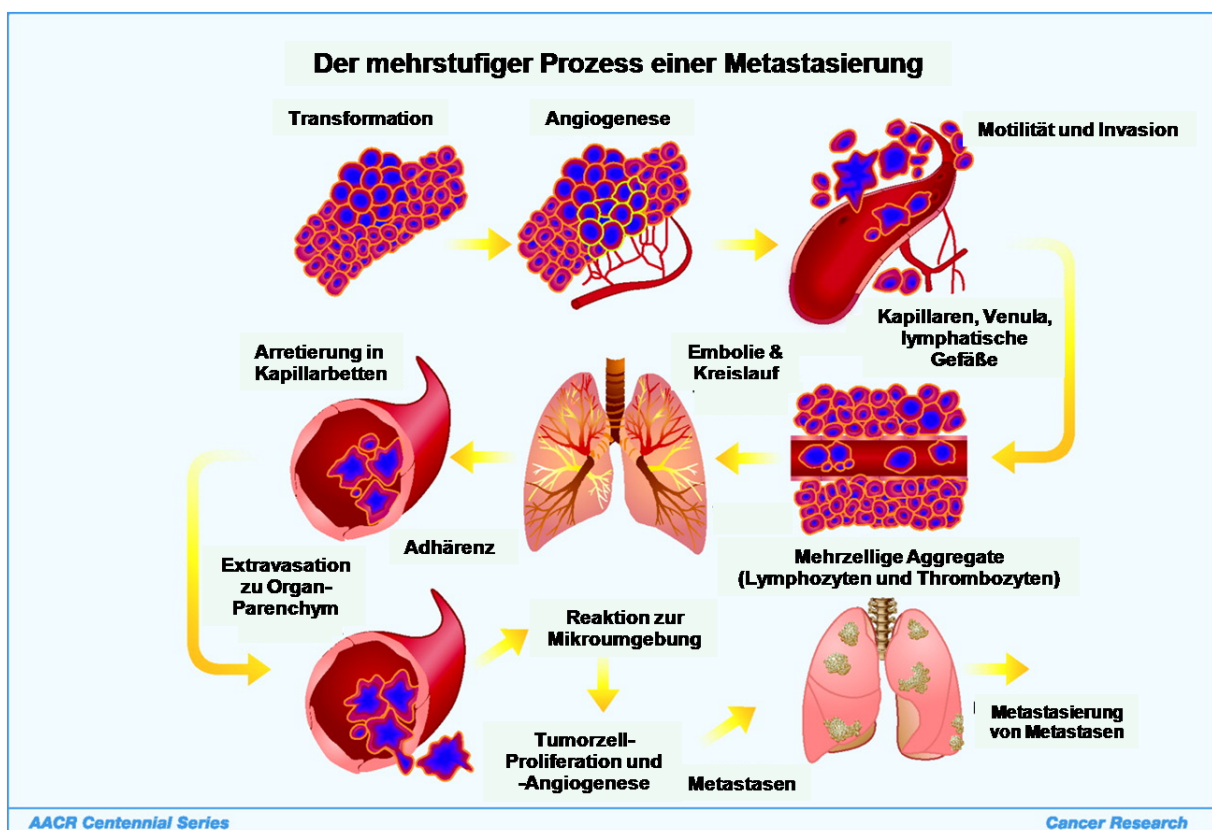


Abb. 1.5: Der Metastasierungsprozess besteht aus sequenziellen und selektiven Schritten. Das Ergebnis jedes Schritts ist abhängig von der Interaktion zwischen metastasierender Subpopulation und homöostatischen Faktoren (Talmadge und Fidler, 2010, modifiziert).

Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess (siehe Abb. 1.5). Am Anfang des Prozesses ist die Entstehung eines Primär-Tumors und die Entwicklung dieses Tumors zu einem invasiveren Typ. Die nächsten Schritte zur Metastasierung im Melanom sind die

Bildung von Gefäßen, die Entgehung der Immun-Kontrolle, die Bildung von Embolien, Extravasation und zuletzt die Siedelung von Tumorzellen in einem Organ (Metastase). Die kutanen Melanome, die Melanome in der Haut, metastasieren oft zur Lunge. Sie können aber auch zum Dünndarm metastasieren. Die Leber ist das Haupt-Zielorgan bei der Metastasierung von Aderhaut-Melanomen (Zbytek, et al., 2006).

Melanome stammen aus Melanozyten, die normalerweise in der Basal-Schicht der Epidermis vorkommen. Aus der unkontrollierbaren Proliferation von Melanozyten entstehen melanozytäre Nävi, die unterschiedliche Dysplasie-Grade zeigen können. Die Meisten von denen entwickeln sich nicht zu einem malignen Melanom (siehe Abb. 1.6), aber Einige von denen breiten sich aus. Es wurde aber auch herausgefunden, dass einige dysplastische Melanozyten zunächst keine Nävi bilden, sondern direkt eine Läsion mit einer Fähigkeit, sich zu streuen, bilden (Gaggioli und Sahai, 2007).

Das Ursprungswachstum von dysplastischen Melanozyten verläuft meist lateral und findet innerhalb der Epidermis statt. Dies wird als das radiale Wachstum (Radial Growth Phase, RGP) bezeichnet und ist mit einer guten Prognose korreliert. Allerdings zeigt die nächste Phase, das vertikale Wachstum (Vertical Growth Phase, VGP), mehr sichtbare Invasion in die Dermis und ist klinisch gefährlicher. Die Umwandlung in VGP ist mit dem Erwerben von metastatischen Eigenschaften korreliert, da die Zellen in die Basal-Membran eindringen und eine verstärkte Vaskularisierung haben. Dies bedeutet, dass die Zellen wahrscheinlich weit auswandern können. Der VGP-Tumor kann sich dann in mehrere aggressive Varianten von Melanomen entwickeln. Dies wird durch eine verstärkte Vaskularisierung und Invasion gezeigt (Gaggioli und Sahai, 2007).

Die Bildung von neuen Gefäßen in Primär-Tumoren und Metastasen ist sehr bedeutsam. Dadurch können neue Wege für die metastatische Disseminierung entstehen (Carmeliet und Jain, 2000).

Danach erfolgt das Eindringen in die Blutbahn oder in die Lymphbahn. Das Zell-Adhäsion-Molekül MCAM ist überexprimiert, wenn Melanome invasiv werden. Dieses Protein fördert die Interaktion zwischen Melanom- und Endothel-Zellen und begünstigt dadurch den Eintritt in die Gefäße (Bogenrieder und Herlyn, 2002).

Außerdem entwickeln Melanome unterschiedliche Mechanismen, um zu verhindern, dass sie von Immunzellen angegriffen werden. Eine Strategie von Melanomzellen ist der inhibitorische Effekt von Zytokinen für die Proliferation zu verhindern. Oncostatin M ist ein IL-6-Zytokin, das *in vitro* die Melanom-Proliferation inhibiert. Metastatische Melanome entwickeln eine Resistenz gegen diese Zytokine durch die Modifikation des Rezeptors von Oncostatin M (Lacrouette, et al., 2007).

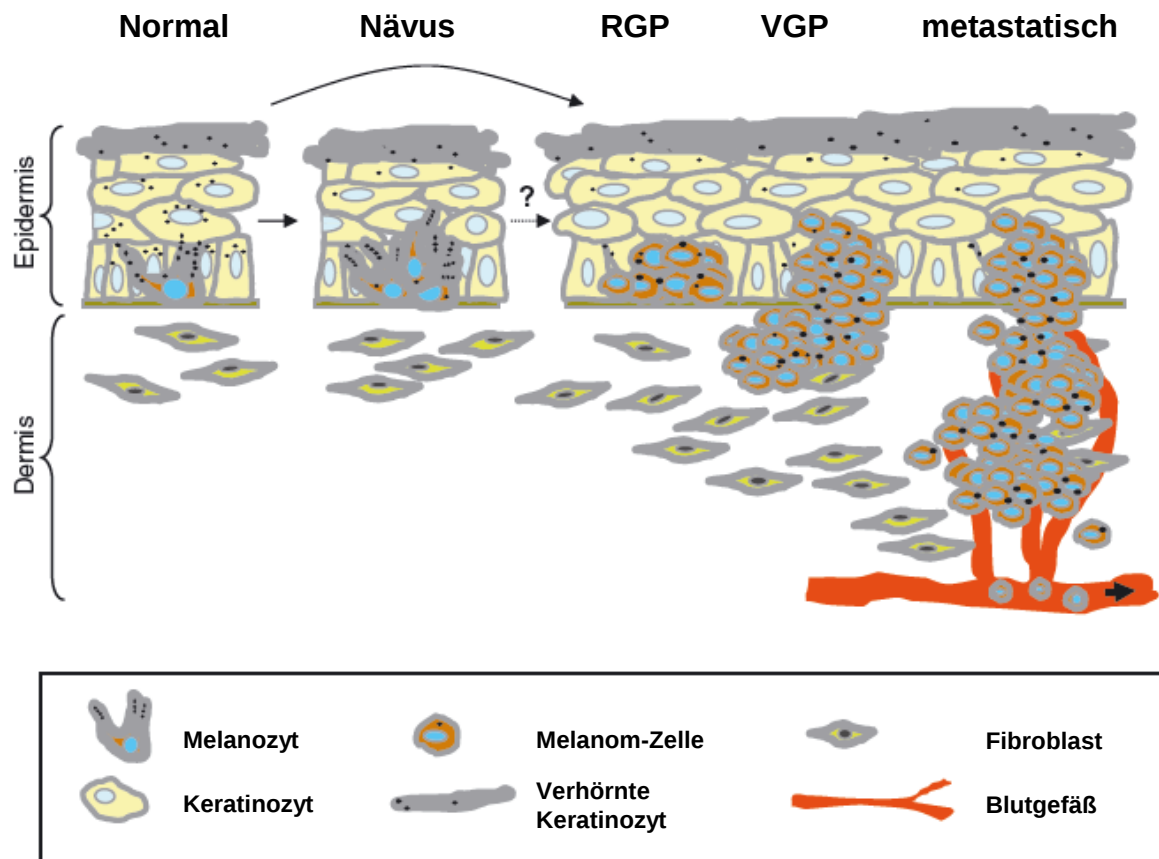


Abb. 1.6: Die Entwicklung eines metastatischen Melanoms. Die Entwicklung eines Melanozyten zu einem malignen Melanom ist dargestellt. Viele Nävi entstehen, aber nur wenige werden in einen malignen Typ gewandelt. Außerdem kann ein maligner Typ direkt aus Melanozyten ohne die Nävus-Phase entstehen (Gaggioli und Sahai, 2007).

Obwohl Melanome hauptsächlich durch die Lymphbahn metastasieren, wurde aber der Prozess von Melanomzellen, bei dem sie an den Endothelzellen anhaften und die anschließend in extrazelluläre Matrix (ECM) invadieren, sehr ausführlich untersucht. Dieser Prozess ist die sogenannte Extravasation, bei dem die Melanom-Zellen aus den Gefäßen in die umgebenden Gewebe auswandern. Die wichtigen Punkte bei diesem Prozess sind die Adhäsion zu Endothel-Zellen und der Abbau von ECM-Komponenten (Zbytek, et al., 2008)

Neutrophile fördern die Adhäsion von Melanom-Zellen zu dem Endothelium und die anschließende Extravasation. Dies geschieht durch die Bindung von ICAM-1 an Melanomzellen und $\beta 2$ -Integrine an Neutrophile (Liang, et al., 2008). Es gibt aber einige Melanomzellen, die andere potentielle Kandidaten exprimieren, die die Adhäsion vermitteln können z.B. $\alpha \beta 3$ - or $\alpha 4 \beta 1$ -Integrine. Darüber hinaus ist die Produktion von Metalloproteasen von Krebszellen sehr wichtig, da die Tumorzellen bei dem erhöhten interstitiellen Druck wegen des Tumorwachstums Kollagen in der ECM degradieren müssen. Es wurde gezeigt, dass

aggressive Melanome Matrix-Metalloproteinasen produzierten z.B. MMP-1, -2, -9, -14 (Seftor, et al., 2001).

Die Melanom-Zellen haben unterschiedliche Strategien zu migrieren bzw. invadieren. Wenn es keine ECM-Barriere gibt, sondern nur eine mit ECM- beschichtete Oberfläche, führen die Melanomzellen diese vier Vorgänge durch: 1. Erweitern der Ausstülpung, 2. die Adhäsion, 3. die Kontraktion, 4. De-Adhäsion. Die Erweiterung der Ausstülpung erfolgt durch Aktin-Polymerisierung. Wenn eine Zelle schon eine Austülpung erweitert hat muss sie eine neue Adhäsion bilden, um die Austülpung zu stabilisieren. Die Haupt-Moleküle bei diesem Prozess sind die Integrine. Viele Arbeitsgruppen haben über die deregulierte Expression von Integrinen in invasiven Melanomen berichtet (Melchiori, et al., 1995; Seftor et al., 1999; Van Belle et al., 1999).

Wenn die Adhäsionen zu der ECM schon gebildet sind, muss eine Kraft zu den Adhäsionen hinzukommen, sodass die Zellen sich bewegen können. Diese Kraft wird durch die produktive Interaktion zwischen Aktin und Myosin-Motor-Proteinen generiert. Der letzte Schritt dieses Prozesses ist die De-Adhäsion. Wenn eine Kontraktions-Kraft zu diesen Adhäsionen zugegeben wird, ohne einige Adhäsionen wieder zu entfernen, wird die Zelle nur einen internen Druck bilden, kann sich aber dann nicht bewegen. Deshalb ist die Ablösung von einigen Adhäsions-Komplexen für eine effektive Motilität erforderlich (Gaggioli und Sahai, 2007).

Um durch eine dichte ECM-Barriere durch zu wandern, müssen die Melanom-Zellen aber die ECM mit Metalloproteinasen degradieren. Außer Matrixmetalloproteinasen produzieren die Melanomzellen auch Cathepsine für den ECM-Abbau (Gaggioli und Sahai, 2007). Außerdem werden die fokale Kontaktbildung und die Invasion je nach ECM-Substrat von unterschiedlichen Integrinen reguliert. Das $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin bindet an fibrillem Kollagen. Es gibt aber außer Integrinen auch noch andere Rezeptoren, die auch für die Adhäsion zum ECM-Substrat verantwortlich sind. Einer von diesen Rezeptoren ist CD44. In einer Melanomzell-Linie mit einer sehr hohen Motilität, MV3, unterstützten sowohl Integrine als auch CD44 die Invasion. Während Integrine für die Invasion durch Kollagen verantwortlich sind, ist CD44 für die Invasion durch Hyaluronan verantwortlich (Maaser, et al., 1999). Weitere Studien berichteten auch über die Förderung der Invasion durch Integrine in Melanomen (Integrine $\alpha 2 \beta 1$ und $\beta 3$) (Klein, et al., 1991; Trikha, et al., 1997).

Darüber hinaus können Melanomzellen sowohl als Einzelzellen als auch als Gruppe migrieren oder invadieren. Als Einzelzellen migrieren die Krebszellen durch eine amöboide- oder mesenchymale Bewegung. Die Zellen mit der mesenchymalen Bewegung sind spindelförmig und die Migration bzw. Invasion ist abhängig von der Adhäsion durch Integrin und von der Anwesenheit der Kontraktionskraft an beiden Zell-Enden (Friedl und Wolf,

2003). In Maaser et al. (1999) wurde die Invasion einer MV3-Zelle in der Kollagen-Matrix gezeigt. Diese Melanom-Zelle war spindelförmig. Tumorzellen können als Einzel-Zellen in die Blut-/Lymph-Gefäße eindringen (Van Zijl, et al., 2011).

Bei der kollektiven Invasion gibt es fordernde hochmobile Zellen, die die Migrations-Spur für die hinteren Zellen bilden. In *ex vivo* Primär-Melanom-Modellen, die in 3D-Kollagen-Matrix kultiviert werden, war die Invasion der multizellulären Kluster von der Funktion von β 1-Integrin-1 abhängig. Hier wurde außerdem gezeigt, dass die β 1-Integrin-Expression in fordernden invadierenden Zellen konzentriert war (Hegerfeldt, et al., 2002). Außerdem berichteten Hegerfeldt, et al. (2002), dass nachdem die kollektive Invasion durch Zugabe von β 1-Integrin-1-Antikörpern inhibiert wird, die Zellen eine neue Migrations-Strategie entwickeln. Hier migrieren die Zellen einzeln mit einer amöboiden Bewegung, welche β 1-Integrin-unabhängig ist. Dieses zeigte, dass es die Melanomzellen nicht nur kollektiv im Stroma migrieren können, sondern auch als Einzel-Zellen im Stroma migrieren.

Die kollektive Invasion spielt wahrscheinlich auch bei allen Schritten zur Metastasierung z. B. der lokalen Invasion, dem Eintritt in die Blut-/Lymph-Gefäße, und dem metastatischen Aussäen eine Rolle (Friedl, et al., 2012). Friedl und Wolf, 2003, haben beschrieben, was der Vorteil der kollektiven Invasion für die Zellen sein könnte. Die große Zellgruppe kann promigratorische Faktoren und Matrix-Proteasen mit hohen Konzentrationen produzieren und die inneren Zellen von dem immunologischen Angriff durch Lymphozyten und natürliche Killerzellen schützen. Außerdem bewegen sich heterogene Gruppen von Zellen als eine Einheit gemeinsam. Hier können die mobileren Zellen die Invasion von weniger mobilen Zellen fördern. Die Zellen mit der geringeren Motilität sind vermutlich Apoptose-resistente Klone, die damit wahrscheinlich die Invasionseffizienz und die Überlebensfähigkeit erhöhen (Friedl und Wolf, 2003).

Außerdem könnten die Krebszellen den Migrations-Mechanismus reprogrammieren, sodass sie ihre invasiven Eigenschaften aufrechterhalten können. Dies geschieht durch morphologische und funktionelle Dedifferenzierung. Krebspräparate, die gegen Adhäsionsrezeptoren oder Matrix-verdauende Enzyme gezielt sind, zeigten deshalb vermutlich keine effektive Wirkung in den klinischen Forschungen (Friedl und Wolf, 2003).

1.5 ZO-1

Eine wichtige Funktion von Epithel- und Endothelzellen ist ihre Ion- und Größe-selektive Barrierefunktion zwischen benachbarten Geweben. Interzelluläre Verbindungen, z.B. Adhärenz- und Tight-Junctions spielen eine entscheidende Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung von epithelialen und endothelialen Barrieren. Tight-Junctions (TJs) sind

die am weitesten apikale liegenden Strukturen des Apikalkomplex, die apikale- und basolaterale Domänen abgrenzen (Niessen, 2007).

ZO-1, Zona Occludens-1, ist das erste gefundene TJ-Protein. Stevenson, et al (1986) hatte einen monoklonalen Antikörper mit TJ-Membranfraktion als Immunogen hergestellt, der ein 225-kD TJ-assoziiertes-Polypeptid in der Leber erkannt hat. Dieses Polypeptid wurde dann als ZO-1 benannt. Dieses Protein gehört zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs) und besteht aus einer SH3-Domäne, einem GUK-Domäne, einer Prolin-reichen-Domäne und drei PDZ-Domänen, die sich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligen. Außerdem gibt es auch eine variable Domäne, die sogenannten U-Domäne (siehe Abb. 1.7, Bauer, et al., 2010). ZO-1 interagiert mit anderen ZO-Proteinen, ZO-2 (Gumbiner, et al., 1991; Jesaitis und Goodenough, 1994) und ZO-3 (Haskins, et al., 1998) durch die Bindung der jeweiligen PDZ-2 Domänen (Utebergenov, et al., 2006).

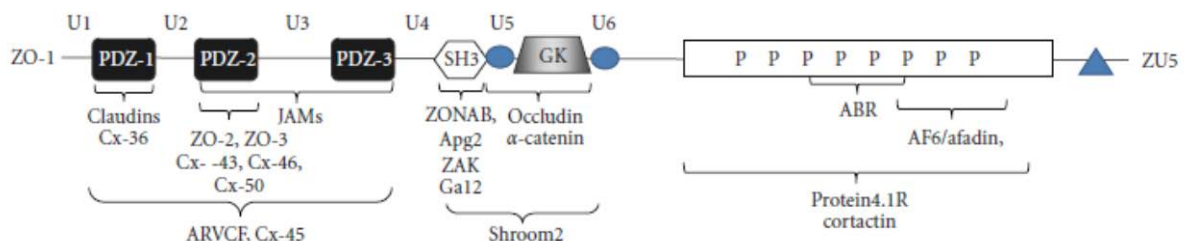


Abb. 1.7: ZO-1 interagiert mit transmembranen Proteinen und mit peripheren zyttoplasmatischen Proteinen an der Zell-Zell-Verbindung (Bauer, et al., 2010). ABR: Aktin bindendes Bereich; AF-6: ALL-1 Fusion-Partner am Chromosom 6; Apg-2: (ATP und Peptid-bindendes Protein in Keimzellen)-2; Cx: Connexin; Ga12: G Protein α 12 Subunit; GUK: Guanylat-Kinase-ähnliche Domäne; JAM: Junction-Adhäsion-Molekül; hScrib: human Scribble; PATJ: Protein associated with tight junctions; P-P-P: Proline-reicher Bereich; PDZ: Psd95/discs large/zonula occludens-1-Domäne; SAF-B: Scaffold attachment Faktor-B; SH3: Src Homologie-3 Domäne; U1-U6: Unique variablen Domäne; ZAK: ZO-1 assoziierte Kinase; ZONAB: ZO-1 assoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein; ZU5: Domäne in ZO-1 und Unc5-ähnliche Netrin-Rezeptoren.

PDZ ist eine Abkürzung von den Mitgliedern der Proteine, die diese Domäne besitzen, das postsynaptische Dichte-Protein (PSD95/SAP90), das "Drosophila septate junction protein Discs-large" (Dlg), und ZO-1. SH3-Domänen wurden in Proteinen gefunden, die bei den Signalwegen zur Regulierung des Zytoskelets beteiligt sind, das Ras-Protein, die Src-Kinase und viele andere. Außerdem binden ZO-Proteine manche peripheren junctionalen Proteine z.B. Aktin- und Myosinbindende Proteine, Signalmoleküle, und transkriptionelle Regulatoren. Dazu wechselwirken alle ZO-Proteine direkt mit Aktinfilamenten (Bauer, et al., 2010). Außer ihrer charakterischen Domänen besitzen ZO-Proteine Kernlokalisations- und Kernexportsignal, das ihr Pendeln zwischen Zytoplasma und Kern ermöglicht.

Obwohl ZO-1 sich typischerweise in Tight Junctions von epithelialen Zellen befindet, kommt es auch in manchen nicht-epithelialen Zelltypen vor, z. B. in Astrozyten, Schwann-

Zellen und Sarkoma-Zelllinien. Diese Zelltypen bilden aber keine Tight-Junctions (Howarth, et al., 1992). ZO-1 kann in anderen Zellverbindungen wie bei Adhärenz- und Gap-Junction gefunden werden. Darüber hinaus wurde es in vielen Studien auch belegt, dass dieses Protein nicht nur strukturelle Barriere-Funktionen hat, sondern auch beteiligt ist bei der Signaltransduktion und der Transkriptionsregulierung (Bauer, et al., 2010).

1.5.1 ZO-1 und Zellverbindungen

Membranen von benachbarten Zellen bilden interzelluläre funktionale Komplexe, um die Nachbar-Zellen zu verankern (Adhärenz-Verbindung), um eine parazelluläre Barriere herzustellen (Tight-Junction), um die Diffusion von integralen Proteinen zu verhindern (Tight-Junction) und um die Zell-Zell-Diffusion von kleinen Ionen und Molekülen zu erlauben (Gap-Junction). Alle diese Zellverbindungen haben gemeinsame Adapterproteine, die ZO-Proteine (Derangeon, et al., 2009).

ZO-Proteine sind Gerüstproteine, die unterschiedliche Proteine zum zytoplasmatischen Bereich der Zellverbindung rekrutieren (Bauer, et al., 2010), z. B. Moleküle für die Bildung von Aktinzytoskelett-Adhäsionskomplexen an der führenden Stelle einer migrierenden Zelle (Taliana, et al., 2005). Außerdem binden ZO-Proteine Barrierebildende Claudine und interagieren mit Signalproteinen und anderen strukturellen Proteinen in der Tight Junction-Struktur und -Funktion (Fanning und Anderson, 2009). Es gibt drei Mitglieder der ZO-Protein-Familie: ZO-1, -2, and -3. Nur ZO-1 und ZO-2 sind im Zellkern lokalisiert. Die drei Proteine haben alle drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne, eine GUK-Domäne und einen Prolin-reichen Bereich, der entweder an dem C-Terminus (ZO-1 und ZO-2) oder zwischen der zweiten und der dritten PDZ-Domäne (ZO-3) liegt. Darüber hinaus interagieren alle ZO-Proteine direkt mit Aktin-Filamenten entweder via ihre COOH-Terminus-Bereiche (ZO-1, ZO-2) oder via N-Terminus-Bereich (ZO-3) (Bauer, et al., 2010). Die Tight-Junction (TJ) ist die apikalste Verbindung zwischen epithelialen Zellen und fungiert sowohl als eine Barriere für die parazelluläre Diffusion von Ionen und Molekülen, als auch als Zaun, der die apikale Plasmamembran von dem basolateralen Bereich von Zellen trennt (D'Atri und Citi, 2002; Kirschner 2010). ZO-1 und ZO-2 sind wichtig für die Bildung von TJ. Nach der Herunterregulation von ZO-1 hatten MDCK-Zellen keine typischen TJ-Stränge mehr. Außerdem ist die parazelluläre Permeabilität höher (Fanning, et al., 2012). Die Interaktion von ZO-1 mit dem C-Terminus von Claudinen wird durch PDZ-1 etabliert (Itoh, et al. 1999). Während JAMs an PDZ2/3 von ZO-1 binden (Ebnet, et al. 2000), bindet Occludin an die SH3-GUK Domäne (Schmidt, et al., 2004) (siehe Abb. 5).

Außerdem spielen ZO-Proteine eine Rolle bei der Bildung und Funktion von Adhärenz-Verbindungen („adherens junction“, AJ). Sowohl in Wirbeltieren als auch in Wirbellosen binden sie unterschiedliche AJ-Proteine z. B. α -Catenin, ARVCF, p120 und AF-

6/afadin (Bauer, et al., 2010 und Fanning, et al., 2012). Adhärens-Verbindungen kommen in unterschiedlichen Bereichen des Körpers, besonders in Epithelien vor. Cadherine an der AJ binden die äußere Umgebung zum Aktin-Zytoskelett und sind beteiligt an der Signalgebung vom Außenbereich der Zelle zum Zytoplasma (Karp, 2005). In Non-Epithelzellen wirkt ZO-1 durch direkte Bindung seines Amino- und Carboxyl-Terminus mit Catenin und Aktinfilamenten als Vernetzungsprotein zwischen dem Cadherin/Cathenin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett (Itoh, et al., 1997).

Die Struktur und Funktion sowohl von Adhärens- als auch von Tight-Junctions ist vom kortikalen Aktin-Zytoskelett abhängig. Das Aktin-Zytoskelett spielt nicht nur eine Rolle bei der Zellmigration, sondern auch bei der Veränderung der Zellmorphologie. Aktin-Filamente liegen hauptsächlich im Kortex, ein enger Bereich direkt unter der Plasmamembran. In dieser Region sind die meisten Aktinfilamente in einem Netzwerk geordnet (Lodish, et al., 2000).

Darüber hinaus assoziiert sich ZO-1 mit Gap-Junctions durch direkte Interaktionen mit Connexinen (Kausalya, et al., 2001 und Li, et al., 2004), was auf eine generelle Funktion von ZO-Proteinen in intrazellulärer Adhäsion und Kommunikation hinweist. Es wurde gezeigt, dass ZO-1 direkt mit unterschiedlichen Gap-Junction-Proteinen interagiert z. B. Cx43 (Toyofuku, et al., 1998), Cx45 (Laing, et al., 2001), und Cx36 (Li, et al., 2004). Laing, et al (2005) hat gezeigt, dass eine Überexpression von ZO-1 in Osteoblasten zu einer erhöhten Permeabilität von Gap-Junctions führen.

1.5.2 Die physiologische Rolle von ZO-1 in normalen Geweben und Zellen

ZO-1 wird bereits sehr früh in der Entwicklung eines Organismus exprimiert. In den Blastomeren der Embryonen von Säugetieren wurde ZO-1 schon detektiert (Fleming, et al., 1989). Die Anwesenheit dieses Proteins ist wichtig für die erfolgreiche Entwicklung eines Embryos. Eine fatale Konsequenz vom fehlenden ZO-1 zeigte das Sterben eines Maus-Embryos. Der Embryo erlitt massive Apoptose im Notochord und in neuralen Gefäßen. Außerdem war die vaskuläre Entwicklung im Dottersack gestört (Katsuno, et al., 2008).

Außerdem wurde bei einer Studie auch die Rolle von ZO-1 in der Migration untersucht. Taliana, et al. (2005) berichtete über die Anwesenheit von ZO-1 an der Front von migrierenden Fibroblasten und vermutete deshalb, dass ZO-1 die Adhäsionskomplexe während der Migration organisiert.

ZO-1 interagiert sowohl mit nukleären Proteinen, als auch mit zytoplasmatischen Proteinen (Bauer, et al., 2010). Viele Studien belegen, dass solches Protein, das zwischen Nukleus und Zytoplasma pendelt, in Signalwegen beteiligt ist. Die SH3-Domäne von ZO-1 bindet unterschiedliche Signalproteine, z. B. Serin-Protein-Kinase (ZAK), Y-Box-Transkriptionsfaktor ZONAB-Protein (ZO-1-assoziiertes Nuklein-Säure-bindendes Protein),

das Hitzeschockprotein Apg2 und das G-Protein Ga12 (Bryse, et al., 2002). Die Interaktion zwischen ZO-1 und ZONAB reguliert die Proliferation von manchen Zellen, z. B. von MDCK-Zellen. Das ZO-1-Level ist in proliferierenden MDCK-Zellen niedrig und steigt mit der Zelldichte. Die Überexpression vom ZO-1 inhibiert die nukleäre Ansammlung von ZONAB und ZONAB kolokalisiert dann mit ZO-1 an der Zellverbindung. Demzufolge ist die Proliferation gehemmt, da eine nukleäre ZONAB-Lokalisation für die Proliferation notwendig ist (Balda und Matter, 2000).

ZO-1 fördert außerdem die Differenzierung von embryonalen Stamm-Mauszellen (ESZ) zu ihren epidermalen Zell-Linien durch die Inhibition der Signalwege in ESZ-Regeneration (z.B. Stat3) und durch die Aktivierung der Signal-Wege in der Differenzierung (z. B. Erk) (Xu, et al., 2012). Aufgrund der Ergebnisse der Studien könnte vermutet werden, dass ZO-1 mit seinen Multidomänen noch mit anderen Signalproteinen interagiert und die jeweiligen Signalwege beeinflusst.

1.5.3 ZO-1 in der Tumorgenese

Das ZO-Protein gehört zur Familie der MAGUK-Proteine (Membran-assoziierte Guanylat-Kinasen). Ein anderes Protein, auch ein Mitglied dieser Familie, ist Dlg. Die Homologie von ZO-Proteinen mit Drosophila Tumorsuppressor-Protein DlgA (Willot, et al., 1993) dient als erster Hinweis auf die bisher unbekannte Rolle von ZO-Proteinen in der epithelialen Krebsentwicklung und/oder Progression. Dlg Protein mit Mutationen verursacht neoplastisches Überwachstum von larva-imaginalen Disc-Zellen (Woods und Bryant, 1989).

So wie Dlg fungiert ZO-1 in verschiedenen Krebsarten als ein Tumorsuppressor. Unterschiedliche Studien berichteten darüber, dass eine verminderte ZO-1-Expression mit einer Tumormanifestation in Brustkrebs und in kolorektalen Karzinomen korreliert ist (Martin, et al., 2004; Kaihara, et al. 2003). Brustkrebs-Patienten mit Metastasen haben ein signifikantes vermindertes ZO-1-Level im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen (Martin, et al., 2004). Dennoch ist ZO-1 in verschiedenen Krebsentitäten z. B. Pankreaskrebs, Magenkrebs und Melanom überexprimiert (Kleeff, et al. 2001; Resnick, et al., 2005; Smalley, et al., 2005).

Polette, et al. (2005) beschrieb eine andere Rolle vom ZO-1 in Brustkrebs. Die Herunterregulation von ZO-1 durch siRNA verminderte die Invasivität der Tumorzellen, was nicht einem Tumorsuppressor entspricht. Hier ist die Expression einer Matrix-Metalloproteinase, MT1-MMP, nach dem ZO-1-Knockdown vermindert. Da ZO-1 in invasiven Tumorzellen im Zytoplasma konzentriert ist und die MT1-MMP-Expression durch ZO-1 reguliert wird, wird es hypothetisiert, dass ZO-1 an Invasions-Signalwegen beteiligt ist. Eine andere Studie bestätigt die Rolle von ZO-1 in der Migration. Es wurde gezeigt, dass ZO-1

mit $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an den Lamellen von migrierenden Lungenkrebs-Zellen interagiert. Die Herunterregulation von ZO-1 verursachte eine verminderte gerichtete Zellmigration (Tuomi, et al, 2009).

Interessanterweise ist die ZO-1-Expression in Magenkarzinomen je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich. In normalem Epithelium und in differenzierten Tumoren ist ZO-1 an der apikalen Seite der Zellen exprimiert, die eine Drüsen-ähnliche Struktur bilden. In undifferenzierten Adenokarzinomen ist die ZO-1-Expression aber stark reduziert bis nicht nachweisbar (Kimura, et al., 1997).

Darüber hinaus ist ein verändertes ZO-1-Level auch in Hautkrebsarten gefunden worden. ZO-1 wurde in Merkel-Zell-Karzinomen gefunden, aber die Merkelzelle ist ZO-1 negativ (Haass, et al., 2003). Merkel-Zell-Karzinom-Zelllinien sind auch ZO-1 positiv (Fuchs, 2011). Über eine andere Hautkrebsart berichtet Smalley et al. (2005) als Allererster darüber, dass die Expression von ZO-1 in Melanomproben und Melanomzelllinien hochreguliert ist. In Melanozyten wurde keine ZO-1-Expression nachgewiesen. Andere normale Hautzellen, wie Keratinozyten und Fibroblasten exprimierten aber ZO-1.

Melanomzellen besaßen aber andere typische TJ-Proteine wie Claudin-7 und Occludin nicht. Nur eine Melanomzell-Linie exprimierte Occludin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das erhöhte ZO-1-Level nicht von veränderten Tight-Junctions verursacht wird (Smalley, et al, 2005).

Smalley, et al (2005) untersuchte die Expression von Adhärenz-Junction-Proteinen in Melanomen. ZO-1 war in metastasierten Melanomen stark exprimiert und es gab eine Kolo-kalisation von ZO-1 mit N-Cadherin in den gesamten Tumoren. In Melanomzellen kolo-kalisierte ZO-1 nicht nur mit N-Cadherin sondern auch mit anderen Adhärenz-Junction-Proteinen, z. B. β -Catenin und phospho-p120-Catenin. Manche Melanomzellen exprimierten E-Cadherin aber nicht an dem Zell-Zell-Kontakt, sodass es vermutlich nicht funktionell ist. Andere getestete Melanomzellen besaßen kein E-Cadherin. Im Gegensatz dazu ist die Interaktion von ZO-1 und N-Cadherin aber funktionell. Kalzium-Switching-Experimente zeigten, dass die beiden Proteine unter Hochkalzium-Bedingung zur Zell-Zell-Adhäsion rekrutiert wurden. Außerdem ist die physikalische direkte Interaktion dieser beiden Proteine durch eine Immunopräzipitation bestätigt. Der Verlust von E-Cadherin und die Hochregulation von N-Cadherin wurde bei einer malignen Transformation von Melanomen oft beobachtet (Li, et al., 2001; Haass, et al., 2004). Durch den Verlust von E-Cadherin kann die Kommunikation zwischen Keratinozyten und Melanozyten nicht gewährleistet werden. Demzufolge entkommen werdende Melanomzellen der Keratinozyten-Kontrolle und kommunizieren miteinander und mit Fibroblasten via N-Cadherin-basierendem Zellkontakt (Haass, et al., 2004).

Darüber hinaus berichtet Smalley, et al. (2005), dass der lentivirale Knockdown mit einem shRNA-Konstrukt in einer Melanomzell-Linie eine verminderte Invasivität und Adhäsion zeigt. Dass reduzierte Adhäsion die Invasion beeinträchtigt, scheint zunächst nicht plausibel. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass für eine Tumordinvasion eine sorgfältige orchestrierte Zell-Adhäsion zur benachbarten Matrix entscheidend ist. Somit könnte die Inhibition der Adhäsion die Zellmotilität blockieren (Smalley, et al., 2005).

In unserem Labor wurden bereits vor dieser Doktorarbeit auch Invasionsuntersuchungen von unterschiedlichen Melanomzell-Linien durchgeführt (Bohner, et al., 2011). Dabei zeigte sich, dass Sphäroide aus 1205Lu-Zellen invasiver waren als Sphäroide aus MV3-Zellen. Im Vergleich zu MV3-Zellen besaßen 1205Lu-Zellen mehr ZO-1-Protein. Dies deutet auch darauf hin, dass das ZO-1-Level bei der Invasion von Melanom-Zellen eine Rolle spielt.

1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit

ZO-1 ist in malignen Melanomen (MM) exprimiert, aber nicht in Melanozyten. In einer früheren Studie führte der shRNA-Knockdown von ZO-1 in WM35-Melanomzellen zu verminderter Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Invasivität (Smalley et al., 2005). In der Vorarbeit in unserem Labor konnte ZO-1 Expression aber bereits in benignen Nävuszellnävus (NZN) nachgewiesen werden, was gegen die reine An- bzw. Abwesenheit von ZO-1 als entscheidenden Faktor für die Malignität spricht. Unsere Hypothese ist daher, dass das ZO-1-Proteinlevel die Malignität von Melanomzellen beeinflusst.

Um dies zu testen, wurden lentivirale shRNA-Transfers in zwei Melanom-Zell-Linien, WM35 und 1205Lu-Zellen durchgeführt. Während die WM35-Zellen aus einem primären Tumor stammen, stammen die 1205Lu-Zellen aus einer Lungen-Metastase. Hierdurch wurden Melanomzellen mit unterschiedlichen ZO-1-Mengen generiert. Mit diesen sowie den Ursprungszellen wird eine Reihe von *in vitro* Phänotyp-Untersuchungen durchgeführt. Hier soll die Rolle von ZO-1 in biologischen Prozessen, die für die Tumورprogression entscheidend sind, z. B. Invasion, Migration, Proliferation, sowie Zelldissoziation aufgeklärt werden. Für diese Versuche wurden 2D-adhärenente Zellrasen und 3D-Sphäroide verwendet.

2. Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

In der Tabelle 2.1 werden die Geräte und Materialien, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.1: Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätename	Gerätetyp	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	Kelvitron [®] t	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bakterienkultur-Schüttler	G25	New Brunswick, Eppendorf AG, Hamburg, DE
Bakterien-Platte	92 x 16 mm mit Nocken	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Bakterien-Röhrchen	Polypropylen, 14 ml	Corning, Inc., New York, USA
Blotkammer	Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Blotkassette	Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad, Hercules, USA
Deckgläser	21x26mm Nr.1	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Digitalkamera	Leica EC3	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
Drehschüttler bei 4 °C	Auto Shake Genier	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Drehschüttler bei Raum-Temperatur	Tiny Turner	CTI, Idstein, DE
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Entwicklungsgerät für Western-Blot-Filme	Curix 60	Agfa, Berlin, DE
Feinwaage	Sartorius BP 210 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
Geldokumentationsanlage	Gene Genius System	Syngene, Cambridge, UK
Heizblock	Dri-Block DB3	Techne, Cambridge, UK
Heizmagnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach, DE
Mikroskop-Inkubator für Live Imaging	Mikroskop Olympus IX81gekoppelt mit dem Inkubator ACU03, Air Conditioning Unit, Evotec	Olympus und Evotec, Hamburg, DE (Einzelstück)
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica Camera AG, Wetzlar, DE

Multiwell Platten	Multiwell™ 96-, 24-, und 6-well	BD Falcon, Corning, Inc., New York, USA
NanoDrop-Photometer	NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrozellulosemembran für Western-Blot	Porengröße: 0,45 µm	Bio-Rad, Hercules, USA
Objektträger	Microslide, mit Mattstreifen, Kanten geschnitten oder geschliffen 90°C, halbweis	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE
Papier-Filter	8,5 x 9	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter	Knick 766 Calimatic	Knick GmbH&Co., Berlin, DE
Pipetten	Eppendorf Research 0,5-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
qPCR-Maschine	StepOne-PCR	Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
qPCR-Platte	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reinstwasseranlage	Astacus LS TI	Membrapure GmbH, Bodenheim, DE
Schaumstoff	Mini Trans-Blot foam pads, 4,8 x 11 cm	Bio-Rad, Hercules, USA
SDS-PAGE-Kammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Serologische Pipetten	Sterile Pipetten (2, 5, 10, 20 ml)	Corning, Inc., New York, USA
Skalpell	Cutfix Stainless, Einmal-Skalpell # 1	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Spritzenfilter 0,22 µm	PVDF, Durchmesser=33 mm	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Spritzenfilter 0,45 µm	PVDF, Durchmesser=33 mm	Merck Millipore, Hessen, DE
Sterilwerkbank	Heraeus HERA Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Thermocycler	Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen, DE

Tischwaage	Sartorius BL3100	Sartorius AG, Göttingen, DE
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge fresco	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifuge	Avanti [®] J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wippschüttler	KS 250	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Zellkultur-Brutschrank	BBD 6220 Zellkultur Wärmeschrank (37 °C, 5 oder 10% CO ₂ , 90% Luftfeuchtigkeit)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkulturflaschen	25 cm ² und 75 cm ²	BD Falcon, Corning, Inc., New York, USA
Zellkultur-Schalen	6 cm ² und 10 cm ²	Corning, Inc., New York, USA
Zellkultur-Zentrifuge	Function Line, Laborfuge 400R	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellschaber	24 cm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zentrifugationsbecher	Polypropylen, 250 ml	Kisker, Steinfurt, DE
Zugelassene Zentrifuge für Lentiviren-S2-Arbeit	Multifuge 3SR	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

Alle Zell-Linien wurden in sterilen Kulturgefäßen der Firma Corning, Inc. kultiviert. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße und die verwendeten Volumina der Kulturmedien.

Tabelle 2.2: Verwendete Zellkulturgefäße mit Volumina

Kulturschalen	Fläche	Mediumvolumen	Hersteller
6-well-Platte	9,5 cm ²	2,5 ml	BD Falcon, Corning, Inc.
24-well-Platte	1,9 cm ²	1 ml	BD Falcon, Corning, Inc.
96-well-Platte	0,32 cm ²	100 µl	BD Falcon, Corning, Inc.
6 cm-Schale	28,26 cm ²	5 ml	Corning, Inc.

10 cm-Schale	78,5 cm ²	10 ml	Corning, Inc.
T25-Zellkulturflasche	25 cm ²	5 ml	BD Falcon, Corning, Inc.
T75-Zellkulturflasche	75 cm ²	15 ml	BD Falcon, Corning, Inc.

2.2 Chemikalien und Medien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Chemikalien für die Herstellung von Reagenzien, Puffern, und Medien genutzt (siehe Tabelle 2.3). Außerdem werden auch die unterschiedlichen Medien sowohl für die Kultivierung von humanen Zellen als auch für die Kultivierung der Bakterien *Escherichia coli* in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Chemikalien und Medien

Substanz oder Medium	Hersteller
Acrylamid	Serva, Heidelberg, DE
Seakem LE Agarose	Lonza, Basel, CH
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, DE
Ampicillin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Bacitracin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacto-Agar	BD, New Jersey, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg, DE
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA, Bovines Serum Albumin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Carbenicillin di-Natrium-Salz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Collagen I rat tail	Corning, Inc., New York, USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM mit stabilem Glutamin und hohe Glukose (4,5 g/l)	Biochrom AG, Berlin, DE
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA.4.Na, Zellkultur geeignet	Biochrom AG, Berlin, DE
EDTA	Merck Millipore, Billerica, USA

Eisessig	Merck Millipore, Billerica, USA
EMEM	Lonza, Basel, CH
Essigsäure	Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol absolut	Merck Millipore, Billerica, USA
Eukitt	Kindler GmbH, Freiburg, DE
Fötale Kälberserum, FCS Gold Europa	PAA
Glukose	Merck Millipore, Billerica, USA
Glycerin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hexadimethrin-Bromid oder Polybren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES, Zellkultur geeignet	Biochrom AG, Berlin, DE
Igepal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Lennox Broth	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin, DE
Magermilchpulver	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Methanol	J. T. Baker Avantor Performance Material, Center Valley, USA
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Molekulargewichts-Marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Molekulargewichts-Marker O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nalgene-Kryo-Röhrchen (1 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumbicarbonat, $NaHCO_3$ 7,5% (w/v)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Natriumchlorid, $NaCl$	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

PBS, steril, Zellkultur geeignet, w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 $\mu\text{g/ml}$)	Biochrom AG, Berlin, DE
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphosäure, 86%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-Größenstandard, Spectra™ Multicolor Broad Range	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Puromycin dihydrochlorid	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI Zellkulturmedium 1640	Biochrom AG, Berlin, DE
Salzsäure, HCl	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
SDS, Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad, München, DE
Sodium-Pyruvat, 100 mM, Zellkultur geeignet	Biochrom AG, Berlin, DE
TEMED, Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris, Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin, 2,5 %	Biochrom AG, Berlin, DE
Trypsin-EDTA, 0,05%, phenol-red	Gibco™, Life Technologies
Trypton enzymatic digestic casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2.1 Zusammensetzung der Zell-Kulturmedien und der verwendeten Trypsin-EDTA-Lösungen

In Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Trypsine aufgelistet, die Zell-Linien finden sich in Tabelle 3.2.

Tabelle 2.4: Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

	Melanom Medium	293T-Medium
Standard-Medium (Biochrom AG)	87 % (v/v) RPMI 1640	86 % (v/v) DMEM mit stabilem Glutamin und hoher Glukose (4,5 g/l)
FCS Gold Europa (PAA)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
L-Glutamin (Biochrom AG)	4 mM (2 % (v/v))	-
Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)	100 U/ml/ 100 µg/ml (1 % (v/v))	100 U/ml/ 100 µg/ml (1 % (v/v))
Sodium-Pyruvat (Biochrom AG)	-	1 mM (1 % (v/v))
HEPES (Biochrom AG)	-	20 mM (2 % (v/v))

Tabelle 2.5: Die Zusammensetzung der verwendeten Trypsin-EDTA-Lösungen

	Melanom Trypsin	293T-Trypsin
Trypsin (0,25 %)	-	0,5 mg/ml (20% (v/v))
Trypsin (2,5 %)	2,5 mg/ml (10% (v/v))	-
EDTA.4.Na (Biochrom AG)	0,1 mg/ml (1 % (v/v))	0,2 mg/ml (2 % (v/v))
PBS (Biochrom AG)	89 % (v/v)	78 % (v/v)

2.3 Kits

Für manche molekulären Arbeiten und zelluläre Assays wurden Kits verwendet (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Die in dieser Arbeit verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Cell Proliferation, ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, DE
iMaxima™ Probe qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quick Cell Proliferation Assay Kit	BioVision, Inc., Milpitas, USA
RNAse-Free DNase Set	Qiagen, Hamburg, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hamburg, DE
peqGOLD Plasmid Miniprep I Kit	Peqlab Biotechnologie, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit	Peqlab Biotechnologie, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
ProFection® Mammalian Transfection System	Promega Corporation, Madison, USA

Corning® BioCoat™ Control Inserts (24-well-Platte)	Corning, Inc., New York, USA
Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers (24-well-Platte)	Corning, Inc., New York, USA
Diff-Quik Stain Set	Siemens Healthcare, Erlangen, DE
ECL Lösung Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.4 Primer-Sonde-Sets

Für die quantitative PCR wurden Primer-Sonde-Sets sowohl für die cDNA des Gentranskripts ZO-1, als auch für die cDNA des Gentranskriptes GAPDH von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Primer für die quantitativen PCR-Assays

Gen	Taqman®-Sonde
ZO-1	Hs01551861_m1
GAPDH	Hs03929097_g1

2.5 Plasmide

Für die Herstellung von shRNA-Lentiviren wurden sowohl shRNA-lentivirale Vektoren als auch lentivirale Verpackungsplasmide genutzt, die in der Tabelle 2.8 aufgelistet sind. Die shRNA-lentiviralen Vektoren besaßen spezifische Sequenzen, die gegen unterschiedliche Stellen der ZO-1-mRNA gerichtet waren (siehe Tabelle 2.9).

Tabelle 2.8: Plasmide für die Herstellung von ZO-1-shRNA-Lentiviren

Plasmid	Funktion
pLKO.1 NT (erhalten von Dr. Stefan Werner, Institut für Tumorbologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg)	besitzt Carbenicillin-, Puromycin-Resistenz- und eine shRNA-Sequenz, die gegen keine humane oder murine mRNA gerichtet ist, wurde als Kontrolle im Knockdown-Versuch verwendet.
pLKO.1-puro-shRNA Klone 52-56 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	besitzen Carbenicillin-, Puromycin-Resistenz- und shRNA-Sequenzen, die gegen ZO-1-mRNA gerichtet sind, und wurden zur Etablierung von Knockdown-Systemen verwendet.

pLKO.1 Empty (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	besitzt Carbenicillin-, Puromycin-Resistenz- und keine shRNA-Sequenz in seinem Klonierungssitus, wurde als Kontrolle im Knockdown-Versuch verwendet.
pMDLg/pRRE (erhalten von Prof. Dr. Nicole Fischer, Mikrobiologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg)	besitzt Ampicillin-Resistenz und gag-Sequenz, die strukturelle Proteine der Viren kodiert, und pol-Sequenz, die retrovirus-spezifische Enzyme kodiert. Dieses Plasmid ist eines von den Verpackungsplasmiden für die Herstellung von Lentiviren.
pRSV-Rev (erhalten von Prof. Dr. Nicole Fischer, Mikrobiologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg)	besitzt Ampicillin-Resistenz. Dieser Vektor ist eines von den Verpackungsplasmiden und kodiert das Rev-Protein der Viren. Dieses Protein reguliert die Genexpression der Lentiviren sowohl auf der Transkriptionsebene als auch auf der Post-Transkriptionsebene.
pCMV-VSV-G (erhalten von Prof. Dr. Nicole Fischer, Mikrobiologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg)	besitzt Ampicillin-Resistenz. Dieser Vektor kodiert VSV-G, das Hüll-Protein der hergestellten Viren (Addgene).

Tabelle 2.9: pLKO.1.shRNA Vektoren und ihre ZO-1-spezifischen Target-Sequenzen

Details for RHS4533-NM_003257	
Hairpin sequence for TRCN0000116252	Color Codes: sense loop antisense shRNA-Nr. : 52
CCGGGCAATAAAGCAGCGTTTCTATCTCGAGATAGAAACGCTGCTTTATGCTTTTGG	
Hairpin sequence for TRCN0000116253	Color Codes: sense loop antisense shRNA-Nr. : 53
CCGGGCGATCTCATAAAGCTGTAAGCTCGAGTTACGAAGTTTATGAGATCGCTTTTGG	
Hairpin sequence for TRCN0000116254	Color Codes: sense loop antisense shRNA-Nr. : 54
CCGGGCTGTCATACATAAAGCAAGCTCGAGATTGCTTTATGTTATGTCAGGCTTTTGG	
Hairpin sequence for TRCN0000116255	Color Codes: sense loop antisense shRNA-Nr. : 55
CCGGGCGACCATTTGAACGCAAGTTTCTCGAGAACTTGCCTTCAATGCTGCTTTTGG	
Hairpin sequence for TRCN0000116256	Color Codes: sense loop antisense shRNA-Nr. : 56
CCGGGCGCTGTCATACATAAAGCAAGCTCGAGTTTCTTTATGTTATGTCAGGCTTTTGG	

2.6 Antikörper

Für die Detektierung der Proteine, die sich in den Zelllysaten befanden, wurden die Antikörper in der Tabelle 2.10 und Tabelle 2.11 genutzt.

Tabelle 2.10: Die verwendeten Primer-Antikörper

Antigen	Spezies	Klon	Firma	Verdünnung
α -Tubulin	Maus	monoklonal, DM1A	Kat-Nr: CP06, Calbiochem [®] , Merck Millipore	1:3000
β -Aktin	Maus	monoklonal,	Kat-Nr:	1:10000

		AC-15	A5441, Sigma-Aldrich	
ZO-1	Kaninchen	polyklonal	Kat-Nr: 61- 7300, Thermo Fisher Scientific	1:100
n-Terminal-ZO-1	Kaninchen	polyklonal	Kat-Nr: 40- 2300, Thermo Fisher Scientific	1:200
ZO-1	Maus	monoklonal, ZO1-1A12	Kat-Nr: 33- 9100, Thermo Fisher Scientific	1:100

Tabelle 2.11: Die verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper-Konjugat	Anti-	Spezies	Firma	Verdünnung
Meerrettichperoxidase	Maus	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	1:5000
Meerrettichperoxidase	Kaninchen	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	1:5000

2.7 Zell-Linien

In dieser Arbeit verwendete humane Zell-Linien werden in der Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Verwendete Zell-Linien

Zelllinie	Tumorart	Ursprungsgewebe
HEK-293T ¹⁾	Nierenkarzinom	Nierenepithel
WM1205Lu ²⁾	Malignes Melanom	Lungenmetastase von WM793B in Maus
WM35 ²⁾	Malignes Melanom	Primärtumor, RGP
WM793B ²⁾	Malignes Melanom	Primärtumor, VGP
MV3 ²⁾	Malignes Melanom	Xenotransplantat einer humanen Metastase

1) erhalten von Dr. Stefan Werner, Tumorbologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg; 2) vorhanden in Dermatologie, Campus Forschung, UKE-Hamburg; RGP (radial-wachsende Phase) VGP (vertikal-wachsende Phase)

2.8 *E. coli*-Linie für eine bakterielle Transformation

In dieser Arbeit wurde eine *E. coli*-Linie, TOP10F' von Invitrogen für eine bakterielle Transformation verwendet. Durch diese Transformation übernehmen die Bakterien die Plasmide in ihre Zellen.

2.9 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Diese Enzyme wurden für den Verdau von Plasmiden verwendet, um die Plasmide zu überprüfen.

2.10 Software

Proteinsignale, die auf den Western-Blots detektiert wurden, wurden mit Hilfe der Software ImageJ (NIH) quantifiziert. Außerdem wurden mit dieser Software die Bilder von Collagen-Invasionsassays und die Bilder von Dissoziationsassays ausgewertet. Für die Datenverarbeitung wurden die Microsoft Office Programme MS Excel und MS Powerpoint verwendet. Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software IBM-SPSS 22 durchgeführt

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Standardkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zell-Linien erfolgte in BBD 6220 (Heraeus, Thermo Fisher Scientific) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 10 % CO₂ für Zellen in DMEM basierendem Medium bzw. 5 % CO₂ für Zellen in RPMI basierendem Medium. Die Zell-Linien wurden dreimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärent-wachsenden Zellen mit 5 ml PBS bei 37°C gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung von dem Boden der T75-Flasche abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von 5 ml vorgewärmtem FCS-PBS abgestoppt und die resuspendierten Zellen dann in einer bestimmten Dichte ausgesät, sodass sie nach zwei Tagen ca. 70-80% konfluent waren. Für Melanom-Zell-Linien wurden die Kulturen 1/6 gesplittet. Die HEK293T-Zellen wurden 1/3 gesplittet.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -196°C für längere Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wird den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Die Zellen wurden in 5 ml Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO, 10% FCS, 90 % (v/v) Vollmedium) resuspendiert, jeweils 1 ml in Nalgene-Kryo-Röhrchen überführt und auf -80°C gekühlt. Die Zellen wurden dann am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Reaktivierung der Zellen, die bei -200 °C gelagert wurden, wurden die Zellen, bei ca. 37 °C im Wasserbad aufgetaut, anschließend mit 5 ml FCS-PBS gewaschen, und bei 1100 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 15 ml Vollmedium resuspendiert und in eine T75-Flasche überführt und schließlich inkubiert.

3.1.3 Puromycin-Resistenz-Bestimmung durch WST-1-Assay

Durch einen WST Assay (Water Soluble Tetrazolium Salt Assay) kann die Viabilität von Zellen quantifiziert werden. Dieser Assay basiert auf der Fähigkeit von lebenden Zellen, mit mitochondrialer Dehydrogenase Tetrazolium-Salz WST-1 zu Formazan zu spalten. Das Spaltprodukt Formazan kann mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen werden. Pro Well einer 96-well-Platte wurden 16000 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium mit Puromycin-haltigen Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen gewechselt. Dieser Tag, an dem das erste Mal Puromycin auf die Zellen gegeben wurde, wird als Tag 0 bezeichnet. Am nächsten Tag (Tag 1) wurden 10 µl Quick-Cell-Proliferation-Reagenz (Biovision, Inc.) zu

manchen Zellen in einer 96-well-Platte zugegeben und im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Die Absorbanz wurde bei 450 nm mit Referenzwellenlänge 650 nm mit dem ELISA-Reader gemessen. Alle zwei Tage wurde ein Medium-Wechsel durchgeführt. Ab Tag 1 bis Tag 5 wurde jeden Tag der WST-Gehalt der Zellen gemessen.

3.1.4 Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände

Für die Herstellung lentiviraler Überstände wurden HEK293T-Zellen unter Verwendung des ProFection-Transfektionsreagenz (Promega Corporation) transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden 5×10^6 HEK293T-Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß 500 μ l 2 x HBS vorgelegt und dann mit DNA/ CaCl_2 -Lösung (pro Transfektionsansatz: 15 μ g pLKO.1-puro-shRNA Plasmid-DNA, 10 μ g pMDLg/pRRE (Verpackungsplasmid), 5 μ g pRSV-Rev (Verpackungsplasmid) 2 μ l pCMV-VSV-G (Hüllplasmid), Wasser ad. 437,5 μ l und 62,5 μ l 2 M CaCl_2) tropfenweise versetzt. Währenddessen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette Luftblasen in der Flüssigkeit erzeugt. Diese Transfektionsansätze wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium der HEK293T-Zellen wurde durch neues Medium, das 25 μ M Chloroquin enthielt, erneuert. Die Transfektionsansätze wurden vor der Zugabe auf die Zellen gevortext. Die Zugabe auf die Zellen erfolgte tropfenweise. Nach 8 Stunden wurde das Medium mit neuem Medium ohne Chloroquin gewechselt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand, der die lentiviralen Partikel enthält, abgenommen und mit einem PVDF-Spritzenfilter mit einer Ausschlussgröße von 0,45 μ m steril filtriert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium erneuert. Der so gewonnene virale Überstand (Filtrat) wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Der Zellkulturüberstand wurde 48 Stunden nach der Transfektion ein zweites Mal gewonnen.

3.1.5 shRNA-Transfer mit Hilfe lentiviraler Zellkulturüberstände

Um die Expression des Gens ZO-1 von Melanomzellen zu vermindern, wurde ein shRNA-lentiviraler Transfer durchgeführt. Hier enthalten die Lentiviren eine shRNA-Sequenz (siehe 3.1.5), die nach der Infektion ins Genom der Melanomzellen integriert wird. Diese shRNA ist spezifisch an die mRNA eines bestimmten Gens gerichtet. Die shRNA wird in der Zelle weiter zu siRNA prozessiert. Diese siRNA mit dem RISC, RNA-induced silencing complex, bindet die mRNA und degradiert diese mRNA. Dies führt zu einer Verminderung des Levels des entsprechenden Proteins.

Wenn nicht anders beschrieben wurde, wurden am Tag vor der Infektion 10^6 Zielzellen in einer 6-well-Platte ausgesät. Das alte Medium wurde abgesaugt und mit 2 ml neuem Medium, das 8 μ g/ml Polybrene enthielt, gewechselt. Nun wurden 200 μ l des steril-filtrierten lentiviralen Überstandes hinzugegeben. Um die Effizienz der Infektion zu erhöhen,

wurde die Zellkulturplatte für 60 min bei 1000 xg zentrifugiert (Multifuge 3SR, Heraeus Holding GmbH). Die Zellen wurden mit dem Infektionsgemisch über Nacht inkubiert. Danach wurde das Gemisch durch ein Puromycin-haltiges Medium ersetzt und weiter für 48 Stunden inkubiert. Als negative Kontrolle der Transduktion wurde Puromycin auch zu den Zellen ohne Viren gegeben. Diese Zellen sollten und waren alle nach der Puromycin-Zugabe abgestorben. Nach der Inkubation wurden die Zellen in T75-Flaschen überführt und im Puromycin-haltigem Medium weiterkultiviert.

3.1.6 Herstellung von Sphäroiden

Zur anschließenden Durchführung eines Invasionstests wurden Sphäroide von Zellen hergestellt. Ein Sphäroid ist ein kugelförmiges Aggregat, das aus mehreren Tausend Tumorzellen besteht. Am Tag des Versuchs wurde 1,5% Agar nobile in PBS in einer Mikrowelle erhitzt. 100 µl flüssiges Agar wurde in jedes Loch einer 96-Loch-Platte gegeben und bei RT unter der sterilen Werkbank ausgießen lassen. Aus den kultivierten Zellen wurde eine Zellsuspension angesetzt, die 25000 Zellen/ml enthielt. In jedes Loch wurden 200 µl Zellsuspension reingegeben. Nach 3 Tagen wurden die Sphäroide auf dem Agar gebildet und für einen Invasionsassay oder einen Adhäsionsassay verwendet.

3.1.7 3D-Kollagen-Invasionsassay

Bei diesem Versuch kann die Invasion von Zellen aus einem Sphäroid, beobachtet werden. Hier wird ein Sphäroid in einem Kollagen-Gel eingebettet und in der Inkubationszeit invadieren das Sphäroid und seine Zellen im Kollagen-Gel. Dieser Prozess ähnelt dem Invasionsprozess, der *in vivo* in der Krebsentstehung entsteht, bei dem Tumorzellen in das umliegende Gewebe eindringen.

3.1.7.1 Durchführung des Invasionsassays

Kollagen in Essigsäure für 1 mg/ml Kollagen-Gemisch

1500 µl	Rattenschwanz Kollagentyp 1 (Je nach Batch eine andere Konzentration)
mit	0,02 N Essigsäure verdünnt bis zu einer Kollagenkonzentration von 1 mg/ml

Kollagen in Essigsäure für 2 mg/ml Kollagen-Gemisch

3000 µl	Rattenschwanz Kollagentyp 1 (Je nach Batch eine andere Konzentration)
mit	0,02 N Essigsäure verdünnt bis zu einer Kollagenkonzentration von 2 mg/ml

Kollagen-Gemisch (1 und 2 mg/ml)

634	µl	EMEM
57	µl	L-Glutamin (200 mM)
693	µl	FCS
5250	µl	Kollagen in Essigsäure mit der jeweiligen Konzentration

Alle Lösungen wurden auf Eis gestellt. Die Invasion der Sphäroide in 1 und 2 mg/ml Kollagen Typ 1 wurde untersucht. Hierzu wurde Kollagen Typ I Rattenschwanz in 0,2 N Essigsäure verdünnt und 5250 µl dieser Lösung wurde zu den anderen Lösungen zugegeben (siehe oben). Der pH-Wert dieses Gemisches wurde durch Zugabe von 7,5 % NaHCO₃ neutralisiert. Zu der Lösung wurde soviel NaHCO₃ zugegeben, bis einen Farbumschlag zur Pfirsichfarbe entstanden ist. In ein Loch einer 24-Loch-Platte wurden 200 µl des Kollagen-Gemisches gegeben und in dem Brutschrank inkubiert.

Währenddessen wurden vier Sphäroide aus der Agar-Platte in einem 0,5 ml Eppi-Gefäß gesammelt. Die Flüssigkeit wurde aus dem Gefäß entfernt, mit 300 µl kaltem Kollagengemisch versetzt und direkt in ein Well der Kollagen-Platte gegeben. Pro Zellbehandlung und Kollagenkonzentration wurden drei Wells vorbereitet. Hierbei wurden die Sphäroide mittig platziert. Anschließend wurde die Platte im Brutschrank für eine Stunde hingestellt, sodass das Kollagen fest wurde. Nachdem das Kollagen fest war, wurde 1 ml Melanom-Medium addiert und in den Brutschrank 2 Stunden vor der Inkubation im Olympus-Inkubator gestellt. Währenddessen wurde der Inkubator vor der Verwendung eingeschaltet und für die Zellkultur-Bedingungen eingestellt (5% CO₂ und 37 °C). Die Platte wurde im Evotec-Olympus-Inkubator für 65 Stunden inkubiert. Dabei wurden alle fünfzehn Minuten Photos mit der 4x Vergrößerung aufgenommen. Die Bilder hatten eine Auflösung von 1376 x 1032 Pixel. Es wurde ein Sphäroid pro Well für die Aufnahme ausgewählt, das in der Mitte des Wells lag. Die Auswertung der Fläche der Sphäroide erfolgte mit der Software FIJI/ImageJ.

3.1.7.2 Auswertung des Invasionsassays

Die aufgenommenen Photos während des Versuchs wurden mit Hilfe der Software FIJI/ImageJ analysiert. Zur Bestimmung der Größe der Sphäroidsfläche wurde zunächst bestimmt, wieviel µm die Länge eines Pixels hat. Es wurde ein Bild von einem Lineal-Objektträger mit der gleichen Vergrößerung, wie es oben beschrieben wird, aufgenommen. Im Programm ImageJ wurde dieses Bild geöffnet. Es wurde ein Strich mit dem Tool Straight Line auf dem Lineal im Bild gezogen, wo dadurch eine Distanz von 100 µm markiert wurde. Es wurde dann Analyse gewählt. Als Nächstes wurde Set-Scale angeklickt. Im darauf folgenden Fenster wurde 100 µm in das Feld „known distance“ und µm in das Feld „unit of length“ eingegeben. Automatisch wurde unten angezeigt: 0,617 Pixel/µm. Unter Image und

Properties wurde nun 1,61989 als Pixel Width, Pixel Height und Voxel Depth angezeigt. Dies bedeutet, dass ein Pixel 1,61989 μm entsprach.

Wenn die Bilder von Sphäroiden geöffnet wurden, wurde dieser Wert unter Image, Properties als Pixel Width, Pixel Height und Voxel Depth und μm als unit of length eingegeben. Außerdem wurde „global“ ausgewählt. Hier wurde die innere Fläche des Sphäroids, wo das Sphäroid noch als ein kompakter Zellverband zu sehen war, als Sphäroidgröße ausgemessen. Mit dem Tool Brush konnte diese Fläche markiert und als ein ROI (Region of Interest) gespeichert werden. Außerdem wurde die Gesamtfläche, in der das Sphäroid und seine ausgewanderten Zellen sich ausbreiteten, gemessen. Mehrere ROIs konnten dann mit der Auswahl „Multi Measure“ gemessen werden. Die Differenz zwischen der Gesamtfläche und der Sphäroidfläche wurde als Invasionsfläche benannt (siehe Abb. 3.1).

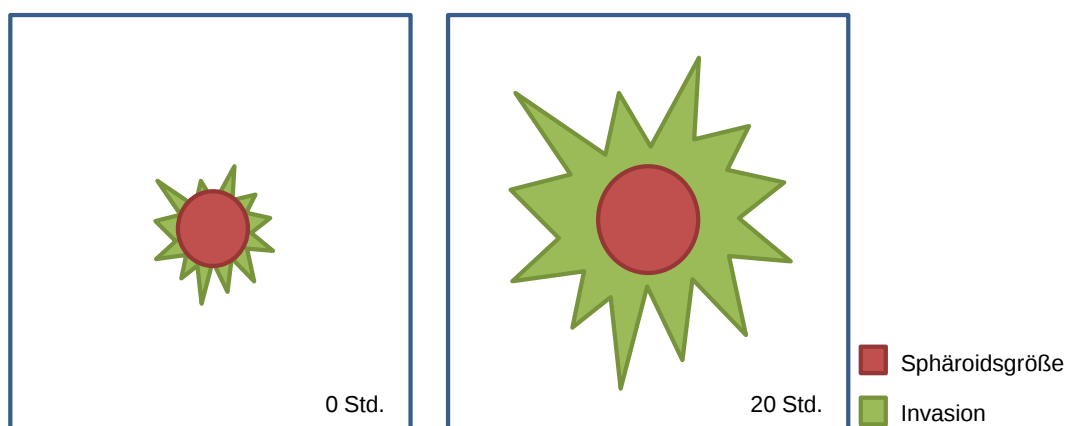


Abb. 3.1: Abbildung eines Sphäroids mit Invasion: Die Sphäroidgröße ist rot markiert. Die Invasion ist die Differenz der Gesamtfläche und der Sphäroidgröße (grün).

Die Flächen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Aus diesen Werten wurde eine Trendlinie mit Excel gebildet, wo auch die Steigung der Linie in der Funktion ermittelt wurde. Die Steigung ist hier eine Flächenänderung pro Zeiteinheit. Ein Beispiel ist in der Abb. 3.2 dargestellt. Die Trendlinie des Sphäroids K-2 hatte die Funktion: $Y = 16315x + 127634$. Die Steigung der Linie war 16315 und zeigte die Invasionsflächenänderung pro Zeiteinheit eines Sphäroids ($\mu\text{m}^2/\text{Std.}$).

In der weiteren Arbeit werden folgende Begriffe verwendet:

- Steigung der Gesamtfläche: Gesamtflächenänderung pro Zeiteinheit.
- Steigung der Invasionsfläche: Invasionsflächenänderung pro Zeiteinheit
- Sphäroidwachstum: Sphäroidflächenänderung pro Zeiteinheit

Die Steigungen wurden zusammen mit ihrem ZO-1-Proteinlevel in einer Excel-Datei eingetragen und statistisch mit der Software SPSS analysiert. Außerdem wurden die

Ursprungsgesamtflächen gemessen und später statistisch untersucht, ob sie die Steigungen beeinflussten. Die Ursprungsgesamtfläche ist die Gesamtfläche bei 0. Std.

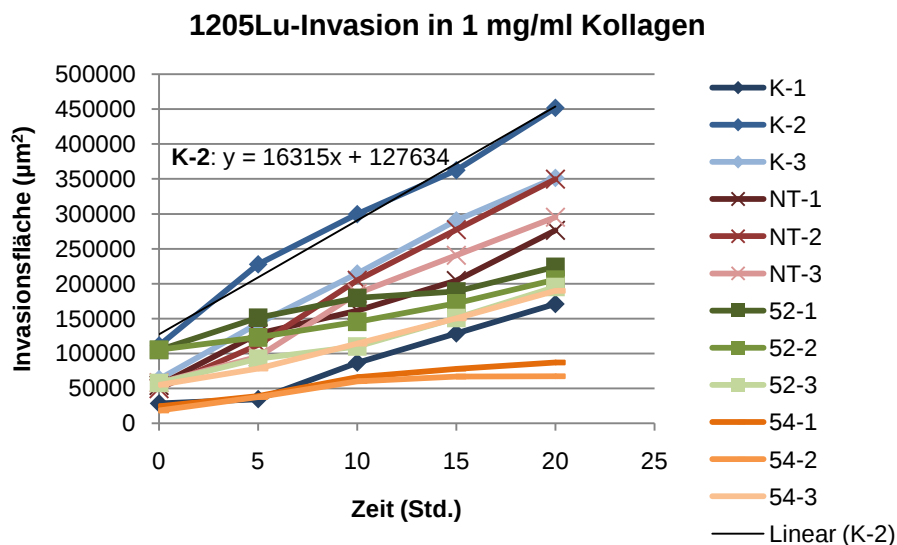


Abb. 3.2: Ein Beispiel einer Trendlinie eines Sphäroids und ihre Funktion bei einem Invasionsversuch: Die Trendlinien und Steigungen von anderen Sphäroids dieses Versuchs wurden auch mit dem Excel-Programm ermittelt.

3.1.8 Dissoziationsassay

Um die Zell-Zell-Adhäsion zu untersuchen wurde bei diesem Assay die Zell-Zell-Verbindung in einem Sphäroid mechanisch durch Pipettieren und enzymatisch durch Zugabe von 0,01 %-Trypsin mit der Zeit aufgelöst. Zum Ansetzen einer 0,01% Trypsin-Lösung wurde 0,05 % Trypsin-EDTA (Gibco) in PBS verdünnt und 5 Minuten vor der Verwendung bei 37 °C vorgewärmt. Ein Sphäroid in 200 µl Medium wurde aus einem Loch der Agar-Platte mit einer 1000 µl-Spitze rauspipettiert und in einer 6 cm-Schale platziert. Dieses Sphäroid mit 25 µl Medium wurde auf einen Deckel einer 96-Well-Platte transferiert. Durch dreimaliges Waschen mit 50 µl PBS wurden Reste vom Medium mit FCS entfernt.

Nach dem Waschen wurde zu dem Sphäroid 100 µl PBS gegeben. Ein Bild dieses Sphäroids im PBS mit einer Auflösung von 2048x1536 wurde als Zeitpunkt 0 aufgenommen. Die Vergrößerung des Bildes betrug 5 x. PBS wurde abgenommen und mit 100 µl 37 °C - warmen 0,01%-Trypsin versetzt. Das Sphäroid wurde 10 Mal hoch- und runterpipettiert und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Photo aufgenommen. Bei jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Sphäroid 10 Mal hoch- und runterpipettiert. Weitere Inkubationszeiten betrugen 2 Minuten, 4 Minuten und 6 Minuten. Es gab drei technische Replikate.

Zur Bestimmung der Größe der Sphäroidsfläche musste zunächst bestimmt werden, wieviel μm^2 ein Pixel hat. Es wurde ein Bild von einem Lineal-Objektträger mit der gleichen Pixel-Auflösung und Vergrößerung, wie es oben beschrieben wird, aufgenommen. Im Programm ImageJ wurde dieses Bild geöffnet. Die Bestimmung der Skalierung wurde wie oben in 3.1.7.2 beschrieben berechnet. Die Sphäroidfläche wurden anhand des Software ImageJ mit dem Tool Brush markiert, als ROI gespeichert, und gemessen. Aus diesen Werten wurden wie im Sphäroidsinvasionsassay (siehe 3.1.7.2) ebenfalls Trendlinien mit Excel erfasst und die negative Steigung der ermittelten Funktion stellt die Reduktion der Sphäroidsfläche in μm^2 pro Minute dar (siehe Abb. 3.3). Auf dem Bild ist es zu erkennen, dass zwischen 0 und 4 Minuten die Kurven zum Teil nicht linear verlaufen. Deshalb wurden drei negative Steigungen oder die sogenannte Abnahme der Fläche ermittelt. Die Abnahme der Flächen zwischen 0-1, 1-2, und 2-4 Minuten wurden berechnet.

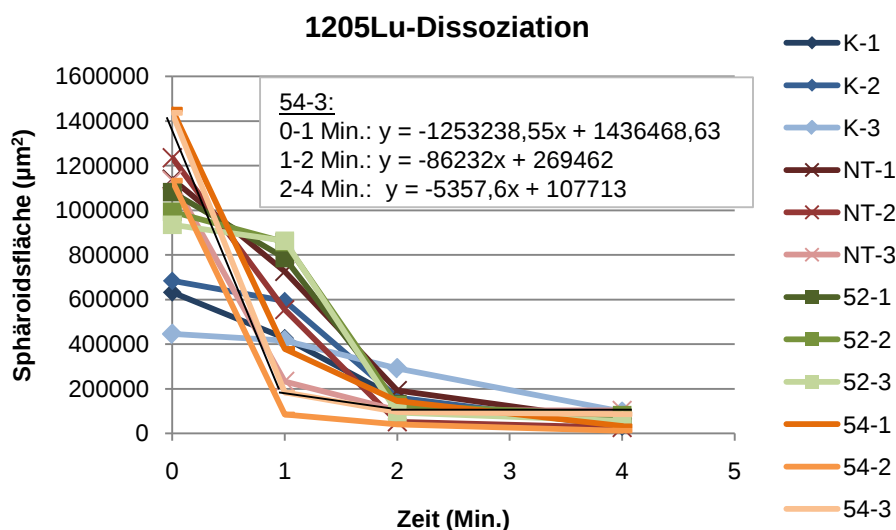


Abb. 3.3: Ein Beispiel der Trendlinien der Dissoziation eines Sphäroids (54-3) und ihre Funktion: Die Trendlinien und Steigungen von anderen Sphäroiden dieses Versuchs wurden auch mit dem Excel-Programm ermittelt.

3.1.9 BrdU-Proliferationsassay

Die Quantifizierung von proliferierenden Zellen erfolgte durch einen BrdU Assay, der auf der Messung der BrdU-Aufnahme von Zellen während der DNA-Synthese basiert. BrdU ersetzt Thymidin in der DNA der teilenden Zellen. Die eingebaute BrdU wurden durch den Antikörper anti-BrdU-POD markiert. Dieser Immunkomplex wurde in einer späteren Substratreaktion detektiert. Der Kit „Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ (Roche) wurde für diese Versuche verwendet. Ein Tag vor der ersten Messung wurden 2000 Zellen in 100 μl Medium pro Well einer 96-well-Platte ausgesät. Es wurden 16 Wells für jede Zellbehandlung innerhalb eines Versuchs mit den Zellen ausgesät. Die Lösungen wurden

wie nach Angabe des Herstellers kurz vor Verwendung vorbereitet. Am Messungstag wurden 10 µl BrdU-Lösung auf die Zellen in einer 96-well-Platte gegeben und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Von den obengenannten 16 Wells wurden in 8 Wells BrdU zugegeben. In die weiteren anderen 8 Wells wurde kein BrdU zugegeben. Das bedeutet, dass es 8 Replikate pro Zellbehandlung gibt. Diese Wells dienen als Hintergrundkontrollen. Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. 200 µl Fix-Denat-Lösung wurden in jedem Well der Platte zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Fix-Denat-Lösung wurden die Zellen fixiert und ihre DNA denaturiert. Die Fix-Denat-Lösung wurde abgezogen. Durch Zugabe von 100 µl anti-BrdU-POD für 60 min wurden proliferierende Zellen markiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen 3x mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. 100 µl Substrat-Lösung wurden den Zellen zugegeben und das ganze für 5 min inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 25 µl 1 M H₂SO₄ benutzt. Die Messung erfolgte bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm mit dem ELISA-Reader. Die Proliferation der Zellen wurde für drei Tage untersucht. Zwischen den Versuchen gab es Unterschiede in ihren Absorbanzen am Tag 1. Deshalb werden Steigungen der Absorbanz für die Auswertung verwendet. Die Absorbanz eines Replikats kann aber nur ein Mal gemessen werden, da die Zellen für die Messung bereits fixiert sind. Deshalb wurde ein Mittelwert von den Absorbanz-Werten der Replikate eines Zellpräparats an einem Messungs-Tag gebildet (siehe Abb.3.4). Aus den Mittelwerten zwischen 1. und 2. Messungs-Tag wurde eine Steigung berechnet. Diese Steigung ist die Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag. Außerdem wurde die Steigung der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag berechnet.

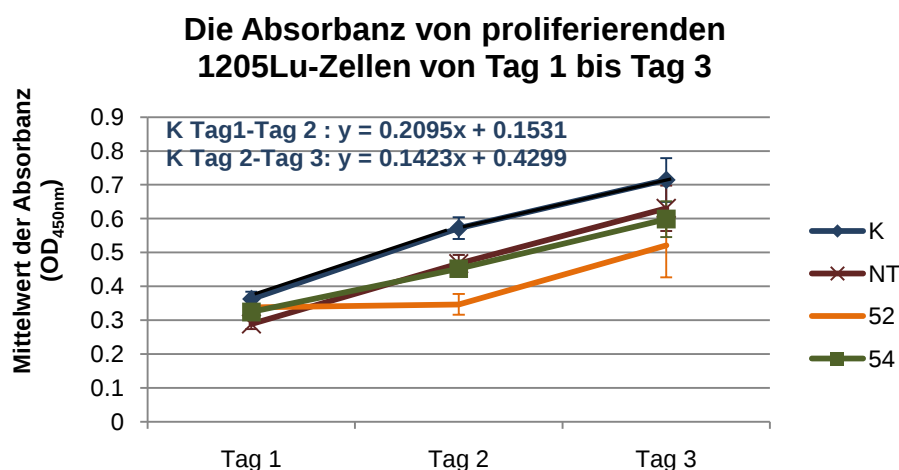


Abb. 3.4: Die Absorbanz der proliferierenden 1205Lu-Zellen innerhalb von drei Tagen bei einem BrdU-Assay als Beispiel. Die Steigung der Absorbanz wurde zwischen 1-2. Tag und zwischen 2-3. Tag durch die Erstellung von Trendlinien ermittelt. Beispiele der Trendlinien des Sphäroids K werden in der Abbildung gezeigt. Die Steigungen sind die a-Werte in den Formeln: $y = ax + b$ ($n=8$, SEM).

3.1.10 Boyden-Kammer-Assay

Der Matrigel-Boyden-Kammer-Assay ist eine andere Option, um die Invasion von Tumorzellen zu untersuchen. Im Gegensatz zum 3D-Collagen-Invasionsassay wird bei diesem Assay kein Sphäroid verwendet, sondern normale adhärente Zellen. Hier werden die Zellen auf einer porösen Membran, die mit Matrigel beschichtet ist, ausgesät. Die Matrigel-Matrix ähnelt der sogenannten Basalmembran *in vivo*. Die invadierenden Zellen wandern durch die Matrigelschicht und die Poren. Außerdem kann man eine Migration auch anhand einer Boyden-Kammer beobachten. Hierzu wird eine poröse Membran ohne Matrigel genutzt.

In dieser Arbeit wurden die Boyden-Kammern von der Firma Corning benutzt. Um die Zell-Invasion zu untersuchen, wurden Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers in einem Format von einer 24-well-Platte verwendet. Mit Corning® BioCoat™ Control Inserts konnte die Migration von einzelnen Tumorzellen, die durch die Poren von der oberen Membranseite ausgewandert waren, analysiert werden.

Vor der Verwendung wurde die Membran mit dem Zellkulturmedium rehydriert. Die Matrigel-Platte, die zuvor bei -20 °C gelagert wurde, musste vor der Rehydrierung bei Raumtemperatur ca. 15 min aufgetaut werden. Zur Rehydrierung wurden 500 µl Serum-freies Melanom-Medium in die Inserts, 750 µl in den Well zugegeben und das ganze im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Nach der Rehydrierung der Membran wurde das Medium entfernt. 750 µl Melanom-Medium mit FCS wurden in die Wells gegeben. Es wurden bei jedem Versuch Triplikate pro Zellbehandlungen angefertigt. Die Inserts wurden in die Wells eingesetzt und 50000 Zellen in 500 µl Serumfreiem Medium wurden in die Inserts eingesät. Nach dem Aussäen wurden die Platten für 48 h in dem Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen auf der unteren Seite der Membran mit Diff-Quik™ Stain Set (Siemens Healthcare) fixiert und angefärbt. Hierzu wurden zunächst die Zellen auf der oberen Seite der Membran mit einem angefeuchteten Wattestäbchen entfernt. Die Zellen wurden mit der Fixierungslösung fixiert, indem die Inserts in den Wells, die mit jeweils 1 ml Fixierungslösung gefüllt waren, eingesetzt wurden, und für 2,5 Minuten inkubiert wurden. Nach der Fixierung folgten die Färbeschritte mit der 1. und der 2. Färbelösung. Jeder Färbeschritt dauerte 2,5 Minuten. Die Inserts wurden nach der Färbung mit Wasser gewaschen und für 30 Minuten trocknen gelassen. Die Membran wurde mit Hilfe eines Skalpell aus dem Insert ausgelöst. Auf einen Objektträger wurde Eukit gegeben. Die Membran wurde auf diesen Objektträger hingelegt und mit einem Deckglass eingedeckelt.

Zehn unterschiedliche Bereiche der Membran wurden bei einer Vergrößerung von 20x fotografiert (Gesamtfläche der zehn Bilder = 2,02 mm²). Die Zellen wurden mit Hilfe der Software ImageJ gezählt. Mit dem Tool Multi Point Selection wurden die Zellen markiert und

gezählt. Diese Information wurde als ein ROI gespeichert und in eine MS-Excel-Tabelle dokumentiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium pH (7,4):

1 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

in Wasser

pH-Einstellung durch Zugabe von 10 M NaOH bis pH 8 und 1 M NaOH bis pH 7,4

Ampicillin:

Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 50 µg/ml

Carbenicillin:

Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 100 µg/ml

Um festes Medium herzustellen, wurden dem LB-flüssigen Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (BD) zugefügt. Das LB-Medium wurde autoklaviert und die Antibiotika-Lösung wurde dem Medium nach Abkühlen auf 56°C zugesetzt. Mit Antibiotika versetzte LB-Platten wurden bis zu 4 Wochen im Kühlraum gelagert. Zur Vermehrung von *E. coli* wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 220 min⁻¹.

3.2.2 Transformation von Bakterien

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

0,05 % (w/v) NaCl

In Wasser

Die Lösung wurde dann autoklaviert und dazu wurden steril filtrierte MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM) und Glukose (20 mM) zugegeben.

Die Transformation wurde nach Herstellersangabe durchgeführt. Transformationskompetente Bakterien Top10F (Invitrogen) in einem One-Shot-Gefäß (Inhalt: 50 µl) wurden zum Auftauen 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 µl NT-Plasmid mit einer

Konzentration von 1,2 µg/µl zu den oben genannten 50 µl der Bakterien gegeben und die Zellsuspension weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 sek auf 42°C erwärmt und sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 200 µl SOC-Medium zugesetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 220 min⁻¹ im Inkubationsschüttler wurden die Bakterien auf Ampicillin enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3 Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab (Mini-Prep)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus einem geringen Kulturvolumen wurde eine Mini-Präparation durchgeführt. Hier wurden 1,5 ml der Bakterienkultur bei einer OD_{600nm} von 1-3 mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep I Kit (Peglab, VWR International GmbH) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution der DNA erfolgte in 50 µl Elutionspuffer. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit der DNA wurden mittels NanoDrop-1000 bestimmt (siehe 3.2.6). Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4 Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab (Maxi-Prep)

TE-Puffer:

10 mM	Tris-Cl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

Für eine Transfektion in die humanen Zellen benötigt man mehr Plasmid-DNA als die Menge, die durch eine Mini-Präparation erhalten wird. Deshalb wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. 300 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit 600-3000 µl einer Übernachtskultur beimpft und 15 Stunden bei 37°C und 220 min⁻¹ bis zu einer bei einer OD_{600nm} von 1-3 im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit (Peglab Biotechnologie, VWR International GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 300 µl TE aufgenommen. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden am NanoDrop-1000 (Thermo Fischer Scientific) ermittelt (siehe 3.2.6). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

3.2.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die erhaltenen Plasmide die gleiche Größe und Schnittstellen wie auf der Karte des jeweiligen Plasmids besaßen. Die pLKO.1-shRNA-Plasmide (Nr. 52 bis Nr. 56), die Verpackungsplasmide (das Plasmid pMDLg/pRRE, das Plasmid pRSV-Rev) und das Hüllplasmid (pCMV-VSV-G) wurden mit EcoR1 überprüft. Für den Verdau mit EcoRI wurden in den Ansatz 0,5 µg DNA, 1 µl Enzym EcoR1, 1 µl Puffer und ad 20 µl ddH₂O eingesetzt. Die Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 14 h durchgeführt. Das pLKO.1-empty-Plasmid wurde mit BamH1 und

Nde1 überprüft. Die beiden verwendeten Enzyme waren als Fast-Digest-Enzyme verfügbar. Deshalb wurde der Verdau nach dem Protokoll für Fast Digestion durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 2 µg DNA, 2 µl Enzym, 2 µl Fast Digest Green Buffer und ad 20 µl ddH₂O. Hier wurden bei einem Verdau mit einer Kombination von zwei Enzymen jeweils 1 µl Enzym von jedem einzelnen Enzym verwendet. Die Restriktionspaltungen dauerten hier nur 5 min. Nach dem Verdau wurde der gesamte Ansatz mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Reinheit und die Konzentration der DNA wurden durch Messungen der optischen Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) und bei 280 nm (OD₂₈₀) im NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Hierbei gilt, dass eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich über die Ermittlung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ beurteilen. Es wurden nur solche Plasmidpräparationen verwendet, deren Quotient mindestens 1,8 betrug. Der OD₂₈₀ liefert die Aussage über Proteinkontaminationen. Außerdem wurde die Reinheit durch den Quotient OD₂₆₀/OD₂₃₀ bestimmt, um zu wissen, ob es eine Verunreinigung mit Polysacchariden, Phenolate, oder mit organischen Salzen gibt. Hier sollte der Quotient ebenfalls mindestens 1,8 betragen.

3.2.7 Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

TAE- Puffer:

40 mM	Trizma Base
1 mM	EDTA (pH 8)
0,1 % (v/v)	Eisessig

Die Gelelektrophorese von DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresesapparaturen. Für die Herstellung des Gels wurde 50 ml Agarose in TAE-Puffer (Standard 1% (w/v) Agarose) in der Mikrowelle gekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in den Behälter der Gelkammer gegossen. Dann wurde das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6xDNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Die Molekulargröße der Banden wurde mit Hilfe eines Molekulargewichts-Markers GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder oder O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Der Lauf des Gels erfolgte für ca. 1 Stunde bei 60 V. Nach dem Lauf wurde die DNA mit Hilfe eines Transluminators analysiert. Hierzu wurde in die DNA eingelagertes Ethidiumbromid zur Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 234 nm) angeregt und das Gel zur Dokumentation am Geldokumentationssystem visualisiert (System GeneGenius, Syngene).

3.2.8 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA von eukaryotischen Zellen wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die RNA Isolierung wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.9 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von RNA wurde das NanoDrop-Gerät (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Konzentration der RNA wurde durch die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt, wobei eine OD von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Die Reinheit der RNA-Proben wurde mittels der Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} beurteilt, wie es in der Hersteller-Angabe von NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) beschrieben ist. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte mindestens 2 betragen. Außerdem wurde die RNA-Probe als rein bezeichnet, wenn der Quotient OD_{260}/OD_{230} mindestens 1,8 betrug.

3.2.10 cDNA-Synthese

Es wurde aus der RNA-Präparation der jeweiligen Melanom-Zellen cDNA (komplementäre DNA) mit dem Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA von jeder Probe verwendet. Es wurden 4 µl Reaktions-Mix, 2 µl Enzym-Mix und ad 20 µl nuklease-freies Wasser zugegeben. Diese Mischung wurde kurz gemischt und anschließend zentrifugiert. Danach wurde sie bei 25 °C für 10 Minuten, bei 50 °C für 15 min und bei 85 °C für 5 min mittels Thermocycler (Biomtra UNO Thermoblock) inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und kurz runterzentrifugiert. Danach wurde die hergestellte cDNA bei -80 °C gelagert.

3.2.11 Quantitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung von TaqMan®-Sonden

Zunächst musste cDNA aus RNA hergestellt werden (3.2.10). Das Reaktionsvolumen in einer Vertiefung in einer 96-Well-Platte betrug 25 µl. Eine PCR-Probe bestand aus 23 µl qPCR-Stammlösung und 2 µl cDNA. Zunächst wurde die Stammlösung angesetzt. Pro Ansatz in der Lösung wurden 12,5 µl iMaxima™ Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1,25 µl 20x TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystem) und 9,25 µl Nuklease-freies Wasser verwendet. Die Ansätze wurden auf die MicroAmp® (Applied Biosystem-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Es wurden Triplikate pipettiert. Die PCR-Analyse erfolgte mit dem StepOne-PCR-Gerät (Applied Biosystem-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Das Standard-PCR-Programm begann mit 2 min

bei 50°C, gefolgt von der initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C. Dann wurden 40 Zyklen im Thermocycler durchlaufen:

Denaturierung:	15 sek	95°C
Primer-Annealing und -Extension:	1 min	60°C

Schließlich folgte die Analyse der Rohdaten mit der StepOne-PCR-Software.

3.2.12 Relative mRNA-Quantifizierung

Bei dieser Methode werden die relativen Expressionsunterschiede einer bestimmten mRNA in Bezug auf ein nicht reguliertes Gen bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. C_T -Wert ist die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Hierbei wird eine gleiche PCR-Effizienz von Referenzgen und Zielgen angenommen. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$$

Zum Vergleich verschiedener Proben, wurde der ΔC_T -Wert der Kontroll-Probe von den ΔC_T -Werten der anderen Proben subtrahiert:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{ProbeX}} - \Delta C_{T\text{Probe0}}$$

Der relative Expressionsunterschied zwischen zwei Proben, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf die Kontroll-Probe (NT) ergab sich aus der arithmetischen Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Protein-Isolierung aus Zellen

RIPA-Lysispuffer:

50 mM	Trizma Base
150 mM	NaCl
1 %	Igepal
0,5 %	Na-deoxycholat
0,1 %	SDS

Protease-Inhibitormix (100 x)

1 mg/ml	Leupeptin
0,1 mg /ml	Pepstatin A
10 mg /ml	Bacitracin
10 mM	PMSF

Nach dem zweimaligen Waschen des Zellrasens oder der Sphäroide mit PBS, wurden auf die Zellen oder Sphäroide in den Schalen oder Platten RIPA-Proteinase-Inhibitor-Puffer zugegeben (siehe Tabelle 3.4). Proteinase-Inhibitor verhindert hier die Degradierung der isolierten Proteine durch Proteinasen, die in den Zellen enthalten sind.

Die Schalen oder Platten wurden anschließend für 15 Minuten auf Eis auf dem Schüttler bei 100 min^{-1} inkubiert. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Falcon) vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 30 Minuten weiter inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie für 15 min bei 13000 min^{-1} und 4°C in der Tischzentrifuge BIOFUGE 13 Heraeus sedimentiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Nach der Zugabe von RIPA-Puffer wurden die Sphäroiden-Gefäße für 30 Minuten auf Eis auf dem Schüttler bei 100 min^{-1} inkubiert und zwischendurch leicht mit den Fingern angeknipst. Nach der Inkubation wurden sie für 15 min bei 13000 min^{-1} und 4°C in der Tischzentrifuge BIOFUGE 13 Heraeus sedimentiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.1: Zugabeschema von PBS und RIPA-Puffer für unterschiedliche Zellkulturgefäße

Kulturschalen	Zellkultur-Typ	PBS	RIPA-Puffer (μl)
24-well-Platte	2D-Zellrasen	1 ml	50 μl
6 cm-Schale	2D- Zellrasen	5 ml	250 μl
10 cm-Schale	2D- Zellrasen	10 ml	500 μl
-	3D-Sphäroide	500 μl	40 μl

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten

Bradford-Reagenz

0,01 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau G250
4,7 % (v/v)	Ethanol, absolut
10 % (v/v)	Phosphorsäure, 88%

Die Lösung wurde mit einem Filterpapier filtriert

Zur Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz benutzt. Diese Methode basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G an Proteine. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe von 465 auf 595 nm. Diese erhöhte Absorption bei 595 nm wird dann gemessen und für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet (Bradford, 1976).

Für die Erstellung einer Eichgrade wurden jeweils 20 µl einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von jeweils 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 und 0,4 µg/µl in den Wells einer 96-well-Platte vorgelegt. 1 µl des Proteinlysats und 19 µl Wasser wurden in einen anderen Well vorgelegt. Den Proben wurden 180 µl der Bradford-Reagenz zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Extinktionsmessung im Elisa-Reader.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel (8% Acrylamid):

8 % (w/v)	Acrylamid
0,21 % (w/v)	Bisacrylamid
0,375 M	Tris/HCl (pH 8,8)
0,1 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,03 % (v/v)	TEMED

Sammelgel:

4 % (w/v)	Acrylamid
0,1 % (w/v)	Bisacrylamid
0,125 M	Tris/HCl (pH 6,8)
0,1 % (w/v)	SDS
0,3 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v)	TEMED

Laemmli-Lauf-Puffer:

38,4 mM	Glycin
0,02 % (w/v)	SDS
5 mM	Tris

SDS-Proben-Puffer (2x):

120 mM	Tris
20% (w/v)	Glycerin
20% (v/v)	β-Merkaptoethanol
10% (w/v)	SDS
1 Spatelspitze	Bromphenolblau

Durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer relativen Größe aufgetrennt. Die Protein-Lysate wurden mit SDS-Proben-Puffer versetzt. Die Proteinproben wurden zuerst für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Bio-Rad Gelkammern wurden für die Elektrophorese verwendet. Das Trenngel wurde durch Mischen entsprechender Mengen der Chemikalien angesetzt, in die Glassplatten bis 1 cm vom oberen Rand gegossen, und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde darauf gegossen und ein Probentaschenkamm darin eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengesetzt und das Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt. Danach wurden 10 µg oder 20 µg Protein in jede Tasche geladen. Hier wurde darauf geachtet, dass in jede Kammer gleich viel Volumen gegeben wurde. Hierzu wurde entsprechend SDS-Proben-Puffer zu den Proben zugegeben. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 15 min bei 100 V und 60 Minuten bei 150 V. Die geelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch eine Immunoblot-Analyse analysiert (siehe 3.3.4 und 3.3.5).

3.3.4 Wet-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Transfer-Puffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,02 % (w/v)	SDS
20% (v/v)	Methanol

Mittels Wet-Blot werden nach der SDS-PAGE (siehe 3.3.3) Proteine auf Nitrozellulose-Membran (Bio-Rad) transferiert, um sie anschließend durch eine Immunoblot-Analyse (siehe 3.3.5) zu analysieren. Außer der Membran wurden 2 Papier-Filter (Bio-Rad) und 2 Schaumstoffe für den Transfer verwendet. Die Membran, die Filter, und die Schaumstoffe wurden in Transferpuffer für 15 min eingeweicht. Auf der Kathodenseite der Blotkassette (Bio-Rad) wurde folgender Aufbau vorgenommen:

- Kathode (-) (schwarze Seite)
1. Ein Schaumstoff
 2. Ein Papierfilter
 2. Gel (blaue Bande unten, Standard rechts)
 3. Membran
 4. Ein Papierfilter
 5. Ein Schaumstoff
- Anode (+) (rote Seite)

Der Transfer für ZO-1-Transfer erfolgte bei 4 °C über Nacht für ZO-1-Transfer mit 350 mA, 300W.

3.3.5 Immunoblot-Analyse

TBST-Waschpuffer:

10 mM	Tris
0,15 M	NaCl
0,05 % (v/v)	Tween

Blockierungspuffer:

1x	Waschpuffer
5% (w/v)	Magermilchpulver

Coomassie-Färbelösung:

40% (v/v)	Methanol
5% (v/v)	Essigsäure
1 Spatelspitze Coomassie Brilliant Blau	

Entfärbelösung:

40% (v/v)	Methanol
5% (v/v)	Essigsäure

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran (siehe 3.3.4) wurde die Membran für 5 min in Ponceau S inkubiert, um die transferierten Proteine anzufärben. Dann wurde die Membran kurz mit Leitungswasser gespült und die Proteinbanden des Proteinmarkers mit einem Bleistift markiert. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch 3 x 5 min mit Waschpuffer. Zur Kontrolle des Blotvorgangs wurde außerdem das Gel in Coomassie-Färbelösung für 1 Stunde inkubiert und mit Entfärbe-Lösung für 1 Stunde entfärbt. Wenn kein Protein auf dem Gel nach der Coomassie-Färbung zu sehen ist, ist der Transfer der Proteine vom Gel zu der Membran erfolgreich. Die Membran wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde der Primärantikörper in der geeigneten Verdünnung in Blockierungslösung mit der Membran 2 Stunden bei Raum-Temperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde zur Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), der im Verhältnis 1:5000 in Blockierungspuffer verdünnt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des Immunkomplexes erfolgte durch Zugabe der ECL-Lösung, die zuvor angesetzt wurde, auf die Membran. Die Membran wurde für 3 min in der Lösung inkubiert, zwischen zwei Plastikfolien

gelegt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Dieser wurde anschließend im Röntgenentwicklungsgerät entwickelt.

Die Röntgenfilme wurden dann eingescannt und als Bilder gespeichert. Die Bilder wurden mit der Software Adobe Photoshop zu graustufigen Bildern bearbeitet. Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Banden aus dem Bild ausgeschnitten, in eine neue Datei kopiert, und als eine TIF-Datei gespeichert. Anschließend wurde diese TIF-Datei zur Quantifizierung der Proteinmenge mit der Software ImageJ geöffnet. Das Tool Rectangular und Strg+1 ermöglicht das Markieren der Proteinbanden einer Probe. Der markierte Bereich konnte mit Strg+2 kopiert werden, sodass andere Proben auch markiert wurden. Danach wurden durch Strg+3 die Intensitäten der Proteine als Spitzen (Peaks) in einem Diagramm dargestellt. Mit dem Tool Straight wurde eine Linie am Boden einer Spitze gezogen, sodass der Bereich einer Spitze markiert wurde. Die Fläche dieses Bereichs wurde mit dem Tool Wand berechnet. Schließlich wurden diese Werte mit MS Excel analysiert. Die Intensität des ZO-1-Proteins wurde durch die des House-Keeping-Proteins geteilt. Diese Werte wurden bei Knockdown-Versuchen auf den Wert der Non-Target-Zellbehandlung (NT) normalisiert (Als Beispiel siehe Abb. 3.5).

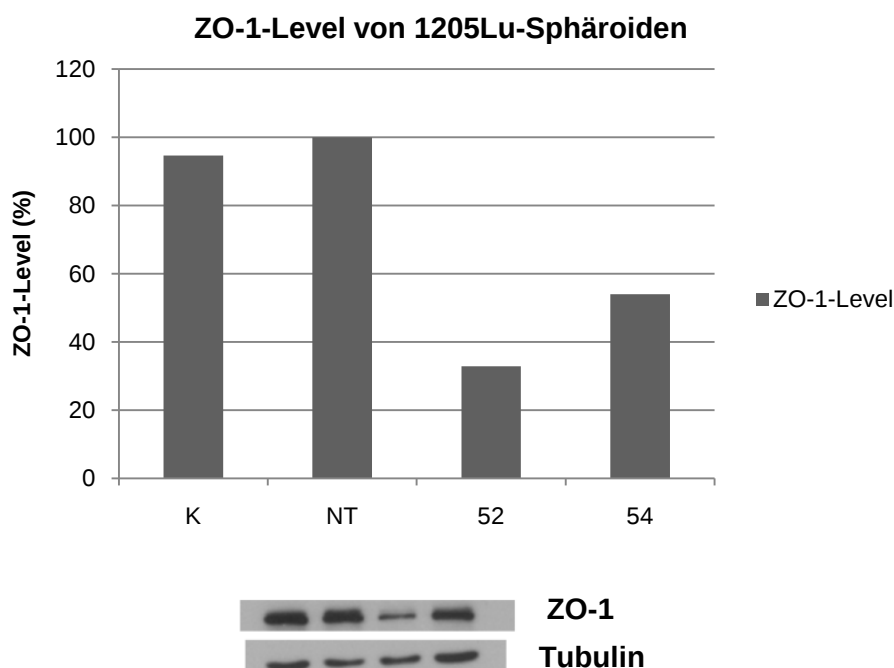


Abb. 3.5: Ein Beispiel einer Western-Blot-Auswertung: Das prozentuale ZO-1-Level einer Probe ist ihre ZO-1-Protein-Intensität, die auf der Intensität des Housekeeping-Gens, Tubulin, und auf der Intensität der Zellbehandlung Non-Target (NT) normalisiert ist.

3.4. Statistische Analyse

Die Unterschiede der ZO-1-Proteinexpression von Melanom-Zell-Linien wurde mit Anova von SPSS 22.0.0 (IBM) untersucht, sodass bestehende signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. Zum Vergleich der beiden Melanom-Linien (1205Lu-Wildtyp und WM35-Wildtyp) in der Kollagen-Invasion, dem Sphäroidwachstum, der Sphäroidgröße, der Dissoziationsrate und der Proliferationsrate wurden T-Tests mit SPSS durchgeführt.

Zur statistischen Analyse der Daten von zellbasierten Assays mit der einzelnen Linie (den Kollagen-Invasionsassays, den Boyden-Kammer-Assays, den Dissoziationsassays und den Proliferationsassays) wurden lineare gemischte Modelle mit der Software SPSS 22.0.0 (IBM) angewendet. Das Modell wird als gemischtes Modell bezeichnet, da in derselben Analyse sowohl feste als auch Zufallsfaktoren verwendet werden. Mit diesem statistischen Verfahren ist es möglich, Korrelations-Modelle zu analysieren (Seltman, 2015). Die Korrelation zwischen einem Faktor und der abhängigen Variable kann quantitativ geschätzt werden, nicht nur ob der Faktor bei höherem oder niedrigerem Level eine Rolle spielt, sondern auch wieviel die Variable vom veränderten Faktor um eine Einheit beeinflusst wird.

Darüber hinaus erlaubt diese statistische Prozedur nicht konstante Variabilität (IBM, 2012). Die Protein-Intensität kann von technischen Faktoren beeinflusst werden, sodass die Intensitäten bei jedem Elektrophorese/Blot-Versuch und jeder Röntgen-Detektion Abweichungen zeigen. Fernández, et. al. (2008) berichtete auch über diese Versuchseffekte beim Nachweis der Proteine und verwendete lineare gemischte Modelle für ihre statistische Analyse. Deshalb wurde in dieser Arbeit Versuch als ein Zufallsfaktor in der statistischen Analyse eingetragen. Für die abhängige Variable wird außerdem angenommen, dass sie aus einer Normalverteilung stammt (IBM, 2012). Bei einer schiefen Verteilung wurden die Daten in In-Skala (logarithmus naturalis) umgewandelt, sodass die Daten eine Normal-Verteilung hatten. Die abhängige Variable war die Steigung bei den Sphäroidsinvasion-, Dissoziation-, und Proliferation-Versuchen. Die abhängigen Variablen bei den Boyden-Kammer-Versuchen sind die Zahl der invadierten und die Zahl der migrierten Zellen. Bei allen Versuchen wurde das ZO-1-Level als ein fester Faktor eingegeben. Andere feste Faktoren wie z.B. Zellbehandlungen wurden auch analysiert und in den jeweiligen Tabellen im Ergebniss-Teil gelistet. Die hierfür verwendeten Syntax-Befehle sind im Anhang gelistet.

Außerdem wurde in den Kollagen-Invasionsversuchen getestet, ob die Ursprungsgesamtfläche die Steigungen beeinflusst. Wenn die Ursprungsgesamtfläche die Steigungen beeinflusst, wird sie in dem Statistik-Modell zur Analyse von weiteren Parametern, wie dem ZO-1-Level und der Kollagen-Konzentration, nicht miteinbezogen.

Weitere statistische Analysen mit dem WM35-Datensatz ähneln größten Teils den Analysen mit den 1205Lu-Daten. Der Unterschied ist, dass eine Konstante für die Variable

ZO-1 zu dem Zufallsfaktor zugegeben wird, da der Versuch Nr. 1 im Vergleich zu anderen Versuchen eine sehr starke Korrelation aufweist und dies die schwachen Korrelationen, die bei den anderen Versuchen gefunden wurden, überlagert. Durch die Zugabe dieser Konstante wurden die Daten der anderen Versuche nicht mehr vom Versuch Nr. 1 überlagert.

4. Ergebnisse

4.1 Maligne Melanom-Zell-Linien exprimierten unterschiedliche Mengen von ZO-1

Die ZO-1-Protein-Expression von malignen Melanom-Zell-Linien wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. WM793-Zellen besaßen im Vergleich zu anderen Zell-Linien sehr wenig ZO-1-Protein (siehe Abb. 4.1). Die WM35-Zell-Linie exprimierte ZO-1 am stärksten. Es gibt keinen signifikanten Unterschied im ZO-1-Level zwischen MV3 und 1205Lu. Zwei Zelllinien, 1205Lu und WM35, besaßen das höchste ZO-1-Level und waren somit geeignet für die Etablierung von Knockdown-Zellen.

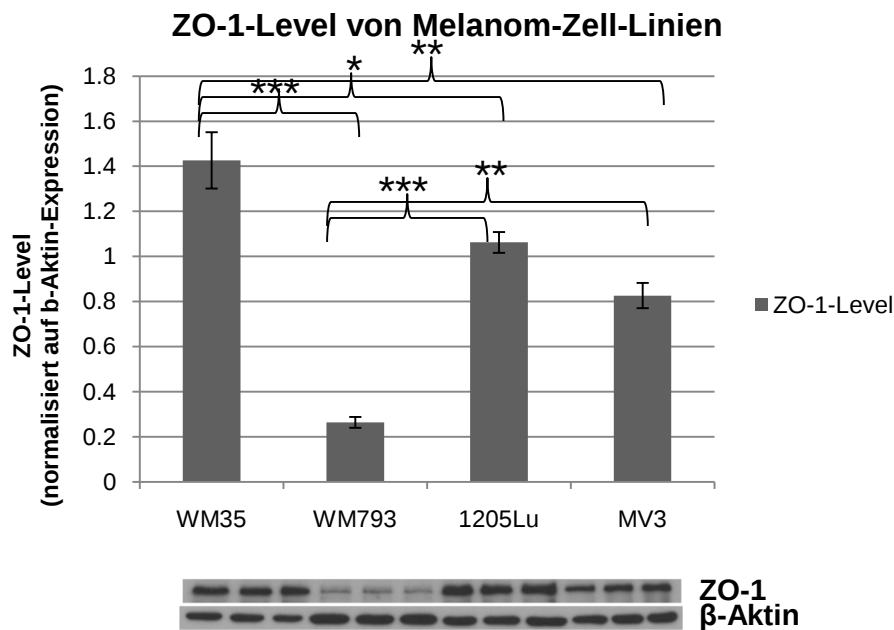


Abb. 4.1: Relative ZO-1-Expression von malignen Melanom-Zell-Linien. Die relativen Unterschiede wurden durch Normalisierung zum Referenzprotein β -Aktin ermittelt (n=3, biologische Triplikate, Anova, SEM, *:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0,001).

4.2 Maligne Melanom-Zell-Linien besaßen unterschiedliche Invasivität, Proliferationsrate und Dissoziationsrate

Zunächst wurde die Invasivität von WM35 und 1205Lu in Kollagenmatrizes in dieser Doktorarbeit genauer untersucht. Dabei wurden zwei Kollagenkonzentrationen (1 mg/ml und 2 mg/ml) verwendet.

Vergleicht man die Steigung der Invasionsfläche (siehe Methoden 3.1.7.2.) der 1205Lu und der WM35-Sphäroide, beobachtet man, dass Sphäroide aus WM35 Zellen sowohl in 1 mg/ml (Abb. 4.2) als auch in 2 mg/ml Kollagen (Abb. 4.3) im Trend invasiver als Sphäroide aus 1205Lu-Zellen waren. Dies war aber nicht signifikant (siehe Abb. 4.2E und 4.3E).

Außerdem wurde das Sphäroidwachstum (die Vergrößerung der Sphäroidgröße über die Zeit) der beiden Linien verglichen. Während die Invasionsflächen von WM35 schneller als die Invasionsflächen von 1205Lu zunahmen, wuchsen die 1205Lu-Sphäroide schneller als WM35-Sphäroide sowohl in 1 mg/ml (Abb. 4.4A) als auch in 2 mg/ml Kollagen (Abb. 4.4B). Die Unterschiede der beiden Linien im Sphäroidwachstum waren aber ebenfalls nicht signifikant. In den Kollagen-Versuchen waren die Ursprungsgrößen der 1205Lu-Sphäroide auch größer und dies war signifikant (siehe Abb. 4.5).

Darüber hinaus wurde die Proliferation der adhärenenten Zellen der beiden Linien verglichen. Die Zunahme der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag war bei den 1205Lu-Zellen etwas höher als bei den WM35-Zellen aber dies war nicht signifikant (siehe Abb. 4.6A). Die Zunahme der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag bei den 1205Lu-Zellen war wesentlich höher. Dies war aber ebenfalls nicht signifikant (siehe Abb. 4.6B).

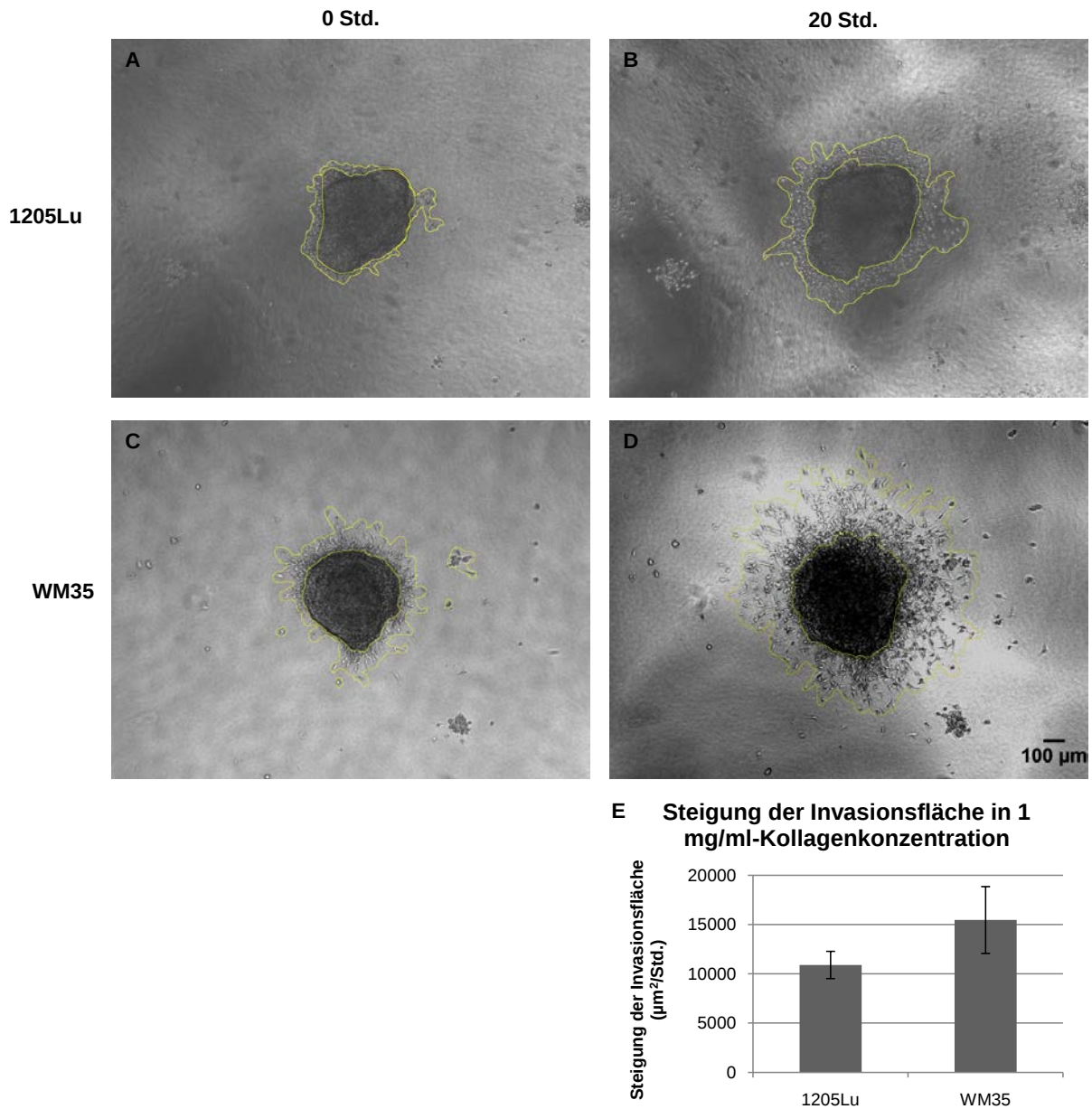


Abb. 4.2: Die Invasion von malignen Melanom-Zell-Linien, 1205Lu (A, B, E) und WM35 (C, D, E) in 1 mg/ml-Kollagen. Der Invasionsbereich wurde mit der inneren und der äußeren Linie markiert. A und C sind Bilder der Sphäroide bei Beginn des Versuchs. B und D sind Bilder der Sphäroide nach 20 Stunden. E: Die Zunahme der Invasionsfläche mit der Zeit ($\mu\text{m}^2/\text{Std.}$) (Steigung der Invasionsfläche) von den beiden Linien. WM35 war invasiver als 1205Lu aber nicht signifikant (T-Test, $p=0,233$, SEM, $n\text{-}1205\text{Lu}=9$, $n\text{-}WM35=11$).

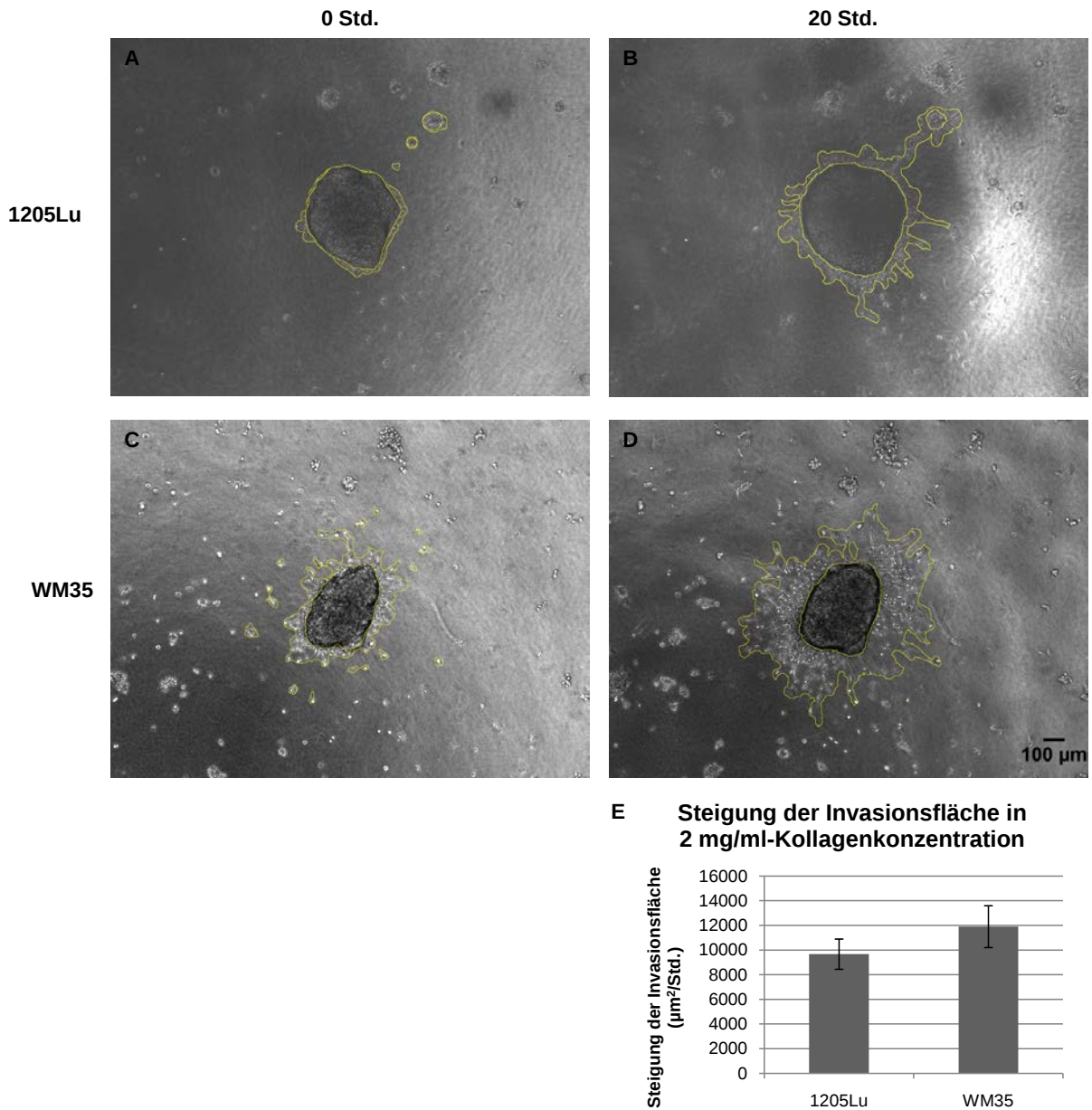


Abb. 4.3: Die Invasion von malignen Melanom-Zell-Linien, 1205Lu (A, B, E) und WM35 (C, D, E) in 2 mg/ml-Kollagen. Der Invasionsbereich wurde mit der inneren und der äußeren Linie markiert. A und C sind Bilder der Sphäroiden bei Beginn des Versuchs. B und D sind Bilder der Sphäroiden nach 20 Stunden. E: Die Zunahme der Invasionsfläche mit der Zeit ($\mu\text{m}^2/\text{Std.}$) (Steigung der Invasionsfläche) von den beiden Linien. WM35 war mehr invasiv als 1205Lu aber nicht signifikant (T-Test, $p=0,299$, SEM, $n\text{-}1205\text{Lu}=11$, $n\text{-}WM35=12$).

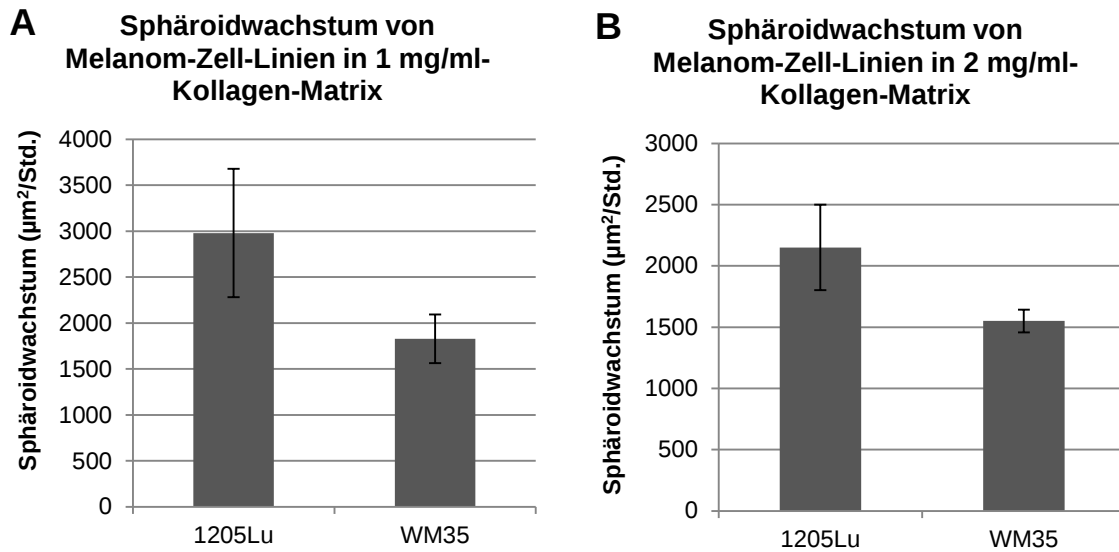


Abb. 4.4: Die Zunahme der Sphäroidgröße mit der Zeit ($\mu\text{m}^2/\text{Std.}$) von den beiden Linien in 1 mg/ml-Kollagen (A) und in 2 mg/ml-Kollagen (B). Die 1205Lu-Sphäroide wuchsen schneller als WM35-Sphäroide aber nicht signifikant (T-Test, A ($p=0,153$, $n_{1205\text{Lu}}=9$, $n_{\text{WM35}}=11$), B ($p=0,124$, $n_{1205\text{Lu}}=11$, $n_{\text{WM35}}=12$), SEM).

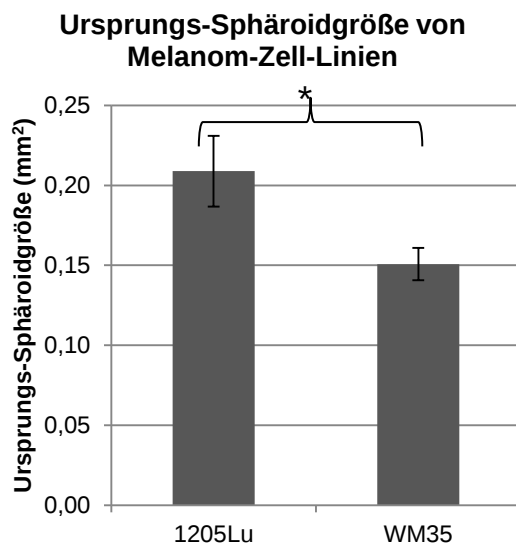


Abb. 4.5: Die Ursprungs-Sphäroidgröße von den beiden Linien in den Kollagen-Invasionsversuchen. Die 1205Lu-Sphäroide waren am Anfang der Versuche signifikant größer als die WM35-Sphäroide (T-Test, $p=0,024$, $n_{1205\text{Lu}}=20$, $n_{\text{WM35}}=23$, SEM).

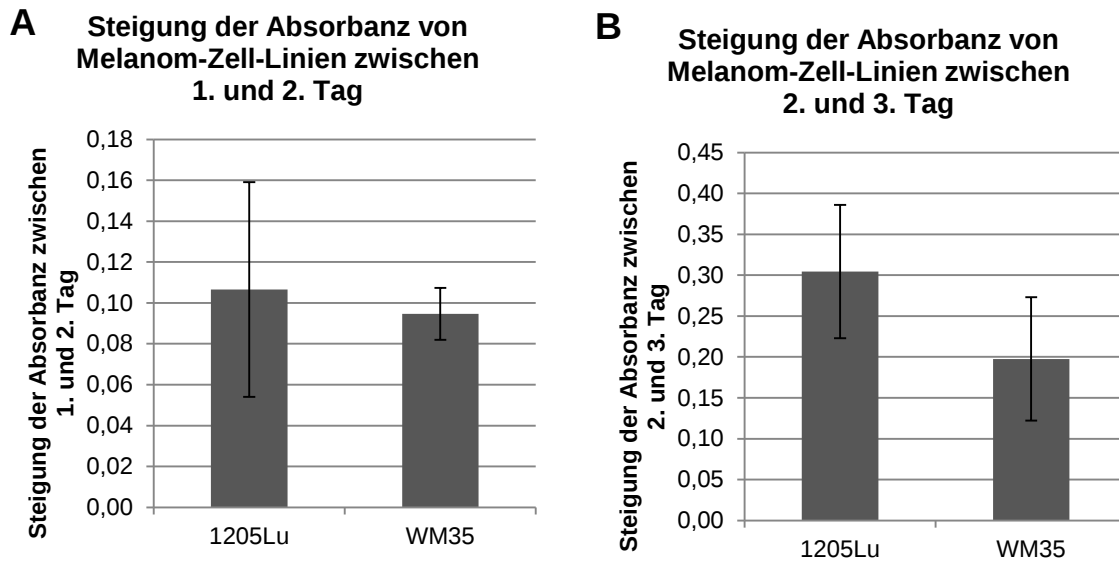


Abb. 4.6: Die Zunahme der Absorbanz von BrdU-behandelten Zellen von den beiden Linien zwischen 1. und 2. Tag. (A) und die Zunahme der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag (B). Die Zunahme der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von 1205Lu-Zellen war etwas höher als die Zunahme der Absorbanz von WM35-Zellen und nicht signifikant. Die Zunahme der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag von 1205Lu-Zellen war höher als die Zunahme der Absorbanz von WM35-Zellen aber ebenfalls nicht signifikant (T-Test, A ($p=0,844$), B ($p=0,390$), $n=3$, SEM).

Darüber hinaus wurde die Dissoziationsrate der Sphäroiden von den beiden Linien untersucht. Die Sphäroide aus 1205Lu-Zellen lösten sich schneller auf als die Sphäroide aus WM35-Zellen aber der Unterschied war nicht signifikant (siehe Abb. 4.7 A, B, C). Zusammengefasst war WM35 in den Kollagenmatrizen invasiver als 1205Lu-Zellen. Dahingegen wuchsen die 1205Lu-Sphäroide schneller als WM35-Sphäroiden. Dies wurde auch bei dem Vergleich von ihrer Proliferationsfähigkeit gefunden. Außerdem dissoziierten 1205Lu-Sphäroide schneller als WM35-Sphäroide.

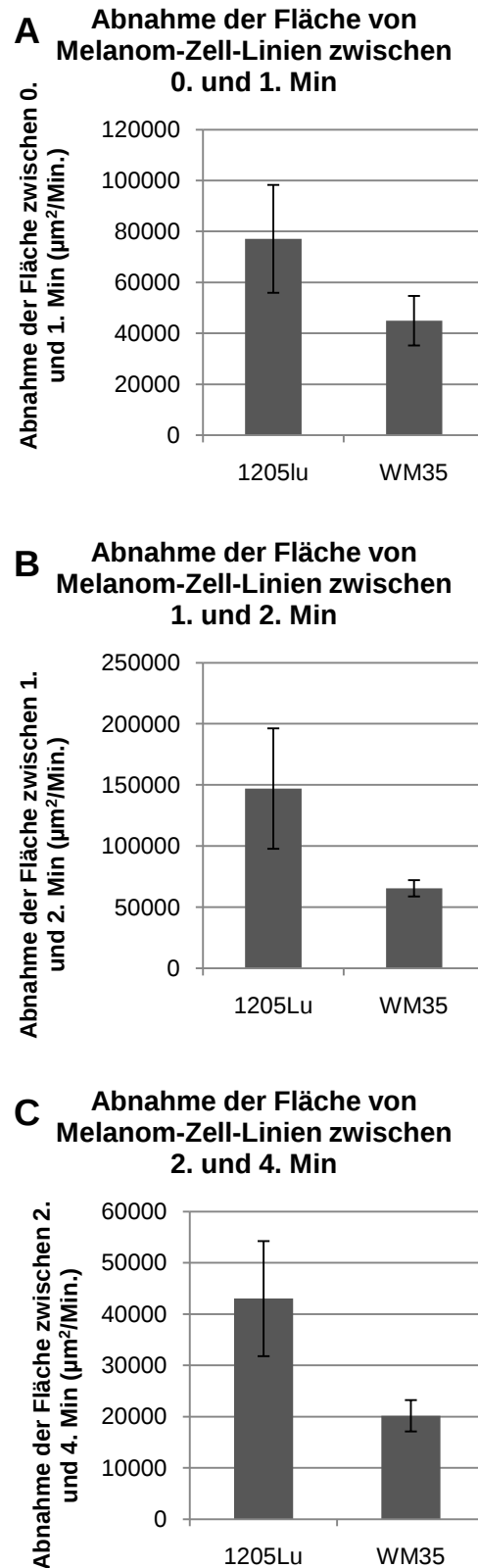


Abb. 4.7: Dissoziation der Sphäroide (Abnahme der Sphäroid-Fläche) von den beiden Linien zwischen 0. und 1. Min (A). Abnahme der Fläche zwischen 1. und 2. Min (B). Abnahme der Fläche zwischen 2. und 4. Min (C). Die Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden war höher als die Abnahme der WM35-Sphäroide aber nicht signifikant (A, B, C). (T-Test, A ($p=0,171$), B ($p=0,143$), C ($p=0,085$), $n_{1205Lu}=8$, $n_{WM35}=9$, SEM).

4.3 Etablierung von lentiviralen Knockdown-Melanom-Zellen

Zur Herstellung von Zellen mit unterschiedlichem ZO-1-Level wurden 1205Lu- und WM35-Zellen, mit 5 shRNA-Lentiviren (Nr. 52-56) transduziert. Die Lentiviren wurden durch eine Transfektion mit den Plasmiden mit ZO-1-spezifischen shRNA-Sequenzen generiert und diese anschließend zur Infektion der Zielzellen verwendet (siehe 3.1.5). Parallel dazu erfolgte die Transduktion der jeweiligen Zelllinie mit den Non-Target-Viren, die als weitere Kontrolle diente. In den Zielzellen wird die RNA der Viren in virale DNA umgeschrieben und ins Genom der Zielzellen integriert. Diese DNA-Sequenz beinhaltet sowohl die shRNA-Sequenz als auch das Gen zur Selektion von transduzierten Zellen, das Puromycin-Resistenz-Gen. Diese werde von den Wirts-Zellen in die jeweilige shRNA transkribiert oder in das Enzym, die für die Resistenz gegen Puromycin verantwortlich ist, translatiert.

4.3.1 Bestimmung der Puromycin-Konzentration zur Selektion von transduzierten Melanom-Zellen

Eine geeignete Konzentration von Selektionsantibiotikum ist entscheidend für eine erfolgreiche Selektion von shRNA-Lentivirus-transduzierten Zellen. Hierzu wurde eine Reihe von Puromycin-Konzentrationen ausgetestet. Eine Konzentration, bei der alle Wildtyp-Zellen innerhalb von 3-5 Tagen gestorben sind, ist für die Selektion geeignet. Pro Loch einer 96-Loch-Platte wurden einen Tag vor der Puromycin-Zugabe 16000 Zellen ausgesät. Die getesteten Konzentrationen lagen von 0,5 bis 9 µg/ml (siehe Abb 4.8 und 4.9). Während für 1205Lu-Zellen 1,5 µg/ml als Selektionkonzentration gewählt wurde, wurde für WM35-Zellen 1 µg/ml gewählt (siehe Abb. 4.8 B und 4.9 B).

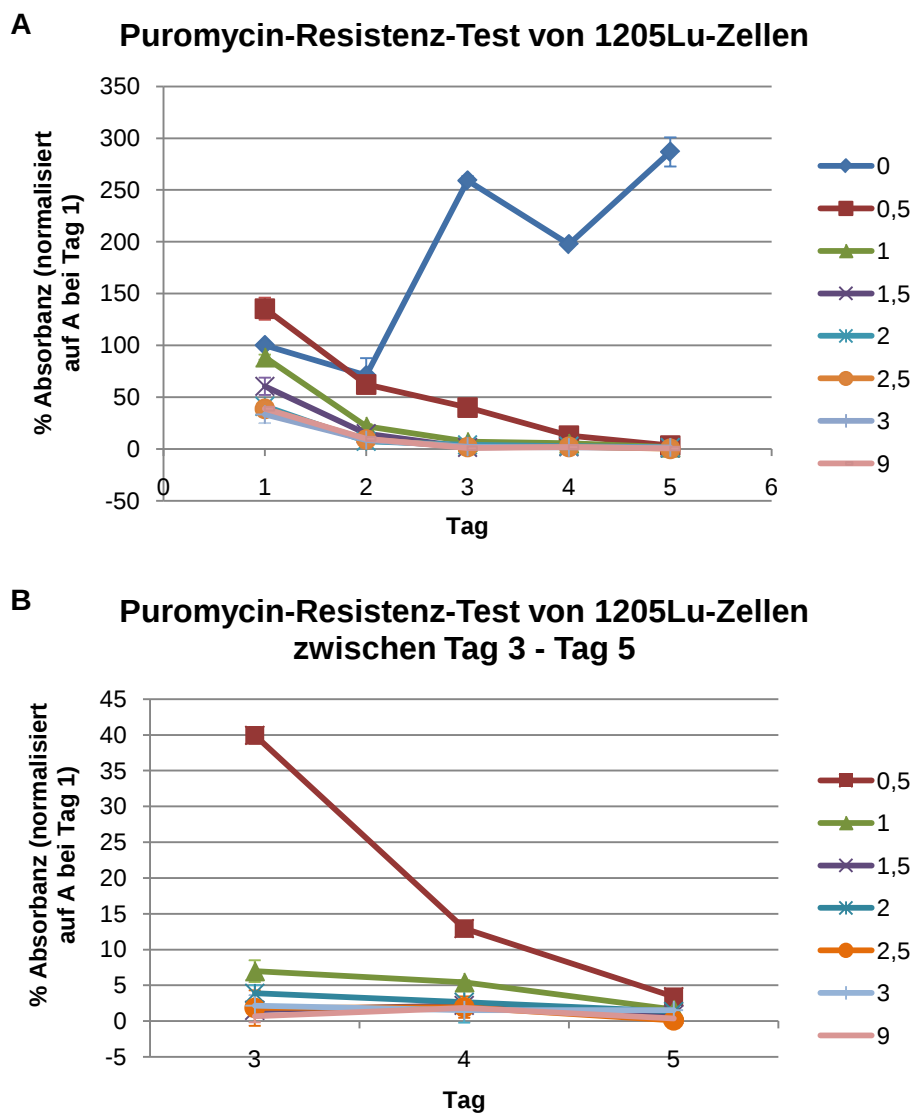


Abb. 4.8: Bestimmung geeigneter Puromycin-Konzentrationen zur Selektion erfolgreich-transduzierter Zellen für 1205Lu-Zellen an allen Tagen (A) und vom 3. bis zum 5. Tag (ohne unbehandelte Kontrolle zur besseren Übersicht) (B). (3 technische Replikate, SEM).

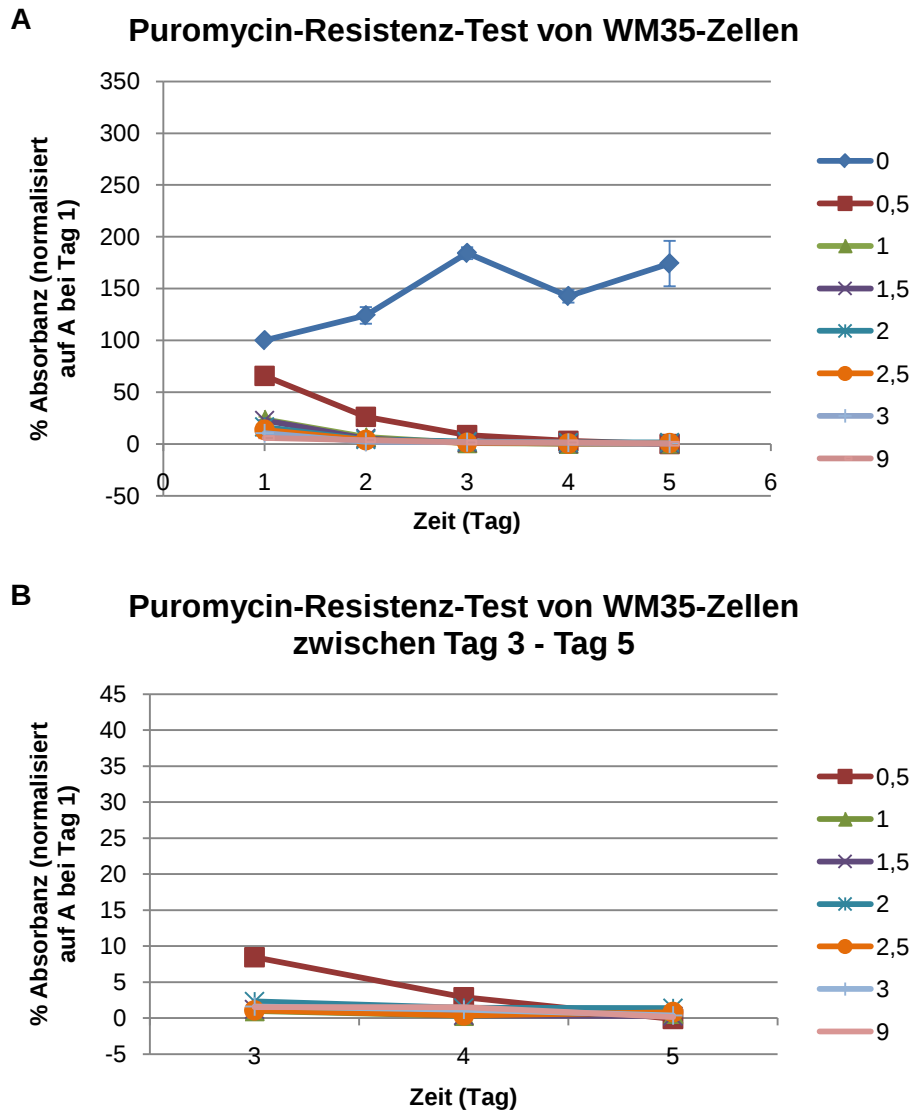


Abb. 4.9: Bestimmung geeigneter Puromycin-Konzentrationen zur Selektion erfolgreich-transduzierter Zellen für WM35-Zellen an allen Tagen (A) und vom 3. bis zum 5. Tag (ohne unbehandelte Kontrolle zur besseren Übersicht) (B). A: Tag 1 (3 technische Replikate, SEM).

4.3.2 Herstellung von 1205Lu-Knockdown-Zellen

Zur Etablierung von malignen Melanom-Knockdown-Modellen wurden die Melanom-Zell-Linien mit 5 verschiedenen shRNA-Lentiviren transduziert. Außerdem wurde eine Kontrolle mit einer Sequenz, die kein Zielgen hat, sogenannte Non-Target-Kontrolle (NT) hergestellt. Nach der Zugabe von shRNA-Lentiviren auf 1205Lu-Zellen wurden transduzierte Zellen durch Behandlung mit dem Puromycin-Antibiotikum selektioniert. Zur Kontrolle wurden Wildtyp-Zellen (K) parallel in Puromycin-haltigem Medium kultiviert. Während transduzierte Zellen die Puromycin-Behandlung überlebten, starben alle K-Zellen. Sowohl aus den

transduzierten Zellen als auch aus den Wildtyp-Zellen wurden RNA und Proteine isoliert und ihre ZO-1 Expression wurde durch qPCR- und Western-Blot-Analyse untersucht.

Als Vorversuch wurde die ZO-1-Expression dieser Zellen auf mRNA-Ebene verglichen. Von den getesteten shRNA-Sequenzen verminderten die Sequenzen der shRNA 52, 54, 55 und 56 das ZO-1-Transkript (siehe Abb. 4.10). Daraus wurden zwei shRNA-behandelte Zellen mit unterschiedlichen ZO-1-Levels, shRNA-52 und shRNA-54-Zellen, ausgesucht. Anschließend wurde ihre Expression in größere n-Zahl untersucht (siehe Abb. 4.11). Es gab eine signifikante Reduktion der ZO-1-Expression bei 52- und 54-Zellen, im Vergleich zu den beiden Kontrollen. Die 54-Zellen exprimierten mehr ZO-1 als die 52-Zellen. Während die 52-Zellen ein ZO-1-Level von $21 \pm 12\%$ ($n=5$) des NT-Levels besaßen, besaßen die 54-Zellen ein ZO-1-Level von $37 \pm 35\%$ ($n=5$).

Da unsere Hypothese war, dass nicht nur die reine Anwesenheit oder Abwesenheit von ZO-1 in der Entstehung oder in der Entwicklung von Melanomen eine Rolle spielte, sondern die Menge der ZO-1-Expression entscheidend ist, wurden in den weiteren Versuchen zum Analysieren der ZO-1-Rolle die Non-Target-, die 52-, und die 54-Linie verwendet. Die Prozesse in der Entwicklung von Melanomen, die dann analysiert wurden, sind die 3D-Invasion, die 2D-Invasion und –Migration, die Proliferation und die Dissoziation.

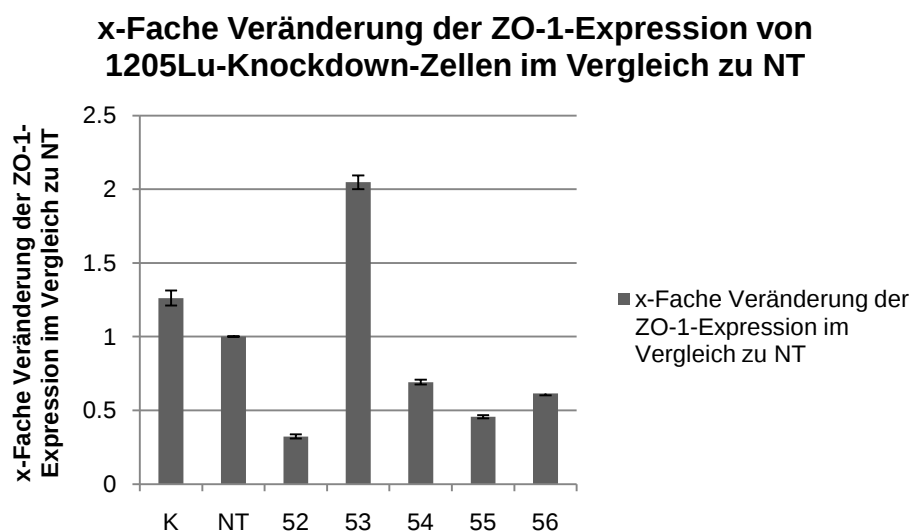


Abb. 4.10: Veränderung der ZO-1-Expression von 1205Lu-Knockdown-Zellen im Vergleich zu NT-Zellen, die durch qPCR-Analyse ermittelt wurde. Die relativen Unterschiede wurden als $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert gezeigt, die durch Normalisierung zum Referenzgen GAPDH und zum Wert von NT ermittelt wurde. (3 technische Replikate, K: Wildtyp-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52-56: ZO-1-shRNA-exprimierende Zellen)

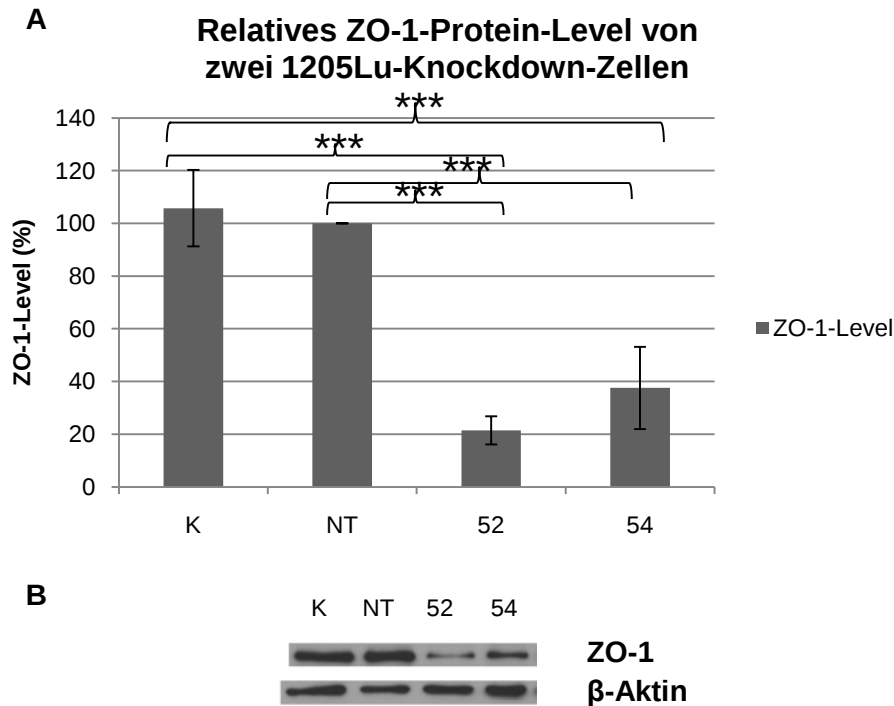


Abb. 4.11: Relatives ZO-1-Proteinlevel von shRNA-52 und shRNA-54 behandelten Zellen normalisiert auf das jeweilige β -Aktin-Level und NT. A: ZO-1-Level von 1205Lu-Zellen. (n=5, SEM, ***:p<0,001), B: Ein Beispiel der ausgewerteten Blots.

4.3.3 Herstellung von WM35-Knockdown-Zellen

Eine weitere Melanom-Zell-Linie, die für die Herstellung von ZO-1-Knockdown-Zellen ausgewählt wurde, war die Zell-Linie WM35. Wie bei der Etablierung von 1205Lu-Knockdown-Zell-Linien überlebten alle transduzierten Zellen die Puromycin-Behandlung. Die gesamten Wildtyp-Zellen starben nach der Zugabe dieses Antibiotikums.

In WM35-Zellen verminderten alle shRNA-Sequenzen die ZO-1-Expression (siehe Abb. 4.12). Aus diesem Vorversuch wurden für weitere ZO-1-Nachweisuntersuchungen (n=5) zwei shRNA behandelten Zellen ausgewählt, shRNA-52- und shRNA-55-Zellen.

Die Western-Blots zeigten, dass mit der shRNA-52 die bessere Herunterregulation der ZO-1-Expression erzielt wurde (siehe Abb. 4.13). Hier exprimierten 52-Zellen $20 \pm 13\%$ (n=5) des ZO-1-Levels von NT. Das 55-Präparat besaß signifikant mehr ZO-1 als das 52-Präparat und zwar $36 \pm 15\%$ (n=5) des NT-Levels. Beide Knockdown-Präparate hatten jedoch eine signifikante Verminderung der ZO-1-Expression. Für die zellbasierten Versuche, um die Rolle von ZO-1 in Melanomzellen zu untersuchen, wurden diese beiden WM35-Knockdown-Präparate verwendet.

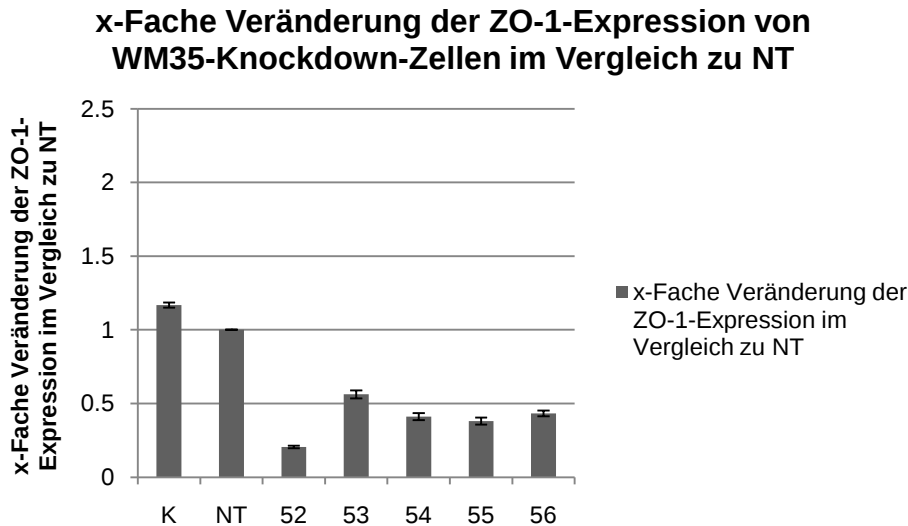


Abb. 4.12: Veränderung der ZO-1-Expression von WM35-Knockdown-Zellen im Vergleich zu NT-Zellen, die durch qPCR-Analyse ermittelt wurde. Die relativen Unterschiede werden als $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert gezeigt, der durch Normalisierung zum Referenzgen GAPDH und zum Wert von NT ermittelt wurde. (3 technischen Replikate, K: Wildtyp-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52-56: ZO-1-shRNA).

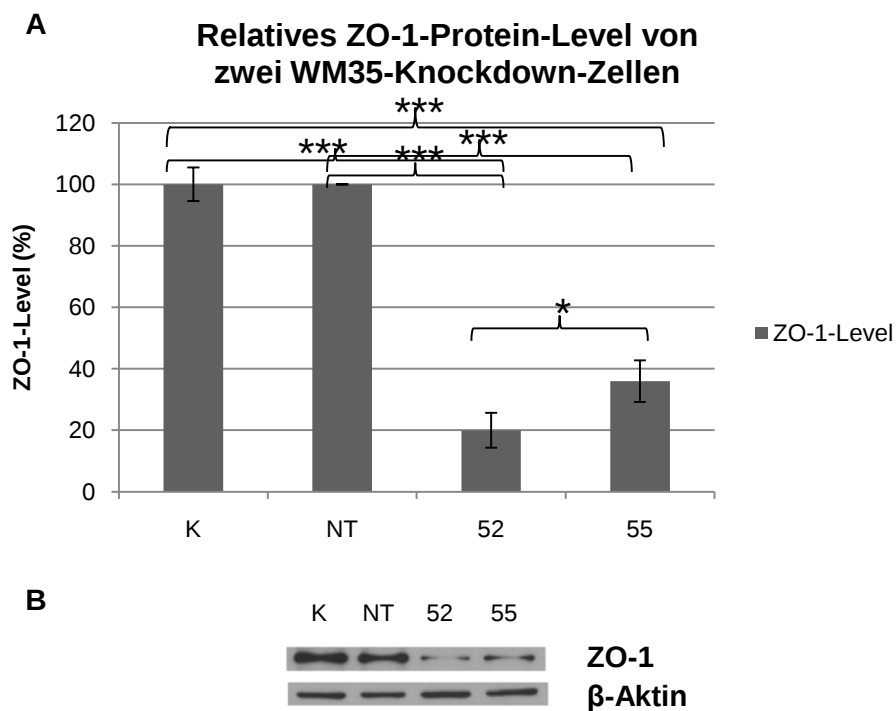


Abb. 4.13: Relatives ZO-1-Proteinlevel von shRNA-52 und shRNA-55 behandelten Zellen normalisiert auf das jeweilige β -Aktin-Level und NT. A: ZO-1-Level von WM35-Zellen (n=5, SEM, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$), B: Ein Beispiel der ausgewerteten Blots.

4.4 Invasion von Melanom-Sphäroiden in einer Kollagen-Matrix

Zur Untersuchung des Einflusses von ZO-1 auf die Invasivität von Melanom-Sphäroiden wurden die Sphäroide in Kollagen-Gele gesetzt und die Auswanderung der Zellen bzw. das Wachstum der Sphäroide bis zu 60 Std. mittels Live-Imaging dokumentiert. Diese Versuche wurden mit den oben genannten zwei Zell-Linien, 1205Lu und WM35 durchgeführt. Die Versuche mit der 1205Lu-Zell-Linie wurden mit den Knockdown Nr. 52 und 54 durchgeführt. Bei den Versuchen mit der anderen Zell-Linie, WM35, wurden die Knockdown-Zellen 52 und 55 verwendet. Außerdem wurden eine Wildtyp- und eine Non-Target-Kontrolle der jeweiligen Zell-Linie genutzt. Eine weitere Kontrolle wurde bei der Untersuchung mit der Linie WM35 mitintegriert. Diese Kontrolle ist die sogenannte Empty-Kontrolle und im Gegensatz zu der Non-Target-Kontrolle besitzt diese Kontrolle keine RNA-Sequenz sondern lediglich die Sequenz des Puromycin-Resistenz-Gens.

4.4.1 1205Lu-Sphäroidswachstum und Invasion

Die Abbildung 4.14 zeigte die Invasion von 1205Lu-Sphäroiden in 1 mg/ml-haltigem Kollagen bei einem Versuch. Im Vergleich zu den beiden Kontrollen hatten die beiden Knockdown-Zellen eine geringere Invasionsfläche. Ein Beispiel der Entwicklung der Sphäroide in der Kollagenmatrix während eines Versuchs wird in der Abb. 4.15 gezeigt. Anhand der Bilder wurden die Sphäroidgröße, die Invasionsfläche und die Gesamtfläche der Sphäroide über die Zeit gemessen (siehe Abb. 4.15). Diese Flächen nahmen über die Zeit zu und diese Zunahmen (Steigungen) wurden dann für die Auswertungen verwendet.

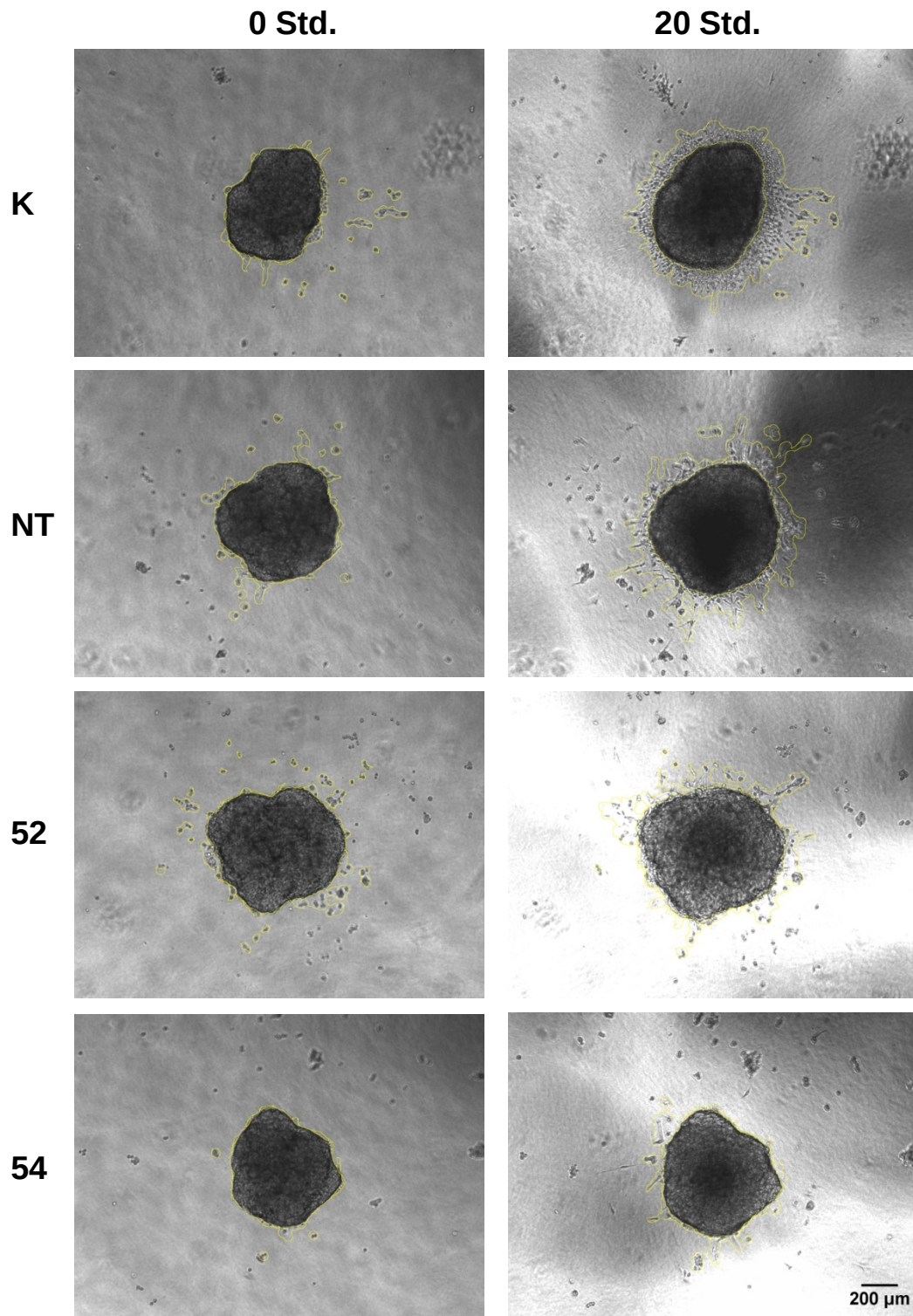


Abb. 4.14: Beispiel der Invasion von 1205Lu-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 1 mg/ml-haltigen Matrix K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 54: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=95%, NT=100%, 52=33%, und 54=54%. Zwischen den gelben Linien ist die Invasionsfläche des jeweiligen Sphäroids markiert. Skalierungslinie: 200 µm

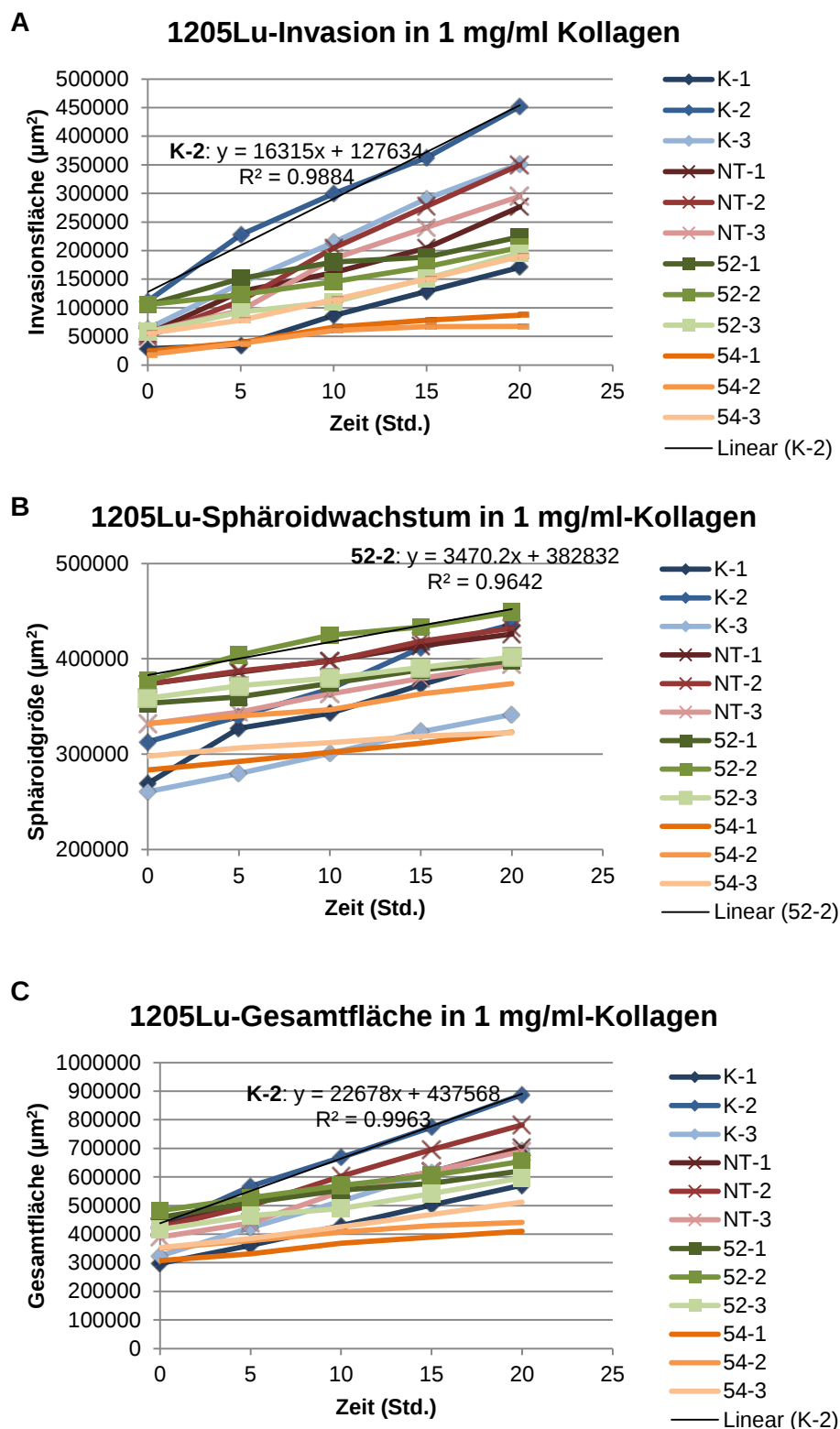


Abb. 4.15: Beispiel eines Kollagen-Invasionsversuchs mit 1205Lu-Zellen in einer 1 mg/ml Kollagen-haltigen Matrix. (A) Invasionsfläche, (B) Sphäroidgröße (C) Gesamtfläche zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die Invasionsversuche wurden außer in 1 mg/ml-Kollagen-haltiger Matrix noch in einer Matrix mit einer Kollagenkonzentration von 2 mg/ml durchgeführt. Auch hier invadierten

die Kontroll-Sphäroide stärker aus als die Knockdown-Sphäroide (siehe Abb. 4.16). Generell sah die Invasion in 1 mg/ml-Kollagen stärker als in 2 mg/ml-Kollagen aus.

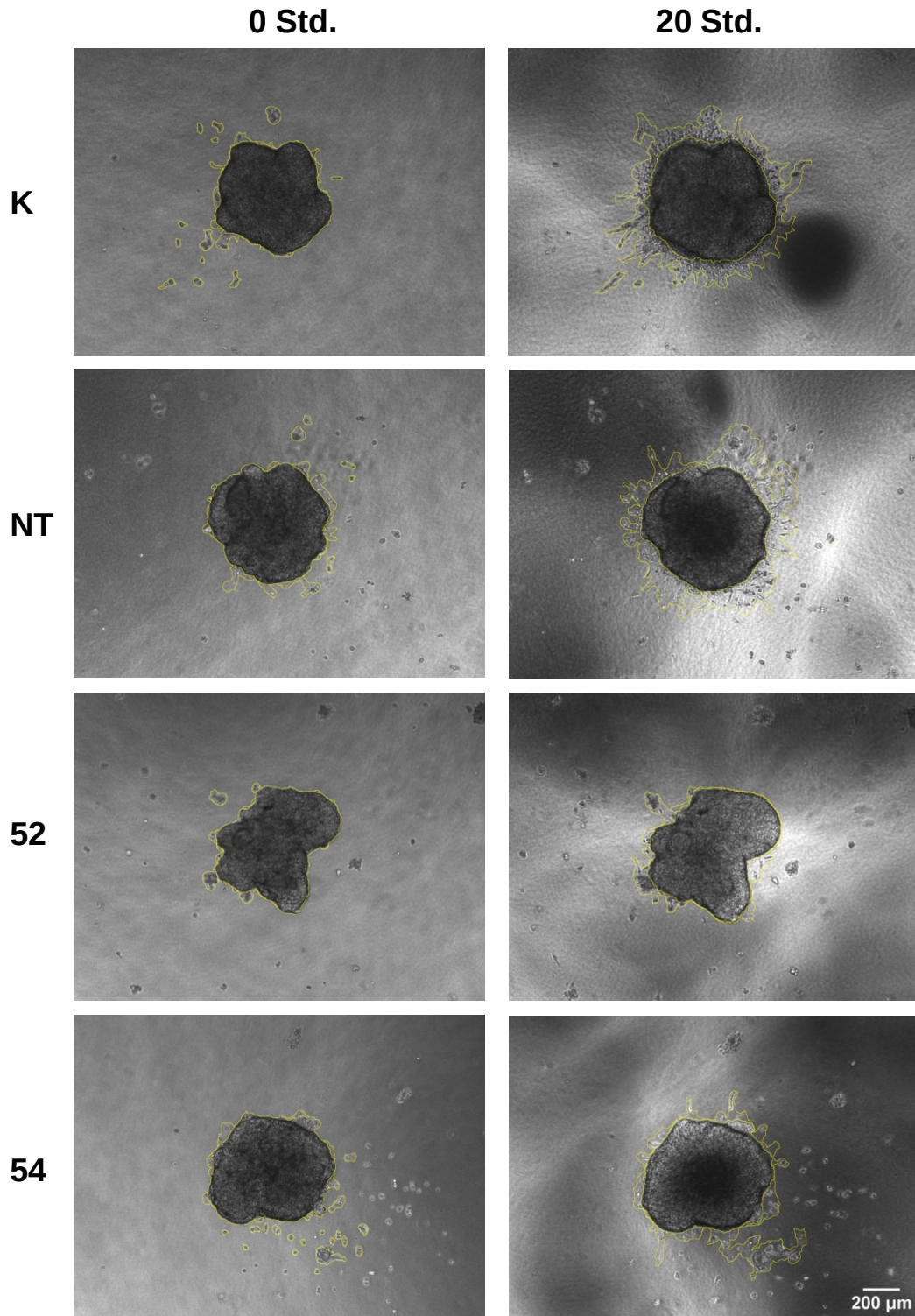


Abb. 4.16: Beispiel der Invasion von 1205Lu-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knockdown innerhalb von 20 Std. in einer 2 mg/ml-haltigen Matrix K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 54: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=95%, NT=100%, 52=33%, und 54=54%. Zwischen den gelben Linien ist die Invasionsfläche des jeweiligen Sphäroids markiert. Skalierungslinie: 200 µm

Die Steigungen der Zellbehandlungen werden verglichen. Die Abbildung 4.17 zeigt die Werte der Steigungen der unterschiedlichen Zellbehandlungen. Dabei zeigt sich, dass die Steigungen in 1 mg/ml Kollagen höher sind als die Werte in 2 mg/ml sind. Das heisst, die Zellen invadieren schneller und auch das Sphäroidwachstum ist schneller in 1 mg/ml als in 2 mg/ml. Darüber hinaus beobachtet man, dass die Steigung für die Invasion und der Gesamtfläche in der Knock-down Präparation 52 in beiden Kollagenkonzentrationen deutlich geringer ist als die WT und die NT-Kontrolle. Das heisst, dass die Invasion langsamer ist. Die Präparation 54 liegt auf Höhe der NT-Kontrolle. Für das Sphäroidwachstum liegen NT, 52 und 54 leicht unter der WT-Kontrolle.

Betrachtet man das ZO-1 Protein-Level in den Sphäroiden so beobachtet man die erwartete verminderte Protein-Expression in den Präparaten 52 und 54, wobei die Herabregulation für 54 geringer ist (Abb. 4.18). Überraschenderweise beobachtet man aber auch in der NT-Kontrolle – im Gegensatz zu Zellen, die zweidimensional gewachsen sind - eine deutliche, wenn auch, aufgrund der grossen Schwankung der ZO-1-Levels der Wildtyp-Kontrolle zwischen den Versuchen, nicht statistisch signifikante Erniedrigung des ZO-1 Levels (Abb. 4.18).

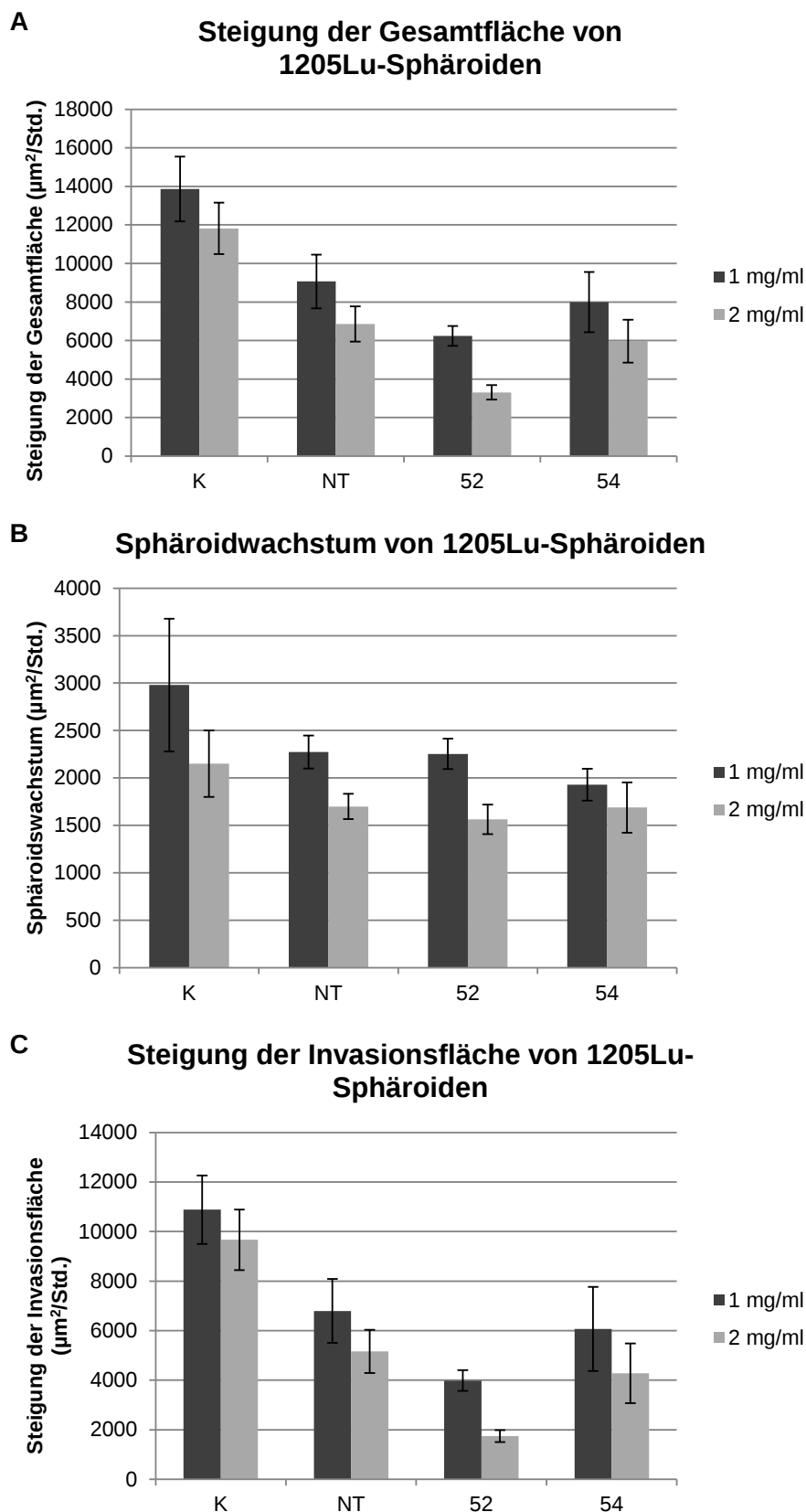


Abb. 4.17: Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von 1205Lu-Sphäroiden in einer Kollagenmatrix mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 2 mg/ml) (n=4, SEM).

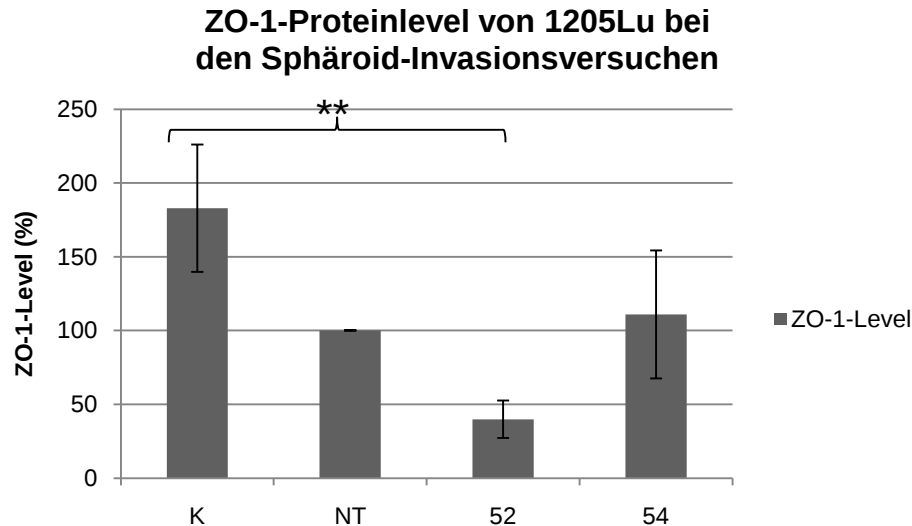


Abb. 4.18: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Sphäroidsinvasionsversuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=4, SEM, **:p<0,01).

Für die statistische Auswertung wurden die Werte der Steigungen in ln-Werte umgewandelt, sodass die Werte eine Normal-Verteilung haben, da die statistische Analyse mit einem linearen gemischten Modell eine Normal-Verteilung der Daten voraussetzt. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in der Abbildung 4.19 dargestellt.

Die Invasion von NT, 52 und 54 war signifikant niedriger als die Invasion von der Wildtyp-Kontrolle. Außerdem war die Invasion von 52 und 54 signifikant niedriger als NT. Es gab aber keine signifikanten Unterschiede im Sphäroidwachstum (siehe Abb. 4.19). Die Steigung der Gesamtfläche der Wildtyp-Kontrolle war signifikant höher als von NT, 52 und 54. Die NT-Kontrolle hatte signifikant höhere Steigung als 52 und 54. Außerdem wurde untersucht, ob die Kollagenkonzentration die Steigungen beeinflusst. Die Steigungen in 1 mg/ml waren signifikant höher als in 2 mg/ml, was die Werte vor der statistischen Analyse in der Abb. 4.17 bestätigt.

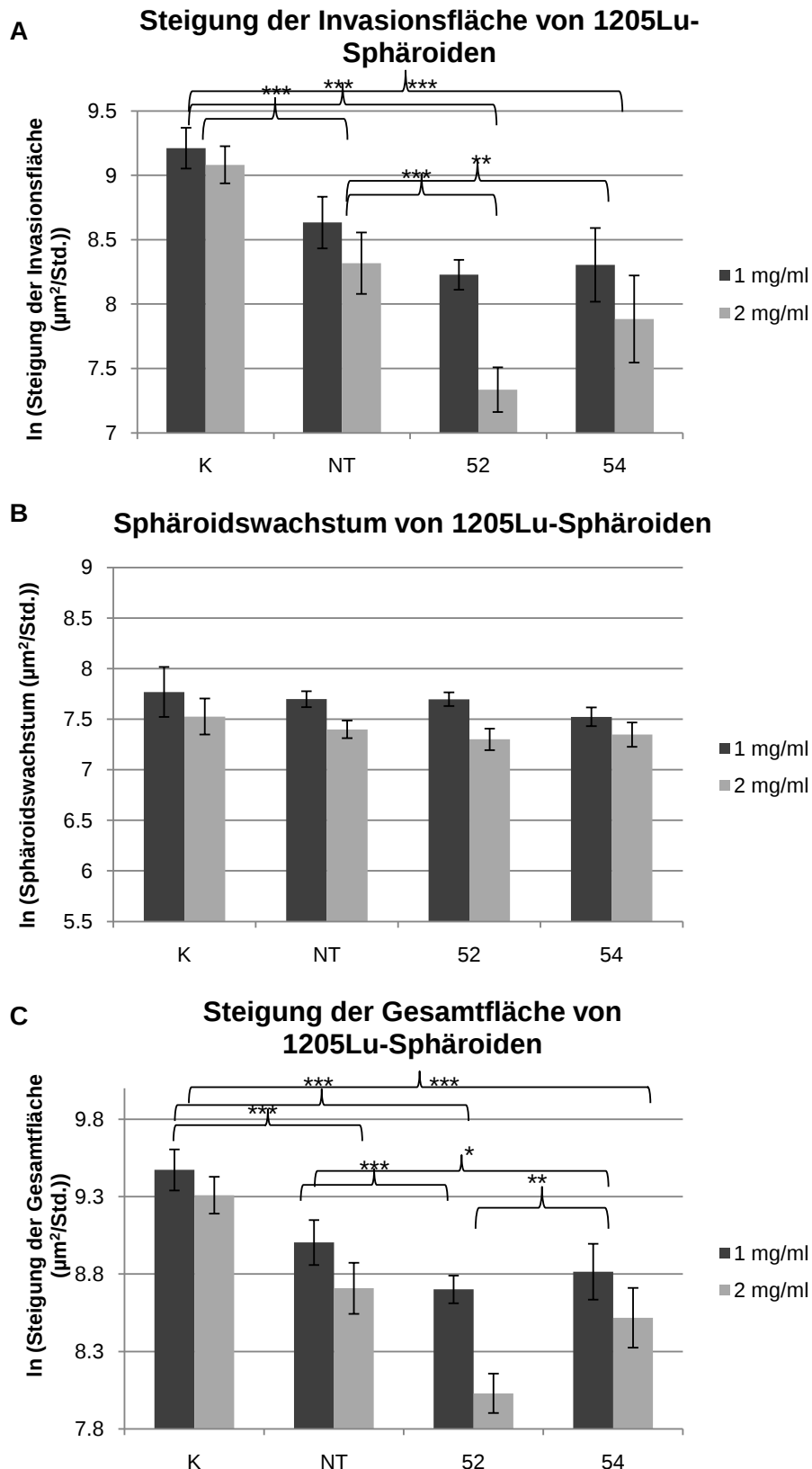


Abb. 4.19: Logarithmierte Steigungen der Gesamtfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Invasionsfläche (C) von 1205Lu-Sphäroiden. Die signifikanten Unterschiede auf den Bildern zeigen die Unterschiede zwischen den Zellbehandlungen (für beide Kollagenkonzentrationen (nicht getrennt)) (n=4, SEM, *:p<0,05, **:p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Die Kollagenkonzentration beeinflusst die drei Arten von Steigungen (der Steigung der Gesamtfläche: ****; der der Sphäroidgröße:***; der der Invasionsfläche: ***).

Wie bereits in 4.17 und 4.19 gezeigt, gab es signifikante Unterschiede in der Veränderung der Invasionsfläche pro Zeit und in der Veränderung der Gesamtfläche pro Zeit zwischen den verschiedenen Zell-Präparationen (K, NT, 52, 54). Darüber hinaus wurde in 4.16 gezeigt, dass sich die ZO-1 Level in den Präparationen unterschieden. Deshalb wurde nun analysiert, ob diese Veränderungen von den ZO-1-Levels abhängen.

Das Ergebnis der Analyse, ob die reine Invasion vom ZO-1-Level abhängt, wird in der Tabelle 4.1 gezeigt. Das ZO-1-Level korreliert positiv mit der Steigung der Invasion (siehe Abb. 4.20, Abb. 4.21 und Tabelle 4.1). Je höher die ZO-1-Expression eines Sphäroids war, desto höher war seine Invasion, und zwar steigt bei einer Zunahme des ZO-1-Gehalts von 20% steigt die Invasion um 14 % (siehe Tabelle 4.1).

Außerdem kann man auf den Abbildungen, Abb. 4.20 und Abb. 4.21, sehen, dass bei den einzelnen ZO-1 Konzentrationen eine höhere Invasion in der Kollagen-Matrix mit geringerer Kollagen-Konzentration stattfand. Dies ist statistisch signifikant (siehe Tabelle 4.2). Hier war die Invasion bei 1 mg/ml Kollagenkonzentration 45 % höher als bei 2 mg/ml (vgl. Tabelle 4.2). Des weiteren gab es eine ähnliche Korrelationen zwischen dem ZO-1-Level und der Invasion ($p=0,109$) bei den beiden Kollagenkonzentrationen. Dies bedeutet, dass die Invasion unabhängig von der Kollagenkonzentration steigt, wenn die ZO-1-Expression erhöht wird.

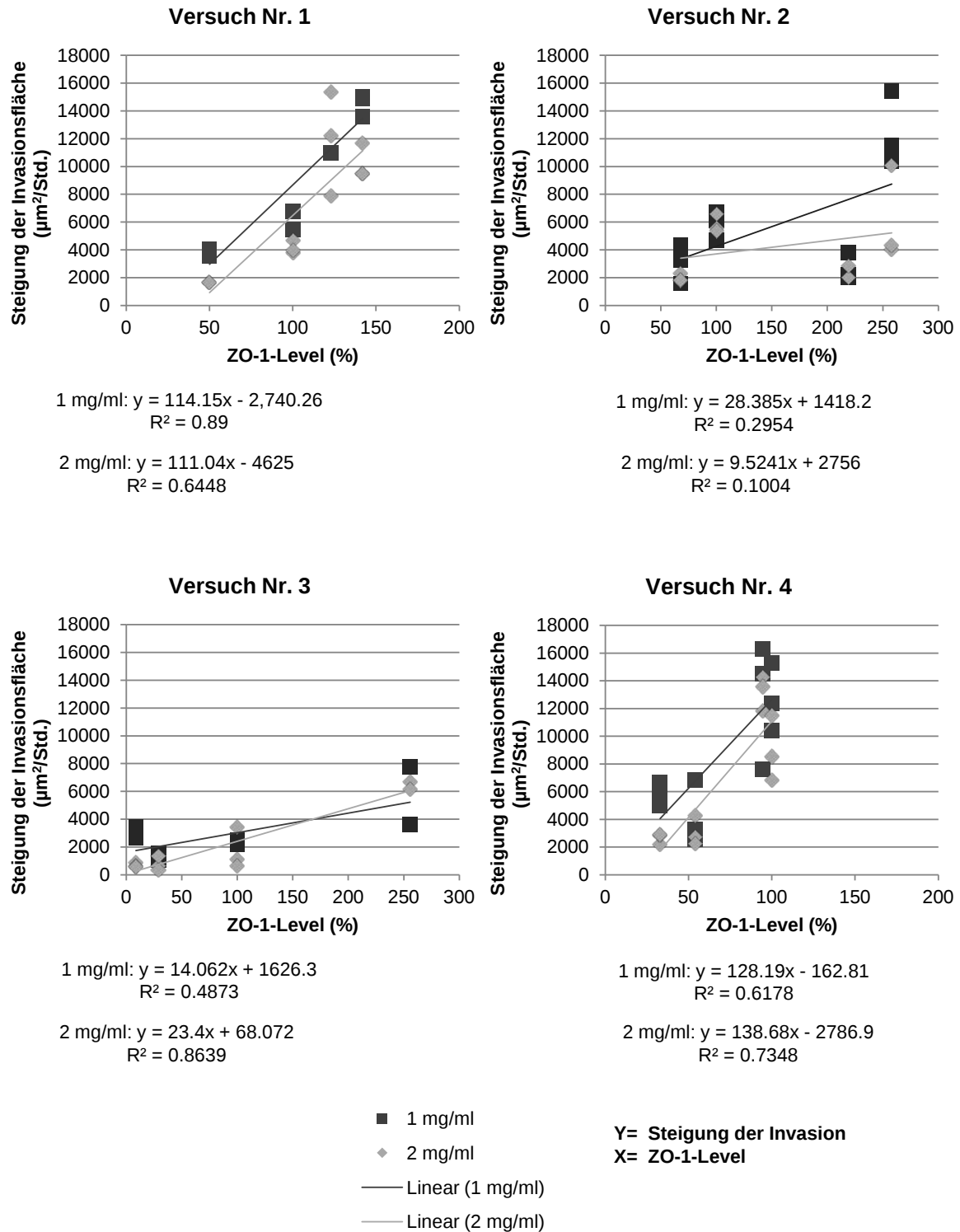


Abb. 4.20: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

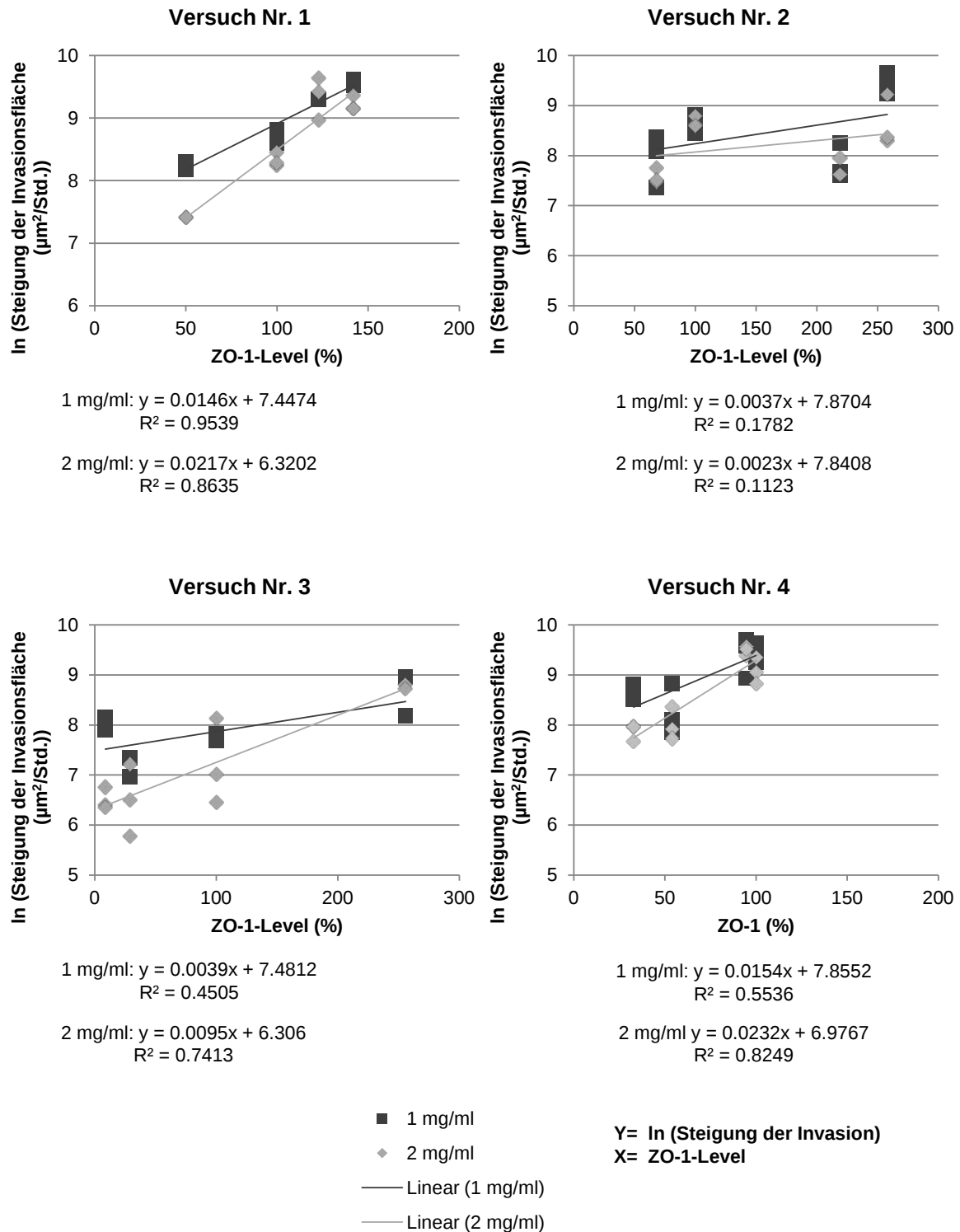


Abb. 4.21: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihre logarithmierte Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Die Steigung wurde vom ZO-1-Level ($p < 0,0001$) und von der Kollagenkonzentration ($p = 0,003$) beeinflusst.

Tabelle 4.1: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der 1205Lu-Invasionsfläche

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	<0,0001	0,0067	0,0009

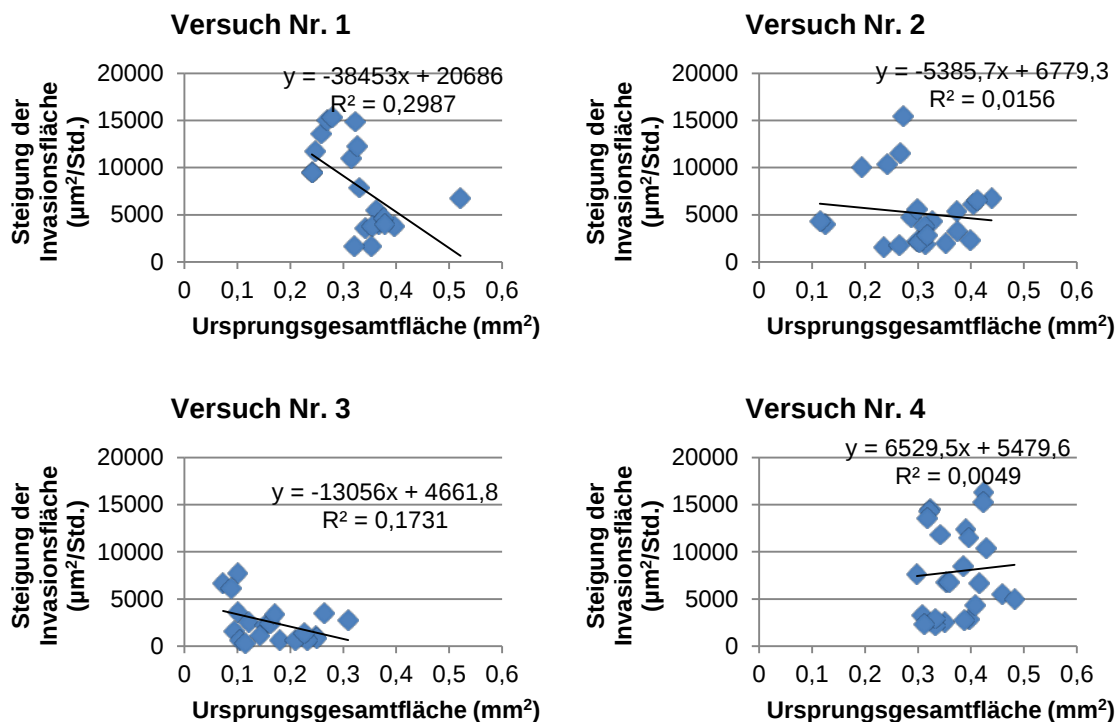
Die Schätzung in ln-Skala ist 0,0067. Dies bedeutet in der Ursprungsskala: Wenn das ZO-1-Level ein Prozent höher ist, ist die Invasion um 0,7% gestiegen. Bei einer Erhöhung des ZO-1-Level von 20% ist die Invasion um 14% gestiegen (n=4).

Tabelle 4.2: Test der Differenz der Steigung der 1205Lu-Invasionsfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	0,003	0,3690	0,1220

Die Differenz der Mittelwerte in der ln-Skala ist 0,369 und entspricht einer höheren Steigung von 45 % bei 1 mg/ml (n=4).

Da die Ursprungsgesamtfläche auch ein Faktor sein könnte, der die Invasivität beeinflussen könnte, wurde überprüft, ob diese Ursprungsfläche eine Wirkung auf die Steigungen in 1205Lu-Sphäroiden hatte. Es gab keinen signifikanten Einfluss auf die Zunahme der Gesamtfläche (siehe Abb. 4.22 (Ursprungswerte) und 4.23 (logarithmierte Werte), $p = 0,263$).

**Abb. 4.22: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.**

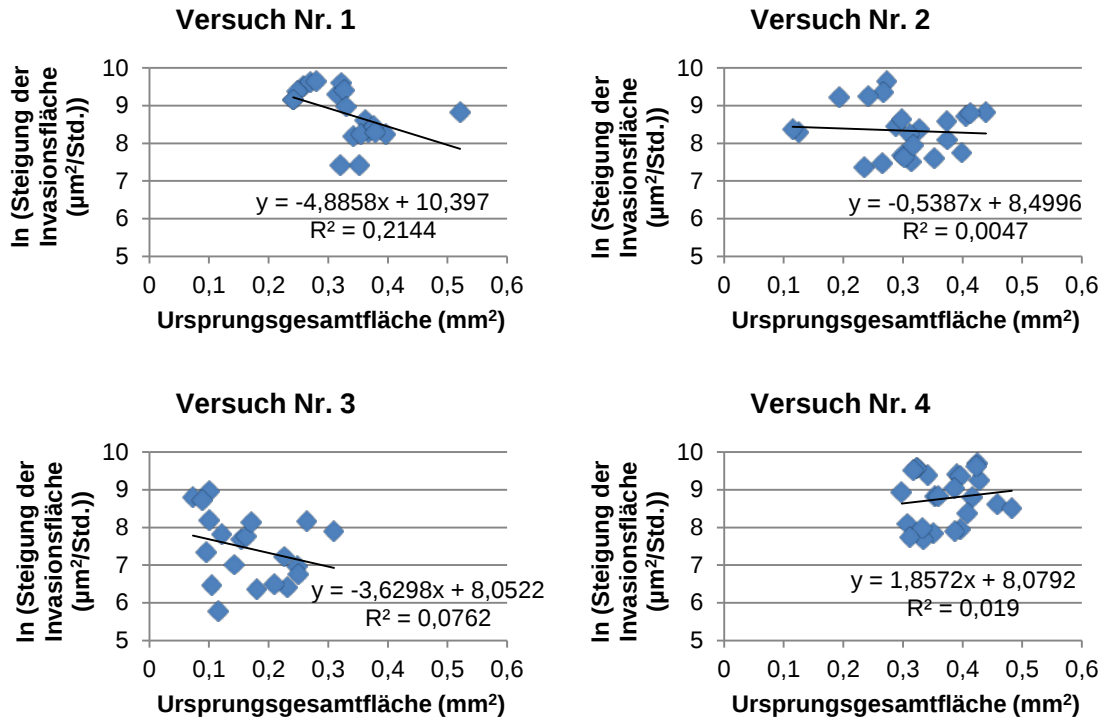


Abb. 4.23: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der ^{125}I -Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („ $\ln(\text{Steigung der Invasionsfläche})$ “) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Die Steigung der Invasionsfläche wurde nicht von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p=0,241$).

Bei den Versuchen wuchsen die kugelförmigen Sphäroide in der Kollagen-Matrix und wurden dadurch mit der Zeit größer. Wir wollen auch herausfinden, ob das ZO-1-Level bzw. die Kollagenkonzentration bei diesem Prozess eine Rolle spielen oder nicht. Die Grafiken in der Abbildung 4.24 zeigen das Wachstum der Sphäroide und ihr ZO-1-Level in der jeweiligen Kollagen-Matrix. Die Werte des Wachstums von Sphäroiden wurden hier wie zuvor beschrieben logarithmiert (siehe Abb. 4.25). Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Gehalt und der Vergrößerung von Sphäroiden gefunden werden (Tabelle 4.3). Die Sphäroide wuchsen bei den einzelnen ZO-1 Konzentrationen schneller in 1 mg/ml als in 2 mg/ml Kollagen-haltiger Matrix (siehe Abb. 4.24, Abb. 4.25 und Tabelle 4.4). Geschätzt ist das Sphäroidwachstum bei der Kollagenkonzentration von 1 mg/ml 30% höher als das Wachstum bei der 2 mg/ml-Kollagen-Matrix. Außerdem hatte die Ursprungsgesamtfläche keinen Einfluss auf das Sphäroidwachstum ($p: 0,257$) (siehe Abb. 4.26 und 4.27).

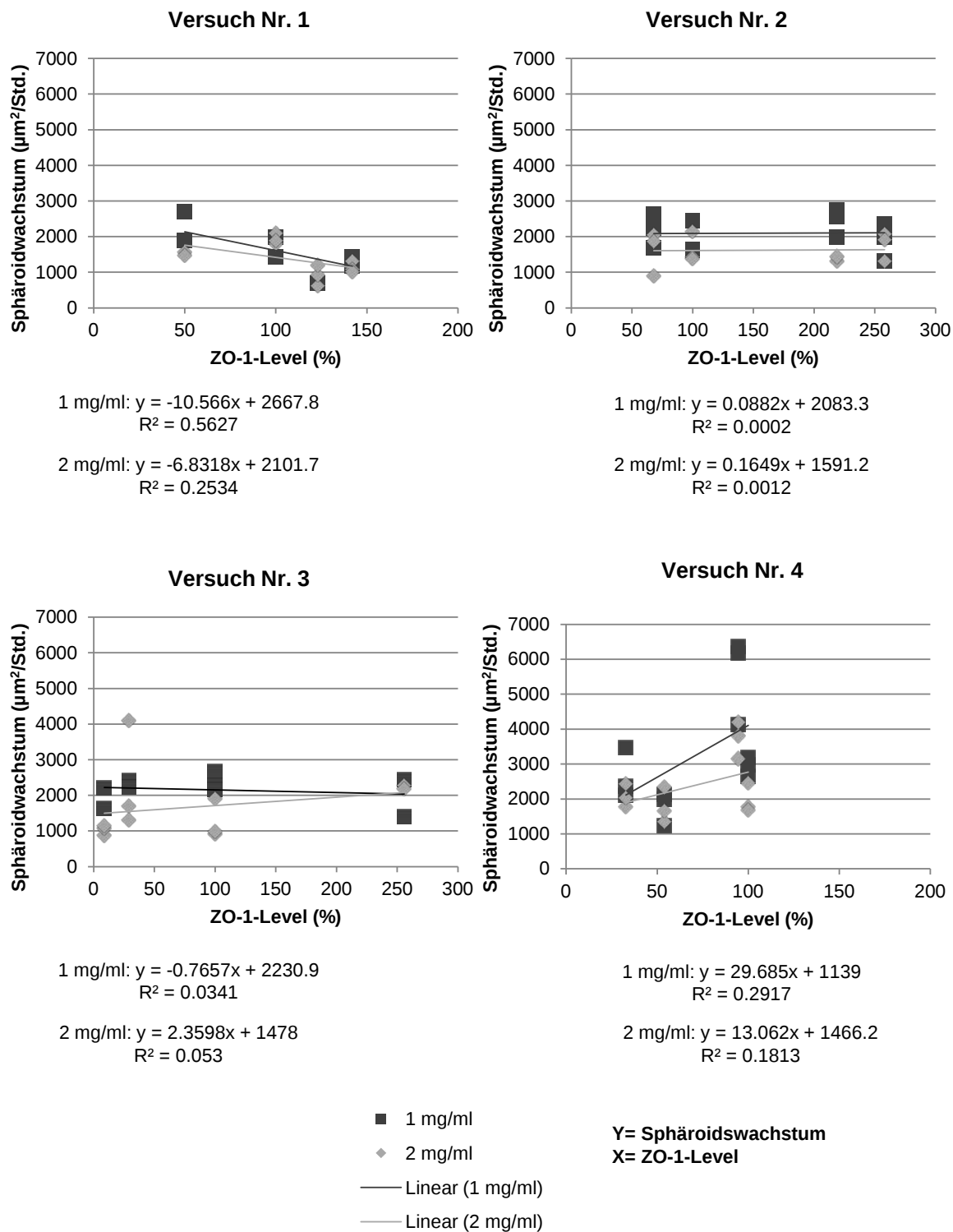


Abb. 4.24: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihr Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

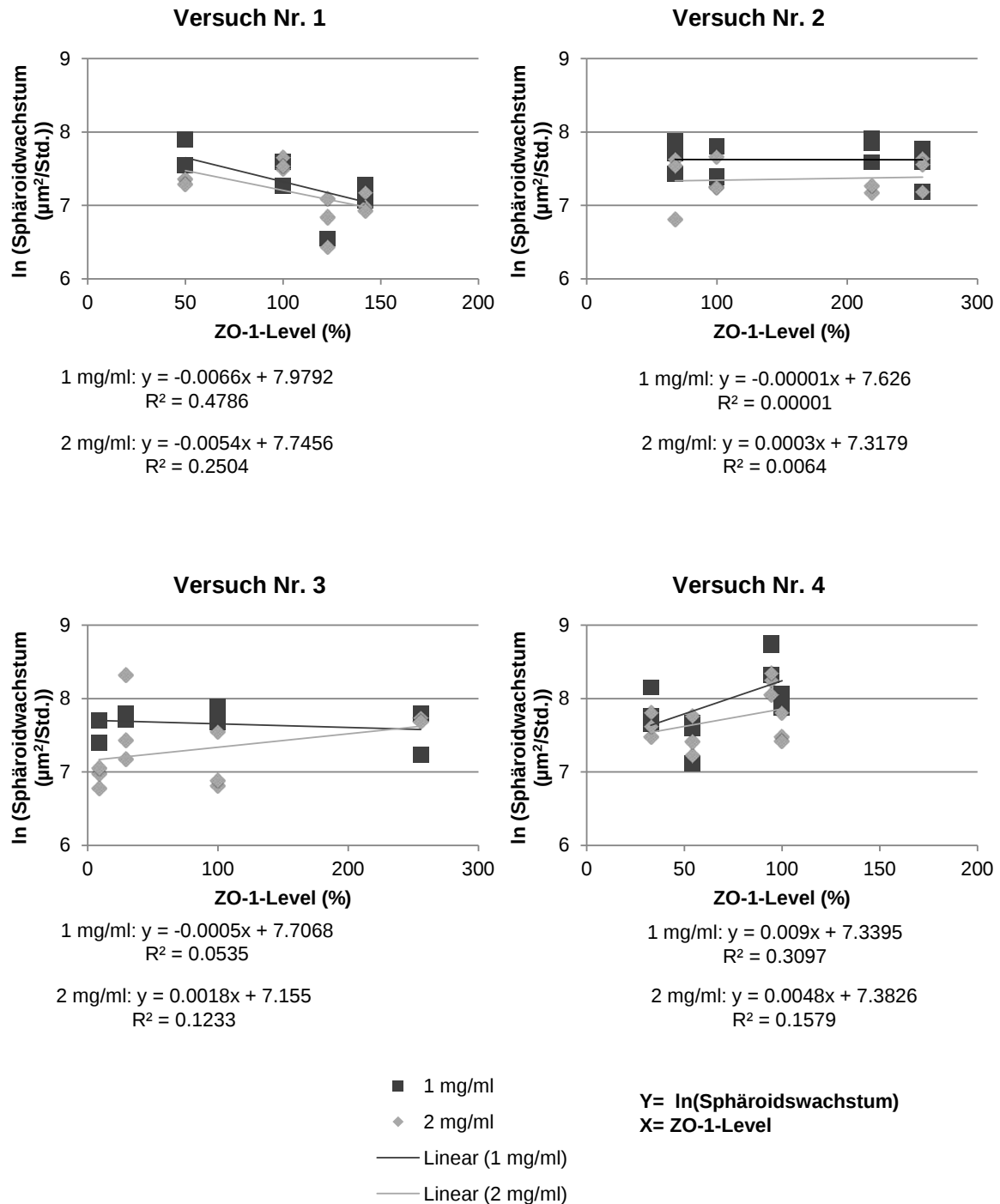


Abb. 4.25: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihr logarithmiertes Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Das Sphäroidwachstum wurde nicht vom ZO-1-Level ($p:0,622$), sondern nur von der Kollagenkonzentration ($p:0,001$) beeinflusst.

Tabelle 4.3: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und dem 1205Lu-Sphäroidwachstum

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,622	0,0003	0,0006

Die Schätzung in ln-Skala ist nicht signifikant (n=4).

Tabelle 4.4: Test der Differenz des 1205Lu-Sphäroidwachstums bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	0,001	0,2600	0,0770

Die Differenz der Mittelwerte in ln-Skala ist 0,2600 und entspricht einem schnelleren Sphäroidwachstum von 30 % bei 1 mg/ml (n=4).

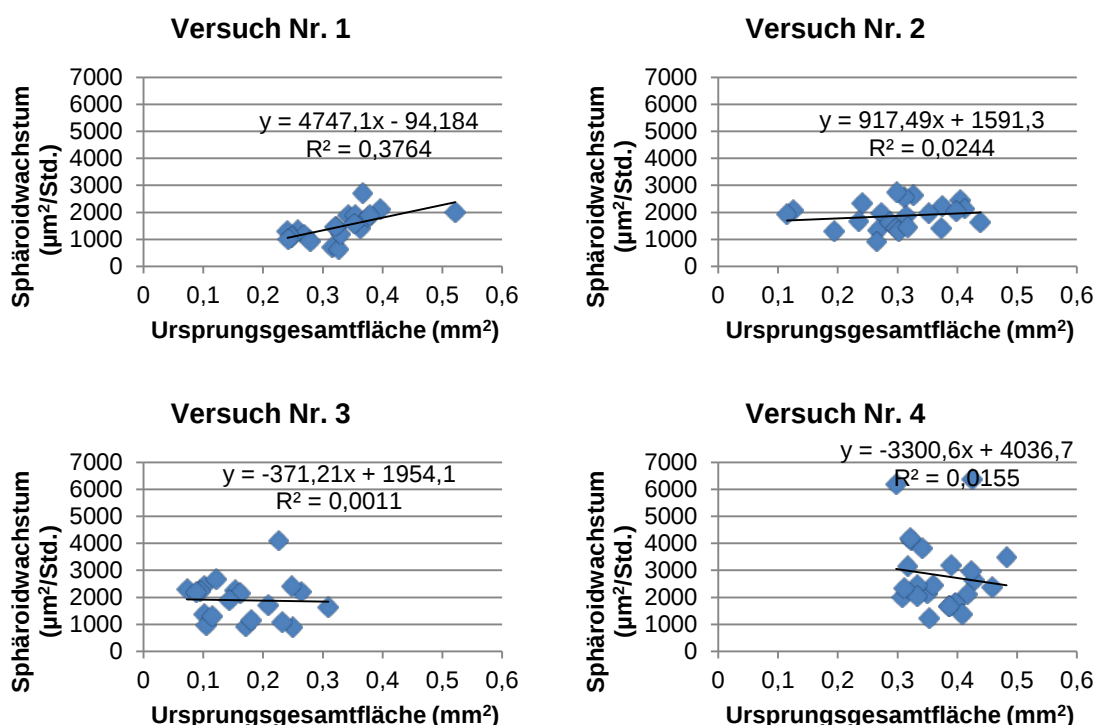


Abb. 4.26: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Sphäroidwachstum“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.

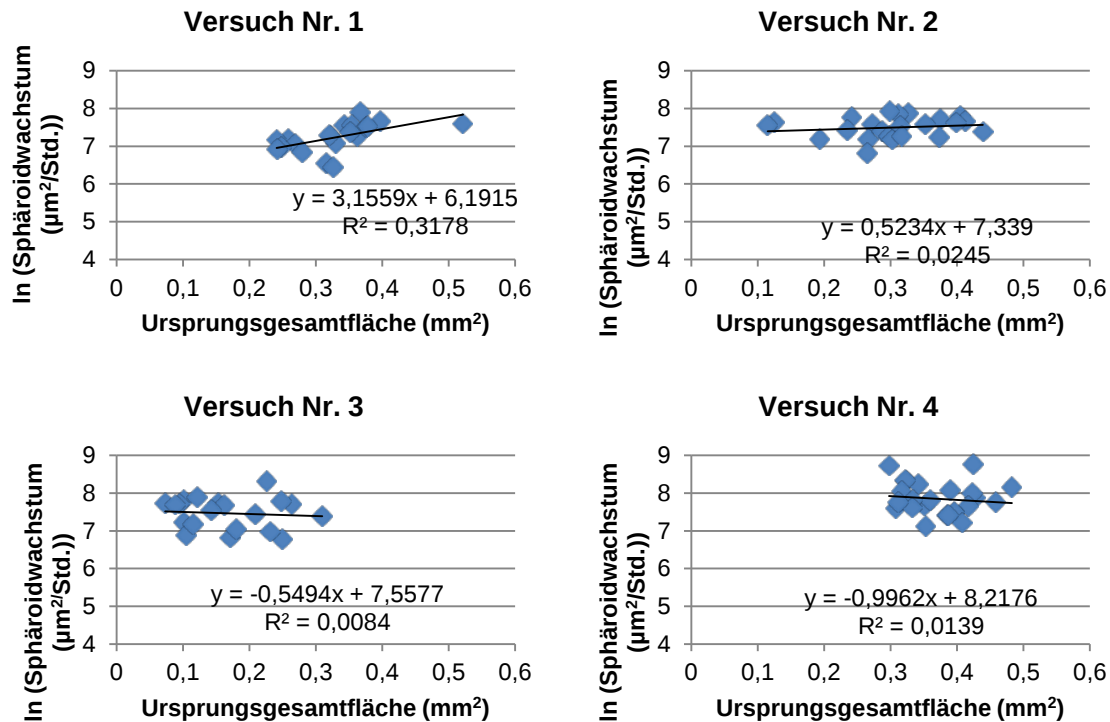


Abb. 4.27: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („ $\ln(\text{Sphäroidwachstum})$ “) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Die Steigung der Gesamtfläche wurde nicht von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p=0,257$).

Die Invasionsfläche und die Sphäroidfläche bilden die Gesamtfläche. Aus den oben genannten Ergebnissen wurde festgestellt, dass die Invasion vom ZO-1-Level abhängt, aber das Sphäroidwachstum hängt nicht vom ZO-1-Level ab. Deshalb wurde es auch untersucht, ob das ZO-1-Level die Steigung der Gesamtfläche beeinflusst. Die ZO-1-Expression der Sphäroide und ihre Steigung der Gesamtfläche bei den vier durchgeführten Einzel-Versuchen sind in der Abb. 4.28 dargestellt. Auf der nächsten Abbildung, Abb. 4.29, sind die logarithmierten Werte der Steigungen gezeigt. Bei allen Versuchen beobachtet man, dass je höher die ZO-1-Expression ist, desto höher ist die Steigung der Gesamtfläche (Abb. 4.28, 4.29). Dies ist für die Zusammenfassung der 4 Versuche signifikant (Tabelle 4.5). Wenn das ZO-1-Level 20 Prozent höher geworden ist, ist die Zunahme der Gesamtfläche um 9 Prozent gestiegen (vgl. Tabelle 4.5).

Die Sphäroid-Invasionsversuche wurden mit zwei unterschiedlichen Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml durchgeführt. Als erstes wurde getestet, ob es eine andere Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und den Steigungen bei den zwei unterschiedlichen Konzentrationen gab. Es gab ähnliche Korrelationen zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der Gesamtfläche ($p=0,262$) bei den beiden Kollagenkonzentrationen. Dies bedeutet, dass unabhängig von der Kollagenkonzentration die Steigung vom ZO-1-Level ähnlich beeinflusst wird.

Betrachtet man die Einzelwerte, so sieht man, dass die gemessenen Steigungen bei der geringeren Kollagenkonzentration höher waren. Die Steigungen der Gesamtfläche bei den jeweiligen ZO-1-Konzentrationen waren bei 1 mg/ml 36% höher als bei 2 mg/ml Kollagen-Gehalt (siehe Tabelle 4.6). Dieser Unterschied war statistisch signifikant.

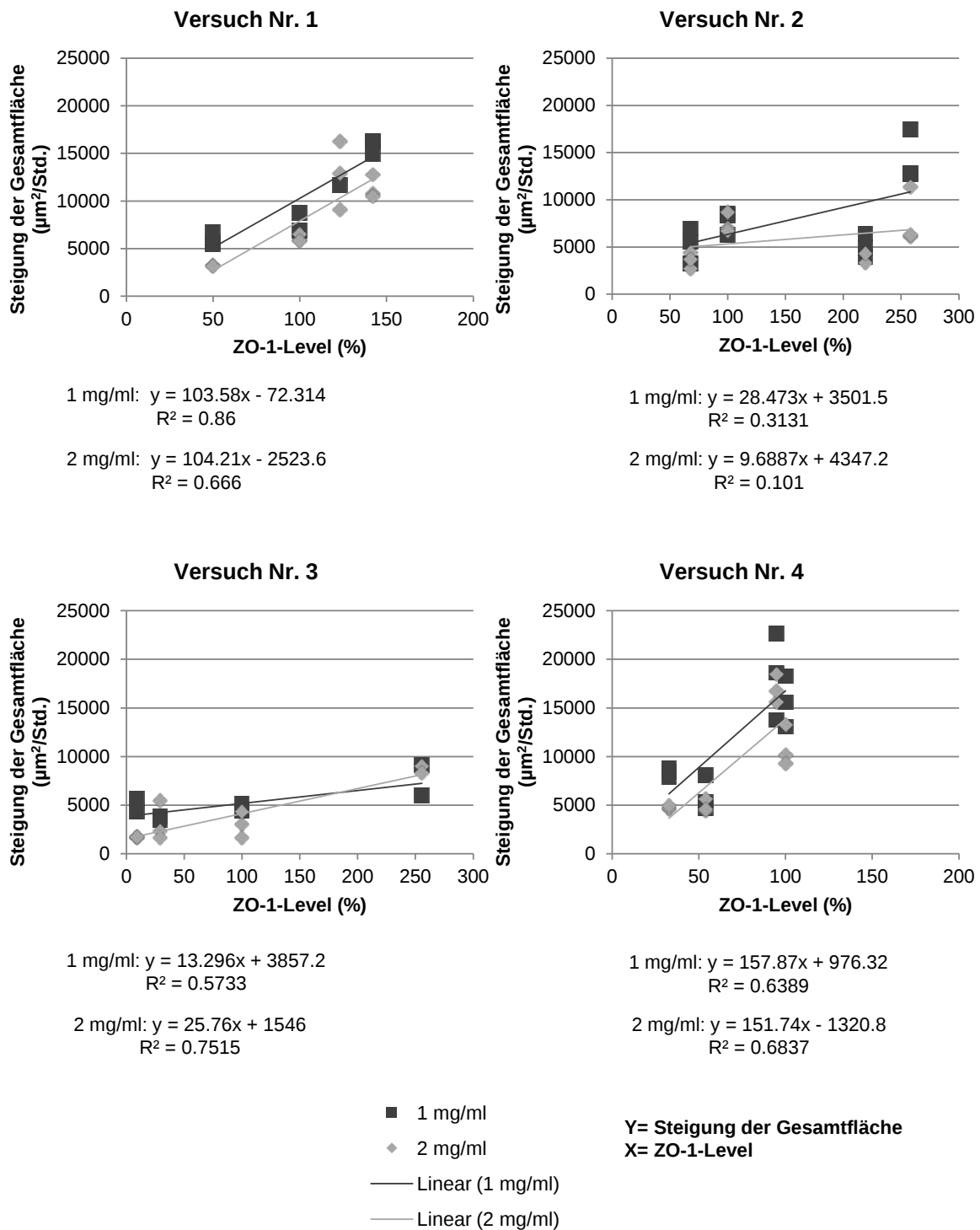


Abb. 4.28: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihrer Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

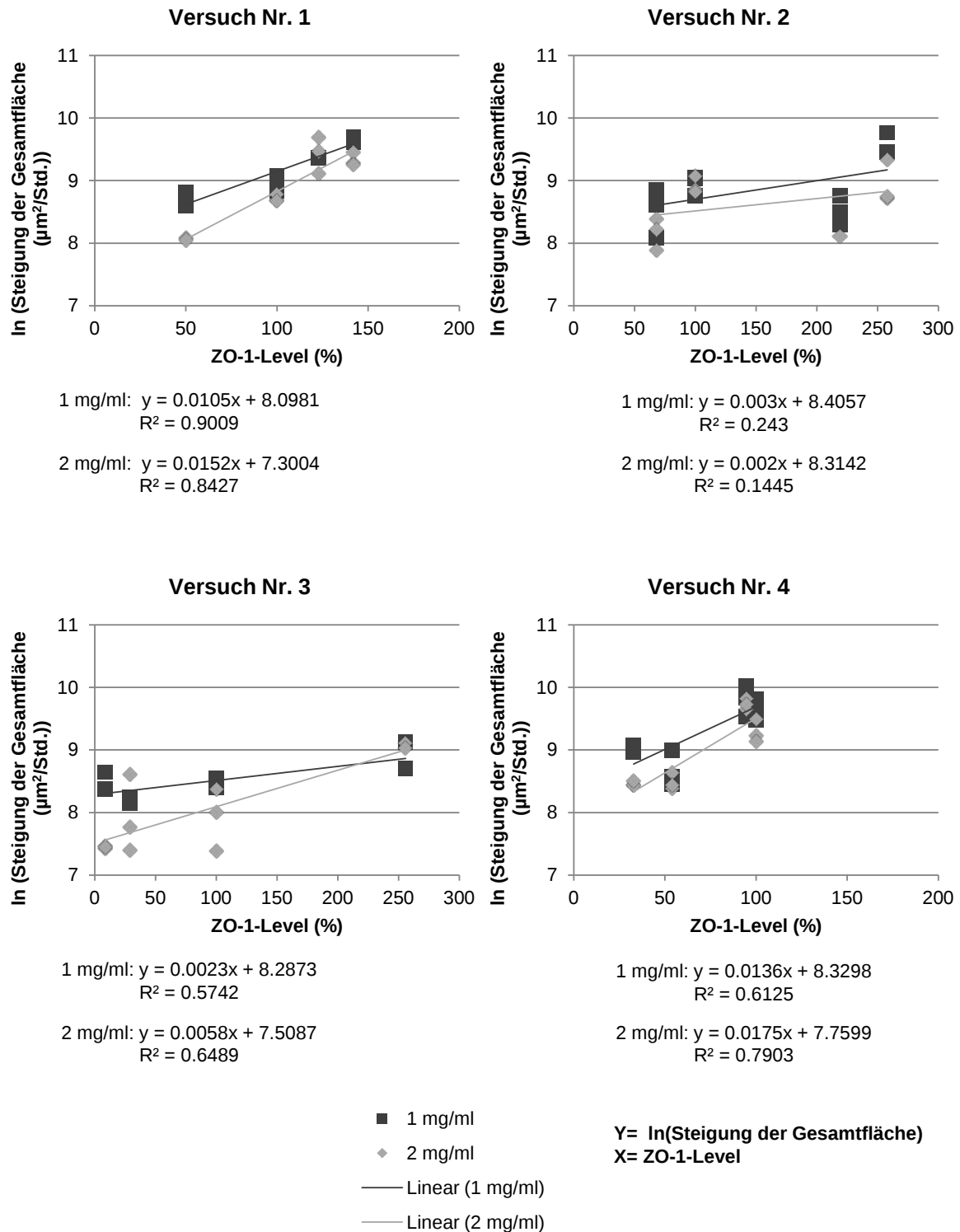


Abb. 4.29: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihrer logarithmierten Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Die Steigung wurde vom ZO-1-Level ($p < 0,0001$) und von der Kollagenkonzentration ($p: 0,001$) beeinflusst.

Tabelle 4.5: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der 1205Lu-Gesamtfläche

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	< 0,0001	0,0046	0,0007

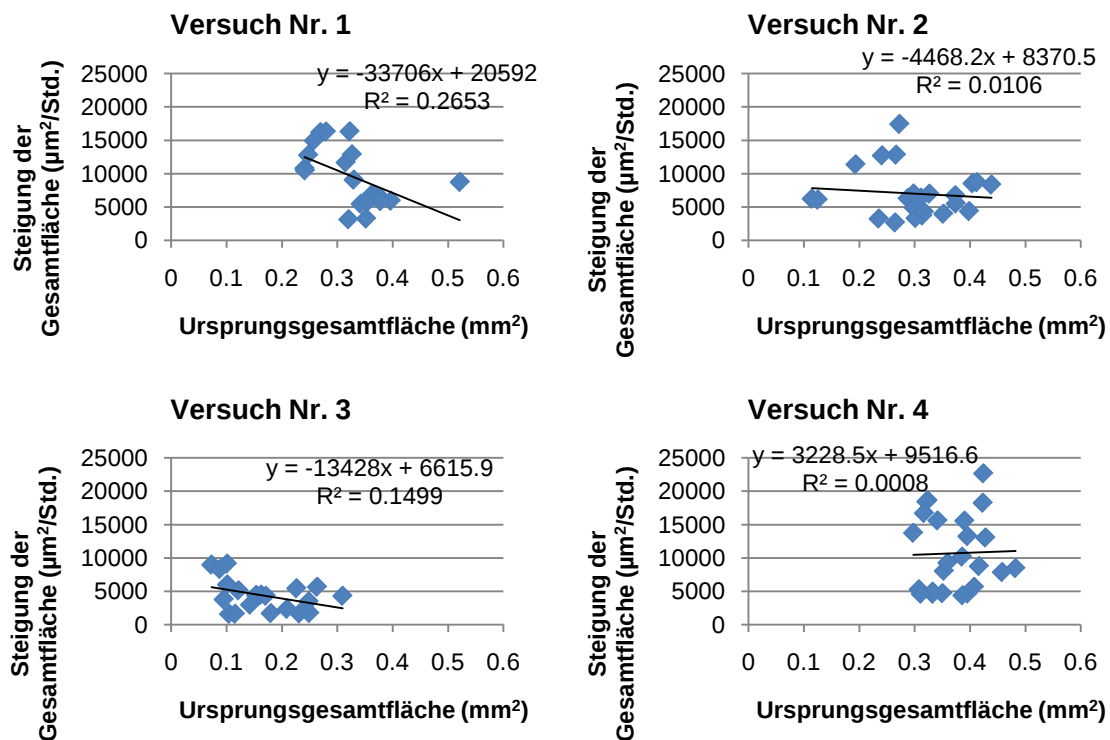
Die Schätzung in ln-Skala ist 0,0046. Dies bedeutet in der Ursprungsskala : Wenn das ZO-1-Level ein Prozent höher ist, ist die Zunahme der Gesamtfläche um 0,5% gestiegen. Bei einer Erhöhung des ZO-1-Levels von 20% ist die Zunahme der Gesamtfläche um 9% gestiegen (n=4).

Tabelle 4.6: Test der Differenz der Steigung der 1205Lu-Gesamtfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	0,001	0,3080	0,0770

Die Differenz der Mittelwerte in ln-Skala ist 0,3080 und entspricht: einer höheren Steigung von 36 % bei 1 mg/ml (n=4).

Des weiteren wurde untersucht, ob die Ursprungsgesamtfläche die Steigung der Gesamtfläche bestimmt oder nicht. Hier gab es auch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Steigung der Gesamtfläche und der Ursprungsgesamtfläche ($p=0,263$) (siehe Abb. 4.30 und 4.31).

**Abb. 4.30: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4.**

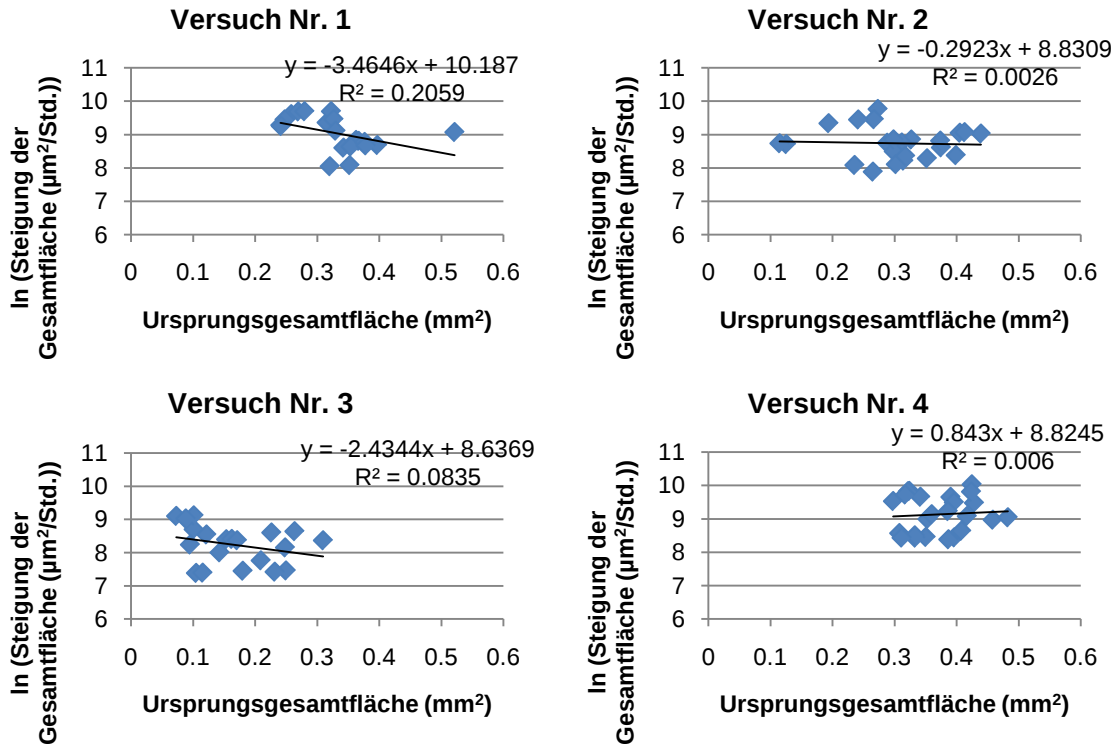


Abb. 4.31: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („ln(Steigung der Gesamtfläche)“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4. Die Steigung der Gesamtfläche wurde nicht von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p=0,263$).

4.4.2 WM35-Sphäroidwachstum und Invasion

Außer mit den 1205Lu-Zellen wurden weitere Untersuchungen der Invasion von Sphäroiden mit der Zell-Linie WM35 durchgeführt. Wie bei den Versuchen mit 1205Lu-Zellen wurden hier die Wild-Typ- und die Non-Target-Kontrolle, und zwei Knockdown-Zellen für die Versuche, die 52- und die 55-Zellen, genutzt. Es wurde aber eine weitere Kontrolle, die sogenannte Empty-Kontrolle integriert. Diese Empty-Kontrolle besitzt nur ein Puromycin-Resistenz-Gen, aber keine lentivirale shRNA- oder Non-Target-Sequenz. Diese Kontrolle soll später in der Analyse mithelfen, um zu erwägen, ob die Daten der Non-Target-Kontrolle weiterhin in der Auswertung aufgenommen werden sollen oder nicht. Falls ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Non-Target in ihrem Invasionsverhalten oder in ihrem Sphäroidwachstum existiert, sollte man die Werte der Empty-Kontrolle mit den Werten der anderen Kontrollen vergleichen. In dem Fall, wo die Empty-Kontrolle nur der Wildtyp-Kontrolle ähnelt, aber nicht der Non-Target-Kontrolle, könnte es sein, dass die Non-Target-Kontrolle doch irgendwelche mRNA doch ausschaltet und einen sogenannten Off-Target-Effekt auslöst.

Die WM35-Sphäroide wuchsen wie die 1205Lu-Sphäroide innerhalb von 20 Std. in der Kollagen-Matrix und manche Zellen wanderten aus den Sphäroiden in dieser Matrix. Hier

wurden auch wie bei den Versuchen mit ^{125}I -Sphäroiden 2 unterschiedliche Kollagenkonzentrationen verwendet (siehe Abb. 4.32 und Abb. 4.33).

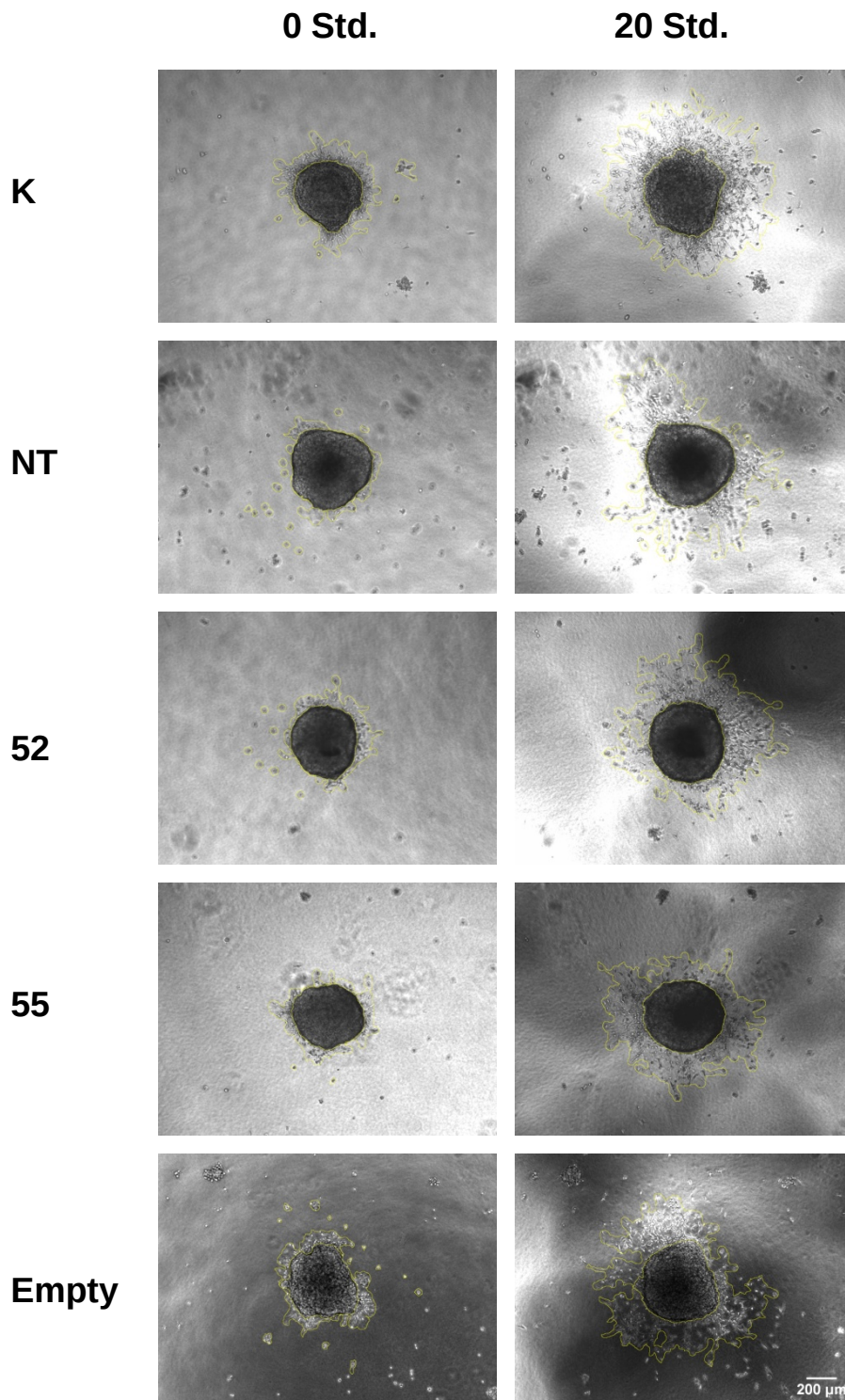


Abb. 4.32: Beispiel der Invasion von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 1 mg/ml-haltigen Matrix K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 54: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=131%, NT=100%, 52=16%, und 55=76%. Zwischen den gelben Linien ist die Invasionsfläche des jeweiligen Sphäroids markiert. Skalierungslinie: 200 µm

In den beiden Kollagenkonzentrationen sah das Invasionsverhalten der Zellbehandlungen ähnlich aus. Dies wurde aber dann genauer untersucht, indem die Invasionsfläche quantifiziert und sie statistisch verglichen wurden (siehe Abb.4.32 und 4.33).

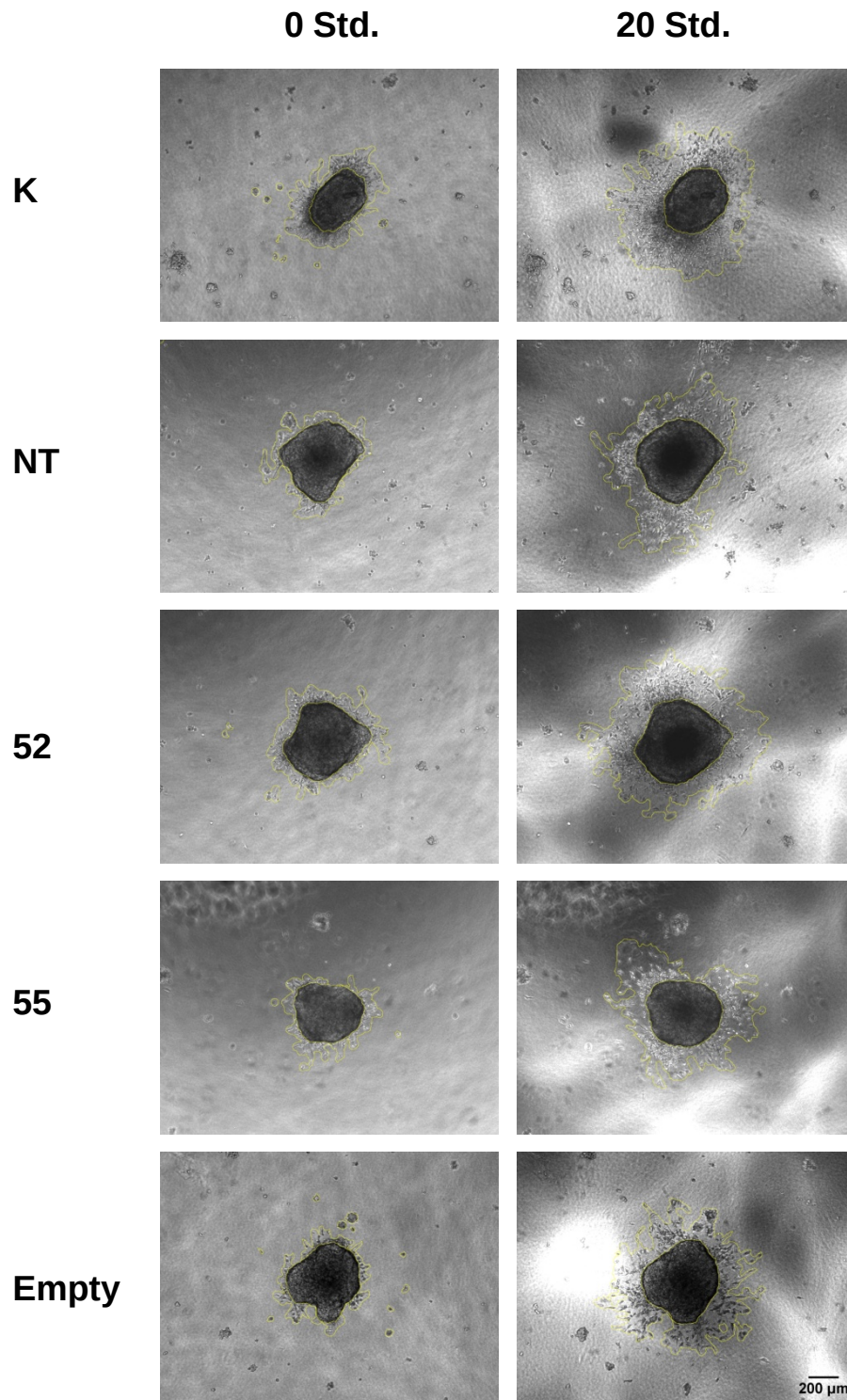
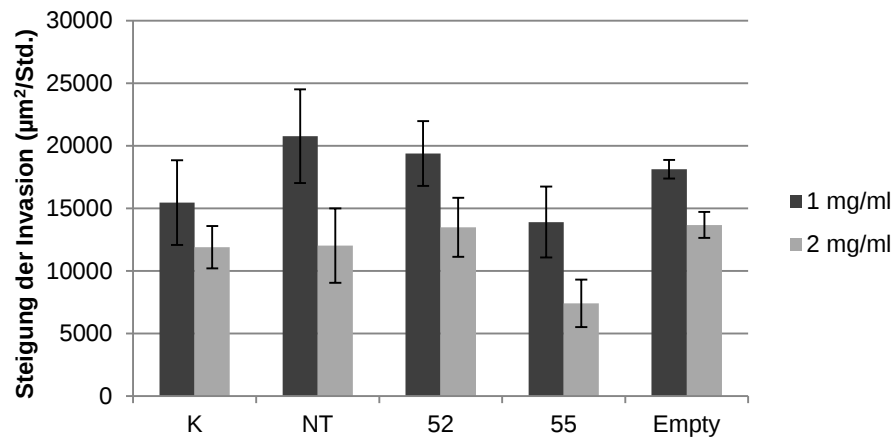


Abb. 4.33: Beispiel der Invasion von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 2 mg/ml-haltigen Matrix K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 54: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=131%, NT=100%, 52=16%, und 55=76%. Zwischen den gelben Linien ist die Invasionsfläche des jeweiligen Sphäroids markiert. Skalierungslinie: 200 µm

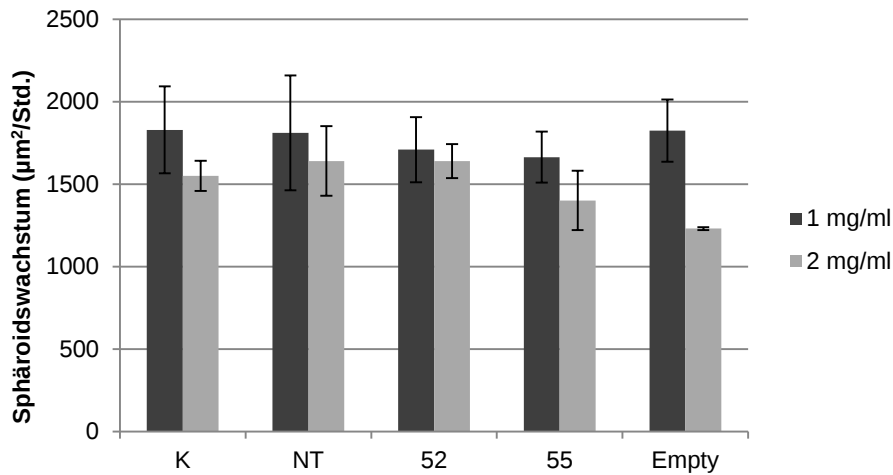
Die Steigungen der Zellbehandlungen werden verglichen. Die Abbildung 4.34 zeigt die Werte der Steigungen der unterschiedlichen Zellbehandlungen. Dabei zeigt sich, dass die Steigungen in 1 mg/ml Kollagen höher sind als die Werte in 2 mg/ml sind, das heisst, die Zellen invadieren schneller. Das Sphäroidwachstum in 1 mg/ml war etwas stärker als in 2 mg/ml. Darüber hinaus sieht man, dass die Steigung für die Invasion und der Gesamtfläche in der Knock-down Präparation 55 in beiden Kollagenkonzentrationen geringer ist als die NT-Kontrolle. Das heisst, dass die Invasion langsamer ist. Die Präparation 52 liegt auf Höhe der NT-Kontrolle. Für das Sphäroidwachstum liegen alle auf der gleichen Höhe außer Empty in 2 mg/ml.

Die ZO-1-Expression von WM35-Zellen in den Sphäroiden wird in der Abb. 4.35 dargestellt. Der Mittelwert der ZO-1-Levels der Wildtyp-Kontrolle war höher als der der Non-Target-Kontrolle und der Empty-Kontrolle. Dies war aber nicht signifikant. Die Empty-Kontrolle lag leicht über dem Niveau der Non-Target-Kontrolle. Dies war ebenfalls nicht signifikant. Außerdem hatte die Wildtyp-Kontrolle im Vergleich zu den Knockdown-Zellen, 52 und 55, stärkere Schwankungen in der ZO-1-Expression. Die Knockdown-Zellen Nr. 52 hatten die deutlichste ZO-1-Reduktion von den beiden Knockdown-Zellen. In den 52-Zellen konnte eine Reduktion der Expression im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle von 80 bis 88% erzielt werden. Die 52-Sphäroide besaßen außerdem eine signifikant geringere ZO-1-Expression als Non-Target. Hier lag die Expression der 52-Sphäroide bei $25 \pm 17\%$ der Non-Target-Kontrolle. Die 55-Zellen hatten ein mittleres ZO-1-Level von $65 \pm 10\%$ im Vergleich zur Non-Target-Kontrolle

A Steigung der Invasionsfläche von WM35-Sphäroiden



B Sphäroidwachstum von WM35-Sphäroiden



C Steigung der Gesamtfläche von WM35-Sphäroiden

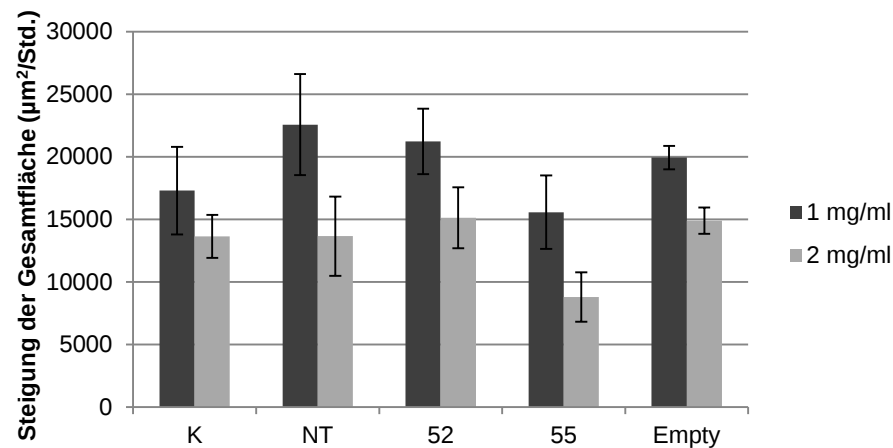


Abb. 4.34: Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von WM35-Sphäroiden in einer Kollagenmatrix mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 2 mg/ml) (n=4, SEM).

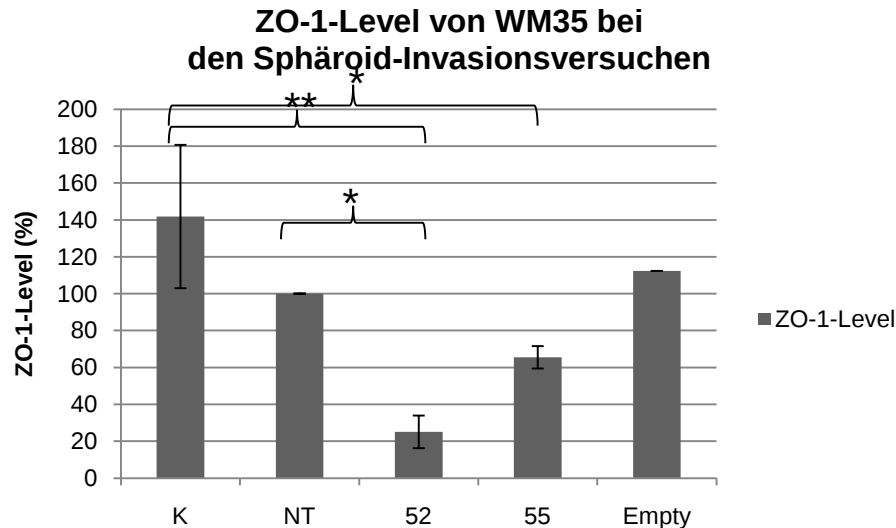


Abb. 4.35: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Sphäroidinvasionsversuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=4, SEM, *:p<0,05, **:p<0,01).

In Abb. 4.34 werden die Werte der Steigungen der unterschiedlichen Zellpräparate dargestellt. Da die Werte nicht normal verteilt waren, wurden sie logarithmiert, um die Voraussetzung für eine valide statistische Analyse mit dem linearen gemischten Modell zu erfüllen. Die Ergebnisse dieser Analyse befinden sich in der Abb. 4.36. Im Gegensatz zu den 1205Lu-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Steigungen zwischen den Zellbehandlungen festgestellt werden (siehe Abb. 4.36). Das Zellpräparat 55 hatte zwar im Vergleich zu den Kontrollen geringere Steigung der Invasionsfläche und geringere Steigung der Gesamtfläche aber nicht signifikant. Der Unterschied in der Steigung der Invasionsfläche zwischen 1 und 2 mg/ml-Kollagen war statistisch signifikant. Außerdem war die Vergrößerung der Gesamtfläche in 1 mg/ml signifikant höher als in 2 mg/ml. Dahingegen ist der Unterschied im Sphäroidwachstum in 1 und 2 mg/ml-Kollagen-Matrix gering und statistisch nicht signifikant.

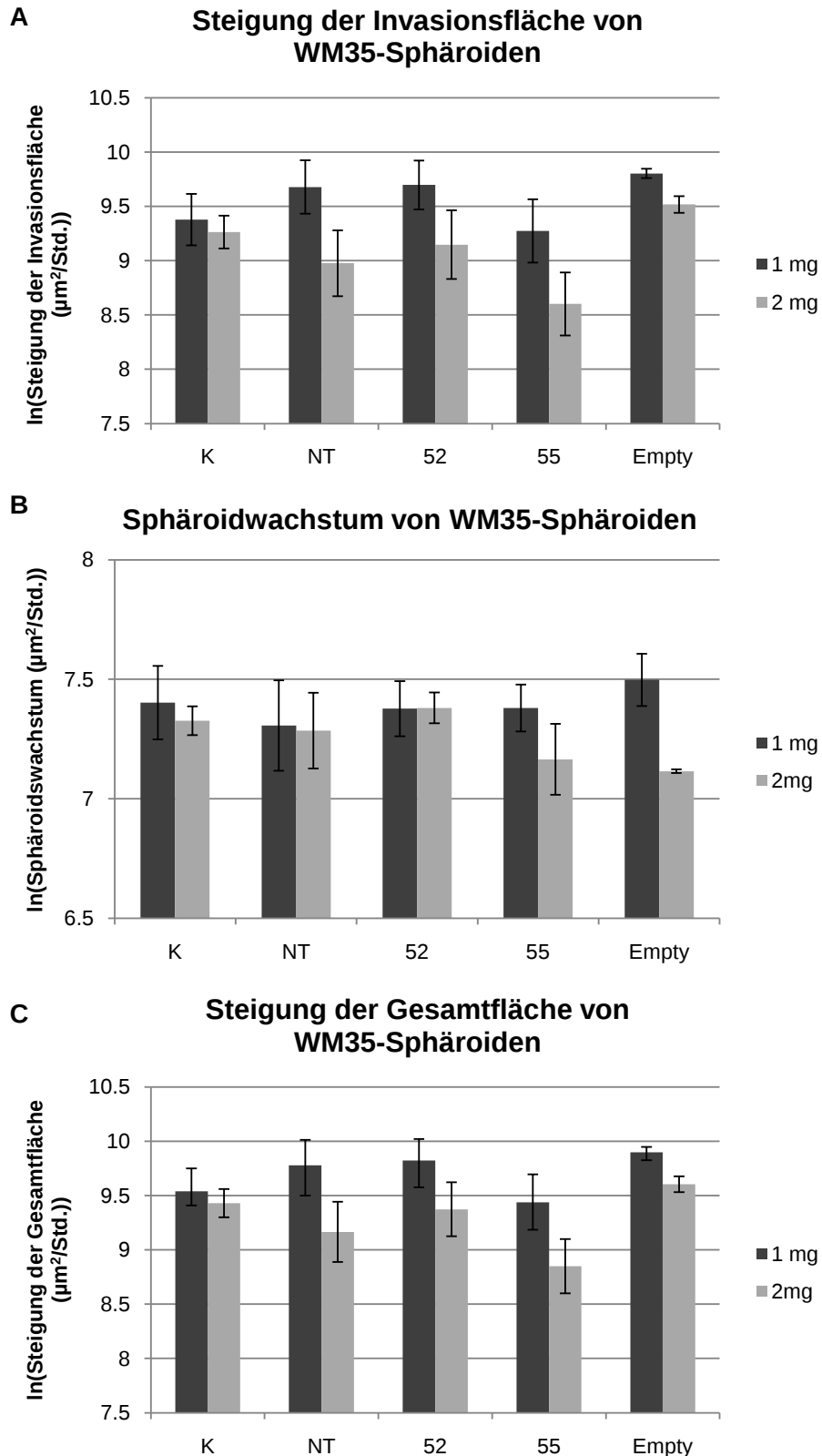


Abb. 4.36: Logarithmierte Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von WM35-Sphäroiden. (n=4, SEM). Es gab keine signifikante Unterschiede zwischen den Zellbehandlungen (für beide Kollagenkonzentrationen (nicht getrennt)). Die Kollagenkonzentration beeinflusst die zwei Arten von Steigungen (der Steigung der Gesamtfläche ($p < 0,0001$) und der der Invasionsfläche ($p < 0,0001$)). Die Steigung der Sphäroidgröße wird aber nicht von der Kollagenkonzentration beeinflusst ($p: 0,285$).

Des weiteren wurde untersucht, ob das ZO-1-Level die Invasion von WM35 beeinflusst. Die Invasion war vom ZO-1-Level unabhängig (siehe Abb. 4.37, Abb. 4.38, und Tabelle 4.7). In der Tabelle 4.8 wird gezeigt, dass in WM35-Zellen eine höhere Invasion bei einer 1 mg/ml als bei 2 mg/ml Kollagen-Konzentration stattgefunden hat. Die Steigung der Invasionsfläche wurde außerdem von der Ursprungsgesamtfläche bestimmt (siehe Abb. 4.39, Abb. 4.40, und Tabelle 4.7). Dies ist anders als in 1205Lu-Sphäroiden, da die Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide nicht die Invasion beeinflusste. Wenn die Ursprungsgesamtfläche 100000 μm^2 größer ist, nimmt die Invasion um ca. 36% zu.

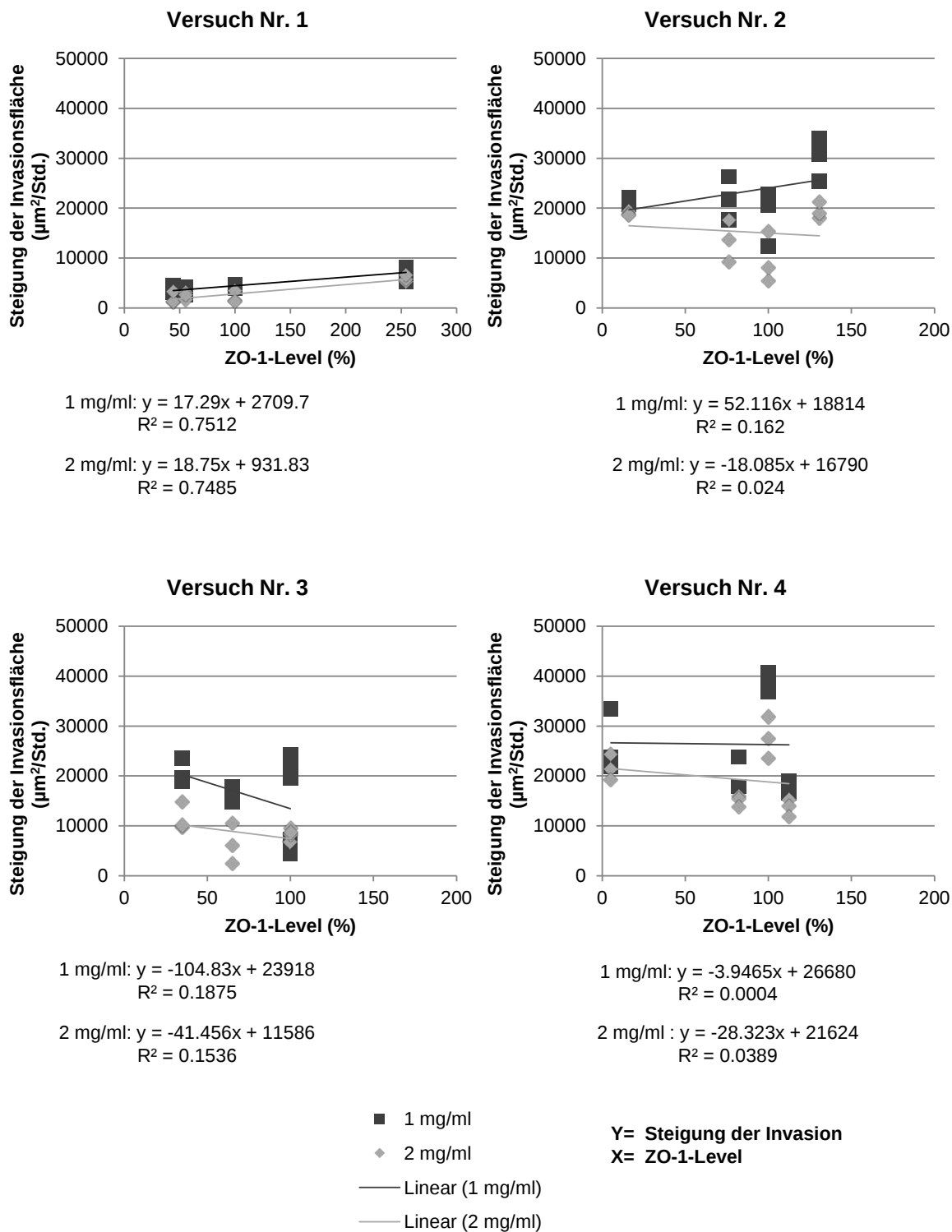


Abb. 4.37: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

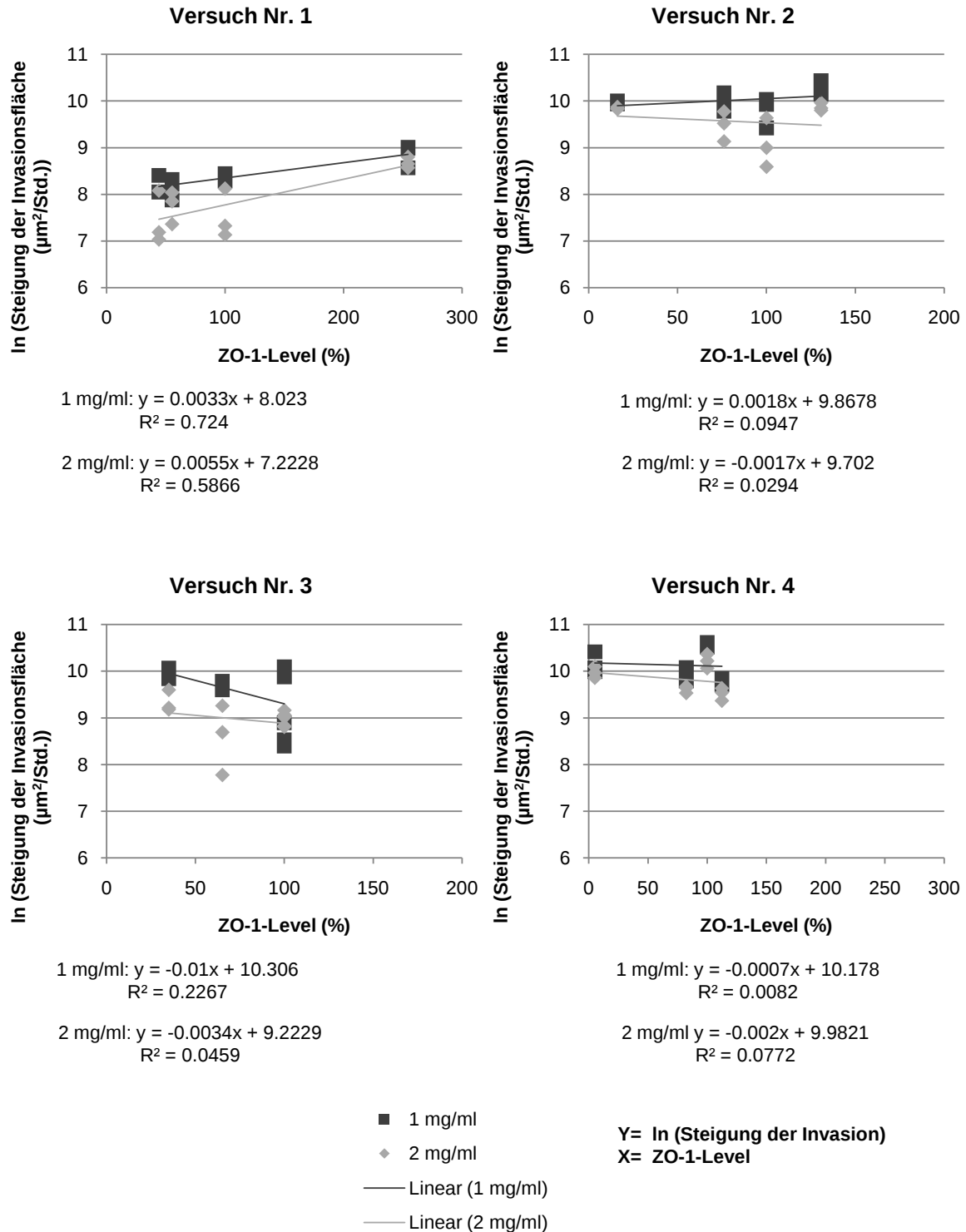


Abb. 4.38: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre logarithmierte Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,879$), aber von der Kollagenkonzentration ($p<0,0001$) beeinflusst.

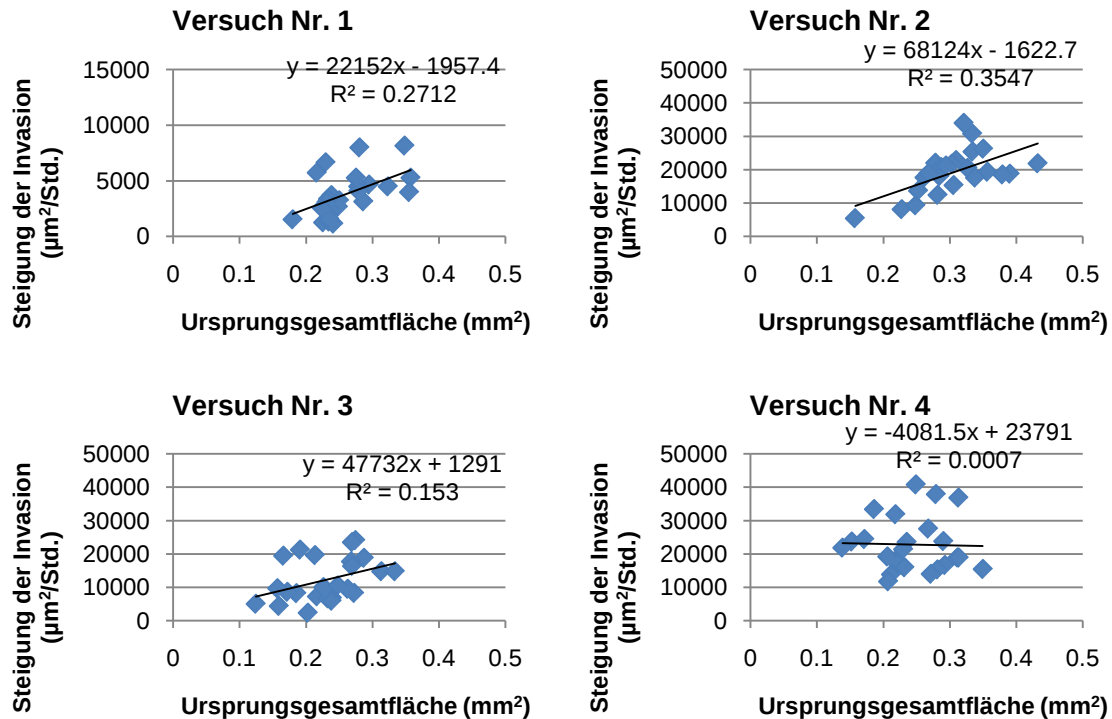


Abb. 4.39: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.

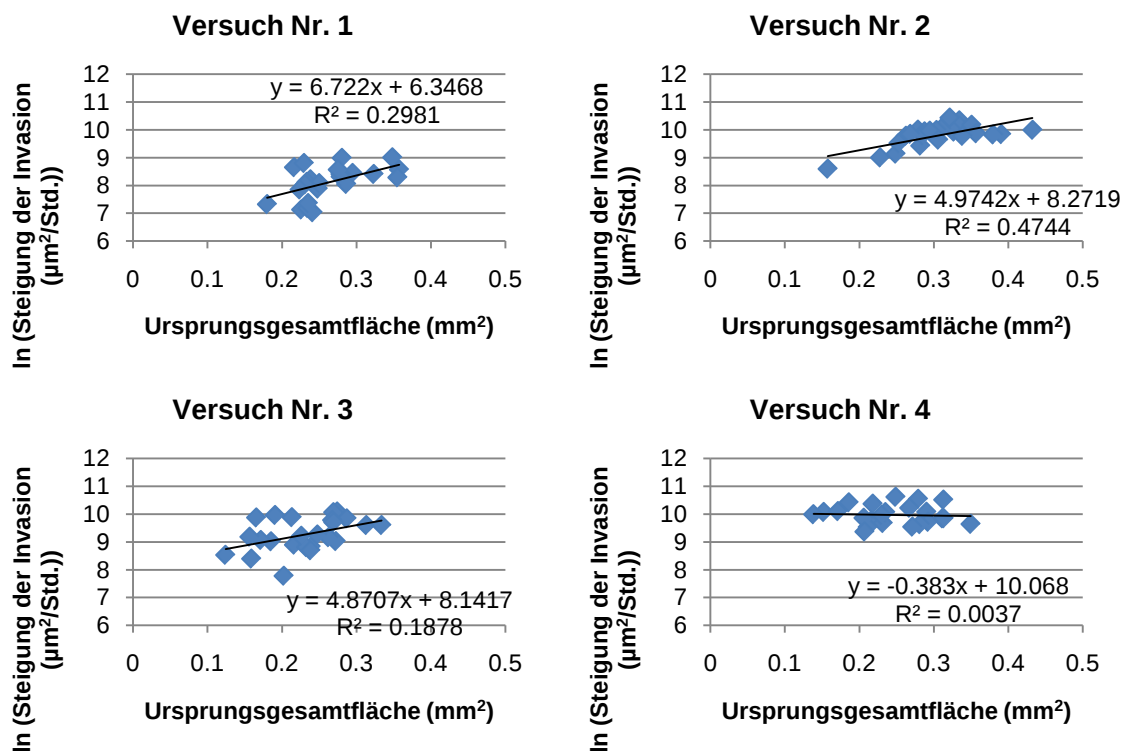


Abb. 4.40: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Die Steigung der Invasionsfläche wurde von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p=0,0002$).

Tabelle 4.7: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Invasion

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,879	-0,0003	0,0019
Ursprungs- Gesamtfläche (mm ²)	0,0002	3,0967	0,7878

Die Schätzung des ZO-1-Levels in ln-Skala ist nicht signifikant. Wenn die Ursprungsgesamtfläche 100000 μm^2 größer ist, nimmt die Invasion um 36% zu (n=4).

Tabelle 4.8: Test der Differenz der WM35-Invasion bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	<0,0001	0,3919	0,0774

Die Differenz der Mittelwerte in ln-Skala ist 0,3919 und entspricht: eine höhere Steigung von 48 % bei 1 mg/ml (n=4).

Außerdem wurde untersucht, ob das Sphäroidwachstum von WM35-Zellen durch eine erhöhte ZO-1-Expression gefördert oder inhibiert wird. Wie bei 1205Lu-Sphäroiden ist das Sphäroidwachstum unabhängig vom ZO-1-Level (siehe Abb. 4.41, Abb. 4.42, und Tabelle 4.9). Im Gegensatz zu dem Wachstum von 1205Lu-Sphäroiden gab es keinen Unterschied in dem Wachstum von WM35-Sphäroiden zwischen 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration (siehe Tabelle 4.10). Das Sphäroidwachstum wurde auch wie die Steigung der Invasionsfläche von der Ursprungsgesamtfläche bestimmt (siehe Abb.4.43, Abb. 4.44, und Tabelle 4.9). Auf der Abb. 4.43 kann man zwar diese positive Korrelation zwischen diesen beiden Parametern sehen, sie ist aber nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Zusammenhang zwischen der Ursprungsgesamtfläche und der Steigung der Invasionsfläche.

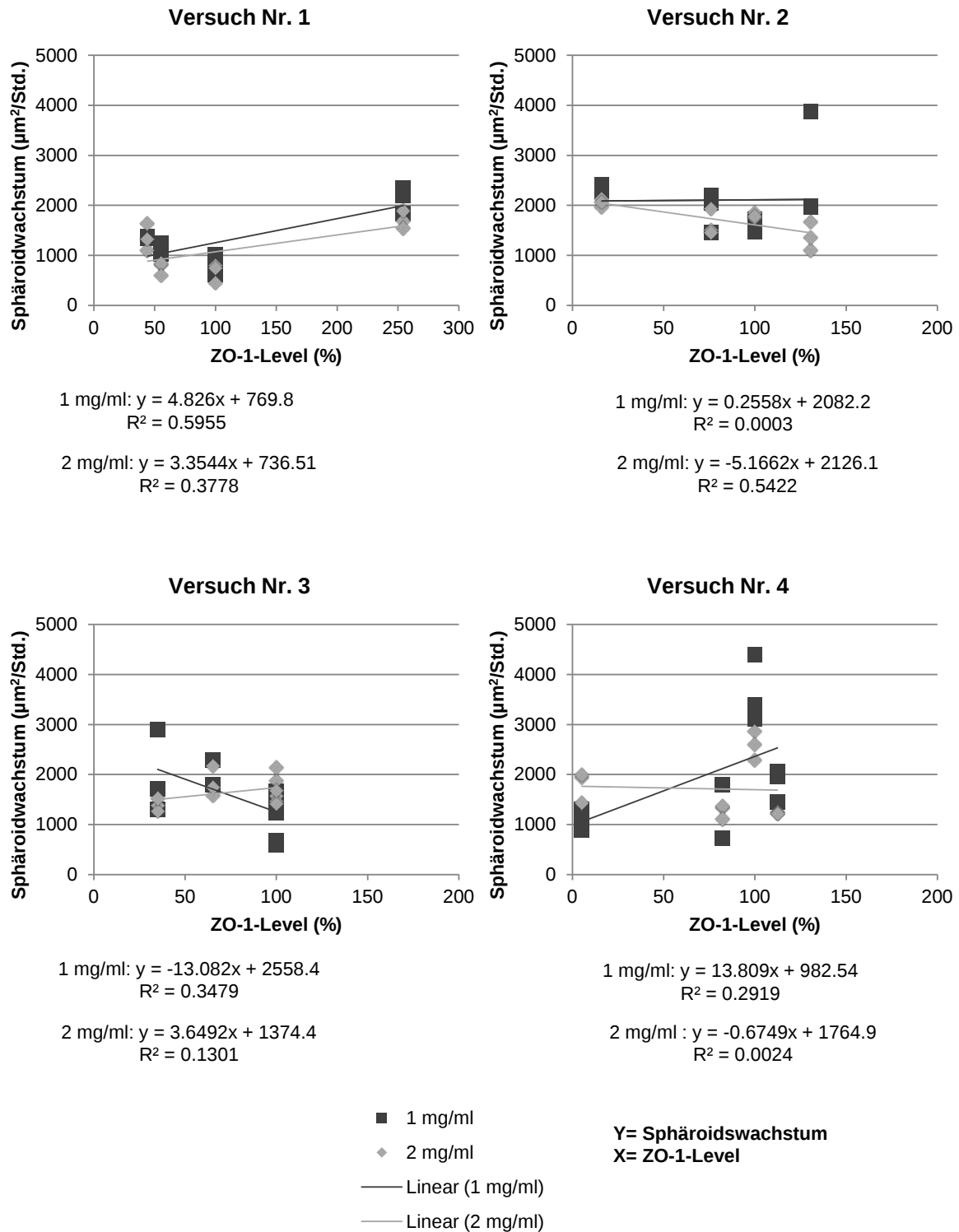


Abb. 4.41: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihr Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

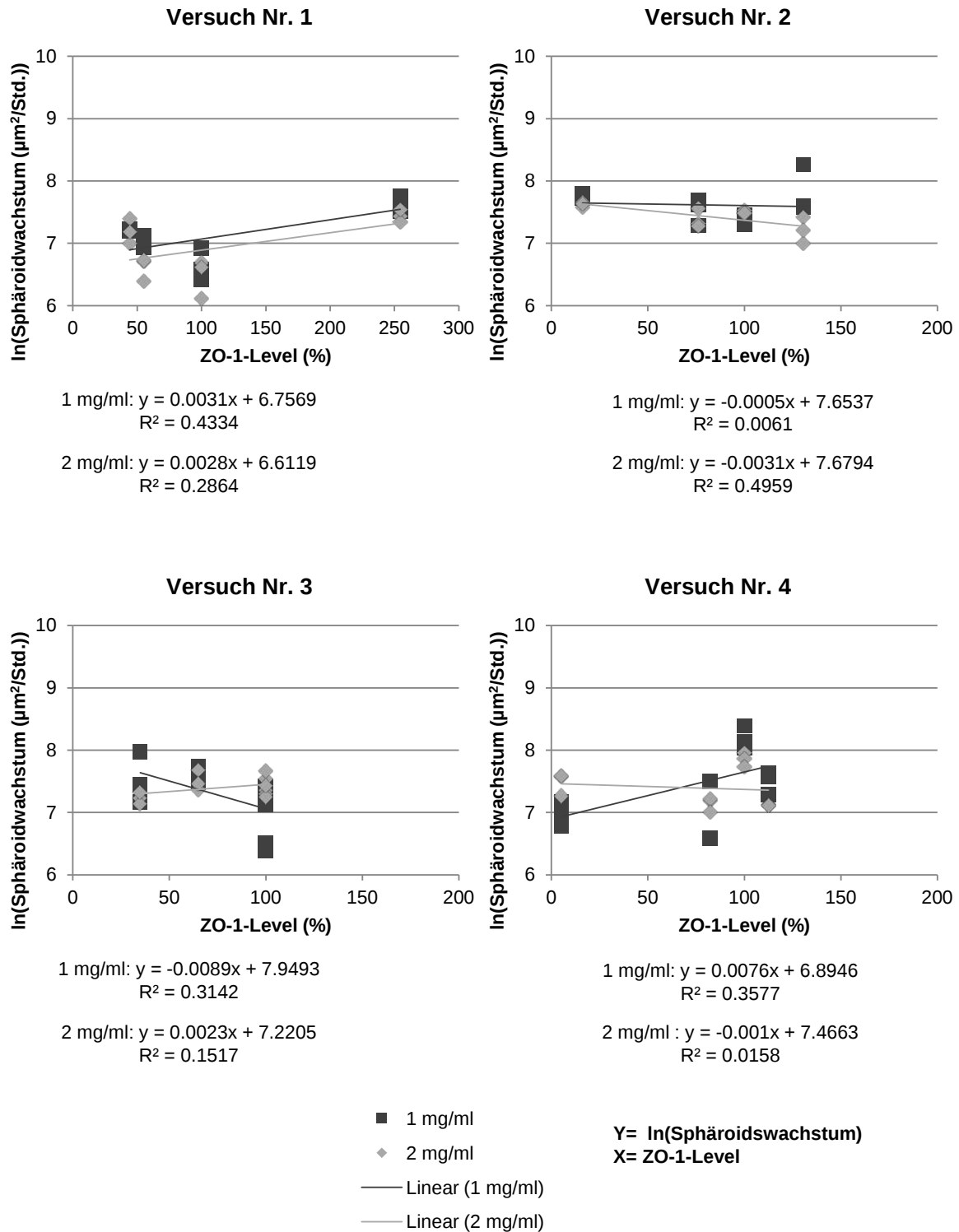


Abb. 4.42: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihr logarithmiertes Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Das Sphäroidwachstum wurde weder vom ZO-1-Level ($p=0,986$) noch von der Kollagenkonzentration ($p=0,684$) beeinflusst.

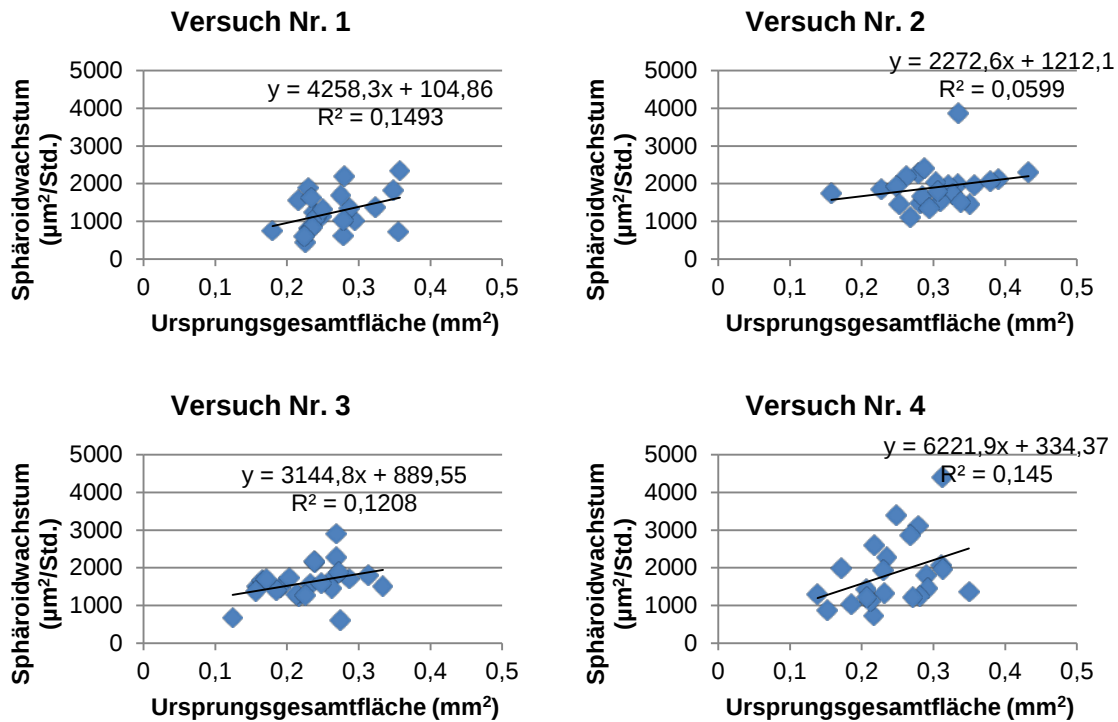


Abb. 4.43: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Sphäroidwachstum“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4.

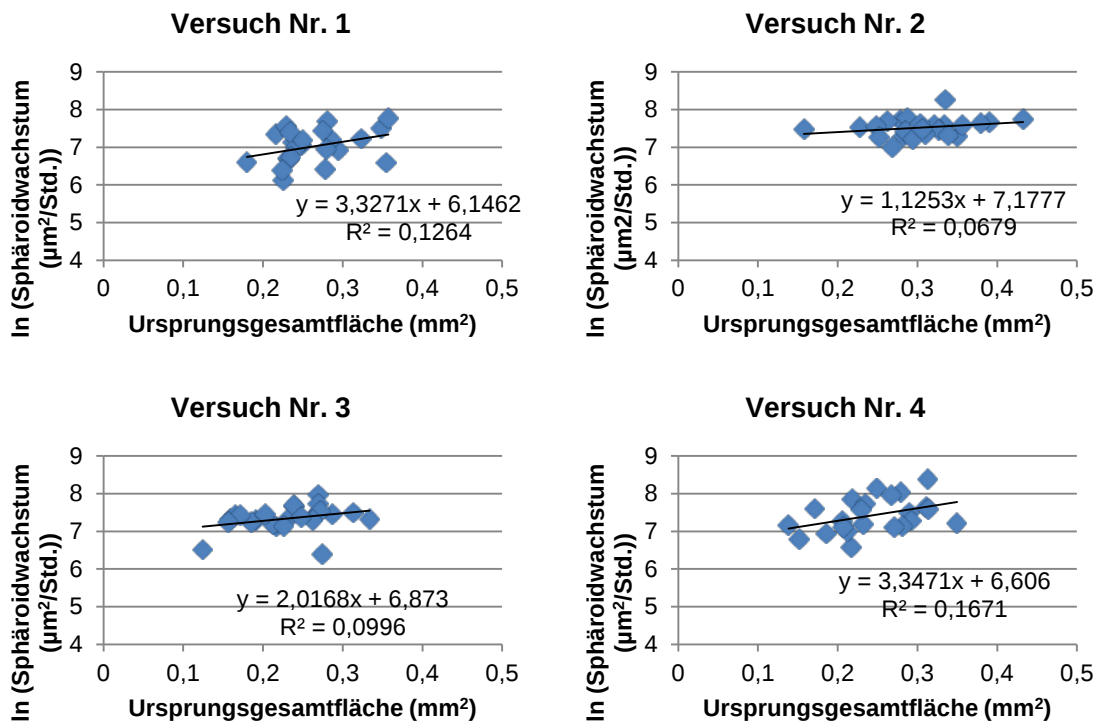


Abb. 4.44: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Das Sphäroidwachstum wurde von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p = 0,031$)

Tabelle 4.9: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und des WM35-Sphäroidwachstums

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,0986	0,0006	0,0349
Ursprungs- Gesamtfläche (mm ²)	0,031	1,6229	0,7372

Die Schätzung des ZO-1-Levels in ln-Skala ist nicht signifikant. Wenn die Ursprungsgesamtfläche 100000 μm^2 größer ist, nimmt das Sphäroidwachstum um 18% zu (n=4).

Tabelle 4.10: Test der Differenz des Sphäroidwachstum bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	0,684	0,0390	0,0720

Die Differenz der Mittelwerte ist nicht signifikant (n=4).

Korreliert man die Steigung der Gesamtfläche mit den ZO-1 Proteinlevels so fand man – anders als bei 1205Lu-Zellen (siehe Abb. 4.45, Abb. 4.46, und Tabelle 4.11) keinen signifikanten Zusammenhang. Ähnlich wie bei 1205Lu hängt aber die Zunahme der Gesamtfläche signifikant von der verwendeten Kollagenkonzentration ab (Tabelle 4.12). Hier ist die Steigung der Gesamtfläche in dem Gel mit einer Kollagenkonzentration von 1 mg/ml 40% höher als in dem Gel mit 2 mg/ml-Kollagen.

Da die Ursprungsgesamtfläche auf die Entwicklung der Sphäroiden in der Kollagen-Matrix einen Einfluss haben könnte, wurde der Zusammenhang zwischen der Ursprungsgesamtfläche und den Steigungen untersucht. Im Gegensatz zu 1205Lu (Abb. 4.30 und Abb. 4.31) korrelierte hier die Steigung der Gesamtfläche von WM35-Sphäroiden positiv mit der Ursprungsgesamtfläche (siehe Abb. 4.47 und 4.48, Tabelle 4.11). Die Korrelation wurde bei drei von vier Versuchen gefunden. Hier spielte die Ursprungsgesamtfläche eine Rolle bei der Zunahme der Gesamtfläche, da eine Zunahme der Steigung der Gesamtfläche von 34% erwartet werden kann, wenn die Ursprungsgesamtfläche 100000 μm^2 größer ist.

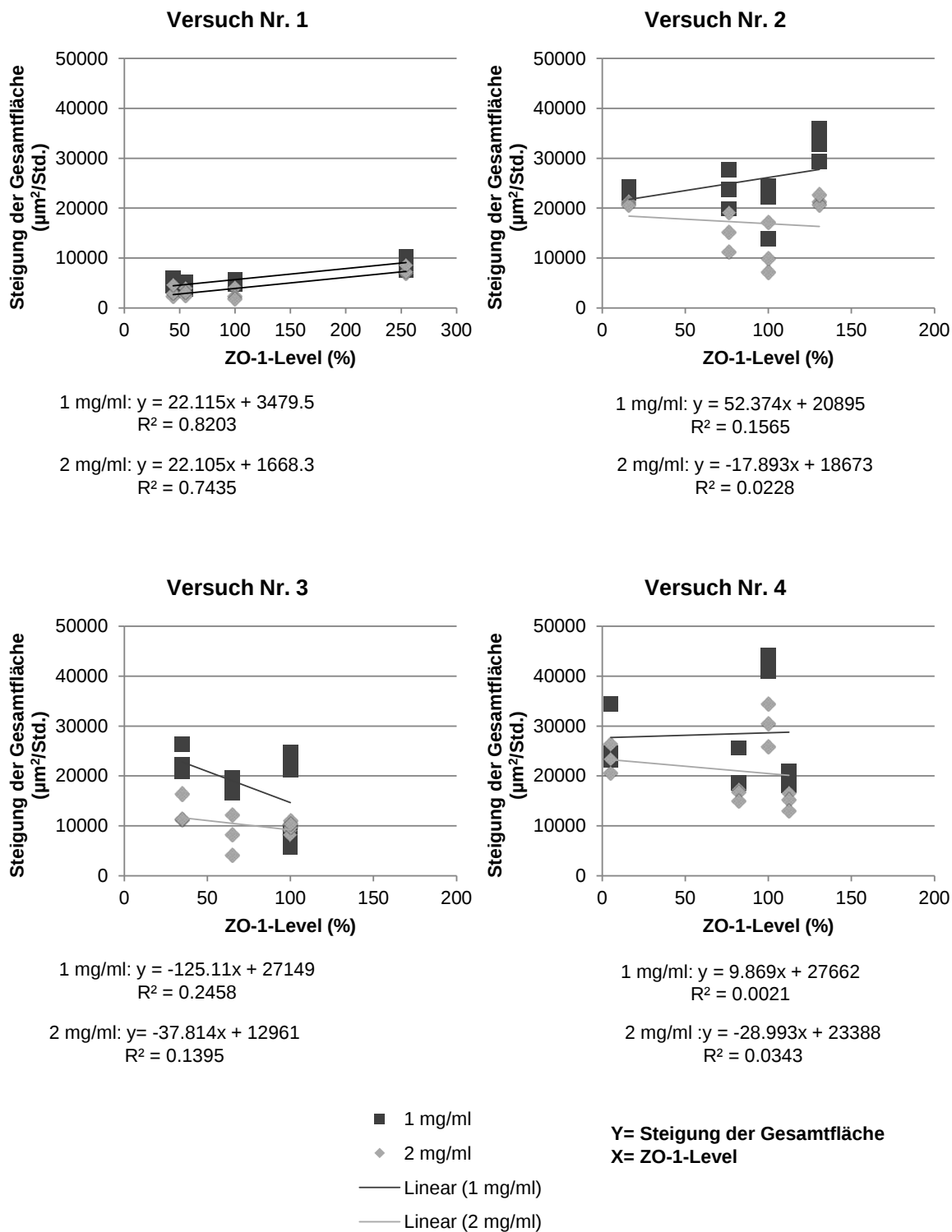


Abb. 4.45: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet.

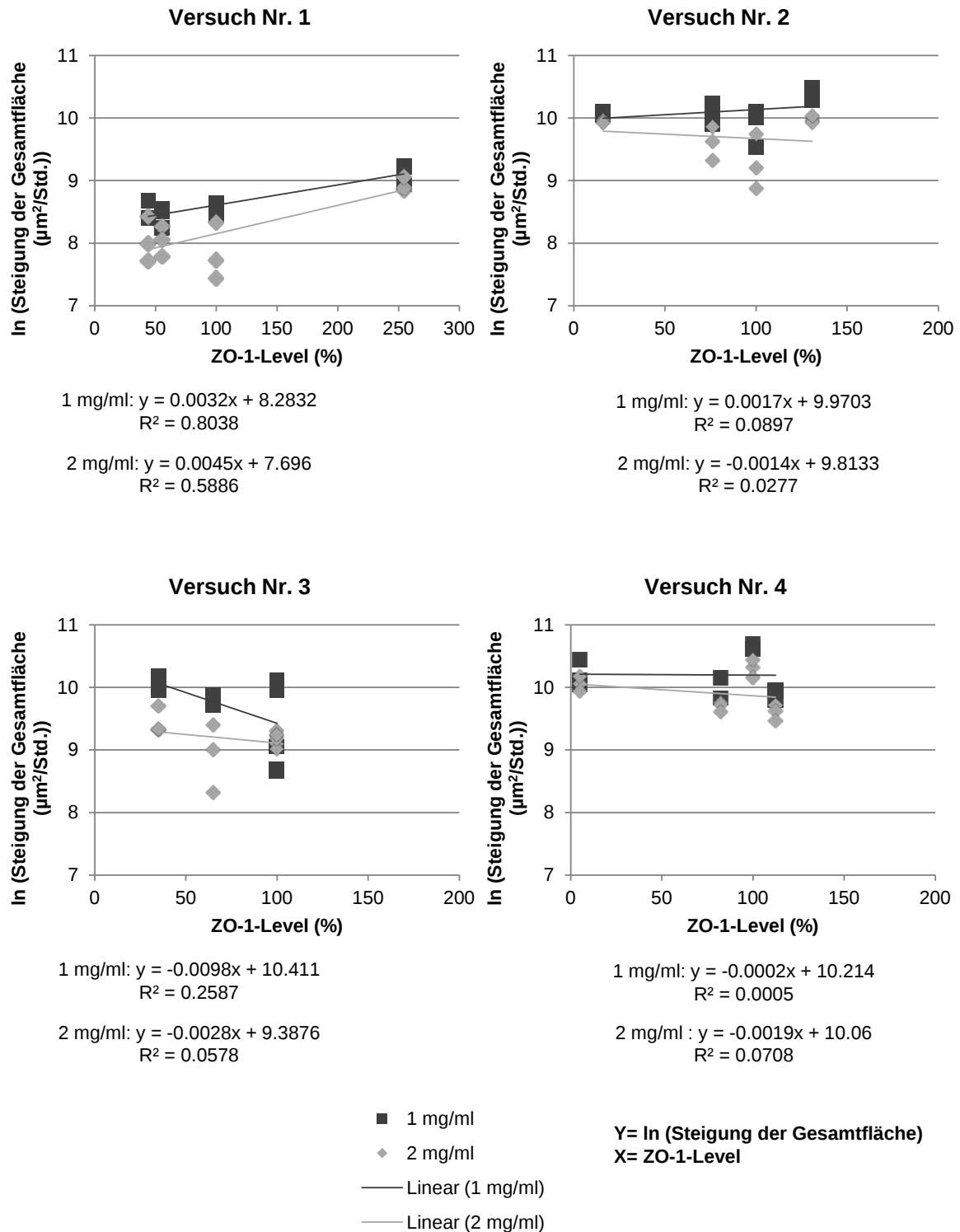


Abb. 4.46: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihrer logarithmierten Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Bei den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Konzentrationen, 1 und 2 mg/ml, verwendet. Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,806$) beeinflusst. Sie wurde aber von der Kollagenkonzentration ($p<0,0001$) beeinflusst.

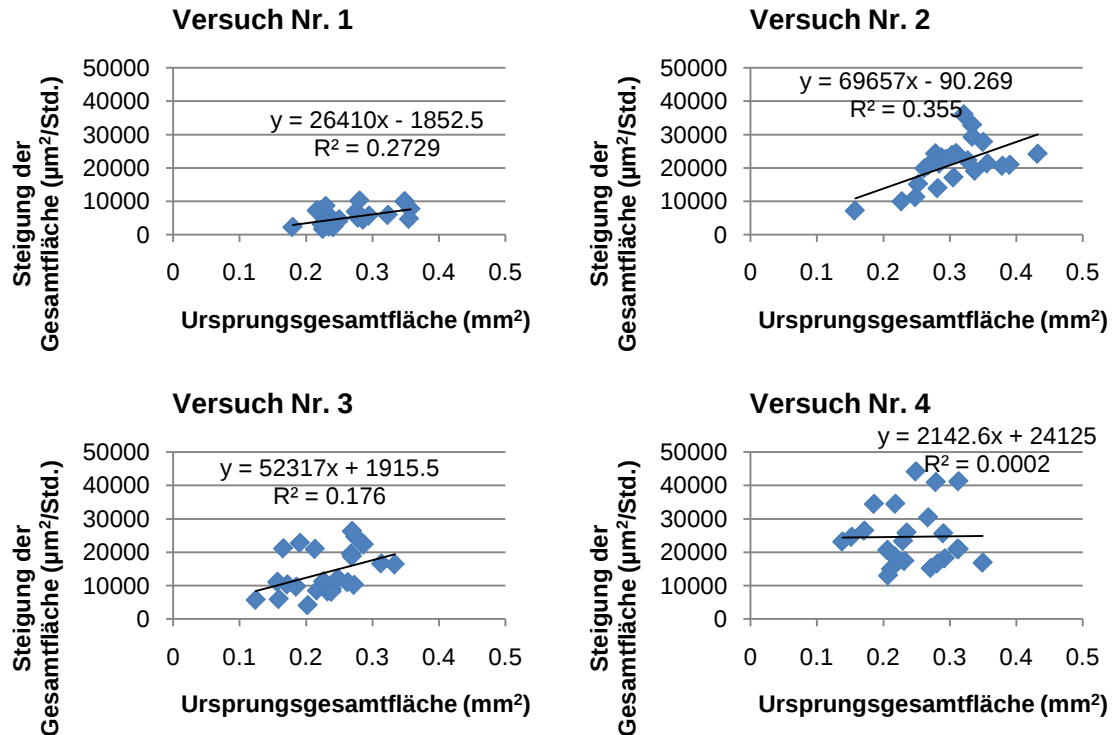


Abb. 4.47: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.

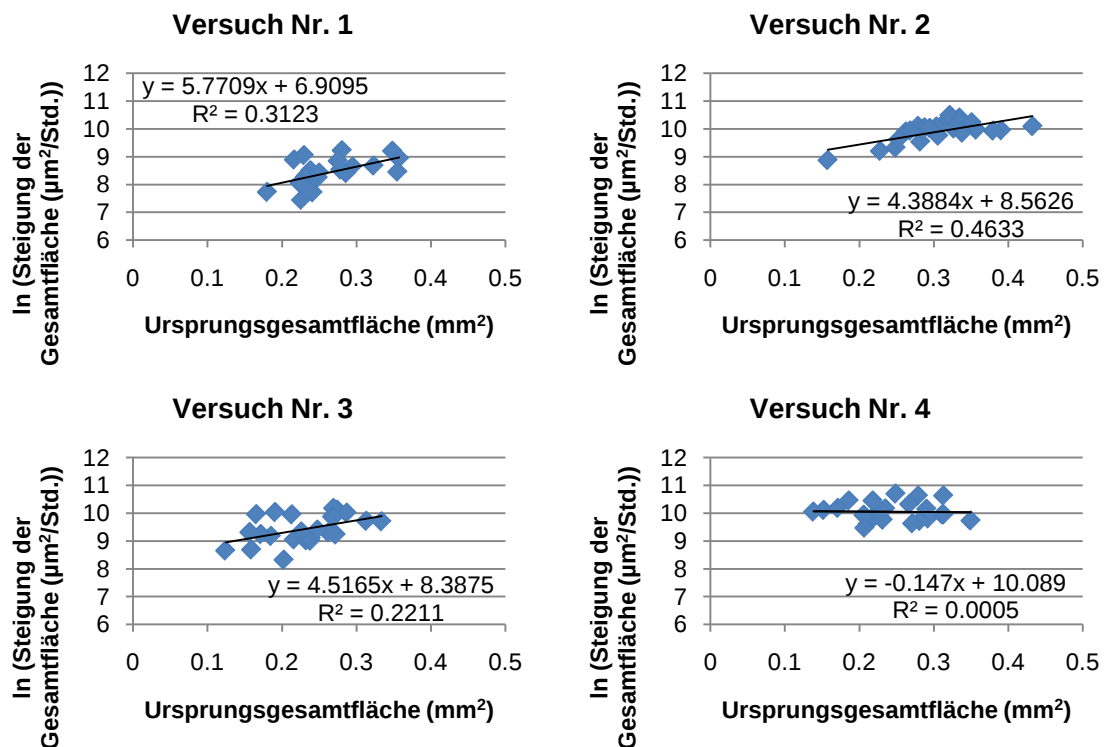


Abb. 4.48: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („logarithmierte Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. Die Steigung der Gesamtfläche wurde von der Ursprungsgesamtfläche beeinflusst ($p < 0,0001$)

Tabelle 4.11: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der WM35-Gesamtfläche

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,806	-0,0005	0,0022
Ursprungs-Gesamtfläche (mm ²)	<0,0001	2,9074	0,6829

Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant Wenn die Ursprungsgesamtfläche 100000 μm^2 größer ist, nimmt die Steigung der Gesamtfläche um 34% zu (n=4).

Tabelle 4.12: Test der Differenz der Steigung der WM35-Gesamtfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration

Parameter	Signifikanz	Differenz der Mittelwerte	SE
Kollagen-Konzentration (1-2 mg/ml)	<0,0001	0,3330	0,0741

Die Differenz der Mittelwerte in ln-Skala ist 0,3080 und entspricht: eine höhere Steigung von 40 % bei 1 mg/ml (n=4).

4.5 Einzel-Zell-Invasion und -Migration von adhärennten Melanom- Zellen

Das ZO-1-Level hatte keinen Einfluss auf die Invasion von WM35-Sphäroiden in einer 3D-Umgebung in der Kollagen-Matrix. Der Invasionstyp bei der Sphäroidinvasion in Kollagen ist überwiegend eine kollektive Invasion (Valencia, et al., 2015; Kumar, et al., 2016). Maaser, et al (1999) hatte die Einzel-Zell-Invasion einer Melanom-Linie, MV3, untersucht. Es könnte sein, dass das ZO-1-Level von WM35-Zellen eher bei ihrer Einzel-Zell-Invasion eine Rolle spielt. Die Einzel-Zell-Invasion wurde anhand einer Boyden-Kammer untersucht. Hier kann nur eine Zelle durch eine Pore durchwandern, da laut Angabe des Herstellers eine Pore nur einen Durchmesser von 8 μm hat. Hier werden die Zellen auf eine poröse Membran ausgesät, die entweder mit einem Matrigel beschichtet war oder nicht. Solche Zellen, die das Matrigel degradieren und anschließend durch die Poren durchwandern, sind invasive Zellen. Zur Untersuchung der reinen Migration von Zellen wird die Membran ohne Beschichtung verwendet. Die Zellen, die durch die Poren durchwandern und auf der anderen Seite der Membran gelangen, können gezählt werden. Ein weiterer Unterschied zwischen dem Boyden-Kammer-Assay und dem Kollagen-Invasions-Assay ist der verwendete Kulturtyp. Während bei den Kollagen-Assays eine 3D-Kultur von Zellen in einer Form von Sphäroiden verwendet wird, werden bei dem Boyden-Kammer-Assay adhärennte 2D Zellen verwendet.

4.5.1 Die Invasion von adhärennten WM35-Zellen

Die Zellbehandlungen unterschieden sich in der Zahl der invadierten Zellen (vgl. Abb. 4.49 und Abb. 4.50). Die Abb. 4.49 zeigt die Zahl der invadierten Zellen der unterschiedlichen Zellbehandlungen, die durch das Matrigel durchwanderten. Für die

statistische Analyse mussten die Werte wieder logarithmiert werden (Abb. 4.50), um eine Normalverteilung zu erreichen, die für die statistische Auswertung notwendig ist.

Wie bereits in 4.3.3 für adhärente WM35-Zellen beschrieben, war auch hier die Expression zwischen den Knockdown-Zellen und allen drei Kontrollen deutlich unterschiedlich (siehe Abb. 4.51). Die drei Kontrollen besaßen hingegen sehr ähnliche ZO-1-Level. Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zellen mit reprimierter ZO-1-Expression. Während die 52-Zellen sehr wenig ZO-1 exprimierten, wiesen die 55-Zellen eine mittlere Expression dieses Proteins auf.

Bei den Zellen der WM35-55 Präparation, die ein mittleres ZO-1-Level besaßen, wurde die höchste Zahl der invadierten Zellen gefunden. Andere Zellbehandlungen sowohl mit höherem als auch mit niedrigerem ZO-1-Gehalt hatten eine signifikant kleinere Zahl an invadierten Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Maximum der Einzel-Invasion von WM35-Zellen bei einer mittleren Expression dieses Gens existierte.

Interessanterweise war aber auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp-Kontrolle und der Non-Target-Kontrolle zu beobachten. Im Gegensatz dazu wies die Empty-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied zur WT-Kontrolle auf. Die Empty-Kontrolle ist eine Kontrolle, die generell den Einfluss der Behandlung mit der Transduktionsmaschinerie nachstellt. Sie besitzt keine shRNA-Sequenz. Die Non-Target-Kontrolle hat eine Non-Target-Sequenz, die theoretisch gegen keine Ziel-RNA gerichtet ist. Da die Non-Target-Kontrolle eine deutlich geringere Zahl an invadierten Zellen auch als die Empty-Kontrolle hatte, deutet dies darauf hin, dass diese Erniedrigung nicht von der allgemeinen Behandlung der Zellen stammt, sondern dass es möglich wäre, dass diese Kontrolle doch einen Off-Target-Effekt bei der Invasion in der Boyden-Kammer auslösen könnte. Deshalb werden die weiteren statistischen Berechnungen sowohl mit als auch ohne den Werten für die Non-Target-Kontrolle durchgeführt.

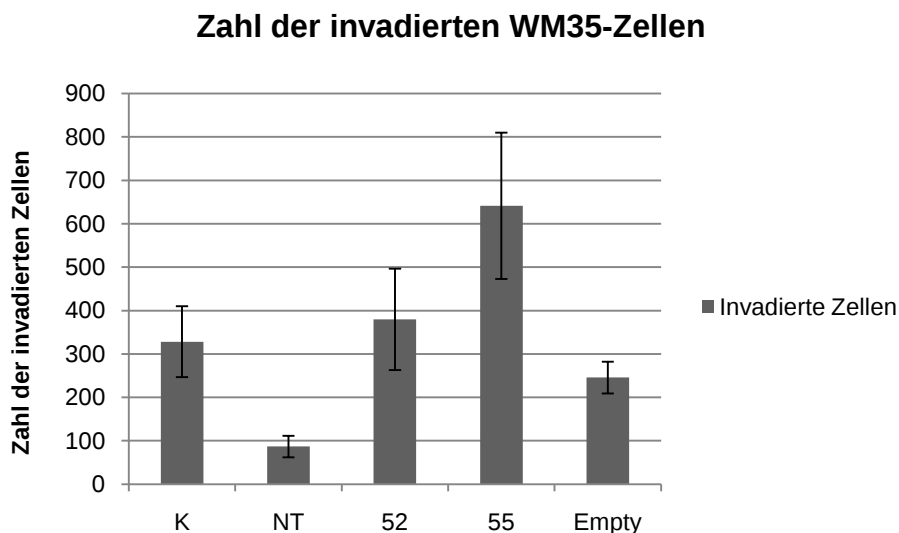


Abb. 4.49: Die Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (n=4, SEM).

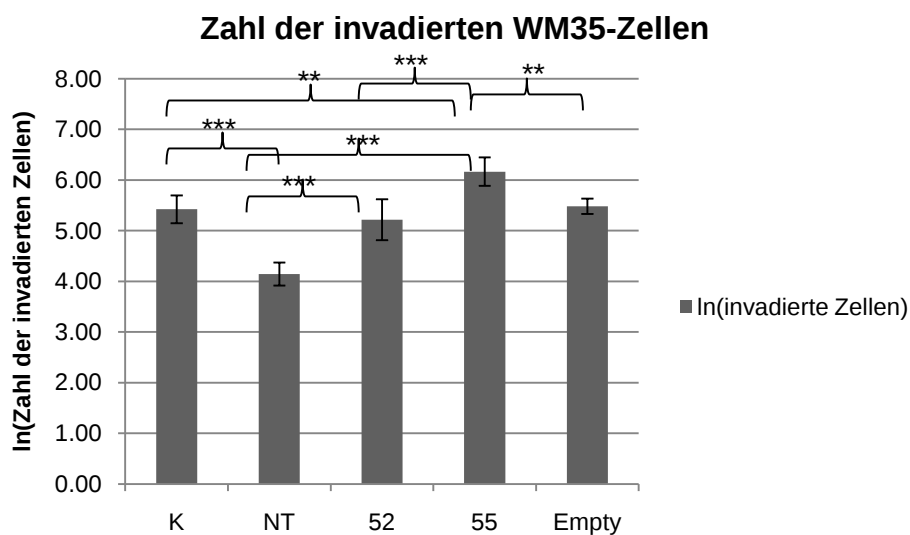


Abb. 4.50: Die logarithmierte Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen. (n=4, SEM, **:p<0,01, ***p:<0,001).

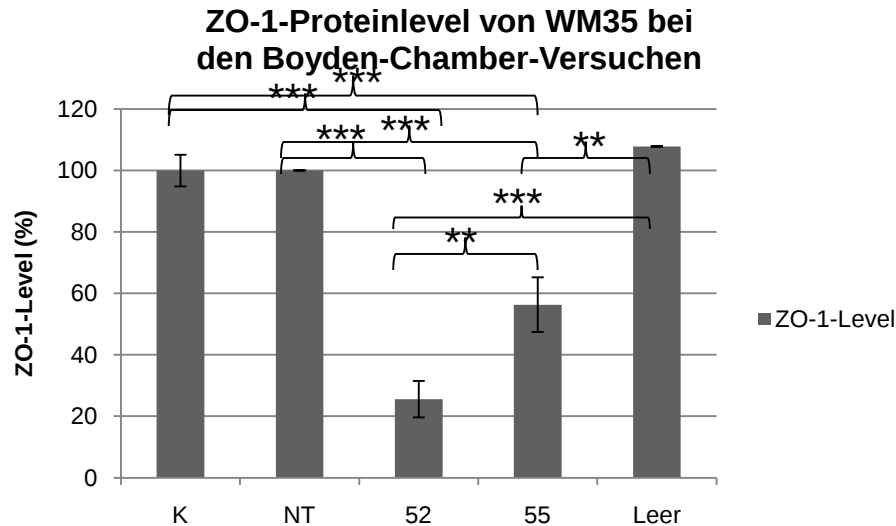


Abb. 4.51: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=4, SEM, **:p<0,01, *p:<0,001).**

Als Erstes wurden die Daten ohne die Werte der Non-Target-Kontrolle analysiert (Abb. 4.52). Aus den Ergebnissen in dieser Abbildung kann hypothetisiert werden, dass die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der invadierten Zellen nicht linear, sondern wahrscheinlich quadratisch ist, wobei ein Maximum-Wert der invadierten Zellen bei einem mittleren ZO-1-Level erreicht wurde. Deshalb wird zusätzlich ein quadratischer Faktor von ZO-1 dem Statistik-Modell zugegeben. Dieser Faktor ist in der Tabelle 4.13 als ZO-1² gelistet. Bei einem linearen Zusammenhang wird nur ein ZO-1-Faktor in den Modell zugegeben, weil der Zusammenhang vom ZO-1 zu dem untersuchenden Parameter (z.B. Y) $Y = bx + c$ ist. Hier ist b die Schätzung für den Faktor ZO-1 (x). Im Gegensatz dazu gibt es bei einem quadratischen Zusammenhang einen weiteren Faktor, den Faktor ZO-1². Hier ist die Funktion: $Y = ax^2 + bx + c$ und a ist die Schätzung für den Faktor ZO-1². C ist der Konstante Term (siehe Tabelle 4.13). Die quadratische Funktion bildet eine Parabel als Grafik. Bei einem negativen a-Wert ist die Grafik nach unten geöffnet und es gibt ein Maximum-Wert für Y oder den sogenannten Scheitelpunkt.

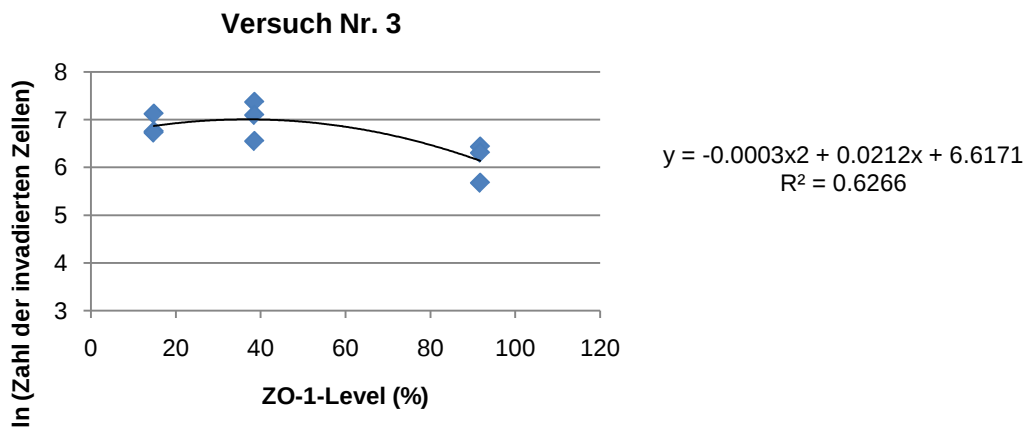
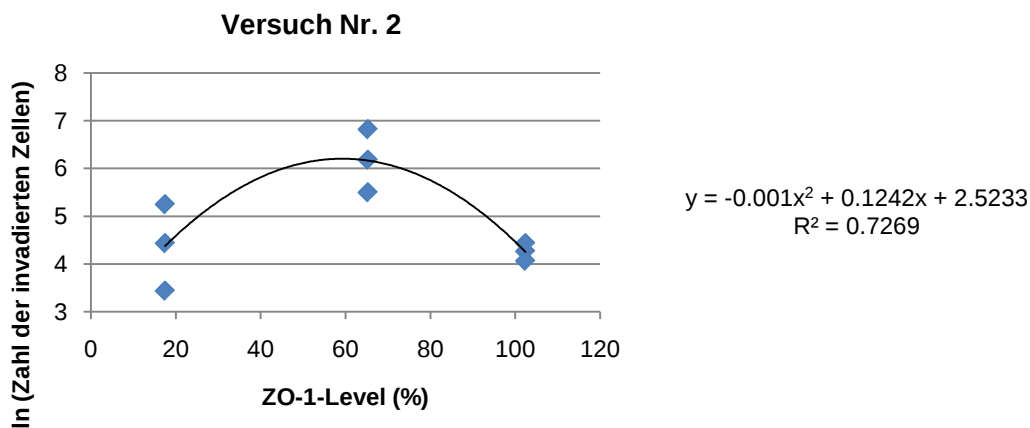
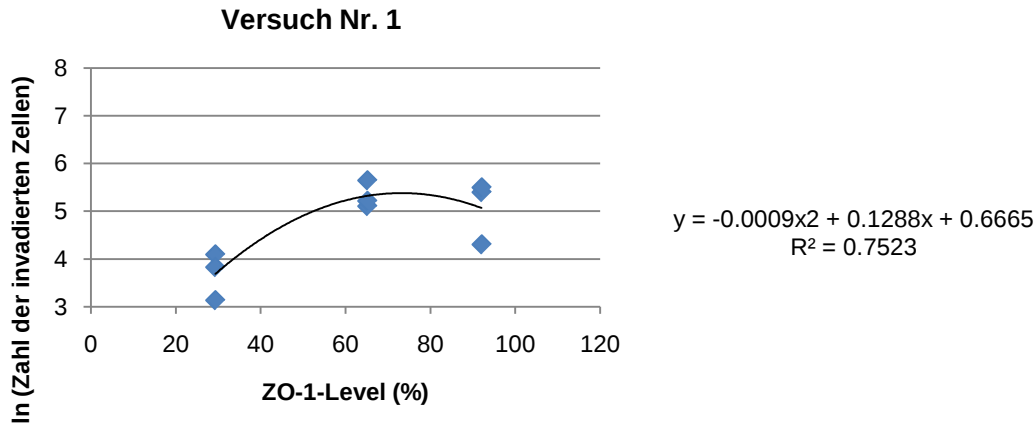


Abb. 4.52: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der logarithmierten Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (ohne NT-Kontrolle). (Versuch 1 bis 3).

Aus den Werten der Tabelle 4.13 lässt sich die quadratische Funktion ableiten: $Y = ax^2 + bx + c$. Y ist $\ln(\text{Zahl der invadierten Zellen})$ und X ist ZO-1-Level. In der Tabelle sind die Schätzungen der oben genannten Faktoren (a, b, und c) gelistet. Hier ist: $a = -0,0007$, $b = 0,0797$ und $c = 3,764$. Die Funktion ist $y = -0,0007x^2 + 0,0797x + 3,764$. Diese Funktion beschreibt den Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen. Zur Darstellung dieser Funktion als eine Grafik werden die gemessenen ZO-1-Werte in die obengenannte Funktion als X-Werte eingetragen.

Dadurch erhält man y oder die geschätzte logarithmierte Zahl der invadierten Zellen. Die Abbildung 4.53 zeigt die Grafik der oben genannten Funktion. Aus dieser Funktion kann das ZO-1-Level, bei dem ein Maximum der logarithmierten Zahl der invadierten Zellen erreicht wird, geschätzt werden. Zur Berechnung dieses ZO-1-Levels wird die Funktion abgeleitet: $y' = 2 \cdot -0,0007x + 0,0797 = 0$. Der errechnete x -Wert ist 59. Somit ist das ZO-1-Level, bei dem ein Maximum der Zahl an invadierten Zellen gibt, 59%, was wiederum ungefähr dem Expressionslevel der Knockdownzellen Nr.55 entspricht (siehe Abb. 4.51).

Tabelle 4.13: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der invadierten WM35-Zellen ohne Non-Target in dem Boyden-Kammer

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Konstanter Term	0,007	3,7640 (c)	0,8982
ZO-1	0,005	0,0797 (b)	0,0257
ZO-1 ²	0,005	-0,0007 (a)	0,0002

In dem Modell wurden $\ln$ -transformierte Werte der Zahl der invadierten Zellen verwendet. Hier wurden die Werte der Non-Target-Kontrolle nicht für die Analyse verwendet. Aus den Schätzungen kann die Funktion gebildet werden, die die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und $\ln$ (Zahl der invadierten Zellen) beschreibt: $y = ax^2 + bx + c$, $y = -0,0007x^2 + 0,0797x + 3,764$ (y ist $\ln$ (Zahl der invadierten Zellen), und x ist das ZO-1-Level) ($n=3$).

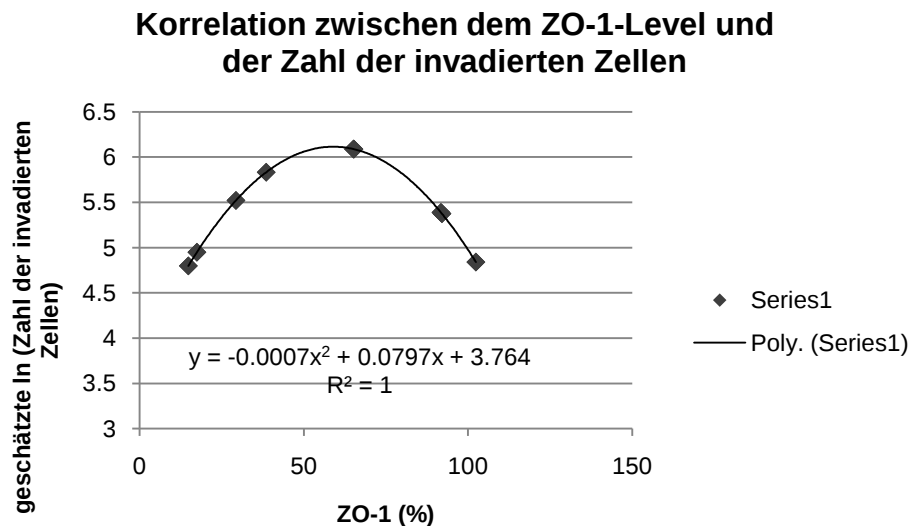


Abb. 4.53: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen. Diese Korrelation hat die Funktion $y = -0,0007x^2 + 0,0797x + 3,764$ (y ist die geschätzte logarithmierte Zahl der invadierten WM35-Zellen und x ist das ZO-1-Level. Das Maximum der geschätzten Zahl der logarithmierten invadierten Zellen liegt bei einem ZO-1-Level von 59% ($n=3$).

Wir können es aber nicht ausschliessen, dass es keinen Off-Target-Effekt bei der Einzel-Zell-Invasion von NT gab. Dafür müsste man genauere Expressionsanalysen von zahlreichen Genen, die für die Invasion verantwortlich sind, durchführen, um fest zu stellen,

ob die Expression von einem oder mehreren dieser Gene gleich bleibt oder nicht. Deshalb wurden zusätzlich die gesamten Daten untersucht, die anschließend für die statistische Auswertung auch logarithmiert werden (siehe Abb. 4.54).

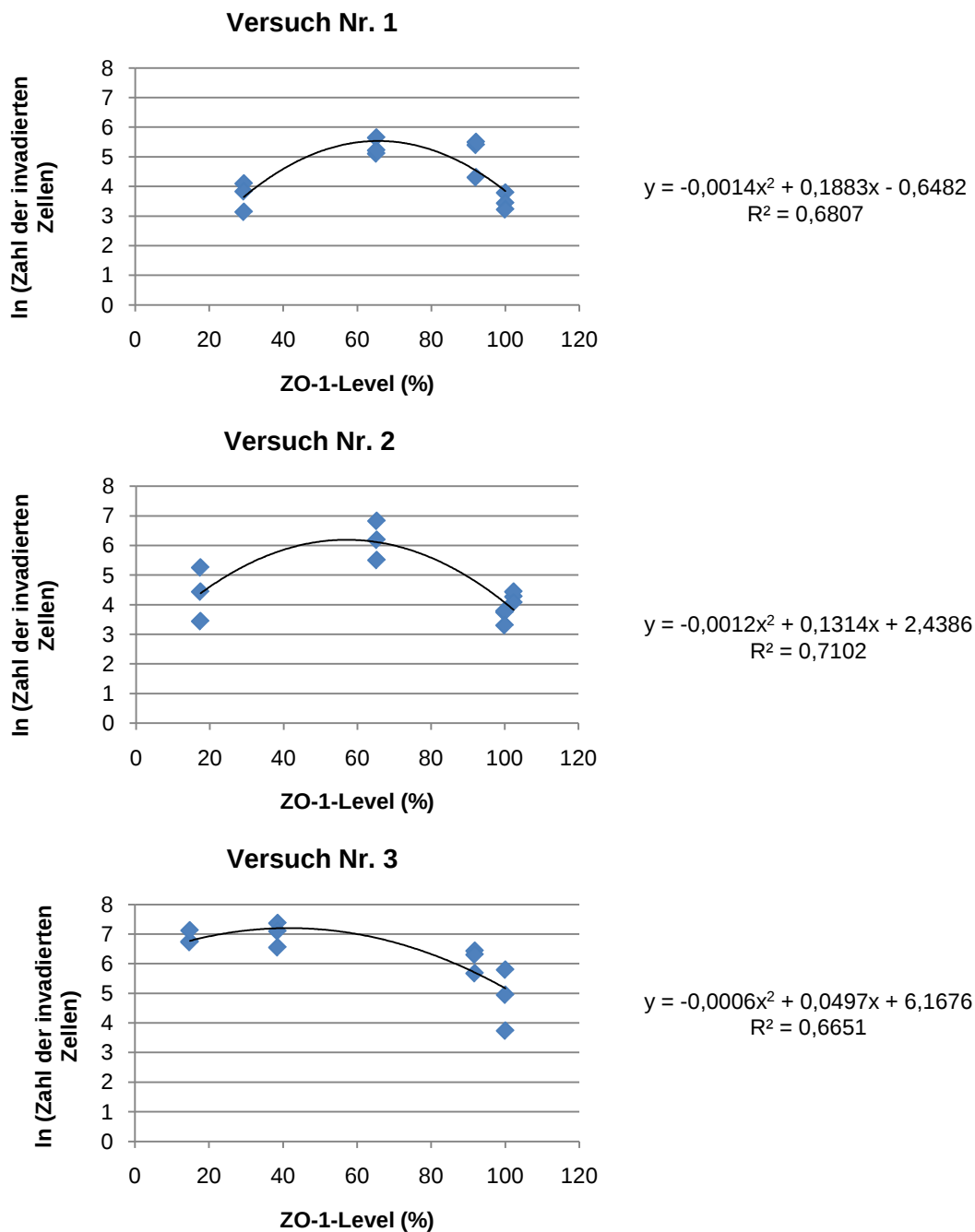


Abb. 4.54: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der logarithmierten Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (mit NT-Kontrolle) (Versuch 1 bis 3).

In den Grafiken kann man ein Maximum der Zahl der invadierten Zellen bei einem mittleren ZO-1-Level von ca. 60% sehen (siehe Abb. 4.54). Zum Validieren dieser Vermutung wurden diese Daten statistisch, wie oben beschrieben analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in der Tabelle 4.14 gelistet.

Tabelle 4.14: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der invadierten WM35-Zellen von allen Zellpräparaten in dem Boyden-Kammer

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Konstanter Term	0,005	3,5284 (c)	0,8534
ZO-1	0,001	0,0967 (b)	0,0254
ZO-1 ²	0,0002	-0,0009 (a)	0,0002

In dem Modell wurden ln-transformierte Werte der Zahl der invadierten Zellen von allen Zellpräparaten verwendet. Aus den Schätzungen kann die Funktion gebildet werden, die die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und ln(Zahl der invadierten Zellen) beschreibt: $y = ax^2 + bx + c$, $y = -0,0009x^2 + 0,0967x + 3,5284$ (y ist ln(Zahl der invadierten Zellen), und x ist das ZO-1-Level) (n=3).

Wie es auf den Abbildungen zu sehen ist, gab es ein Maximumwert der logarithmierten Zahl der invadierten Zellen in dem mittleren Bereich des ZO-1-Levels (siehe Tabelle 4.14 und Abb. 4.54), da der quadratische Faktor ZO-1² signifikant war. Aus den Werten der Tabelle 4.14 lässt sich die quadratische Funktion ableiten: $Y = ax^2 + bx + c$. Y ist die geschätzte logarithmierte Zahl der invadierten Zellen und X ist das ZO-1-Level. In der Tabelle sind die Schätzungen der oben genannten Faktoren (a, b, und c) gelistet. Hier ist: $a = -0,0009$, $b = 0,0967$ und $c = 3,5284$. Die Funktion lautet: $y = -0,0009x^2 + 0,0967x + 3,5284$. Um eine Grafik zu erstellen, die den Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen beschreibt, musste man die gemessenen ZO-1-Level-Werte aus den Versuchen in die obengenannte Funktion integrieren. Dadurch erhält man die ln-Zahl der invadierten Zellen. In der Abb. 4.55 wurde die obengenannte Grafik dargestellt, bei der als x-Werte die ZO-1-Werte und als Y-Werte die geschätzte logarithmierte Zahl der invadierten Zellen eingetragen wurden.

Aus dieser Funktion kann das ZO-1-Level, bei dem ein Maximum der logarithmierten Zahl der invadierten Zellen erreicht wird, geschätzt werden. Zur Berechnung dieses ZO-1-Levels wird die Funktion abgeleitet: $y' = 2 \cdot -0,0009x + 0,0967 = 0$. Der errechnete x-Wert ist 55. Dies bedeutet, dass ein Maximum der Zahl der invadierten Zellen bei einem ZO-1-Level von ca. 55% liegt. Dieser ZO-1-Wert ähnelt dem Wert, der aus der statistischen Analyse ohne die Non-Target-Kontrollen gewonnen wurde. Zusammengefasst war die Einzel-Zell-Invasion von adhären WM35-Zellen vom ZO-1-Level abhängig, wobei die höchste Zahl der invadierten Zellen bei einem mittleren ZO-1-Level von ca. 55-59% lag.

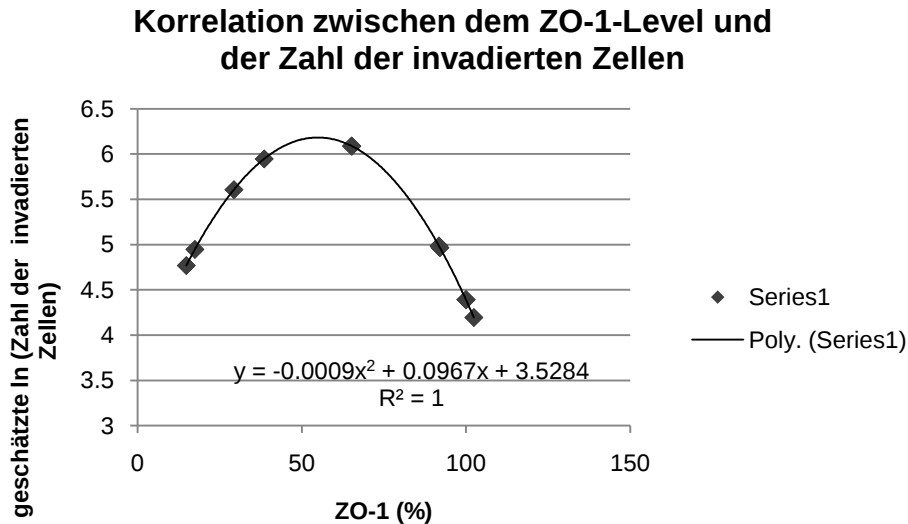


Abb. 4.55: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen. Diese Korrelation hat die Funktion $y = -0,0009x^2 + 0,0967x + 3,5284$ (y ist die geschätzte logarithmierte Zahl der invadierten WM35-Zellen und x ist das ZO-1-Level. Das Maximum der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen liegt bei einem ZO-1-Level von 55% (n=3).

4.5.2 Die Migration von adhärenenten WM35-Zellen

Mit den Boyden-Kammern wurde außerdem die Migration untersucht. Die Zellen, die nach 48 Std. durch die Poren in der Membran zu der unteren Seite der Membran migrierten, wurden hierbei gezählt. Zunächst wurde die Zahl dieser Zellen bei den unterschiedlichen Zellbehandlungen betrachtet.

Zwischen den Zellbehandlungen konnten signifikante Unterschiede der Zahl der migrierten Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 4.56). Die Wildtyp-Kontrolle hatte eine höhere Zahl von migrierten Zellen als die Non-Target-Kontrolle, obwohl sie fast die gleiche Menge an ZO-1 hatten (siehe Abb. 4.51). Die Empty-Kontrolle ähnelt hier aber der Non-Target-Kontrolle. Vermutlich gab es somit einen Effekt der Behandlung mit Lentiviren auf die Migration. Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedliche statistische Analysen durchgeführt. Bei der einen Analyse wurden alle Daten analysiert und bei der anderen Analyse wurden die Daten ohne die Werte der Wildtyp-Kontrolle (K) analysiert.

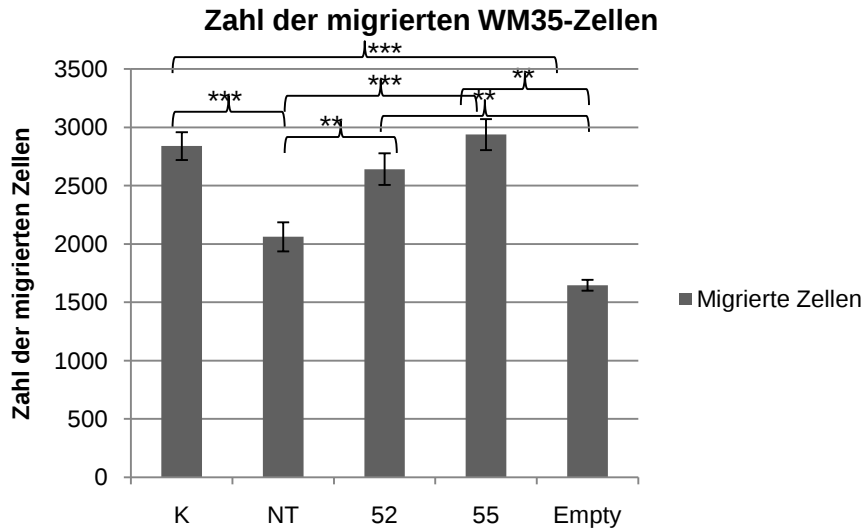


Abb. 4.56: Zahl der migrierten WM35-Zellen. (n=4, SEM, **:p<0,01, *p:<0,001).**

Als erstes wurden alle Daten (inklusive K) analysiert. Die Abbildung 4.57 stellt die Zahl der migrierten Zellen von allen Zellpräparaten und ihre ZO-1-Expression dar. Hier konnte man keinen deutlichen Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Level und der Migration feststellen. Dies muss aber nochmal statistisch bestätigt werden. Zur Überprüfung der Rolle von ZO-1 bei der Migration von adhären WM35-Zellen wurden zunächst ZO-1 und sein quadratischer Terminus, $ZO-1^2$ als die festen Faktoren in die statistische Analyse eingegeben. Das Ergebnis dieses Tests ist in der Tabelle 4.15 dargestellt. Der Faktor $ZO-1^2$ ist hier nur gering signifikant. Außerdem war der Faktor ZO-1 nicht signifikant.

Da der Faktor ZO-1 nicht signifikant war, wurde ein weiteres Analyse-Modell gebildet, in dem dieser unsignifikante Faktor entfernt wurde. Aus der Analyse wurde aber festgestellt, dass auch der quadratische Faktor nicht signifikant war (siehe Tabelle 4.16). Hier konnte somit kein Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Level und der Migration von WM35-Zellen gefunden werden.

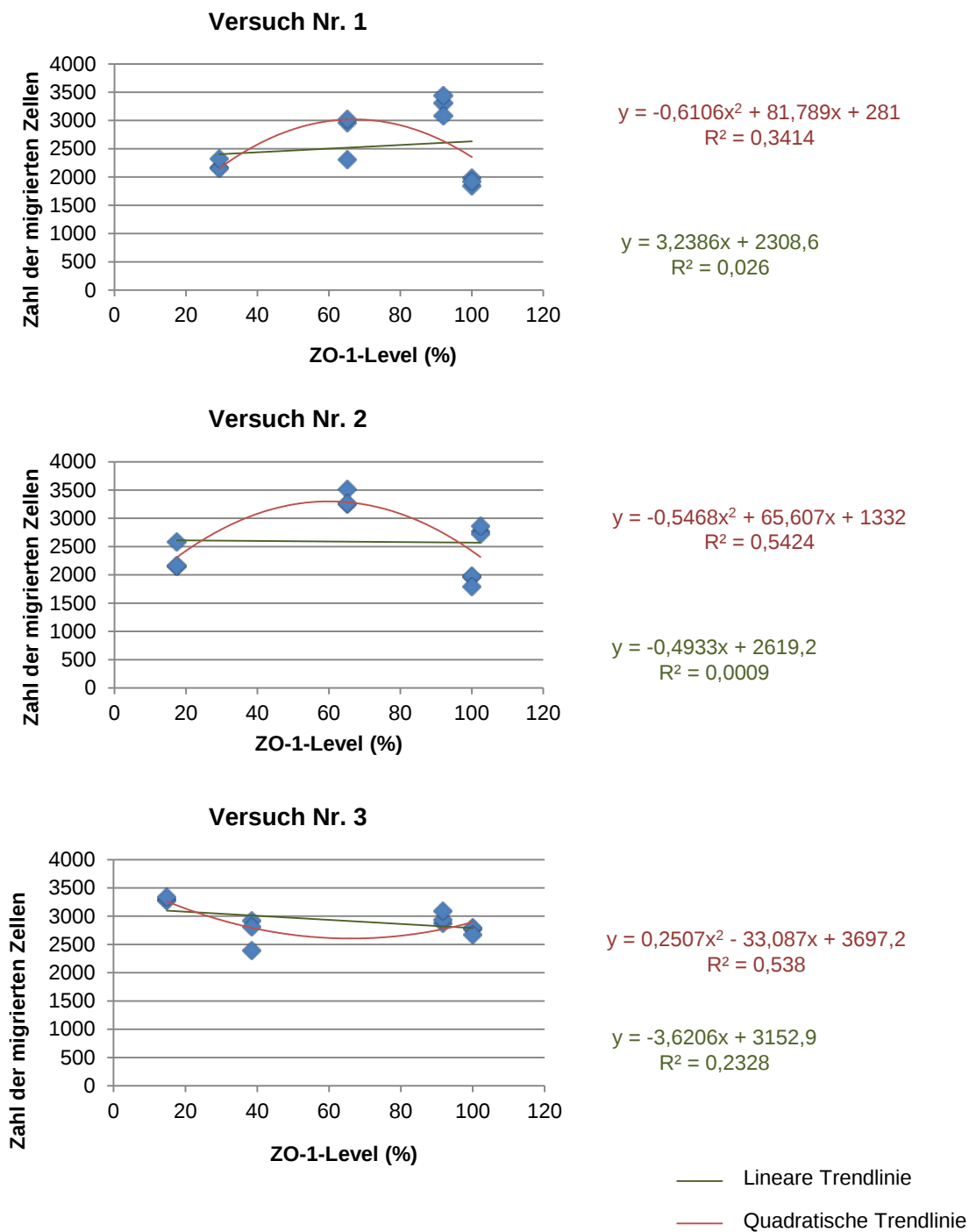


Abb. 4.57: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der Zahl der migrierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (mit Wildtyp-Kontrolle) (Versuch 1 bis 3).

Tabelle 4.15: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit zwei festen Faktoren (mit K)

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Konstanter Term	0,000	2112,2756	379,6700
ZO-1	0,056	29,9762	15,1202
ZO-1 ²	0,045	-0,2561	0,1231

In dem Modell wurden die Werte der Zahl der migrierten Zellen von allen Zellpräparaten verwendet. Von den Faktoren war nur der quadratische Faktor ZO-1 signifikant (n=3).

Tabelle 4.16: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit einem festen Faktor (mit K)

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Konstanter Term	0,000	2778,0033	167,7400
ZO-1 ²	0,441	-0,0162	0,0207

In dem Modell wurden die Werte der Zahl der migrierten Zellen von allen Zellpräparaten verwendet. Der quadratische Faktor von ZO-1 war nicht signifikant (n=3).

Des weiteren wurde untersucht, ob die Daten ohne die Wildtyp-Kontrolle eine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten Zellen zeigen. Während die anderen Zellpräparate mit Lentiviren und Puromycin behandelt wurden, wurde die Wildtyp-Kontrolle nur in dem Kulturmedium kultiviert. Deshalb könnte es sein, dass die Wildtyp-Kontrolle ein deutlich anderes Verhalten als die anderen Zellbehandlungen aufwies und somit keine gut geeignete Kontrolle für die Versuche wäre. Die Grafiken, die die Korrelation der Zahl der migrierten Zellen und ihre ZO-1-Expression in den Boyden-Kammer-Versuchen ohne die Werte der Wildtyp-Kontrolle zeigen, wurden in der Abbildung 4.58 dargestellt. Der Versuch Nr. 1 und der Versuch Nr. 2 zeigten eine deutliche Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten Zellen, in der ein Maximum der Zahl der migrierten Zellen bei dem mittleren ZO-1-Level gefunden wurde (mit $R^2=0,76$ und $0,95$). Versuch Nr. 3 zeigte dahingegen eine andere Korrelation, bei der ein Minimum beim mittleren ZO-1-Level gefunden wurde. Diese Werte wurden wie bei der vorherigen Analyse statistisch untersucht, um festzustellen, welche Korrelation von der oben genannten Korrelationen signifikant war.

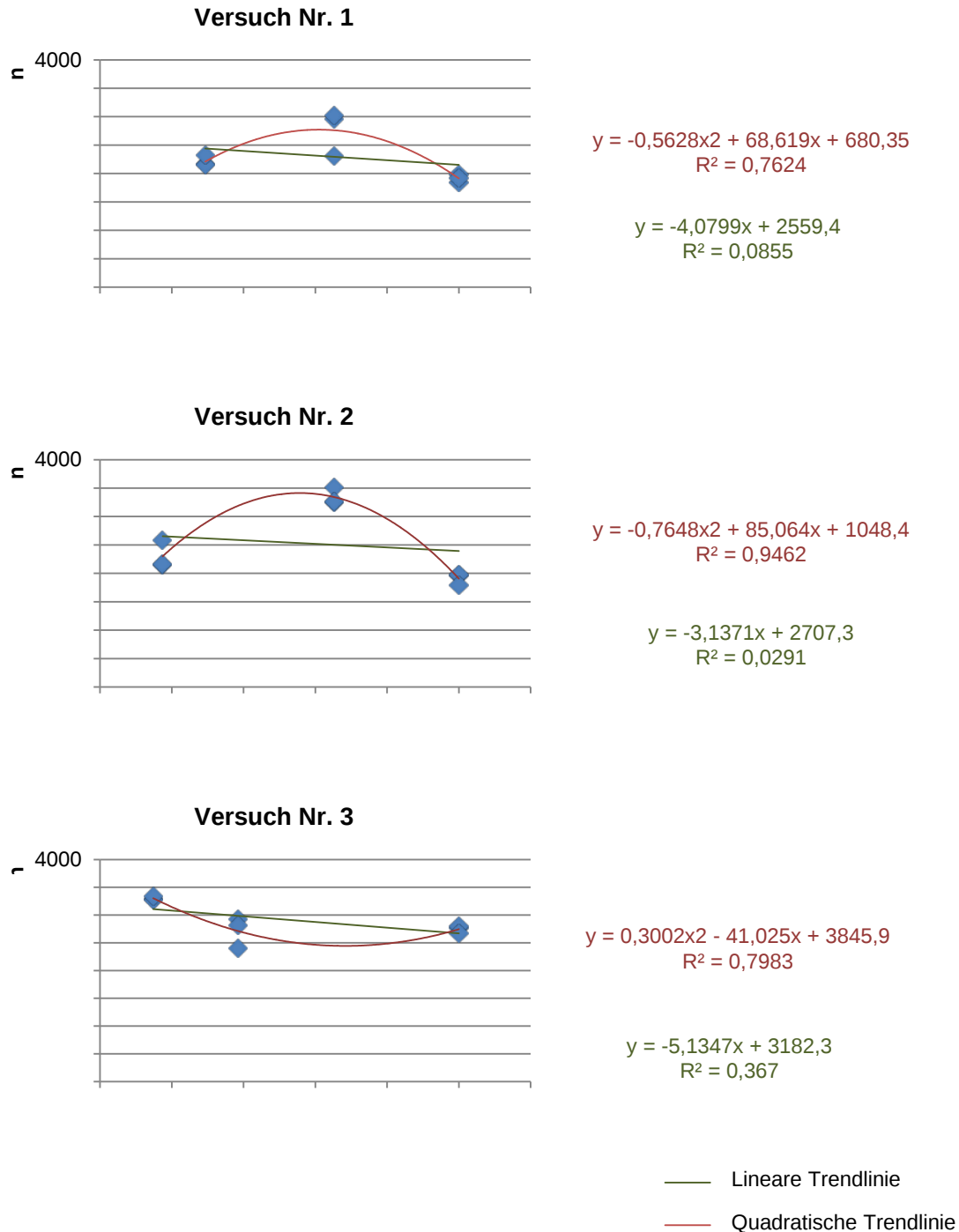


Abb. 4.58: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der Zahl der migrierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (ohne Wildtyp-Kontrolle) (Versuch 1 bis 3).

Die statistische Analyse der Daten ohne die Wildtyp-Kontrolle ist in der Tabelle 4.17 gezeigt. Tatsächlich gab es eine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten Zellen, bei der ein Maximum bei dem mittleren ZO-1-Level gab. Hier waren sowohl der quadratische ZO-1-Faktor als auch der lineare ZO-1-Faktor signifikant. Aus der Schätzung dieser Faktoren kann man eine Funktion bilden, die den Zusammenhang zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten Zellen beschreibt. Die Funktion lautet:

$y = -0,339776x^2 + 36,5819x + 1982,4370$. Durch das Eintragen der gemessenen ZO-1-Werte in diese Funktion, erhält man die geschätzte Zahl der migrierten Zellen. Mit diesen Werten kann man eine Grafik erstellen, die die Korrelation zwischen den ZO-1-Levels und der geschätzten Zahl der migrierten Zellen darstellt (siehe Abb. 4.59).

Dies bedeutet, dass ein Maximum der Zahl der migrierten Zellen bei einem mittleren ZO-1-Level liegt. Dieses ZO-1-Level kann man ermitteln, indem man die oben genannte Funktion ableitet. Die Ableitung der Funktion ist $y' = 2 \cdot (-0,339776)x + 36,5819$. Bei dem Maximum der quadratischen Funktion ist $y' = 0$. Deshalb kann man das ZO-1-Level (x) hier bestimmen. Das ZO-1-Level, bei dem ein Maximum der Zahl der migrierten Zellen gefunden wird, ist 59 %.

Tabelle 4.17: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit zwei festen Faktoren (ohne K)

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Konstanter Term	0,000	1982,4370	374,7554
ZO-1	0,012	36,5819	13,3683
ZO-1 ²	0,005	-0,339776	0,1093

In dem Modell wurden die Werte der Zahl der migrierten Zellen verwendet. Von den Faktoren waren der Faktor ZO-1 und der Faktor ZO-1² signifikant (n=3). Aus den Schätzungen kann die Funktion gebildet werden, die die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten Zellen beschreibt: $y = -0,339776x^2 + 36,5819x + 1982,4370$ (y ist die Zahl der migrierten Zellen), und x ist das ZO-1-Level (n=3).

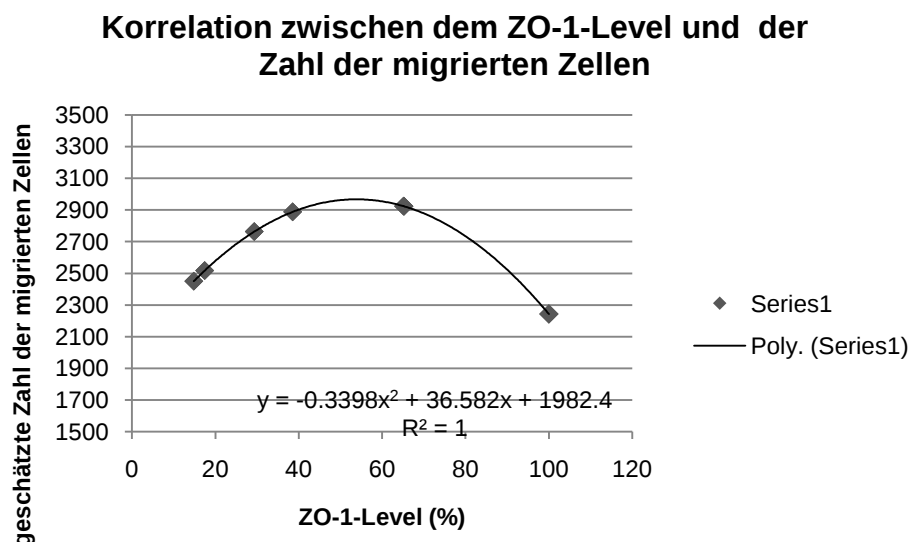


Abb. 4.59: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten Zahl der migrierten Zellen. Diese Korrelation hat die Funktion $y = -0,3398x^2 + 36,582x + 1982,4$ (y ist die geschätzte Zahl der migrierten WM35-Zellen und x ist das ZO-1-Level. Das Maximum der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen liegt bei einem ZO-1-Level von 59% (n=3).

Bei dem mittleren Level von ZO-1 von ca. 60% des Levels der Non-Target-Kontrolle wurden sowohl die höchste Zahl an invadierten Zellen als auch die höchste Zahl an migrierten Zellen gefunden ist. Dies bedeutet, dass die Einzel-Zell-Migration und –Invasion vom ZO-1-Level abhängig ist, wobei das Maximum der migrierten oder invadierten Zellen bei dem mittleren ZO-1-Level gefunden wurde.

4.6 Dissoziation von Melanom-Sphäroiden

Eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion ist unabdingbar für die Invasion und die Metastasierung von Krebszellen (Hirohashi & Kanai, 2003; Balzer & Konstantopoulos). In den Kollagen-Invasions-Versuchen wurde herausgefunden, dass eine erhöhte ZO-1-Expression die Invasion der Linie 1205Lu fördert. Die erhöhte Invasivität kann auch auf einer verminderten interzellulären Adhäsion zurück zu führen sein. Anders als die Linie 1205Lu hatte die Linie WM35 keine Korrelation zwischen ihrem ZO-1-Level und ihrer Invasionsfähigkeit aus dem Sphäroid. Deshalb muss geklärt werden, ob das ZO-1-Level eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion in den Sphäroiden dieser beiden Linien spielt.

Die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion in den Sphäroiden kann durch einen Dissoziationsassay untersucht werden. Hier wurden die Zell-Zell-Verbindungen in den Sphäroiden durch eine enzymatische und mechanische Behandlung mit der Zeit abgebaut. Die meisten Sphäroide waren in 4 Minuten fast komplett degradiert. Für die Interpretation der Daten wurden die Abnahme der Sphäroidfläche zwischen 0-1, 1-2 und 2-4 Minuten verwendet. Diese Werte sind die Steigungen, die aus den Linien ermittelt wurden, die die Sphäroidsflächen mit den Zeitpunkten verbinden (siehe 3.1.8).

4.6.1 Dissoziation von 1205Lu-Sphäroiden

Wie bei den vorherigen Versuchen wurden 1205Lu-Kontrollen und 1205Lu-Zellen mit verminderter ZO-1-Expression verwendet. Abb. 4.60 zeigt Beispiele von Sphäroiden während eines Dissoziations-Versuchs. Hier waren die Flächen der Sphäroide bei 4 Min. kleiner als am Anfang der Dissoziations-Behandlung. Die gemessenen Werte dieser Flächen sind in der Abbildung 4.61 dargestellt.

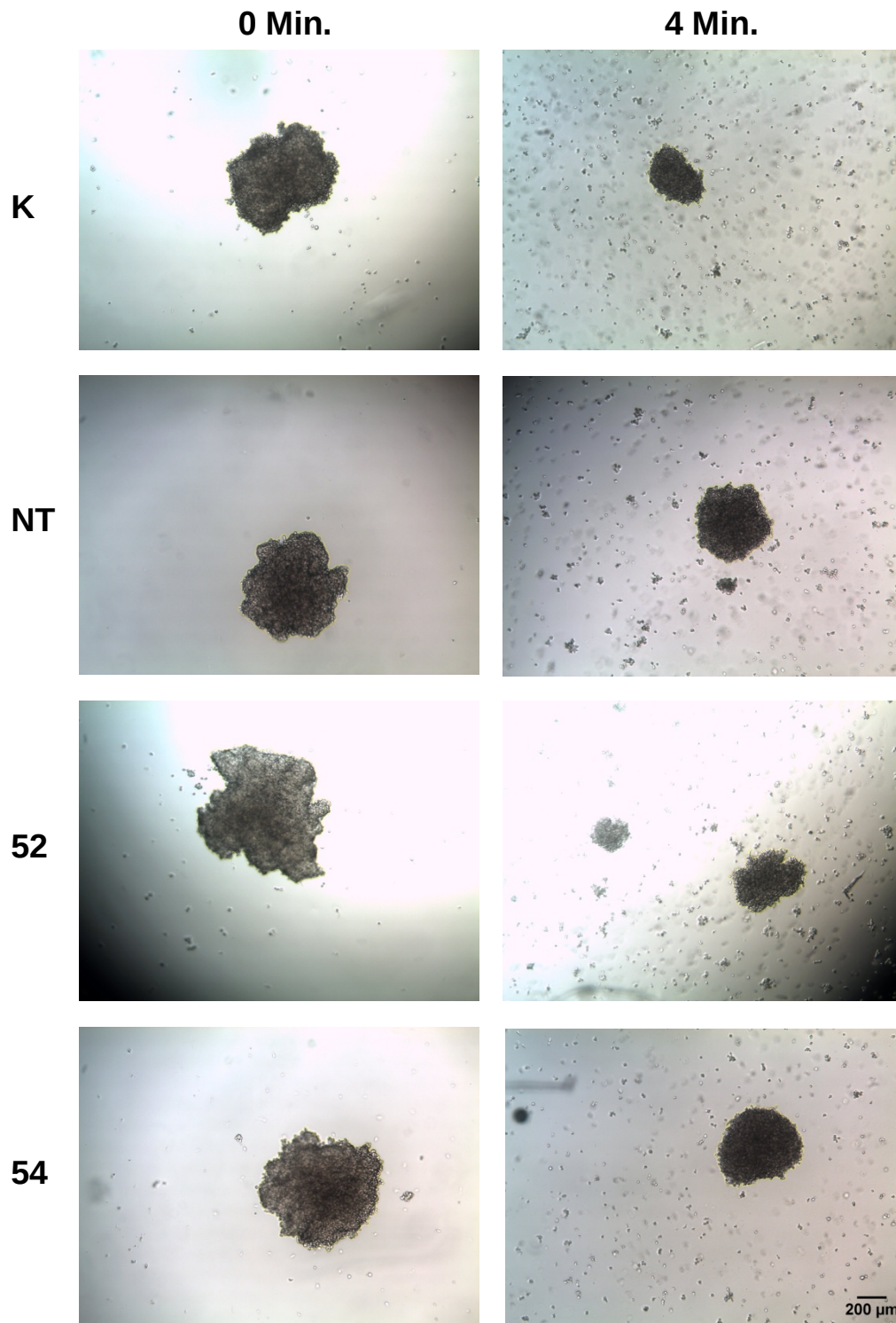


Abb. 4.60: Beispiel der Dissoziation von ^{125}Lu -Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 4 Min. K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 54: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=210%, NT=100%, 52=9%, 54=32%. Skalierungslinie: 200 μm

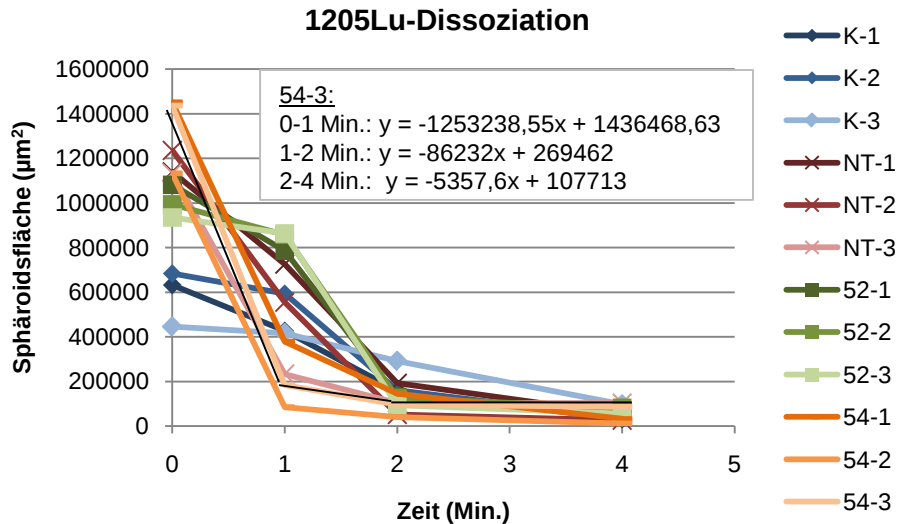


Abb. 4.61: Die Abnahme der Fläche der Sphäroide durch die mechanische und enzymatische Dissoziation während der 4 Min. bei einem Kollagen-Invasions-Versuch als Beispiel. Aus allen Grafiken wurden die Abnahme-Werte durch das Erstellen von Trendlinien zwischen 0-1, 1-2 und 2-4 Min. ermittelt. Beispiele der Trendlinien des Sphäroids 54-3 werden in der Abbildung gezeigt. Die Abnahme-Werte sind die a-Werte in den Formeln: $y = -ax + b$

In der Abb. 4.62 ist die Abnahme der Sphäroidsgröße der Zellpräparate dargestellt. Die Werte der Steigungen wurden logarithmiert, sodass sie normal verteilt waren (siehe Abb. 4.64). In Abbildung 4.63 wurde der Nachweis des ZO-1-Proteins dieser Zellen dargestellt. Die beiden Knockdown-Zellen besaßen im Vergleich zu allen Kontrollen signifikant weniger Protein.

Die Zellpräparate unterschieden sich nicht in der Abnahme der Fläche (Dissoziation) zwischen 0 und 1 Minuten (vgl. Abb. 4.64 A). Es gab auch keinen signifikanten Unterschied der Zellbehandlungen in der Abnahme zwischen 1 und 2 Minuten (vgl. Abb. 4.64 B). In den weiteren 2 Min. konnte auch kein Unterschied zwischen den Zellbehandlungen gefunden werden (siehe Abb. 4.64 C). In den drei Zeiträumen lösten sich die Sphäroide der Kontrollen, WT-Kontrolle und Non-Target-Kontrolle, mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit auf (siehe Abb. 4.64 A-C).

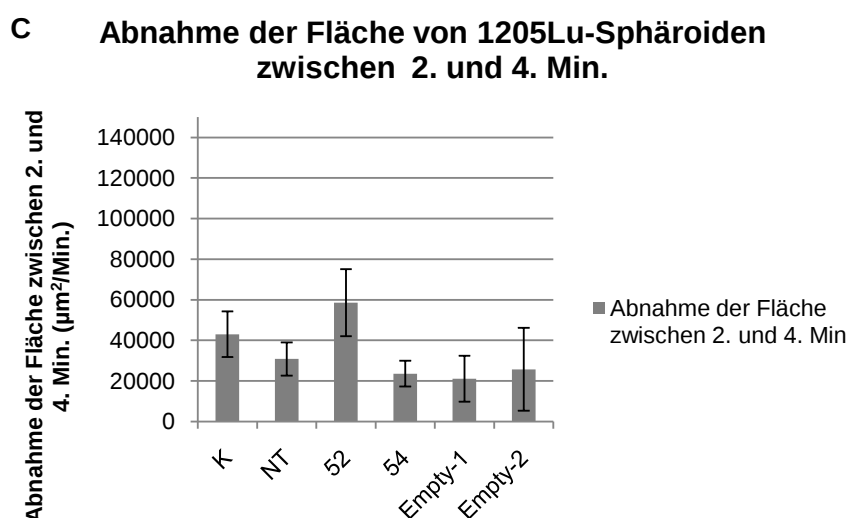
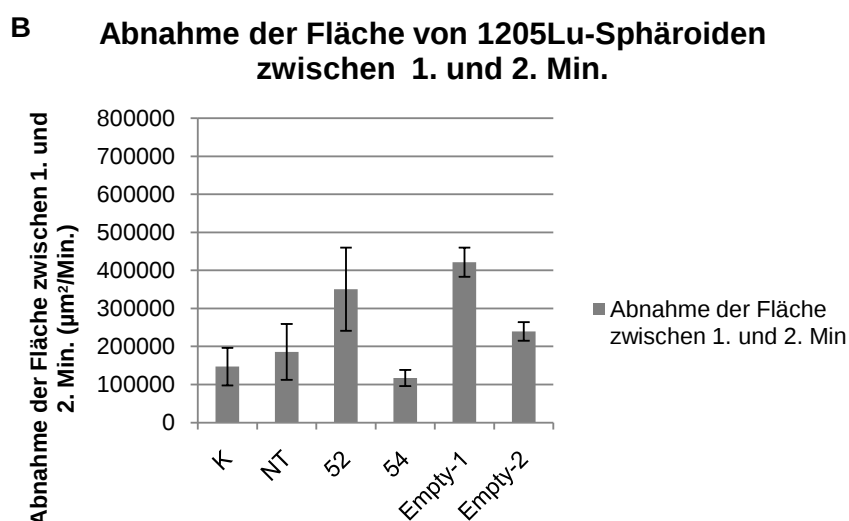
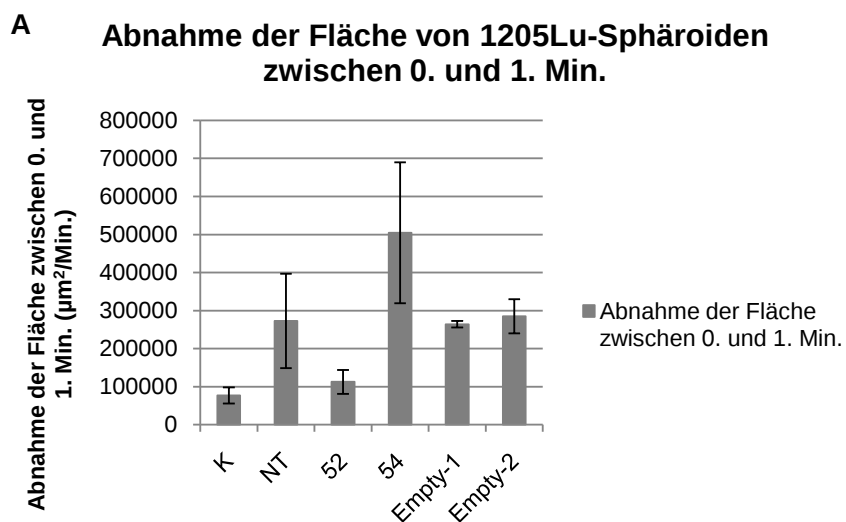


Abb. 4.62: A. Die Abnahme der Fläche von ^{125}Lu -Sphäroiden zwischen 0 und 1 Min., B. Die Abnahme der Fläche von ^{125}Lu -Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Die Abnahme der Fläche von ^{125}Lu -Sphäroiden zwischen 2 und 4 Min. (n=3 , SEM).

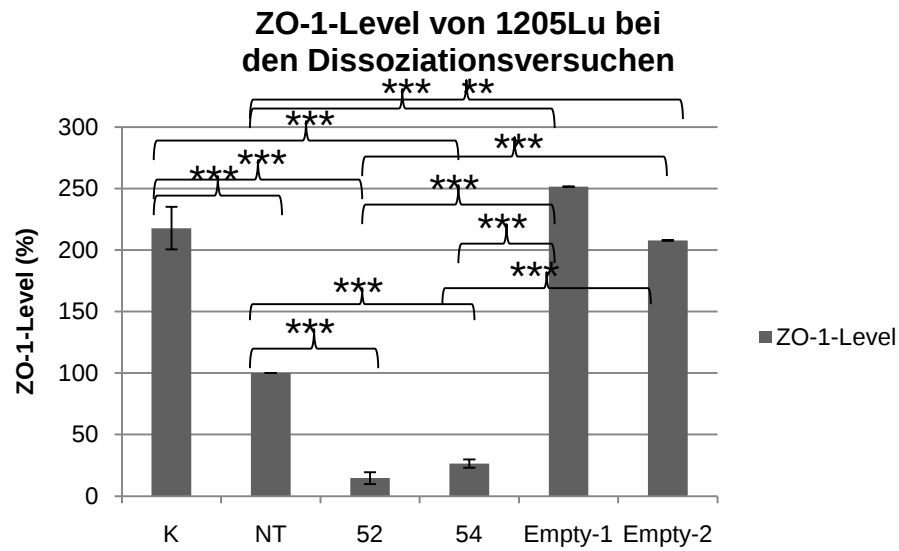
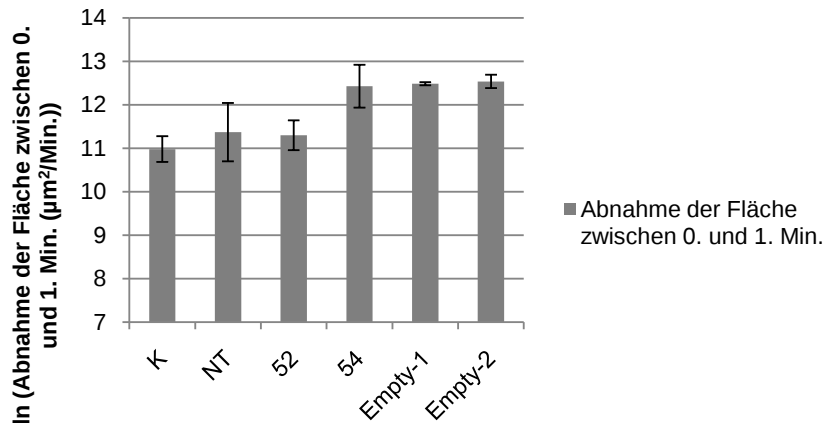
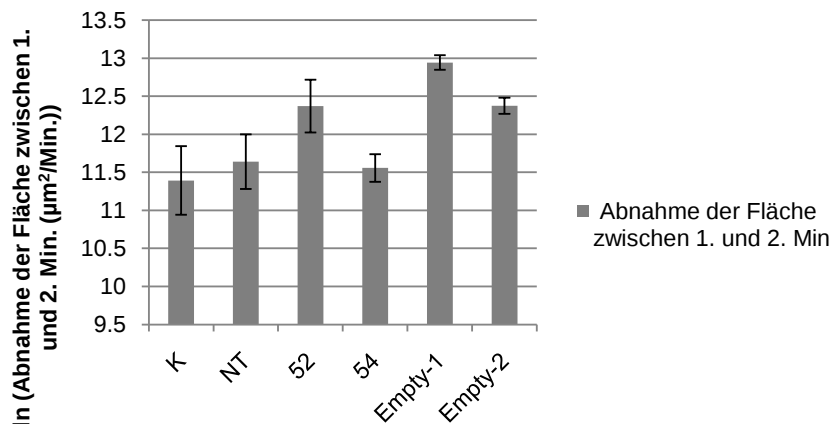


Abb. 4.63: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Dissoziations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=3, SEM, **:p<0,01, *p:<0,001).**

A Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 0. und 1. Min.



B Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 1. und 2. Min



C Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 2. und 4. Min

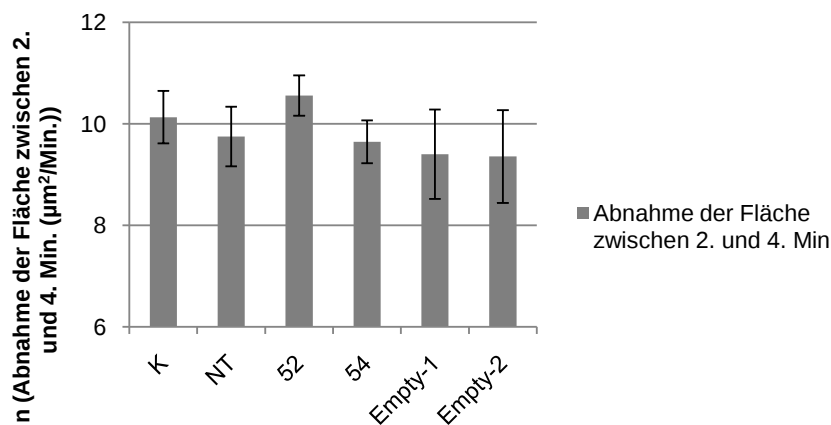


Abb. 4.64: A. Logarithmus der Abnahme der Fläche der 1205Lu-Zellpräparate zwischen 0 und 1 Min., B. Logarithmus der Abnahme der Fläche der 1205Lu-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Logarithmus der Abnahme der Fläche der Sphäroide zwischen 2 und 4 Min (n=3, SEM).

Als Nächstes wurde die Abhängigkeit der Dissoziation zu dem ZO-1-Level untersucht. Die Dissoziation zwischen 0 und 1 Minute wurde nicht vom ZO-1-Gehalt beeinflusst (siehe Abb. 4.65, Abb. 4.66 und Tabelle 4.18).

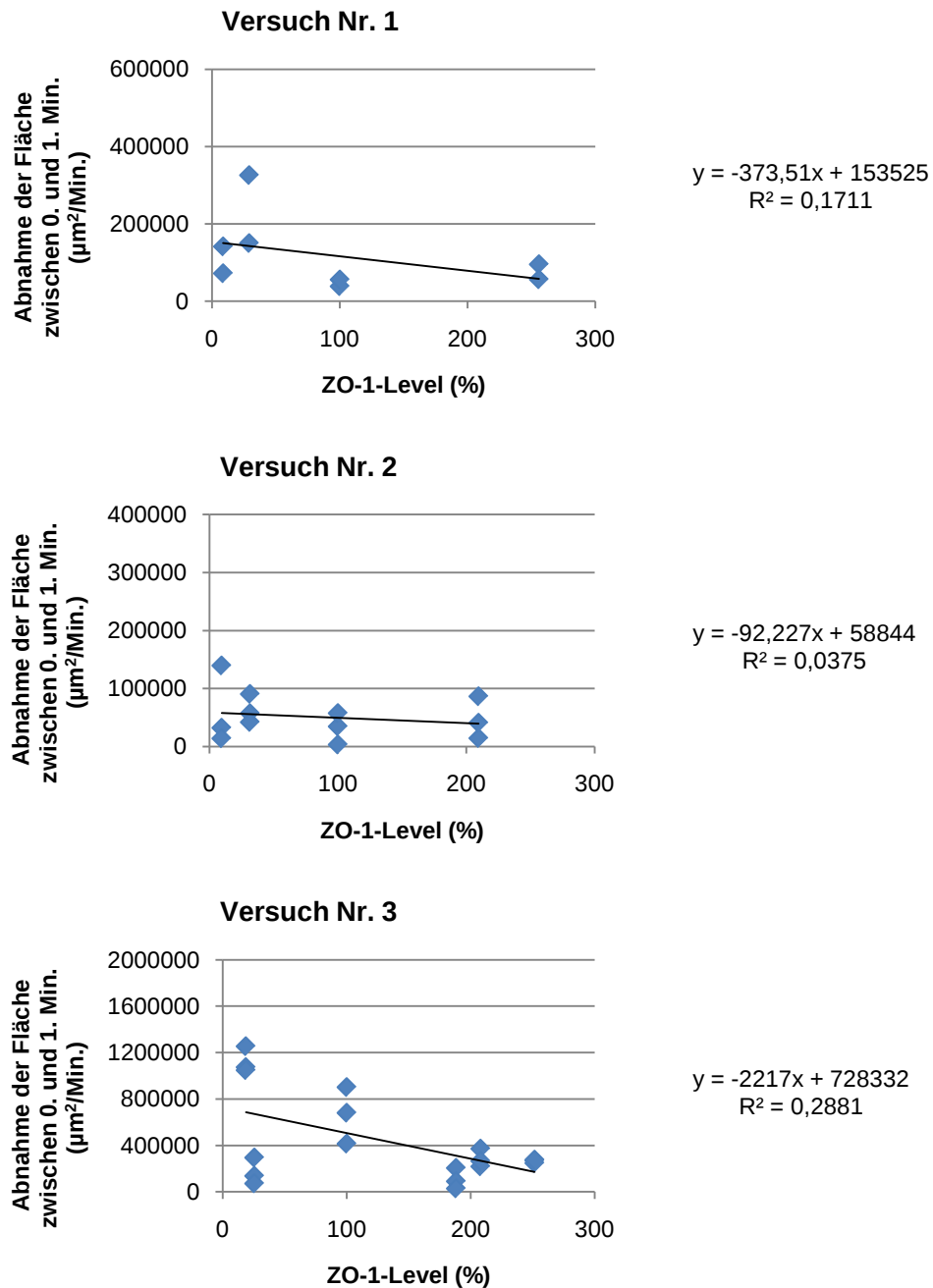


Abb. 4.65: Korrelation des ZO-1-Levels der ^{125}Lu -Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

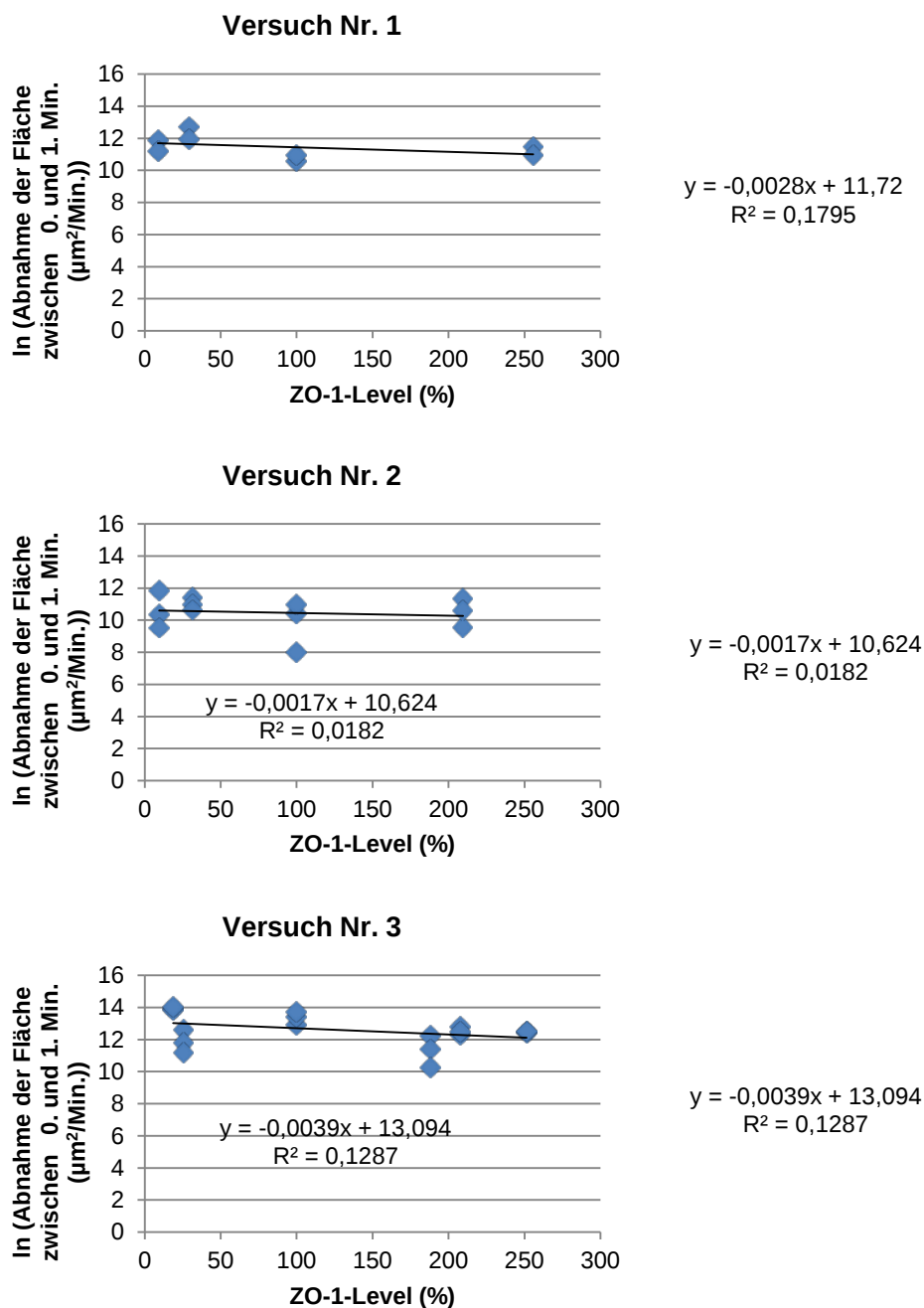


Abb. 4.66: Korrelation des ZO-1-Levels von ^{125}Lu -Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,175$) beeinflusst.

Tabelle 4.18: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der ^{125}Lu -Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,175	0,0027	0,0019

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse im Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant.

Zwischen dem 1. und 2. Minute war die Abnahme der Fläche auch nicht vom ZO-1-Gehalt bestimmt (siehe Abb. 4.67, Abb. 4.68 und Tabelle 4.19).

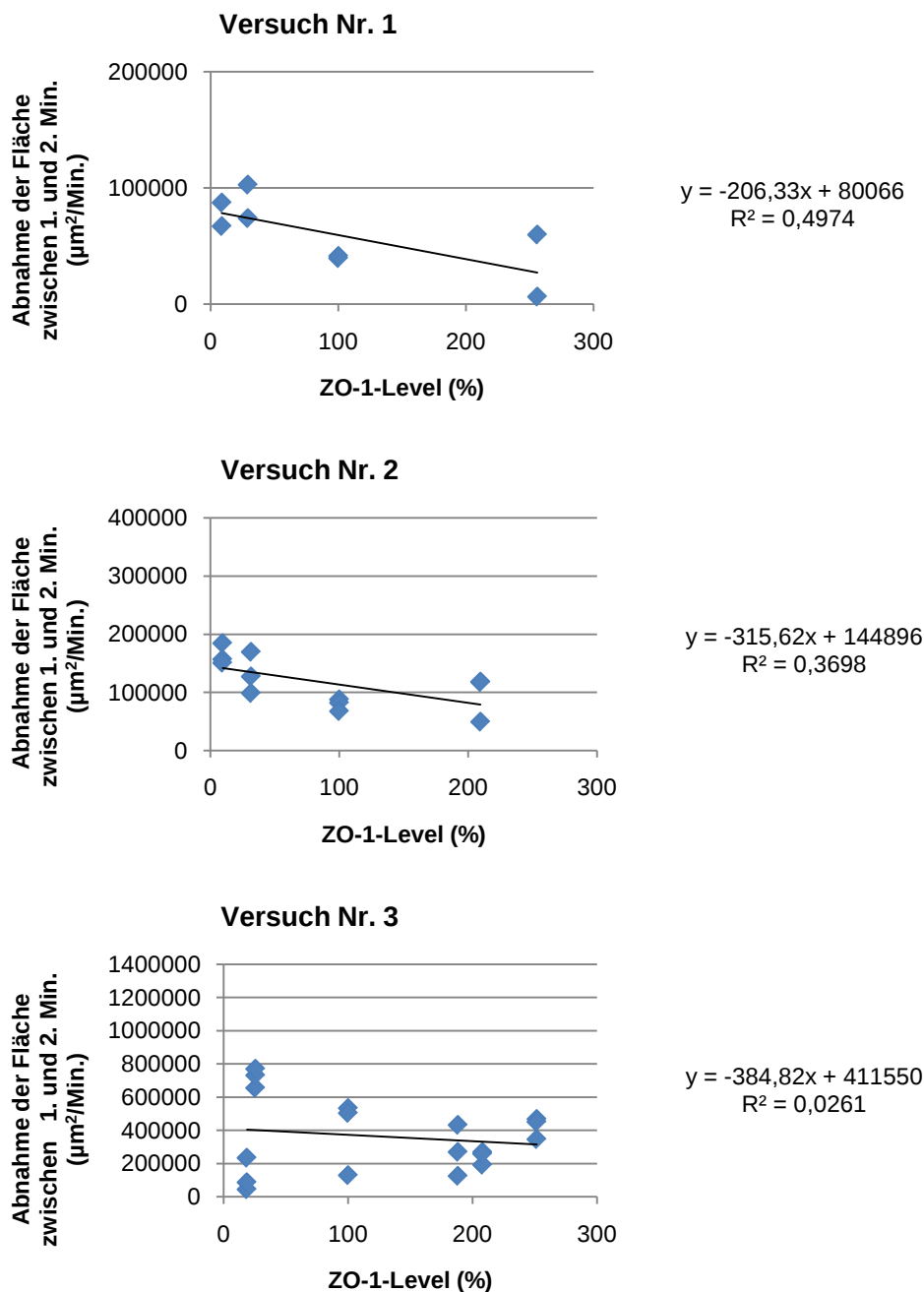


Abb. 4.67: Korrelation des ZO-1-Levels der ^{125}Lu -Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

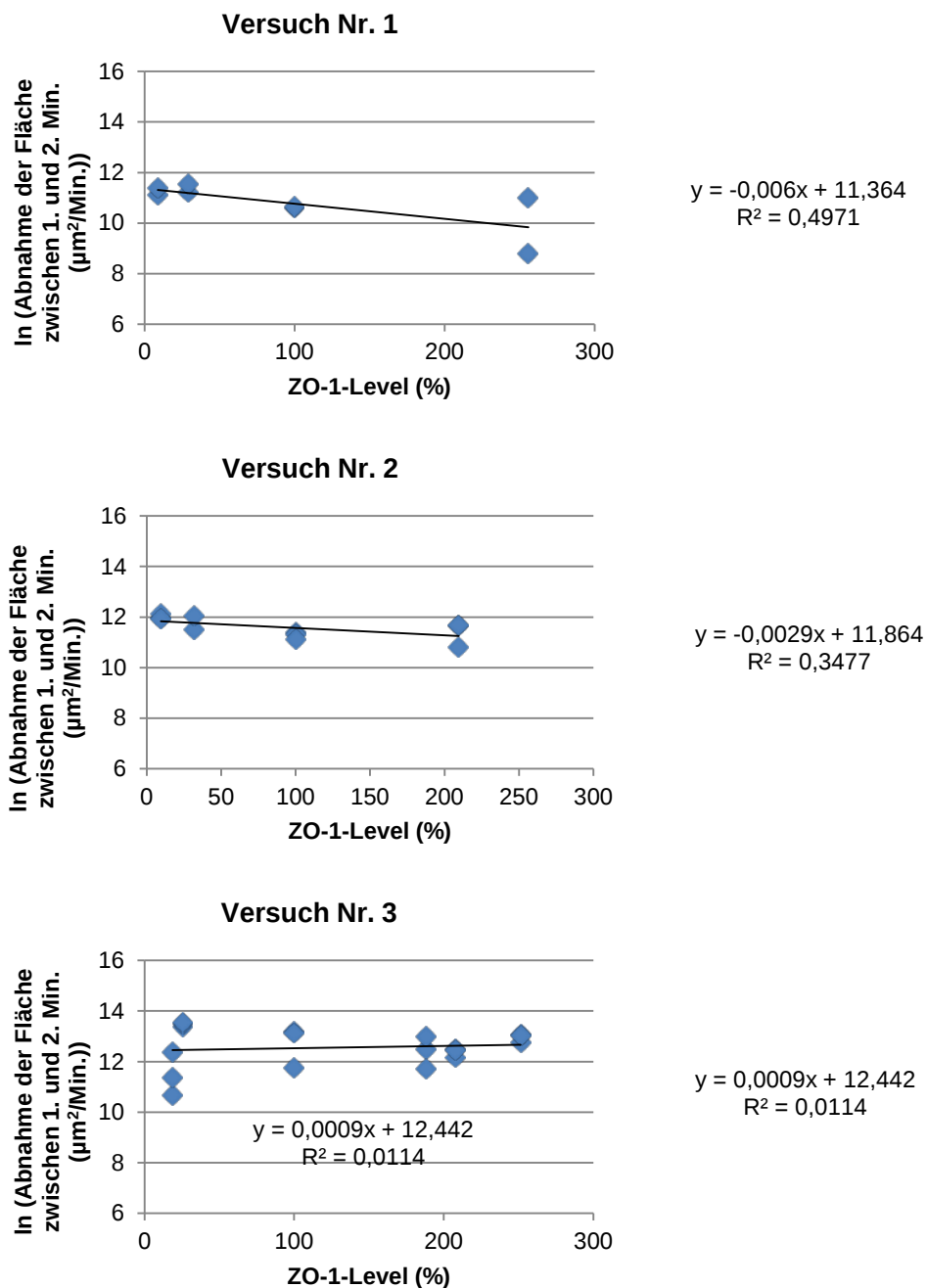


Abb. 4.68: Korrelation des ZO-1-Levels von ^{125}Lu -Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,185$) beeinflusst.

Tabelle 4.19: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der ^{125}Lu -Dissoziation zwischen 1 und 2 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,185	-0,0017	0,0013

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse im Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

In den weiteren zwei Minuten (2-4 Min.) war die Dissoziation ebenfalls unabhängig von der ZO-1-Expression (siehe Abb. 4.69, Abb 4.70 und Tabelle 4.20).

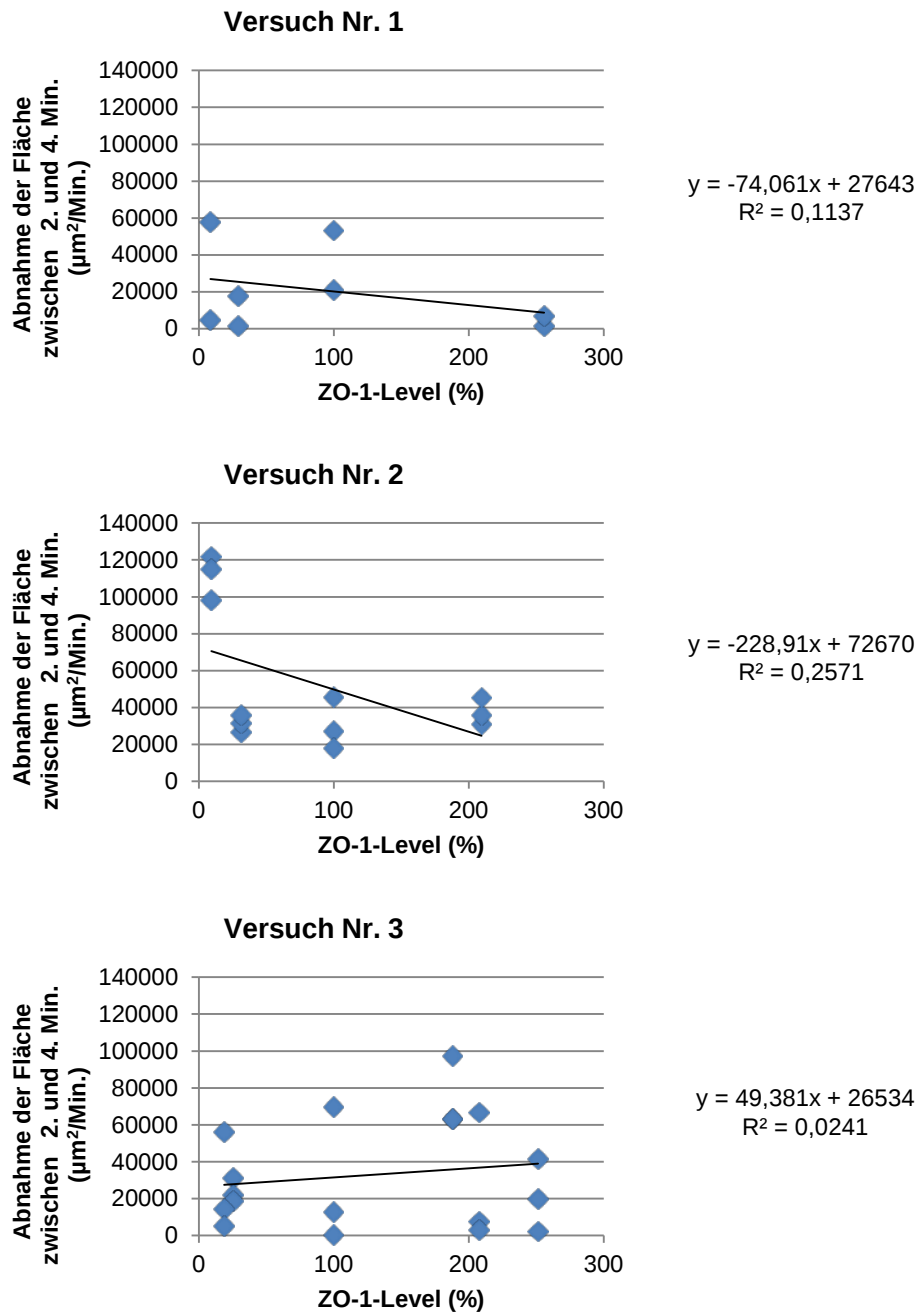


Abb. 4.69: Korrelation des ZO-1-Levels der ^{125}Lu -Sphäroide und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

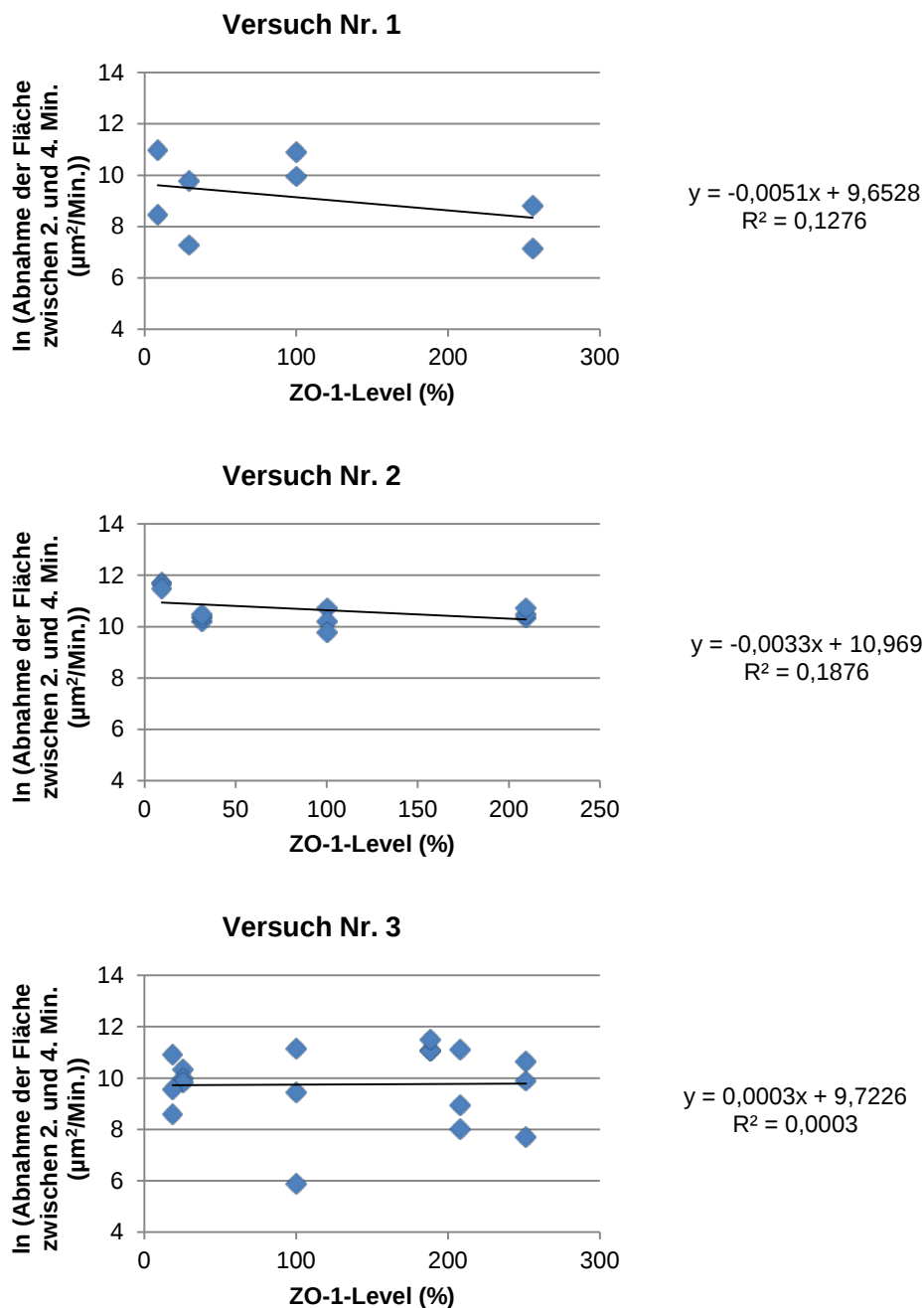


Abb. 4.70: Korrelation des ZO-1-Levels von 1205Lu-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,373$) beeinflusst.

Tabelle 4.20: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 2 und 4 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,373	-0,0021	0,0024

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse in Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

Bei der Dissoziation könnte aber die Ursprungsgröße eines Sphäroids eine Rolle spielen. Die Abbildung 4.71 zeigt die Ursprungsgrößen der Sphäroiden und ihre Flächen-Abnahme zwischen 0-1. Min. Die logarithmierten Werte werden in der nächsten Abb. 4.72 dargestellt. Aus der statistischen Analyse wurde herausgefunden, dass die Abnahme der ^{125}I -Sphäroidsfläche zwischen 0 und 1 Minuten von der Ursprungsgesamtfläche abhängig war ($p=0,0003$, siehe Tabelle 4.21). Wenn ein Sphäroid $100000 \mu\text{m}^2$ größer ist, nimmt die Fläche bei der Dissoziation 37 % schneller ab.

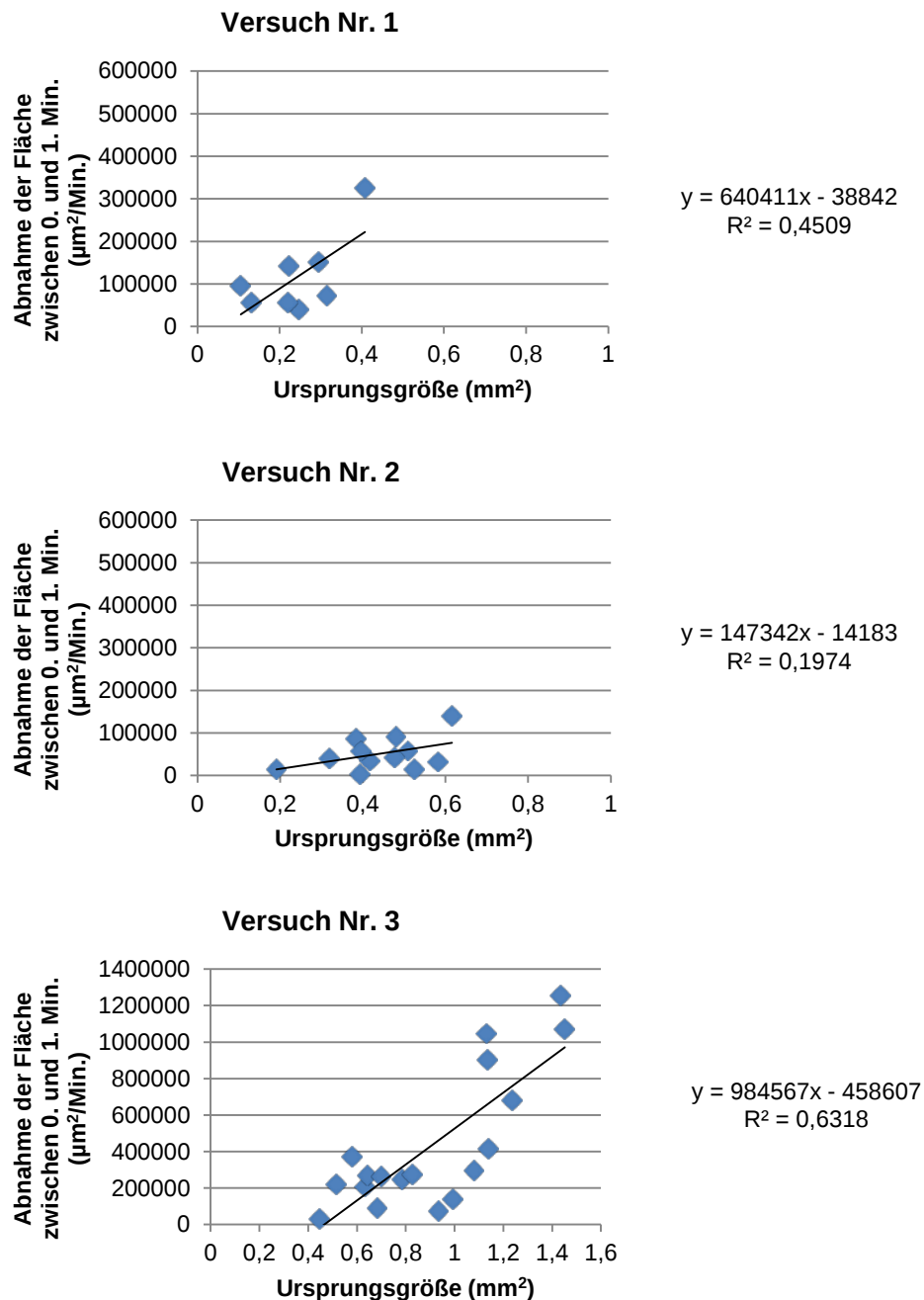


Abb. 4.71: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der ^{125}I -Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 0-1. Min. (Versuch 1 bis 3).

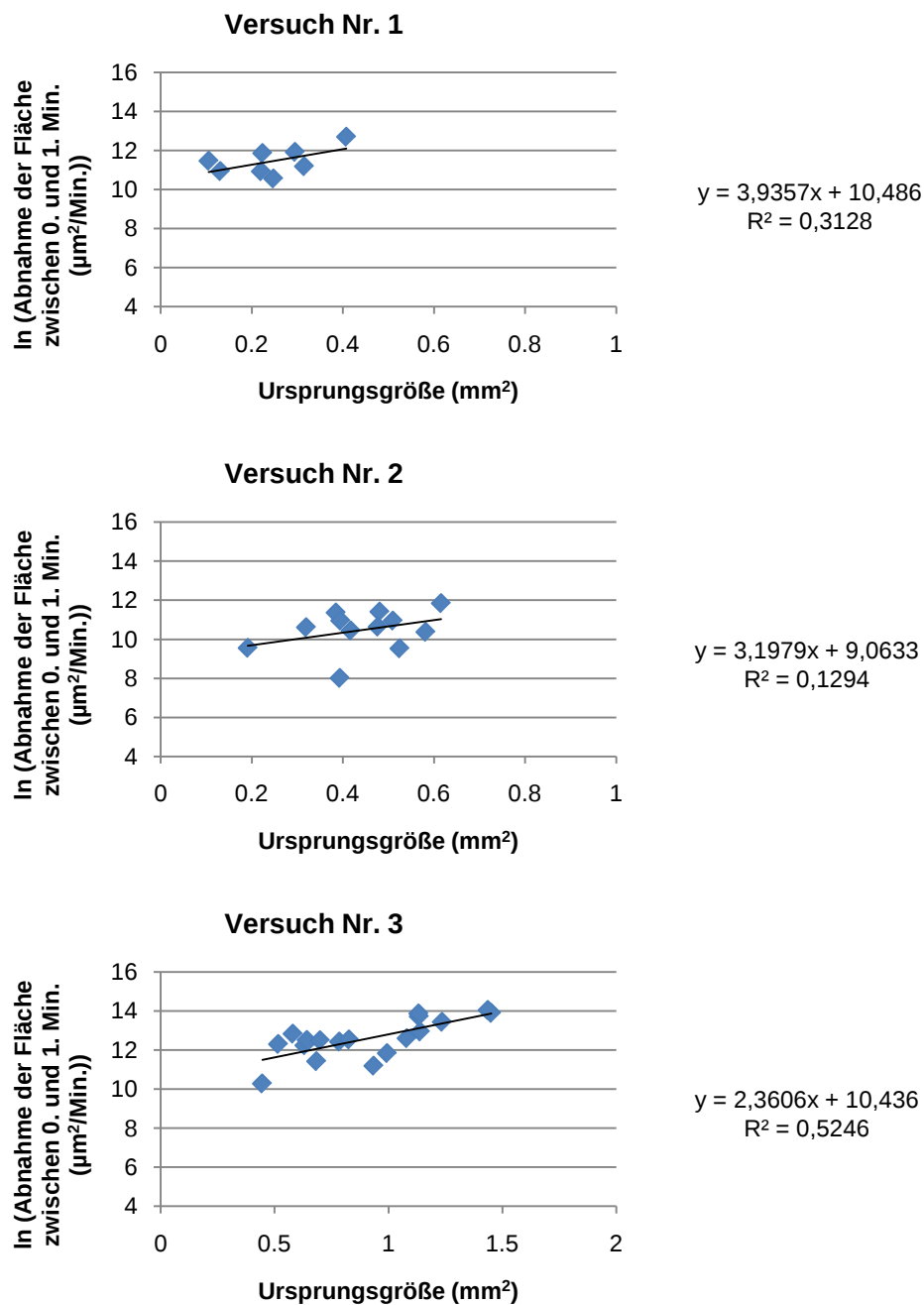


Abb. 4.72: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1. Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p=0,0003$).

Tabelle 4.21: Test der Korrelation zwischen der Ursprungsgröße und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
Ursprungsgröße (mm ²)	0,0003	3,1546	0,7351

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse im Logarithmus naturalis umgewandelt. Wenn die Ursprungsgröße 100000 µm² größer ist, nimmt die Dissoziation um 37% zu (n=3).

Außerdem wurde die Abhängigkeit der Dissoziation zwischen 1-2. Min zu der Ursprungsgröße untersucht (siehe Abb. 4.73 und 4.74). In den Versuch 1 und 2 gibt es zwar eine positive Korrelation zwischen der Ursprungsgröße und der Flächen-Abnahme. Der Versuch 3 zeigt aber keine Korrelation. Insgesamt war die Korrelation statistisch nicht signifikant ($p=0,377$).

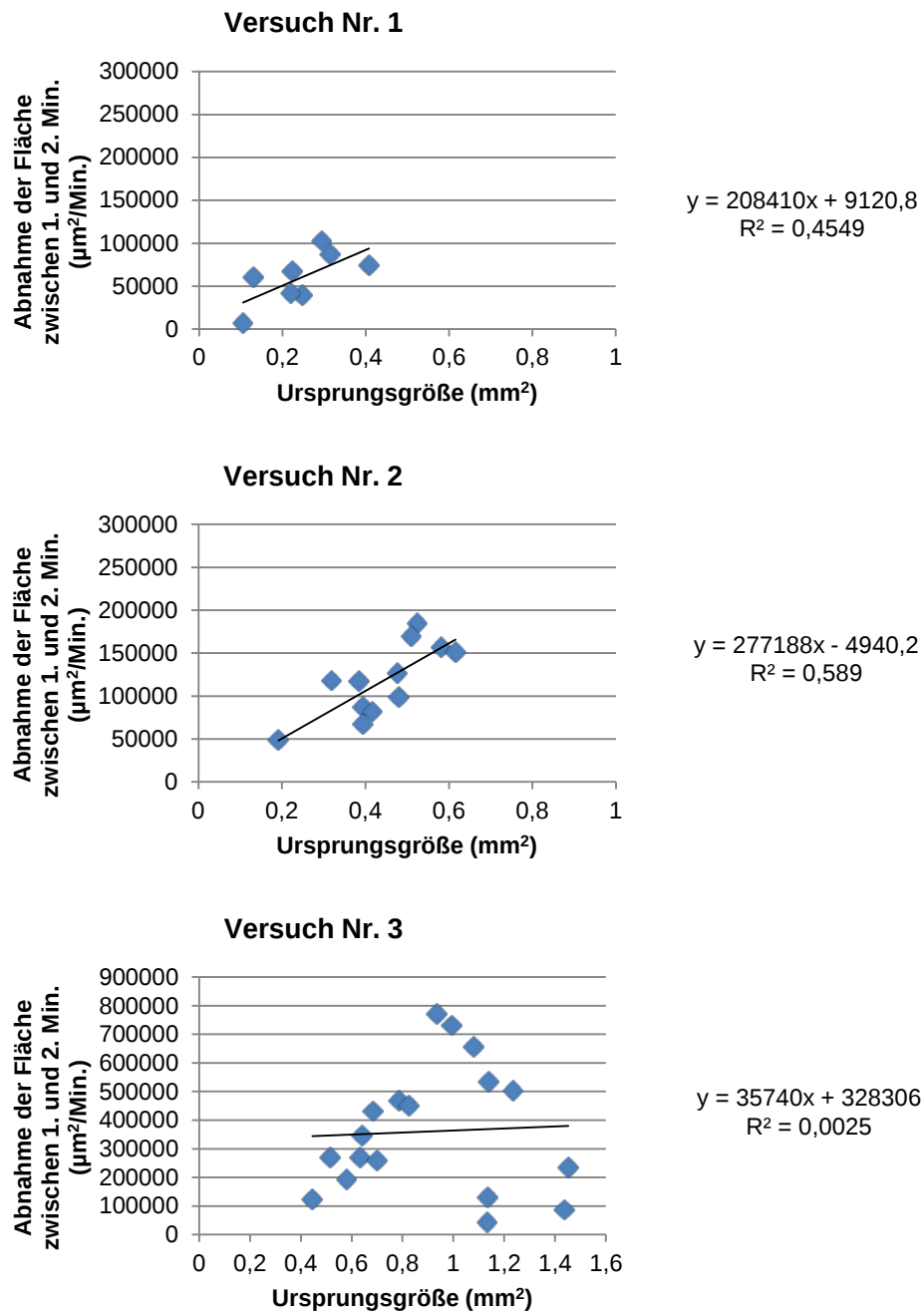


Abb. 4.73: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der ^{125}Lu -Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 1-2. Min. (Versuch 1 bis 3).

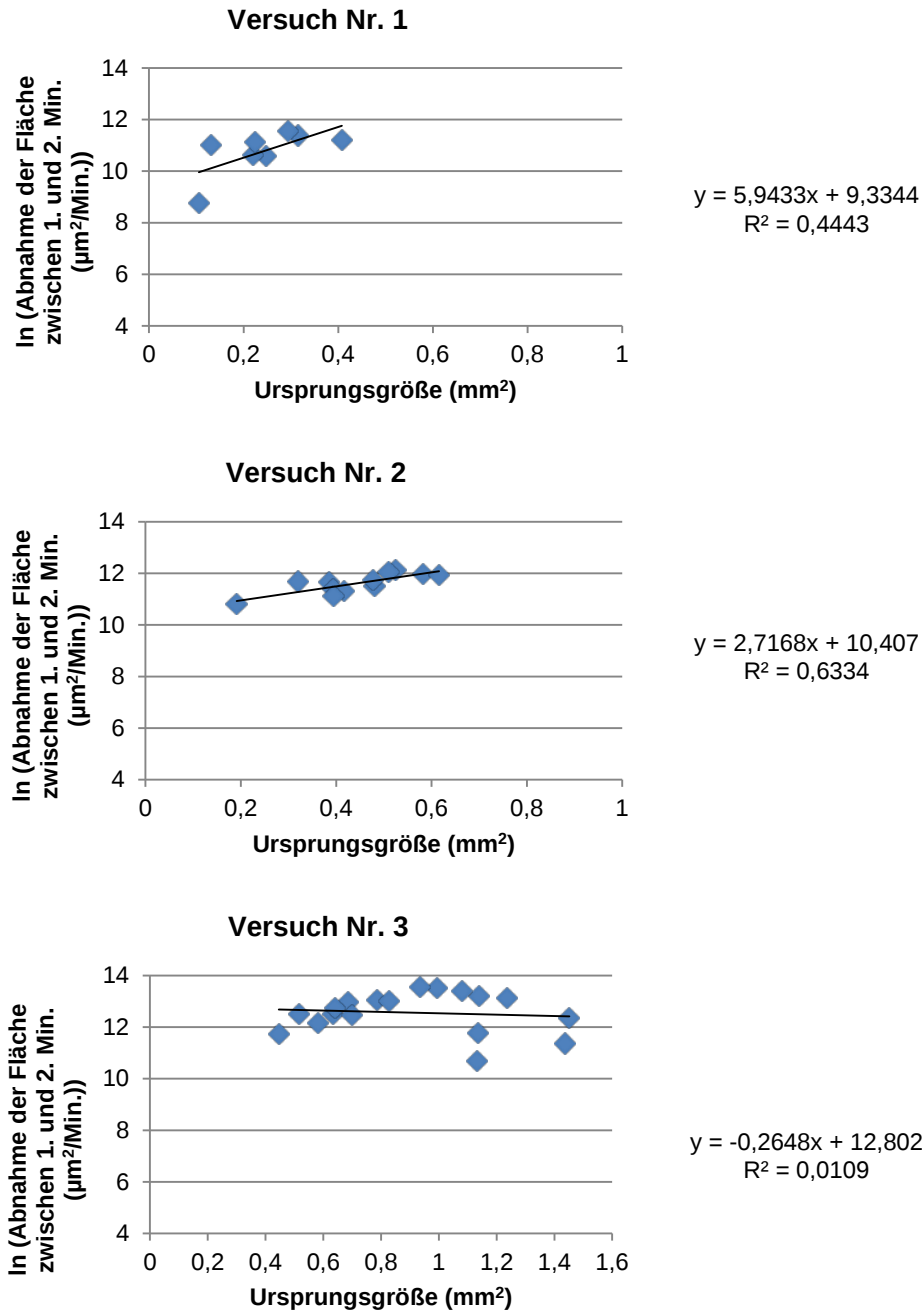


Abb. 4.74: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der ^{125}I -Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2. Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p=0,377$).

In dem Zeitrahmen zwischen 2. und 4. Min war die Dissoziation von ^{125}I -Sphäroiden unabhängig von der Ursprungsgröße (siehe Abb. 4.75 und Abb 4.76, $p=0,955$). Aus diesen Ergebnissen kann man den Rückschluss ziehen, dass das ZO-1-Protein keine Rolle bei der Dissoziation von ^{125}I -Zellen spielt. Wie diese Sphäroide sich in der ersten Minute dissoziieren, wurde aber von der Ursprungsgröße des Sphäroids bestimmt.

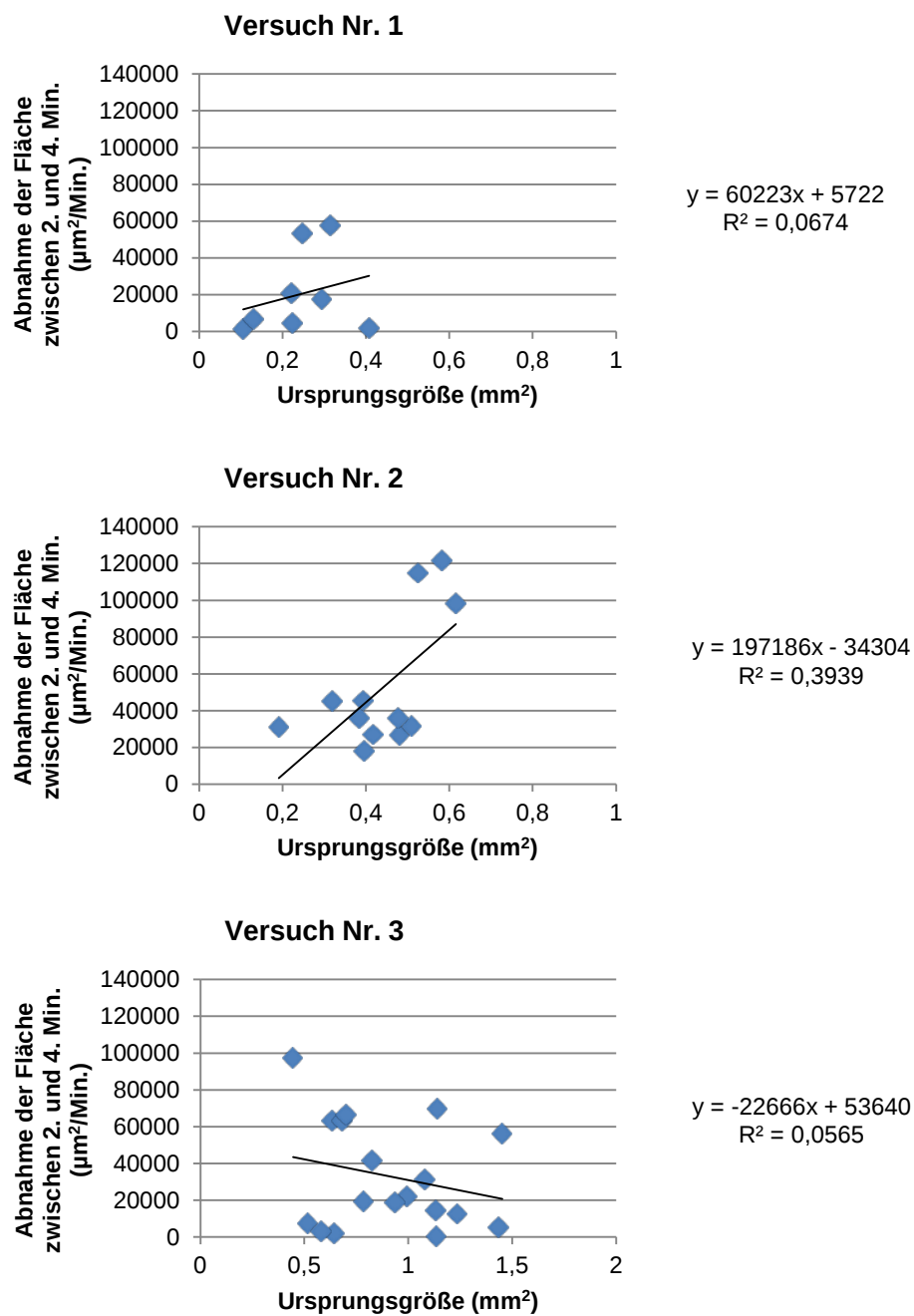


Abb. 4.75: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der ^{125}Lu -Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 2-4 Min. (Versuch 1 bis 3).

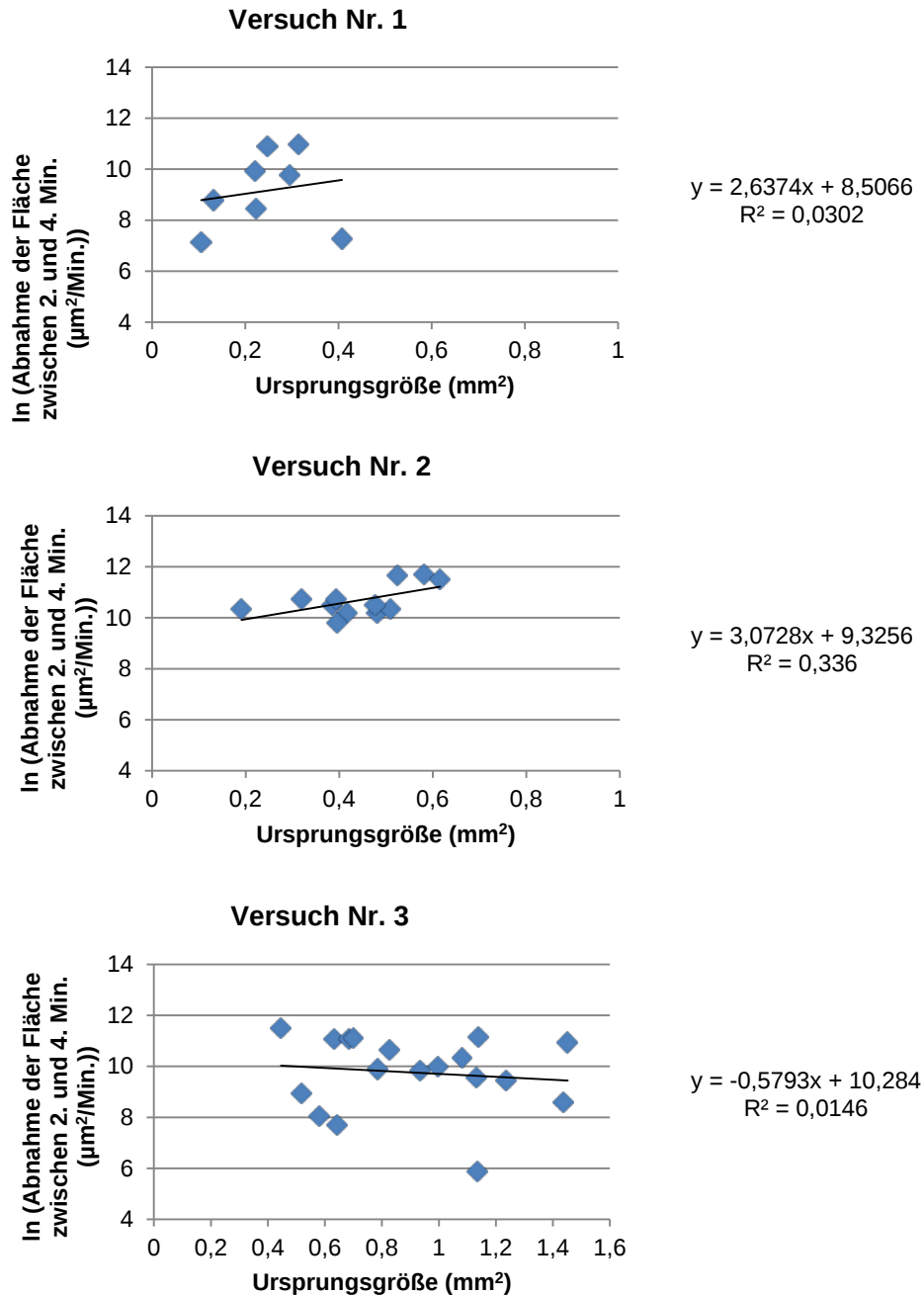


Abb. 4.76: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der ^{125}I -Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p=0,955$).

4.6.2 Dissoziation von WM35-Sphäroiden

Das Degradieren der Zell-Zell-Verbindung in Melanom-Sphäroiden wurde mit einer weiteren Zell-Linie, WM35, untersucht. Hier wurden wie bei den anderen Versuchen 2 Kontroll-Präparate und zwei Knockdown-Präparate für die Versuche genutzt. Die Sphäroide waren nach der dissoziierenden Behandlung kleiner geworden. Die Bilder von einigen Sphäroiden bei einem Versuch werden exemplarisch in der Abb. 4.77 gezeigt

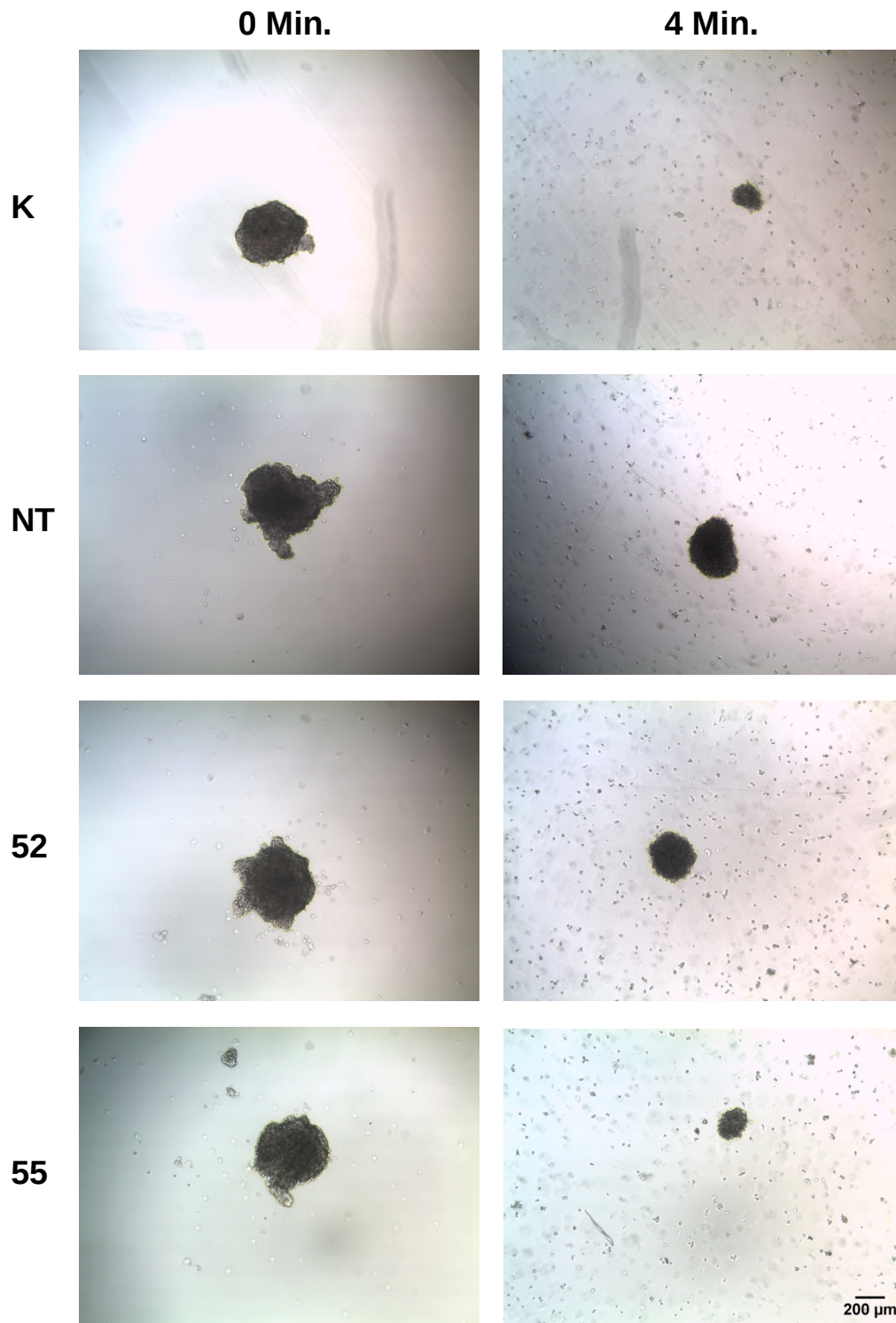
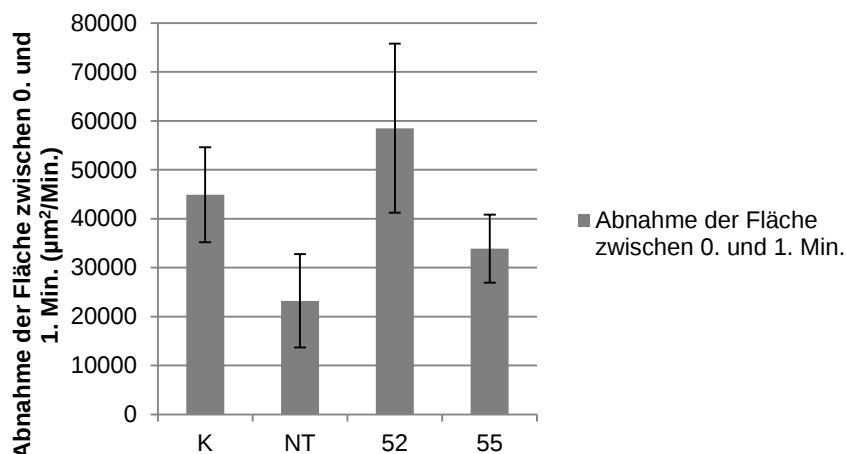


Abb. 4.77: Beispiel der Dissoziation von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 4 Min. K: Wild-Typ-Kontrolle, NT: Non-Target-Kontrolle, 52 und 55: Knockdown-Zellen. Relative ZO-1-Proteinlevel: K=130%, NT=100%, 52=16%, 55=76%. Skalierungslinie: 200 µm

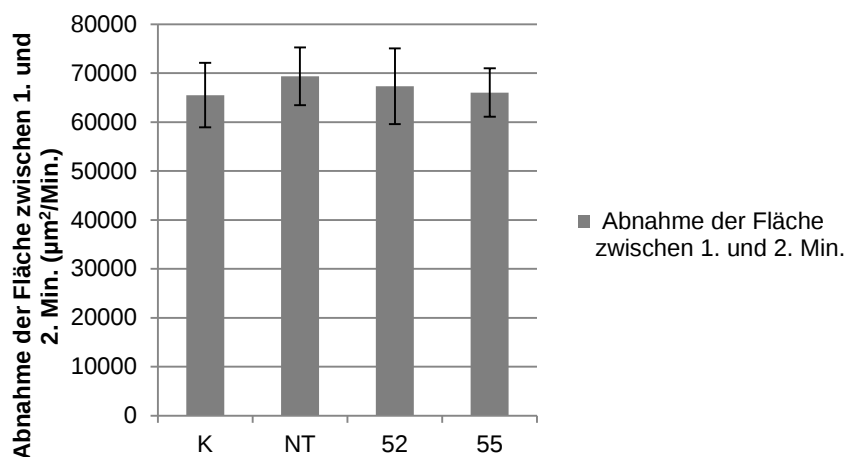
Die Zellpräparate unterschieden sich nur in der Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min (siehe Abb. 4.78). Die ZO-1-Expression dieser Zellpräparate ist in der Abb 4.79 dargestellt. Unterschiede der Expression existierten, aber ein signifikanter Unterschied wurde nur zwischen der Wildtyp-Kontrolle und den Knockdown-Zellen gefunden. Diese Kontrolle hatte

ein höheres ZO-1-Level als die beiden Knock-down-Zellpräparate (siehe Abb. 4.79). Die Abnahme der Flächen war nicht normal verteilt. Deshalb wurden diese Werte in den Logarithmus Naturalis umgewandelt (siehe Abb. 4.80). Tatsächlich sind die Unterschiede zwischen den Zellpräparaten im Zeitrahmen 0-1 Min. statistisch signifikant. Die 52-Sphäroide und die Wild-Typ-Sphäroide dissoziierten sich signifikant schneller als die NT-Sphäroiden (siehe Abb. 4.80).

A Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden
zwischen 0. und 1. Min.



B Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden
zwischen 1. und 2. Min.



C Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden
zwischen 2. und 4. Min.

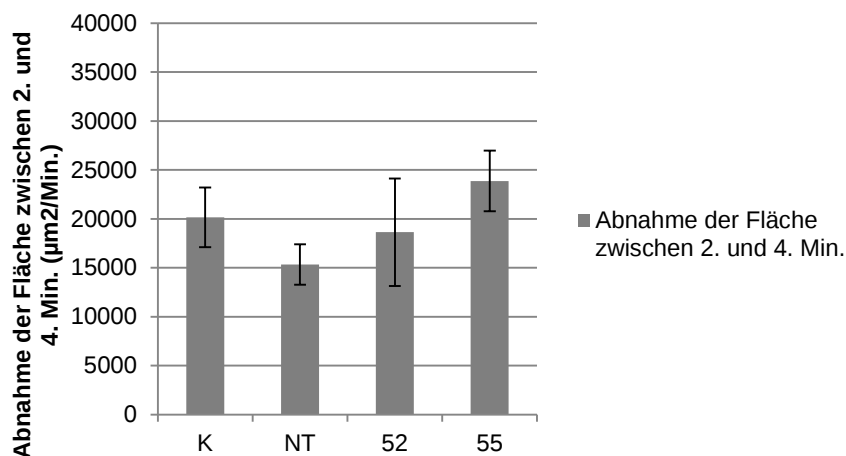


Abb. 4.78: A. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 0 und 1 Min., B. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 2 und 4 Min. (n=3 , SEM).

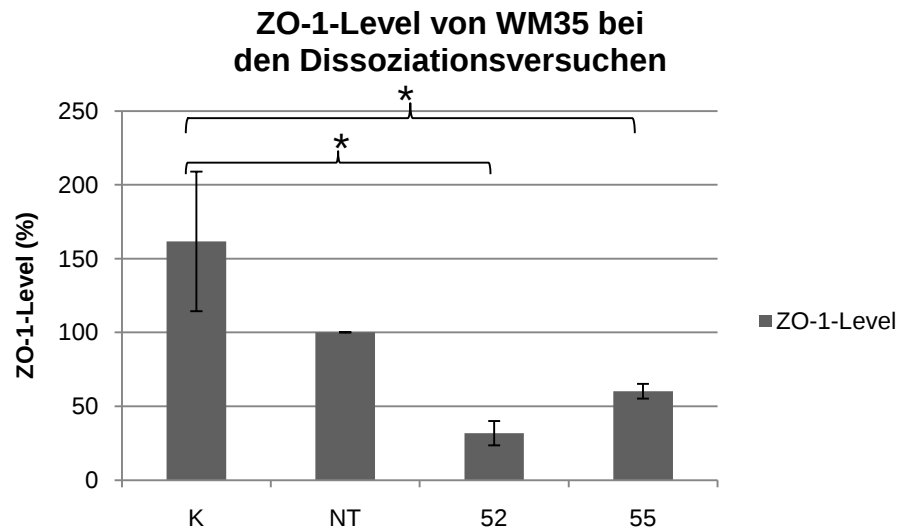


Abb. 4.79: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Dissoziations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=3, SEM, *:p<0,05).

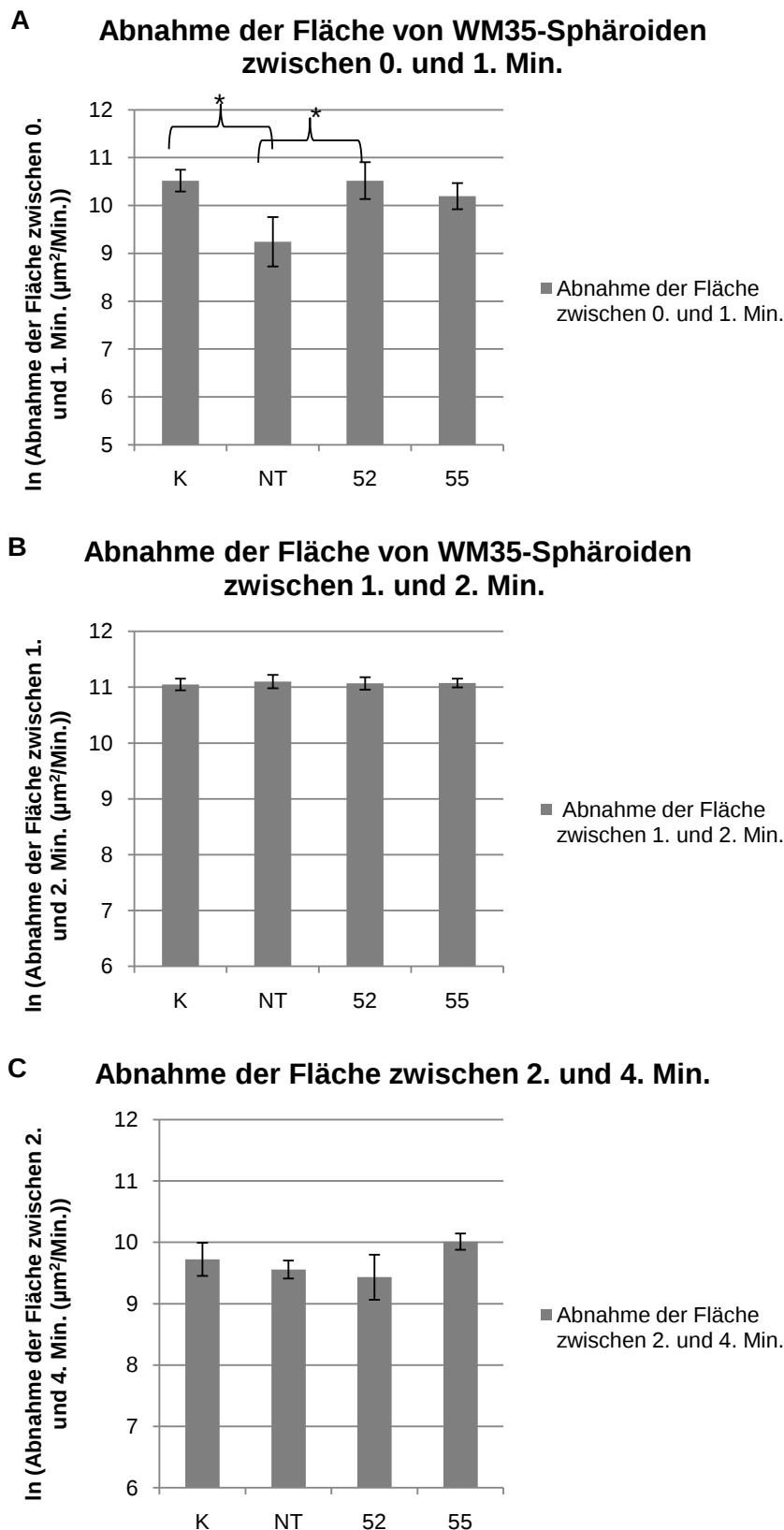


Abb. 4.80: A. Logarithmierte Abnahme der Fläche der WM35-Zellpräparate zwischen 0 und 1 Min., B. Logarithmierte Abnahme der Fläche der WM35-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Logarithmierte Abnahme der Fläche der Sphäroide zwischen 2 und 4 Min. (n=3 , SEM, *:p<0,05).

Als Nächstes wurden die Abnahme der Fläche und die ZO-1-Werte in einem weiteren linearen gemischten Modell zusammengefügt und analysiert. Die Fläche-Abnahme zwischen 0 und 1 Minute wurde durch das ZO-1-Level nicht beeinflusst (vgl. Abb 4.81, Abb 4.82, und Tabelle 4.22).

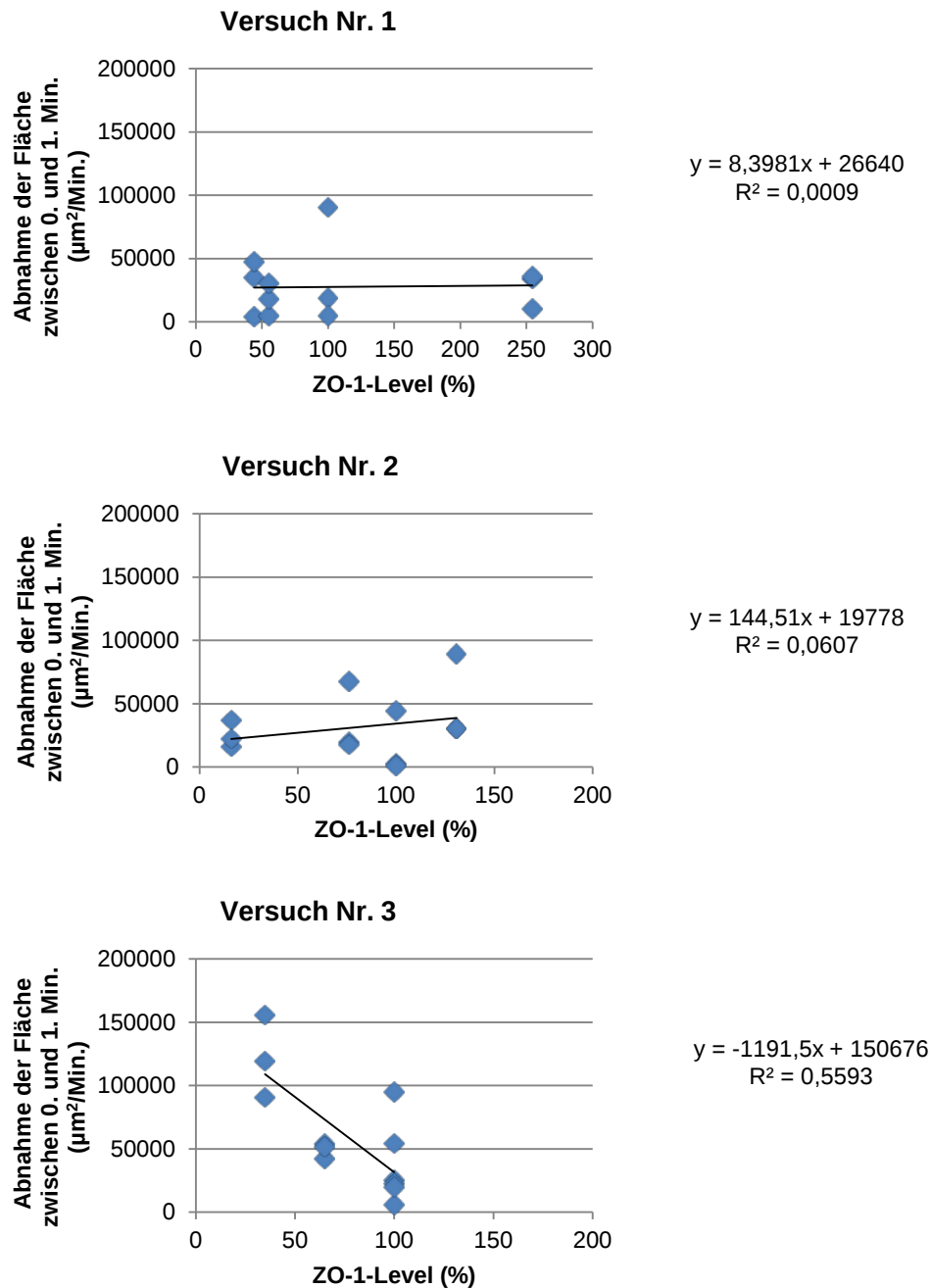


Abb. 4.81: Korrelation des ZO-1-Levels der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

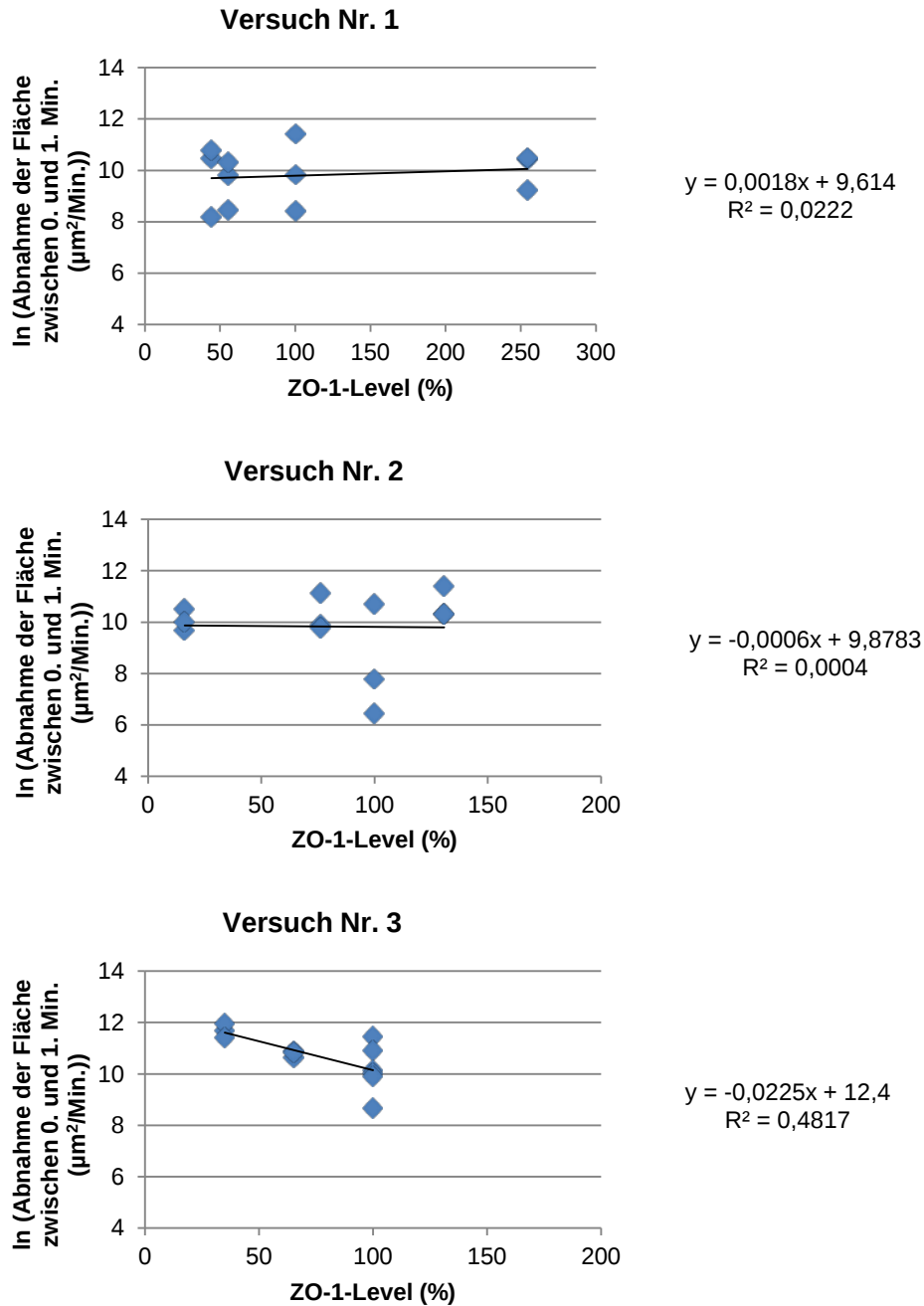


Abb. 4.82: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,740$) beeinflusst.

Tabelle 4.22: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,740	-0,0011	0,0033

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse im Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

Zwischen der ersten und der zweiten Minute wurde die Dissoziation der Sphäroide auch durch ZO-1-Gehalt nicht beeinflusst (siehe Abb. 4.83, Abb. 4.84, und Tabelle 4.23).

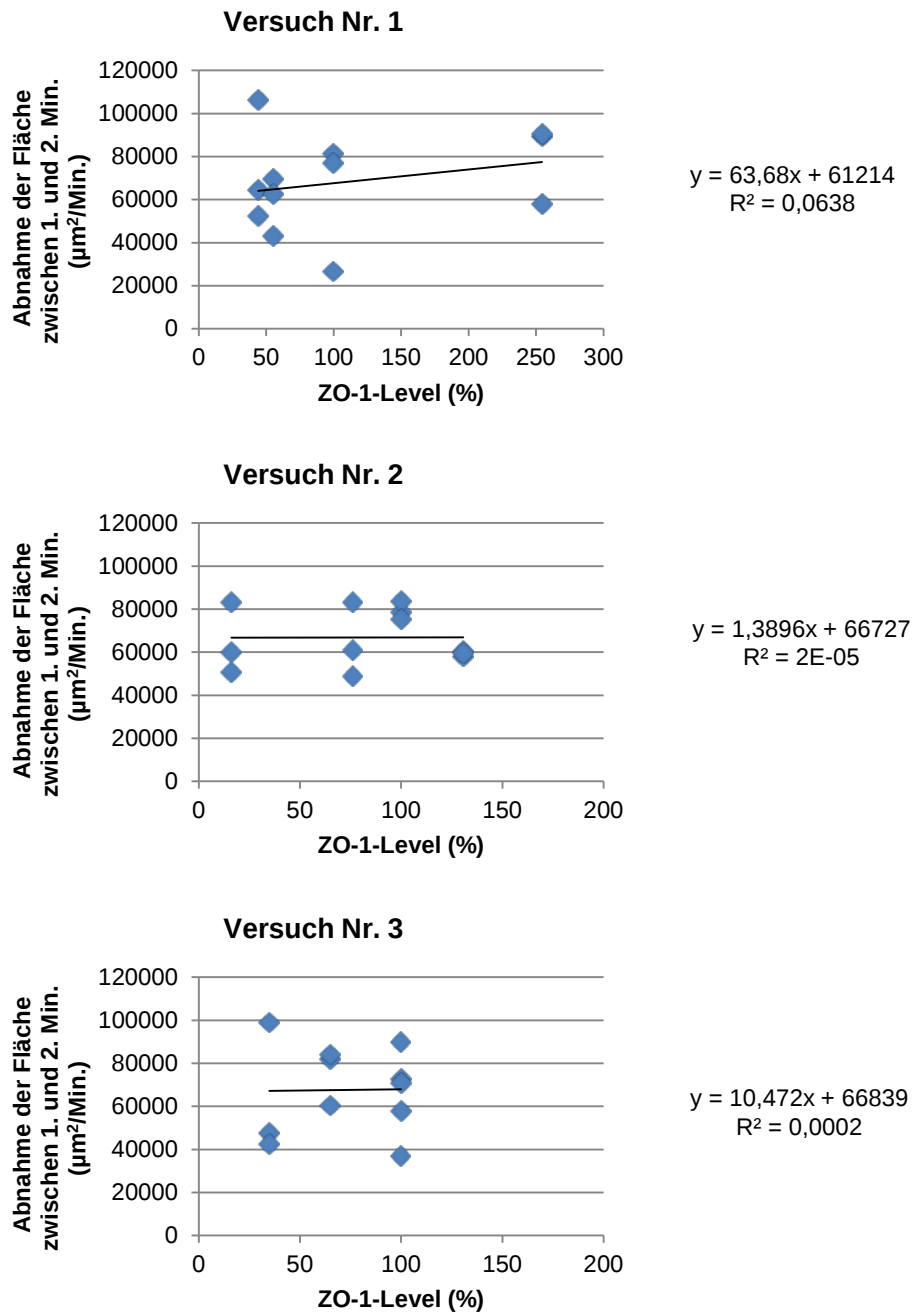


Abb. 4.83: Korrelation des ZO-1-Levels der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

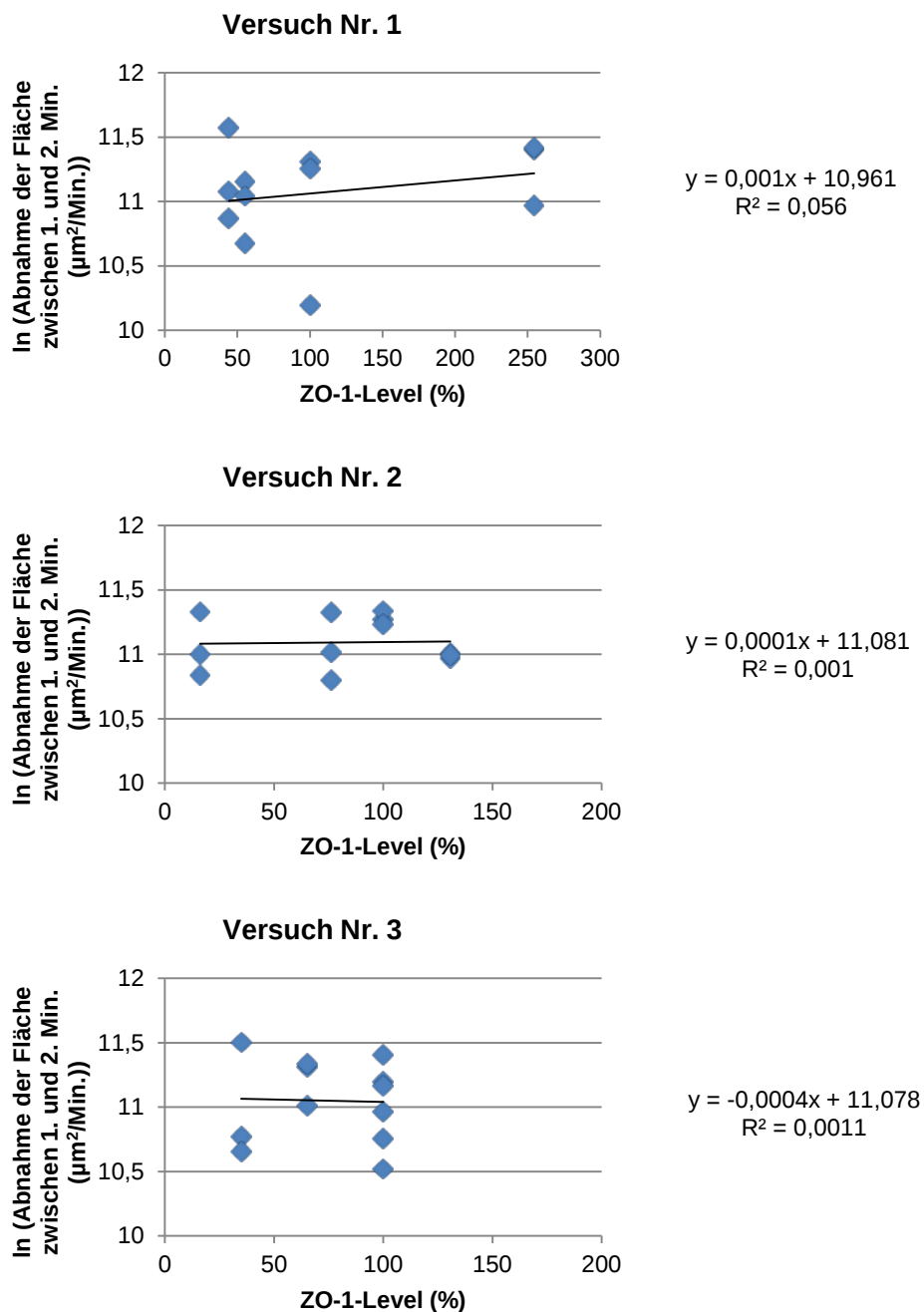


Abb. 4.84: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,410$) beeinflusst.

Tabelle 4.23: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 1 und 2 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,410	0,0007	0,0008

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse in den Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

Genau wie zwischen den ersten Zeitpunkten lösten sich die Sphäroide zwischen 2-4 Min. unabhängig vom ZO-1-Level (siehe Abb. 4.85, Abb. 4.86 und Tabelle. 4.24). Diese und die obengenannten Ergebnisse weisen nach, dass die Dissoziation der Sphäroide der beiden Melanom-Zell-Linien, 1205Lu und WM35 nicht mit der ZO-1-Expression korreliert.

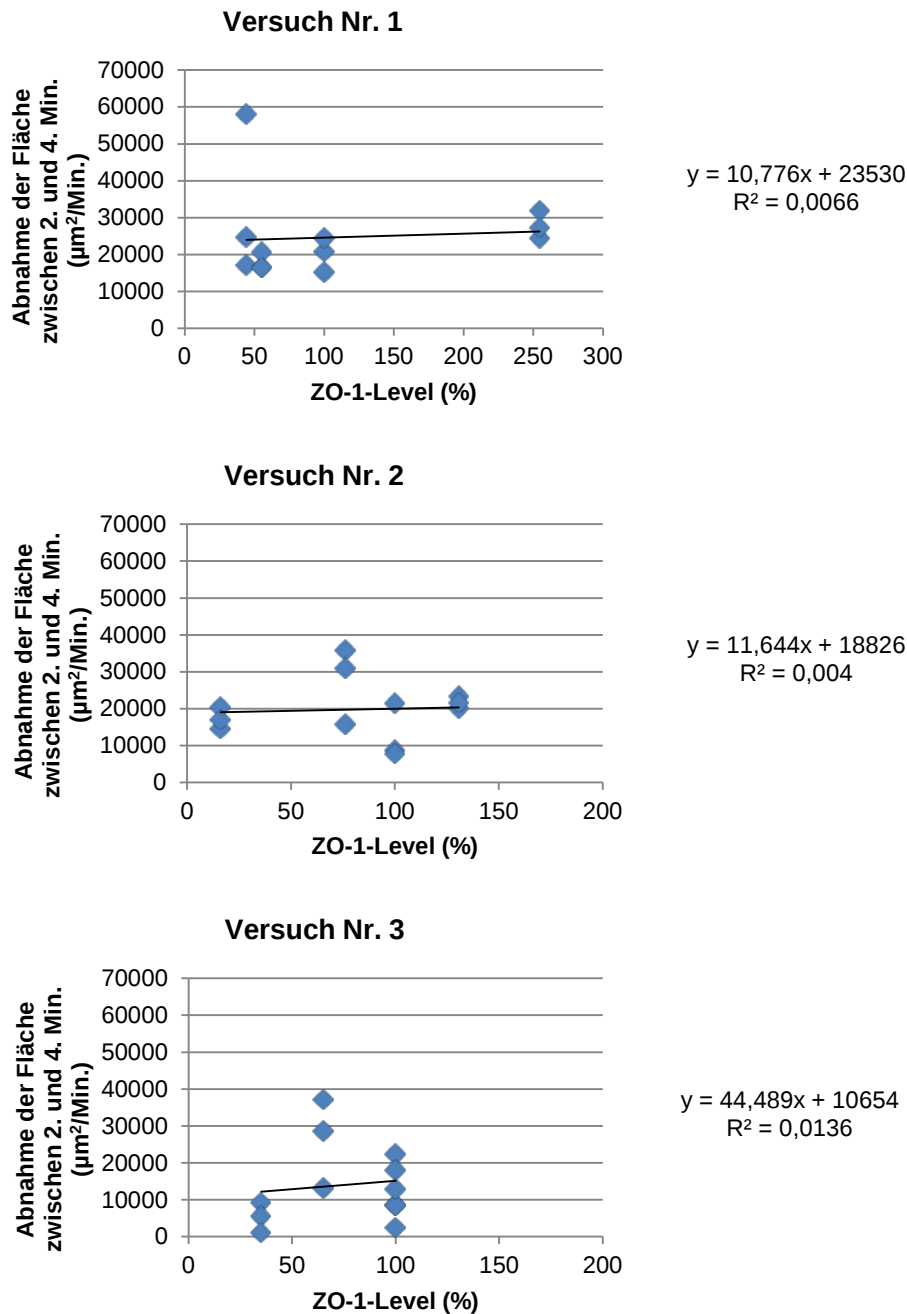


Abb. 4.85: Korrelation des ZO-1-Niveaus der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. bei den Dissoziations-Versuchen (Versuch 1 bis 3).

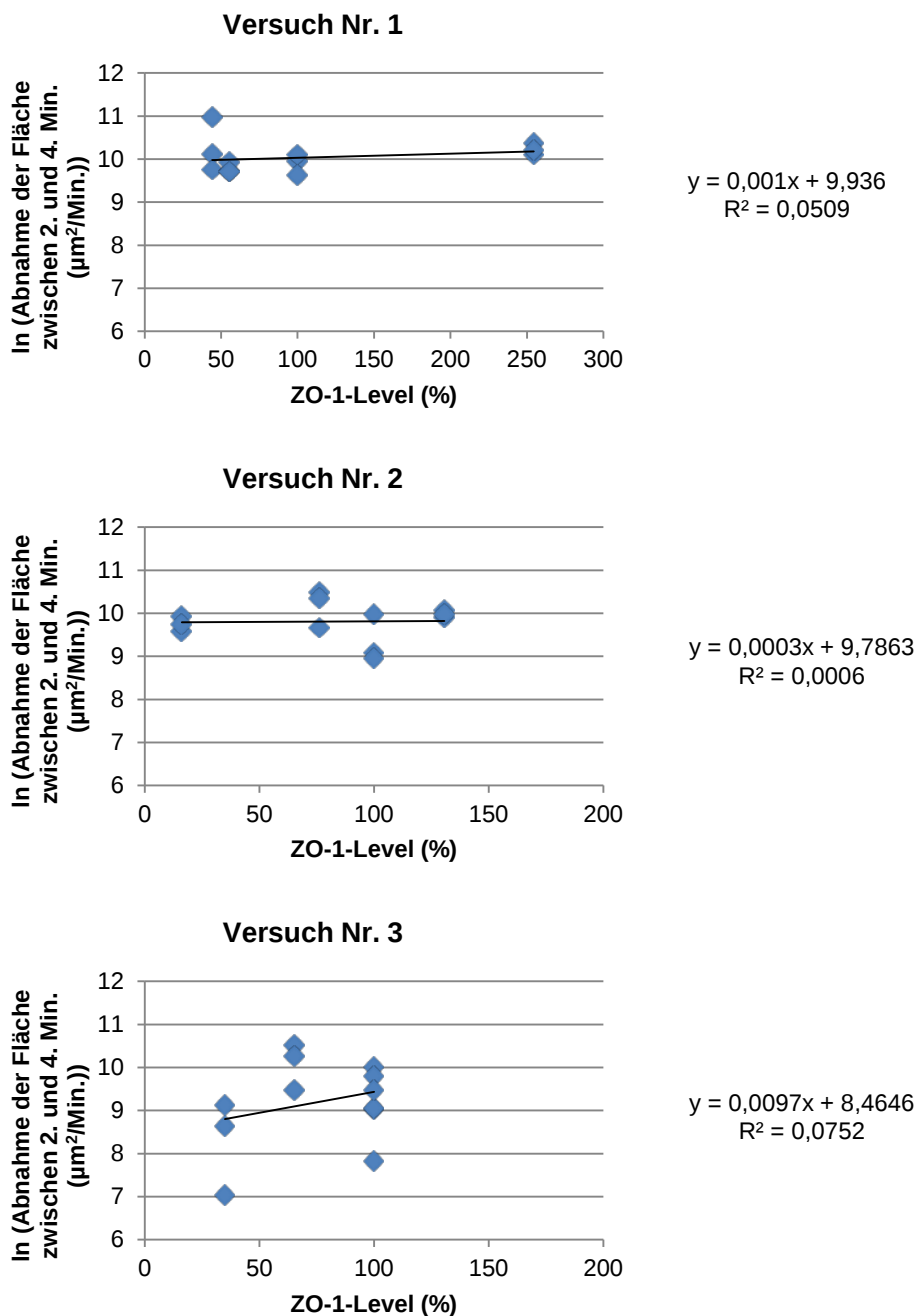


Abb. 4.86: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und dem natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,366$) beeinflusst.

Tabelle 4.24: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 2 und 4 Minuten

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,366	0,0018	0,0020

Die Abnahme der Fläche wurde für die Analyse im Logarithmus naturalis umgewandelt. Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

Des Weiteren wurde geprüft, ob die Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide auf die Auflösung der Zell-Zell-Verbindung wirkte. Die Abnahme der Sphäroidsgröße nach ein minutiger Dissoziation war nicht von der Ursprungsgröße abhängig (siehe Abb. 4.87 und Abb. 4.88, $p:0,728$). Dies war anders als bei den 1205Lu-Sphäroiden, wo ihre Abnahme in diesem Zeitraum von ihrer Ursprungsgröße abhängig war.

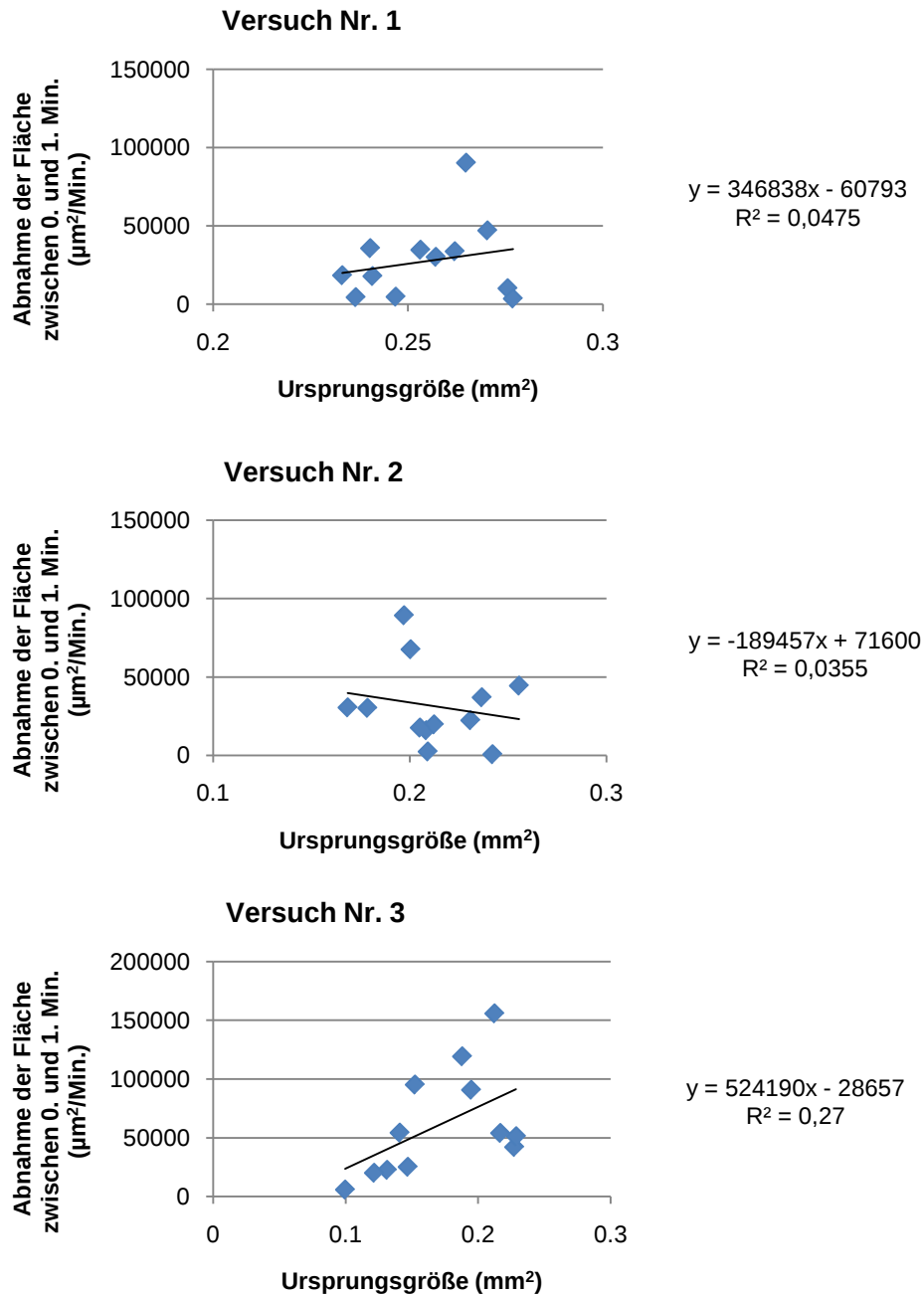


Abb. 4.87: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 0-1. Min. (Versuch 1 bis 3).

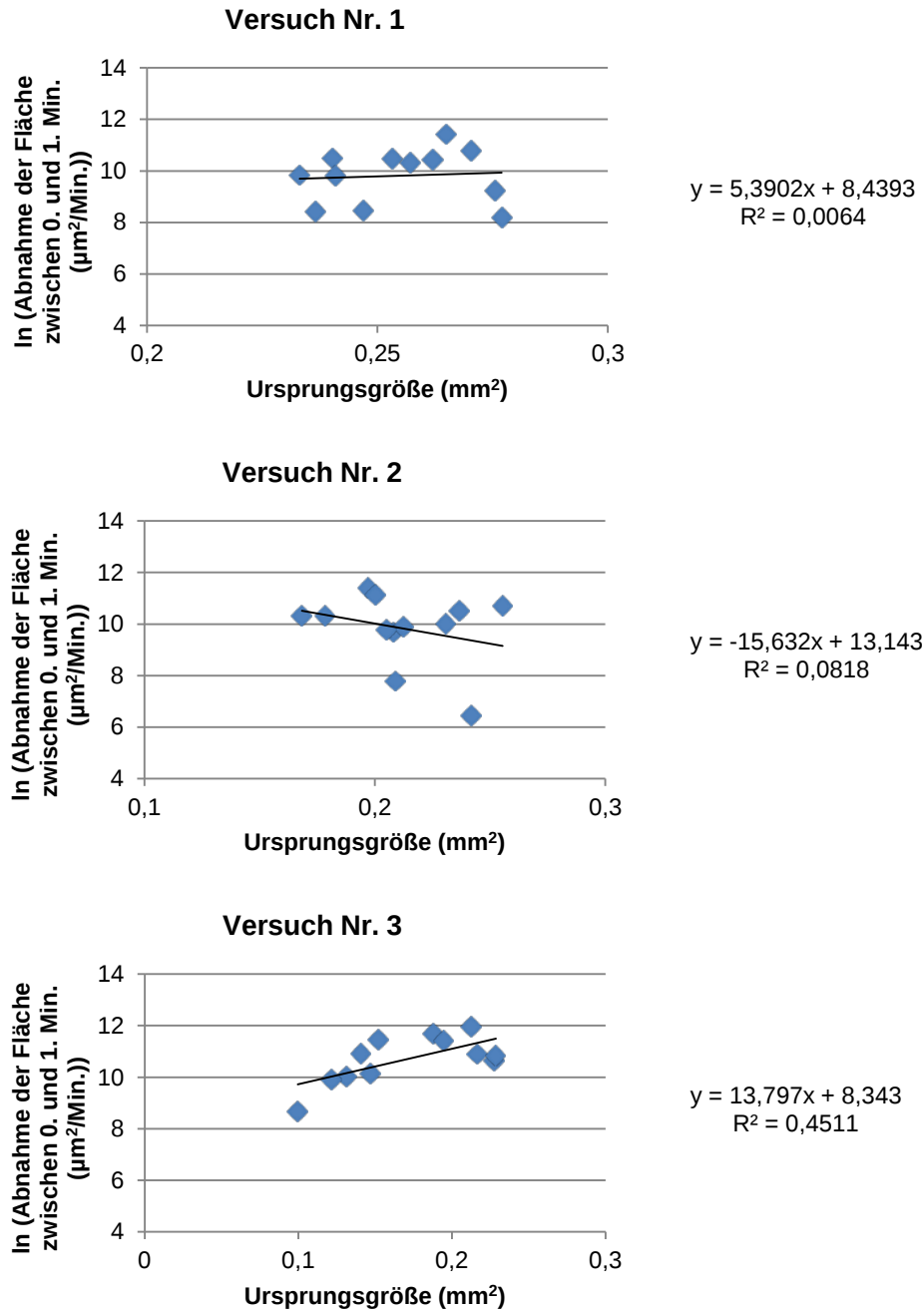


Abb. 4.88: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 0-1. Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p = 0,728$).

Die Dissoziation der Sphäroide zwischen 1-2. Minuten wurde auch nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst (siehe Abb. 4.89 und Abb. 4.90, $p = 0,386$).

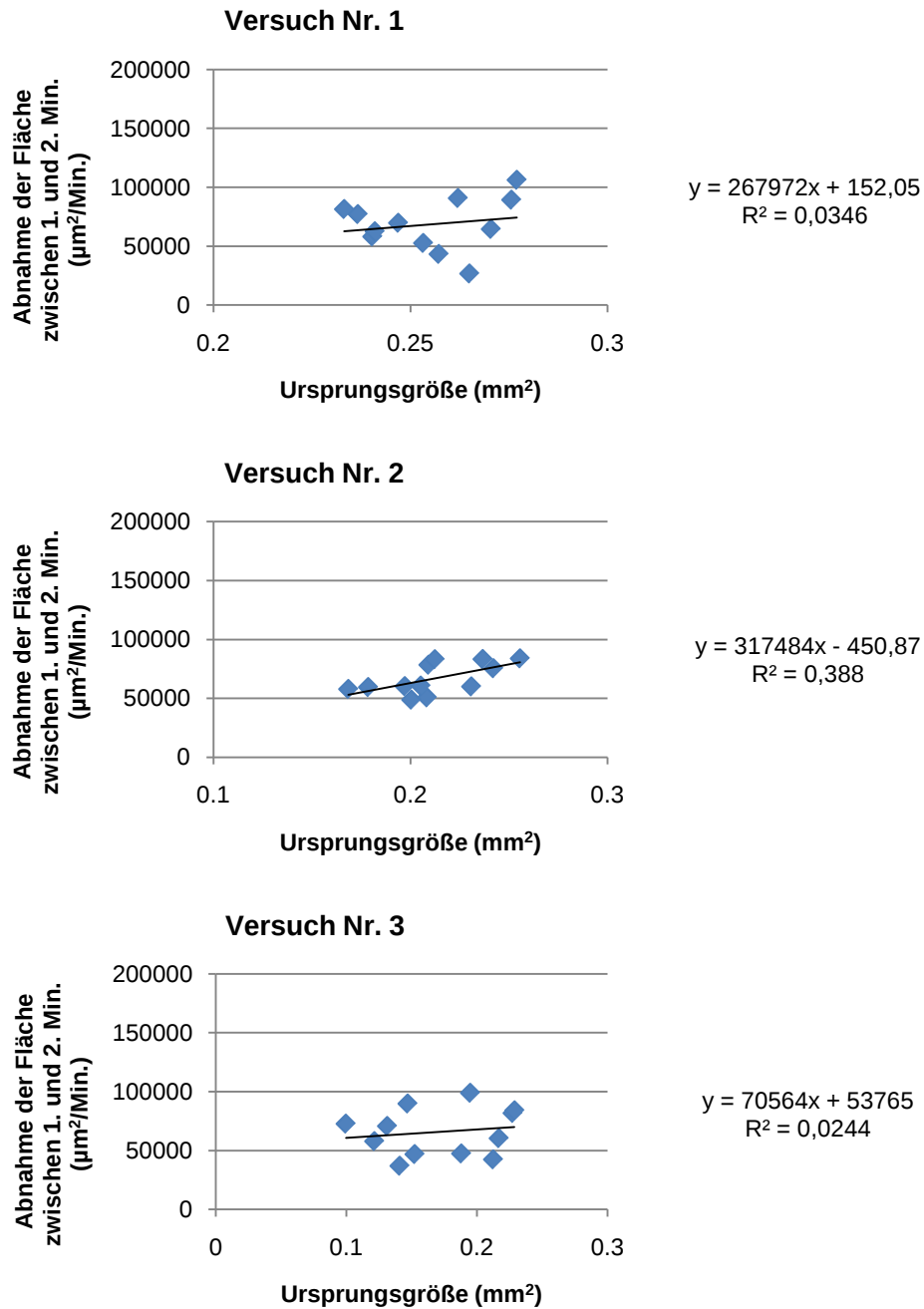


Abb. 4.89: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 1-2 Min. (Versuch 1 bis 3).

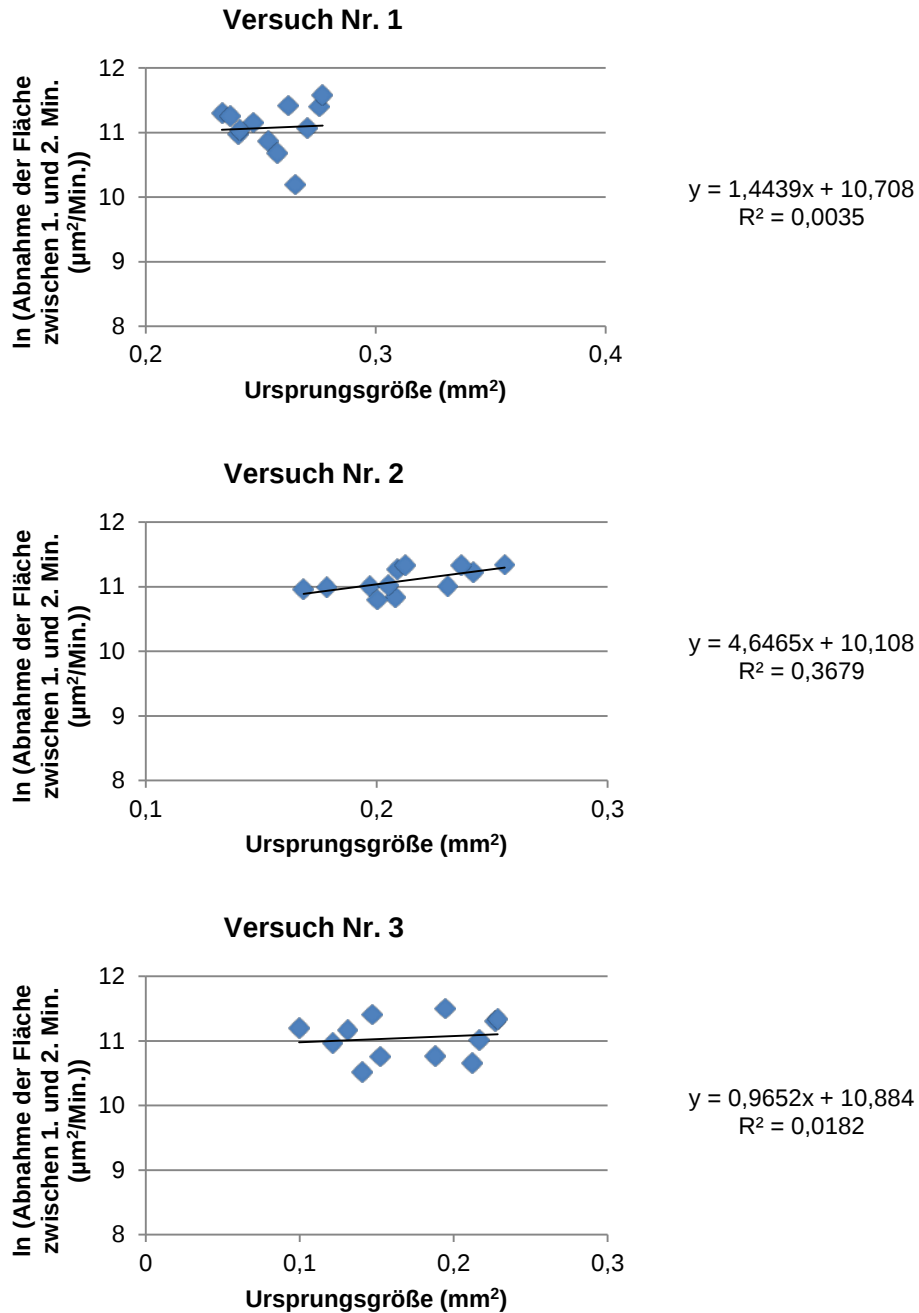


Abb. 4.90: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 1-2 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p = 0,386$).

Wie bei den anderen Zeitrahmen war die Dissoziation zwischen 2 und 4 Min. auch von der Ursprungsgröße unabhängig (siehe Abb. 4.91 und Abb. 4.92, $p = 0,298$). Aus den dargelegten Ergebnissen kann zusammengefasst werden, dass weder das ZO-1-Level noch die Ursprungsgröße die Dissoziation von WM35-Sphäroiden bestimmt.

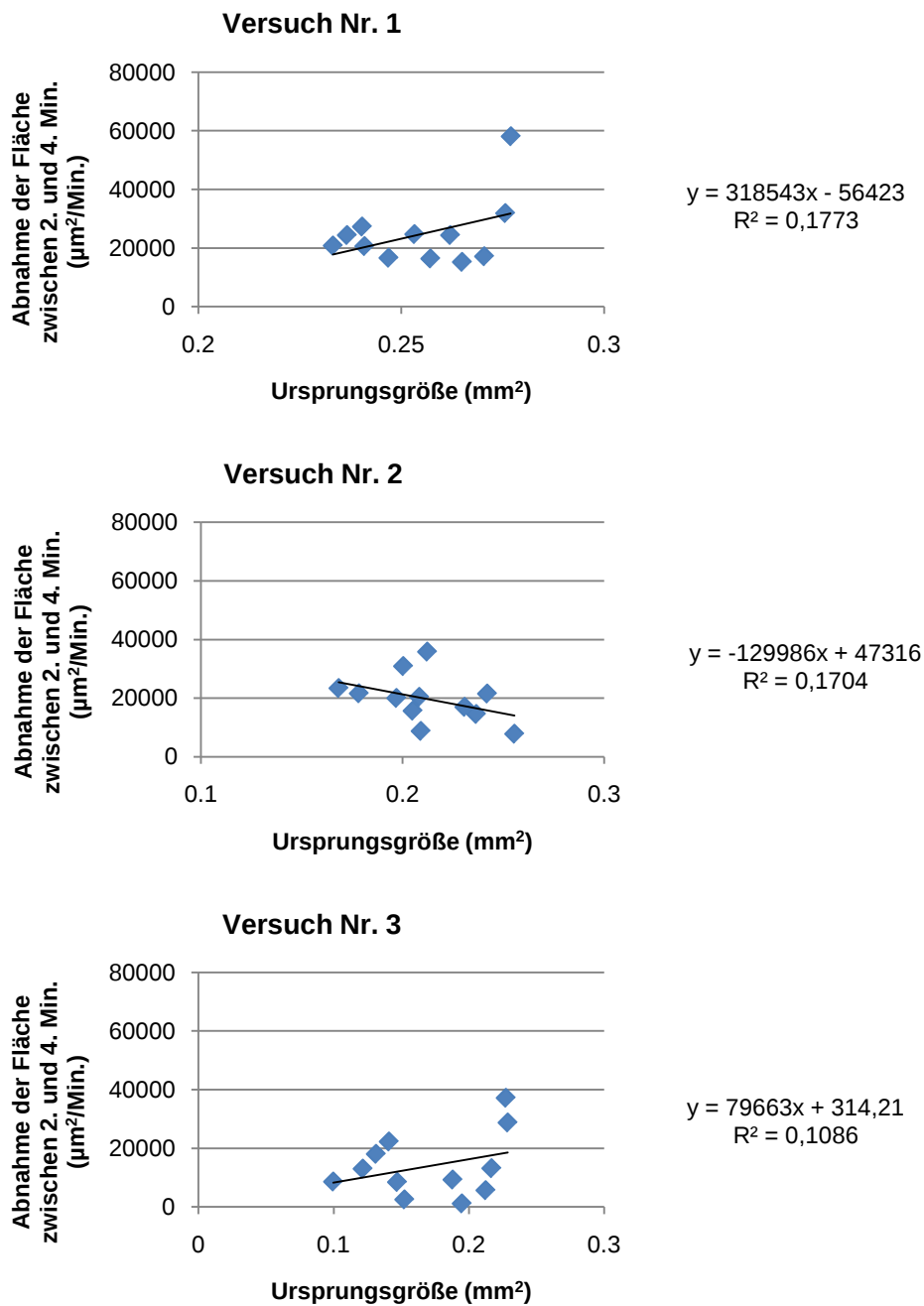


Abb. 4.91: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 2-4 Min. (Versuch 1 bis 3).

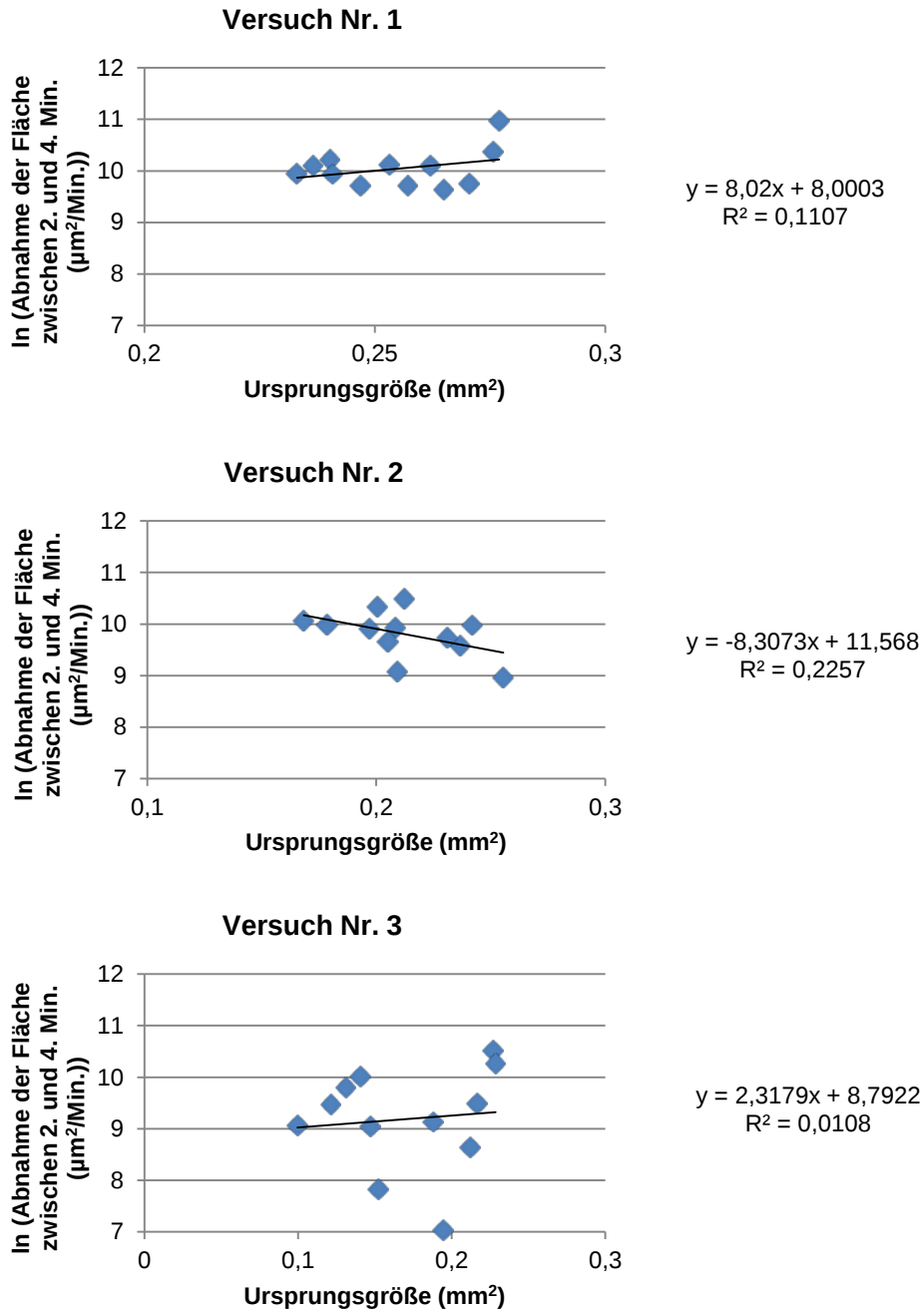


Abb. 4.92: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 2-4 Min. (Versuch 1 bis 3). Die Dissoziation wurde nicht von der Ursprungsgröße beeinflusst ($p = 0,298$).

4.7 Proliferation von Melanom-Zellen

Neben der Invasion spielt bei der Entstehung von Melanomen auch die Proliferation eine wichtige Rolle (Gaggioli und Sahai, 2007). Deshalb wurde auch die Proliferation in den beiden verwendeten Melanom-Linien mit Hilfe von BrdU-Assays untersucht. Die Proliferationsassays wurden für drei Tage durchgeführt und die Zunahme oder die sogenannte Steigung der Absorbanz zwischen den Tagen wurde statistisch analysiert.

4.7.1 Proliferation von 1205Lu-Zellen

Bei den Proliferationsversuchen wurden zwei Kontrollen und zwei Knockdown-Zell-Präparationen verwendet. Die proliferierenden Zellen wurden innerhalb von 3 Tagen gemessen (siehe Abb. 4.93 als Beispiel). Hier bauen die Zellen während der Zellteilung BrdU in ihrer DNA ein, die in den nächsten Schritten immunologisch markiert wurde und durch eine entstehende enzymatische Farbreaktion photometrisch gemessen werden konnte. Die Veränderungen der Absorbanzen über die Zeit (Steigungen) wurden dann für die Auswertungen verwendet (siehe Abb. 4.93).

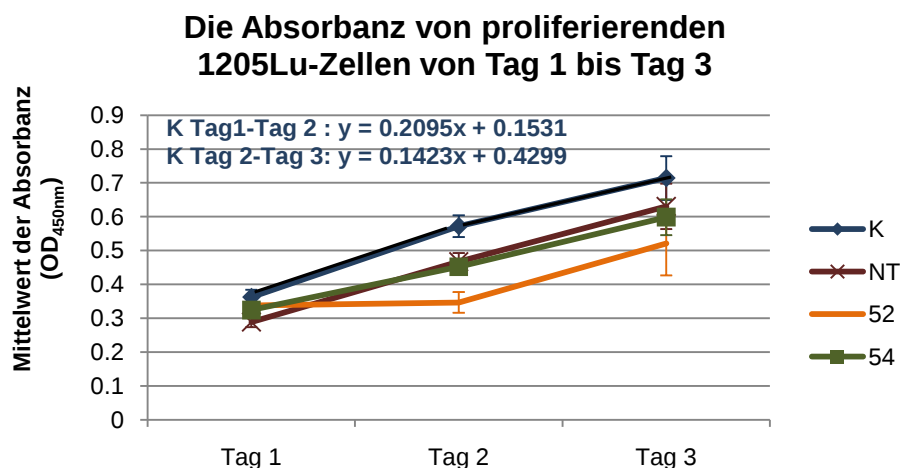


Abb. 4.93: Die Absorbanz der proliferierenden 1205Lu-Zellen innerhalb von drei Tagen bei einem BrdU-Assay als Beispiel. (n=8, SEM).

Die Abb. 4.94 zeigt die Steigungen der Absorbanz der unterschiedlichen Zellbehandlungen. Zwischen den Zellbehandlungen wurde kein signifikanter Unterschied der Steigungen nachgewiesen. Die beiden-Kontrollen teilten sich schneller als die 52-Zellen (siehe Abb. 4.94). Dies war aber nicht signifikant unterschiedlich. Diese Zellen exprimierten zwar unterschiedliche ZO-1-Level, aber sie unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abb. 4.95).

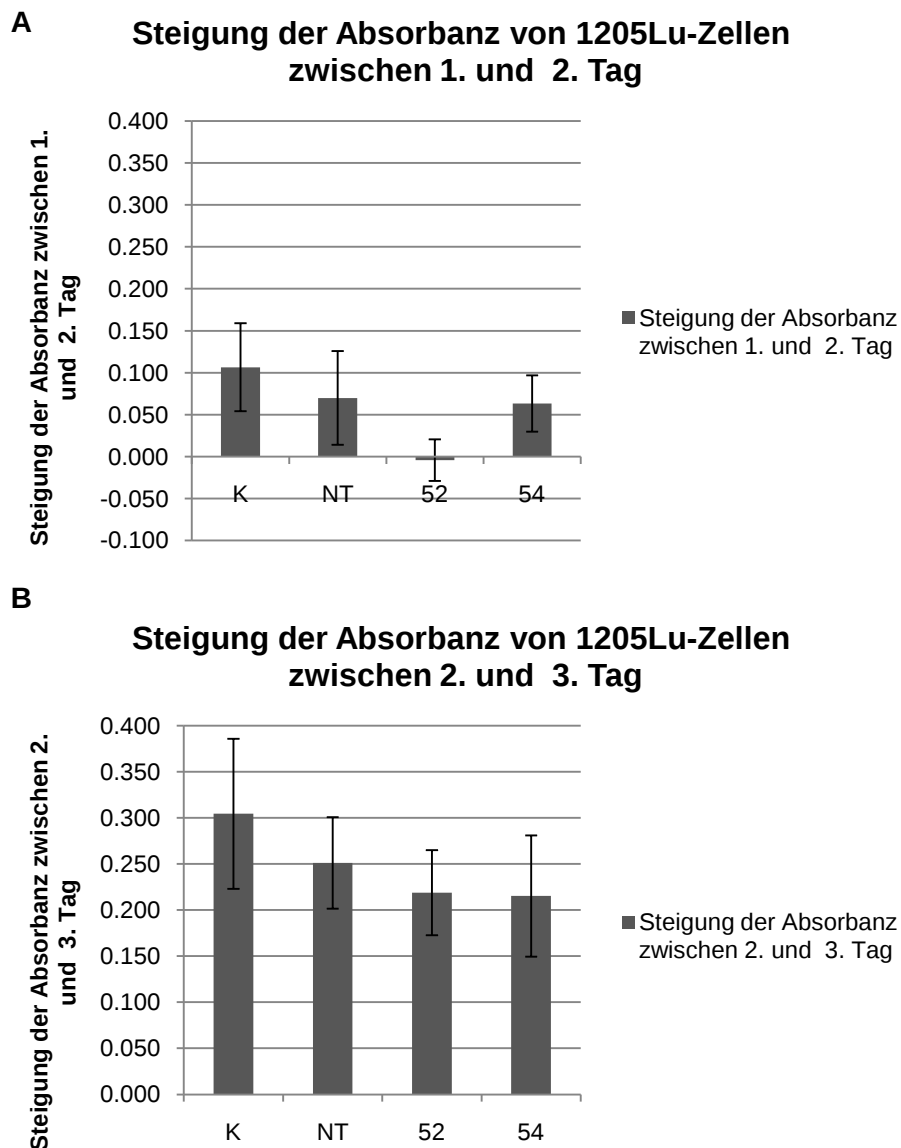


Abb. 4.94: A. Steigung der Absorbanz von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen zwischen 1. und 2. Tag, B. Steigung der 1205Lu-Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag bei den Proliferationsassays. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellbehandlungen (n=3,SEM).

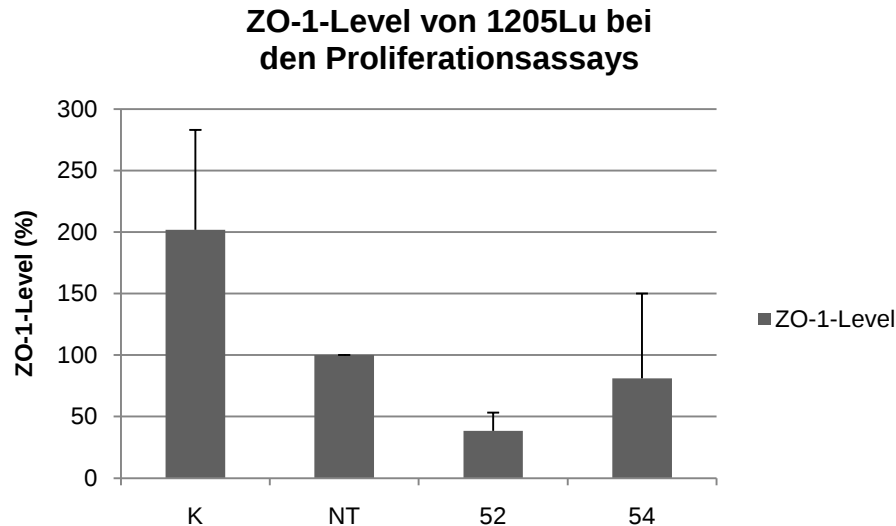


Abb. 4.95: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Proliferations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT (n=3, SEM).

Die Steigungen der Absorbanz zwischen dem 1. und 2. Tag zeigten keinen deutlichen Zusammenhang mit dem ZO-1-Level (siehe Abb. 4.96). Durch die statistische Analyse dieser Daten mit dem linearen gemischten Modell wurde herausgefunden, dass die 1205Lu-Proliferation zwischen dem 1. und 2. Tag tatsächlich nicht vom ZO-1-Level abhängt (siehe Tabelle 4.25). Die Steigung der Absorbanz zwischen dem 2. und 3. Tag war auch unabhängig vom ZO-1-Level (siehe Abb. 4.97 und Tabelle 4.26). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von 1205Lu-Zellen nicht vom ZO-1-Level beeinflusst wird.

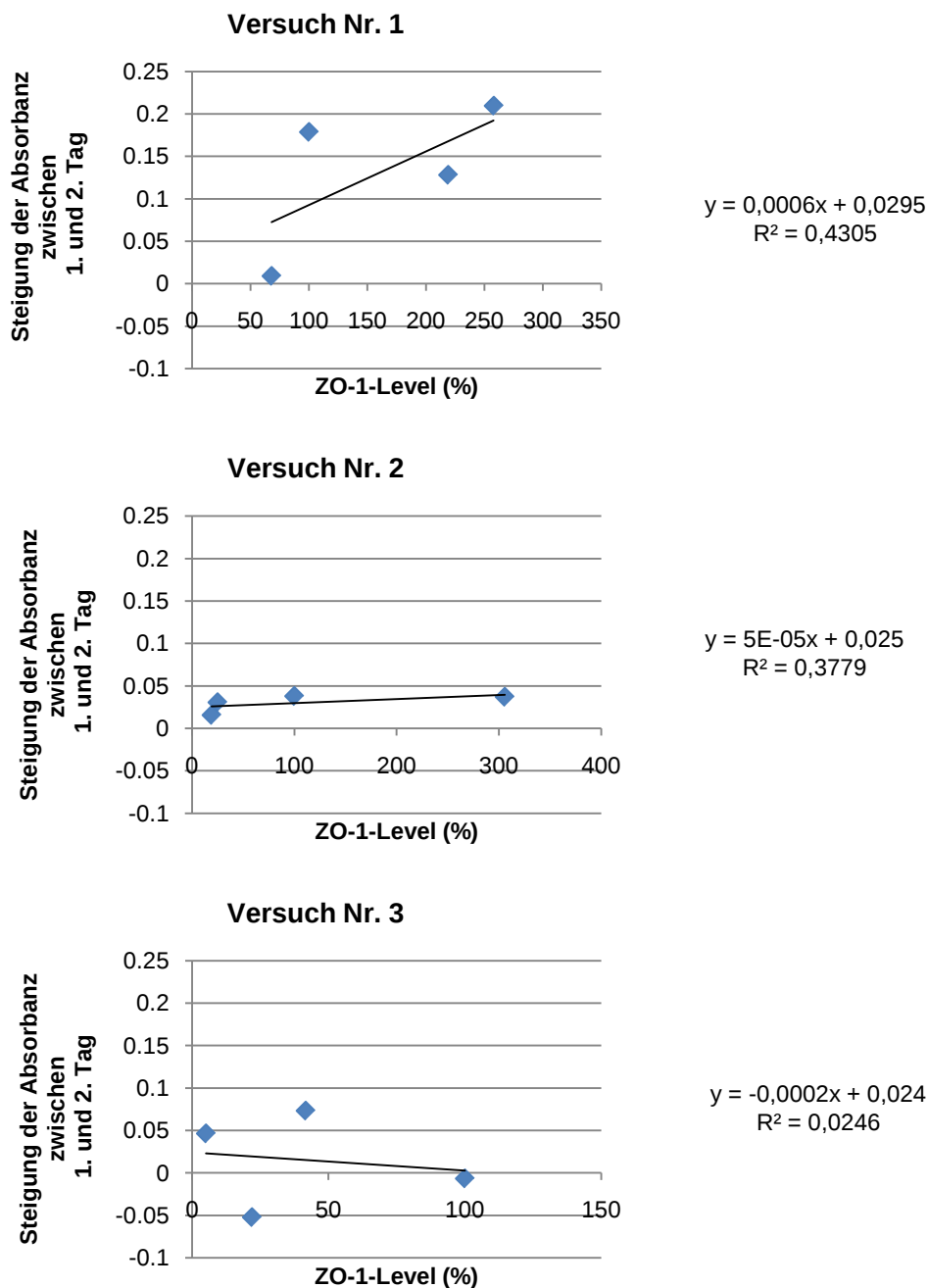


Abb. 4.96: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen (Versuch 1 bis 3). Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,181$) beeinflusst.

Tabelle 4.25: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Proliferation zwischen 1. und 2. Tag

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,181	0,0003	0,0002

Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

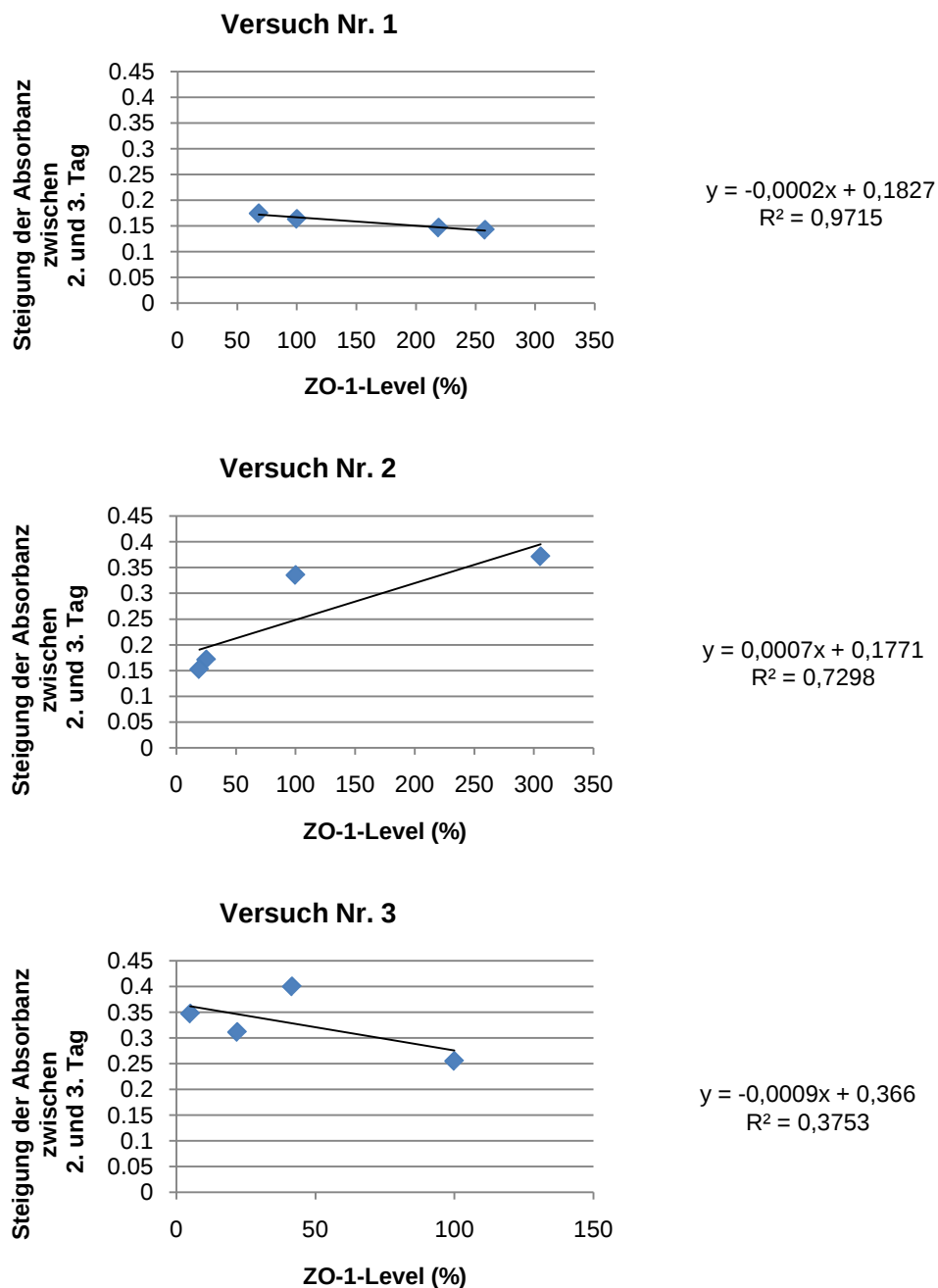


Abb. 4.97: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen (Versuch 1 bis 3). Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,255$) beeinflusst.

Tabelle 4.26: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Proliferation zwischen 2. und 3. Tag

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,255	0,0003	0,0002

Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

4.7.2 Proliferation von WM35-Zellen

Bei den oben genannten Ergebnissen wird gezeigt, dass das ZO-1-Level keine Rolle bei der Proliferation von 1205Lu-Zellen besitzt. Um herauszufinden, ob es bei WM35-Zellen auch nicht mit der Zellteilung korreliert ist, wurden Proliferationsversuche mit den WM35-Zellen durchgeführt.

Zwischen den WM35-Zellpräparationen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Zunahme der Absorbanz weder vom ersten zum zweiten Tag noch vom zweiten zum dritten Tag (siehe Abb. 4.98A und B). Die ZO-1-Expression von WM35-Zellen mit den unterschiedlichen Behandlungen ist in der Abbildung 4.99 dargestellt. Je nach ZO-1-Gehalt konnte man die Zellen in drei Gruppen aufteilen. Die Wildtyp- und Non-Target besaßen ein hohes ZO-1-Level. Während die 52-Zellen wenig ZO-1 exprimierten, exprimierten die 55-Zellen ZO-1 im mittlerem Bereich. Die Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von NT war höher als 52 und 55 (siehe Abb. 4.98A). Die ZO-1-Expression von NT war ebenfalls höher als 52 und 55 (siehe Abb. 4.99). Außerdem war sowohl die Steigung der Absorbanz von 55 in diesem Zeitraum als auch das ZO-1-Level von 55 höher als das von 52. Zwischen den beiden Kontrollen gab es Unterschiede. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant.

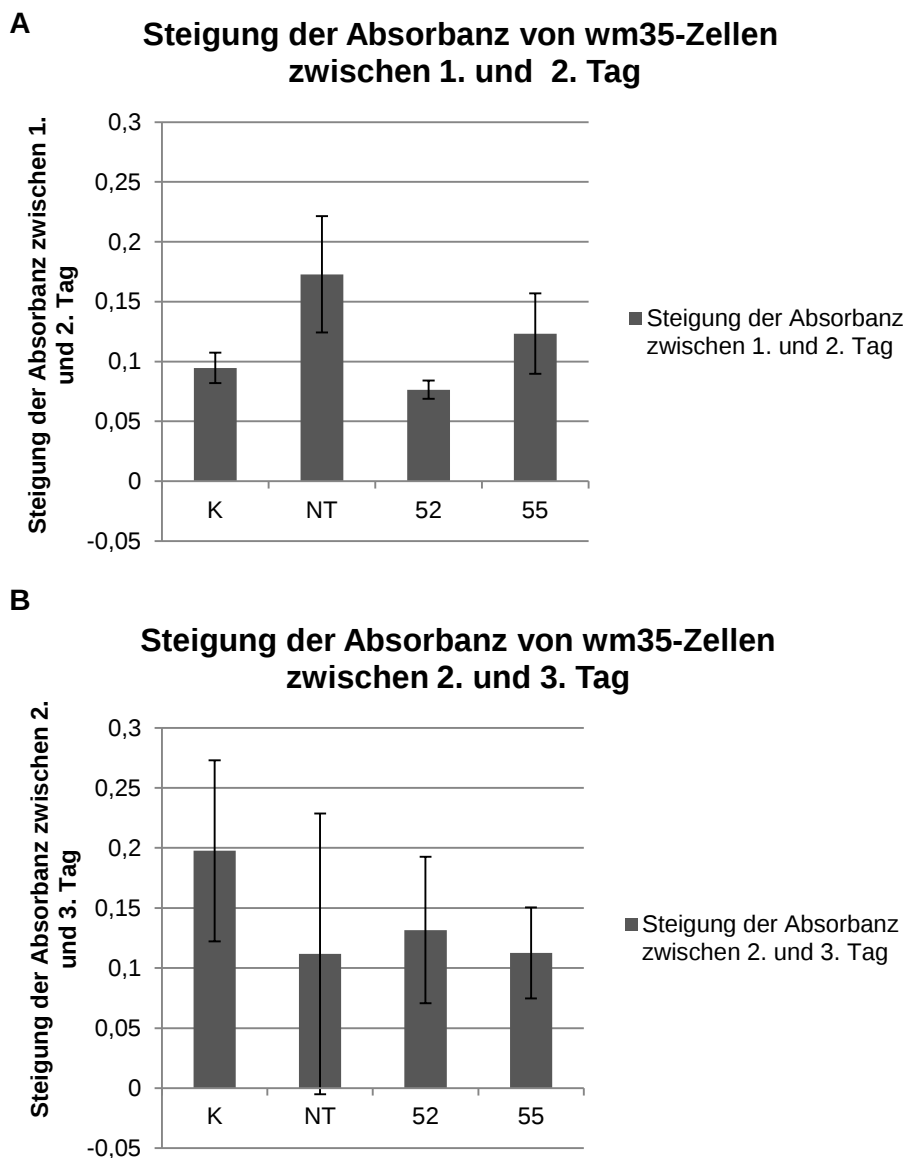


Abb. 4.98: A. Steigung der Absorbanz von BrdU-behandelten WM35-Zellen zwischen 1. und 2. Tag, B. Steigung der 1205Lu-Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag bei den Proliferationsassays. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellbehandlungen (n=3,SEM).

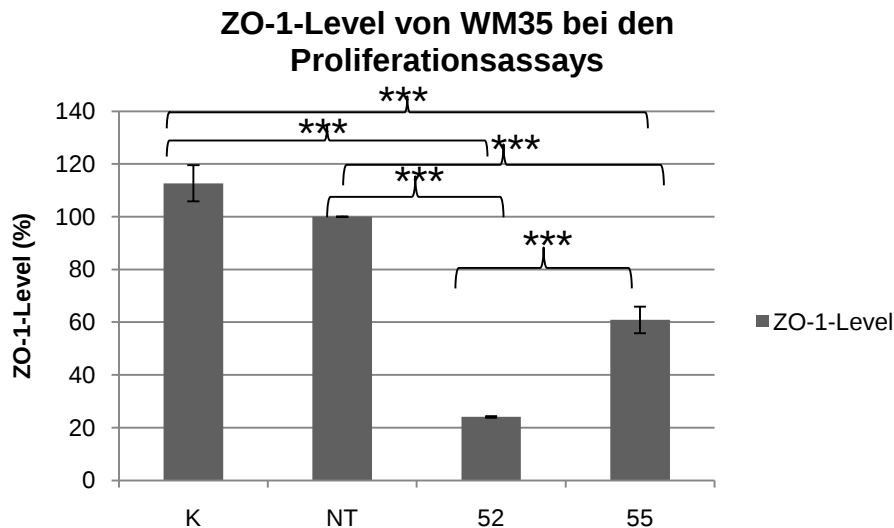


Abb. 4.99: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Proliferations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT. (n=3, SEM, *p:<0,001).**

Mit den Daten wurde getestet, ob die ZO-1-Level mit der Proliferationsrate korrelierten. In der Abb. 4.100 werden die Steigungen der Absorbanz von WM35-Zellen zwischen dem 1. und 2. Tag und ihr ZO-1-Level bei den drei Versuchen dargestellt. In der weiteren Abbildung, Abb. 4.101, werden die Steigungen der Absorbanz zwischen dem 2. und 3. Tag gezeigt. In den beiden Abbildungen kann man sehen, dass die Steigungen nicht mit dem ZO-1-Level korrelieren. Die Ergebnisse aus der statistischen Analyse dieser Daten sind in der Tabelle 4.27 und 4.28 zu sehen. Das Fazit der hier dargelegten Betrachtungen ist, dass ZO-1 die Zellteilung von WM35 Melanomzellen nicht beeinflusst.

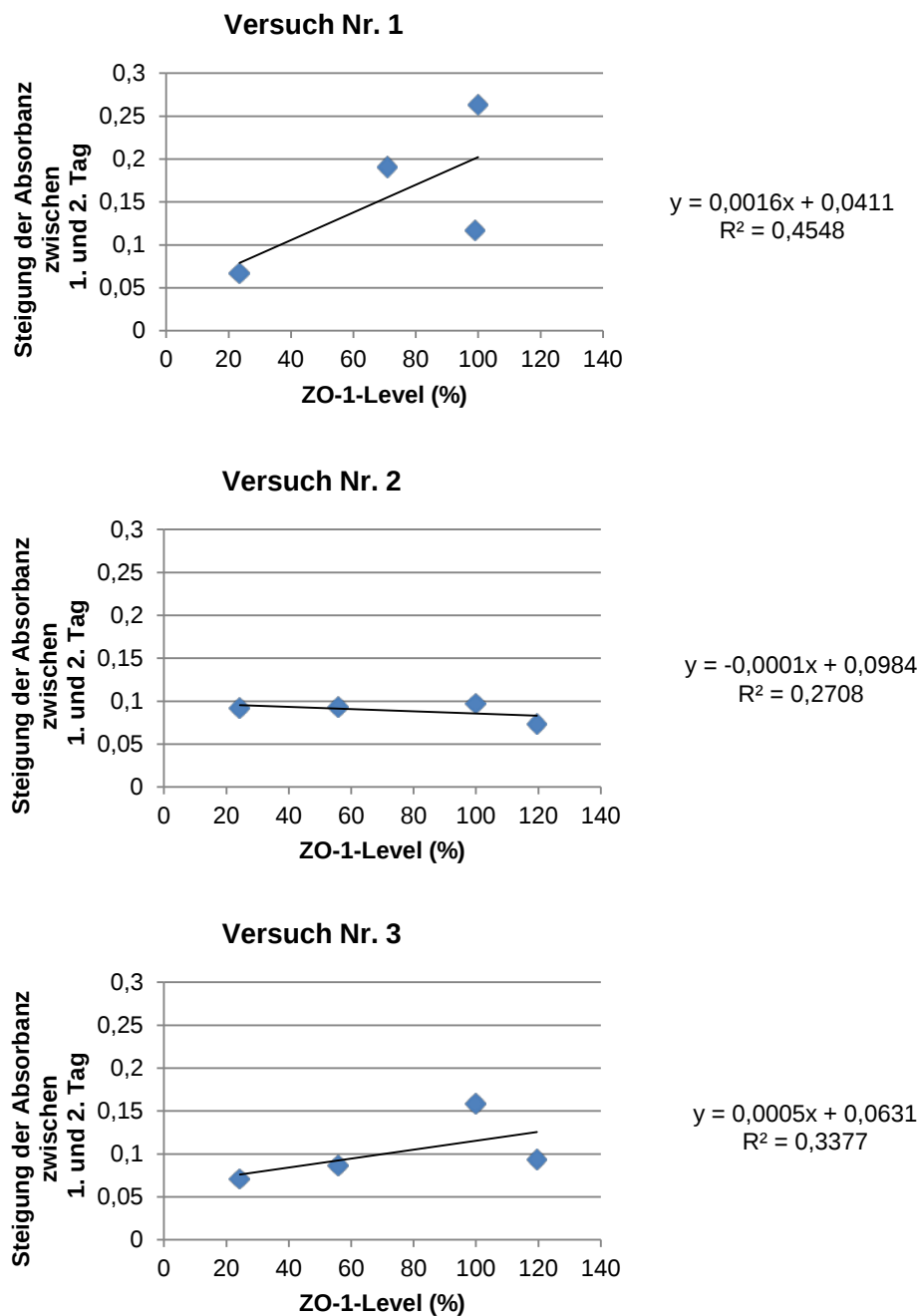


Abb. 4.100: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von BrdU-behandelten WM35-Zellen (mit K) (Versuch 1 bis 3). Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,234$) beeinflusst.

Tabelle 4.27: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Proliferation zwischen 1. und 2. Tag

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,234	0,0006	0,0004

Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

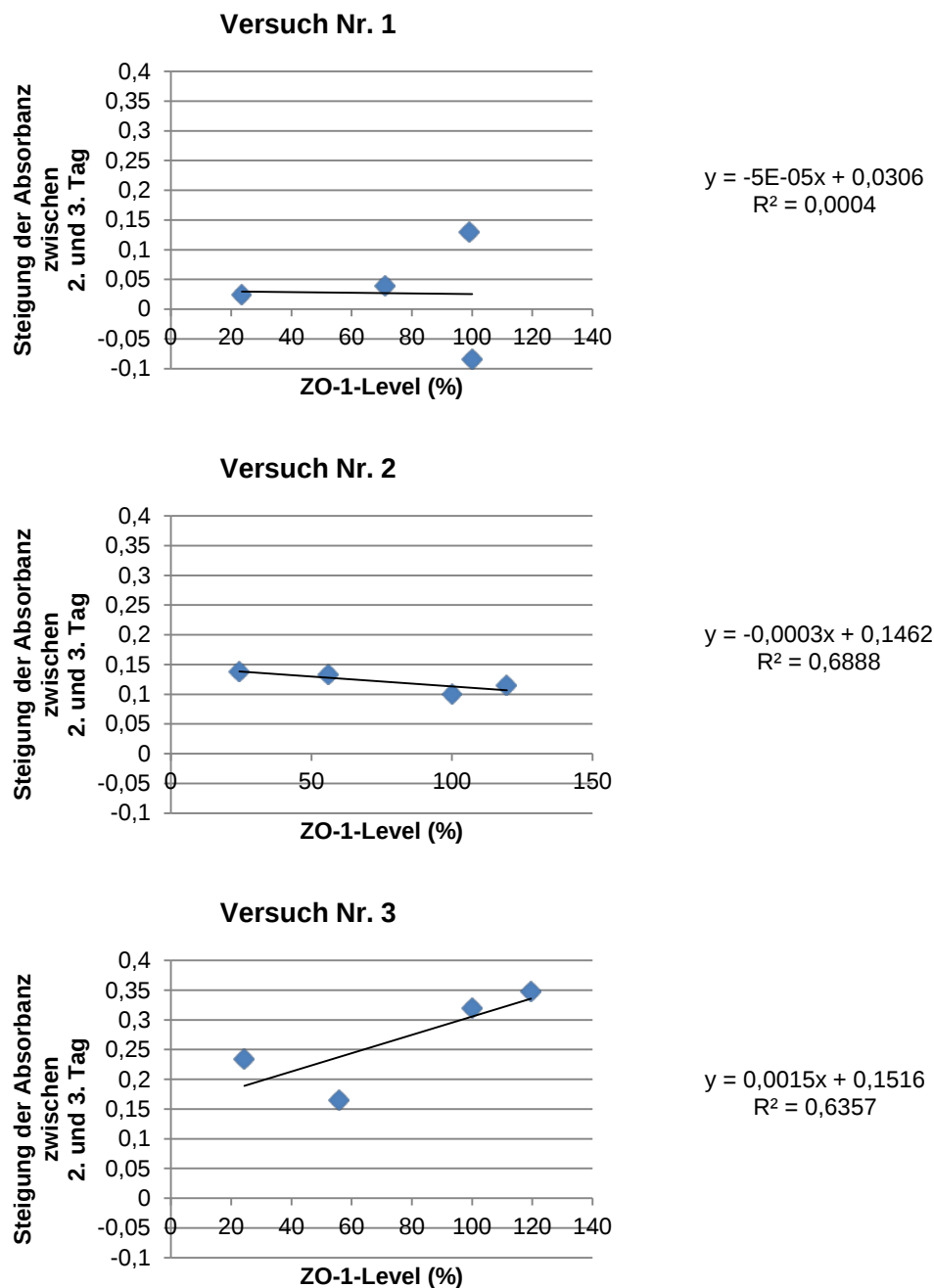


Abb. 4.101: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag von BrdU-behandelten WM35-Zellen (mit K) (Versuch 1 bis 3). Die Steigung wurde nicht vom ZO-1-Level ($p=0,479$) beeinflusst.

Tabelle 4.28: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Proliferation zwischen 2. und 3. Tag

Parameter	Signifikanz	Schätzung	SE
ZO-1-Level	0,479	0,0004	0,0006

Die Schätzung des ZO-1-Levels ist nicht signifikant ($n=3$).

5. Diskussion

In einer Studie von Kaihara, et al. (2003) wird berichtet, dass eine verminderte ZO-1-Expression mit einer Tumormanifestation in kolorektalen Karzinomen korreliert ist. Dennoch ist ZO-1 in verschiedenen anderen Krebsentitäten z. B. Pankreaskrebs, Magenkrebs, Brustkrebs und Melanom überexprimiert (Kleeff, et al. 2001; Resnick, et al., 2005; Smalley, et al., 2005, Polette, 2005).

ZO-1 ist in malignen Melanomen exprimiert, aber nicht in Melanozyten. In einer früheren Studie führte der shRNA-Knockdown von ZO-1 in WM35-Melanomzellen zu verminderter Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Invasivität (Smalley et al., 2005). Sowohl in der Vorarbeit in unserem Labor als auch in der Arbeit von Smalley, et al. (2005) konnte ZO-1 Expression aber bereits in benignen Nävuszellnävi (NZN) nachgewiesen werden, was gegen die reine An- bzw. Abwesenheit von ZO-1 als entscheidenden Faktor für die Malignität spricht. In der Vorarbeit in unserem Labor wurde es herausgefunden, dass Melanome mehr ZO-1-exprimierende Zellen hatten als NZN. Unsere Hypothese war daher, dass das ZO-1-Proteinlevel die Malignität von Melanomzellen beeinflusst.

Um dies zu untersuchen wurden in dieser Doktorarbeit Melanom-Zell-Präparate mit unterschiedlichen ZO-1-Expressionslevels durch lentivirale shRNA-Transfer von 5 shRNA-Sequenzen generiert. Hier wurden zwei Melanom-Linien, 1205Lu und WM35, verwendet. Es wurden jeweils zwei Knockdown-Präparate ausgewählt, die für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden. Aus diesen Zellen wurden dann Sphäroide hergestellt, die anschließend für Kollagen-Invasions-Versuche genutzt wurden. Während das ZO-1-Level eine Rolle bei der Invasion von 1205Lu-Sphäroiden spielt, spielte das ZO-1-Level bei der Invasion von WM35-Zellen keine Rolle. In diesen Zellen war die Invasion aber von der Ursprungsgesamtfläche der Sphäroide beeinflusst. Eine weitere Untersuchung der Invasion von WM35-Zellen erfolgte mittels Matrigel-beschichteten-Boyden-Kammern. Hier wurde die Invasion von Zellen aus 2D-Verbänden statt der Invasion aus Sphäroiden getestet. Während bei den Kollagen-Invasionsassays eher die kollektive Invasion stattfindet, findet bei den Boyden-Kammerassays eher die Einzel-Zell-Invasion statt. Hier wurde beobachtet, dass sich die höchste Zahl an invadierten Zellen bei einem mittleren ZO-1-Level von ca. 59% ergeben hat. Das ZO-1-Level beeinflusste aber weder die Dissoziation der Sphäroide noch die Zellteilung dieser beiden Melanom-Zell-Linien.

5.1 Maligne Melanom-Zell-Linien exprimierten unterschiedliche Menge von ZO-1 und besaßen unterschiedliche Invasivität

Von Primär-Tumoren, humanen Metastasen oder Xenograft-Metastasen wurden zahlreiche Melanom-Linien hergestellt. Um geeignete Zell-Linien für die Etablierung von Melanom-Knockdown-Modellen zu wählen, wurden vier Zell-Linien auf die ZO-1-Expression untersucht.

Die WM35-Zellen wurden von einem Primär-Tumor mit radialem Wachstum etabliert (Wistar Institute, 2013). WM793 wurde ebenfalls von einem Primär-Tumor etabliert, aber der Tumor hatte ein vertikales Wachstum (Juhasz, et al., 1993). Tumoren mit radialem Wachstum sind weniger invasiv als Tumoren mit vertikalem Wachstum.

Die weiteren zwei Linien stammten aus Metastasen. Die Zell-Linie 1205Lu wurde aus einer Metastase in immunodefizienter Maus nach der Inokulation mit WM793-Zellen hergestellt (Juhasz, et al., 1993). Eine andere Zell-Linie, die aus einer Metastase stammte, ist MV3. Diese Zell-Linie wurde aus einer Metastase eines Patienten gewonnen. Ein Teil von der Lymphknoten-Metastase wurde in nackter Maus transplantiert und nach drei Passagen in Mäusen wurden die MV3-Zellen isoliert (Muijen, et al., 1991).

Wie oben beschrieben waren WM793 die parentalen Zellen von 1205Lu-Zellen. Gallagher et al. (2005) berichtete dass, die 1205Lu-Zell-Linie sich schneller als die WM793-Zell-Linie teilte und auch invasiver war. Eine Studie von Juhasz, et al (1993) bestätigt dies auch. Nach der Inokulation mit 1205Lu- und WM793-Zellen unter den humanen Hauttransplantaten in Mäusen bildeten sich Metastasen in der Lunge. Während 5 von 6 Mäusen nach der Inokulation mit 1205Lu Zellen Lungen-Metastase hatten, hatten 1 von 3 Mäusen nach der Inokulation mit WM793-Zellen (Parental-Zellen von 1205Lu-Zellen) Metastasen (Juhasz, et al., 1993).

Die MV3-Zellen, die auch wie 1205Lu-Zellen aus einer Metastase isoliert wurden, sind ebenfalls hochmetastatisch (bilden spontane Metastasen). Nach einer intravenösen Inokulation mit MV3-Zellen bildeten 95% der nackten Mäuse (n=20) innerhalb 6 Wochen Lungen-Metastasen. Außerdem bildeten 90% der nackten Mäuse (n=20) Lungen-Metastasen nach der subkutanen MV3-Inokulation (Muijen, et al., 1991). Die beiden Studien haben aber die Metastasierungsfähigkeit von 1205Lu und die von WM35 nicht miteinander verglichen. In der Vorarbeit in unserem Labor wurde die Invasion dieser beiden Linien in Kollagen verglichen. Die Linie 1205Lu war invasiver als die Linie MV3 (Bohner et al., 2011).

In dieser Doktorarbeit wurde die Invasion von 1205Lu und die von WM35 bei den Kollagen-Invasionsassays verglichen. Die WM35-Sphäroide zeigten eine stärkere Invasivität als die 1205Lu-Sphäroide. Die 1205Lu-Sphäroide wuchsen aber schneller als die WM35-

Sphäroide. Außerdem waren sie leichter zu dissoziieren als WM35-Sphäroide. Dass 1205Lu-Sphäroide schneller wuchsen und auch leichter zu dissoziieren waren als WM35-Sphäroide, zeigt, dass 1205Lu möglicherweise wegen verstärkten Wachstums und verstärkter Dissoziation so erfolgreich Metastasen *in vivo* bilden können.

Die WM35-Zellen hatten das höchste ZO-1-Level von allen vier Zell-Linien, die in dieser Arbeit getestet wurden. Das zweit-höchste Level von ZO-1 wurde in den 1205Lu-Zellen gefunden. Die ZO-1-Expression von 1205Lu-Zellen war höher als die von MV3-Zellen. Die Zellen, die am wenigsten ZO-1 exprimierten, waren die WM793-Zellen. Smalley, et al. (2005) hatte ebenfalls nachgewiesen, dass WM35-Zellen viel ZO-1 und WM793-Zellen ganz wenig ZO-1 exprimierten. Von allen von ihm getesteten Linie hatte WM793 auch die niedrigste ZO-1-Expression. In der Vorarbeit in unserem Labor (Bohner et al., 2011) wurde ebenfalls gezeigt, dass 1205Lu mehr ZO-1 als MV3 exprimierte.

Die ZO-1-Expression der beiden metastasierten Linien, 1205Lu und MV3, war höher als die Expression der Linie, WM793, die aus einem VGP-Tumor isoliert wurde. *In vivo* waren die 1205Lu fähiger Metastasen zu bilden als WM793 (Juhasz, et al., 1993). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ZO-1-Expression wahrscheinlich mit der Invasivität der unterschiedlichen Linien korreliert. Darüber hinaus korrelierte die ZO-1-Expression mit der Invasivität in Kollagenassays für die drei Linien, die in unserem Labor untersucht wurden. Die WM35-Zellen hatten ein höheres ZO-1-Level als die 1205Lu-Zellen und auch eine stärkere Invasion in Kollagen. Allerdings stammt WM35 aus einem Primär-Tumor mit einem radialen Wachstum und 1205Lu aus einer Metastase. Dies wiederum zeigt, dass die Hochregulation vom ZO-1 schon bereits in der früheren Phase der Melanom-Entwicklung stattfindet. Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse von Smalley et al (2005) und die Untersuchungen in der Vorarbeit in unserem Labor, dass die Hochregulation von ZO-1 sowohl in Nävus-Zell-Nävi als auch in Melanom gefunden wurden (Bohner et al., 2011). Die Melanozyten exprimierten hingegen kein ZO-1. Smalley et al. (2005) haben auch keine deutliche Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und dem Tumor-Grad gefunden. Aus diesen Ergebnissen können wir aber zeigen, dass die Zell-Linien mit den unterschiedlichen Malignitätsgraden auch unterschiedliche ZO-1-Levels besaßen.

Durch den Vergleich der ZO-1-Expression der Melanom-Linien konnten Zell-Linien zur Herstellung von Knockdown-Modellen bestimmt werden. Da WM35 und 1205Lu ziemlich viel ZO-1 exprimierten, waren diese beiden Linien zur Etablierung von Knockdown-Linien geeignet. Außerdem wurde WM35 von Smalley, et al. (2005) auch zur Untersuchung der Rolle von ZO-1 verwendet. Deshalb wurde in dieser Doktorarbeit diese Zell-Linie in den Versuchen miteinbezogen, sodass verglichen werden konnte, ob dieselben Beobachtungen gemacht werden.

5.2 Etablierung von lentiviralen Knockdown-Melanom-Zellen

Um Melanom-Zell-Präparationen mit unterschiedlichen ZO-1 Proteinlevels zu generieren, wurden die Zellen mit verschiedenen shRNAs transduziert. Dabei zeigte sich dass mit der shRNA-52 die deutlichste Herabregulation der ZO-1-Expression in den beiden Zell-Linien auf 20% der Levels der beiden Kontrollen (Wildtyp und NT) erreicht werden konnte. Das ist sehr interessant, da die shRNA-52 die einzige Sequenz ist, die gegen einen untranslatierten Bereich der mRNA gerichtet ist (3'UTR). Über miRNA ist bekannt, dass die miRNAs die gegen das 3'UTR-Bereich gerichtet sind, sehr effektiv den Abbau ihrer Ziel-mRNA fördern (Hausser, et al., 2013). Vermutlicherweise trifft dies bei dem Abbau durch shRNA auch zu. Die anderen verwendeten shRNAs sind gegen den Protein-kodierenden Bereich gerichtet. Die 54-shRNA-transduzierten 1205Lu-Zellen besaßen auch eine Herabregulation (auf 36 % der Levels der beiden Kontrollen), aber höhere ZO-1-Expression als die 52-Zellen. Bei den Versuchen mit 1205Lu-Zellen wurden diese beiden Knockdown-Zellen verwendet. Bei WM35 wurde mehr ZO-1-Protein in 55- als in 52-transduzierten Zellen nachgewiesen (auf 36% der Levels der beiden Kontrollen). Für weitere Assays mit WM35 wurden diese beiden Zell-Präparate verwendet.

Bei den Versuchen wurden sowohl adhärenente Zellen, die zweidimensional gewachsen sind (2D-Kultur) als auch Sphäroide (3D-Kultur) verwendet. Die obengenannte ZO-1-Level-Untersuchungen wurden auch mit 2D-Kultur durchgeführt. In den 2D-Kulturen von 1205Lu-Zellpräparaten hatten 52-Zellen 20% des ZO-1-Levels der beiden Kontrollen und 54-Zellen 36% des ZO-1-Levels. Allerdings war die Expression der 1205Lu-Wildtyp-Kontrolle bei den Proliferations-Assays höher als NT. Das ZO-1-Level der NT-Kontrolle lag bei 50% der Wildtyp-Kontrolle. In allen 2D-Kulturen (in Boyden-Kammer- und Proliferations-Versuchen) von WM35-Zellen hatte 52 ebenfalls ein ähnliches ZO-1-Level um 20% der Levels der beiden Kontrollen. Die 55-Zellen besaßen 59%. Dies war 23% mehr als das Level bei den Vorversuchen. Insgesamt zeigten aber die 2D-Kulturen eine ziemlich konstante ZO-1-Expression zwischen den Versuchen und weisen nur geringe Variabilität. Die beiden Kontrollen exprimierten fast das gleiche ZO-1-Level. Das Non-Target-Level war 96% des Wildtyp-Kontroll-Levels.

In den 3D-Kulturen von 1205Lu-Zellen lag das ZO-1-Level von 52-Sphäroiden um 17% des Wildtyp-Kontroll-Levels. Dies ähnelt der Expression in 2D-Kultur. Die Expression von 54-Sphäroiden war 44% des Wildtyp-Kontroll-Levels. Dies war etwas höher (8% höher) als ihr Level in 2D-Kulturen. Des weiteren lag das ZO-1-Level der 52-Sphäroide aus WM35-Zellen um 12 % des Levels der Wildtyp-Kontrolle. Dies ist etwas niedriger als ihr ZO-1-Level in 2D-Kulturen. Die 55-Sphäroide exprimierten auch weniger ZO-1 als ihre adhärenente Zellen (26% der Wildtyp-Kontrolle). Ihre adhärenente Zellen hatten wie oben beschrieben ein ZO-1-

Level von 59% der Wildtyp-Kontrollen. Interessanterweise beobachtete man auch in den Non-Target Zellen der beiden Linien eine verminderte Expression von ZO-1 in den Sphäroiden im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle.

Man beobachtet aber auch, dass die Sphäroide der Wildtyp-Kontrollen der beiden Linien (1205Lu und WM35) eine starke Variabilität des ZO-1-Levels hatten. Außerdem exprimierten die shRNA-54-Sphäroide aus 1205Lu-Zellen unterschiedliche ZO-1-Levels zwischen den Versuchen. Dies korrelierte aber nicht mit der Zeit, wann ein Versuch gelaufen war. Hingegen exprimierten die 52-Sphäroide der beiden Linien eine relativ konstante ZO-1-Expression. Das andere Knockdown-Präparat von WM35, shRNA-55, hatte ebenfalls ein relativ stabiles ZO-1-Level. Insgesamt war das ZO-1-Level in den Sphäroiden weniger konstant als das ZO-1-Level in den adhärenenten Zellen.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede des Levels von 54-Sphäroiden wäre, dass sich in den 54-1205Lu-Zellen neben transduzierten Zellen auch noch untransduzierte Zellen befinden, die sich unter bestimmten Bedingungen stärker oder weniger stark vermehren würden und somit das ZO-1 Gesamtlevel verändern würden. Da keine Einzelzellselektion bei den Präparationen stattgefunden hat, kann diese Erklärung grundsätzlich nicht ausser Acht gelassen werden. Allerdings wurden die Zell-Linien, außer der Wildtyp-Kontrolle, stetig in Puromycin-haltigem Medium kultiviert, deshalb sollten sich sich die untransduzierten Zellen nicht langfristig überleben bzw. sich nicht vermehren können. Eine weitere mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Sequenz der shRNA-54 nicht so effektiv den Abbau der mRNA von ZO-1-fördert. Vermutlicherweise ist die Komplementarität der shRNA-54 zu der ZO-1-mRNA nicht sehr optimal, sodass es Schwankungen in der Effektivität des Abbau-Prozesses von ZO-1-mRNA gibt.

Wie oben beschrieben, gibt es Unterschiede in der Variabilität im ZO-1-Level der Zellpräparationen zwischen 2D und 3D-Kultur. In adhärenenten Zellen gibt es eine homogene Verteilung der ERK2-Expression. Im Gegensatz dazu ist die Verteilung in den Sphäroiden inhomogen. Die Zellen, die außen liegen, hatten z.B. eine höhere Proliferations-Aktivität, gezeichnet durch die erhöhte ERK-Expression, als die Zellen, die sich in der Mitte eines Sphäroids befinden (Haass, et al., 2008). Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Sphäroide hatten unterschiedliche Ursprungsgrößen. Hier könnte es sein, dass die Sphäroide generell wegen der unterschiedlichen Größe unterschiedliche Levels von Proteinen besaßen. Dies verursacht möglicherweise die höhere Variabilität des ZO-1-Levels in den Sphäroiden im Vergleich zu den adhärenenten Zellen.

In einigen Versuchen gab es einen Einfluss der Transduktion mit den „Non-Target“-Viren auf die zu untersuchenden tumorbiologischen Prozesse. Die Non-Target-Zellen sind die Zellen, die eine sogenannte Non-Target-Sequenz in ihrem Chromosom nach der

Transduktion tragen. Die Sequenz hat die Hairpin-Struktur wie eine shRNA, ist aber an keine RNA gerichtet. Deshalb verwendet man sie als eine weitere Kontrolle außer den Wildtyp-Zellen. Es könnte aber ein Off-Target-Effekt auftreten, wenn die Non-Target-Sequenz durch ihre partielle Bindung zu irgendwelcher mRNA diese mRNA abbauen würde und dadurch wäre die Expression des Gens vermindert. Petz et al. (2011) hat die CAT-Aktivität der Non-Target- und die Aktivität der Wildtyp(unbehandelte)-Kontrolle von Hepatozyten untersucht (CAT: Chloramphenicol-Acetyl-Transferase). Die Aktivität der Wild-Typ-Kontrolle war höher als die Non-Target-Kontrolle. Wahrscheinlich gibt es hier auch einen Off-Target-Effekt, der die verminderte CAT-Aktivität verursacht.

Außerdem wurde in dieser vorliegenden Arbeit eine Herunterregulation der ZO-1-Expression in den NT-Sphäroiden beobachtet. Bolinches-Amorós, et al. (2014) verwendeten auch die Non-Target-Kontrolle bei dem Knockdown-Versuch ihres zu untersuchenden Gens FXN. In der Publikation wird gezeigt, dass die Expression der Non-Target auch ebenfalls niedriger als der Wild-Typ-Kontrolle (eine neuroblastoma Zell-Linie, SH-SY5) war. Hier war das FXN-Level von NT 77% des FXN-Levels der Wildtyp-Kontrolle. Mit diesen Zellen hatten sie z.B. den Einfluss von FXN auf die Proliferation untersucht, in dem sie Wachstum-Kurve ihrer Zellpräparationen erstellt hatten. Hier waren die Wachstums-Kurven dieser beiden Kontrollen ähnlich, aber die Wildtyp-Zellen wuchsen etwas schneller. Diese und obengenannte Beobachtungen zeigen, dass die Non-Target-Kontrolle bei dem Knockdown-Versuch einiger Gene die Expression dieser Gene sogar unterdrückt. Außerdem könnten sie auch die Expression anderer Gene unterdrücken, sodass ein Unterschied zwischen den Wildtyp-Zellen und den Non-Target-Zellen in den zu untersuchenden Parametern beobachtet wurde.

5.3 Invasion von Melanom-Zellen und ZO-1 Proteinlevel

Melanomzellen können sowohl als Einzelzellen als auch als Gruppe migrieren oder invadieren. Bei der kollektiven Invasion gibt es forderere hochmobile Zellen, die die Migrations-Spur für die hinteren Zellen bilden. In *ex vivo* Primär-Melanom-Modellen, die in 3D-Kollagen-Matrix kultiviert werden, war die Invasion der multizellulären Kluster von der Funktion von β 1-Integrin-1 abhängig. Hier wurde außerdem gezeigt, dass die β 1-Integrin-Expression in forderen invadierenden Zellen konzentriert war (Hegerfeldt, et al., 2002). Als Einzelzellen migrieren die Krebszellen durch eine amöboide- oder mesenchymale Bewegung. Die Zellen mit der mesenchymalen Bewegung sind spindelförmig und die Migration bzw. Invasion ist abhängig von der Adhäsion durch Integrin und von der Anwesenheit der Kontraktionskraft an beiden Zell-Enden. (Friedl und Wolf, 2003).

Smalley, et al. (2008) beschrieben die generellen Vorteile von 3D-Kulturmodellen im Vergleich zu dem konventionellen Kulturmodell und zu dem Tiermodell. Die adhärente Kultur

berücksichtigt nicht, dass Zellen in Wirklichkeit in einem 3D-Raum leben und sich an eine extrazelluläre Matrix anhaften. Tiermodelle hingegen sind sehr komplex und involvieren Interaktionen von unterschiedlichen Zelltypen in unbestimmter Weise, sodass es schwierig ist, die Effekte der einzelnen Variablen auf den zellulären Phänotyp zu sehen. Die 3D-Kulturmodelle sind eine gute Mittellösung zwischen der künstlichen Umgebung, die man in 2D-Kulturen hat, und der hohen Komplexität von Tiermodellen.

Zur Untersuchung der Invasion von Melanomzellen wurden für beide Tumorzellarten Sphäroide in Kollagen-Matrix sowie für WM35 zusätzlich der Boyden-Kammer-Assay durchgeführt.

5.3.1. Der Einfluss von ZO-1-Level auf die Sphäroid-Invasion

Sphäroide ähneln im Vergleich zu adhärenenten Zellen eher einem Tumor, weil sie aus mehreren Zellen in einem kompakten Kugel und nicht nur aus einer Zellschicht bestehen. Die Invasion der beiden Melanom-Linien war überwiegend eine kollektive Invasion, wo die meisten Zellen, die aus einem Sphäroid ausgewandert waren, sich gemeinsam in der Matrix invadieren.

In 1205Lu-Sphäroiden korreliert die Invasivität der Zellen wie postuliert mit dem ZO-1 Level, und zwar je mehr ZO-1, desto höher die Invasivität. Dem ist aber nicht so bei WM35-Zellen. Bei WM35-Sphäroiden sieht man noch nicht mal überhaupt eine signifikante Verminderung der Invasivität in den Knockdown-Sphäroiden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das ZO-1-Level von WM35 deutlich höher ist als das Level von 1205Lu-Sphäroiden, sodass eine Veränderung im ZO-1-Level bis 82% die Invasion von WM35-Sphäroiden nicht beeinflusst.

Eine verminderte Invasion bei geringerem ZO-1-Level, die in dieser vorliegenden Arbeit bei 1205Lu-Sphäroiden gefunden wurde, wurde auch von Polette, et al. (2005) in Mammakarzinom-Zellen beobachtet. Dabei war die Expression einer Matrix-Metalloproteinase, MT1-MMP (Synonym:MMP-14) nach der Herunterregulation vom ZO-1-Level niedriger geworden. Dieses Enzym degradiert Kollagentyp-1. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Invasivität bei höherem ZO-1-Level von 1205Lu-Zellen zunahm. Darüber hinaus berichtete Polette, et al (2007) dass ZO-1 und β -Catenin während der Migration von der Membran in das Zytoplasma und anschließend ins Nukleus gelangen, wo sie den β -Catenin/TCF/LEF-Weg aktivieren. Ein Zielgen dieses Signalwegs ist MMP-14. Die Expression dieser Proteinase ist bei der Migration von Brustkrebszellen hochgeschaltet.

Smalley et al. (2005) hat auch die WM35-Linie auf die Invasion getestet und fand aber bei einer Herunterregulation der ZO-1-Expression von ca. 90% eine deutliche verminderte Invasivität. Bei unseren Sphäroidsinvasions-Untersuchungen wurde eine

Herrunterregulation des ZO-1-Levels von 82% detektiert. Die 52-Zellen hatten 82% weniger ZO-1 als die Wildtyp-Kontrolle. In dieser Arbeit wurden andere shRNA-Sequenzen verwendet als in der Arbeit von Smalley, et al (2005). Die shRNA-Sequenz, die in der Smalleys Arbeit verwendet wurde, wurde am Anfang der shRNA-Technologie entwickelt und könnte einen Mangel in der Auswahl der Sequenz haben. In dieser Doktorarbeit wurde hingegen shRNA-Sequenzen verwendet, die aus der shRNA-Bibliothek des RNAi Konsortiums stammen, welche insgesamt shRNA-Sequenzen von rund 15000 humanen und 15000 murinen Genen beinhaltet. Die shRNA-Sequenzen wurden sorgfältig nach strikten Richtlinien entworfen, um die möglichen Off-Target-Effekte zu minimalisieren (Moffat et al., 2006). Außerdem kann man den Zielbereich der shRNA-Sequenz von Smalley, et al. in den ZO-1-Transkripten, die in NCBI vorgelegt wurden, nicht finden.

Es könnte aber sein, dass die Reduktion des ZO-1-Levels in den WM35-Sphäroiden nicht genug ist, um die Invasion durch ZO-1-Level-Veränderung zu modulieren, weil es eine Diskrepanz von 8% zwischen der erreichten Reduktion in dieser Doktorarbeit und der Arbeit von Smalley, et al. (2005) gibt. Ein Unterschied von 8% ist aber nur ein kleiner Unterschied in der Herrunterregulation von ZO-1-Level. Es wurde aber versucht, die Plasmide von Smalley, et al. zu erhalten. Diese Plasmide waren leider bei einem Tiefkühlunfall im Labor von Smalley, et al. abhanden gekommen.

Darüber hinaus gab es technische Unterschiede zwischen der Arbeit von Smalley et al. (2005) und dieser vorliegenden Arbeit. Das Kulturmedium war anders. Während in dem Kulturmedium von Smalley die Basal-Medien, MCDB153 und L15, verwendet wurden, wurde RPMI 1640 als das Basal-Medium in dieser Doktorarbeit verwendet. Ein weiterer Unterschied ist der Gehalt von FCS (fetales Kälberserum) in dem Kulturmedium. Smalley et al Kulturmedium enthielt 2% FCS. Im Gegensatz dazu enthielt unseres Medium 10% FCS. FCS versorgt die Kulturen mit Hormonen, Cytokinen, Wachstums- und Anheftungsfaktoren, Bindungs- und Transportproteinen (z. B. Fibronectin und Transferrin), mit zahlreichen Aminosäuren, anorganischen Salzen, Spurenelementen sowie Puffer- und Neutralisationssystemen, wie z. B. Albumin, Immunglobulinen oder Proteaseinhibitoren. Neben höhermolekularen Stoffen wie Polypeptiden, Wachstumsfaktoren und Hormonen, werden mit dem Serum auch Cholesterin, Fettsäuren und Lipide in die Zellkultur eingebracht (Gstraunthaler und Lindl, 2013). Außerdem hatten Smalley et al. zusätzlich Insulin in ihr Medium eingebracht. Deshalb könnte es sein, dass die Zellen in den beiden Arbeiten ein anderes Verhalten zeigten, da die verwendeten Medien sich stark unterschieden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Arbeiten ist die Zeit der Sphäroids-Herstellung. In dieser Arbeit wurden die Zellen auf dem Agar für 3 Tage zur Herstellung für Sphäroiden inkubiert. Hingegen war die Herstellungs-Zeit in Smalleys Arbeit 2 Tage.

Außerdem kann man nicht ausschliessen, dass die verwendete Kollagen-Konzentration anders ist. In dieser Doktorarbeit wurde 1 und 2 mg/ml Kollagen-Konzentration verwendet. Welche Konzentration in der Arbeit von Smalley verwendet wurde, wird in der Publikation nicht erwähnt. Einige dieser Unterschiede können der Grund sein, weshalb es einen Unterschied in den Ergebnissen der beiden Arbeiten gibt.

In den Versuchen mit 1205Lu-Sphäroiden wurde jedoch eine Korrelation zwischen den ZO-1-Levels und der Invasion gefunden. Je höher das Level dieses Proteins ist, desto höher ist die Invasion. Dies ist die erste Studie, die eine Abhängigkeit der Invasion von Melanomzellen zu den ZO-1-Levels beschreibt. In einer anderen Publikation wurde ebenfalls eine Korrelation zwischen den Levels eines anderen Proteins und der Invasion beschrieben. Jenkinson, et al. (2004) hat herausgefunden, dass die Levels des Proteins S100A4 mit der Invasion von unterschiedlichen Brustkrebs-Zell-Linien korrelieren. Je stärker dieses Protein exprimiert wurde, desto stärker ist die Invasion.

1205Lu-Wildtyp-Zellen hatten ein schnelleres Wachstum der Sphäroide als WM35. Die Invasion von 1205Lu-Sphäroiden war aber schwächer. Die Sphäroide waren am Anfang auch größer, aber nicht signifikant unterschiedlich. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Dass bei den 1205Lu-Sphäroiden schwächere Invasion beobachtet wurde, könnte dadurch kommen, dass das ZO-1-Level von 1205Lu niedriger als das von WM35 war. Die beobachteten Unterschiede im Sphäroidwachstum wurden aber wahrscheinlich nicht vom ZO-1-Level beeinflusst, sondern durch andere Mechanismen, da die Proliferation und die Dissoziation nicht mit der ZO-1-Expression korrelieren. Außer in ihrem ZO-1-Level haben diese beiden Linien Unterschiede in der Expression von vielen Genen, besonders weil sie aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben stammen. Während WM35 aus einem Primärtumor isoliert wurde, wurde 1205Lu aus einer Lungen-Metastase gewonnen. Ryu, et al. (2007) haben Mikro-Array-Analysen von Melanom-Zell-Linien aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben durchgeführt. Im Vergleich zu Zell-Linien, die aus Primärtumoren gewonnen wurden, hatten die metastatischen Zell-Linien höhere Expressionen von Genen, die sich an dem Zell-Zyklus und an der Proliferation beteiligen z.B. ZWINT, CDCA2, NCAPH, NCAPG, NCAPG2, PBK, NUSAP1, BIRC5, ESCO2, HELLS, MELK, and CDKN2C.

5.3.2 Einfluss des ZO-1-Levels auf die Einzel-Zell-Invasion und –Migration von adhärennten Zellen

Melanomzellen können auch einzeln oder kollektiv invadieren (Manning, et al., 2015; Weigelin, et al., 2012). Die Transwell-Migrations- und –Invasions-Assays oder die sogenannten Boyden-Kammer-Assays können verwendet werden, um die Fähigkeit von einzelnen Zellen, auf dem Chemoattraktanten zu reagieren und gerichtet zu dem Chemoattraktanten zu migrieren oder invadieren, zu testen (Justus, et al., 2014). Diese Assays

nutzen eine Matrigel-Schicht auf einem porösen Filter, der die obere Kammer, in dem die Zellen eingesät sind, von der unteren Kammer, wo der Attraktant, FCS, zugefügt ist, trennt. Durch die Zugabe der Matrigel-Schicht kann man die Invasion von Zellen untersuchen.

In dieser Doktorarbeit wurde die Invasion von WM35-Zellen untersucht. Interessanterweise wurde die höchste Invasion bei mittlerem ZO-1-Level (ca. 59% des Non-Target-Levels) gefunden. Die Invasion bei geringerem oder höherem ZO-1-Level war niedriger. In Yap, et al. (2005) wurde es beschrieben, dass bei dem mittleren Level von Cofilin die höchste Motilität der von Ihnen untersuchten Glioblastoma-Zellen gefunden wurde. Die Zellen mit der mittleren Cofilin-Expression hatten in 5 Minuten die weiteste Strecke im Vergleich zu anderen Zellen zurückgelegt.

Während die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Einzel-Invasion von WM35-Zellen quadratisch war, beeinflusste das ZO-1-Level nicht die Invasion in die Kollagen-Matrix. Dieser Unterschied kann durch mehrere Faktoren entstehen. Der Invasionstyp bei der Sphäroid-Invasion war überwiegend eine kollektive Invasion (Valencia, et al., 2015, Kumar, et al., 2016). Im Gegensatz dazu invadierten die Zellen im Boyden-Kammer lediglich als Einzel-Zellen. In der kollektiven Invasion müssen die Zell-Zell-Verbindungen durch Cadherine oder Connexinen aufrechterhalten werden und die Invasion unterstützen, was in der Einzel-Zellinvasion nicht der Fall ist (Friedl und Wolf, 2003). Smalley et al. (2005) zeigte die Kollokalisierung von ZO-1 und N-Cadherin sowohl in metastatischen Melanomen als auch in den WM35-Zellen. Obwohl WM35 auch E-Cadherin exprimierten, befand sich nur N-Cadherin in der Zell-Zell-Verbindung, welches mit ZO-1 kollokalisiert war. Darüber hinaus assoziiert sich ZO-1 mit Gap-Junction durch direkte Interaktionen mit Connexinen, was auf eine generelle Funktion von ZO-1 in interzellulärer Adhäsion und Kommunikation hinweist. Die Zellen, die durch das Matrigel einzeln in dem Boyden-Versuch wandern, haben im Gegensatz zu der kollektiven Invasion, zuvor die Verbindungen zu ihrem Zellrasen gelöst.

Außerdem wurde im Boyden-Versuch eine andere extrazelluläre Matrix verwendet. Während im Sphäroid-Invasionsversuch Kollagen Typ-1 genutzt wurde, wurde im Boyden-Versuch eine Matrigel-Schicht verwendet. Das Matrigel-Matrix ist eine solubilisierte Basalmembran-Zubereitung, die aus einem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)- Maus-Sarkom extrahiert wird. Dieser Tumor ist reich an ECM-Proteinen. Der Hauptbestandteil ist Laminin, gefolgt von Kollagen IV, Heparan Sulfate Proteo-Glykan und Entaktin (Ohashi, et al., 2016). Hughes, et al. (2010) haben weitere Komponenten wie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und ihre Bindungsproteine im Matrigel gefunden. Basiert auf den Bestandteilen ähnelt Matrigel der Basalmembran, z.B. der Basalmembran von Endothelium, in die die Krebszellen während der hämatologischen Metastasierung eindringen (Albini,

1998; Kelley, et al., 2014). Kollagen-1 wird hingegen eher in dem Stroma eines Tumors oder Dermis gefunden (Fang, et al., 2014).

Der Unterschied in der verwendeten extrazellulären Matrix (ECM) könnte der Grund dafür sein, dass bei den Kollagen-Typ1-Invasionsassays keine Korrelation und bei den Matrigel-Boyden-Assays eine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Invasivität auftritt. Abhängig vom ECM-Substrat wird die Invasion von unterschiedlichen Integrinen reguliert. Die Integrine und andere Adhäsionsrezeptoren beteiligen sich an der Rekrutierung der Proteasen zu der Kontaktstelle, die dann die ECM-Komponenten degradieren (Friedl und Wolf, 2003). Außerdem verdauen Proteasen nur bestimmte ECM-Substrate. Kollagen 4, das im Matrigel enthalten ist, wird von Gelatinase B und Kollagenase 4 verdaut. Im Sphäroid-Invasionsassay wurde aber Kollagentyp-1 verwendet. Dieser Kollagen-Typ wird z.B. durch MT1-MMP degradiert (Visse und Nagase, Supplement, 2003).

Mit den Boyden-Kammern kann man außerdem die Migration analysieren. Hier waren Filter ohne Beschichtung im Einsatz. Wie bei der Einzel-Zell-Invasion war bei der Migration von WM35-adhärenenten-Zellen die Korrelation zwischen der ZO-1-Expression und der Zahl an migrierten Zellen quadratisch. Dies zeigte, dass die beiden Prozesse vom ZO-1-Level abhängen. Hier wurde auch ein Maximum der Migration bei einem mittleren ZO-1-Level von 59% gefunden. Manche Proteine beteiligen sich an Migration und Invasion z.B. CXCL5, CXCL8/IL-8, CXCL16 und ING4 (Xu, et al, 2014; Brysse, et al, 2012; Hatterman, et al, 2008; Li, et al, 2008). Brysse, et al. (2012) hat berichtet, dass die Expression des Chemokins, CXCL8/IL-8 durch ZO-1 in Brustkrebszellen gefördert wurde. Die Zell-Linien, die eine hohe CXCL8/IL-8-Expression besaßen, hatten auch eine hohe Zahl an invadierten Zellen bei den Matrigel-Boyden-Kammer-Versuchen. Youngs, et al. (1997) zeigten, dass die Migration der Brustkrebszell-Linie MCF-7, durch die Zugabe von CXCL8/IL-8 und anderen Chemokinen gefördert wurde. In verschiedenen Melanom-Zell-Linien wurde die Expression von IL-8 nachgewiesen (Schadendorf, et al., 1993).

Die Expression von IL-8 konnte auch in der vorliegenden Arbeit von dem ZO-1-Level abhängig sein, sodass es eine quadratische Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Migration bzw. Invasion gab. Hier gäbe es vermutlich ein Optimum-Level von IL-8 für die Invasion bzw. Migration. Wenn es zu wenig ist, wird die Invasion bzw. Migration von Zellen ungenügend durch IL-8 gefördert, aber wenn es zu viel ist, könnte es sogar diese Prozesse inhibieren. Tatsächlich wurde es von Lin, et al. (2004) nachgewiesen, dass es eine optimale Konzentration für IL-8 gibt, bei der die maximale Migration von Neutrophilen gefunden wurde.

5.3.3 Der Einfluss der Ursprungs-Gesamtfläche und der Einfluss der Kollagen-Konzentration auf die Sphäroid-Invasion

Am Anfang der Versuche besaßen die Sphäroide der 1205Lu-Zellpräparate unterschiedliche Gesamtflächen, die zwischen 73000 und 521000 μm^2 lagen. Die Größe dieser Fläche beeinflusste aber nicht die Entwicklung von 1205Lu-Sphäroiden in dem Kollagengel. Dies bedeutet, dass es keine Korrelation zwischen der Fläche im Zeitpunkt 0 Std. und dem Sphäroidwachstum oder der Sphäroidsinvasion gab.

Während die Ursprungsgesamtfläche die 1205Lu-Sphäroidinvasion und das Sphäroidwachstum nicht beeinflusste, beeinflusste sie die Invasion und das Sphäroidwachstum von WM35. Je größer die Ursprungsgesamtfläche ist, desto stärker ist die Invasion und desto schneller ist das Sphäroidwachstum (um 18%). Ein Grund hierfür könnte der Unterschied des Ursprungs der Zellen sein. Wahrscheinlich spielt die Ursprungsgesamtfläche eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Primärmelanomen, wenn sie invasiver werden. Das Tumorregisterzentrum München (2015) hatte den Verlauf der Krankheit über 10 Jahre verfolgt und berichtete, dass die Tumordicke eines Primärtumors das Überleben von Patienten bestimmte. Während 72% Melanom-Patienten mit einer Tumordicke von ≤ 2 mm nach 10 Jahren überlebten, überlebten nur 24 % Patienten mit einer Tumordicke > 4 mm.

Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen 1 und 2 mg/ml-Kollagenkonzentration in der Invasion von 1205Lu- und WM35-Sphäroiden gefunden. Bei einer geringeren Kollagenkonzentration gibt es weniger physische Hemmung als bei einer höheren Kollagenkonzentration (Blacher, et al., 2014). Außerdem gibt es weniger Kollagen-Protein, das die Matrix-Proteinasen verdauen müssen. Deshalb können sich die Zellen einfacher im Kollagen mit niedrigerer Konzentration bewegen oder ausbreiten. Die 1205Lu-Sphäroide wuchsen schneller im 1 mg/ml Kollagen-Matrix als im 2 mg/ml Kollagen. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Kollagenkonzentration nicht das Sphäroid-Wachstum von WM35.

5.4 Dissoziation von Melanom-Sphäroiden

Die Invasion der 1205Lu-Sphäroide in die Kollagen-Matrix hängt vom ZO-1-Level ab. Es stellt sich die Frage, ob dieser ZO-1-Effekt bei der Invasion wegen veränderter Zell-Zellverbindungs-Stärke entsteht, oder wegen veränderter aktiver Invasion. Bei der aktiven Invasion migrieren die Zellen eines Sphäroids, verändern ihre Form und verdauen die Matrix-Komponenten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Sphäroide zunächst rein durch mechanische Behandlung versucht zu dissoziieren, aber es war nur ein geringer Effekt auf die Dissoziation nachweisbar. Die Sphäroide blieben auch nach mehrmaligem Pipettieren

intakt und ihre Größe hatte sich kaum verändert (Daten nicht gezeigt). Wan, et al. (2012) hatte dies ebenfalls beobachtet, zeigte aber, dass die Sphäroide aus Brustkrebszellen sich durch enzymatische Behandlung in einzelnen Zellen trennen lassen. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit eine Dissoziation mittels enzymatischer Behandlung – in Kombination mit der Mechanischen Behandlung – durchgeführt. Nun konnte tatsächlich eine Dissoziation der Sphäroide beobachtet werden.

Allerdings wurde keine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Dissoziationsrate in beiden Zell-Linien, 1205Lu und WM35, nachgewiesen. Das bedeutet, dass die Menge von ZO-1-Protein die Sphäroid-Dissoziation der 1205Lu-Linie bei ihrer Invasion nicht beeinflusst, sondern lediglich den aktiven Prozess der Invasion. Zellen haften aneinander über Zelloberflächlichen-Proteine, sogenannten Zell-Adhäsionsmolekülen (CAMs, Cell Adhesion Molecules). Cadherine sind die Haupt-CAMs, die für Ca^{2+} abhängige Zell-Zell-Verbindung verantwortlich sind. Smalley et al. (2005) hat nachgewiesen, dass ZO-1 N-Cadherin in Melanomzellen bindet. Die Lokalisation von N-Cadherin, die an dem Zell-Zell-Kontakt gefunden wurde, war aber nach der Herunterregulation der ZO-1-Expression gleich geblieben. Dies deutet darauf hin, dass ZO-1 zur N-Cadherin-basierten Zellverbindung rekrutiert wird, und nicht umgekehrt. Die N-Cadherin-Zellverbindung bzw. die Stärke der Zell-Zell-Verbindung wird nach dem ZO-1-Knockdown somit nicht verändert, wie es sich in dieser vorliegenden Arbeit herausgestellt hat.

Smalley et al. (2005) hat aber gezeigt, dass das WM35-Sphäroid mit vermindertem ZO-1-Level mechanisch leichter zu dissoziieren war als das Kontroll-Sphäroid. Während das shRNA-Sphäroid nach der mechanischen Behandlung aufgelöst war, blieb das Kontroll-Sphäroid intakt. In dieser Doktorarbeit musste die Dissoziation nicht nur mechanisch sondern auch enzymatisch durchgeführt werden, da sowohl die Knockdown-Sphäroide als auch die Kontroll-Sphäroide ohne die Zugabe von Trypsin nicht aufgelöst werden konnten. Wahrscheinlich war die Verbindungsstärke der Sphäroide in dieser Doktorarbeit einfach stärker als die der Sphäroide von Smalley. Während Smalley für 2 Tage die Zellen auf dem Agar zur Herstellung von Sphäroiden inkubierte, wurden sie in dieser vorliegenden Arbeit für 3 Tage inkubiert. Dies könnte der Grund sein, wieso in dieser Doktorarbeit eine stärkere Adhäsion in den Zellen der Sphäroide gefunden wurde als in der Arbeit von Smalley, die dann eventuell zu dem Unterschied der Ergebnisse dieser beiden Arbeiten führten.

Des weiteren wurde es aber festgestellt, dass am Anfang der Dissoziation der 1205Lu-Sphäroide zwischen 0-1 Minuten die Sphäroidsgröße eine Rolle spielt. Diese Abhängigkeit der Dissoziationsrate zu der Ursprungsgröße wurde aber nur bei 1205Lu und nicht bei WM35 gefunden. Es könnte sein, dass diese Abhängigkeit spezifisch für Zell-Linien ist, die aus Metastasen isoliert wurden, da die 1205Lu-Zellen aus einer Lungenmetastase

etabliert wurden. Es könnte aber auch sein, weil ihr Sphäroid größer als WM35 ist, was wahrscheinlich die Dissoziation begünstigte.

5.5 Proliferation von Melanomzellen

Eine aufrechterhaltende Proliferation ist für den Wachstum von Tumoren oder Metastasen erforderlich. In einigen Publikationen wurde die Funktion von ZO-1 bei der Zellteilung beschrieben. ZO-1 interagiert mit einem Transkriptionsfaktor, ZONAB, das die Zellproliferation von Aderhautmelanomzellen (Jayagopal, et al., 2011) und Epithel-Zellen (Balda und Matter, 2000; Qiao, et al., 2014) reguliert. In proliferierenden Zellen kommt ZONAB hauptsächlich im Nukleus vor, wo es die Proliferation durch die Bindung mit CDK4 und die Hochregulation von 'Proliferating Cell Nuclear Antigen' (PCNA) und cyclin D1 fördert (Sourisseau, et al., 2006). In langsam oder nicht proliferierenden Zellen ist das nukleäre Level reduziert. Das ZONAB-Protein ist dann vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo es ZO-1 bindet. Das ZO-1-Level ist in wachsenden Zellen niedrig und ist maximal in konfluenten Zellen (Balda und Matter, 2000; Qiao, et al., 2014).

Basierend auf den oben genannten Erkenntnissen wird vermutet, dass ZO-1 als ein Inhibitor der Proliferation fungiert und infolgedessen ein Verlust vom ZO-1 eine erhöhte Proliferation verursachen kann. Bei den BrdU-Versuchen gab es aber keine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Proliferation. Darüber hinaus gab es bei den Kollagen-Invasions-Versuchen auch keine Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und dem Sphäroidwachstum. Umeda, et al. (2004) zeigte ebenfalls an Maus-Epithel-Zellen, dass es zwischen Wildtyp- und Knockout-Epithelzellen keinen Unterschied bei der Zellteilung gab. In einer anderen Studie wurde darüberhinaus gezeigt, dass Knockout- und Wildtyp-Embryonen fast die gleiche Anzahl von proliferativen Zellen besaßen (Katsuno, et al., 2008).

Des weiteren wurde die Proliferation der Wildtyp-Zellen der beiden Melanom-Linien verglichen. 1205Lu-Zellen hatten eine schnellere Proliferationsrate und wie zuvor beschrieben auch ein schnelleres Wachstum der Sphäroide als WM35. Da das ZO-1-Level sowohl die Proliferation von adhärennten Zellen als auch das Sphäroidwachstum in den beiden Linien nicht beeinflusste, gibt es vermutlichlicherweise andere Genexpressions-Unterschiede zwischen den beiden Linien, welche eine Rolle bei der Proliferation spielen (siehe Kapitel 5.3.1).

6. Zusammenfassung

ZO-1 ist in malignen Melanomen exprimiert, aber nicht in Melanozyten. In einer früheren Studie führte der shRNA-Knockdown von ZO-1 in WM35-Melanomzellen zu verminderter Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Invasivität. In der Vorarbeit in unserem Labor konnte ZO-1 Expression aber bereits in benignen Nävuszellnävus (NZN) nachgewiesen werden, was gegen die reine An- bzw. Abwesenheit von ZO-1 als entscheidenden Faktor für die Malignität spricht. Die Hypothese, die in dieser Arbeit getestet werden sollte, war daher, dass das ZO-1-Proteinlevel die Malignität von Melanomzellen beeinflusst.

Die ZO-1 Expression war in 4 verschiedenen Melanomlinien unterschiedlich und das Invasionsverhalten dieser Linien im Verhältnis zum ZO-1 Level passt sehr gut zu der obengenannten Theorie, wie in dieser Doktorarbeit und in den Arbeiten aus der Vorgängerarbeit von Claudia Böhner gezeigt wird. Aus diesen Linien wurden dann die zwei Linien mit dem höchsten ZO-1 Gehalt, 1205Lu und WM35, genommen und daraus Zellen mit unterschiedlichen ZO-1 Gehalt durch lentiviralen Knockdown etabliert.

Durch die Verwendung von 5 verschiedenen shRNA-Lentiviren konnten Melanomzellen mit unterschiedlichen ZO-1-Level generiert werden. Die shRNA-52 erzielte die beste Herunterregulation der ZO-1-Expression in beiden Zell-Linien. Zur genaueren Untersuchung der Rolle des ZO-1-Levels im Melanom wurden zusätzlich Zellen mit einem mittleren Knockdown verwendet. Bei WM35-Zellen war der Knock-down Ansatz mit shRNA-55, bei 1205Lu mit shRNA-54.

Melanomzellen können einzeln oder kollektiv invadieren. Die kollektive Invasion kann in 3-dimensionaler Matrix-basierter Zellkultur untersucht werden. Hier wurden aus den Zellen Sphäroide hergestellt, welche anschließend in einem Kollagen-Typ-1-Gel eingebettet wurden. Die Invasion der 1205Lu Melanomzellen wurde vom ZO-1-Level bestimmt. Eine Zunahme der ZO-1-Menge von 20% führte zu einer Erhöhung der Invasivität um 14%. Dahingegen war die Invasion von WM35-Sphäroiden vom ZO-1-Level unabhängig. Die Invasion in einem geringeren Kollagengehalt war höher als in einem höheren Kollagengehalt. Dies betrifft die beiden Zell-Linien und sowohl Wildtyp- also auch Knock-down-Zellen.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob ZO-1 statt der kollektiven Invasion die Invasion von WM35-Einzel-Zellen beeinflusst. Hierzu wurde die Invasion von Zellen durch einen mit Matrigel-beschichtetem Filter in einer Boyden-Kammer untersucht. Hier wurde eine Abhängigkeit der Invasion vom ZO-1 Level beobachtet. Die höchste Invasion wurde bei mittlerem ZO-1-Level mit ca. 60% des Kontroll-Levels gefunden. Die Invasion bei niedrigerem oder höherem ZO-1-Level ist niedriger. Darüber hinaus wurde die Migration anhand der unbeschichteten Membranen in den Boyden-Kammern untersucht. Hier wurde auch bei einem mittleren ZO-1-Level die höchste Zahl an migrierten Zellen gefunden.

Vermutlicherweise werden Gene, die an beiden Prozessen beteiligt sind, durch ZO-1 reguliert. Weiterhin konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass das ZO-1-Level weder die Dissoziation noch die Proliferation der hier untersuchten Melanomzellen beeinflusst.

Aus den Ergebnissen dieser Doktorarbeit wurde festgestellt, dass ZO-1 spezifisch nur die Invasion und nicht die anderen tumorbiologischen Prozesse beeinflusst. Dabei ist nicht nur die reine Anwesenheit oder die Abwesenheit dieses Proteins entscheidend, sondern das ZO-1 Level. Darüber hinaus ist der Einfluss unterschiedlich in unterschiedlichen Melanom-Zell-Linien.

6.1 Summary

ZO-1 is expressed in malignant melanomas but not in melanocytes. In a former study the shRNA-knockdown of ZO-1 in WM35 melanoma cells resulted in less cell-cell-adhesion and cell invasion. In a previous work in our lab, the ZO-1 expression could be detected also in Nevus Cell Nevi, which shows that different ZO-1 expression level than simply its presence may mark invasiveness. The hypothesis, which had to be tested in this study, was that the ZO-1 protein level affects the malignancy of melanoma cells.

The ZO-1 expression of 4 different melanoma cell lines was different and the invasivity of these cell lines was correlated with the ZO-1 level, which fits the above theory well, as it is shown in this study and in the previous study of Claudia Böhner. From these cell lines, two cell lines with the highest ZO-1 level, 1205Lu and WM35 were chosen and out of these cells cells with different ZO-1 level were established.

By the utilisation of 5 shRNA lentiviruses, melanoma cells with different ZO-1 level were generated. The shRNA 52 delivered the best knockdown in both cell lines. For more accurate investigation of the role of ZO-1 levels in melanoma, cells with moderate knockdown were also used. In WM35 cell line, the shRNA-55 knockdown preparation was used and in 1205Lu, the shRNA-54.

Melanoma cells can invade either individually or collectively. The collective invasion can be examined in 3-dimensional matrix based cell culture. Out of these cells, spheroids were built, which then afterwards embedded in collagen type I gel. The invasion of 1205Lu cells was determined by the ZO-1 level. An increase of 20% in the ZO-1 level resulted in an elevated invasivity of 14%. In contrast, the invasion of WM35 spheroids did not depend on the ZO-1 level. The invasion in lower collagen concentration was stronger than in higher collagen concentration.

Furthermore, it was investigated whether ZO-1 controls the single cell invasion of WM35 cells rather than its collective invasion. For this, the invasion of cells through matrigel coated filter in a boyden chamber was examined. Here the dependency of the invasion on

the ZO-1 level was observed. The highest invasivity was found at mid ZO-1 level (60% of the control level). The invasion at lower and higher ZO-1 was lower. In addition the migration was investigated by using uncoated membranes in the boyden chambers. Here the highest number of migrated cells was found also at moderate ZO-1 level. The genes which play a role in these two processes may be regulated by ZO-1.

Beside that I can show in this study, that ZO-1 specifically influences the invasion but not other tumorbiological processes. Thereby it is not only the presence nor the absence of this protein which is crucial but the ZO-1 level.

7 Literaturverzeichnis

- Albini, A., et al. (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, 47,12, 3239-3245
- American Cancer Society. (2015). What are the key statistics about melanoma skin cancer? <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>
- American Cancer Society. (2015). What are the key statistics about melanoma skin cancer? <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>
- Balch, C. M., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol* 27, 36, 6199-6206.
- Balda, M. S., und Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO* 19, 9,, 2024-2033
- Balzer, E. M., und Konstantopoulos, K. (2012). Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4, 2, 171-181
- Bani, M. B., et al. (1996). Multiple Features of Advanced Melanoma Recapitulated in Tumorigenic Variants of Early Stage (Radial Growth Phase) Human Melanoma Cell Lines: Evidence for a Dominant Phenotype. *Cancer Res* 56, 3075-3086.
- Baykal, C. und Yazganoğlu, K. D. (2014). *Clinical Atlas of Skin Tumors*. Springer Verlag: Berlin
- Bao, Q. et al (2007). Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. *Mol Cell*, 26, 25, 2, 181-92.
- Bauer, H., et al. (2010). The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *J Biomed Biotech* 2010, 1-11
- Blacher, S. et al. (2014). Cell Invasion in the Spheroid Sprouting Assay: A Spatial Organisation Analysis Adaptable to Cell Behaviour. *PLOS ONE* 9, 5, e97019, 1-10
- Bohner, C. et al. (2011). Differential expression of ZO-1 in melanoma and nevi and their tumor microenvironment – an indicator of malignancy. *Exp Dermatol*, 20, 162–216, P216
- Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2002). Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44, 1–15.

- Bolinches-Amorós, A., et al. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Front. Cell. Neurosci* 8, 124, 1-15
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Bryse, A., et al. (2012). Regulation of CXCL8/IL-8 Expression by Zonula Occludens-1 in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 10, 121-132
- Carmeliet, P., und Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.
- Carvalho, L. (2006). Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 59, 9, 961-8.
- Chang, A. E., et al. (1998). The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* 83, 8, 1664-1678.
- D'Atri, F., und Citi, S. (2002). Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review). *Mol Membr Biol* 19, 103-112
- Davies, M. A. und Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545–5555
- Derangeon, M., et al. (2009). Reciprocal influence of connexins and apical junction proteins on their expressions and functions. *Biochim Biophys Acta* 1788, 768-778
- Deutsche Krebsgesellschaft (2015). Malignes Melanom. <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/malignes-melanom-schwarzer-hautkrebs.html>.
- Ebnet, K., et al. (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 275, 27979-27988
- Fang, M. et al. (2014). Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biol.* (2014) 35:2871–2882
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2009). Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 113–120

- Fanning, A. et al. (2012) Zonula Occludens (ZO)-1 and -2 Regulate Apical Cell Structure and the Zonula Adherens Cytoskeleton in Polarized Epithelia. *Mol Biol Cell* 23, 577-590
- Fernández, E. A. et. al. (2008). Improving 2D-DIGE protein expression analysis by two-stage linear mixed models: assessing experimental effects in a melanoma cell study. *Bioinformatics*, 24, 23, 2706–2712
- Fleming, T. P., et al. (1989). Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: Control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J Cell Biol* 108, 1407–1418
- Friedl, P. und Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 362-374
- Friedl, P., et al. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48, 441–449
- Friedl, P. et al. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 14, 777-783
- Fritsch, P. (2009). *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer Medizin Verlag: Heidelberg
- Fuchs, F. (2011). Charakterisierung humaner Merkelzellkarzinom-Zelllinien unter besonderer Berücksichtigung der Expression von Tight Junction-Proteinen. Dissertation. Universität Hamburg
- Gaggioli, C., und Sahai, E. (2007). Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 20, 161–172
- Galagher, et al. (2005). Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* 26, 11, 1856-1867
- Goebeler, M., et al. (2012). *Augenheilkunde, Dermatologie, HNO : IN 5 TAGEN*. Online Ausgabe. Springer. S. 260-263
- Gstraunthaler, G, und Lindl, T. (2013) *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Springer-Spektrum, Heidelberg
- Gumbiner, B. et al. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8, 3460–3464
- Gupta, G. P. und Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127, 679-695
- Haass, N. K. et al. (2003). Expression patterns of tight junctions proteins in Merkel cell carcinoma and adjacent epidermis. *The Merkel Cell* 223-226

- Haass, N. K. et al. (2004). The role of altered cell–cell communication in melanoma progression. *Journal of Molecular Histology* 35, 309-318
- Haass, N.K. et al. (2008). The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res*, 14, 230–239
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674
- Haskins, J. et al. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occluding. *J Cell Biol*, 141, 1, 199–208
- Hattermann, K., et al. (2008). The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6. *Mol Cell Neurosci* 39, 1, 133-141
- Hausser, J. et al. (2013). Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Research* 23, 604-615
- Hegerfeldt, Y., et al. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*. 62, 2125–2130.
- Hirohashi, S., und Kanai, Y. (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*, 94, 575-581
- Hocker, T. L. et al. (2009). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol*, 128, 11, 2575-95.
- Howarth, A. G. et al. (1992) Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol*, 262, C461-C469
- Hughes, C. S., et al. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010, 10, 1886–1890
- IBM. (2012). Knowledge Center: Lineare gemischte Modelle. http://www-01.ibm.com/support/knowledgecenter/SSLVMB_21.0.0/com.ibm.spss.statistics.help/idh_mixl.htm?lang=de
- Itoh, M. et al. (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138, 1, 181–192
- Itoh, M. et al. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147, 5, 1351-1363

- Jayagopal, A. et al. (2011). Tight Junction–Associated Signaling Pathways Modulate Cell Proliferation in Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52, 1, 588-593
- Jenkinson, S. R., et al. (2004). S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer*, 90, 253 – 262
- Jesaitis, L. A. und Goodenough, D. A. (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein, *J Cell Biol*, 124, 6, 949–961
- Juhasz, I. et al. (1993). Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* 143, 2, 528-537
- Justus, C. R., et al. (2014). *In vitro* Cell Migration and Invasion Assays. *J. Vis. Exp.* 88, e51046.
- Kaihara, T., et al. (2003). Redifferentiation and ZO-1 reexpression in livermetastasized colorectal cancer: Possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Sci* 94, 2, 166-172
- Karp, G. (2005). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. Ausgabe:4. s. 265. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken
- Katsuno, T., et al. (2008). Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. *Mol Biol Cell*, 19, 2465-2475
- Kausalya, P. J. (2001) Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells, *FEBS Letters*, 505, 1, 92–96.
- Kelley, L. C., et al. (2014). Traversing the basement membrane in vivo: A diversity of strategies. *J. Cell Biol.* Vol. 204 No. 3 291–302
- Kim, C., et al. (2010). Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. *The Oncologist*, 15, 765–771
- Kimura, Y., et al. (1997). Expression of Occludin, Tight-Junction-Associated Protein, in Human Digestive Tract. *Am J Pathol* 151, 45-54
- Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170
- Kirschner, N., et al. (2010). Tight Junction: is there a role in dermatology. *Arch Dermatol Res* 302, 483-493
- Klein, C. E., et al. (1991). Identification of a Melanoma Progression Antigen as Integrin VLA-2 *J Invest Dermatol* 96, 281–284

- Kleeff, J., et al. (2001). Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas* 23, 259-265
- Kumar, S., et al. (2016). Proteolytic and non-proteolytic regulation of collective cell invasion: tuning by ECM density and organization. *Sci Rep* 6, 19905, 1-17
- Lacrouette, A., et al. (2007). Loss of oncostatin M receptor β in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 26,6, 881–892.
- Laing, J. G., et al. (2001). Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 276, 23051-23055.
- Laing, J. G., et al. (2005). ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells. *J Cell Sci* 118, 2167-2176
- Li, J., et al. (2008). Role of ING4 in human melanoma cell migration, invasion and patient survival. *Carcinogenesis*, 29, 7, 1373–1379
- Li, G., et al. (2001). N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. *Cancer Res* 61, 3819-3825
- Li, X. *et al.* (2004). Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, β TC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochem Cell Biol*, 122, 5, 485–498.
- Liang, S., et al. (2008). Hydrodynamic shear rate regulates melanomaleukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. *Ann Biomed Eng* 36, 4, 661–671.
- Lin, F., et al. (2004). Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 576–581
- Lodish, H., et al. (2000) *Molecular Cell Biology*. Ausgabe: 4. W. H. Freeman: New York
- Maaser, K., et al. (1999). Functional Hierarchy of Simultaneously Expressed Adhesion Receptors: Integrin α 2 β 1 but Not CD44 Mediates MV3 Melanoma Cell Migration and Matrix Reorganization within Three-dimensional Hyaluronan-containing Collagen Matrices. *Molecular Biol Cell* 10, 3067–3079
- Martin, T. A., et al. (2004). Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 40, 2717–2725
- Manning, C. S., et al. (2015) Intravital imaging of SRF and Notch signalling identifies a key role for EZH2 in invasive melanoma cells *Oncogene* August 13, 34, 33, 4320-4332.
- Melchiori, A., et al. (1995). The α 3 β 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res* 219, 233–242.

- Mobley, A. K. et al. (2012). Driving transcriptional regulators in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31, 3, 621-632
- Moffat, J., et al. (2006). A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124, 1283-1298
- Moll, I. (2016). *Dermatologie*. Ausgabe: 8. Thieme: Stuttgart
- Muijen, GNP. et al. (1991). Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* 48, 85-91
- Niessen, CM. (2007). Tight junction/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-2532
- Ohashi, K., et al. (2016). Methods for Implantation of Matrigel Matrix into Mice Tissue Fix. http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/an_DL_036_Methods_for_Implantation_of_Matrigel_Matrix_into_Mice_Tissue_Fix.pdf
- Petz, M., et al. (2012). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res* 40,1, 290-302
- Polette, M. et al. (2005). Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression Is Regulated by Zonula Occludens-1 in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, 65, 17, 7691-7698
- Polette, M. et al. (2007). β -Catenin and ZO-1: Shuttle Molecules Involved in Tumor Invasion-Associated Epithelial-Mesenchymal Transition Processes. *Cells Tissues Organs* 185, 61-65
- Qiao, I. R. et al. (2014) Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3 silencing on kidney collecting duct principal cell proliferation and adhesion, *Cell Cycle*, 13,19, 3059-3075
- Resnick, M. B., et al. (2005). Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol* 36, 886-892
- Robert Koch Institut. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe.
- Ryu, B., et al. (2007). Comprehensive Expression Profiling of Tumor Cell Lines Identifies Molecular Signatures of Melanoma Progression. *Plos One* 7, e594
- Sandru, A. et al. (2014). Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life* 7, 4, 572-576
- Schadendorf, D., et al. (1993). IL-8 Produced by Human Malignant Melanoma Cells in Vitro Is an Essential Autocrine Growth Factor. *J Immunol* 151, 2667-2675,

- Schmidt, A. *et al* (2004). Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci* 61, 11, 1354-1365
- Seftor, R. E., *et al.* (2001). Cooperative interactions of laminin 5 γ 2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61, 17, 6322–6327.
- Seftor, E. A., *et al.* (2002). Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 19, 233–246
- Seltman, H. J. (2015). Experimental Design and Analysis: Chapter 15. <http://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/Book.pdf>
- Smalley, K. S., *et al.* (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
- Smalley, K. S. M., *et al.* (2008). In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 1-10.
- Soengas, M. S., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409, 6817, 207-11.
- Sourisseau, T. *et al.* (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26, 2387–2398.
- Stevenson, *et al.* (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
- Taliana, L., *et al.* (2005). ZO-1: Lamellipodial Localization in a Corneal Fibroblast Wound Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1, 96-103
- Talmadge, J. E. und Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res*, 70, 5649-5669
- Trikha, M. *et al.* (1997). The high affinity α 5 β 3 integrin is involved in invasion of human melanoma cells. *Cancer Res* 57, 2522–2528
- Toyofuku, T., *et al.* (1998). Direct association of the gap junction protein connexin43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273, 12725-12731

- Tumorregister München. (2015). Tumorstatistik: Überleben C43: Malignes Melanom.
http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C43__G.pdf.
Herruntergeladen am 17.02.2015.
- Tuomi, S., et al. (2009). PKC ϵ Regulation of an $\alpha 5$ Integrin–ZO-1 Complex Controls Lamellae Formation in Migrating Cancer Cells. *Sci Signal* 2, 77, ra32, 1-15
- Umeda, K., et al. (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279, 44785-44794
- Utepbergenov, D. I., et al. (2006). Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain, *J Biol Chem*, 281, 34, 24671–24677
- Valencia, A. M. J., et al. (2015). Collective cancer cell invasion induced by coordinated contractile stresses. *Oncotarget* 6, 41, 43438-43451
- Van Belle, P.A., et al. (1999). Progression- related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum. Pathol.* 30, 562–567.
- Van Zijl, F., et al. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728, 1-2, 23–34.
- Visse, R. und Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Supplementary Data. Circ Res*, 92, 827-839.
- Wan, Y. H., et al. (2012). Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. *PLOS ONE*, 7, 9, e44640
- Weigelin, B., et al. (2012) Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion, *IntraVital*, 1, 1, 32-43
- WHO. International Agency of Cancer Research. (2012). Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalences Worldwide in 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Willott, E., et al. (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *PNAS* 90, 16, 7834-7838
- Wistar Institute. Melanoma cell lines grouped for BRAF/-N-ras/PTEN/CDK4 mutations.
<http://www.wistar.org/lab/meenhard-herlyn-dvm-dsc/page/melanoma-cell-lines-0>.
Heruntergeladen am 27. Mai 2013
- Wong, R.S.Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin* 30, 87, 1-14

- Woods, D. F., und Bryant, P. J. (1989). Molecular Cloning of the *Lethal(1) Discs Large-1* Oncogene in *Drosophila*. *Dev Biol* 134, 222-235
- Wu, H., et al. (2005). Pleiotrophin expression correlates with melanocytic tumor progression and metastatic potential. *J Cutan Pathol*. 32, 125–30.
- Xu, J., et al. (2012). ZO-1 Regulates Erk, Smad1/5/8, Smad2, and RhoA Activities to Modulate Self-Renewal and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 30, 1885-1900
- Xu, X., et al. (2014). Roles of CXCL5 on migration and invasion of liver cancer cells. *J Transl Med* 12, 193, 1-11
- Yap, C. T., et al. (2005). The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil Cytoskeleton*, 60, 3, 153-165
- Youngs, S. J., et al. (1997). Chemokines Induce Migrational Responses in Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Int J Cancer*, 71, 257-266
- Zbytek, B., et al. (2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol* 3, 5, 569–585

8 Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei Dimensionen
3D	drei Dimensionen
Abb.	Abbildung
AJ	Adhärens-Junction
AJCC	American Joint Committee on Cancer
anti-BrdU-POD	Anti-BrdU-peroxidase Antikörper
APG	Autophagy
ARVCF	Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome
BRAF	B-RAF (Rapid Accelerated Fibrosarcoma)
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAMs	Cell Adhesion Molecules
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CH	Schweiz
cm	Centimeter
Cx36	Connexin-36
Cx43	Connexin-43
Cx45	Connexin-45
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
DE	Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dlg	Drosophila septate junction protein Discs-large
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin

ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
ESZ	embryonale Stamm-Mauszellen
FCS	Fetales Kälberserum
FXN	Frataxin
Ga12	G protein, alpha 12
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
HBS	Hepes Buffered Saline
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
ING-4	Inhibitor Of Growth Family Member 4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JAM	Junctional Adhesion Molecule
K	Wildtyp-Kontrolle
Kb	kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
Kollagenkonz.	Kollagenkonzentration
LB	Lennox-Broth
ln	logarithmus naturalis
M	Molar
MAGUK	Membran-assoziierten Guanylatkinasen

MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
mg	miligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
Min.	Minuten
ml	mililiter
mm	millimeter
MM	Malignes Melanom
MMP-14	Matrix-Metalloproteinase-14
mRNA	messenger RNA
MT1-MMP	Membrane-Typ 1-Matrix-Metalloproteinase 1
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µM	mikroMolar
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
nm	nanometer
NT	Non-Target
NZN	Nävuszellnävi
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	das postsynaptische Dichte-Protein (PSD95/SAP90), das "Drosophila septate junction protein Discs-large" (Dlg), und ZO-1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAF	Rapid Accelerated Fibrosarcoma
RGP	Radial Growth Phase
RIPA-Puffer	Radioimmunopräzipitation-Assay- Puffer
RISC	RNA-induced silencing complex
ROI	Region of Interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S2	Sicherheitsstufe-2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SH3	Src-Homology 3
shRNA	small hairpin RNA
sig	Signifikanz
siRNA	small interfering RNA
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Std.	Stunden
TCF/LEF	T Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight-Junction
UK	United Kingdom, Das Vereinigte Königreich
USA	United States of America
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
VGP	Vertical Growth Phase

Versuchs-Nr.	Versuchs-Nummer
WHO	World Health Organization
WST Assay	Water Soluble Tetrazolium Salt Assay
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens-1
ZO-2	Zonula Occludens-2
ZO-3	Zonula Occludens-3
ZONAB	ZO-1-assoziiertes Nuklein-Säure-bindendes Protein

9 Anhang

9.1 Plasmide

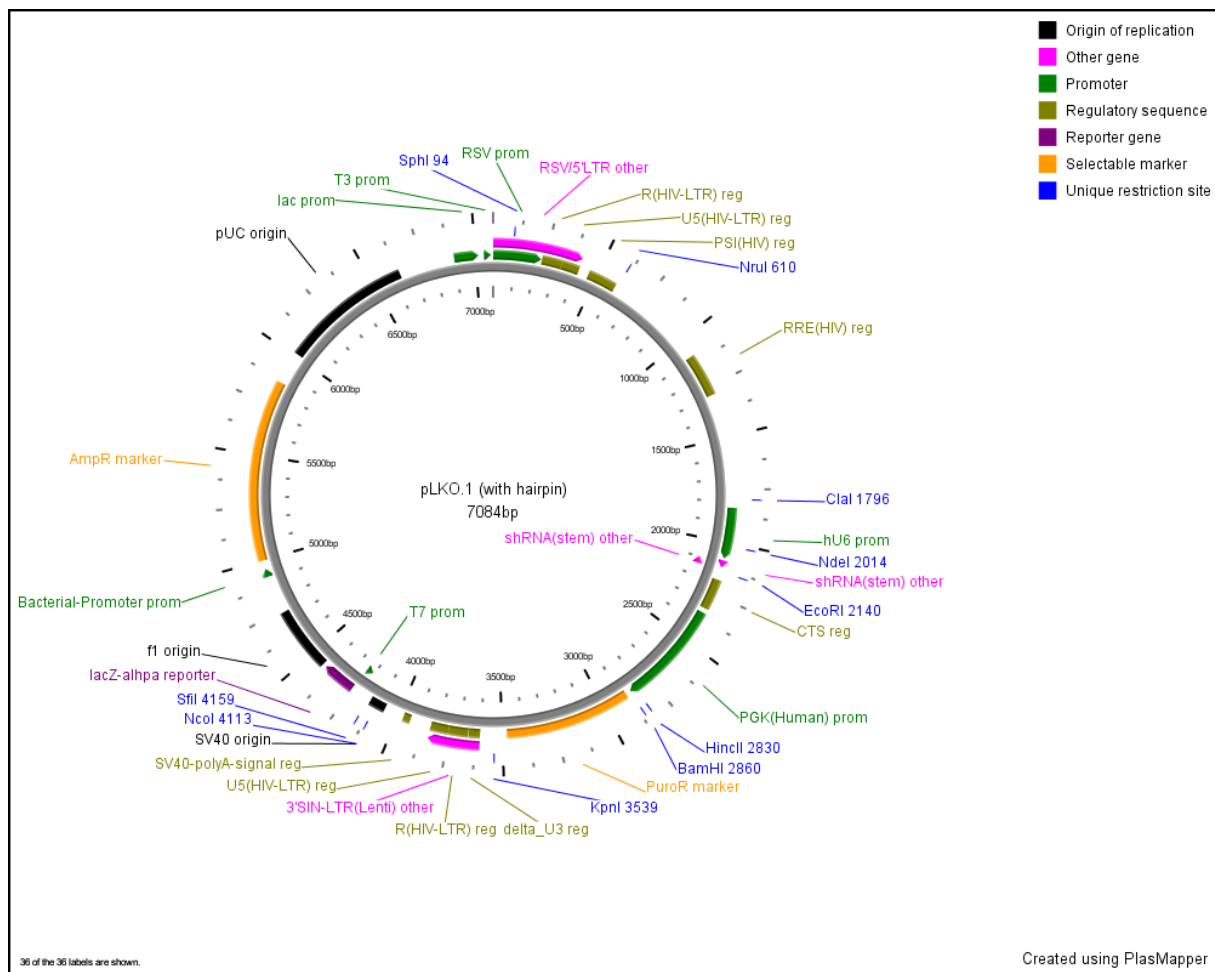


Abb 9.1: Der pLKO.1-puro-shRNA-Vektor. Der Vektor besitzt eine shRNA-Sequenz, die gegen bestimmte mRNA eines Gens oder gegen keine mRNA des Menschen und der Maus gerichtet ist (Open Biosystem)

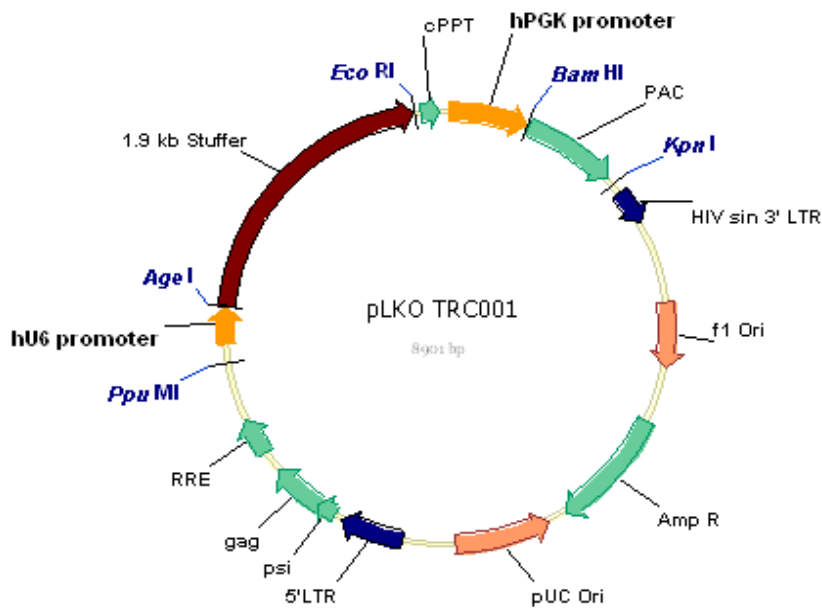


Abb 9.2: Der pLKO.1-puro-empty-Vektor. Der Vektor besitzt keine shRNA-Sequenz, die gegen bestimmte mRNA eines Gens oder gegen keine mRNA des Menschen und der Maus gerichtet ist (The RNAi Consortium, Broad Institute)

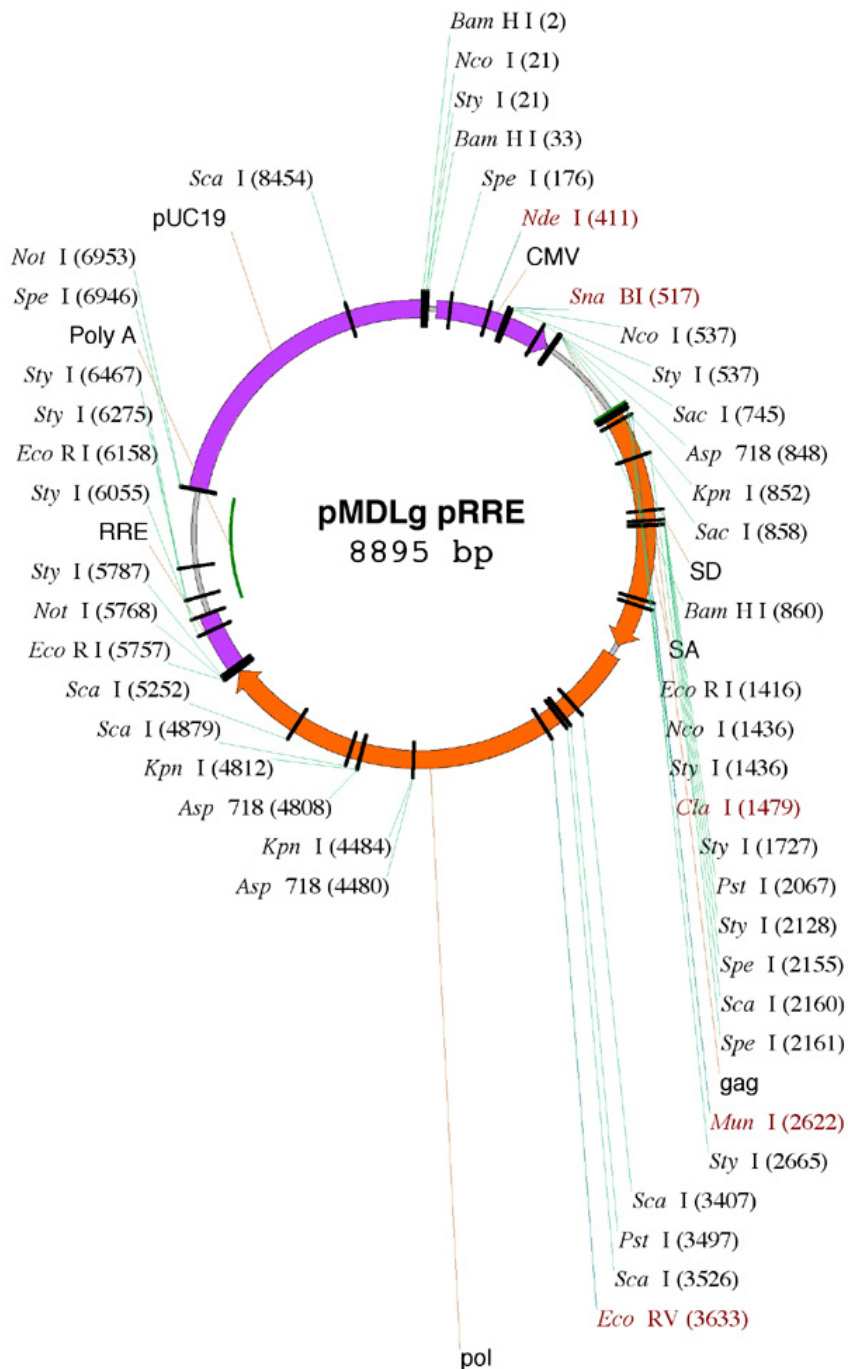


Abb 9.3: Der pMDLg pRRE-Vektor. Dieser Vektor ist ein von den Verpackungsplasmiden und kodiert die strukturellen Proteine und die Enzymen der Lentiviren (Addgene).

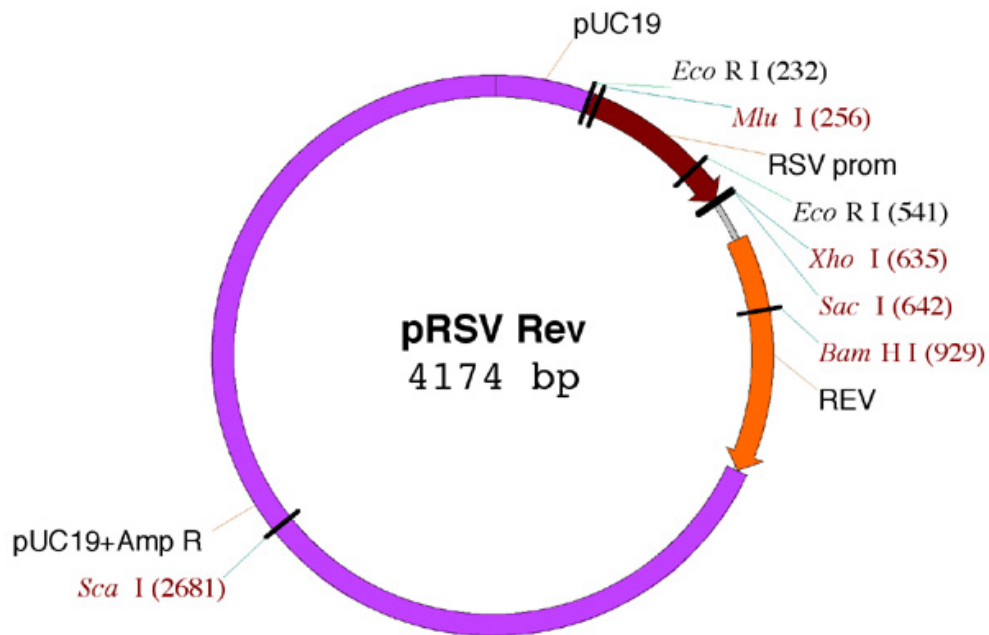


Abb 9.4: Der pRSV-Rev-Vektor. Dieser Vektor ist ein von den Verpackungsplasmiden und kodiert das Rev-Protein. Dieses Protein reguliert die Genexpression der Lentiviren sowohl auf der Transkriptionsebene als auch auf der Post-Transkriptionsebene (Addgene).

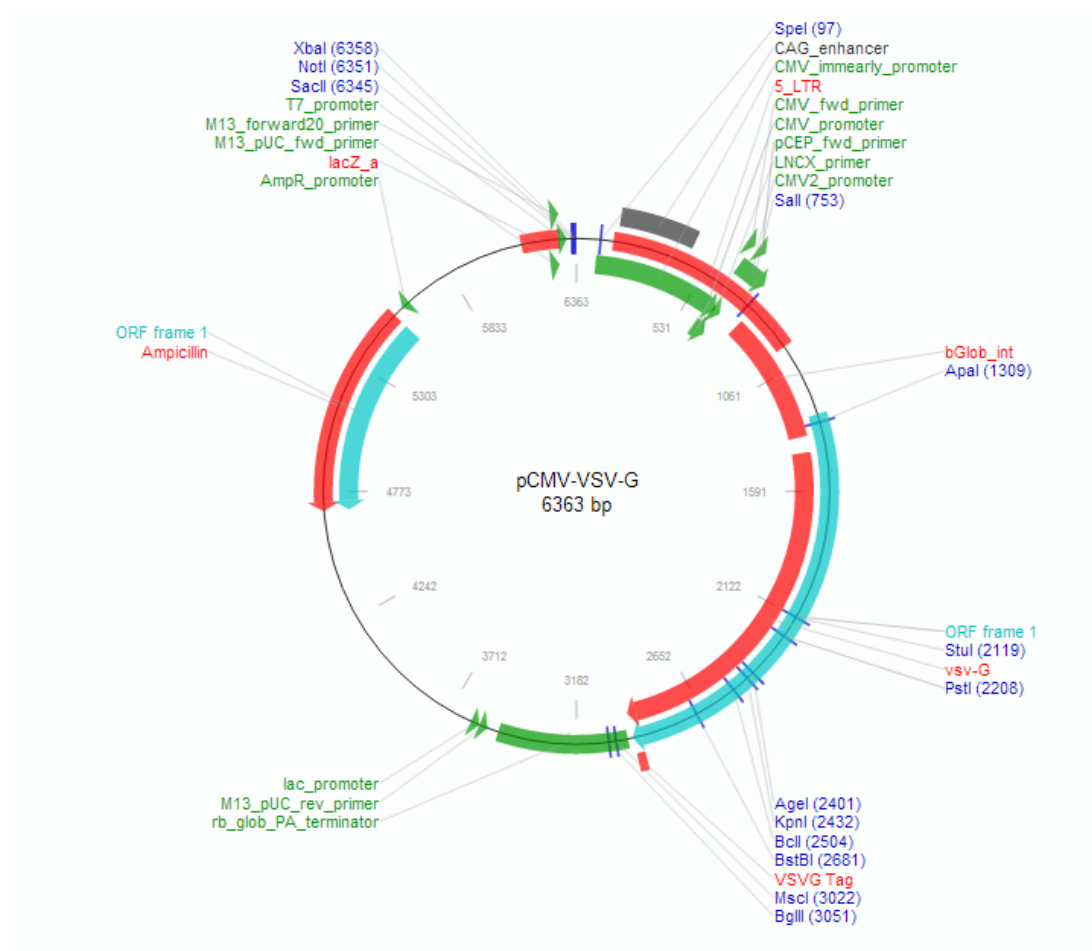


Abb 9.5: Der pCMV-VSV-G-Vektor. Dieser Vektor kodiert VSV-G, das Hülle-Protein der Viren (Addgene).

9.2 DNA-Molekulargewichts-Marker

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

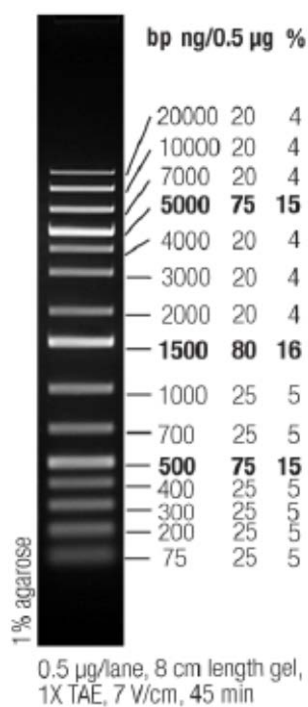


Abb 9.6: Molekulargewichts-Marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use

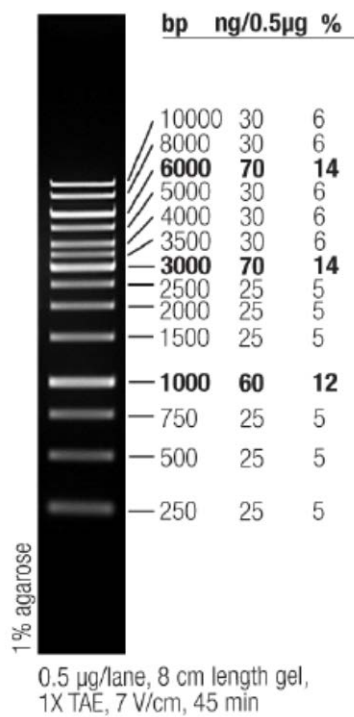


Abb 9.7: Molekulargewichts-Marker O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

9.3 Protein-Molekulargewichts-Marker

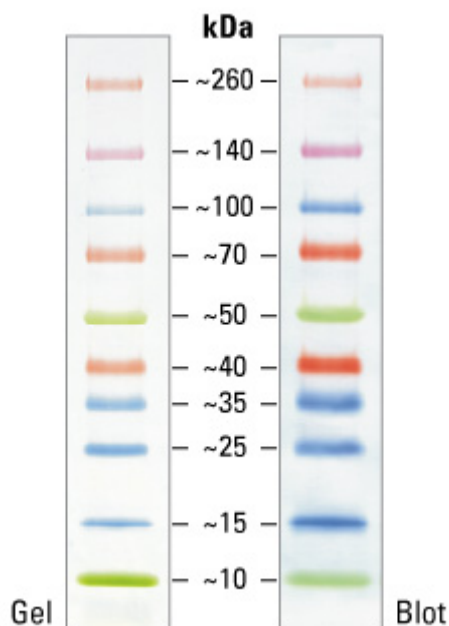


Abb 9.8: Protein-Molekulargewichts-Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

9.4 Verwendete Syntax zur statistischen Auswertung mit der Software IBM-SPSS 22 (Linear-gemischte Modelle)

Der Vergleich der ZO-1-Levels der Zellpräparationen

```
MIXED zo1 BY zellbehandlung
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zellbehandlung | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(zellbehandlung) COMPARE
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

9.4.1 Kollagen-Invasions-Versuche

9.4.1.1 Kollagen-Invasions-Versuche von 1205Lu-Sphäroiden

A. Der Vergleich der Steigungen der Gesamtflächen von Zell-Präparationen:

```
MIXED ln_steiga BY mg zellbehandlung
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=mg zellbehandlung | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(zellbehandlung) COMPARE
```

```
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

In_steiga ist die logarithmierte Steigung der Gesamtflächen
mg ist die Kollagen-Konzentration

B. Der Vergleich des Sphäroidwachstums von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt A). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigb substituiert.
In_steigb ist das logarithmierte Sphäroidwachstum

C. Der Vergleich der Steigungen der Invasionsflächen von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt A). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigdiffab substituiert.
In_steigdiffab ist die logarithmierte Steigung der Invasionsflächen

D. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und der Steigung der Gesamtfläche:

```
MIXED In_steiga with a_0_mm  
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)  
HCONVERGE(0,  
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)  
/FIXED=a_0_mm | SSTYPE(3)  
/METHOD=REML  
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV  
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

a_0_mm ist die Ursprungsgesamtfläche

E. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und dem Sphäroidwachstum:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt D). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigb substituiert.

F. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und der Steigung der Invasionsfläche:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt D). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigdiffab substituiert.

G. Der Abhängigkeit-Test der Steigung der Gesamtfläche zu dem ZO-1-Level und der Kollagen-Konzentration

```
MIXED In_steiga BY mg WITH zo1  
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)  
HCONVERGE(0,  
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)  
/FIXED=mg zo1 | SSTYPE(3)  
/METHOD=REML  
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV  
/EMMEANS=TABLES(mg) COMPARE  
/SAVE=FIXPRED SEFIXP  
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

zo1 ist das ZO-1-Level

H. Der Abhängigkeit-Test des Sphäroidwachstum zu dem ZO-1-Level und der Kollagen-Konzentration

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt G). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigb substituiert.

I. Der Abhängigkeit-Test der Steigung der Invasionsfläche zu dem ZO-1-Level und der Kollagen-Konzentration

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt H). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigdiffab substituiert.

9.4.1.2 Kollagen-Invasions-Versuche von WM35-Sphäroiden

A. Der Vergleich der Steigungen der Gesamtflächen von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 A

B. Der Vergleich des Sphäroidwachstums von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 B

C. Der Vergleich der Steigungen der Invasionsflächen von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 C

D. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und der Steigung der Gesamtfläche:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 D

E. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und dem Sphäroidwachstum:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 E

F. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgesamtfläche und der Steigung der Invasionsfläche:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.1.1 F

G. Der Abhängigkeits-Test der Steigung der Gesamtfläche zu dem ZO-1-Level, zu der Kollagen-Konzentration und zu der Ursprungsgesamtfläche

```
MIXED In_steiga BY mg WITH zo1 a_0_mm
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED= mg zo1 a_0_mm | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(mg) COMPARE
/SAVE=FIXPRED SEFIXP
/RANDOM=INTERCEPT zo1 | SUBJECT(versuch) COVTYPE(UN).
```

H. Der Abhängigkeits-Test des Sphäroidwachstums zu dem ZO-1-Level, zu der Kollagen-Konzentration und zu der Ursprungsgesamtfläche

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt G). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigb substituiert.

I. Der Abhängigkeits-Test der Steigung der Invasionsfläche zu dem ZO-1-Level, zu der Kollagen-Konzentration und zu der Ursprungsgesamtfläche

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt G). Hier wurde aber In_steiga mit In_steigdiffab substituiert.

9.4.2 Boyden-Kammer-Versuche

A. Der Vergleich der Zahl an invadierten Zellen von Zell-Präparationen:

```
MIXED In_invzellen BY zellbehandlung
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zellbehandlung | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(zellbehandlung) COMPARE
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

In_invzellen ist die logarithmierte Zahl an invadierten Zellen

B. Der Abhängigkeits-Test der Zahl an invadierten Zellen zu dem ZO-1-Level:

```
MIXED In_invzellen WITH zo1
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 zo1*zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

zo1 ist der lineare Faktor für das ZO-1-Level

zo1*zo1 ist der quadratische Faktor für das ZO-1-Level

C. Der Vergleich der Zahl an migrierten Zellen von Zell-Präparationen:

Die Syntax-Befehle sind ähnlich wie oben (Punkt A), aber In_invzellen wird mit migzellen substituiert.

migzellen ist die Zahl an migrierten Zellen

D. Der Abhängigkeits-Test der Zahl an migrierten Zellen zu dem ZO-1-Level:

Analyse mit allen Daten:

```
MIXED migzellen WITH zo1
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 zo1*zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

Entfernen des nicht signifikanten linearen Faktor für das ZO-1-Level

```
MIXED migzellen WITH zo1
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1*zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

Analyse ohne K:

```
MIXED migzellen WITH zo1
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
```

```
/FIXED=z01 z01*z01 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

9.4.3 Dissoziations-Versuche

9.4.3.1 Dissoziations-Versuche von ¹²⁵Iu-Sphäroiden

A. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 0-1 Min:

```
MIXED ln_psteig01 BY zellbehandlung
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zellbehandlung | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(zellbehandlung) COMPARE
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

ln_psteig01 ist die Abnahme der Fläche zwischen 0-1 Min

B. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 1-2 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt A). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig12 substituiert. ln_psteig12 ist die Abnahme der Fläche zwischen 1-2 Min

C. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 2-4 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt A). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig24 substituiert. ln_psteig24 ist die Abnahme der Fläche zwischen 2-4 Min

D. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 0-1 Min:

```
MIXED ln_psteig01 WITH f_0mm
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=f_0mm | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

f_0mm ist die Ursprungsgröße

E. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 1-2 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt D). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig12 substituiert.

F. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 2-4 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt D). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig24 substituiert.

G. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 0-1 Min. zu dem ZO-1-Level und zu der Ursprungsgröße:

```
MIXED ln_psteig01 WITH zo1 f_0mm
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 f_0mm | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

H. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 1-2 Min. zu dem ZO-1-Level:

```
MIXED ln_psteig12 WITH zo1
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

I. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 2-4 Min. zu dem ZO-1-Level:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt H). Hier wurde aber ln_psteig12 mit ln_psteig24 substituiert.

9.4.3.2 Dissoziations-Versuche von WM35-Sphäroiden

A. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 0-1 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 A

B. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 1-2 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 B

C. Der Vergleich der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 2-4 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 C

D. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 0-1 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 D

E. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 1-2 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 E

F. Der Korrelations-Test zwischen der Ursprungsgröße und der Abnahme der Sphäroids-Fläche von Zell-Präparationen zwischen 2-4 Min:

Die Syntax-Befehle sind wie im Kapitel 9.4.3.1 F

G. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 0-1 Min. und zu dem ZO-1-Level:

```
MIXED ln_psteig01 WITH zo1
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

H. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 1-2 Min. zu dem ZO-1-Level:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt G). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig12 substituiert.

I. Der Abhängigkeits-Test der Abnahme der Fläche zwischen 2-4 Min. zu dem ZO-1-Level:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt G). Hier wurde aber ln_psteig01 mit ln_psteig24 substituiert.

9.4.4 Proliferations-Versuche

A. Der Vergleich der Steigungen der Absorbanz von Zell-Präparationen zwischen 1-2 Tag:

```
MIXED steig12 BY zellbehandlung
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zellbehandlung | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/EMMEANS=TABLES(zellbehandlung) COMPARE
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

steig12 ist die Steigung der Absorbanz zwischen 1-2 Tag

B. Der Vergleich der Steigungen der Absorbanz von Zell-Präparationen zwischen 2-3 Tag:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt A). Hier wird aber steig12 mit steig23 substituiert
steig23 ist die Steigung der Absorbanz zwischen 2-3 Tag

C. Der Abhängigkeits-Test der Steigung der Absorbanz zwischen 1-2 Tag zu dem ZO-1-Level:

```
MIXED steig12 WITH zo1
  /CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1) SINGULAR(0.000000000001)
HCONVERGE(0,
  ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=zo1 | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(versuch) COVTYPE(VC).
```

D. Der Abhängigkeits-Test der Steigung der Absorbanz zwischen 2-3Tag zu dem ZO-1-Level:

Die Syntax-Befehle sind wie oben (Punkt C). Hier wird aber steig12 mit steig23 substituiert

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Mikroskopische Struktur der Haut	2
Abb. 1.2: Schematische elektronmikroskopische Darstellung der dendritischen epidermalen Zellen (Melanozyt, Langerhans-Zelle und Merkel-Zelle	3
Abb. 1.3: Verschiedene Formen von malignen Melanomen	5
Abb. 1.4: Für die Krebsentstehung sind genetische Alterationen in verschiedenen Mechanismen der Zellphysiologie nötig	9
Abb. 1.5: Der Metastasierungsprozess besteht aus sequenziellen und selektiven Schritten.	10
Abb. 1.6: Die Entwicklung eines metastatischen Melanoms.	12
Abb. 1.7: ZO-1 interagiert mit transmembranen Proteinen und mit peripheralen zytoplasmatischen Proteinen an der Zell-Zell-Verbindung	15
Abb. 3.1: Abbildung eines Sphäroids mit Invasion	36
Abb. 3.2: Ein Beispiel einer Trendlinie eines Sphäroids und ihre Funktion bei einem Invasionsversuch	37
Abb. 3.3: Ein Beispiel der Trendlinien der Dissoziation eines Sphäroids (54-3) und ihre Funktion	38
Abb. 3.4: Die Absorbanz der proliferierenden 1205Lu-Zellen innerhalb von drei Tagen bei einem BrdU-Assay als Beispiel.	39
Abb. 3.5: Ein Beispiel einer Western-Blot-Auswertung	50
Abb. 4.1: Relative ZO-1-Expression von malignen Melanom-Zell-Linien.	53
Abb. 4.2: Die Invasion von malignen Melanom-Zell-Linien, 1205Lu (A, B, E) und WM35 (C, D, E) in 1 mg/ml-Kollagen	55
Abb. 4.3: Die Invasion von malignen Melanom-Zell-Linien, 1205Lu (A, B, E) und WM35 (C, D, E) in 2 mg/ml-Kollagen.	56
Abb. 4.4: Die Zunahme der Sphäroidgröße mit der Zeit ($\mu\text{m}^2/\text{Std.}$) von den beiden Linien in 1 mg/ml-Kollagen (A) und in 2 mg/ml-Kollagen (B).	57
Abb. 4.5: Die Ursprungs-Sphäroidgröße von den beiden Linien in den Kollagen-Invasionsversuchen.	57
Abb. 4.6: Die Zunahme der Absorbanz von BrdU-behandelten Zellen von den beiden Linien zwischen 1. und 2. Tag. (A) und die Zunahme der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag (B).	58
Abb. 4.7: Dissoziation der Sphäroide (Abnahme der Sphäroid-Fläche) von den beiden Linien zwischen 0. und 1. Min (A). Abnahme der Fläche zwischen 1. und 2. Min (B). Abnahme der Fläche zwischen 2. und 4. Min (C).	59

Abb. 4.8: Bestimmung geeigneter Puromycin-Konzentrationen zur Selektion erfolgreich-transduzierter Zellen für 1205Lu-Zellen an allen Tagen (A) und vom 3. bis zum 5. Tag (ohne unbehandelte Kontrolle zur besseren Übersicht) (B).	61
Abb. 4.9: Bestimmung geeigneter Puromycin-Konzentrationen zur Selektion erfolgreich-transduzierter Zellen für WM35-Zellen an allen Tagen (A) und vom 3. bis zum 5. Tag (ohne unbehandelte Kontrolle zur besseren Übersicht) (B).	62
Abb. 4.10: Veränderung der ZO-1-Expression von 1205Lu-Knockdown-Zellen im Vergleich zu NT-Zellen, die durch qPCR-Analyse ermittelt wurde.	63
Abb. 4.11: Relatives ZO-1-Proteinlevel von shRNA-52 und shRNA-54 behandelten Zellen normalisiert auf das jeweilige β -Aktin-Level und NT.	64
Abb. 4.12: Veränderung der ZO-1-Expression von WM35-Knockdown-Zellen im Vergleich zu NT-Zellen, die durch qPCR-Analyse ermittelt wurde.	65
Abb. 4.13: Relatives ZO-1-Proteinlevel von shRNA-52 und shRNA-55 behandelten Zellen normalisiert auf das jeweilige β -Aktin-Level und NT.	65
Abb. 4.14: Beispiel der Invasion von 1205Lu-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 1 mg/ml-haltigen Matrix	67
Abb. 4.15: Beispiel eines Kollagen-Invasionsversuchs mit 1205Lu-Zellen in einer 1 mg/ml Kollagen-haltigen Matrix. (A) Invasionsfläche, (B) Sphäroidgröße (C) Gesamtfläche zu verschiedenen Zeitpunkten.	68
Abb. 4.16: Beispiel der Invasion von 1205Lu-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 2 mg/ml-haltigen Matrix	69
Abb. 4.17: Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von 1205Lu-Sphäroiden in einer Kollagenmatrix mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 2 mg/ml)	71
Abb. 4.18: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Sphäroidsinvasionsversuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT.	72
Abb. 4.19: Logarithmierte Steigungen der Gesamtfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Invasionsfläche (C) von 1205Lu-Sphäroiden.	73
Abb. 4.20: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	75
Abb. 4.21: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihre logarithmierte Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	76
Abb. 4.22: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	77
Abb. 4.23: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide	

zur logarithmierten Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („ln(Steigung der Invasionsfläche)“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	78
Abb. 4.24: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihr Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	79
Abb. 4.25: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihr logarithmiertes Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	80
Abb. 4.26: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Sphäroidwachstum“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	81
Abb. 4.27: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („ln(Sphäroidwachstum)“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	82
Abb. 4.28: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihrer Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	83
Abb. 4.29: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der 1205Lu Zellen in Sphäroiden und ihrer logarithmierten Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	84
Abb. 4.30: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4.	85
Abb. 4.31: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der 1205Lu-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („ln(Steigung der Gesamtfläche)“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4.	86
Abb. 4.32: Beispiel der Invasion von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 1 mg/ml-haltigen Matrix	87
Abb. 4.33: Beispiel der Invasion von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 20 Std. in einer 2 mg/ml-haltigen Matrix	88
Abb. 4.34: Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von WM35-Sphäroiden in einer Kollagenmatrix mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 2 mg/ml)	90
Abb. 4.35: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Sphäroidinvasionsversuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT	91
Abb. 4.36: Logarithmierte Steigungen der Invasionsfläche (A), der Sphäroidsgröße (Sphäroidwachstum) (B) und der Gesamtfläche (C) von WM35-Sphäroiden.	92
Abb. 4.37: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	94

Abb. 4.38: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre logarithmierte Steigung der Invasionsfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	95
Abb. 4.39: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	96
Abb. 4.40: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Invasionsfläche pro Zeit („Steigung der Invasionsfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	96
Abb. 4.41: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihr Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	98
Abb. 4.42: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihr logarithmiertes Sphäroidwachstum bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4. ...	99
Abb. 4.43: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Sphäroidwachstum“) bei den Kollagen-Invasion-Versuchen 1 bis 4.	100
Abb. 4.44: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Sphäroidgröße pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	100
Abb. 4.45: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihre Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	102
Abb. 4.46: Korrelation zwischen ZO-1-Protein-Level der WM35 Zellen in Sphäroiden und ihrer logarithmierten Steigung der Gesamtfläche bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	103
Abb. 4.47: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	104
Abb. 4.48: Korrelation der gemessenen Ursprungsgesamtfläche der WM35-Sphäroide zur logarithmierten Vergrößerung der Gesamtfläche pro Zeit („logarithmierte Steigung der Gesamtfläche“) bei den Kollagen-Invasions-Versuchen 1 bis 4.	104
Abb. 4.49: Die Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen	107
Abb. 4.50: Die logarithmierte Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen.	107
Abb. 4.51: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT.	108
Abb. 4.52: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der logarithmierten Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (ohne NT-Kontrolle).	109

Abb. 4.53: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen.	110
Abb. 4.54: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der logarithmierten Zahl der invadierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (mit NT-Kontrolle)	111
Abb. 4.55: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten logarithmierten Zahl der invadierten Zellen.	113
Abb. 4.56: Zahl der migrierten WM35-Zellen.	114
Abb. 4.57: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der Zahl der migrierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (mit Wildtyp-Kontrolle)	115
Abb. 4.58: Korrelation zwischen ZO-1-Levels und der Zahl der migrierten WM35-Zellen bei den Boyden-Kammer-Versuchen (ohne Wildtyp-Kontrolle)	117
Abb. 4.59: Die Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der geschätzten Zahl der migrierten Zellen.	118
Abb. 4.60: Beispiel der Dissoziation von 1205Lu-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 4 Min.	120
Abb. 4.61: Die Abnahme der Fläche der Sphäroide durch die mechanische und enzymatische Dissoziation während der 4 Min. bei einem Kollagen-Invasions-Versuch als Beispiel.	121
Abb. 4.62: A. Die Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 0 und 1 Min., B. Die Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Die Abnahme der Fläche von 1205Lu-Sphäroiden zwischen 2 und 4 Min.	122
Abb. 4.63: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Dissoziations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT.	123
Abb. 4.64: A. Logarithmus der Abnahme der Fläche der 1205Lu- Zellpräparate zwischen 0 und 1 Min., B. Logarithmus der Abnahme der Fläche der 1205Lu-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Logarithmus der Abnahme der Fläche der Sphäroide zwischen 2 und 4 Min.	124
Abb. 4.65: Korrelation des ZO-1-Levels der 1205Lu-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	125
Abb. 4.66: Korrelation des ZO-1-Levels von 1205Lu-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min.	126
Abb. 4.67: Korrelation des ZO-1-Levels der 1205Lu-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	127
Abb. 4.68: Korrelation des ZO-1-Levels von 1205Lu-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min.	128
Abb. 4.69: Korrelation des ZO-1-Levels der 1205Lu-Sphäroide und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	129

Abb. 4.70: Korrelation des ZO-1-Levels von 1205Lu-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min.	130
Abb. 4.71: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 0-1. Min.	131
Abb. 4.72: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1. Min.	132
Abb. 4.73: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 1-2. Min.	133
Abb. 4.74: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2. Min.	134
Abb. 4.75: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und ihrer Dissoziation zwischen 2-4 Min.	135
Abb. 4.76: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der 1205Lu-Sphäroide und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min.	136
Abb. 4.77: Beispiel der Dissoziation von WM35-Sphäroiden mit und ohne ZO-1 knock-down innerhalb von 4 Min.	137
Abb. 4.78: A. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 0 und 1 Min., B. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Abnahme der Fläche von WM35-Sphäroiden zwischen 2 und 4 Min.	139
Abb. 4.79: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Dissoziations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT.	140
Abb. 4.80: A. Logarithmierte Abnahme der Fläche der WM35-Zellpräparate zwischen 0 und 1 Min., B. Logarithmierte Abnahme der Fläche der WM35-Sphäroiden zwischen 1 und 2 Min., C. Logarithmierte Abnahme der Fläche der Sphäroide zwischen 2 und 4 Min.	141
Abb. 4.81: Korrelation des ZO-1-Levels der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	142
Abb. 4.82: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 0-1 Min.	143
Abb. 4.83: Korrelation des ZO-1-Levels der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	144
Abb. 4.84: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und des natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 1-2 Min.	145
Abb. 4.85: Korrelation des ZO-1-Levels der WM35-Sphäroiden und ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min. bei den Dissoziations-Versuchen	146
Abb. 4.86: Korrelation des ZO-1-Levels von WM35-Sphäroiden und dem natürlichen Logarithmus ihrer Flächen-Abnahme zwischen 2-4 Min.	147

Abb. 4.87: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 0-1. Min.	148
Abb. 4.88: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 0-1. Min.	149
Abb. 4.89: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 1-2 Min.	150
Abb. 4.90: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 1-2 Min.	151
Abb. 4.91: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße von WM35-Sphäroiden und ihre Abnahme zwischen 2-4 Min.	152
Abb. 4.92: Korrelation der gemessenen Ursprungsgröße der WM35-Sphäroide und ihrer logarithmierten Abnahme zwischen 2-4 Min.	153
Abb. 4.93: Die Absorbanz der proliferierenden 1205Lu-Zellen innerhalb von drei Tagen bei einem BrdU-Assay als Beispiel.	154
Abb. 4.94: A. Steigung der Absorbanz von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen zwischen 1. und 2. Tag, B. Steigung der 1205Lu-Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag bei den Proliferationsassays.	155
Abb. 4.95: Relatives ZO-1-Proteinlevel von 1205Lu-Zellen bei den Proliferations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT	156
Abb. 4.96: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen	157
Abb. 4.97: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag von BrdU-behandelten 1205Lu-Zellen	158
Abb. 4.98: A. Steigung der Absorbanz von BrdU-behandelten WM35-Zellen zwischen 1. und 2. Tag, B. Steigung der 1205Lu-Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag bei den Proliferationsassays.	160
Abb. 4.99: Relatives ZO-1-Proteinlevel von WM35-Zellen bei den Proliferations-Versuchen normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level und NT.	161
Abb. 4.100: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 1. und 2. Tag von BrdU-behandelten WM35-Zellen (mit K)	162
Abb. 4.101: Korrelation des ZO-1-Levels und der Steigung der Absorbanz zwischen 2. und 3. Tag von BrdU-behandelten WM35-Zellen (mit K)	163

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Klinische Klassifikation der Melanome (Fritsch, 2009).	5
Tabelle 2.1: Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 2.2: Verwendete Zellkulturgefäße mit Volumina	23
Tabelle 2.3: Chemikalien und Medien	24
Tabelle 2.4: Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien	27
Tabelle 2.5: Die Zusammensetzung der verwendeten Trypsin-EDTA-Lösungen	27
Tabelle 2.6: Die in dieser Arbeit verwendeten Kits	27
Tabelle 2.7: Primer für die quantitativen PCR-Assays	28
Tabelle 2.8: Plasmide für die Herstellung von ZO-1-shRNA-Lentiviren	28
Tabelle 2.9: pLKO.1.shRNA Vektoren und ihre ZO-1-spezifischen Target-Sequenzen	29
Tabelle 2.10: Die verwendeten Primer-Antikörper	29
Tabelle 2.11: Die verwendeten sekundären Antikörper	30
Tabelle 2.12: Verwendete Zell-Linien.....	30
Tabelle 3.1: Zugabeschema von PBS und RIPA-Puffer für unterschiedliche Zellkulturgefäße	46
Tabelle 4.1: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der 1205Lu-Invasionsfläche	77
Tabelle 4.2: Test der Differenz der Steigung der 1205Lu-Invasionsfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	77
Tabelle 4.3: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und dem 1205Lu- Sphäroidwachstum	81
Tabelle 4.4: Test der Differenz des 1205Lu-Sphäroidwachstums bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	81
Tabelle 4.5: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der 1205Lu-Gesamtfläche	85
Tabelle 4.6: Test der Differenz der Steigung der 1205Lu-Gesamtfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	85
Tabelle 4.7: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Invasion	97
Tabelle 4.8: Test der Differenz der WM35-Invasion bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	97
Tabelle 4.9: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und des WM35- Sphäroidwachstums	101
Tabelle 4.10: Test der Differenz des Sphäroidwachstum bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	101
Tabelle 4.11: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Steigung der	

WM35-Gesamtfläche	105
Tabelle 4.12: Test der Differenz der Steigung der WM35-Gesamtfläche bei 1 und 2 mg/ml Kollagenkonzentration	105
Tabelle 4.13: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der invadierten WM35-Zellen ohne Non-Target in dem Boyden-Kammer	110
Tabelle 4.14: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der invadierten WM35-Zellen von allen Zellpräparaten in dem Boyden-Kammer	112
Tabelle 4.15: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit zwei festen Faktoren (mit K)	116
Tabelle 4.16: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit einem festen Faktor (mit K)	116
Tabelle 4.17: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der Zahl der migrierten WM35-Zellen in der Boyden-Kammer mit zwei festen Faktoren (ohne K)	118
Tabelle 4.18: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten	126
Tabelle 4.19: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 1 und 2 Minuten	128
Tabelle 4.20: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 2 und 4 Minuten	130
Tabelle 4.21: Test der Korrelation zwischen der Ursprungsgröße und der 1205Lu-Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten	132
Tabelle 4.22: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 0 und 1 Minuten	143
Tabelle 4.23: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 1 und 2 Minuten	145
Tabelle 4.24: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Dissoziation zwischen 2 und 4 Minuten	147
Tabelle 4.25: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Proliferation zwischen 1. und 2. Tag	157
Tabelle 4.26: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der 1205Lu-Proliferation zwischen 2. und 3. Tag	158
Tabelle 4.27: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Proliferation zwischen 1. und 2. Tag	162
Tabelle 4.28: Test der Korrelation zwischen dem ZO-1-Level und der WM35-Proliferation zwischen 2. und 3. Tag	163

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Johanna Brandner für die Stellung des Themas dieser Doktorarbeit, für die konsequente engagierte Betreuung im Verlauf der Doktorarbeit und für die Zurverfügungstellung aller technischen und finanziellen Mittel, bedanken. Sie hatte mir viele nützliche Ideen, wertvolle Anregungen und Motivation gegeben, sowohl während der praktischen Tätigkeit im Labor, als auch bei der Fertigstellung der Dissertation.

Ich danke Frau Prof. Dr. Ingrid Moll für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit im dem hervorragend ausgestatteten Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE, Universitätsklinikum Eppendorf – Hamburg. Bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Universität Hamburg und dafür, dass er immer Zeit gefunden hat, meine Fragen mit Rat und Tat zu beantworten. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Kristoffer Riecken für die Möglichkeit bedanken, den Olympus-Inkubator in seinem Labor zu verwenden und für die stetige Hilfsbereitschaft während der Verwendung des Geräts.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie und Venerologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, zahlreichen Ratschläge und netten Gespräche möchte ich danken. Mein Dank gilt den technischen Assistentinnen, Pia Houdek, Ewa Wladykowski, und Sabine Vidal-y-Sy, für ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und die Weitergabe ihrer wertvollen Erfahrungen. Besonders möchte ich hier Frau Pia Houdek und Sabine Vidal-y-Sy danken, die mich sehr stark unterstützt hatten. Ich danke Dr. Michaela Zorn-Kruppa, Post Doc in der Dermatologie für ihre Hilfe und Beratung, die mir immer weitergeholfen hatte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Thomas Volksdorf, Dr. Christopher Ueck, Katja Bäsler und Janine Radtke für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Ebenso richtet sich mein Dank an meine Vorgängerin, Claudia Bohner, sowie an die ehemaligen Kollegen, Dr. Nina Kirschner und Dr. Christian Börnchen für die technische Anleitung und für das gute Arbeitsklima. Außerdem danke ich Frau Anne Daubmann für die statistische Beratung.

Zum Schluss geht ein großes Dankeschön an meine Eltern, da ohne ihre Unterstützung die gesamte Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich bei meinen Geschwistern dafür herzlich bedanken, dass sie mir ständig mit positiven Ratschlägen, aufmunterndem Lachen und Verständnis zur Seite standen. Vor allem möchte ich Gott danken für seine Gnade und seine Liebe, die er mir jeden Tag geschenkt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mutiha A. T. Pandjaitan', written in a cursive style.

Mutiha A. T. Pandjaitan