

Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologische Chemie I
Vorstand: Prof. Dr. M. Scharl

**Untersuchungen zur Apoptoseregulation
durch die Melanom induzierende Rezeptortyrosinkinase
Xmrk**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg
vorgelegt von

Jessica C. Hassel
geb. **Morcinek**
aus Büdingen

Würzburg, November 2003

Referent: Prof. Dr. Manfred Scharl
Koreferentin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker
Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

meiner Mami

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Krebs

1.1.1. Allgemeine Einführung	1
1.1.2. Kontrolliertes Zellwachstum	3
1.1.3. Tumorgene	6

1.2. Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen

1.2.1. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen in der Zelltransformation	8
1.2.2. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen im malignen Melanom	9

1.3. Das Xiphophorus-Melanom-System

1.3.1. Allgemeine Einführung	11
1.3.2. Signaltransduktion von Xmrk	14

1.4. Zielsetzung	20
-------------------------	----

2. Material

2.1. Zelllinien	22
2.2. Bakterienstämme	23
2.3. Plasmid-Konstrukte	23
2.4. Oligonukleotide (Primer)	24
2.4.1. Primer für die Dynabeads-Extraktion	
2.4.2. Primer für die PCR	
2.5. Medien und Pufferlösungen	24
2.6. Chemikalien und Radiochemikalien	25
2.7. Antikörper	25
2.8. Marker	27
2.8.1. Proteinmarker	
2.8.2. DNA-Marker	
2.8.3. RNA-Marker	
2.9. Geräte	28

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen	29
3.1.2. Stimulation eukaryontischer Zellen	30
3.1.3. Zellzahlbestimmung	31
3.1.4. Proliferationsassays	31
3.1.5. Rezeptordichtevergleich mit ELISA-Technik	32

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Aufschluß eukaryontischer Zellen zur Gewinnung zellulärer Proteine	33
3.2.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	34
3.2.3. Analyse von DNA-bindenden Proteinen	35
3.2.4. Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.2.5. Western Blot Analyse	39

3.3. Molekularbiologische Methoden mit DNA

3.3.1. Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	41
3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	41
3.3.3. Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung	41
3.3.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
3.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	42
3.3.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	43
3.3.7. Transformation kompetenter Bakterienzellen	43

3.4. Molekularbiologische Methoden mit RNA

3.4.1. Allgemeines	44
3.4.2. RNA-Extraktion	45
3.4.3. Konzentrationsbestimmung	45
3.4.4. LiCl-Fällung	45
3.4.5. Northern-Blot	45
3.4.6. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung auf Northern Blots	47
3.4.7. RT-PCR	50

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen in Ba/F3 Zellen	53
4.1.1. Langzeitwachstum und Überleben	53
4.1.2. Charakterisierung von HER-mrk und HER exprimierenden Ba/F3 Zelllinien	54
4.1.3. Messung der DNA-Fragmentierung zur Untersuchung der Apoptoseregulation in Ba/F3-Zellen	60
4.1.4. HER-mrk Mutanten	62
4.1.5. Analyse der Aktivierung von STAT1, 3 und 5 durch die Rezeptoren HER, HER-mrk und seine Mutanten Hm Δ 1075 und Δ 1006	64
4.1.6. Analyse der Bcl-X _L Expression nach Stimulation von HER, HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006	68
4.1.7. Analyse der Bcl-2 Expression nach Stimulation von HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006	71
4.1.8. Analyse der Mcl-1 Expression nach Stimulation von HER, HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006	72
4.1.9. Bestimmung des optimalen Wirkungsbereiches der Inhibitoren Rapamycin und Wortmannin	73
4.2. Untersuchungen in Pigmentzellen	76
4.2.1. Analyse der Expression von Bcl-X _L und Mcl-1 nach Stimulation von HER-mrk in melan-a Hm Zellen	77
4.2.2. Analyse der Aktivierung von STAT1, 3 und 5 in humanen Melanomzelllinien und der Fischmelanomzelllinie PSM	78
4.2.3. Analyse der Expression von Bcl-X _L und Pim-1 und der Aktivierung der MAP-Kinase in humanen Melanomzelllinien	81

5. Diskussion

5.1. Signaltransduktion im Ba/F3 Zellsystem	83
5.1.1. Die Rolle von HER-mrk im Ba/F3 Zellsystem	83
5.1.2. Die mrk-Kinase und ihre Signalwege	85
5.1.3. Antiapoptotische und mitogene Signalwege der mrk-Kinase	91
5.2. Signaltransduktion in Pigmentzellen	98

6. Zusammenfassung	104
Summary	106
7. Anhang	
7.1. Rezeptordichtebestimmung	109
7.1.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von mAB 108.1	109
7.1.2. Einfluß der Zellzahl auf das Lichtsignal beim Zell-ELISA	110
7.2. Vorversuch DNA-Leitern	111
Literaturverzeichnis	113
Abkürzungen	134
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Krebs

1.1.1. Allgemeine Einführung

Krebs ist eine Erkrankung, die fast alle mehrzelligen Lebewesen betreffen kann, und auch beim Menschen ist Krebs eine historisch lang bekannte Krankheit. Schon unsere Vorfahren scheinen darunter gelitten zu haben. So gibt es 3500 Jahre alte medizinische Schriften aus Ägypten, die Krankheitsbilder beschreiben, auf die die Diagnose Krebs passen würde (Davidson, 1967). Außerdem hat man menschliche Skelette gefunden, deren charakteristische Veränderungen auf Krebs hinweisen; so z.B. den Schädel eines Inka-Indianers, der kleine schwarze Flecken aufweist, die darauf schließen lassen, daß er vor mehr als 500 Jahren an einem malignen Melanom erkrankt und vielleicht sogar gestorben war (Ortega et al, 1966). Die Inzidenz an Krebs hat allerdings erst in den letzten hundert Jahren stark zugenommen (Abb.1). Heute ist Krebs in den zivilisierten Ländern nach den Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.

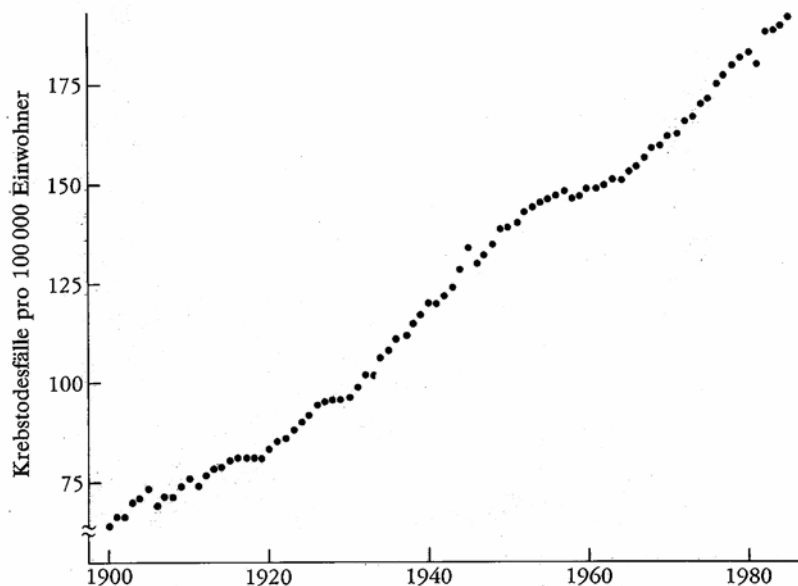


Abb.1: Gesamtsterblichkeit an Krebs in den Vereinigten Staaten zwischen 1900 und 1985 (die Zahlen sind nicht alterskorrigiert; aus: Cancer, Prescott und Flexer, 1989)

Einleitung

Die Mortalitätszunahme an Krebs ist vor allem auf die Abnahme der Sterblichkeit durch Infektionskrankheiten aufgrund der Therapiemöglichkeiten der modernen Medizin zurückzuführen. Krebs ist in der Regel eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters. Dies erklärt sich aus den Mechanismen der Krebsentstehung. Bisher nimmt man als Ursachen spontane Mutation, Umweltfaktoren wie Strahlung, Chemikalien und Viren und eine genetische Disposition an (Prescott und Flexer, 1989).

Schäden durch Umweltfaktoren wie Strahlung, Chemikalien und Viren akkumulieren im Laufe eines Lebens und lösen in der Regel erst nach einer Latenzzeit von 5 bis zu 30 Jahren Krebs aus. Daß diese Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle spielen, kann man anhand von Einwandererbewegungen verfolgen, bei der Menschen unterschiedlicher Rasse und Herkunft sich in ihrem Krebsrisiko für bestimmte Krebsarten an das Einwandererland angleichen. So sank z.B. für Japaner, die in die USA einwanderten, das Risiko für Magenkrebs, allerdings stieg dafür das Risiko für Brustkrebs (Haenszel und Kurihara, 1968).

Strahlen und Kanzerogene wirken krebsauslösend durch Veränderung der DNA-Sequenzen, sogenannte Mutationen. Sie werden deshalb auch als Mutagene bezeichnet. Allerdings treten Mutationen auch spontan auf, statistisch in einer Häufigkeit von 10^{-6} je Gen und Zellteilung. Dieser Wert ergibt sich aus den grundsätzlichen Grenzen der Genauigkeit bei DNA-Replikation und -Reparatur. Allein durch spontane Mutation hat so im Laufe eines menschlichen Lebens jedes einzelne Gen 10^{10} mal die Gelegenheit in einer Körperzelle zu mutieren. Mutationen durch Umweltfaktoren addieren sich dazu.

Da Mutationen irreversible Veränderungen in der DNA darstellen, können sie auch an die Nachkommen weitergegeben werden. Dies sorgt für das familiär gehäufte Auftreten mancher Tumoren, wie z.B. das familiäre Mammakarzinom durch Mutation in den BRCA-Genen oder das familiäre Kolonkarzinom (HNPCC-Gen).

Mutationen können, wenn sie in kodierenden Sequenzen auftreten, ein verändertes Protein zur Folge haben: Dieses kann entweder seine Funktion einbüßen oder insofern entarten, daß es ständig (konstitutiv) aktiv ist. Mutationen im Promotorbereich eines Genes können hingegen zu einer Veränderung in der Genexpression führen, so daß ein Protein zu viel, zu wenig, im falschen Zelltyp oder zu einem unpassenden Zeitpunkt translatiert wird.

Aber auch epigenetische Veränderungen können zu einer Krebsentwicklung führen. So können Gene durch Methylierung bzw. Demethylierung inaktiviert bzw. aktiviert werden. In verschiedenen Tumoren hat man jüngst eine Hypermethylierung von CpG-Inseln der Promotoren von Tumorsuppressorgenen gefunden, was deren Expression

Einleitung

verhindert (Toyota und Issa, 1999). Solch eine Stilllegung wurde z.B. für das Tumorsuppressorgen Rb im Retinoblastom gefunden (Ohtnai-Fujita et al, 1993), aber auch für andere Tumorsuppressorgene wie z.B. E-Cadherin (Zelladhäsionsmolekül) in einigen Tumoren (Herman, 1999). Im Gegensatz dazu wurde in Bronchial- und Kolonkarzinomen eine generelle Hypomethylierung gefunden, was zu einer Aktivierung von Onkogenen führen könnte (Feinberg und Vogelstein, 1983b).

Krebs geht von der Entartung einer einzigen Zelle aus, die sich durch Zellteilung vermehrt und so einen Zellklon bildet. Damit eine Zelle entartet, sind in aller Regel mehrere Mutationsereignisse nötig, die zufällig zusammentreffen und so einen kumulativen Effekt haben (Vogelstein und Kinzler, 1993). Dies ergibt sich aus dem erhöhten Risiko für Krebs mit zunehmendem Alter, aber auch aus der hohen spontanen Mutationsrate. Aus statistischen Berechnungen schätzt man, daß drei (bei Leukämien) bis sieben (bei Karzinomen) Zufallsereignisse eintreten müssen, damit eine Zelle zur Krebszelle wird. Im Sinne einer Mikroevolution erhält die Krebszelle zunächst die Fähigkeit zur unendlichen Vermehrung und Unsterblichkeit, im Verlauf der Tumorentwicklung, der sogenannten Tumorprogression, dann die Fähigkeit zur Invasion, zur Neovaskularisation (Angiogenese), zur Metastasierung und sogar zur Resistenzbildung gegen Medikamente.

1.1.2. Kontrolliertes Zellwachstum

Die Proliferation von Zellen wird in der G₁-Phase des Zellzyklus kontrolliert. Die unterschiedlichen Verdopplungszeiten von verschiedenen Zelltypen beruhen vor allem auf der Dauer dieser G₁-Phase. Zellen, die sich nicht mehr teilen sollen, werden in dieser Phase arretiert. Dieser Mechanismus ist in vielen Tumorzellen defekt und führt somit zu unkontrollierter Proliferation und mangelnder Differenzierung.

Differenzierung ist auch verantwortlich für die begrenzte Lebensdauer einer Zelle, da als Folge von Differenzierungsschritten eine Stammzelle in das Endstadium einer sich nicht mehr teilenden Zelle übergeht. Zusätzlich haben Zellen ein System entwickelt, die Anzahl der Zellverdopplungen anhand der Telomere mitzuzählen. (Compagni and Christofori, 2000). Normale menschliche Zellen teilen sich 60 bis 70 mal, arretieren dann im Zellzyklus und gehen in ein Seneszenzstadium über. Telomerase, das Enzym das für einen Erhalt der Telomerlänge verantwortlich ist, ist in normalen somatischen Zellen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht aktiv. Allerdings findet man in

Einleitung

etwa 80% der Tumorzellen eine erhöhte Telomeraseaktivität (Holt und Shay, 1999), was zur unendlichen Teilungsfähigkeit von Tumorzellen führen kann.

Zu den wichtigsten Schutzmechanismen des Körpers gegen eine Krebsbildung gehört das Auslösen des Absterbens von Zellen (Hanahan und Weinberg; 2000). Dieser als Apoptose (griechisch für "fallen", verglichen mit den fallenden Blättern eines Baumes) bezeichnete Mechanismus soll bei Mehrzellern die Gewebhomeostase gewährleisten. So werden z.B. zur Erneuerung des Epithels die oberflächlichen Epithelzellen der Haut und des Darms durch Apoptose entsorgt und von der Basalzellschicht aus wieder gebildet. In der Embryonalentwicklung werden z.B. bei der Fingerentwicklung die Zellen zwischen den Fingern (ursprünglich Schwimmhäute) apoptotisch oder autoimmune T-Zellen werden während der T-Zell-Selektion im Thymus durch Apoptose eliminiert. Aber auch das Immunsystem (T-Killerzellen) bedient sich dieses Mechanismus, indem es in Virus befallenen Zellen oder in Krebszellen den Zellselbstmord auslöst (Duke et al, 1997). Tumorzellen zeigen häufig Mutationen, die zu einer Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose führen (Jäättelä, 1999).

Die Apoptose wird auch als "programmierter Zelltod" bezeichnet, da sie strengen Kontrollmechanismen unterliegt. Sie wird im Gegensatz zur Nekrose gezielt induziert.

Eine apoptotische Zelle zeigt mikroskopisch ein typisches Bild:

Die Zellen bekommen pyknotische Zellkerne bis hin zum Kernzerfall (Karyorrhesis), verlieren den Zellkontakt zu Nachbarzellen und schrumpfen. Die gesamte Zelle scheint zu brodeln, durch Abschnürung entstehen Bläschen auf der Zelloberfläche, das sogenannte "blebbing" der Zelle. Zum Schluß zerfällt die gesamte Zelle in kleine Vesikel, den apoptotischen Körperchen, die dann von Phagozyten beseitigt werden (Whyllie et al, 1980).

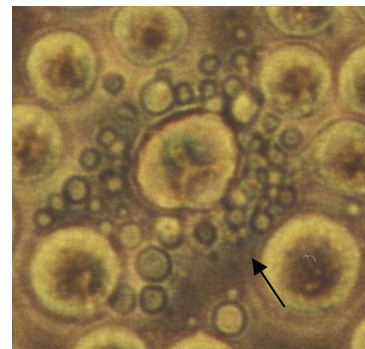


Abb.2: Apoptotische Ba/F3-Zelle (Pfeil) zwischen normalen Zellen

Auf molekularbiologischer Ebene entspricht diesen Veränderungen ein kontrollierter Abbau der Zelle. Es kommt auf unterschiedliche Weise (je nach Auslöser und Zellart) zu einer Aktivierung von Caspasen (Nicholson et al, 1995). Diese Cysteinproteasen, von denen inzwischen 14 verschiedene in Säugern bekannt sind, spalten spezifisch mehr als 70 verschiedene Proteine (Fadeel et al, 2000):

Einleitung

1. Proteine, die zum Zytoskelett gehören wie Lamine (führt zur Zellschrumpfung und Verlust der Zell-Zell-Kontakte)
2. Proteine, die an Signaltransduktionswegen für Proliferation und Antiapoptose beteiligt sind
3. nukleäre Proteine wie Histone, Topoisomerasen und PARP (Poly-ADP-ribose-Polymerase)
4. Pro-Caspasen im Rahmen einer Proteasekaskade, die dadurch zu aktivierten Caspasen werden

Die Aktivierung von PARP scheint für die Aktivierung von Endonukleasen verantwortlich zu sein, die als letzte Instanz die DNA der Zelle fragmentieren.

Die Auslöser für die Apoptose sind vielfältig. Dazu gehören durch Strahlung oder Kanzerogene ausgelöste DNA-Schäden, die über einen p53-abhängigen Weg in die Apoptose führen. Aber auch die T-Killerzellen des Immunsystems lösen über Perforine und Granzym B Apoptose aus, ebenso wie die Aktivierung sogenannter "Todesrezeptoren" wie Fas oder der TNF-Rezeptor. Einige Zellen (vor allem die des Immunsystems) benötigen die permanente Stimulation durch Wachstumshormone, wie z.B. Interleukine, um die Apoptose zu unterdrücken (Raff, 1992).

So unterschiedlich wie die Auslöser sind auch die Wege, über die diese Auslöser wirken. Es gibt eine ganze Reihe von Proteinen, die antiapoptotisch oder proapoptotisch wirken (siehe Übersicht). Die Bcl-2 Familie, benannt nach dem zuerst beschriebenen antiapoptotischen Protein Bcl-2 (Tsujimoto et al, 1985; Vaux et al, 1988), stellt die bekanntesten Proteine in der Apoptoseregulation dar. Bcl-2 wurde zuerst im folliculären B-Zell-Lymphom beschrieben. Es wurde ursprünglich an der Bruchstelle der t(14/18) Translokation gefunden, die im folliculären B-Zell-Lymphom häufig vorkommt. Bcl war ursprünglich die Abkürzung für „B-cell lymphoma/leukemia“ (Tsujimoto et al, 1984), wird heute aber meist mit „breakpoint cluster“ übersetzt, da die Bruchstellen des Chromosoms 18 innerhalb eines kurzen DNA-Stückes geclustert auftreten, in dessen Bereich das *bcl-2* Gen liegt. Durch diese Translokation gerät das *bcl-2* Gen in die Promotorkontrolle der schweren Immunglobulinkette und wird dadurch dereguliert exprimiert (Tsujimoto et al, 1985). Eine Überexpression von *bcl-2* konnte neben dem folliculären B-Zell-Lymphom aber auch in anderen Tumoren wie z.B. dem malignen Melanom nachgewiesen werden. Dabei korrelieren die Expressionslevel von *bcl-2* und *bcl-X_L* mit der Aggressivität vom Melanomen (Leiter et al, 2000). Aber auch Melanozyten exprimieren basal schon viel *bcl-2*, da sie physiologischerweise als

Einleitung

Schutzschild gegen UV-Strahlung fungieren und dabei nicht gleich apoptotisch werden dürfen (Duke et al, 1997).

Sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Proteine werden über verschiedene Signaltransduktionswege in ihrer Genexpression reguliert oder durch Phosphorylierungen in ihrer Aktivität beeinflusst. Dabei entscheidet das Verhältnis von proapoptotischer zu antiapoptotischer Fraktion in der Zelle über Leben und Tod.

Übersicht über Proteine in der Apoptoseregulation (modifiziert nach Jäättälä, 1999):

antiapoptotisch wirken:	Bcl-2, Bcl-X _L , Mcl-1, A1, Bcl-w, Bfl-1; Rb; Hsp70, Hsp27, Survivin
proapoptotisch wirken:	Bad, Bax, Bcl-X _S , Bak, Bik, Bim, Diva; p53

1.1.3. Tumorgene

Da antiapoptotische Proteine der Apoptose entgegenwirken stellen für diese Proteine kodierende Gene potentielle Onkogene (onkos = griechisch für Tumor) dar.

Onkogene entstehen durch Mutation aus Proto-Onkogenen, entweder spontan oder durch transformierende Faktoren wie Viren, chemische Karzinogene und Strahlen. Onkogene kann man unterteilen in dominante Onkogene (Onkogene im engeren Sinne) und rezessive Onkogene, die auch als Tumorsuppressorgene bezeichnet werden. Für die Krebsentwicklung ist entweder die Aktivierung von (dominanten) Onkogenen verantwortlich oder aber der Verlust von Tumorsuppressorgenen.

Onkogene wurden als das transformierende genetische Material onkogener Viren entdeckt (Martin, 1970), die ihre DNA in das Wirtsgenom integrieren. Dabei können entweder Onkogene mitgebracht werden, die als Proto-Onkogene zufällig aus dem Genom vorheriger Wirtszellen aufgenommen wurden und nach Mutation als Onkogene in die DNA des neuen Wirts eingebaut werden, oder das zufällige Einbauen der starken Promotoren für die Transkription der Viren-DNA vor ein Proto-Onkogen im menschlichen Genom sorgt für die Transkription eines Onkogens (Insertionsmutation). Proto-Onkogene stellen zelluläre Gene dar, die das Zellwachstum, die Apoptose, die Zelldifferenzierung und die Zellbeweglichkeit steuern. Bei Veränderung zum Onkogen wird so das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zelle verändert. Das Potential eines Onkogens zeigt sich darin, daß Onkogene dominant wirken, d.h. selbst bei noch unverändertem zweitem Allel des Proto-Onkogens setzt sich die tumorauslösende Potenz des Onkogens durch.

Einleitung

Die meisten Onkogene lassen sich anhand ihrer Funktion innerhalb der Zelle in fünf Klassen einteilen (Beispiele; modifiziert nach Hunter, 1991):

1. Wachstumsfaktoren: *sis* (β -PDGF), *int-1*(wnt-1), *int-2* (FGF)
2. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormone:
 - a) Rezeptortyrosinkinasen: *ErbB-1* (EGFR), *ErbB-2* (neu), *kit*, *Xmrk*
 - b) Intrazelluläre Rezeptoren: *erbA*
3. Proteine für die intrazelluläre Signalübertragung:
 - a) Tyrosinkinasen: *src*, *yes*, *abl*, *fyn*
 - b) Serin/Threoninkinasen: *raf*, *mos*, *pim-1*, *Akt*
 - c) GTPasen: *ras*
 - d) Adaptoren: *crk*
4. Nukleäre Transkriptionsfaktoren: *jun*, *fos*, *myc*, *myb*, *rel*
5. Antiapoptotische Proteine: *bcl-2*, *bcl-X*

Die meisten Onkogene kodieren für Proteine der Superfamilie der Proteinkinasen (Hunter, 1987). Obwohl weitaus mehr Serin-/Threoninkinasen bekannt sind (Hanks, 1988), dominieren bei den Proto-/Onkogenen die Tyrosinkinasen, wohl weil sie in viele Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle involviert sind. In gesunden Zellen sind in der Regel nur 0,05% der Phosphorylierung von Proteinen Tyrosinphosphorylierungen. Bei Tumorzellen ist der Anteil durch konstitutiv aktive Tyrosinkinasen bedeutend höher. Diese konstitutive Aktivierung scheint auf die neoplastische Entwicklung einer Zelle einen großen Einfluß zu haben (Fedi et al, 1997; Tsatsanis und Spandidos, 2000) und kann entweder durch Überexpression oder durch Mutation der Tyrosinkinase entstehen.

Eine neue Klasse von Onkogenen kodiert für antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie *nicht* durch eine Induktion von Zellproliferation onkogen wirken (Jäättelä et al, 1999). Für Bcl-2 wurde sogar eine Inhibition der Zellproliferation in verschiedenen Zellen wie Thymozyten, Lymphozyten und Fibroblasten gefunden (Reilly et al, 1996). Stattdessen wirken sie durch die Inhibition der Apoptose onkogen, indem sie die Zellen so dem natürlichen Entsorgungsmechanismus für fehlgesteuerte Zellen entziehen. Die Apoptoseinhibition ist neben der unkontrollierten Zellvermehrung also ein entscheidender Schritt zur neoplastischen Transformation.

Im Gegensatz zu Onkogenen sind Tumorsuppressorgene Gene, die physiologischerweise die Ausbildung eines Tumors unterdrücken. Sie wurden deshalb auch Anti-

Einleitung

Onkogene genannt und sind die am häufigsten mutierten Gene in den meisten humanen Tumoren. Allerdings müssen dafür beide Allele des Gens ausfallen, d.h. auf zellulärer Ebene sind Tumorsuppressorgene rezessiv. Typische Beispiele sind die Zellzykluskontrollproteine p53 und Rb. Sie überwachen den laufenden Zellzyklus, können Zellen in der Ruhephase arretieren oder sogar den Zelltod, die Apoptose induzieren. Bei vielen Tumoren findet man Mutationen in diesen Genen. So zeigen mehr als 50% aller Tumoren ein defektes p53 Protein (Soussi, 2000). Beim familiären (erblichen) Retinoblastom hat man in der Keimbahn die Mutation eines Rb-Allels gefunden, was den Träger anfällig für Tumoren (vor allem multiple Retinoblastome der Netzhaut) macht. Weitere Tumorsuppressorgene sind außerdem WT1, das bei Mutation zum Wilmstumor führt, BRCA-1 und -2 für das Mammakarzinom, NF1 für das Schwannom und APC für das Kolonkarzinom. Außerdem gehören zu den Tumorsuppressorgenen auch die Reparatursysteme für DNA-Schäden. Bei der rezessiv vererbten Hautkrankheit Xeroderma pigmentosum z.B. fehlen in den Zellen die Reparatursysteme für UV-Schäden. Diese Patienten entwickeln deshalb sehr schnell Hautkrebs und versterben meist in jungen Jahren.

1.2. Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen

1.2.1. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen in der Zelltransformation

Tyrosinkinasen spielen für die Entstehung von Tumoren eine herausragende Rolle. Eine Gruppe von Tyrosinkinasen, die dabei von großer Relevanz ist, umfasst die Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Sie besitzen einen extrazellulären Anteil mit Ligandenbindungsdomäne, einen Transmembranteil bestehend aus einer einzigen hydrophoben Transmembran- α -Helix und einen katalytischen intrazellulären Anteil mit Tyrosinkinasedomäne, an den sich ein C-terminales Ende anschließt. Nach Liganden induzierter Rezeptordimerisierung wird der C-Terminus an bestimmten Tyrosinresten autophosphoryliert, was zur Rekrutierung verschiedener Signalproteine führt (Yarden and Ullrich, 1988).

Bis heute sind 16 verschiedene RTK-Familien gefunden worden, in die die RTKs anhand ihrer Struktur unterteilt werden. Außerdem gibt es noch eine Reihe zusätzlicher RTKs, die keiner Familie zugeordnet werden können (van der Geer et al, 1994).

Die zuerst entdeckte RTK war 1982 der Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Cohen, 1986; Ullrich et al, 1984). Der EGF-Rezeptor wird häufig in Mammakarzinomen, Plattenepithelkarzinomen oder Karzinomen anderen

Einleitung

epithelialen Ursprungs überexprimiert (Yarden und Ullrich, 1988; Eccles et al, 1995; Ellerbroek et al, 1998). Eine Überexpression anderer humaner Gene, die für Rezeptoren aus der EGFR-Familie kodieren wie vor allem HER2/neu ist für viele Adenokarzinome charakteristisch und ist oft ein Marker für eine schlechte Prognose (Slamon et al, 1989; Hynes und Stern, 1994). Neben der Überexpression werden RTKs in Tumoren häufig durch Mutationen konstitutiv aktiv. So führt z.B. eine Mutation im Gen des HER2/neu-Rezeptors, die einen Aminosäureaustausch in der Transmembrandomäne zur Folge hat (Val 664 => Gln), zu einem konstitutiv aktiven neu-Rezeptor (Stern und Kamps, 1988; Weiner et al., 1989). Eine onkogene Version des EGF-Rezeptors hingegen entsteht z.B. durch Deletion im Proto-Onkogen, was einen Verlust des ligandenbindenden extrazellulären Anteils des EGF-Rezeptors und seine konstitutive Aktivierung zu Folge hat. RTKs aus anderen Familien wie z.B. der PDGF-Rezeptor („platelet derived growth factor“) und der IGF1-Rezeptor („insulin-like growth factor“) spielen ebenfalls in verschiedenen Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom eine Rolle (Rogler et al, 1994; Favoni und de Cupis, 2000).

1.2.2. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen im malignen Melanom

Auch im malignen Melanom und davon etablierten Zelllinien findet man eine generell gesteigerte Phosphotyrosinkinaseaktivität, die entweder durch Überexpression von Pigmentzell-typischen Kinasen und/oder durch erworbene unphysiologische Expression zusätzlicher RTKs entsteht (Halaban, 1994). RTKs, die physiologische Rezeptoren für Pigmentzellen darstellen, sind z.B. der FGF-R1, c-Met, IGF1-R und c-Kit (Rodeck und Herlyn, 1991, Halaban, 1994).

Der FGF-Rezeptor spielt eine wichtige physiologische Rolle in der Differenzierung und Proliferation von Melanozyten (Halaban, 1996). Normale Melanozyten sind von exogenem bFGF für ihre Proliferation abhängig, während die meisten Melanomzellen eine hohe bFGF Expression zeigen und so durch einen autokrinen Loop eine konstitutive Aktivierung ihres FGF-Rezeptors erreichen (Halaban et al, 1988) und dadurch unabhängig von externen Wachstumsfaktoren werden (Becker et al, 1992; Halaban et al, 1994; Yayon et al, 1997). Allerdings müssen für die Tumoreigenschaft der Zellen noch andere Ereignisse eine Rolle spielen, da eine konstitutive endogene bFGF Expression in normalen Melanozyten zwar zu autonomem Wachstum in Zellkultur, nicht jedoch zu einer Tumorentwicklung in vivo nach subkutaner Injektion der Zellen in nackte Mäuse führt (Dotto et al, 1989).

Einleitung

Die RTK c-Met wird von Melanozyten exprimiert und ihre Aktivierung durch den Liganden HGF/SF („hepatocyte growth factor/scatter factor“) stimuliert verschiedene zelluläre Aktivitäten, die zum neoplastischen Phänotyp führen können wie Zellproliferation, Motilität, Invasivität und morphogenetische Transformation. HGF/SF transgene Mäuse zeigen eine Anhäufung von Melanozyten in Epidermis und Dermis und entwickeln im Mittel innerhalb von 20 Monaten primäre kutane Melanome (Noonan et al, 2000). Somit könnte c-Met in frühen Stadien der Transformation eine Rolle spielen (Halaban et al, 1993). In Melanomen wird c-Met allerdings vor allem in späteren Stadien exprimiert (Natali et al, 1993), wobei die Stimulierung von Met in Melanomzellen durch eine Aktivierung von proteolytischen Enzymen wie z.B. der Gelatinase zu einer gesteigerten Invasivität und Motilität führt. Met hat einen wachstumsinhibierenden Effekt auf Melanomzellen, der allerdings in der Umgebung von Hepatozyten (durch hepatozytäre Wachstumsfaktoren) aufgehoben wird (Rusciano et al, 1998). Dies fördert die Lebermetastasierung von Melanomen, wobei die Leber tatsächlich in vivo einen der häufigsten Metastasierungsorte von Melanomen darstellt. Vor allem Uveamelanome metastasieren bevorzugt in die Leber, was häufig mit einer c-Met Expression korreliert (Hendrix et al, 1998).

Für die Aktivierung des IGF1-Rezeptors wurde neben der Wachstumsstimulation eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Antiapoptose beschrieben. So zeigte sich, daß eine Inhibierung dieser RTK in humanen Melanomzelllinien neben einem Wachstumsstop in die Apoptose führt (Kanter-Lewensohn et al, 1998). Andererseits sind aber auch Melanomzelllinien beschrieben, die nicht auf eine IGF1-R Stimulierung oder Inhibierung reagierten (Furlanetto et al, 1993). Eine IGF1-R Expression wird in vielen Melanomen (Fleming et al, 1994; Stracke et al, 1989) und in den meisten Melanommetastasen (Kanter-Lewensohn, 1998) gefunden. Diese sind in ihrem Wachstum durch autokrine Stimulation von exogenem IGF-I unabhängig (Herlyn et al, 1990).

Rezeptortyrosinkinasen, die im malignen Melanom häufig überexprimiert oder ekto exprimiert werden, sind u.a. der EGF-Rezeptor (Houghton et al, 1987), ECK, FGF-R4, HEK2, TIE, TYRO-9, TYRO-10 (Easty et al, 1993, 1995a,b) und AXL (Quong et al, 1994). Allerdings konnte bisher keine direkte Rolle dieser Rezeptortyrosinkinasen für die Initiation oder Aufrechterhaltung des neoplastischen Phänotyps der Melanomzellen gezeigt werden. Zudem zeigen verschiedene Melanome und Melanomzelllinien sehr heterogene Expressionsmuster dieser Rezeptortyrosinkinasen, so daß diese Moleküle möglicherweise keine relevante Funktion besitzen, sondern nur die Konsequenz einer chaotischen Molekularbiologie von sich schnell teilenden Zellen darstellen. Die davon

Einleitung

in Melanomen am häufigsten überexprimierten Rezeptortyrosinkinasen sind ECK und HEK2 aus der EPH-Familie der Rezeptortyrosinkinasen (Easty et al, 1995a). Eine EGF-Rezeptor Expression wurde in 91% von Melanometastasen gefunden, verglichen mit 19% in Nävuszellnävi (de Wit et al, 1992). Dies könnte einen möglichen Einfluß des EGF-Rezeptors in späteren Melanomstadien aufzeigen. Allerdings scheint der EGF-R nicht die Proliferation oder diese zumindest nicht ausschlaggebend zu beeinflussen, da ein monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor das Melanomwachstum nicht inhibieren konnte (Rodeck et al, 1991). TIE und der VEGF-R werden im malignen Melanom nicht direkt in den Melanomzellen exprimiert, sondern in den ins Melanom einsprossenden Gefäßen (Lin et al, 1998, 1999; Kaipainen et al, 1994). So könnten die Melanomzellen über eine VEGF-Sekretion die Angiogenese und somit ihre Versorgung fördern.

Es gibt aber auch RTKs, deren Expression während der Melanomprogression verloren geht. Dies geschieht häufig mit c-Kit, dem Rezeptor für den Stammzellfaktor/MGF („mast cell growth factor“) (Lassam und Bickford, 1992; Natali et al, 1992), der für die Entwicklung von Melanozyten eine entscheidende Rolle spielt (Nocka et al, 1990; Funasaka et al, 1992). In Melanomen, in denen c-Kit exprimiert wird, ist diese RTK nicht konstitutiv aktiv und kann nicht in positiver Weise mit der malignen Transformation von Melanozyten assoziiert werden (Funasaka et al, 1992). Vielmehr scheint die Reduktion der c-Kit Expression eine Folge der Transformation zu sein (Lassam und Bickford, 1992). Ebenso wurden für die RTK KDR, TYRO-3, SEK und den katalytisch inaktiven RTK-ähnlichen Rezeptor PTK7, die in Melanozyten exprimiert werden, eine Herabregulierung der Expression in metastasierenden Melanomen und Melanomzelllinien gefunden. (Easty et al, 1993, 1995b, 1997). Da das allerdings jeweils nicht in allen Melanomen der Fall ist, stellt der Verlust der Expression dieser RTKs wohl kein notwendiges Kriterium für die Transformation dar.

1.3. Das Xiphophorus-Melanom-System

1.3.1. Allgemeine Einführung

Zu den ältesten und am besten verstandenen Beispielen eines erblichen Tumors gehört das Melanom von tropischen Fischen der Gattung Xiphophorus, die zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae) gehören. Beheimatet ist dieser Fisch in den Flußsystemen Mexikos, Honduras und Guatemalas (Kallman, 1975) und die

Einleitung

verschiedenen Arten unterscheiden sich unter anderem in ihrem Pigmentmuster. In Xiphophorus-Fischen lassen sich zwei Typen von spezialisierten melaninbildenden Pigmentzellen unterscheiden: die Mikro- und die Makromelanophoren, die sich aus den gleichen Vorläuferzellen, den Melanoblasten entwickeln (Humm und Young, 1956). Die Mikromelanophoren sind in der gesamten Haut des Fisches verteilt und machen die graue Körperfarbe aus, während die Makromelanophoren die verschiedenen Pigmentmuster der Fische bilden (Gordon, 1927, 1959).

Durch Kreuzung bestimmter Arten der Gattung Xiphophorus treten in den Nachkommen Fische mit malignem Melanom auf (Abb.3), welches sich aus Makromelanophoren entwickelt (Anders, 1991).

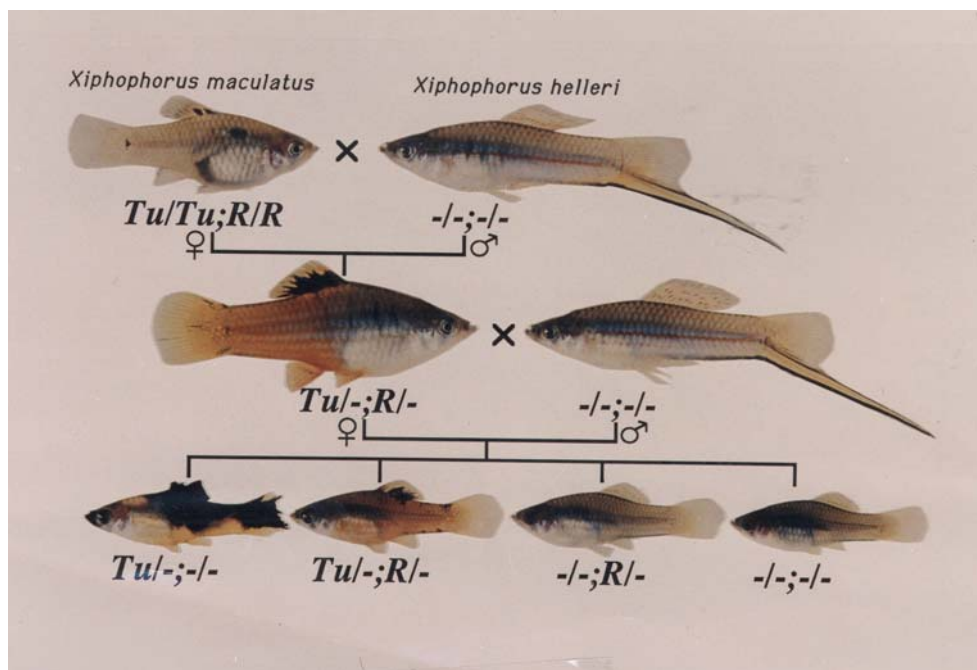


Abb.3: Kreuzungsbedingte Melanombildung bei Xiphophorus und genetisches Modell für die Tumorentstehung (Erläuterung siehe Text)

Bei der klassischen Standardkreuzung wird ein *Xiphophorus maculatus* Weibchen (Platy) mit einem Makromelanophorenmuster in der Rückenflosse (*Sd* für „spotted dorsal“) mit einem *Xiphophorus helleri* Männchen (Schwertträger) ohne Pigmentmuster (*X. helleri*) gekreuzt. Die uniformen Nachkommen der F1-Generation sind fruchtbar, größer als die Elternfische und zeigen einen vergrößerten Pigmentfleck in der Rückenflosse. Wenn man solch ein Weibchen wiederum mit einem *X. helleri* Männchen zurückkreuzt, erhält man in einer Mendelschen Verteilung 50% Nachkommen ohne

Einleitung

Pigmentflecke mit dem Phänotyp von *X. helleri*, 25% mit dem Phänotyp der F1-Generation (vergrößerter Pigmentfleck) und 25% mit einem invasiv wachsenden malignen Melanom.

Das erbliche Auftreten der Melanome läßt sich durch folgendes genetisches Modell erklären (Abb.3). Reinrassige *X. maculatus* besitzen zwei Allele eines Tumorgens (*Tu*) und zwei Allele eines Repressorgens (*R*) (Ahuja und Anders, 1976). Der pigmentflecklose *X. helleri* hingegen besitzt diese Gene nicht. Die Hybriden der F1-Generation erhalten nur ein *Tu*-Gen und ein *R*-Gen des Mutterfisches und dies führt zu einer benignen Vermehrung der Makromelanophoren in der Rückenflosse. Es wird deshalb auch als „benignes Melanom“ bezeichnet. Bei erneuter Rückkreuzung mit *X. helleri* kommt es in einer Mendelschen Verteilung zu 25% Fischen mit dem Genotyp von *X. helleri*, 25% mit nur einem *R*-Gen, 25% mit dem Genotyp der F1-Generation und 25% mit nur einem *Tu*-Gen ohne Repressor. Die daraus resultierende unregulierte Expression des Tumorgens induziert die Ausprägung des malignen Melanoms (Anders, 1991).

Das melanom-induzierende Tumorgen kodiert für die onkogene Rezeptortyrosinkinase Xmrk („Xiphophorus Melanom Rezeptor Kinase“; Wittbrodt et al, 1989). Xmrk hat ein Molekulargewicht von 160kDa und wurde wegen hoher Ähnlichkeit zum humanen EGF-Rezeptor dieser RTK-Familie zugeordnet. Im Fisch gibt es 2 Kopien eines EGF-Rezeptors, EGFRa und b, wobei letztere das Xmrk Protoonkogen darstellt (Gomez et al, in Vorbereitung).

Die onkogene Version (ONC) von Xmrk ist eine durch Genduplikation entstandene zweite Kopie einer proto-onkogenen Form (INV). INV-Xmrk wird in allen bisher untersuchten Xiphophorusarten und anderen Fischen in fast allen Geweben exprimiert (Adam und Schartl, 1992; Schartl, 1995). INV scheint neben einer Rolle bei induktiven Prozessen in der Embryonalentwicklung einen Einfluß auf Proliferation und Differenzierung neuroepithelialer Gewebe zu haben (Winkler et al, 1994). Die Expression von dominant negativen Xmrk-Mutanten in Fischembryonen führte zu einer dramatischen Beeinflussung der Organogenese, insbesondere zu Fehldifferenzierung des Neuralrohrs und Gehirns, Organen, in denen das Proto-Onkogen exprimiert ist.

ONC-Xmrk wird nur im Melanom überexprimiert und die Stärke der Expression ist direkt proportional zum Malignitätsgrad des Melanoms (Mäueler et al, 1988, Wittbrodt et al, 1989). Neben der Überexpression sind allerdings noch aktivierende Mutationen in ONC-Xmrk (Dimitrijevic et al, 1998), die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen, notwendig für die Tumorinduktion. Von 12 Aminosäureaustauschen zwischen INV und ONC scheinen für die konstitutive Aktivierung zwei wichtig zu sein,

Einleitung

die die Aminosäuresequenz im extrazellulären Anteil von Xmrk verändern (Gomez et al, 2001). Dabei spielen die Veränderungen von intramolekularen Disulfidbrücken zu intermolekularen Disulfidbrücken zwischen zwei Xmrk-Proteinen eine wichtige Rolle. Dies führt zur kovalenten Dimerbildung und somit zur konstitutiven Aktivierung von Xmrk (Gomez et al, 2001). Somit stellt Xmrk eine RTK dar, die über die zwei „klassischen“ Mechanismen, nämlich Überexpression und aktivierende Mutationen zur onkogenen Version eines physiologischen Rezeptors wurde.

Expressionsstudien in transgenen Medaka-Fischen (*Oryzias latipes*) zeigten, daß allein die starke Expression von ONC-Xmrk ausreichend für die Tumorbildung ist. INV-Xmrk hingegen führt nicht zu einer Tumorinduktion (Winkler et al, 1994). Dabei konnte ONC-Xmrk offensichtlich nur zur neoplastischen Transformation von solchen Zellen führen, die über entsprechende Komponenten der Xmrk induzierten intrazellulären Signalweiterleitung verfügen, da nur in bestimmten Geweben wie Hirn, Epithelien, Auge und Pigmentzellen Tumoren ausgelöst werden konnten (Winkler et al, 1994).

1.3.2. Signaltransduktion von Xmrk

Der Prozeß, durch den Zellen lokale Signale extrazellulärer Stimuli amplifizieren und ins Innere der Zellen weiterleiten, wird als Signaltransduktion bezeichnet.

Bei RTKs sorgt die Bindung des Liganden für eine Dimerisierung des Rezeptors (Heldin 1995, 1996). Dadurch wird die Tyrosinkinase aktiviert, die dann jeweils intrazelluläre Tyrosinseitenketten des Dimer-Partners transphosphoryliert (Autophosphorylierung). Auf diese Weise phosphorylierte Tyrosine dienen als hochaffine Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine (Favoni und de Cupis, 2000). Dabei binden verschiedene RTKs unterschiedliche Kombinationen von Proteinen, so daß unterschiedliche Antworten ausgelöst werden. Zusätzlich ist die Induktion bestimmter Signalwege und Zellantworten auch durch den zellulären Kontext determiniert, d.h. eine RTK kann in verschiedenen Zellen durch Rekrutieren verschiedener Signalproteine verschiedene Wirkungen haben. Wachstumsfaktoren können in einem Zelltyp sogar konzentrationsabhängig qualitativ unterschiedliche Ergebnisse erzielen (Cross und Dexter, 1991).

Innerhalb der Signaltransduktionskaskade ist jeder Schritt solch einer komplexen Serie von enzymatischen Reaktionen ein potentieller Regulationspunkt und die verschiedenen Signaltransduktionskaskaden greifen an solchen Punkten ineinander. So entsteht ein sehr komplexes Bild der Mechanismen, die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptoseverhalten der Zellen steuern. Die RTKs haben dadurch einen ausgeprägten

Einleitung

Einfluß auf das kontrollierte Zellwachstum, was das onkogene Potential dieser Rezeptoren erklärt.

Der onkogene Xmrk-Rezeptor zeigt eine konstitutive Aktivität, die zur dauerhaften Tyrosinphosphorylierung seiner Substrate führt (Wittbrodt et al, 1992; Malitschek et al, 1994). Bis heute konnte eine Reihe von Substraten identifiziert werden, die durch Xmrk rekrutiert werden. Dazu zählen die Phospholipase C γ (PLC γ), die Adapterproteine Shc und Grb2, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die Fyn-Kinase aus der Familie der Src-Kinasen und der Transkriptionsfaktor STAT5 (Wellbrock et al, 2002). Alle diese Substrate zeichnen sich durch den Besitz sogenannter src homologer Domänen (SH2-Domänen) aus, anhand derer sie die Phosphotyrosine von Xmrk erkennen und binden können. SH2-Domänen definieren Domänen, die spezifisch mit Phosphotyrosin-Resten interagieren und eine Homologie zu der entsprechenden Domäne im Protein pp60^{c-src} aufweisen (Sadowski et al, 1986; Pawson, 1995). Nach Bindung an den Rezeptor werden die SH2-Domänen Proteine selbst an Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert. Sie sorgen dann durch Interaktionen mit weiteren Proteinen für die Induktion verschiedener Signalwege, auf die im folgenden genauer eingegangen werden soll.

Phospholipase C γ

Für Xmrk wurde gezeigt, daß die Aktivierung des Rezeptors in Xiphophorus-Melanom-Zellen zu einer Rekrutierung der Phospholipase-C γ (PLC γ) führt (Wellbrock et al, 1995). Aus Studien an anderen RTKs, wie dem EGF-Rezeptor, weiß man, daß diese Aktivierung zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI_{4,5}P₂) zu zwei wichtigen Second-Messenger-Molekülen, nämlich 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-triphosphat (PI_{1,4,5}P₃) führt. PI_{1,4,5}P₃ wird ins Cytosol freigesetzt und bindet an Calciumkanäle im endoplasmatischen Retikulum (Petch et al, 1990). Das so freigesetzte Calcium kann neben Veränderungen im Zytoskelett eine Bindung der Proteinkinase C (PKC) an die Plasmamembran bewirken, wo sie durch das in der Membran verbliebene DAG aktiviert wird. Die PKC kann verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF κ B und Enzyme des Stoffwechsels, aber auch die Raf-Kinase und sogar den Rezeptor selbst phosphorylieren. Diese für den EGF-R beschriebene Phosphorylierung durch die PKC sorgt für eine Herabsetzung der Rezeptorsensibilität, indem die Affinität des Rezeptors für den Liganden abnimmt (Lin et al, 1986).

Einleitung

MAP-Kinase-Weg

Die Bindung von Shc und Grb2 an Xmrk sorgt für die Induktion des MAP-Kinase-Weges (Wellbrock und Schartl, 1999). Dies stellt, wie in den meisten Zellen, auch in den Fischmelanomzellen und in einer stabil Xmrk exprimierenden murinen pro-B Zelllinie (Ba/F3) ein Proliferationssignal dar. Das Adapterprotein Grb2 (für "Growth factor receptor binding protein 2") bindet dabei mit seiner SH2-Domäne entweder direkt an den aktivierten Rezeptor oder aber über ein weiteres Adapterprotein Shc. Shc-Proteine (p52, p46 und p66) besitzen SH2- und Phosphotyrosinbinde(PTB)-Domänen, mit denen sie an Phosphotyrosine des Rezeptors binden (Migliaccio et al, 1997; van de Geer and Pawson, 1995). Dieser phosphoryliert Shc (Nowak et al, 1997), was dann die Bindungsstelle für Grb2 darstellt. Grb2 wiederum bindet mit seinen beiden SH3-Domänen das GEF(Guaninnucleotide Exchange Factor)-Protein Sos (für "son of sevenless", ein Drosophila-Homolog) und lokalisiert es so an die Plasmamembran, wo es die GTPase Ras aktiviert. Diese Hydrolyseaktivität in Ras kann durch ras-GTPase-aktivierendes Protein, das ebenfalls von vielen RTKs rekrutiert und inhibiert wird, gesteigert werden (Borowski et al, 1996). Aktiviertes Ras bindet und aktiviert Mitglieder aus der Familie der Raf-Serin/Threoninkinasen und setzt so eine Serin/Threoninkinasekaskade in Gang. In deren Verlauf wird zunächst MEK an Serin/Threonin phosphoryliert (Zwick et al, 1999), die dann die MAP(mitogenaktivierte Protein)-Kinase ERK ("extrazellulär regulierte Kinase") an einem Threonin- und einem Tyrosinrest phosphoryliert. ("MEK" steht für MAP-ERK-Kinase.). Darüberhinaus phosphoryliert MEK aber auch Sos, wodurch dessen Interaktion mit Proteinen gehemmt und so der MAPK-Weg wieder abgeschaltet wird (Buday, 1999).

Der MAP-Kinase-Weg ist evolutionär hochkonserviert, so daß die meisten, wenn nicht sogar alle eukaryontischen Zellen inklusive der Pflanzen über eine Proteinkinasekaskade verfügen, die mit der Aktivierung einer MAP-Kinase endet (Johnson and Vaillancourt, 1994). Bis heute sind mindestens sieben verschiedene MEKs und MAP-Kinasen (MAPK) allein in Säugern gefunden worden (Dhanasekaran und Reddy, 1998), wobei bei dem oben beschriebenen Weg MEK1 und 2 und durch diese ERK1 und 2 aktiviert werden. Ist die MAPK aktiviert, leitet sie das Signal weiter, indem sie in der Zelle verschiedenartige Proteine wie andere Proteinkinasen wie z.B. RSK und Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1, Jun und Fos, Myc, TCF aber auch STAT-Proteine (siehe unten) Serin/Threonin-phosphoryliert, was dann zur Expression verschiedener Gene führt, die mit der Steuerung von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose assoziiert sind (Favoni und de Cupis, 2000).

Neben der Aktivierung des MAPK-Weges wird der Serin/Threoninkinase Raf noch eine antiapoptotische Funktion durch Interaktion mit Proteinen der Bcl-2 Familie

Einleitung

zugeschrieben. So findet sich eine Bindung an Bcl-2 (Wang et al, 1996b) und außerdem kann Raf Bad (unabhängig vom PI3K-Weg, siehe unten) phosphorylieren, wodurch dieses an 14-3-3 Proteine gebunden wird und somit nicht mehr mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-X_L dimerisieren kann. Dieses ist dann frei, um seine antiapoptotische Wirkung zu entfalten.

Grb2-Rekrutierung führt aber nicht nur zu einer MAPK-Aktivierung. Es wurde noch eine Reihe von Proteinen gefunden, die neben Sos an die SH3-Domäne von Grb2 binden können. Dies sind u.a. Dockingproteine wie Cbl, GEF-Proteine wie C3G, Phosphotyrosinphosphatasen wie SHP-2, aber auch die Serin/Threoninkinase MEKK1 (Buday, 1999). Zu welchen Signalwegen das führt, ist noch weitestgehend unbekannt.

PI-3-Kinase-Weg

Die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) ist ein Dimer bestehend aus einer regulatorischen 85kDa Komponente und einer katalytischen 110kDa Untereinheit. Die regulatorische Untereinheit besitzt zwei SH2-Domänen und bindet über diese an spezifische Phosphotyrosine des Xmrk-Rezeptors, wodurch sie aktiviert wird (Wellbrock et al, 1999). Auf diese Weise gelangt die katalytische Untereinheit in unmittelbare Nachbarschaft zu ihren membrangebundenen Substratmolekülen, den Phosphoinositiden, die durch Phosphorylierung der Phosphoinosite Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI₄P) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI_{4,5}P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4-bi-phosphat (PI_{3,4}P₂) bzw. Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PI_{3,4,5}P₃) werden. Diese führen über eine Bindung an die "pleckstrin homology" (PH) Domäne zur Membranbindung der Serin/Threoninkinase Proteinkinase B (PKB) oder auch Akt (Burgering und Coffey, 1995; Cross et al, 1995; Franke et al, 1995), wo diese durch die Proteinkinase B-Kinase (oder auch USK) oder andere unbekannte Kinasen aktiviert wird (Alessi et al, 1997; Stokoe et al, 1997). Diese Akt-Phosphorylierung konnte auch für den Xmrk-Rezeptor nachgewiesen werden (Wellbrock et al, 1999).

Akt kann Bad, ein Protein aus der Bcl-2 Familie, phosphorylieren, wodurch dessen proapoptotische Funktion inhibiert wird (Zha et al, 1996; Dudeck et al, 1997; Franke et al, 1997). Aktivierte Akt kann aber auch in einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3) resultieren (Sutherland et al, 1993), die den Transkriptionsfaktor β -Catenin und den Tumorsuppressor APC (gefunden bei der Adenomatosis polyposis coli) durch Phosphorylierung und Assoziation inhibieren kann (Morin et al, 1997).

Einleitung

Interaktion mit Mitgliedern der Src-Familie

pp60^{c-src} (Src) ist der Prototyp der Src-Kinasen, welche zytoplasmatische, membran-assoziierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen sind. Sie besitzen eine SH2-, eine SH3- und eine Kinasedomäne ("SH1"). In die Src-Familie gehören neben Src unter anderem auch Fyn, Fgr, Lyn und Yes. Die Interaktion mit RTKs geschieht wiederum über die SH2-Domäne. Src scheint einen Einfluß auf das Zytoskelett zu haben, da Src mit Molekülen des Zytoskeletts wie z.B. Cortaktin oder der Nichtrezeptor-Tyrosinkinase Fak interagiert (Belsches et al, 1997; Hunter, 1997).

Xmrk induziert eine starke Fyn-Kinase-Aktivierung, die in ihrer Stärke mit dem Malignitätsgrad der Melanome korreliert ist. Somit scheint Fyn eine entscheidende Rolle in der Xmrk spezifischen Signaltransduktion zu spielen (Wellbrock et al, 1995; Wellbrock und Schartl, 2000). Fyn wird nach der Bindung an Xmrk von diesem durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert und interagiert mit der PI3K, die so durch Fyn aktiviert wird (Wellbrock und Schartl, 2000). Darüberhinaus induziert Fyn eine Herabregulation der Expression der MAPK-Phosphatase MKP-1 und sorgt so für eine hohe MAPK-Aktivität, die in Melanozyten für eine Suppression der Differenzierung verantwortlich gemacht werden konnte (Wellbrock et al, 2002b).

Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie

Die Mitglieder der STAT-Proteine ("signal transducers and activators of transcription") sind latente zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren. Bisher wurden sieben Mitglieder identifiziert, nämlich STAT1-6 (einschließlich 5a und b). Die STATs binden mit ihrer SH2-Domäne an die aktivierte RTK und werden von dieser an einem Tyrosinrest am C-terminalen Ende phosphoryliert, der in allen STAT-Familie-Mitgliedern hochkonserviert ist. Dies induziert die Dimerisierung zweier STAT-Moleküle, die dann in den Kern translozieren und dort an DNA binden, die die jeweilige STAT-Bindungssequenz enthält (Bromberg und Darnell, 2000). Für die volle Aktivität der STAT-Transkriptionsfaktoren wird außerdem eine Serin-Phosphorylierung durch aktivierte MAPK (siehe oben) als notwendig diskutiert. Neben der Phosphorylierung und damit Aktivierung durch die RTK selbst können auch mehrere Nicht-RTKs wie z.B. Src und Abl zu einer STAT-Phosphorylierung führen.

Als Transkriptionsfaktoren induzieren die STAT-Proteine die Transkription verschiedener Gene, die in Wachstum, Differenzierung und Apoptoseregulation involviert sind (Favoni und de Cupis, 2000). STAT1 und 3 bilden Homo- und Heterodimere und binden an die gleiche Promotorsequenz, das sogenannte Serum-induzierbare Element (SIE). Dadurch kommt es zur Expression verschiedener Gene wie z.B. *c-fos* und *pim-1* (STAT3). STAT5 hingegen bindet an eine andere Promotor-

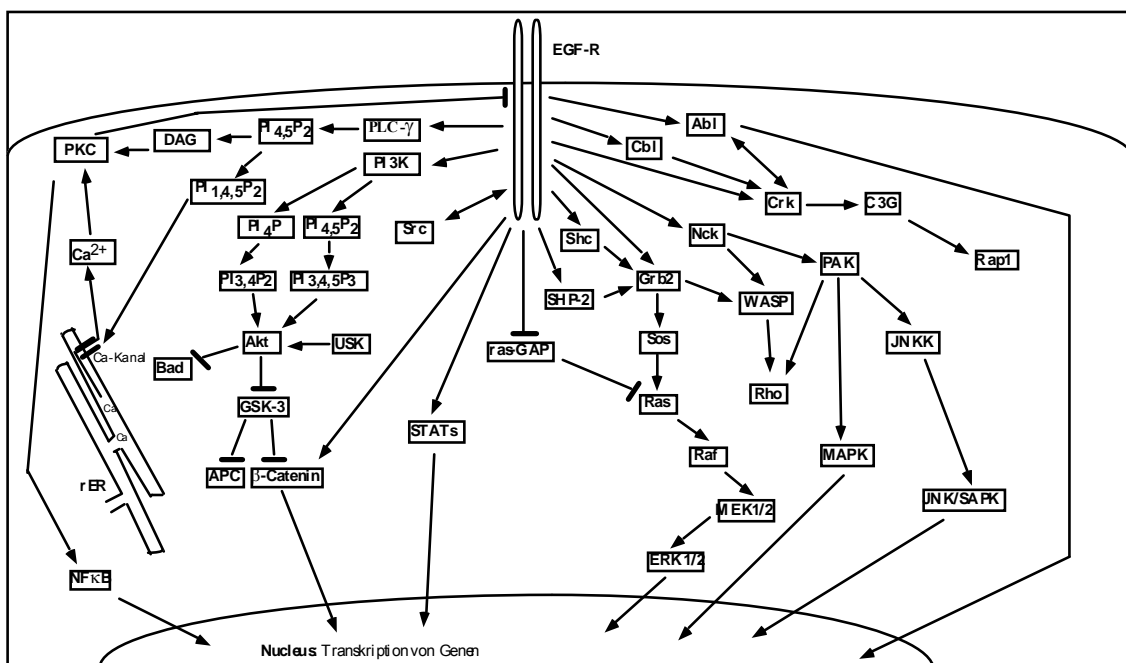
Einleitung

sequenz und führt so zur Expression von z.B. *cis*, *pim-1*, *bcl-X* und anderen. Je nach Zelltyp entwickeln die STAT-Proteine unterschiedliche Wirkungen. STAT1 scheint eine wichtige Rolle im Wachstumsstopp zu spielen, während STAT3 und 5 in Zellproliferation und Antiapoptose involviert und in vielen Tumoren durch permanente Phosphorylierung konstitutiv aktiv sind (Bromberg und Darnell, 2000).

Für Xmrk konnte gezeigt werden, daß diese RTK in Fischmelanomzellen STAT5, nicht aber STAT1 und 3 aktiviert. Dies führt zur Induktion der STAT5-Zielgene *cis*, *pim-1* und *osm* (Wellbrock et al, 1998b; Baudler et al, 1999). STAT5 zeigt außerdem eine höhere Aktivität in malignen Xiphophorus-Melanomen als in benignen, was zeigt, daß STAT5-Aktivierung mit der Malignität der Tumoren korreliert.

Neben diesen für Xmrk nachgewiesenen Signalwegen, sind noch eine Reihe von weiteren Proteinen und Wegen für andere RTKs (z.B. den EGF-R) wichtig, die bisher für Xmrk noch nicht untersucht wurden. Dazu gehört z.B. neben der Aktivierung von β -Catenin auch eine Rekrutierung von weiteren Adapterproteinen wie Nck, Crk und Cbl und der Phosphotyrosinphosphatase SHP-2, die mit einer Vielzahl von Proteinen wie der PI3K, Grb2, der Abl-Kinase und untereinander interagieren, deren Funktion aber noch weitestgehend unbekannt ist (Buday, 1999). Ein Modell über die für den EGF-R in verschiedenen Zellen möglichen Signalwege (a) und die für Xmrk bisher identifizierten Signalwege (b) gibt Abb.4. Dabei sind die Signalwege für Xmrk (in b) wegen ausführlicher Darstellung für den EGF-R (in a) vereinfacht dargestellt.

a



Einleitung

b

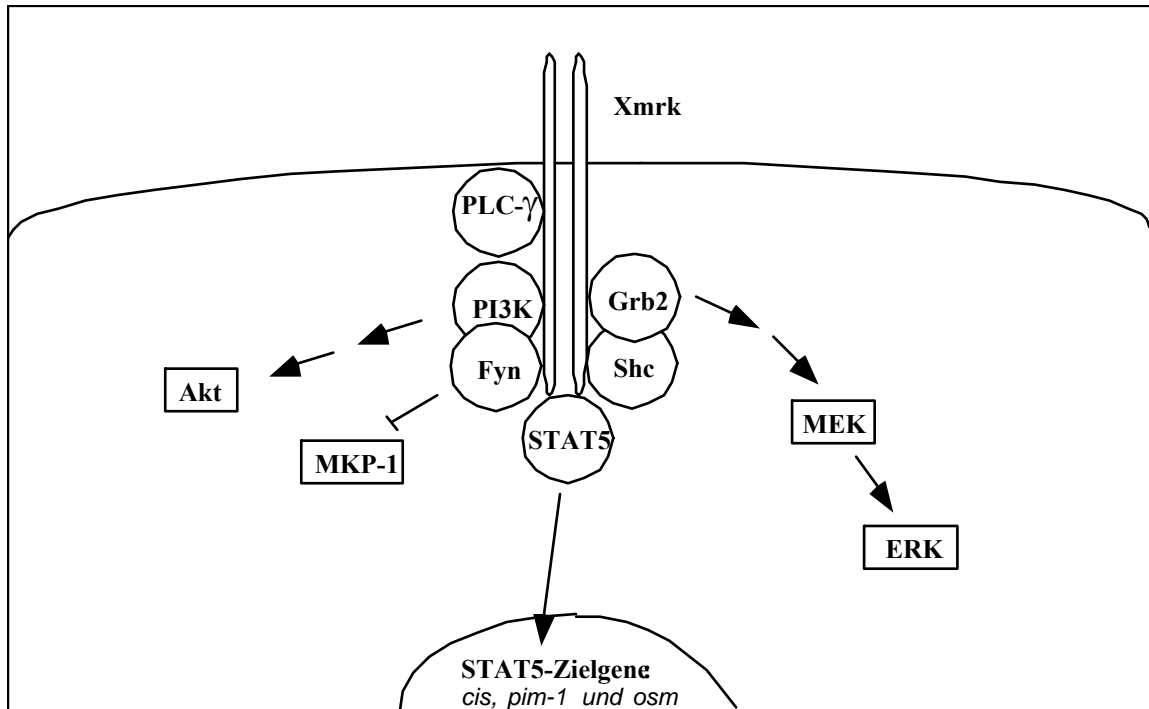


Abb.4: Übersicht über die bisher identifizierten Signalproteine und -wege des EGF-Rezeptors (a; alle möglichen Wege aus verschiedenen Zellsystemen) und des Xmrk-Rezeptors (b; PSM und Ba/F3-Zellen)

1.4. Zielsetzung

Nachdem Xmrk als Auslöser für die Melanomentwicklung in Xiphophorus identifiziert wurde (Wittbrodt et al, 1989), konzentrierte sich das Interesse auf die durch den Rezeptor induzierte Signaltransduktion. Expressionsexperimente in Medaka-Fischen, in denen Xmrk nur in bestimmten Geweben wie Gehirn, Epithelien, Auge und Pigmentzellen zu Tumoren führte (Winkler et al, 1994), zeigten, daß spezifische Signalproteine für die onkogene Wirkung von Xmrk notwendig sind.

Eine Reihe verschiedener SH2-Domäne tragender Signalproteine wie Grb2, Shc, PLC- γ , PI3K, Fyn und STAT5 wurden schon als Substrate des Xmrk-Rezeptors identifiziert. Sie werden vom Rezeptor rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert. Mit Hilfe von Proliferationsstudien wurde außerdem untersucht, ob Xmrk die Zellproliferation anregt, welches in verschiedenen Zelllinien (wie NIH 3T3-, melan a und Ba/F3-Zellen) sowie in Fischmelanomzellen (PSM) gezeigt werden konnte (Wellbrock et al, 2002).

Einleitung

Im Gegensatz zu den meisten Tumorzellen, bei denen mehrere Gene mutieren müssen, um einen malignen Phänotyp auszuprägen, reicht beim Xiphophorusmelanom ein einziges mutiertes Gen aus. Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich deshalb die Frage, ob ein Onkogen-Produkt allein, nämlich der Xmrk-Rezeptor neben mitogenen Signalen auch antiapoptotisch wirken kann und - wenn ja - welche Signalwege dafür wichtig sind.

Untersucht werden sollte dies zunächst in der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3, welche ein sensitives System für die Untersuchung von Proliferation und Apoptose darstellt. Ba/F3-Zellen proliferieren unter IL-3 Stimulation und werden apoptotisch, wenn IL-3 entzogen wird, brauchen dieses Signal folglich auch zum Langzeitüberleben. In Ba/F3 Zellen, die keine Rezeptortyrosinkinasen der EGF-Rezeptorfamilie exprimieren (Riese et al, 1995), wurde die Rezeptorchimäre HER-mrk exprimiert (Wittbrodt et al, 1992), deren extrazellulärer Teil vom humanen EGF-R und deren intrazellulärer Teil von Xmrk stammt. Diese Rezeptorchimäre kann nun mit EGF stimuliert werden, um so mrk-spezifische Signalwege - im Gegensatz zum konstitutiv aktiven Xmrk-Rezeptor - in *induzierbarer* Form zu untersuchen.

Als Vergleich diene neben den wildtypischen Ba/F3-Zellen eine Ba/F3-Zelllinie, die den humanen EGF-R exprimiert, da bekannt ist, daß der EGF-R in diesem Zellsystem kein Langzeitüberleben sichern kann (Collins et al, 1988; Shibuya et al, 1992).

Nach Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien in Bezug auf Rezeptordichte, Proliferationsverhalten und Langzeitüberleben sollten weitere Untersuchungen Aufschluß über die benutzten antiapoptotischen Signalwege geben. Von humanen Melanomen ist bekannt, daß sie meist eine Überexpression von Bcl-2 und/oder Bcl-X_L zeigen (Leiter et al, 2000), zwei Proteinen aus der Bcl-2 Familie mit antiapoptotischem Effekt. Deshalb lag der Schwerpunkt der Untersuchungen in der Regulation dieser Proteine durch die mrk-Kinase.

Die im heterologen Zellsystem Ba/F3 ermittelten Daten sollten im Anschluß auf ihre Bedeutung in Melanozyten und Melanomzellen verifiziert werden.

2. Material

2.1. Zelllinien

Ba/F3 Zellen:

wt: Die wildtypischen Ba/F3 Zellen sind murine pro-B-Zellen, die endogen den IL3-Rezeptor exprimieren; (Palacios und Steinmetz, 1985)

BaF HER: Ba/F3 Zellen, stabil transfiziert mit dem Expressionskonstrukt pECE/EGFR, Hygromycin resistent

BaF Hm: Ba/F3 Zellen, stabil transfiziert mit dem Expressionskonstrukt Prk5 HER-mrk, Hygromycin resistent

melan-a Zellen:

wt: immortalisierte, nicht Tumor-produzierende Linie von pigmentierten Melanozyten, etabliert von epidermalen Melanoblasten von Embryonen der Maus (C57BL non agouti black mice); (Bennett et al, 1987)

melan-a EGF IX/3: melan-a Zellen, stabil transfiziert mit dem Expressionskonstrukt Cvn HER-mrk, G418 resistent

PSM Zellen:

PSM Zellen stammen von einem amelanotischen Anteil eines spontanen malignen Melanoms von Xiphophorus Hybriden ("Platy-Swordtail-Melanoma"; Wakamatsu et al., 1981). Sie überexprimieren den onkogenen Xmrk-Rezeptor (Wittbrodt et al., 1989).

A2:

Bei dieser Fischzelllinie handelt es sich um spontan immortalisierte, epitheliale Zellen aus Embryonen von *Xiphophorus xiphidium* (Kuhn et al., 1979).

humane Melanomzelllinien:

Alle hier verwendeten humanen Melanomzelllinien entstammen ursprünglich aus malignen Melanomen der Haut.

Bro: Diese Zelllinie wurde aus der Biopsie eines hochaggressiven, amelanotischen, undifferenzierten Primärtumors etabliert; Lockshin et al (1985)

D10: etabliert von G. Degiovanni, Liège, Belgien, keine Erstbeschreibung in der Literatur

Material

A375: ATCC#CRL-1619; von einer 54-jährigen Patientin, etabliert von soliden, amelanotischen Tumoren durch D.J. Giard et al. (1973)

SK-Mel28: ATCC#HTB-72; etabliert aus einer Biopsie eines amelanotischen malignem Melanom von einem 51-jährigen Patienten durch T. Takahashi; Carey et al (1976)

A431:

ATCC#CRL-1711; humane, epidermoide Karzinomzelllinie, hohe EGFR Expression

NIH 3T3:

ATCC#CCL-92; embryonale Fibroblasten; etabliert durch G. Todaro und H. Green (1962) aus "Swiss albino" Mausembryonen

2.2. Bakterienstämme

Zur Vermehrung der Vektoren wurde ausschließlich folgender E.coli-Stamm verwendet:

E.coli XL1-Blue *recA1, endA1, gyrA1, thi-1, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁻), supE44, relA1, Δ (lac), [F', proAB, laxI^qZΔM15, Tn10(tet^r)]*

2.3. Plasmid-Konstrukte

pBcl-X_L: Dieses etwa 5kb große Plasmid enthält ein 900bp langes EcoRI-XbaI Insert, das die kodierende Sequenz für Bcl-X enthält. Es entstand durch Klonieren der *bcl-X* Sequenz in den Vektor pcDNA¹/Amp.

Dieser Vektor wurde konstruiert von R.Brown und ist ein Geschenk von Fabrice Gouilleux, Institut Cochin de Genetique Moleculaire, Paris.

pim-1: 0,57kb-Fragment vom 3'-Ende der kodierenden Sequenz von humanem pim-1, isoliert vom EST Klon IMAGp998J11687 (Resource Centre, MPI Berlin); als Fragment von A.Gomez und E.Geissinger erhalten.

2.4. Oligonukleotide (Primer)

2.4.1. Primer für die Dynabeads-Extraktion

Stat5	β -Casein-GAS-site („gamma activating site“)	
	5'-GATC <u>AGA TTT CTA GGA ATT CAA TCC</u> -3'	25mer
	5'-GATC <u>GGA TTG AAT TCC TAG AAA TCT</u> -3'	25mer
	Frank et al (1995)	
Stat1/3	hSIE ("high affinity Serum inducible element")	
	5'-GATC <u>CAT TTC CCG TAA ATC GTCG</u> -3'	23mer
	5'-GATC <u>CGA CGA TTT ACG GGA AATG</u> -3'	23mer
	Zhong et al (1994)	

Die unterstrichene Sequenz stellt die eigentliche Bindungssequenz dar, "GATC" sorgt für passende Schnittstellen für die Ligasereaktion, um lange Oligoketten zu erzeugen.

2.4.2. Primer für die PCR

Bcl-2	Primer1: 5'-GTG GTG GAG GAG CTC TTC A-3'	19mer
	Primer2: 5'-CTT CAC TTG TGG CCC AGA TA-3'	20mer
	Das so erzeugte PCR-Produkt hat eine Größe von 327bp.	
Bcl-X_L	Primer1: 5'-AAA TGT CTC AGA GCA ACC GGG-3'	21mer
	Primer2: 5'-TCA CTT CCG ATC GAA GAG TG-3'	20mer
	Das so erzeugte PCR-Produkt hat eine Größe von 727bp. Nosaka et al (1999)	
GAPDH	Primer1: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT -3'	24mer
	Primer2: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'	24mer
	Das so erzeugte PCR-Produkt hat eine Größe von 306bp. Wong et al (1994) Neben dem Einsatz als Kontrolle in der RT-PCR diente das amplifizierte Fragment nach Extraktion aus dem Gel und radioaktiver Markierung mit der OLB-Reaktion auch als Sonde für die Northern-Blots.	

2.5. Medien und Pufferlösungen

Alle Medien und Pufferlösungen wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt und wenn nötig durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

Die für die Zellkultur verwendeten Medien wurden von Gibco BRL als Trockenmedium bezogen, nach den Angaben des Herstellers in destilliertem Wasser gelöst und nach pH-Einstellung (pH 7,4) steril filtriert.

Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Lösungen wurden nach Sambrook et al (1989) hergestellt.

RNase A: RNase A in einer Konzentration von 10mg/ml wird zur DNase-Inaktivierung in 10mM Tris/HCl pH 7,5 und 15mM NaCl 15min auf 95°C erhitzt. Nach langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die RNase-Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6. Chemikalien und Radiochemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionslösungen wurden von Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma GmbH (Deisenhofen) bezogen.

Röntgenfilme X-ray Retina; Fotochemische Werke Berlin GmbH

Stimulantien:

TPA und Choleratoxin
(Melanozytenkultur) Calbiochem

IL-3 Überstand von X63Ag8-653 BVP m-IL-3 exprimierenden Zellen (Karasuyama and Melchers, 1988)

Inhibitoren:

Rapamycin Calbiochem

Wortmannin Calbiochem

Radiochemikalien:

[*methyl*-H³]-Thymidin Amersham, Braunschweig, 1mCi (1mCi/ml)

α³²-dCTP Hartmann Analytic, Braunschweig, (3000 Ci/mmol)

2.7. Antikörper

mAb 108.1 monoklonaler Antikörper von der Maus, der gegen ein nicht-denaturiertes Epitop der extrazellulären Domäne des humanen EGF-Rezeptors gerichtet ist
Anwendung im Zell-ELISA
(Lax et al., 1989; von Prof. A. Ullrich, München)

Material

anti-ptyr (5E.2) monoklonaler Antikörper von der Maus gegen Phosphotyrosin
Verdünnung: 1:5000 im Western Blot
(Fendly et al., 1990; von Prof. A.Ullrich, München)

Alle folgenden Antikörper wurden im Western Blot in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

anti-PEP mrk polyklonales Kaninchenserum, das gegen ein Peptid aus der intrazellulären Domäne von Xmrk gerichtet ist
Dieses Peptid unterscheidet sich nur in einer Aminosäure vom korrespondierenden Peptid des humanen EGF-Rezeptors und deshalb zeigt dieser Antikörper eine Kreuzreaktion mit dem EGF-R

anti-Stat5b (C-17) polyklonales Kaninchenserum, das gegen den Carboxyterminus von Stat5b der Maus gerichtet ist
Spezifität: Stat5a und b von Maus, Ratte und Mensch, keine Kreuzreaktion zu Stat1, 2, 3, 4 oder 6
(Santa Cruz)

anti-Stat1 (E-23) polyklonales Kaninchenserum, das gegen den Carboxyterminus von humanem Stat1 β p84 und Stat1 α p91 gerichtet ist
Spezifität: Stat1 von Mensch, Maus und Ratte, keine Kreuzreaktion zu Stat2 bis 6
(Santa Cruz)

anti-Stat3 (C-20) polyklonales Kaninchenserum, das gegen den Carboxyterminus von Stat3 p92 der Maus gerichtet ist
Spezifität: Stat3 der Maus, Mensch und Ratte; keine Kreuzreaktion zu den anderen Stat-Proteinen
(Santa Cruz)

anti-Bcl-X_L polyklonales Kaninchenserum, das gegen humanes Bcl-X_L gerichtet ist
Spezifität: Mensch, Hund, Ratte, Maus und Huhn
(Transduction Laboratories)

anti-Mcl-1 monoklonaler Antikörper von der Maus, der gegen humanes Mcl-1 gerichtet ist
Spezifität: Mensch, Hund, Ratte, Maus und Huhn
(Transduction Laboratories)

anti-MAPK-12D4 monoklonaler Antikörper von der Maus, der gegen phosphorylierte und somit aktivierte MAPK (mitogen activated protein kinase) gerichtet ist
Spezifität: Mensch, Maus und Ratte
(nanoTools)

Material

anti-Pim-1 (N-16) polyklonales Serum von der Ziege, das gegen den Aminoterminus von humanem Pim-1 gerichtet ist
Spezifität: Maus, Ratte und Mensch
(Santa Cruz)

anti-ERK2 (C-14) polyklonales Kaninchenserum, das gegen den Carboxyterminus von ERK-2 der Ratte gerichtet ist
Spezifität: ERK-2 p42 und schwächer ERK1 p44 von Maus, Ratte, Mensch, Huhn und Frosch (Santa Cruz)

Peroxidase(HRP)-gekoppelte Zweitantikörper:

anti-Kaninchen polyklonales Ziegenserum, das gegen die schwere und leichte Kette von Kaninchen IgGs gerichtet ist
Verdünnung: 1:10000-20000
(Biorad)

anti-Maus polyklonales Ziegenserum, das gegen die schwere und leichte Kette von Maus IgGs gerichtet ist
Verdünnung: 1:3000-10000
(Biorad)

anti-Ziege polyklonales Eselserum, das gegen die schwere und leichte Kette von Ziegen IgGs gerichtet ist
Verdünnung: 1:1000-1:5000
(Santa Cruz)

2.8. Marker

2.8.1. Proteinmarker

- Prestained Protein Marker, 27-180 kDa (SDS 7b; Sigma)
- Prestained Protein Marker, 6-175kDa (New England Biolabs)

2.8.2. DNA-Marker

Als Marker zum Vergleich der Größe von DNA-Fragmenten wurde der Vektor pBICat6 mit der Endonuklease MspI geschnitten und mit DNA-Ladepuffer versetzt.

2.8.3. RNA-Marker

- RNA-Leiter mit Fragmenten zwischen 0,24 und 9,5 kb (Gibco BRL)

Material

2.9. Geräte

Blotkammer	BIORAD-MINI TRANS BLOT
Flüssigszintillationszähler	raytest
Gelkammer	Biometra, Minigel-Twin G42
Luminometer	Berthold
PCR-Maschine	T3 Thermocycler, Biometra
Röntgenfilmentwickler	Compact 35, Protec
Sterilarbeitsbank	BRK (Reutlingen) und Klein (Würzburg)
Szintillationszähler	Kontron MR300
Thermoblock	Thermomixer, Eppendorf
Thermocenter	Salvis
Überkopffroller	Heidolph
UV-"cross linker"	GS Gene linker, Biorad
UV-Transilluminatoren	HerolabUVT 2020 (254nm) und Bachofer (Reutlingen, 366nm)
UV/VIS-Spektralphotometer	Pharmacia LKB Ultrospec III
Waagen	Chyp MP300 Mettler H10Tw
Zellerntner	Skatron
Zellkulturbrutschränke	Heraeus
Zentrifugen:	Eppendorf-Centrifuge 5415C Heraeus Biofuge pico Heraeus Labofuge T (auch mit Mikrotiterplatten-Rotor) Heraeus Minifuge RF (auch mit Mikrotiterplatten-Rotor) Heraeus Megafuge 1.0 Sorvall RC-5B (Rotoren: SS-34, SA-300)

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind im Abschnitt "Material" aufgelistet und beschrieben (siehe 2.1.). Die verschiedenen Zelllinien werden unter sterilen Bedingungen wie folgt kultiviert:

Ba/F3 Zellen: Die Kultivierung erfolgt in RPMI-Medium unter Zusatz von 1% einer Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Gibco BRL) (entspricht 10000 U/ml Penicillin und 10000µg/ml Streptomycin), 5% fetalem Kälberserum (FCS, seromed) und 5% von steril filtriertem Überstand von murinen IL-3 exprimierenden X63Ag8-653 BVP Zellen (Karasuyama, 1988).

melan-a Zellen: Kultiviert werden diese Maus-Melanozyten in DMEM-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS (PAA) und je nach Zelltyp:

melan-a wt	200nM TPA, 1,2nM Cholera toxin (Calbiochem)
melan-a EGF IX/3	humanes EGF (50ng/ml)

NIH 3T3: Diese Zellen werden in DMEM-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS kultiviert.

humane Melanomzelllinien (Bro, D10, SK Mel-28 und A375) und A431: Die Kultivierung dieser Tumorzellen erfolgt in RPMI-Medium, dem neben 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS (PAA) zugesetzt werden.

All diese Zellen von Maus und Mensch werden den physiologischen Bedingungen entsprechend bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

PSM und A2: Diese Fischzelllinien werden in Ham's F12-Medium (Gibco BRL) unter Zusatz von 10% FCS (PAA) bei 28°C/5% CO₂ kultiviert.

Methoden

Die Subkultivierung erfolgt bei den als Suspension vorliegenden Ba/F3 Zellen durch Zugabe von frischem Medium im Verhältnis 1:1. Damit die Möglichkeit besteht, während der Versuche stets auf kultivierte Zellen zurückzugreifen, empfiehlt es sich, eine Verdünnungsreihe auf 24-well Schalen anzulegen.

Alle anderen Zelllinien wachsen adhärent und werden bei Erreichen der Konfluenz subkultiviert, wobei nur die Fischzellen (PSM und A2) durch Abspülen gelöst werden können. Die anderen Zelllinien müssen zunächst zwei bis drei Minuten mit Trypsin/EDTA (10x Trypsin von Gibco 1:10 mit 0,5M EDTA) inkubiert werden und können dann mit 0,5M EDTA Lösung abgespült werden.

Zur längerfristigen Lagerung werden ca. 4×10^6 Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in 1ml Einfriermedium (jeweiliges Kulturmedium inklusive Zusätze, 5%FCS zusätzlich, 10%DMSO) durch langsames, kontinuierliches Abkühlen auf -80°C tiefgefroren und können dann bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zur erneuten Kultivierung der tiefgefrorenen Zellen werden diese zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut und zur Verdünnung des zytotoxischen DMSO in 5ml Medium gewaschen und dann ausgesät. Dabei werden die Ba/F3 Zellen in 2ml Medium aufgenommen, um als Verdünnungsreihe auf 24-wells ausgesät zu werden, während die adhärent wachsenden Zellen in 10ml Medium auf 10cm-Schalen gegeben werden. Zentrifugiert werden die Zellen stets für 7 Minuten bei 1100 Upm (Megafuge 1.0, Heraeus).

3.1.2. Stimulation eukaryontischer Zellen

Ba/F3-Zellen: Die Zellen werden 2x in PBS gewaschen, um das Stimulus enthaltende Kulturmedium zu entfernen, und dann im jeweiligen Kulturmedium (mit Penicillin/Streptomycin, ggf. FCS, aber ohne weitere Zusätze) aufgenommen. Dort hungern sie für einige Stunden (je nach Experiment). Dadurch wird versucht, die Zellen in der G_1 -Phase zu arretieren und so vor der Stimulation in der Zellzyklusphase anzugleichen.

Zur Stimulation wurden die Zellen entweder mit 50ng humanem EGF pro ml Medium oder mit 5% IL-3 Überstand versetzt. Für die 10-Minuten Stimulation wurden die Zellen zuerst nach Pelletierung in PBS resuspendiert und dort in einem kleinen Volumen von 2ml mit 100ng/ml EGF bzw. 5% IL-3 Überstand stimuliert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (7min, 1100Upm) geerntet, 1x PBS gewaschen und dann nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Methoden

melan-a Zellen und A431: Auch diese Zellen werden für die verschiedenen Versuche zunächst mit 1x PBS gewaschen und dann in DMEM-Medium (plus Pen/Strep und 10% FCS) gehungert. Die Stimulation erfolgte dann mit TPA/Choleratoxin (200nM/1,2nM) für die wildtypischen Melanozyten und mit 50ng/ml EGF für die HER-mrk exprimierenden melan-a EGF IX/3 bzw. die EGF-Rezeptor tragenden A431 Zellen. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und dann entweder direkt auf der Platte lysiert (siehe 3.3.1.1. Proteine) oder durch trypsinieren und anschließende Pelletierung geerntet und schockgefroren.

3.1.3. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Trypanblau im Verhältnis 1:1.

3.1.4. Proliferationsassays

3.1.4.1. Bestimmung der Zellzahl

Ba/F3 Zellen wurden zunächst 2x PBS gewaschen und dann in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in RPMI-Medium (mit 1% Pen/ Strep, 5% FCS) ausgesäht und nach zweistündigem Hungern mit EGF (50ng/ml) bzw. 5% IL-3 stimuliert. Alle 48 Stunden wurden die Zellen gezählt und anschließend wieder auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml subkultiviert.

3.1.4.2. Bestimmung der DNA-Replikationsrate mittels Inkorporation von [H^3]-Thymidin

Ba/F3 Zellen wurden 2x PBS gewaschen und auf 96-wells (6×10^4 Zellen pro well) ausgesäht. Nach zweistündigem Hungern (in RPMI-Medium mit 1% Pen/Strep und 5%FCS) wurden die Zellen mit EGF (50ng/ml) bzw. 5% IL-3 stimuliert und nach 20 Stunden mit 2,5 μ Ci radioaktiver [H^3]-Thymidin-Lösung pro ml versetzt (5% [H^3]-Thymidin mit einer Aktivität von 1mC/ml in 50mM Thymidin/PBS-Lösung). Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurden die Zellen mittels Skatron-Zellerntner auf Glasfaserfilter (Skatron) gesaugt und nach einer Stunde trocknen bei 80°C durch Flüssigszintillationszählung (raytest) vermessen.

Methoden

Statistische Untersuchungen wurden mit dem Programm „instat“ für Macintosh durchgeführt.

3.1.5. Rezeptordichtevergleich mit ELISA-Technik

Um die an der Oberfläche der Zellen exprimierten Rezeptorzahlen untereinander zu vergleichen, wurde ein Zell-ELISA (nach Lischke et al, 1996) verwendet. Mit dieser Methode können Oberflächenantigene auf ganzen Zellen durch Antikörperdetektion mit anschließender Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden.

Zunächst muß man die zu verwendende weiße (undurchsichtige) 96-well Mikrotiterplatte (Berthold) über Nacht bei 4°C mit 3% BSA (in PBS) im Dunkeln blocken. Die Zellen werden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, 1x PBS gewaschen, in PBS/3% BSA (1×10^5 Zellen pro 50µl) resuspendiert und in die trockengeschlagene Mikrotiterplatte ausgesät (1×10^5 Zellen pro well). Der Primärantikörper wird in 50µl PBS/3% BSA dazupipettiert und nach Resuspension für 30min bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 Upm (Heraeus Labofuge T mit Mikrotiter-Rotor) werden die Zellen 2x mit 100µl PBS gewaschen und dann für weitere 30min bei 4°C in 100µl PBS/3% BSA mit HRP(Meerettich-Peroxidase)-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und dreimaligem PBS-Waschen werden die Zellen in 50µl 0,1M Tris (pH 8,5) resuspendiert.

Für die Chemilumineszenz-Reaktion werden gemischt (abgedunkeltes Falcon):

10ml Luminol

44µl Cumarsäure

8µl H₂O₂

Die Chemilumineszenz-Reaktion und die quantitative Vermessung der Intensität erfolgt maschinell mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Luminometers (Berthold). Hierdurch kann eine sehr genaue Bestimmung der Chemilumineszenz-Intensität erfolgen. Alternativ kann diese Methode aber auch mit transparenten ELISA-Platten und anschließender Exposition auf einem Röntgenfilm durchgeführt werden. Dabei muß allerdings ein Raster verwendet werden, das die wells gegeneinander abschirmt.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Aufschluß eukaryontischer Zellen zur Gewinnung zellulärer Proteine

3.2.1.1. Gewinnung zytoplasmatischer- und membrangebundener Proteine

Zur Analyse von zytoplasmatischen- und membrangebundenen Proteinen aus eukaryontischen Zellen werden die Zellen unter Bildung eines Lysates durch einen Detergenz enthaltenden Puffer aufgebrochen.

Ba/F3 Zellen: Geerntete und pelletierte Zellen werden frisch oder als gefrorene Zellpellets auf Eis mit etwa 100µl Lysispuffer pro 1×10^6 Zellen durch vortexen resuspendiert und dann 20 min zum kompletten Aufschließen auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile und Zelltrümmer werden durch 30-minütige Zentrifugation bei 15000Upm (Tischzentrifuge) bei 4°C vom Lysat getrennt, welches bei -20°C gelagert werden kann.

Adhärente Zellen: Konfluent gewachsene Zellen werden in der Kulturschale 2x mit PBS gewaschen und dann sofort auf Eis mit etwa 1ml Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen überschichtet. Nach 5 min wird das Lysat in ein Eppendorfgesäß überführt und zum vollständigen Aufschluß weitere 10 min auf Eis inkubiert. Kontrolliert werden kann die Lyse mit dem Mikroskop, da auf der Zellkulturschale nach Lyse nur noch die Zellkerne und Zelltrümmer zu sehen sind.

<u>Lysispuffer:</u>	50mM	HEPES; pH7,5
(Lagerung bei 4°C)	150mM	NaCl
	1,5mM	MgCl ₂
	1mM	EGTA
	10%	Glycerin
	1%	Triton X-100

In die für den jeweiligen Ansatz benötigte Menge Lysispuffer werden die Protease- und Phosphataseinhibitoren frisch zugesetzt:

1mM	PMSF
10µg/ml	Aprotinin
10µg/ml	Leupeptin
100mM	NaF
200µM	Na ₃ VO ₄

Methoden

3.2.1.2. Gewinnung nukleärer Proteine

Zur Analyse von Kernproteinen wird ein mechanisches Aufschlußverfahren, die Methode des "freeze and thaw" verwendet, um Gesamtzellextrakte zu erhalten.

Die Zellpellets werden mit 100µl Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen versetzt und durch vortexen resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, erneut gevortext, schockgefroren etc. - insgesamt 4x. Das Lysat wird durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C von unlöslichen Bestandteilen und Zelltrümmern befreit.

<u>Lysispuffer:</u>	20mM	HEPES; pH 7,9
(Lagerung bei -20°C)	20%	Glycerin
	50mM	KCl
	1mM	EDTA
	1mM	DTT
	100mM	NaCl
Frisch zugesetzt werden:	1mM	PMSF
	10µg/ml	Leupeptin
	2mM	Na ₃ VO ₄

3.2.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Methode nach Bradford basiert auf der Bindung des organischen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm nach 595nm bewirkt. Durch photometrische Messung der Absorption bei 595nm kann die Proteinkonzentration quantitativ gemessen werden.

1ml Bradford-Lösung (1:5 Verdünnung der Stammlösung von Bio-Rad) wird in die Küvetten vorgelegt und mit einem Aliquot (1-5µl) des zu messenden Proteinlysates vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595nm gemessen und die Proteinkonzentration über eine mitgemessene BSA-Referenz errechnet.

Methoden

3.2.3. Analyse von DNA-bindenden Proteinen

DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren sind häufig kurzlebige Moleküle, die nur in geringer Menge in der Zelle vorkommen. Um ihre DNA-Bindungsaktivität zu untersuchen, macht man sich diese zu nutze, in dem man die Proteine mit Hilfe von DNA, die die spezifische Bindungssequenz enthält, aus einem Proteinlysat extrahiert.

Die Extraktion mit magnetischen Kügelchen (Dynabeads) vereinfacht die Handhabung, da die Waschgänge anstelle von Zentrifugation mit einem Magneten durchgeführt werden können.

Dabei ist die faktorbindende DNA-Sequenz über eine Biotinylierung an die mit Streptavidin gekoppelten magnetischen Kügelchen gebunden. Diese DNA-Fragmente sorgen dann für die Isolierung von im Lysat befindlichen Proteinen, die an deren faktorbindende Sequenz binden.

3.2.3.1. Herstellung DNA-gekoppelter Magneto-Beads

Das folgende Protokoll stellt einen 10fachen Ansatz dar und ist folglich für die Bearbeitung von zehn Proteinproben ausreichend.

1. Annealing der komplementären Oligonukleotide

Pipettierschema:	5nmol	Primer1
	5nmol	Primer2
	90µl	TE 10.01
	40µl	5x PNK-Puffer (Gibco, 5x forw.buf)
	ad 170µl	H ₂ O

Bedingungen:	1.	88°C	5min
	2.	65°C	10min
	3.	37°C	10min
	4.	Raumtemperatur	5min

2. Phosphorylierung der 5'-Enden

Dazu wird zu dem 170µl-Ansatz 20µl 10mM ATP (Endkonzentration: 1mM ATP) und 5µl T4-PNK (10U/µl, Gibco, Endkonzentration: 0,5U/µl) pipettiert und dann für 45 min bei 37°C inkubiert.

Methoden

Im Anschluß wird zur Reinigung der DNA eine Phenol/Chloroform-Fällung mit darauf folgender Ethanol-Präzipitation (3.2.2.) durchgeführt und die DNA in 130µl H₂O resuspendiert.

3. Ligation der DNA-Fragmente

Durch die Ligation werden die 5'-phosphorylierten DNA-Fragmente aneinander gekettet und bilden so größere DNA-Fragmente mit vielen Proteinbindungssequenzen. Hierzu werden dem 130µl-Ansatz 40µl 5x Ligasepuffer (Gibco BRL) und 20µl Ligase (20Units, Gibco) zupipettiert und der Ansatz dann über Nacht bei 14-16°C inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgt wiederum eine Phenol/Chloroform-Fällung mit anschließender Ethanol-Präzipitation und Resuspension in 21µl H₂O.

4. Biotinylierung der ligierten DNA-Fragmente

Der Einbau von biotinyliertem dATP in die DNA-Fragmente sorgt für die mögliche Bindung an Streptavidin.

Pipettierschema:	20µl	vom Ansatz
	20µl	Biotin-dATP (0,4nM, Gibco BRL)
	20µl	dNTPs (ohne dATP, 1mM)
	10µl	10x Klenow-Puffer (Gibco)
	16 U	Klenow
	ad 100µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach wiederum eine Phenol/Chloroform-Fällung und 3x eine Ethanolpräzipitation unter Verwendung von NH₄-Acetat durchgeführt.

Pipettierschema:	100µl	Ansatz
	20µl	10M NH ₄ -Acetat
	300µl	96% Ethanol

In Anwesenheit von NH₄-Acetat fällt Ethanol DNA-Fragmente mit mehr als 18 Basen. Demzufolge werden für die Bindung an die Streptavidin-Dynabeads nur ausreichend lange DNA-Fragmente verwendet und außerdem überschüssiges Biotin-ATP abgetrennt, das die Bindung der DNA-Fragmente an Streptavidin blockieren würde.

Die Oligos werden in 1ml Puffer B aufgenommen.

Methoden

5. Bindung an die Streptavidin-Dynabeads

Für einen 10fachen Ansatz werden 1ml Streptavidin-Dynabeads M-280 (Dyna) benötigt. Zunächst werden die magnetischen Kügelchen 3x in Puffer B gewaschen und dann auf zwei 1,5 ml Behälter verteilt. Dazu werden jeweils 500µl der Oligos pipettiert und das ganze für 3 Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Anschließend werden die Kügelchen mit Hilfe des Magneten 3x mit 1ml Puffer B und 1x mit 1ml Puffer A gewaschen und zum Blocken der magnetischen Kügelchen mit 1ml 2%iger BSA-Lösung (in Puffer A) über Nacht bei 4°C rotiert.

Am folgenden Tag werden die Kügelchen nochmals 3x in Puffer A gewaschen und können dann in Puffer A bei 4°C gelagert werden.

Die so bereiteten für ein Protein spezifischen Kügelchen können problemlos bis zu 10x verwendet werden und halten sich mindestens ein halbes Jahr (bei 4°C).

3.2.3.2. Analyse von DNA-Bindungsaktivitäten mit Magneto-Beads

Für diesen Schritt werden die unter 3.2.1.2. erhaltenen Gesamtzellextrakte eingesetzt. 100µl (1x Ansatz) Magneto-Beads werden mit 1-2mg Protein für 60 min bei Raumtemperatur rotiert und nach Verwerfen des Überstandes 3x in 100µl Puffer A gewaschen. Gebundene Proteine werden jeweils mit 10µl Puffer B für 20 min bei Raumtemperatur eluiert, das Eluat in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und der Vorgang mit weiteren 10µl in einem zweiten Elutionsschritt wiederholt. Das so gewonnene Eluat wird mit 2x Laemmli-Puffer (siehe 3.2.4.) versetzt und kann dann analysiert werden.

Puffer A (Bindungspuffer):

50mM NaAc
50mM NaCl
einstellen auf pH 7,5 mit HCl

Puffer B (Kopplungs- und Elutionspuffer):

50mM NaAc
1M NaCl
einstellen auf pH 7,5 mit HCl

Methoden

3.2.4. Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) erfolgt die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die Proteine eines Proteingemisches werden zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (5%) fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel (7,5%-12%) entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Eine optimale Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich von 20-30kDa erreicht man mit einem 12%igem Trenngel, während für Proteine im Bereich von 100kDa ein 7,5%iges Trenngel besser geeignet ist.

Die zu analysierenden Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit denaturierendem Ladepuffer nach Laemmli versetzt und 5-10min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt in 1x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von maximal 200V. Der Verlauf der Auftrennung kann anhand der Bromphenolblau-Bande des Laemmli-Puffers verfolgt werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Proteine entweder direkt mit Coomassie Blue R-Färbung (2,5g/l in 45% Methanol, 10% Eisessig) angefärbt werden (Detektionsgrenze: 0,5µg Protein pro Bande) oder aber mit einem spezifischen Antikörper in der Western Blot Analyse (3.3.5.) detektiert werden, dessen Detektionsgrenze im pg-Bereich liegt.

<u>Sammelgel:</u>	250mM	Tris-Cl; pH6,8
	5% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1; Roth)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,1% (w/v)	TEMED
<u>Trenngel:</u>	375mM	Tris-Cl, pH8,8
	7,5-12% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0.05% (w/v)	TEMED
<u>2x Laemmli-Puffer:</u>	250mM	Tris-Cl; pH6,8
	4%	SDS
	20%	Glycerin

Methoden

	0.03%	Bromphenolblau
	3%	β -Mercaptoethanol (wenn denaturierend)
<u>5x SDS-Laufpuffer:</u>	125mM	Tris-Cl; pH8,3
	1M	Glycin
	0.5%	SDS

3.2.5. Western Blot Analyse

3.2.5.1. Protein-Transfer auf Nitrozellulose-Membran

Um ein Protein mit einem spezifischen Antikörper nachzuweisen, muß man die Proteine aus dem Gel zunächst in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran transferieren. Dazu äquilibriert man die Membran und das Gel zunächst für 10min in Transfer-Puffer und baut dann den Blot luftblasenfrei auf, in dem Gel und Membran jeweils von 3 Lagen 3MM Whatman Papier und einem Schwämmchen nach außen abgegrenzt werden. Geblottet wurde nach dem Tankblotting-Verfahren bei 4°C in Blotkammern von BioRad bei einem Strom von maximal 0,34A für 1,5h, wobei bei 0,25A gestartet wurde.

<u>Transfer-Puffer:</u>	25mM	Tris
	200mM	Glycin
	20%	Methanol

3.2.5.2. Immunologische Detektion

mit BSA-Blockpuffer: Nach dem Blotten wird die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 10min auf dem Schüttler mit BSA-Blockpuffer (1,5% BSA in Waschpuffer) inkubiert und dann für 1-2h mit dem Erstantikörper (in BSA-Blockpuffer). Nach 3x Waschen für 5min in Waschpuffer wird die Membran für 45-60min mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (in BSA-Blockpuffer) inkubiert und wiederum 3x 5min gewaschen.

mit Milch-Blockpuffer: Anstelle von BSA-Blockpuffer wird dem Waschpuffer 5% Milchpulver zugesetzt und zum Blocken und zur Antikörperinkubation verwendet. Nach 20-30min Blocken wird die Membran für 1h mit dem Erstantikörper (in Milch-

Methoden

Blockpuffer) inkubiert, 3x 5min gewaschen, 45min mit dem Zweitantikörper (in Milch-Blockpuffer) inkubiert und wiederum 3x 5min gewaschen.

Die Inkubation mit Milchpulver ist wegen Reaktionen des Antikörpers mit dem Milchpulver allerdings nicht für Phosphotyrosinblots geeignet.

Die so entstandenen Protein-Antikörper-Komplexe können nun durch 1-minütiges Schwenken der Membran in den Reagenzien des ECL-Detektionssystems (Amersham) nachgewiesen werden, wobei die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H_2O_2 katalysiert. Diese Reaktion wird als Chemilumineszenz sichtbar, erreicht ihr Maximum nach 5-10min und klingt dann innerhalb von 60-90min ab. Die Expositionszeiten der Membran zum Film hängen von der Spezifität und Konzentration des verwendeten Antikörpers sowie von der nachzuweisenden Proteinmenge ab und liegen zwischen mehreren Sekunden bis wenigen Minuten.

Um die Membran erneut für eine Detektion mit einem anderen Antikörper verwenden zu können, wird sie zunächst 3x 5min gewaschen, dann mit Strip-Puffer bei 50°C für 25-30min inkubiert und anschließend 3x 15min mit PBS gewaschen. Bevor man die Membran mit dem neuen Erstantikörper inkubiert, muß man sie wiederum 10min blocken.

<u>10x Waschpuffer:</u>	100mM	Tris-Cl; pH 7,9
	1,5M	NaCl
	2,5%	Tween

<u>Strip-Puffer:</u>	62,5mM	Tris-Cl; pH 6,7
	100mM	β -Mercaptoethanol
	2%	SDS

3.3. Molekularbiologische Methoden mit DNA

3.3.1. Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Zum Aufschließen von Zellpellets zur DNA-Extraktion werden diese (je nach Zellmenge) mit etwa 500µl Lysispuffer versetzt, dem zum Proteinverdau frisch Proteinase K (100µg/ml) zugesetzt wird. Nach sorgfältigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wird der Ansatz für eine Stunde bei 80°C inkubiert und dann für 10min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 14000Upm, Raumtemperatur). Der Überstand wird in ein SST-Röhrchen (Becton Dickinson) überführt, eine Phenol/Chloroform-Fällung und Ethanolpräzipitation (3.2.2.) angeschlossen und die gefällte DNA in 50-100µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Lysepuffer (Schartl): 200mM NaCl
100mM EDTA, pH 8
0,2% SDS

3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur schnellen Isolierung der Plamid-DNA wurde der entsprechende Präparationskit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers angewandt. Die so isolierte DNA muß bei -20°C gelagert werden oder direkt ein Plasmidverdau zur Gewinnung des DNA-Fragmentes angesetzt werden.

3.3.3. Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wird zur Reinigung von DNA-haltigen Lösungen durchgeführt.

Die DNA-haltige Lösung wird in SST-Röhrchen überführt, mit 1Vol Phenol versetzt, 10min auf dem Schüttler gerüttelt, mit einem weiteren Volumen Chloroform /Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wiederum 10min geschüttelt. Dann wird bei 2000Upm (Heraeus Minifuge RF) für 20min zentrifugiert. Wird anstelle von SST-Röhrchen in Eppendorfgefäßen gearbeitet, wird nach der Phenolextraktion ebenfalls zentrifugiert (14000Upm, Tischzentrifuge), die obere Phase in ein frisches

Methoden

Eppendorfgesäß überführt und dann verbliebenes Phenol durch Chloroform Extraktion entfernt.

Die obere DNA-enhaltende Phase wird in ein frisches Eppendorfgesäß überführt und dann mit 1/10Vol 3M KAc und 2,5Vol 96% Ethanol versetzt. Nach sorgfältigem Mischen läßt man die DNA bei -20°C für mindestens eine halbe Stunde stehen, um auch kleinere DNA-Fragmente zu fällen. Anschließend wird für 20min bei 4°C (Tischzentrifuge, 14000Upm) zentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals 10min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird die DNA bei 37°C getrocknet und in einem passenden Volumen destilliertem Wasser (50-100µl) aufgenommen.

3.3.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um das DNA-Fragment aus dem isolierten Plasmid zu gewinnen, wird ein Plasmidverdau mit den Restriktionsendonukleasen angesetzt, die das DNA-Fragment spezifisch aus dem Vektor ausschneiden.

pBcl-X _L -Vektor	EcoRI und XbaI (Gibco BRL)
psFFU-Neo-flag-hu-Bcl-2-Vektor	EcoRI

0,5-1µg DNA werden mit 5-10U des Enzyms (Konzentration im Ansatz 0,5U/µl) und passendem Puffer (Herstellerangaben) für 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wird das Reaktionsvolumen so gewählt, daß die Enzymlösung und somit die Glycerinkonzentration 10% des Ansatzes nicht überschreitet.

3.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl präparativ zur Isolierung amplifizierter oder mit Restriktionsenzymen gewonnener DNA-Fragmente eingesetzt, als auch für analytische Zwecke.

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente werden 0,8-1,8%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden Proben werden vor dem Auftragen mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Erstellung der DNA-Leitern erwies sich ein RNA-Verdau mit RNase A (500µg/ml) als hilfreich. Je nach

Methoden

Größe der Gele wird die Elektrophorese bei 40 bis 100 Volt durchgeführt. Anschließend wird das Gel für mindestens 15min in Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml) gefärbt und 20-30min in Wasser entfärbt. Das Ergebnis kann dann zu analytischen Zwecken im kurzwelligen UV-Bereich (254nm) angesehen und zur Dokumentation als Foto festgehalten werden. Dabei dient ein mit aufgetragener DNA-Marker als Größenvergleich zur Identifikation der DNA-Banden. Zur Isolierung von DNA schneidet man die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht (366nm) aus dem Gel aus.

<u>50x TAE:</u>	2M	Tris-Essigsäure ; pH7,7
	0,1M	EDTA

<u>10x Ladepuffer:</u>	50%	Glycerin
	100mM	EDTA; pH 7,5
	1%	SDS
	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylencyanol

3.3.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus der Agarose wurde entweder ein Kit zur Agarose Gel Extraktion von Qiagen (QIAquick oder QIAEX) oder von Gibco BRL (CONCERT Gel Extraction System) verwendet und zur Erfolgskontrolle der Extraktion ein Agarosegel mit der Probe und einem Standard-Marker geladen.

3.3.7. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Transformation wurden E.coli-Bakterien des Stammes XL1-Blue eingesetzt. Diese werden nach dem Protokoll von Hanahan (1983) hochkompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA.

Eine entsprechende Menge (100-200µl) an kompetenten Zellen wird mit ca. 10-20ng der zu transformierenden DNA vermischt und 20min auf Eis inkubiert. Eine Inkubation von 2min bei 37°C (Hitzeschock) macht die Zellmembran für die Transformation permeabel. Nach Abkühlen des Ansatzes für 1min auf Eis wird mit 1ml LB-Medium

Methoden

aufgefüllt, damit die Bakterien für eine Stunde bei 37°C unter stetigem Schütteln wachsen können.

Zum Ausplattieren werden die Bakterien für 10min bei 2000Upm (Tischzentrifuge, Raumtemperatur) zentrifugiert, das Bakterienpellet in 100µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Nach 12-16 Stunden können Einzelkolonien isoliert werden.

<u>LB-Medium:</u>	10g/l	Trypton (DIFCO laboratories)
	5g/l	Hefeextrakt (DIFCO)
	10g/l	NaCl
	ad 1l	destilliertes Wasser
		autoklavieren

LB-Agarplatten: wie LB-Medium, aber zusätzlich 15g Bacto-Agar (DIFCO)

Für die Selektion auf Ampicillin-Resistenz werden nach dem Abkühlen unter 60°C 100µg/ml Ampicillin (Sigma) zugefügt.

3.4. Molekularbiologische Methoden mit RNA

3.4.1. Allgemeines

Wichtig beim Arbeiten mit RNA ist, daß Lösungen und Materialien RNase-frei sind. Dazu müssen die bei Sambrook et al (1989) beschriebenen Arbeitsregeln eingehalten werden, von denen die wichtigsten folgend aufgeführt werden:

Da RNase an Händen vorkommt, müssen beim Arbeiten Handschuhe getragen werden. Außerdem muß das Versuchsmaterial RNase-frei sein. Dazu müssen Pipettenspitzen mit Handschuhen gesteckt werden, Einmal-Plastikbehälter verwendet werden oder aber die Glasbehälter für vier Stunden bei 80°C erhitzt werden. Lösungen müssen extra für RNA-Arbeiten beiseite gestellt werden, um passenden Umgang zu gewährleisten. Alle benötigten Lösungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt, das mit 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) pro 1l Wasser mindestens 12h mittels Magnetrührer gemischt und anschließend zur Beseitigung des kanzerogenen DEPC autoklaviert wurde.

Methoden

3.4.2. RNA-Extraktion

RNA wurde unter Anwendung von TRIZOL (Gibco BRL) nach den Angaben des Herstellers extrahiert und ausgefällt. Zur Homogenisierung der zu analysierenden Zellen wurde ein Ultra Turrax (IKA) verwendet. Die gefällte RNA wurde am Ende in einer möglichst geringen Menge deionisiertem Formamid (für Northern) oder DEPC-Wasser (für RT-PCR) aufgenommen. So gewonnene RNA-Lösungen sollten bei -80°C gelagert werden.

3.4.3. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Spektralphotometer (Pharmacia) durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm, wobei 1OD_{260} einem RNA-Gehalt von $40\mu\text{g/ml}$ entspricht.

3.4.4. LiCl-Fällung

Um RNA aufzukonzentrieren oder aus Lösungen abzutrennen, muß sie gefällt werden. Dazu wird die gewünschte Menge RNA in ein Eppendorfgefäß überführt und mit $1/10\text{Vol}$ 4M LiCl und $2,5\text{Vol}$ 96% Ethanol versetzt, gut gemischt und für mindestens 30min bei -80°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14000Upm , 4°C) wird der Überstand verworfen, das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 55°C im Thermoblock leicht getrocknet und dann der gewünschten Menge deionisiertem Formamid bzw. DEPC-Wasser aufgenommen.

3.4.5. Northern-Blot

Bei der Northern-Blot Analyse wird die zu untersuchende RNA zunächst mit einer Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und dann mittels Kapillar-Blot-Technik auf eine Nylonmembran transferiert, auf der die RNA dann für Hybridisierungen immobilisiert ist.

Die für die Auftrennung von RNA verwendeten Gele besitzen einen Agarosegehalt von 1,2% und zusätzlich 6,6% Formaldehyd und 10% 10x GRB-Puffer (Endgehalt 1x

Methoden

GRB). Zunächst wird die Agarose in DEPC-Wasser aufgeköcht, dann 1/10Vol GRB-Puffer und 37%iges Formaldehyd zugegeben und sofort gegossen.

Die Proben werden folgendermaßen vorbereitet:

15µl Probe (20µg RNA in 15µl deionisiertem Formamid)
3µl 10x GRB-Puffer
7µl DEPC-Wasser
5µl 37%iges Formaldehyd

Dieser Ansatz wird für 15min bei 60°C inkubiert, dann mit 3µl 10x GLB-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 60Volt für 4-5 Stunden in 1x GRB-Puffer.

Im Anschluß kommt der eigentliche "Northern-Blot", ein Transfer der RNA auf eine Nylonmembran mittels Kapillar-Blot-Technik. Das Gel wird zunächst für 15-20min in DEPC-Wasser gewässert und der Blot wie folgt aufgebaut:

- 2 Lagen 1MM Whatman-Papier, die in die Blotkammer hängen
- das Gel mit der Öffnung der Taschen nach unten darauf legen
- passend zugeschnittene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham)
- 6 Lagen 1MM Whatman-Papier
- Stapel saugfähige Papierhandtücher auflegen
- Glasplatte zum Abdecken und ein Gewicht zum beschweren

Als Laufmittel dient 20x SSC. Um zu verhindern, daß das Laufmittel statt durch die Membran direkt von den Papierhandtüchern aufgesaugt wird, müssen die Gelkanten mit Parafilm abgedeckt werden. Das Blotten erfolgt über Nacht.

Am nächsten Tag wird die Membran nach Markieren der Taschen (Bleistift und Anstechen mit Kanüle) 30min in 6x SSC neutralisiert und die komplette RNA-Übertragung aus dem Gel auf die Membran nach Ethidiumbromid-Färbung des Gels im UV-Licht kontrolliert. Die Membran wird zur Fixierung der RNA mit UV-Licht einer Gesamtleistung von 150mJ bestrahlt (GS Gene Linker, BioRad). Dieser als "cross-linking" bezeichnete Vorgang sorgt für eine kovalente Bindung der RNA an die Membran. Zusätzlich wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C getrocknet.

Zum Schluß wurde die auf der Membran gebundene RNA mit Methylenblau-Lösung angefärbt, die Membran mit einer Lösung aus Wasser und Methanol im Verhältnis 3:1

Methoden

wieder entfärbt und mit einem Längenstandard zur Dokumentation fotografiert, um eventuelle Degradation der RNA abschätzen zu können und festzuhalten, wo sich die Markerbanden auf der Membran befinden.

10x GRB-Puffer:

200mM	MOPS (3-Morphino-Propan-Sulfonsäure)
50mM	NaOAc
10mM	EDTA

einstellen auf pH 7,0 mit NaOH

Deionisieren von Formamid:

Dem Formamid wird 5g/ml Austauschharz zugesetzt und der Ansatz für eine Stunde gerührt (Magnetrührer). Das deionisierte Formamid sollte dann lichtgeschützt bei -20°C gelagert werden.

10x GLB-Ladepuffer:

50%	Glycerin
1mM	EDTA; pH 7,5
0,4%	Bromphenolblau
0,04%	Xylencyanol

20x SSC:

3M	NaCl
0,3M	NaCitrat

einstellen auf pH 7,0 mit HCl

Methylenblau-Lösung:

0,5M	NaOAc; pH 5,2
0,04%	Methylenblau

3.4.6. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung auf Northern Blots

3.4.6.1. Radioaktive Markierung von DNA (OLB-Reaktion)

Zur Detektion exprimierter Gene auf Northern Blots wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Markierung erfolgte nach der "random priming"-Methode (Feinberg and Vogelstein, 1983). Bei dieser Methode binden Hexanukleotide (dN₆) als Zufallsprimer an die denaturierte Sonden-DNA, von denen aus die DNA-Polymerase I

Methoden

(Klenow-Fragment) den Komplementärstrang synthetisiert. Dabei baut sie angebotenes radioaktives $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP in den neusynthetisierten Strang ein.

Zur Markierung werden 50-100ng des aus einem Plasmid geschnittenen (3.3.4.) und durch Gelelektrophorese (3.3.5.) und Agarosegeleextraktion (3.3.6.) gewonnenen DNA-Fragmentes eingesetzt und ad 33 μl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Zur Trennung der DNA-Doppelstränge wird für 10min bei 95°C inkubiert und anschließend 3-4min auf Eis abgekühlt.

Nach Zugabe von

10 μl Oligo-labeling-Mix (OLB-Mix)

3 μl BSA (10mg/ml)

1 μl Klenow-Polymerase (= 6U) und

3 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (= 30 μCi)

wird der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

<u>OLB-Mix:</u>	1M	HEPES
	0,25M	Tris
	25mM	MgCl ₂
	0,35%	Mercaptoethanol
	0,1mM	dATP, dGTP, dTTP (Pharmacia)
	OD 27/mL	Hexanukleotide (Pharmacia)

Um kleinere Fragmente und übrig gebliebene Nukleotide von der radioaktiv markierten Sonde abzutrennen und den Erfolg der radioaktiven Markierung festzustellen, wird der Ansatz über eine Sephadex G-50 Säule zentrifugiert. Kleinere Fragmente und die übrig gebliebenen Nukleotide verbleiben in der Säule und die DNA-Sonde wird als Eluat aufgefangen. 1 μl davon kann nun im Szintillationsgerät vermessen werden und so die Aktivität der Probe bestimmt werden. Für die Hybridisierung von Northern Blots wurden zwischen 5 und 10x10⁶ Cpm/ml Hybridisierungsmix eingesetzt.

3.4.6.2. Hybridisierung von Northern Blots

Die Hybridisierung von spezifischen radioaktiven DNA-Sonden an RNA nutzt man zum Nachweis der Expression der korrespondierenden Gene.

Methoden

Zunächst muß der fertige Filter, d.h. nach Northern Blot und Fixierung der RNA, zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran vorhybridisiert werden. Dazu wird der Filter - nach kurzer Anfeuchtung in 1x SSC - aufgerollt in die Hybridisierungsröhren gelegt, mit reichlich Hybridisierungsmix versetzt und bei 42°C unter stetigem Drehen für mindestens 6 Stunden inkubiert. Zur Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde wird diese nach 10-minütigem Erhitzen und Abkühlen auf Eis zum Hybridisierungsmix hinzu pipettiert. Dieser sollte von der Menge nun so bemessen sein, daß die Aktivität der Lösung $5-10 \times 10^6$ Cpm/ml beträgt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C.

Hybridisierungsmix:

Für die heterologen DNA-Sonden (Mensch auf Maus) wurde Hybridisierungsmix mit 35% Formamid, für die homologe GAPDH-Sonde mit 50% Formamid verwendet.

<u>Ansatz für 50ml:</u>	<u>35%</u>	<u>50%</u>
50x Denhardt's	5ml	5ml
5% Natriumpyrophosphat	1ml	1ml
1M Tris-Cl; pH 7,5	2,5ml	2,5ml
20% SDS	2,5ml	2,5ml
20x SSC	12,5ml	12,5ml
steriles Wasser	9ml	1,5ml
Formamid (deionisiert)	17,5ml	25ml

Frisch zupipettiert werden $100 \mu\text{g/ml}$ Lachssperma-DNA, nachdem diese für 10min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt wurde.

Um unspezifisch gebundene DNA-Sonde vom Filter zu entfernen, wird dieser nach der Hybridisierung 2x bei 55°C in Waschlösung (2x SSC, 1% SDS) für 45min inkubiert. Zur Autoradiographie wird der nasse Filter eingeschweißt und in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolien bei -80°C je nach Stärke des Signals zwischen 1-7 Tagen dem Röntgenfilm exponiert.

Zur erneuten Hybridisierung wird der Filter mit 1xSSC/1%SDS-Waschlösung bei 60°C für 45min gewaschen und nach Abklingen der Restaktivität erneut vorhybridisiert, etc.

Die verwendeten radioaktiv markierten Sonden hybridisierten an RNA folgender Grösse:

Methoden

GAPDH	1,3kb
Pim-1	2,6kb
Bcl-X	2,7kb

3.4.7. RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase – PCR) wurde in den durchgeführten Versuchen zum Nachweis für die Expression bestimmter Gene verwendet, da sie im Vergleich zur Northern Blot Analyse eine sensitivere Methode ist.

Sie verläuft in zwei Schritten: Zunächst wird die RNA (nach erfolgtem DNase-Verdau) mit Hilfe von Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern wird in der anschließenden PCR dann die gesuchte Sequenz amplifiziert.

3.4.7.1. DNaseI Behandlung

Um noch eventuell vorhandene DNA zu beseitigen, muß die in DEPC-Wasser aufgenommene RNA zunächst einer DNase Behandlung unterzogen werden. Dazu wird die RNA mit 35Units RNase-freie DNase (Boehringer) und einer passenden Menge 10x DNase-Puffer (Endkonzentration 1x DNase-Puffer) versetzt und nach sorgfältigem Mischen für 30min bei 37°C inkubiert.

Zur Beseitigung der DNase wird daran eine RNase-freie Phenol/Chloroform-Fällung (3.3.2.) angeschlossen, die RNA mit LiCl gefällt (3.4.4.) und vermessen (3.4.3.).

<u>10x DNase-Puffer:</u>	500mM	Tris-Cl; pH 7,5	lagern bei -20°C
(RNase frei)	100mM	MgCl ₂	

3.4.7.2. RT-Reaktion

Bei der RT-Reaktion wird RNA mit Hilfe von Hexanukleotiden (computergesteuerte Zufallsmischung) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

<u>Reaktionsansatz:</u>	1µg	RNA
	1µl	Hexanukleotide (0,5µM) ("Random Primer", Gibco BRL)
	9µl	DEPC-Wasser

Methoden

Dieser Ansatz wird für 10min bei 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann folgendes zupipettiert:

4µl	5x First Strand Buffer (Gibco BRL)
2µl	DTT (0,1M) (Gibco BRL)
1µl	dNTPs (10mM)

Anschließend wird für 2min bei 42°C inkubiert, 0,5µl Reverse Transkriptase (SuperscriptII, Konzentration 200U/µl, Gibco BRL) zupipettiert und nach sorgfältigem Mischen für eine Stunde wiederum bei 42°C inkubiert. Danach wird das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Der RT-Ansatz kann bei -20°C gelagert werden. Ein Aliquot daraus wird zur PCR-Reaktion eingesetzt.

3.4.7.3. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ("Polymerase chain reaction", PCR) dient der Amplifizierung von DNA. DNA-Fragmente werden enzymatisch durch die thermostabile Taq-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) mit einem Temperaturoptimum von 70-75°C ausgehend von Primerpaaren exponentiell vermehrt.

<u>Reaktionsansatz:</u>	5µl	10x PCR-Puffer (Gibco BRL)
	1,5µl	MgCl ₂ (50nM, Gibco BRL)
	8µl	dNTPs (200µM jeweils)
	1µl	Primer1 (50pmol/µl)
	1µl	Primer2 (50pmol/µl)
	0,5µl	Taq DNA Polymerase (1,25-2,5U)
	4µl	RT-Reaktion
	ad 50µl	Millipore-Wasser (autoklaviert)

Die PCR-Bedingungen müssen für jede Probe in Vorversuchen bestimmt werden. Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur T_m der benutzten Primer und kann in grober Annäherung wie folgt berechnet werden:

$$T_m = (\text{Anzahl G+C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl A+T}) \times 2^\circ\text{C}$$

Die Annealingtemperatur sollte 5°C niedriger als die Schmelztemperatur sein.

Um eine semiquantitative Aussage über die vorhandene RNA-Menge und so über die Genexpression (RT-PCR) machen zu können, muß die Zyklenzahl der PCR so gewählt

Methoden

werden, daß sich die PCR noch in der exponentiellen Phase befindet, aber das Fragment mit Ethidiumbromidfärbung bereits darstellbar ist.

Die PCR-Bedingungen (für die semiquantitative RT-PCR) waren folgende:

Bcl-2/Bcl-X_L			GAPDH	
<u>Programm:</u>	1.	95°C 2min.		
	2.	95°C 30sec		
	3.	55°C 30sec	3.	60°C 30sec
	4.	72°C 1min		
	Schritte 2.-4. für		Schritte 2.-4. für 27 Zyklen (RT-PCR)*	
	30 Zyklen (Bcl-2)		bzw. 35 Zyklen (Northern)*	
	20 Zyklen (Bcl-X _L)			
	5.	72°C 5min.		

*Nach 27 Zyklen wurden semiquantitative RT-PCR Bedingungen erreicht, d.h., etwaige Schwankungen in der RNA bzw. dann DNA-Menge konnten detektiert werden. Dieser Ansatz wurde folglich zur Ladekontrolle der analysierten Proben eingesetzt. 35 Zyklen hingegen wurden durchgeführt, wenn die DNA aus dem Gel extrahiert und für die Verwendung als Northern Sonde radioaktiv markiert wurde.

Bei der PCR entstehen DNA-Fragmente folgender Größe:

Bcl-2: 327bp
Bcl-X: 727bp
GAPDH: 306bp

Der PCR-Ansatz kann dann nach Versetzen mit DNA-Probenpuffer direkt auf ein Agarosegel geladen werden und nach der Elektrophorese analysiert (Foto zur Dokumentation) bzw. aus dem Gel isoliert (3.3.6., OLB-Probe) oder bei -20°C gelagert werden.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen in Ba/F3 Zellen

Um die Signaltransduktion der RTK Xmrk zu untersuchen, wurde die aktivierbare Rezeptorchimäre HER-mrk verwendet, die aus dem extrazellulären Anteil des humanen EGF-R (HER) und dem intrazellulären Anteil von Xmrk besteht (Wittbrodt et al, 1992). Stimulation mit humanem EGF führt zur Aktivierung der mrk-Kinase, was eine Induktion mrk-spezifischer intrazellulärer Signalwege zur Folge hat. Ba/F3 Zellen, eine murine pro-B-Zelllinie, stellen ein geeignetes Zellsystem dar, um Proliferations- und Apoptoseverhalten zu untersuchen, da diese Zellen faktorabhängig sind und nach dessen Entzug apoptotisch werden. Physiologischerweise exprimieren diese Zellen den IL-3R und sind für Langzeitüberleben abhängig von IL-3. In BaF Hm Zellen wird die Rezeptorchimäre HER-mrk stabil exprimiert. Sie wurden durch Transfektion wildtypischer Ba/F3 Zellen mit einem HER-mrk-Expressionsplasmid generiert (Wellbrock et al, 1998a).

In den folgenden Experimenten wurden außerdem Ba/F3 Zellen verwendet, die statt des HER-mrk Rezeptors den humanen EGF-R (HER) exprimieren, der in diesem Zellsystem kein Langzeitüberleben sichern kann (Collins et al, 1988; Shibuya et al, 1992).

4.1.1. Langzeitwachstum und Überleben

Um die Fähigkeit des HER-mrk Rezeptors zur Induktion mitogener und antiapoptotischer Signalwege zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart von EGF kultiviert und alle zwei Tage gezählt (Abb.5).

Wie zu erwarten, zeigten die wildtypischen Ba/F3 Zellen (wt), die keine Rezeptoren der EGF-R Familie exprimieren (Riese et al, 1995), kein Langzeitüberleben unter EGF. Ihre Zahl blieb etwa zwei Tage lang konstant und sank im Folgenden durch Absterben der Zellen zügig ab bis nach vier Tagen nahezu keine lebende Zelle mehr nachweisbar war. Stimulation des IL-3 Rezeptors von Ba/F3 Zellen hingegen führte zu Proliferation und Langzeitüberleben. EGF-Stimulation von HER1 in BaF HER Zellen (Klone HER3, 5 und 6; nur HER3 exemplarisch in Abb.5 dargestellt), konnte kein Langzeitüberleben der Zellen sichern. Allerdings war das Absterben der Zellen verzögert, ihre Zahl blieb

Ergebnisse

bis zu vier Tage konstant und war dann wie bei wildtypischen Ba/F3 Zellen rückläufig (Abb.5).

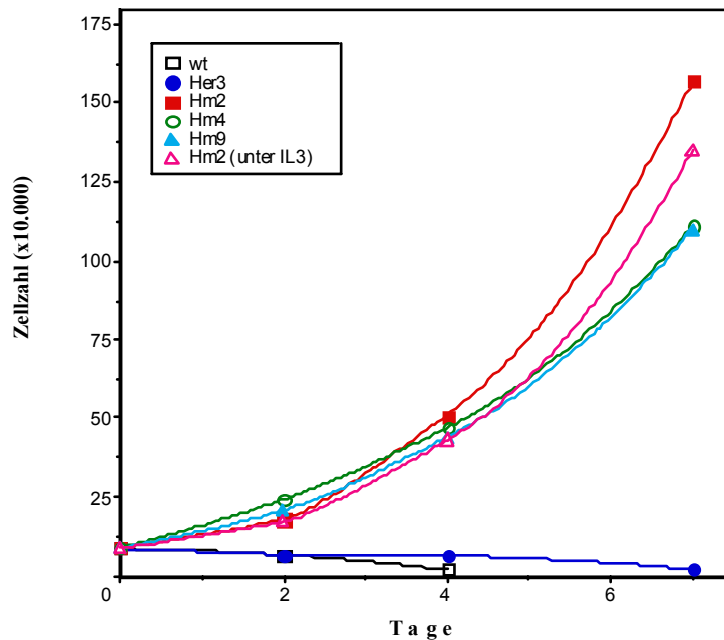


Abb.5: Langzeitüberleben der BaF Hm-Klone unter EGF:

HER-mrk sichert in Ba/F3 Zellen im Gegensatz zum humanen EGF-R (HER) Langzeitüberleben.

Die Zellen (wt, HER3, 5 und 6, Hm2, 4 und 9) wurden jeweils 2mal mit PBS gewaschen und dann in einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml RPMI Hungermedium (RPMI plus 1%Pen/Strep und 5%FCS) ausgesät. Nach 2-stündigem Hungern wurden die Zellen mit EGF (50ng/ml) bzw. 5% IL-3 Überstand stimuliert und alle 48 Stunden gezählt und wieder auf eine Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml subkultiviert.

BaF Hm Zellen (Klone Hm2, 4 und 9) hingegen zeigten eine starke Proliferation unter EGF-Stimulation und ein Langzeitüberleben wie IL-3 stimulierte Zellen (getestet über eine Dauer von 2 Wochen, nur bis zum 7. Tag in Abb.5 dargestellt). HER-mrk war folglich in der Lage, in Ba/F3 Zellen Langzeitüberleben zu sichern.

4.1.2. Charakterisierung von HER-mrk und HER exprimierenden Ba/F3 Zelllinien

4.1.2.1. Bestimmung der Rezeptordichte in verschiedenen BaF Hm- und BaF HER-Klonen

Um auszuschließen, daß die gemessenen Unterschiede zwischen BaF HER und Hm Zellen im Langzeitüberleben darauf beruhen, daß sie unterschiedlich viele Rezeptoren

Ergebnisse

auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden zunächst die Rezeptordichten der verschiedenen Zellklone verglichen. Dabei wurden zwei Methoden verwendet: zum einen die Western Blot Analyse (3.2.5.) und zum anderen eine ELISA-Technik (3.1.5.).

Im Western Blot wurden 50µg Gesamtprotein von BaF Hm2, 4 und 9 sowie von BaF HER3, 5 und 6 mit anti-PEP-mrk Antikörper analysiert. Anti-PEP-mrk erkennt ein Epitop in der intrazellulären Domäne von Xmrk, welches sich im humanen EGF-R allerdings nur in einer Aminosäure unterscheidet. Deshalb kreuzreagiert dieser Antikörper mit HER. Allerdings lassen sich aufgrund der leicht unterschiedlichen Epitopstruktur nur die Klone innerhalb eines Zelltyps, also nur BaF HER untereinander und BaF Hm untereinander vergleichen, da die Affinität des Antikörpers zu den beiden Rezeptoren verschieden sein könnte. Anti-PEP-mrk detektierte in der Western Blot Analyse ein 170kDa (HER) bzw. ein 165kDa (HER-mrk) Protein.

Unter den BaF Hm-Klonen exprimierte Hm2 mit Abstand die wenigsten HER-mrk Rezeptoren, gefolgt von Hm4 und Hm9. Unter den BaF HER-Klonen besaß HER3 weniger EGF-Rezeptoren als HER5 und HER6 (Abb.6a).

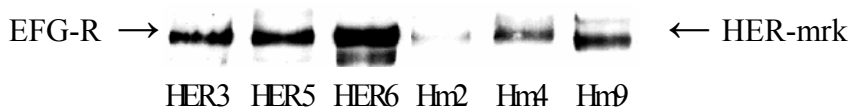
Um die verschiedenen Ba/F3-Klone in ihrer Rezeptordichte auch gegeneinander (BaF HER mit BaF Hm) zu vergleichen, wurde ein anderer Antikörper in einer ELISA-Technik eingesetzt (3.1.5.). Der Antikörper mAB 108.1 ist ein monoklonaler Antikörper von der Maus, der gegen die nicht-denaturierte extrazelluläre Domäne des humanen EGF-Rezeptors gerichtet ist. Da die extrazellulären Domänen von HER und HER-mrk identisch sind, läßt sich mit diesem Antikörper auf der Zelloberfläche HER und HER-mrk nachweisen und so die Rezeptordichten der verschiedenen BaF HER- und Hm-Klone vergleichen. Der Vorteil gegenüber der Detektion im Western Blot liegt zudem darin, daß tatsächlich nur die an der Oberfläche exprimierten Rezeptoren, die vom Liganden erreicht und aktiviert werden können, detektiert werden.

Um die geeignete Menge an einzusetzendem Erstantikörper zu bestimmen, wurde vor Durchführung des eigentlichen Versuchs die Dissoziationskonstante, der sogenannte K_D -Wert des Erstantikörpers bestimmt (siehe 7.1.1.1.). Der K_D -Wert von mAB 108.1 lag bei 15nM. Um sicher zu gehen, daß im geplanten Experiment möglichst alle Rezeptoren mit Erstantikörper abgesättigt wurden, wurde dieser für die Experimente in einer Konzentration von 40nM eingesetzt. Das mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers in Gegenwart von Luminol gebildete Chemielumineszenzsignal wurde durch ein Mikrotiterplattenluminometer quantitativ gemessen und in relativen Lichteinheiten ("relative light units", RLU) angegeben.

Ergebnisse

Die Daten aus der Western-Blot Analyse mit Anti-PEP-mrk wurden durch den Zell-ELISA bestätigt und sind darin leichter quantifizierbar. So exprimierte BaF Hm4 etwa 10,5mal und Hm9 etwa 13,5mal mehr Rezeptoren auf der Oberfläche als Hm2, während BaF HER5 etwa doppelt so viele Rezeptoren besaß wie HER3, und HER6 noch etwas mehr. Im Rezeptorvergleich HER gegen HER-mrk zeigte dieses Experiment, daß alle BaF HER Klone weniger Rezeptoren auf der Oberfläche exprimierten als Hm9 und Hm4. Hm2 allerdings hatte eine geringere Rezeptordichte als alle HER-Klone (Abb.6b).

a Western Blot: Anti-PEP-mrk



b Zell-ELISA

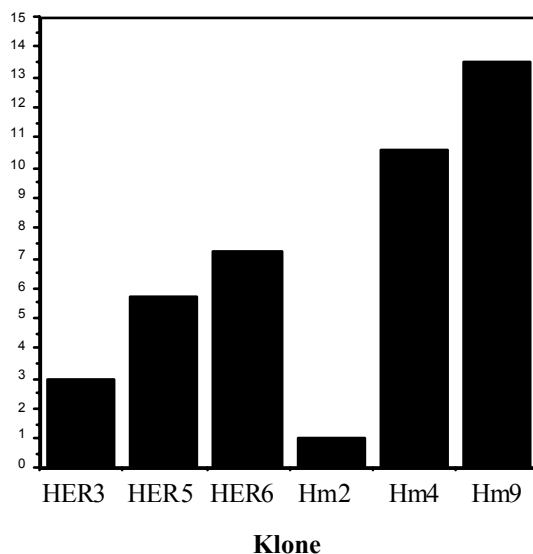


Abb.6: Rezeptordichtebestimmung mit Western Blot Analyse (a) und Zell-ELISA (b):

(a) Für die Western Blot Analyse wurden die Zellen der verschiedenen Ba/F3-Klone lysiert. 50µg Gesamtprotein wurde auf ein 7,5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und in Western Blot Technik mit anti-PEP-mrk detektiert.

(b) Für den Zell-ELISA wurden (in Doppelbestimmung) nach 2maligem waschen mit PBS 1×10^5 Zellen pro well der Mikrotiterplatte ausgesät und mit mAB 108.1 Antikörper detektiert. Das mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers gebildete Chemilumineszenzsignal wurde maschinell durch ein Mikrotiterplattenluminometer quantifiziert und in relativen Lichteinheiten angegeben. In (b) sind die so gemessenen Werte als Faktoren zu Hm2 = 1 angegeben.

Ergebnisse

4.1.2.2. Proliferationsverhalten

Die Bestimmung der Rezeptordichte ermöglichte die Klärung der Frage, ob die Anzahl der Rezeptoren einen Einfluß auf die Stärke der Proliferationsantwort nach Rezeptorstimulation hat. Das Proliferationsverhalten der einzelnen Ba/F3-Klone wurde durch Einbau von radioaktivem H^3 -Thymidin bei der DNA-Replikation gemessen.

Bereits bekannt war, daß die Stimulation von HER-mrk zur Proliferation führt (Wellbrock et al, 1998a). Die durch HER-mrk (Klon BaF Hm9) induzierte DNA-Replikation im H^3 -Thymidineinbau beträgt etwa 40-50% des vom IL-3 Rezeptor induzierten Einbaus (Abb.7a; $p=0,0001$). Der EGF-R hingegen induziert keine oder nur geringe DNA-Replikation in Ba/F3 Zellen (Riese et al, 1996 und Abb.7a, Klon BaF HER3; $p=0,0001$). Wildtypische Zellen zeigten wie erwartet keine Proliferation nach Stimulation mit EGF (Negativkontrolle), wohl aber nach Stimulation mit IL-3 (Positivkontrolle, Abb.7a).

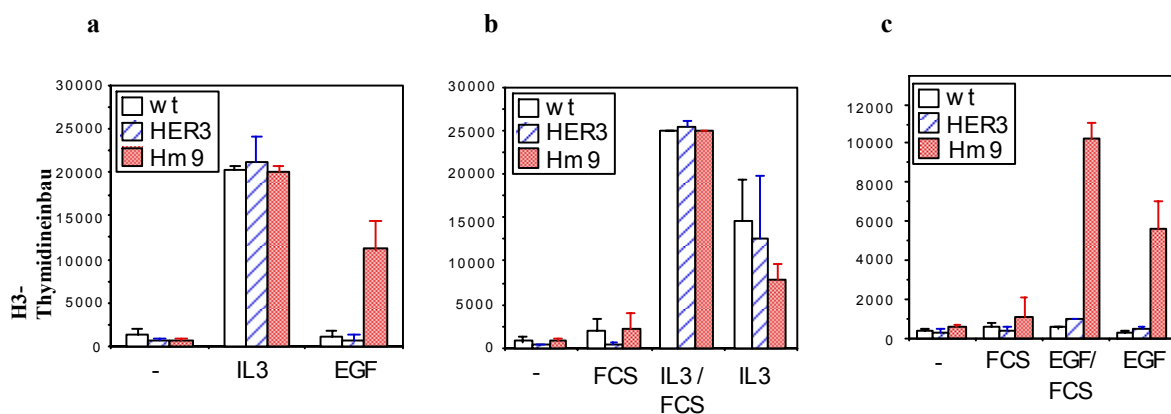


Abb.7: Bestimmung der Proliferationsaktivität durch Messen des Einbaus an radioaktivem H^3 -Thymidin: HER-mrk (Klon Hm9) zeigt etwa 40-50% des durch IL-3 induzierten Thymidineinbaus, während HER keine oder nur eine geringe DNA-Replikation bewirkt (a: $p=0,0001$ für alle drei Klone). Darüberhinaus führt die Anwesenheit von FCS bei der Rezeptorstimulation zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsantwort bei IL-3 Stimulation (b: $p=0,0001$ für BaF Hm9; $p=0,0362$ für BaF HER3 und $p=0,0012$ für BaF wt) sowie bei EGF Stimulation des HER-mrk Klones (c: $p=0,0001$). Alleinige FCS-Zugabe hat dagegen keinen signifikanten Effekt gegenüber unstimulierten Zellen (b und c: $p=0,1267$).

Für dieses Experiment wurden Ba/F3 Zellen nach Aussaat und zweistündigem Hungern (3.1.4.2) mit 5% IL3-Überstand bzw 50ng/ml EGF mit oder ohne FCS stimuliert oder unstimuliert belassen (-). Nach 20 Stunden Inkubation wurde H^3 -Thymidin zugesetzt und nach weiteren 4 Stunden mittels Skatron-Zellerntner und Flüssigszintillationzählung ausgewertet (3.1.4.2.). Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des 2-tailed T-Tests (instat) überprüft.

Der durch FCS induzierte Anstieg im H^3 -Thymidin-Einbau gegenüber unstimulierten Zellen erwies sich als nicht signifikant (Abb.7b und c; $p=0,1267$). Die Anwesenheit von

Ergebnisse

FCS bei der Rezeptorstimulation führte jedoch zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsantwort des IL-3-Rezeptors (Abb.7b, $p=0,0001$ für BaF Hm9; $p=0,0362$ für BaF HER3 und $p=0,0012$ für BaF wt), aber auch des HER-mrk-Rezeptors (Abb.7c; $p=0,0001$). FCS scheint folglich Cofaktoren für eine Stimulation zu liefern.

Um den Einfluß der Rezeptordichte auf die Stärke der Proliferationsantwort nach Rezeptorstimulation in den verschiedenen Zellklonen zu untersuchen, wurden die Klone BaF HER3, 5 und 6 und Hm2, 4 und 9 in mehreren unabhängigen Versuchen mittels H^3 -Thymidininkorporation getestet.

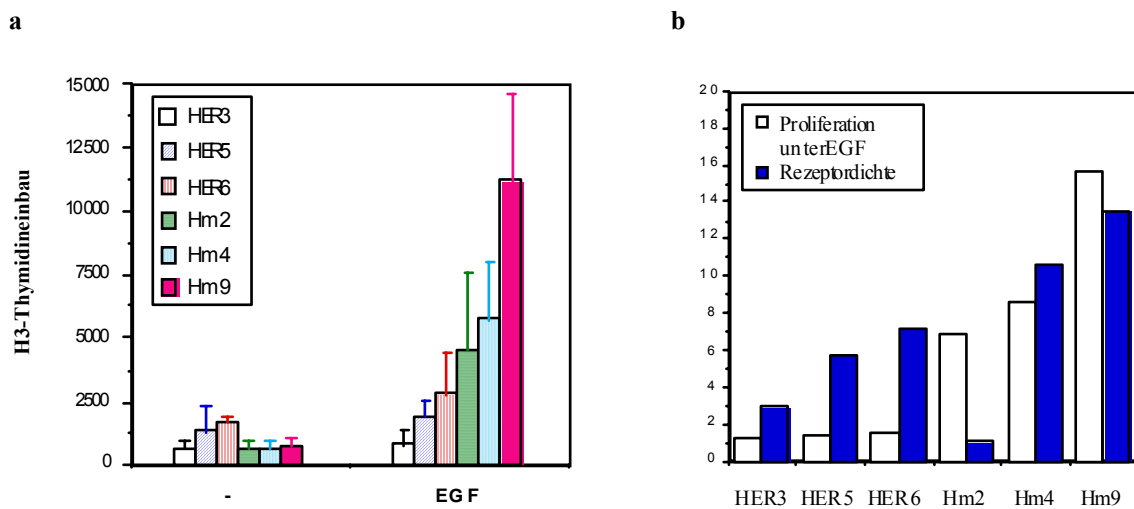


Abb.8:

(a) Aktivitätswerte aus 6 unabhängigen H^3 -Thymidineinbau Experimenten mit den Klonen BaF HER3, 5 und 6 und Hm2, 4 und 9 nach EGF-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen (-); Versuchsdurchführung wie unter Abb.7 beschrieben; $p = 0,0001$

(b) Graphische Darstellung zum Vergleich der Proliferationsaktivität mit der Rezeptordichte. Dabei entspricht die Darstellung der Rezeptordichte Abb.6 (b), während die Proliferationsaktivität als Zuwachs an DNA-Replikationsaktivität angegeben wurde, d.h. aus Abb.8 (a) wurde von den EGF-Werten die Basalaktivität (-) der Klone subtrahiert, um den tatsächlichen Effekt der EGF-Stimulation zu zeigen. Die Werte beider Säulengruppen sind als Faktoren dargestellt, wobei der kleinste Wert jeweils 1 gesetzt wurde, d.h. bei der Proliferation HER3 = 1 und bei der Rezeptordichte Hm2 = 1. Die anderen Werte wurden dazu in Bezug gesetzt. Diese Darstellung verdeutlicht, daß die Rezeptordichte nicht die Ursache für die starke Proliferationsantwort des HER-mrk Rezeptors war, sondern daß der humane EGF-R nicht die Potenz des HER-mrk Rezeptors besaß, Proliferation zu induzieren.

Alle BaF Hm-Klone führten nach EGF-Stimulation zu einer starken Induktion der DNA-Replikation. Sogar BaF Hm2, der BaF Hm-Klon mit der geringsten Rezeptordichte, proliferierte stärker als alle BaF HER-Klone (Abb.8a). Diese zeigten nur einen schwachen Einbau von radioaktivem Thymidin. Vergleicht man die Proliferationsstärke innerhalb der verschiedenen Zellklone, so sieht man, daß bei den BaF Hm-Klonen Hm2 am schwächsten und Hm9 mit Abstand am stärksten proliferierte

Ergebnisse

($p=0,0013$). Bei den BaF HER-Klonen war der Unterschied nur gering, aber dennoch mit $p=0,0370$ signifikant. Hier proliferierte BaF HER3 am schwächsten und HER6 am stärksten. Außerdem fiel bei allen BaF HER-Klonen auf, daß sie verglichen mit HER-mrk der BaF Hm-Zellen eine erhöhte Basalaktivität des EGF-Rezeptors besitzen. Auch diese stieg mit zunehmender Rezeptordichte an (Abb.8a).

Innerhalb der verschiedenen BaF Zellklone hatte die Rezeptordichte folglich einen Einfluß auf die Proliferationsstärke. Diese war jedoch bei HER-mrk exprimierenden Zellen durchweg deutlich stärker, weshalb dies als spezifische Wirkung der mrk-Kinase gedeutet werden konnte.

Für die weiteren Versuche wurde der Klon 9 der BaF Hm Zellen eingesetzt, da hier jeweils der ausgeprägteste Effekt in einem Versuch zu erwarten war. Von den BaF HER-Klonen wurde HER3 verwendet, da die Basalaktivität bei diesem Klon im Vergleich zu HER5 und 6 noch gering und so die Auswirkung einer Stimulation besser beurteilbar war. Dies zeigt auch eine Western Blot Analyse mit einem Phosphotyrosinantikörper von mit EGF stimulierten Ba/F3 Zellen (Abb.9). Der HER-mrk-Rezeptor (Klon BaF Hm9) zeigte im Ruhezustand nur eine geringe Tyrosinphosphorylierung, die sich bei Aktivierung durch EGF-Stimulation enorm verstärkte. Bei den BaF HER-Klonen hingegen zeigte nur HER3 einen sichtbaren Unterschied zwischen Ruhezustand und Aktivierung, während der HER6-Klon bereits eine hohe Basalaktivität besaß (Abb.9).

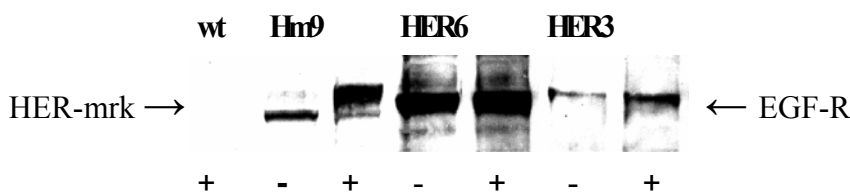


Abb.9: Analyse der Rezeptortyrosinphosphorylierung in verschiedenen Ba/F3 Zelllinien

Ba/F3 Zellen wurden nach 2maligem waschen mit PBS in Hungermedium (RPMI, 1%P/S, 5%FCS) aufgenommen und nach 4 Stunden 10min mit EGF stimuliert, dann 1mal mit PBS gewaschen und lysiert. Jeweils 50µg Protein von unstimulierten (-) und EGF-stimulierten (+) Zellen wurde mit der Western Blot Analyse untersucht. Mit EGF versetzte wildtypische Ba/F3 Zellen dienten als Negativkontrolle.

Wenn nötig wurden in den folgenden Experimenten neben BaF HER3 und Hm9 auch andere Klone eingesetzt, um Einflüsse der Rezeptordichte auf die Ergebnisse zu untersuchen.

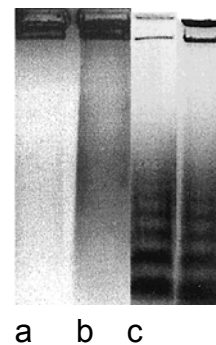
Ergebnisse

4.1.3. Messung der DNA-Fragmentierung zur Untersuchung der Apoptoseregulation in Ba/F3 Zellen

Für den IL-3 Rezeptor ist in Ba/F3 Zellen beschrieben, daß dieser neben der Induktion der Zellproliferation die Apoptose verhindern kann (Rodriguez-Tarduchy et al, 1990). Der humane EGF-R hingegen vermittelt in diesem Zellsystem kein Langzeitüberleben (Collins et al, 1988). Die Charakterisierung der verschiedenen Ba/F3 Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit hat gezeigt, daß HER-mrk im Gegensatz zu HER Proliferation und Langzeitüberleben vermitteln kann (4.1.2.). Deshalb wurde im Folgenden geprüft, ob die aus den Langzeitwachstumsstudien gewonnene Vermutung stimmte, daß HER-mrk auch antiapoptotische Signalwege induzieren kann.

Ein typisches Merkmal für Apoptose ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung. Sie entsteht durch das spezifische Schneiden der DNA durch aktivierte Endonukleasen. Dadurch entstehen DNA-Fragmente spezifischer Länge, die nach Extraktion und Auftrennung im Agarosegel als „Leitern“ erscheinen (Abb.10c). Eine nekrotische Zelle zeigt im Gegensatz dazu einen DNA-Schmier durch unspezifischen Abbau der DNA (Abb.10b), während eine lebende Zelle sich durch eine solitäre hochmolekulare Bande an genomischer DNA auszeichnet (Abb.10a).

Abb.10: Typische Darstellung nach DNA-Extraktion und Auftrennung im Agarosegel von Ba/F3 Zellen bei gesunden lebenden Zellen (a), bei nekrotischen Zellen (b) und bei apoptotischen Zellen (c)



Diese in der Apoptose beobachtete DNA-Fragmentation wurde als Indikator genutzt, die vermutete Fähigkeit der mrk-Kinase zur Apoptoseinhibition zu überprüfen.

Die Experimente zeigten bei wildtypischen Ba/F3 Zellen wie erwartet unter Stimulation mit IL3/FCS keine apoptosetypische DNA-Fragmentierung noch nekrosotypischen DNA-Abbau, sondern nur die Extraktion von genomischer DNA (Abb.11). IL-3 ist in Ba/F3 Zellen der physiologische Stimulus, um ein Überleben der Zellen sicher zu stellen (Rodriguez-Tarduchy et al, 1990). Dagegen zeigten unstimulierte sowie FCS und EGF behandelte Zellen die für die Apoptose typische DNA-Leiter. FCS schien dabei die

Ergebnisse

Apoptose ein wenig zu verzögern. Im Vergleich zu unbehandelten und EGF stimulierten Ba/F3 Zellen wurden größere DNA-Fragmente isoliert, d.h. die DNA-Fragmentation war zu diesem Zeitpunkt weniger weit fortgeschritten.

EGF/FCS behandelte BaF HER Zellen zeigten 20h nach Stimulation ebenfalls DNA-Fragmentierung, d.h. der humane EGF-R kann die Apoptose in Ba/F3 Zellen nicht verhindern. Dies wurde anhand der drei HER-Klone HER3, 5 und 6 überprüft (in Abb.11 ist HER3 dargestellt, HER5 und 6 ohne Abb.). HER-mrk hingegen kann in diesen Zellen tatsächlich die Apoptose unterdrücken (Abb.11). Die Stimulation des HER-mrk Rezeptors mit EGF/FCS zeigte keine DNA-Leiter. Dies war ebenfalls in den drei Hm-Klonen, also Hm2, 4 und 9 der Fall (in Abb.11 ist Hm9 abgebildet, Hm2 und 4 ohne Abb.). Interessanterweise führte die Stimulation von BaF Hm Zellen mit IL-3 bzw. EGF ohne FCS-Zusatz zur Apoptose, genauso wie bei unstimulierten oder nur FCS behandelten Zellen (Abb.11). FCS schien neben einer Steigerung der Proliferation von Ba/F3-Zellen (4.1.2.2.) folglich auch für die Antiapoptose der Zellen als Cofaktor wichtig zu sein.

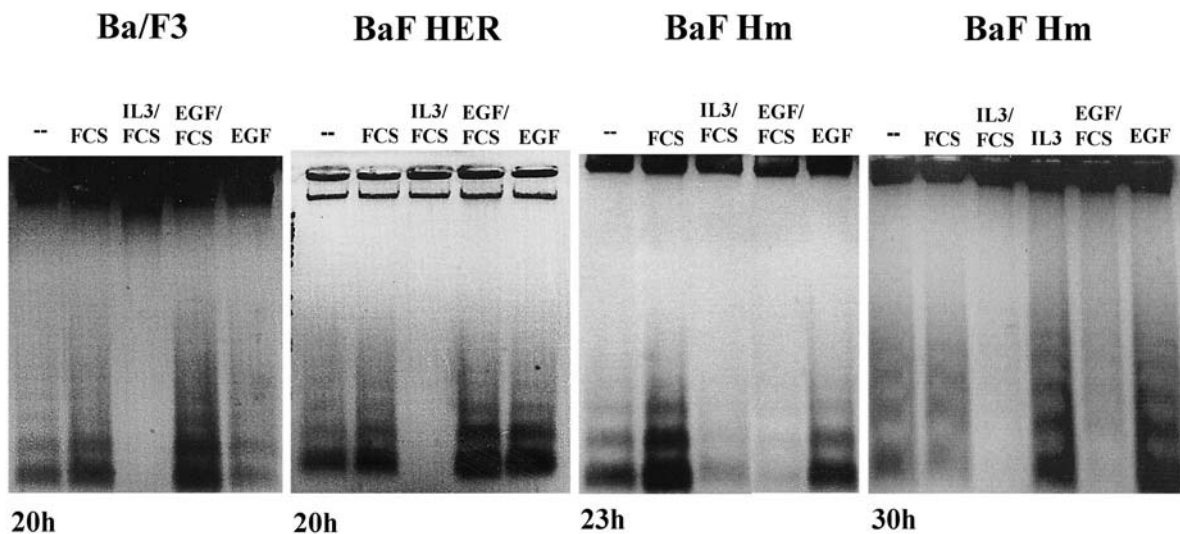


Abb.11: DNA-Leitern von wildtypischen Ba/F3, BaF HER und BaF Hm Zellen:

Ba/F3 Zellen wurden 2mal mit PBS gewaschen, in RPMI-Hungermedium aufgenommen und 2 Stunden sitzengelassen und dann entweder unstimuliert belassen (-) oder mit IL3/FCS und EGF/FCS, aber auch FCS, IL-3 und EGF alleine versetzt. Nach 20 bis 30 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, die DNA extrahiert und mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Im Ba/F3 Zellsystem konnte somit gezeigt werden, daß HER-mrk im Gegensatz zum humanen EGF-R neben einer starken Induktion der Zellproliferation auch die Apoptose verhindern kann. Die mrk-Kinase induziert demnach mitogene sowie antiapoptotische Signalwege, die im folgenden untersucht wurden.

Ergebnisse

4.1.4. HER-mrk Mutanten

Bereits einige der von der mrk-Kinase induzierten Signalwege wurden untersucht und sind somit bekannt. Dazu gehören die Aktivierung der PLC- γ (Wellbrock et al, 1995), die Aktivierung des MAPK Weges (Wellbrock und Schartl, 1999), der PI3K (Wellbrock et al, 1999) und Akt-Kinase, der Fyn-Kinase (Wellbrock et al, 1995; Wellbrock und Schartl, 2000) und des Transkriptionsfaktors STAT5 (Wellbrock et al, 1998b; Baudler et al, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Signalwege für die antiapoptotische Funktion der mrk-Kinase wichtig sind. Dafür stand zum einen der Vergleich mit den Signalwegen des humanen EGF-Rezeptors HER zur Verfügung, der in diesem Zellsystem kein Überleben gewährleistet. Zum anderen wurden in Ba/F3 Zellen exprimierte Rezeptormutanten von HER-mrk untersucht, die in unterschiedlicher Länge an ihrem Carboxyterminus verkürzt sind. Dadurch fehlen ihnen unterschiedlich viele C-terminale Phosphotyrosine, die die Bindungsstellen für rekrutierte Signalproteine darstellen (1.3.2.). Unter den Rezeptormutanten war mit der Fragestellung "antiapoptotische Signalwege" v.a. eine sehr interessant. Diese als Hm Δ 1006 bezeichnete Mutante, die die komplette Kinasedomäne, aber carboxyterminal keine substratbindenden Phosphotyrosine besitzt (Abb.12a), hatte zwar die Fähigkeit zur Induktion von DNA-Replikation, konnte aber kein Langzeitüberleben sichern (Abb.12b). Dabei entsprach die Stärke der DNA-Replikation im H3-Thymidineinbau etwa 30% der von IL-3 stimulierten und etwa 60-75% der von EGF-stimulierten BaF Hm Zellen (ohne Abb.) In Wachstumsexperimenten zeigte sich jedoch, daß EGF stimulierte BaF Hm Δ 1006 Zellen ebenso schnell absterben wie wildtypische Ba/F3 Zellen (Abb. 12b).

Die nächst längere Rezeptormutante, Hm Δ 1075, besitzt zwei substratbindende Phosphotyrosine (Abb.12a) und zeigte in Proliferation und Langzeitüberleben ein Bild wie der komplette HER-mrk-Rezeptor (Abb.12b). Hm Δ 1075 scheint somit eine Art Minimalrezeptor darzustellen, der in der Lage ist, alle für Proliferation und Überleben wichtigen Signalwege zu induzieren.

Ergebnisse

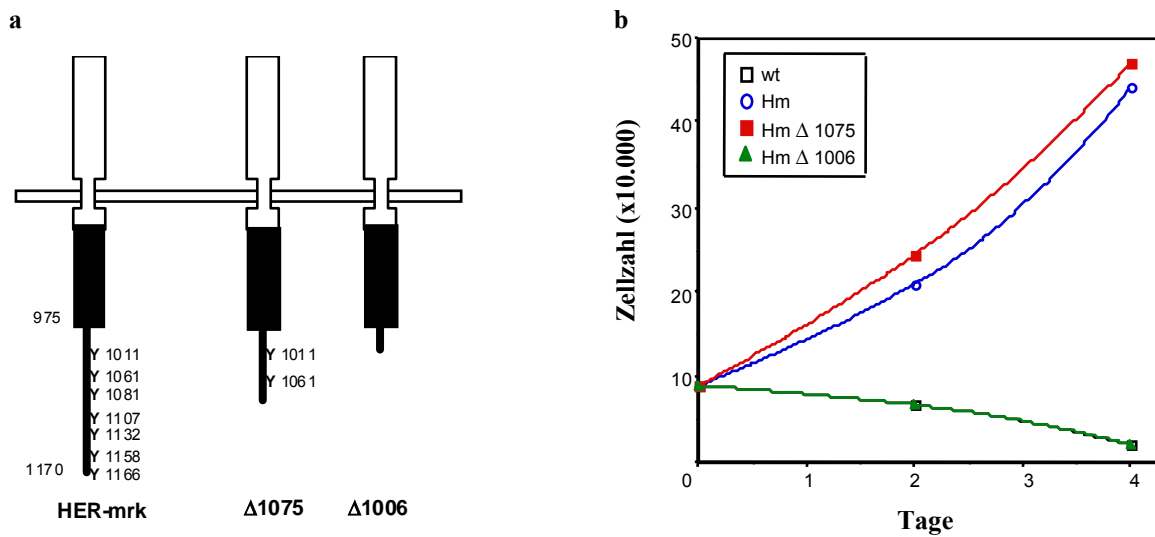


Abb.12:

(a) HER-mrk und die beiden Rezeptormutanten Hm Δ 1075 und Δ 1006; von jeweils einen dieser Rezeptoren exprimierenden Ba/F3 Zelllinien wurden durch Zell-ELISA Klone ausgewählt, die in ihrer Rezeptordichte dem BaF Hm9-Klon entsprachen. Dies waren BaF Hm Δ 1006/4 und BaF Hm Δ 1075/7, die im folgenden einfach BaF Hm Δ 1006 und BaF Hm Δ 1075 genannt werden.

(b) Langzeitüberleben von BaF wt, Hm, Hm Δ 1006 und Δ 1075 (Versuchsdurchführung wie in Abb.5 beschrieben)

Die Untersuchung von BaF Hm Δ 1006 Zellen auf DNA-Fragmentierung zeigte im Einklang mit den Langzeitwachstumsstudien, daß diese Mutante des HER-mrk Rezeptors, die keine substratbindenden Phosphotyrosine besitzt, im Gegensatz zum kompletten HER-mrk Rezeptor nicht in der Lage war, die Apoptose zu verhindern (Abb.13).

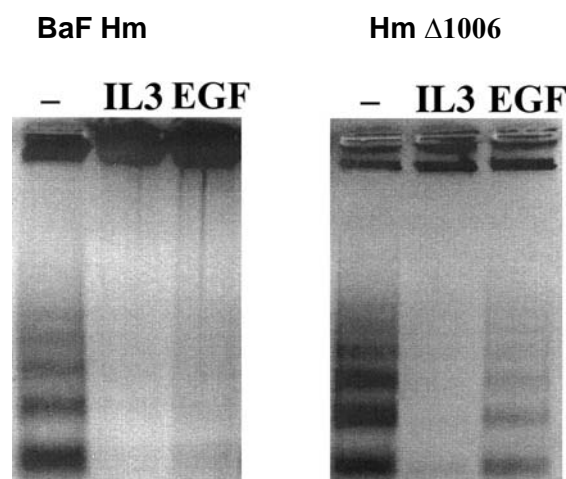


Abb.13: DNA-Leitern von BaF Hm und Hm Δ 1006 30 Stunden nach Stimulation mit IL3 bzw. EGF (beide mit FCS Zusatz) bzw. unstimuliert (-); Versuchsdurchführung wie in Abb. 11 beschrieben. Im Gegensatz zu HER-mrk konnte die Rezeptormutante Hm Δ 1006 die Apoptose nicht unterdrücken.

Ergebnisse

Die HER-mrk Mutante Hm Δ 1006 ist somit noch fähig, mitogene Signale zu erzeugen, während das Vermögen antiapoptotische Signale zu induzieren verloren ging. Sie eignet sich deshalb hervorragend, Signalwege daraufhin zu untersuchen, ob sie für die mitogene oder die antiapoptotische Funktion des HER-mrk Rezeptors notwendig sind.

4.1.5. Analyse der Aktivierung von STAT1, 3 und 5 durch die Rezeptoren HER, HER-mrk und seine Mutanten Hm Δ 1075 und Δ 1006

Ein möglicher antiapoptotischer Signalweg, dessen Bedeutung im Ba/F3-Zellsystem am IL-3 Rezeptor gezeigt wurde (Dumon et al, 1999), ist die Induktion der Genexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L. Bcl-X_L wirkt über eine Stabilisierung des mitochondrialen transmembranen Potentials der Apoptose entgegen (Chao und Korsmeyer, 1998) und ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors STAT5 (Socolovsky et al, 1999; Dumon et al, 1999).

STAT5 wird vom HER-mrk Rezeptor in Ba/F3 Zellen phosphoryliert und damit aktiviert und führt zur Induktion von Zielgenen wie *pim-1*, *cis* und *osm* (Wellbrock et al, 1998b). Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob der EGF-R in Ba/F3 Zellen zu einer STAT5 Aktivierung führt. Zudem sollte geklärt werden, ob auch die carboxyterminal verkürzte HER-mrk Rezeptormutante Hm Δ 1006 noch zu einer STAT5-Phosphorylierung in der Lage ist. Beide Rezeptoren konnten in Ba/F3 Zellen kein Langzeitüberleben vermitteln. Neben STAT5 wurden außerdem die STAT-Familienmitglieder 1 und 3 untersucht.

Für die Untersuchung einer STAT-Aktivierung kann man sich die Bindung phosphorylierter und damit aktivierter STAT-Proteine an DNA mit der spezifischen STAT-Bindungssequenz zu nutzen machen. Da nur aktivierte STAT-Proteine als Dimere an die DNA binden, können diese selektiv extrahiert und mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Die DNA-Bindungssequenzen waren für STAT5 die „gamma activating site“ (GAS; 5'-AGA TTT CTA GGA ATT CAA TCC-3') aus dem β -Casein-Promotor und für STAT1 und 3 das „high affinity serum inducible element“ (hSIE; 5'-CAT TTC CCG TAA ATC GTCG-3').

Ergebnisse

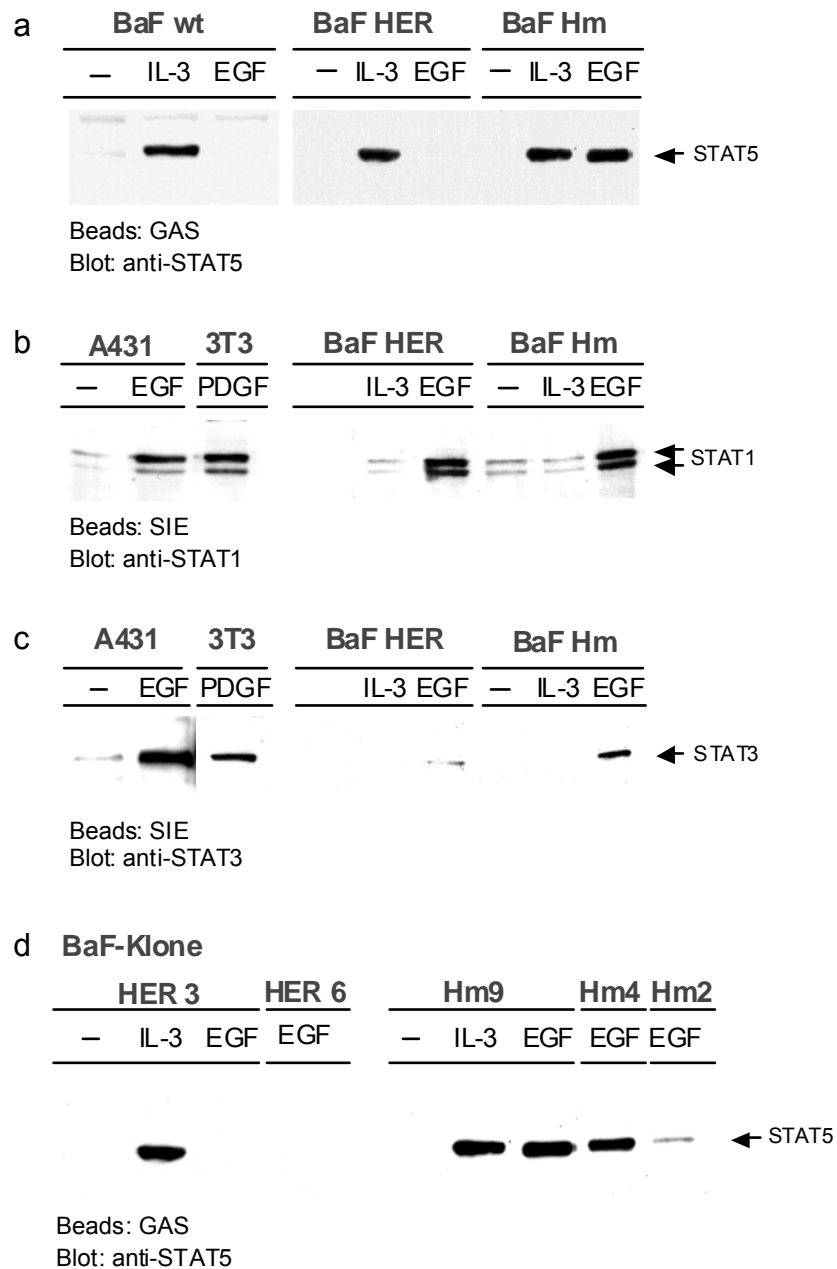


Abb.14: Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen STAT5, 1 und 3 von DNA-bindenden Proteinen 2×10^7 Zellen wurden nach 4-stündigem Hungern in RPMI einer 10min-Stimulation mit EGF bzw. IL-3 unterzogen und mit Lysispuffer für Kernproteine lysiert (3.3.1.2.). Die aktivierten STAT-Proteine wurden aus Proteinlysate mit einer Menge von 1mg Gesamtprotein mit Hilfe von an eine Matrix gebundenen DNA-Oligomeren extrahiert, die die jeweilige STAT-Bindungssequenz enthalten (Dynabeads-Methode; 3.3.3.) und dann im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen STAT 5 (95kDa), 3 (89kDa) und 1 (α/β ; 91/84kDa) analysiert.

In **a-c** sind die Ergebnisse der HER-mrk und EGF-R Stimulation für STAT5, 1 und 3 zu sehen. Als Kontrolle dienten für STAT5 die wildtypischen Ba/F3 Zellen und für STAT1 und 3 EGF stimulierte A431 Zellen und PDGF stimulierte NIH3T3 Zellen. Die Ba/F3 Zellen für die STAT5-Extraktion und die STAT1/3-Extraktion stammen jeweils aus dem gleichen Zellansatz. In **d** sind die Ergebnisse aus der Analyse der verschiedenen BaF HER- und Hm-Subklone für STAT5 abgebildet.

Ergebnisse

Die Experimente zeigten (Abb.14), daß STAT5 in wildtypischen Ba/F3 Zellen nur nach IL-3 Stimulation über die DNA-Bindung extrahiert werden konnte. Unstimulierte und EGF-stimulierte Zellen führten zu keiner DNA-Bindung von STAT5 und somit zu keiner Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors. Ebenso wenig führte eine EGF-Stimulation von BaF HER zu einer STAT5-Aktivierung, d.h. der EGF-R induzierte keine Aktivierung von STAT5.

Stimulation von HER-mrk hingegen hatte - wie auch die Stimulation des IL-3 Rezeptors - DNA-Bindungsaktivität von STAT5 zur Folge (Abb.14a; vgl. auch Wellbrock et al, 1998b). STAT1 wurde von beiden RTKs (HER-mrk und dem EGF-R) in Ba/F3 Zellen in gleich starker Weise aktiviert (Abb.14b) und STAT3 ebenfalls von beiden, aber stärker von HER-mrk (Abb.14c). EGF stimulierte A431 Zellen und PDGF stimulierte NIH 3T3 Zellen dienten für STAT1 und 3 als Positivkontrolle (Olayioye et al, 1999; Cirri et al, 1997). Die Stimulation des IL-3 Rezeptors zeigte in verschiedenen Versuchsansätzen ein uneinheitliches Bild: Während in manchen Versuchsansätzen nur eine Aktivierung von STAT5 durch den IL-3 Rezeptor gezeigt werden konnte, wurden in anderen auch STAT1 und 3 aktiviert. Dabei war die Stimulation mit EGF bei BaF Hm stets positiv für alle drei STAT Proteine. Die Ursache für diese Unterschiede beim IL-3 Rezeptor muß folglich in der IL-3 Stimulation gelegen haben. Während Pallard et al (1995), Sakai et al (1997) und Demoulin et al (1999) nur eine Aktivierung von STAT5 durch den IL-3 Rezeptor in Ba/F3 Zellen zeigen konnten, haben Nagata und Todokoro (1996) eine Aktivierung von STAT1, 3 und 5 beschrieben. Da in den vorliegenden Versuchsansätzen und auch denen von Sakai et al (1997) und Demoulin et al (1999) kein rekombinantes IL-3, sondern Zellkulturüberstand IL-3 produzierender Zellen verwendet wurde, könnte eine andere Charge mit geringerer IL-3 Menge für solche Unterschiede verantwortlich gewesen sein.

Um auszuschließen, daß die festgestellten Unterschiede in der STAT5-Aktivierung Rezeptordichte bedingt sind, wurden auch die verschiedenen Ba/F3 Subklone untersucht (Abb.14d). Auch BaF HER6, der HER-Klon mit den meisten EGF-Rezeptoren, zeigte keine oder nur minimale STAT5-Aktivierung nach EGF-Stimulation. Die geringe Rezeptordichte von BaF Hm2 hingegen führte dennoch zu einer STAT5-Aktivierung, wenn auch weniger stark (Abb.14d).

Nachdem eine Aktivierung von STAT1, 3 und 5 durch die mrk-Kinase gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die mrk-Mutante Hm Δ 1006, die keine Phosphotyrosinbindungsstellen mehr aufweist, noch eine STAT-Aktivierung zeigt. Nach etablierter Lehrmeinung dürfte dies nicht möglich sein, da eine intrazelluläre Rezeptortyrosinphosphorylierung zur Bindung und Aktivierung von STAT5 benötigt

Ergebnisse

wird. Überraschenderweise wurde nach 10-minütiger EGF-Stimulation des Hm Δ 1006 Rezeptors aber tatsächlich eine STAT5-Bindung an die DNA-Bindungssequenz gefunden (Abb.15a). Diese war allerdings schwächer als bei Stimulation des kompletten HER-mrk Rezeptors. Die Hm Δ 1075-Mutante, die die zwei proximalsten intrazellulären Phosphotyrosinbindungsstellen noch besitzt, zeigte hingegen eine ebenso starke STAT5-Aktivierung wie HER-mrk. STAT1 und 3 hingegen wurden nicht durch Hm Δ 1006 aktiviert (Abb.15b). Die bis auf die Kinasedomäne verkürzte Rezeptormutante Hm Δ 1006 kann folglich noch eine geringe STAT5-Aktivierung induzieren, nicht jedoch eine Aktivierung von STAT1 und 3.

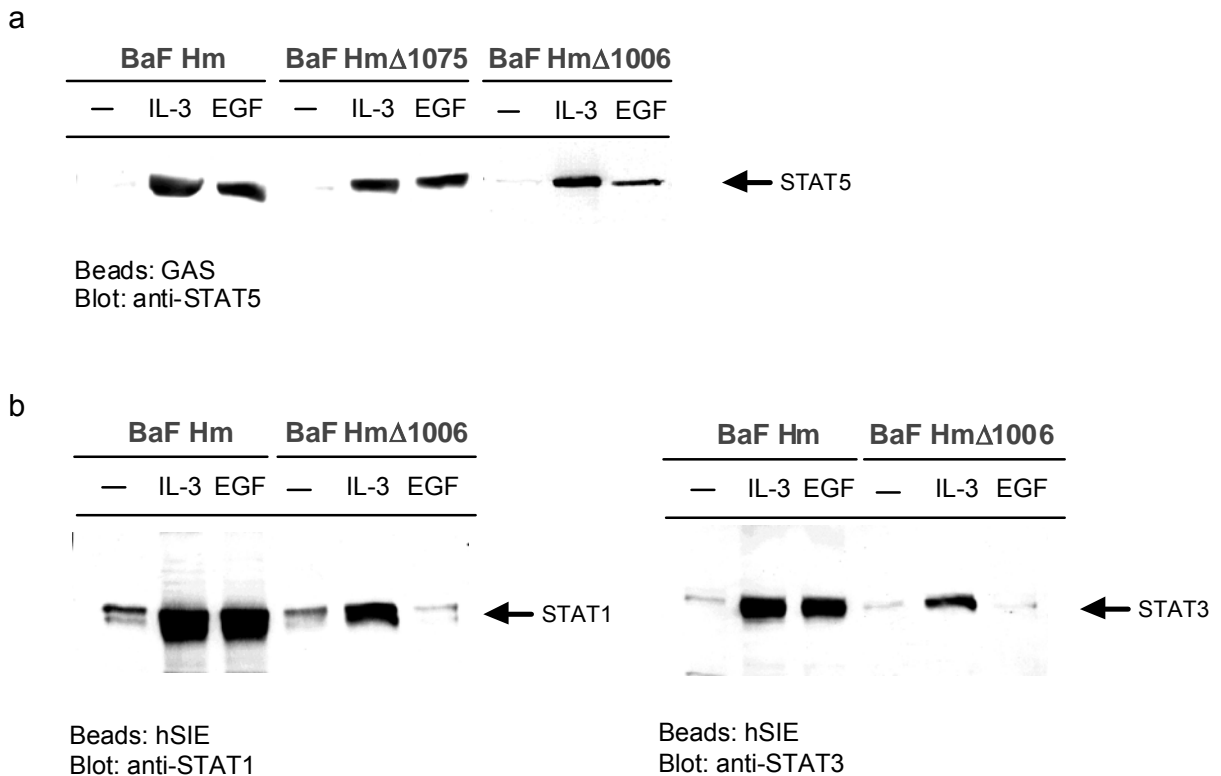


Abb.15: Western Blot Detektion von STAT-Dynabeads-Extraktionen von BaF Hm und den Mutanten Hm Δ 1006 und Δ 1075 mit Antikörpern gegen STAT5 (beide Mutanten) und STAT1 und 3 (nur Hm Δ 1006); Versuchsdurchführung wie unter Abb.14 beschrieben

Ergebnisse

4.1.6. Analyse der Bcl-X_L Expression nach Stimulation von HER, HER-mrk und dessen Mutante HmΔ1006

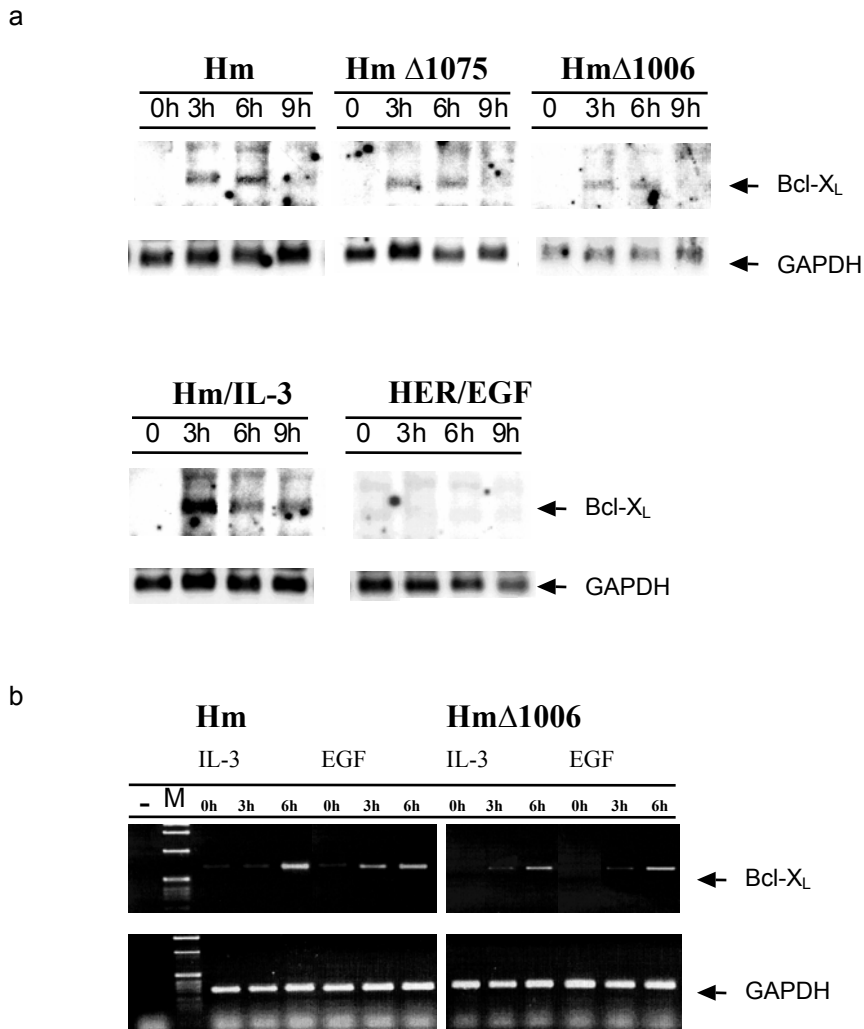


Abb.16: Bcl-X_L Northern Blot Analyse (a) und RT-PCR (b) zur Analyse der Bcl-X_L Expression in verschiedenen Ba/F3 Zelllinien nach Stimulation mit EGF bzw. IL-3

Die Zellen wurden 6 Stunden in RPMI/FCS gehungert und dann mit EGF (50ng/ml) bzw IL-3 (5% Überstand) stimuliert. Alle 3 Stunden wurde ein Aliquot Zellen geerntet und nach RNA-Extraktion im Northern (a) oder mittels RT-PCR (b) analysiert. Im Northern Blot wurde eine 900bp große humane Bcl-X_L Sonde eingesetzt, die nach Hybridisierung zur Detektion eines 2,7kb großen Fragmentes führte. Die RT-PCR führte zur Amplifikation eines 727bp großen Fragmentes. Als Ladekontrolle diente im Northern die Hybridisierung der Blots mit einer murinen GAPDH-Sonde (306bp), die zur Detektion eines 1,3kb großen Fragmentes führte. Zur Kontrolle der Bcl-X RT-PCR wurde eine PCR mit GAPDH durchgeführt, die zur Amplifikation eines 306bp großen Fragmentes führte.

Das Gen des aus der Bcl-2 Familie stammenden antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L stellt ein Zielgen für den Transkriptionsfaktor STAT5 dar (Socolovsky et al, 1999; Dumon et al, 1999). Deshalb stellte sich die Frage, ob die STAT5-Aktivierung durch HER-mrk

Ergebnisse

neben einer Induktion von *cis* und *pim-1* (Wellbrock et al, 1998b) auch zu einer Induktion der Transkription von *bcl-X* führt.

Northern Blot Analyse (Abb.16a) und RT-PCR (Abb.16b) zeigten wie beschrieben (Dumon et al, 1999) eine Induktion der *bcl-L* Transkription zwischen 3 und 6 Stunden nach IL-3 Stimulation aller untersuchten Ba/F3 Zellklone. Aber auch die Stimulation des HER-mrk Rezeptors sowie der HER-mrk-Mutante Hm Δ 1075 hatte eine Transkription von *bcl-X* zur Folge. Dies war interessanterweise zudem auch bei Stimulation der Rezeptormutante Hm Δ 1006 der Fall, d.h. die Phosphotyrosin-unabhängige schwächere Aktivierung von STAT5 schien für die Induktion des Zielgens *bcl-X_L* ausreichend zu sein. Der EGF-R hingegen führte in Ba/F3 Zellen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Miyazaki et al (1995) nicht zu einer Induktion von *bcl-X*.

In der Northern Blot Analyse erschien bei der Hybridisierung mit der heterologen Bcl-X Sonde zusätzlich zur beschriebenen Bande von 900bp in Ba/F3 Zellen drei weitere Banden mit etwa 1,5kb, 4kb und mehr als 10kb. Diese zeigten allerdings in den verschiedenen Stimulationen keine Stärkeunterschiede. Die 1,5 und 4kb-Banden könnten unspezifische Bindung zur 18S- und 28S-rRNA darstellen. Die hochmolekulare Bande verschwand auch bei zusätzlichem DNA-Verdau vor der Northern Blot Analyse nicht und stellte somit keine mitextrahierte molekulare DNA dar. In anderen Zellen wie den murinen Melanozyten melan-a und verschiedenen Mausegeweben wie Muskel, Herz und Leber (freundlichst überlassen von A. Heinrich und Prof. Gessler) zeigten sich diese zusätzlichen Banden nicht.

Um zu untersuchen, ob die Induktion der *bcl-X* Transkription auch in eine vermehrte Bcl-X_L Proteinexpression mündet, wurden Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen Bcl-X_L (26kDa) durchgeführt (Abb.17). Im Vergleich zu unstimulierten Zellen waren die Bcl-X_L Proteinlevel 2 Tage nach Stimulation von HER-mrk als auch des IL-3 Rezeptors erhöht, d.h. beide Rezeptoren führten zu einer vermehrten Bcl-X_L Expression (Abb.17a). Der EGF-R hingegen konnte, wenn überhaupt, höchstens in geringem Ausmaß die Bcl-X_L Proteinmenge erhöhen, während sich die Bcl-X_L Proteinlevel nach EGF-Stimulation von wildtypischen Ba/F3 Zellen nicht von der unstimulierten Zellen unterschied. Diese Ergebnisse wurden auch mit den Klonen BaF HER6 (höchste Rezeptordichte bei den BaF HER-Klonen) und BaF Hm2 (niedrigste Rezeptordichte bei den BaF Hm-Klonen) bestätigt (Abb.17b). Die Untersuchung des Bcl-X_L Proteins nach Stimulation von Hm Δ 1006 zeigte, daß auch durch diese HER-mrk Mutante hohe Bcl-X_L Proteinlevel im Vergleich zu unstimulierten Zellen erreicht wurden (Abb.17c). Die Expression der MAP-Kinase

Ergebnisse

ERK-2 (42kDa) wird in Ba/F3 Zellen nicht durch eine Stimulation des IL-3-, EGF- oder HER-mrk Rezeptors beeinflusst und diente deshalb als Ladekontrolle (Abb.17).

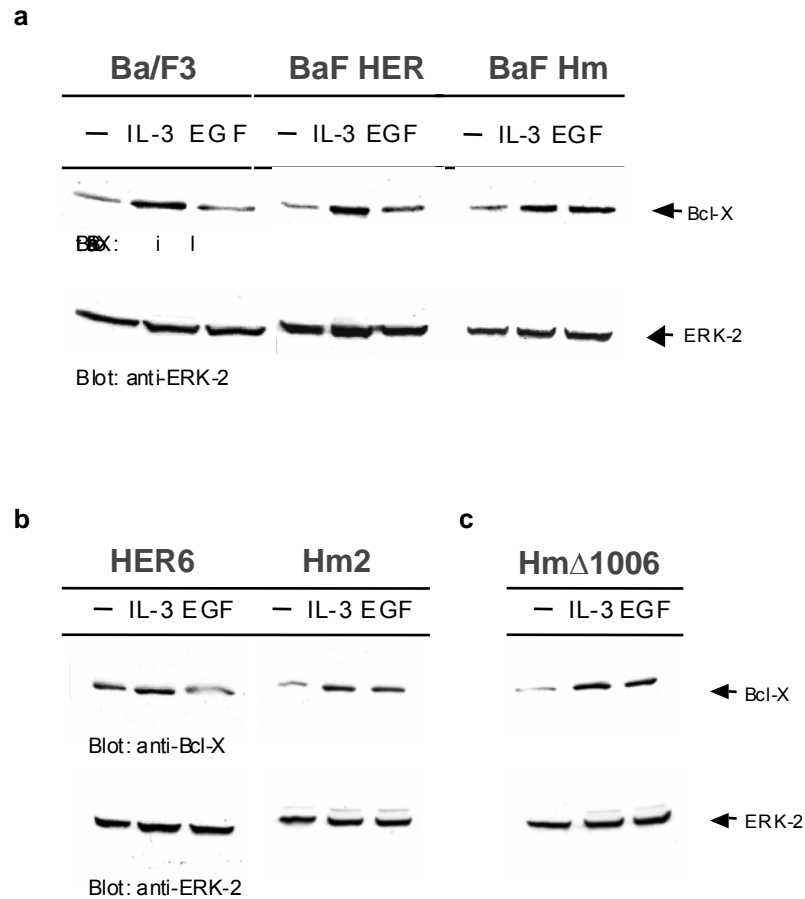


Abb.17: Western Blot Analyse von Zellysaten (BaF wt, HER3 und 6, Hm9 und 2 und HmΔ1006) 48 Stunden nach Stimulation mit EGF, IL-3 oder keiner Stimulation (-): Auf Proteinebene zeigte BaF Hm nach EGF-Stimulation genauso wie nach IL-3 Stimulation mehr Bcl-X_L Protein als die unstimulierten Zellen, während EGF-Stimulation von BaF HER höchstens zu minimal angehobenen Bcl-X_L-Proteinleveln führte (a und b). Die Rezeptormutante HmΔ1006 dagegen konnte die Proteinmenge genauso wie HER-mrk hoch halten (c).

Für die Western Blot Analyse wurden die verschiedenen Ba/F3 Zellen 2mal mit PBS gewaschen, in Hungermedium (RPMI/FCS) aufgenommen (dreifache Menge vom Ausgangsvolumen) und 2 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen mit EGF (50ng/ml) bzw. IL-3 (5% Überstand) stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, lysiert und im Western Blot mit einem Anti-Bcl-X_L-Antikörper (Bcl-X_L bei 26kDa) detektiert. Die Detektion mit ERK-2 (42kDa) diente als Ladekontrolle.

Ergebnisse

4.1.7. Analyse der Bcl-2 Expression nach Stimulation von HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006

Neben Bcl-X wurde auch das bekannteste antiapoptotische Protein Bcl-2 untersucht. Für Bcl-2 sind zwei Regulationsmechanismen der Apoptoseregulation beschrieben. Zum einen wird Bcl-2 durch antiapoptotische Stimuli wie Interleukine und Wachstumsfaktoren in der Transkription induziert (Reed et al, 1987), zum anderen aber auch serinphosphoryliert (May et al, 1994). Dabei wirkt ein vermehrter Proteingehalt sowie dessen Phosphorylierung antiapoptotisch, indem phosphoryliertes Bcl-2 z.B. das proapoptotische Protein Bax binden und so die von Bax vermittelte Caspaseaktivierung verhindern kann (Yin et al, 1994).

Bekannt war, daß Stimulation des IL-3 Rezeptors im Ba/F3 Zellsystem eine *bcl-2* Transkription induziert, während der EGF-R dies nicht vermag (Miyazaki et al, 1995; Shi et al, 1997). Mit Hilfe der RT-PCR Analyse wurde untersucht, ob HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006 *bcl-2* induzieren (Abb.18).

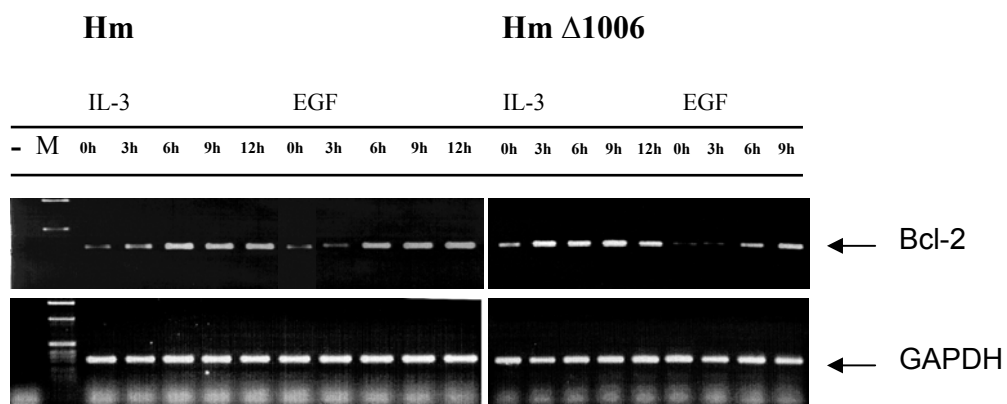


Abb.18: RT-PCR aus RNA-Extrakten von mit IL-3 bzw. EGF stimulierten BaF Hm (Klon 9) und Hm Δ 1006 Zellen. Das PCR-Produkt von Bcl-2 hatte eine Größe von 327bp; GAPDH (306bp) als Ladekontrolle; Versuchsdurchführung wie unter Abb.16 beschrieben

Wie erwartet führte die IL-3 Stimulation von Ba/F3-Zellen zu einer Erhöhung der *bcl-2* Transkription mit Beginn 3 Stunden nach der Stimulation. Aber auch HER-mrk und sogar die Mutante Hm Δ 1006 induzierten *bcl-2* (Abb.18). Dabei auffallend war, daß die Stimulation der mrk-Kinase im Vergleich zum IL3-Rezeptor zu einer verzögerten *bcl-2* Transkription führte, beginnend 6 Stunden nach der Stimulation. Im Gegensatz zum

Ergebnisse

EGF-R führte die Stimulation von HER-mrk sowie der Mutante Hm Δ 1006 somit zur *bcl-2* Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüberhinaus Versuche unternommen, mittels Immunpräzipitation und Western Blot Analyse eine mögliche Bcl-2 Phosphorylierung zu untersuchen. Diese Versuche scheiterten jedoch an der mangelnden Spezifität der Bcl-2- und Phosphoserin-Antikörper, die auch darauf beruhen könnte, daß die Proteinmengen an Bcl-2 in den Zellen zu niedrig sind.

4.1.8. Analyse der Mcl-1 Expression nach Stimulation von HER, HER-mrk und dessen Mutante Hm Δ 1006

„Myeloid cell leukemia 1“ (Mcl-1) ist ein weiteres antiapoptotisches Protein aus der Bcl-2 Familie, das als früh induziertes Gen während der Differenzierung von ML-1 myeloischen Leukämiezellen identifiziert wurde (Kozopas et al, 1993). Wie Bcl-2 ist Mcl-1 ein mitochondriales Membranprotein. Es wird v.a. in verschiedenen hämatologischen Zelllinien aber auch in epidermalen Zellen von Ösophagus und Pankreas exprimiert und seine Transkription in den verschiedenen Zellen über unterschiedliche Signalwege reguliert. Dazu gehören die Aktivierung über die PI3K/Akt (Henson et al, 2003; Wang et al, 1999), den MAPK-Weg (Huang et al, 2000; Leu et al, 2000) aber auch über Jak/STAT (Puthier et al, 1999). Im Ba/F3 Zellsystem ist eine Induktion der *mcl-1* Transkription durch den IL-3 Rezeptor über eine Aktivierung der PI3K und Akt beschrieben (Wang et al, 1999). Da dieser Weg auch von Xmrk aktiviert wird (Wellbrock et al, 1999) wurde eine mögliche Induktion der Mcl-1 Expression untersucht (Abb.19).

Die Western Blot Analyse zeigte, dass in BaF Hm und BaF Hm Δ 1006 Zellen die Mcl-1 Proteinmenge nur in den faktordeprivierten unstimulierten Zellen abfiel, d.h. nicht nur der IL-3 Rezeptor, sondern auch HER-mrk und die Mutante Hm Δ 1006 induzierten eine Mcl-1 Expression (Abb.19). Der EGF-R hingegen war dazu in Ba/F3 Zellen nicht in der Lage. Der Mcl-1 Proteingehalt in EGF-stimulierten BaF HER Zellen entsprach dem der unstimulierten Zellen. Da dieser Effekt auch auf apoptosebedingtem Proteinabbau beruhen könnte, wurde ein Stimulationsexperiment mit den HER-mrk exprimierenden BaF Hm Zellen angeschlossen (Abb.19b). Dieses zeigte, daß HER-mrk 2-5 Stunden nach der Rezeptorstimulation zu einem Ansteigen der Mcl-1 Proteinmenge führte.

Ergebnisse

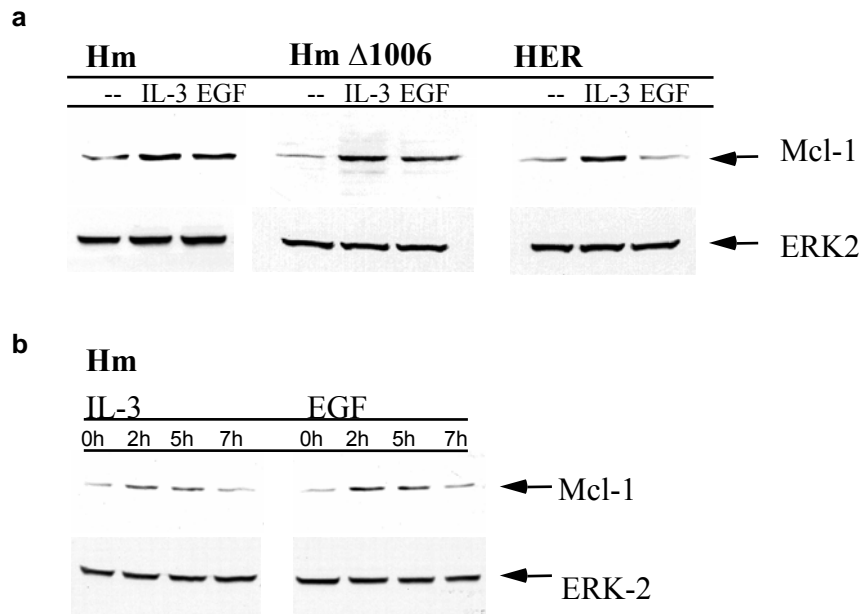


Abb.19: Western Blot Analyse zum Mcl-1 Nachweis (a) 48 Stunden nach Stimulation mit IL-3 bzw. EGF versus unstimuliert (-) (b) im Verlauf in den ersten Stunden nach Stimulation

Es wurden BaF Hm, Hm Δ 1006 und HER Zellen 2mal mit PBS gewaschen und in RPMI-Medium ohne IL-3 Zusatz aufgenommen und zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit IL-3 bzw. EGF stimuliert oder unstimuliert belassen und nach 48 Stunden Inkubation durch Zentrifugation geerntet, 1mal mit PBS gewaschen und in Lysispuffer resuspendiert. 50 μ g Protein wurden auf ein 12%iges Polyacrylamidgel geladen und nach dem Blotting mit Hilfe der Western Blot Analyse mit Mcl-1 Antikörper detektiert. Für die Stimulationsuntersuchung wurde ähnlich verfahren, nur daß die Zellen vor der Stimulation mit IL-3 bzw. EGF zur Synchronisierung der Zellzyklen sechs Stunden im Hungermedium inkubiert und nach Stimulation zu den angegebenen Zeiten geerntet wurden.

4.1.9. Bestimmung des optimalen Wirkungsbereiches der Inhibitoren Rapamycin und Wortmannin

Um zu untersuchen, wie die Bcl-2 und Mcl-1 Expression durch den Rezeptor reguliert wird, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. Im Ba/F3 Zellsystem ist eine Interaktion der Inhibitoren Rapamycin und Wortmannin mit Signalwegen beschrieben, die zu einer Induktion der Gentranskription von Bcl-2 und Mcl-1 führen. Rapamycin (RAP) inhibiert die p70 S6K (Chung et al, 1992; Kuo et al, 1992) und die *bcl-2* Transkription (Miyazaki et al, 1995), während Wortmannin (WO) ein Inhibitor der PI3K ist. Da eine Induktion der *mcl-1* Genexpression in Ba/F3 Zellen nach IL-3 Rezeptorstimulation über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges verläuft, sollte Wortmannin somit auch die *mcl-1* Transkription hemmen (Wang et al, 1999). Darüberhinaus ist für Wortmannin aber in einigen Zellsystemen auch eine *bcl-2* Transkriptionshemmung beschrieben (Minshall et al, 1999).

Ergebnisse

Um die optimale Wirkkonzentration der Inhibitoren in Ba/F3 Zellen zu ermitteln, wurde die Wirkung verschiedener Inhibitorkonzentrationen auf die DNA-Replikation im H³-Thymidininkorporationassay getestet (Rapamycin: Abb.20; Wortmannin: Abb.21).

Rapamycin inhibierte die DNA-Replikation von IL-3 stimulierten Ba/F3 Zellen (Abb.20a), sowie von EGF stimulierten BaF Hm (HER-mrk) und BaF HER (EGF-R) Zellen (Abb.20b). Dabei wurde eine maximale Inhibierung von 50% der Ausgangsproliferationsaktivität bei 5nM Rapamycin erreicht, was somit eine geeignete Konzentration für die Untersuchung eines Effektes auf die genannten Signalwege sein sollte.

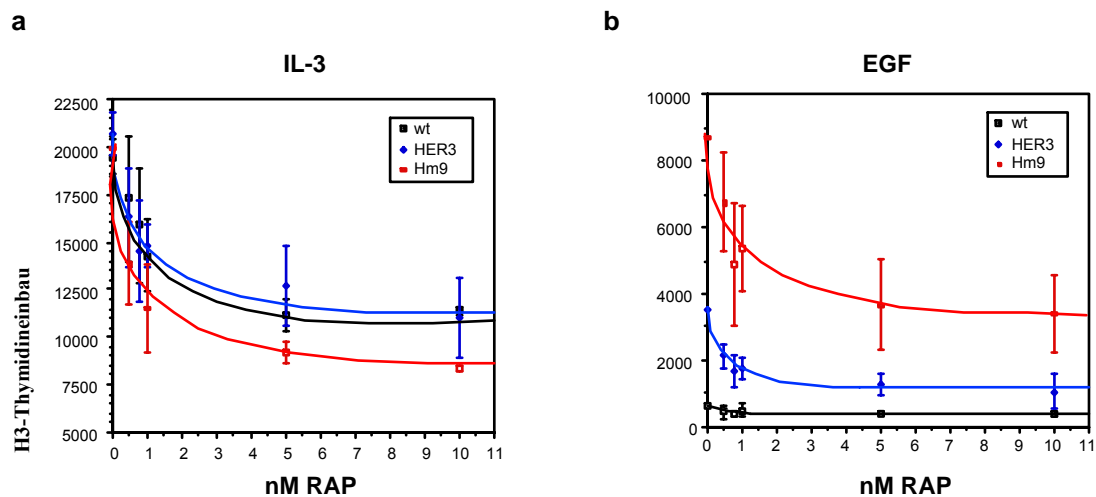


Abb.20: Wirkung von Rapamycin (RAP) auf die DNA-Replikation von BaF wt, HER und Hm unter IL-3 (a) und EGF (b) im H³-Thymidineinbau. Die maximale Inhibierung betrug etwa 50% der Aktivität ohne Inhibitor und wurde bei 5nM erreicht.

Bei den Versuchen wurde wie unter 3.1.4.2. beschrieben verfahren (siehe auch Abb.7), mit dem Unterschied, daß die Zellen zusätzlich nach zweistündigem Hungern zunächst mit dem Inhibitor versetzt und nach 45min Inkubation mit EGF bzw IL-3 stimuliert wurden.

Bei der statistischen Auswertung ergab der Student T-test des Vergleichs von Ausgangsaktivität zur maximal erreichten Rapamycininhibition (bei 5nM) unter IL-3 Stimulation aus 4 unabhängigen Versuchen für BaF wt einen Wert von $p=0,0041$, für BaF HER $p=0,0009$ und für BaF Hm $p=0,0008$ und damit für alle drei Ba/F3 Zelllinien eine signifikante Inhibition durch Rapamycin. Unter EGF-Stimulation wurden Werte von $p=0,2383$ für BaF wt (keine Signifikanz), $p<0,0001$ für BaF HER und $p=0,0023$ für BaF Hm und somit eine signifikante Hemmung des Thymidineinbaus durch Rapamycin errechnet.

Auch Wortmannin verursachte eine Inhibierung der DNA-Replikation im H³-Thymidineinbau (Abb.21). Die maximale Inhibierung betrug etwa 40% (zwischen 35 und 50%) des Proliferationssignals unter IL-3 bzw. EGF Stimulation ohne Inhibitor und

Ergebnisse

wurde bei 1-2 μ M Wortmannin erreicht. Für die Untersuchung des PI3K Signalweges sollte demnach Wortmannin in einer Konzentration von 1-2 μ M eingesetzt werden.

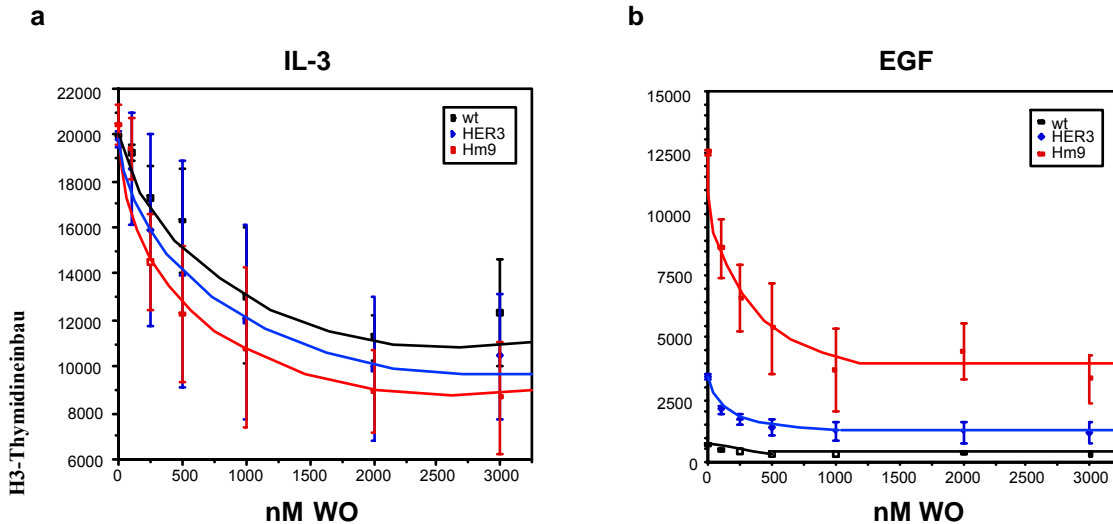


Abb.21: Wirkung von Wortmannin (WO) auf die DNA-Replikation von BaF wt, HER und Hm unter IL-3 (a) und EGF (b) im H³-Thymidineinbau. Die maximale Inhibition betrug etwa 40% der Aktivität ohne Inhibitor und wurde bei 1-2 μ M Wortmannin erreicht.

Der Student T-test ergab bei der Wortmannin-Inhibition unter IL-3 Stimulation $p=0,0001$ für BaF wt, $p=0,0169$ für BaF HER und $p<0,0001$ für BaF Hm und unter EGF Stimulation $p<0,0001$ für alle drei Ba/F3-Zelllinien und somit eine signifikante Inhibition durch Wortmannin. Die relativ hohen Standardabweichungen erklären sich (wie auch bei der Hemmung mit Rapamycin) aus dem Aktivitätsverlust des Inhibitors mit der Aufbewahrungszeit (ohne Abb.).

Leider konnten die im Anschluß geplanten Experimente zur Untersuchung des Effektes von Rapamycin und Wortmannin auf das HER-mrk medierte Zellüberleben und die durch die mrk-Kinase induzierten Signalwege im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2. Untersuchungen in Pigmentzellen

Um die Relevanz der durch Xmrk induzierten Signalwege in Ba/F3 Zellen für Pigmentzellen und das Melanom zu ermitteln, wurden die verschiedenen Signalwege zum einen in der mit HER-mrk transfizierten murinen Melanozytenzelllinie melan-a Hm und zum anderen in der Xiphophorus-Melanomzelllinie PSM untersucht. Darüberhinaus wurden einige Signalwege auch in humanen Melanomzelllinien analysiert, um zu klären, ob die für Xmrk gefundenen Wege auch für das menschliche Melanom eine Bedeutung haben.

Melanomzellen, aber auch schon die Melanozyten selbst, zeichnen sich durch eine herabgesetzte Apoptosebereitschaft aus (Duke et al, 1997). So hatten auch die verwendeten melan-a Zellen zwei Wochen nach Entzug der Wachstums promotoren TPA und Cholera toxin zwar ihre Proliferation eingestellt, zeigten aber keine Apoptose. Nach Extraktion der DNA und Auftrennung im Agarosegel fand sich zwar genomische DNA, aber keine apoptotische DNA-Fragmentierung (Daten nicht gezeigt).

Stimulation des HER-mrk Rezeptors in melan-a Zellen bewirkte eine Unabhängigkeit der Zellen von externen Wachstums promotoren wie TPA und Cholera toxin. So transfizierte Zellen proliferierten in Anwesenheit von EGF und zeigten - im Gegensatz zu den wildtypischen Zellen - keine ausdifferenzierten, pigmentierten Zellen mehr, sondern einen transformierten Phänotyp (Abb.22).

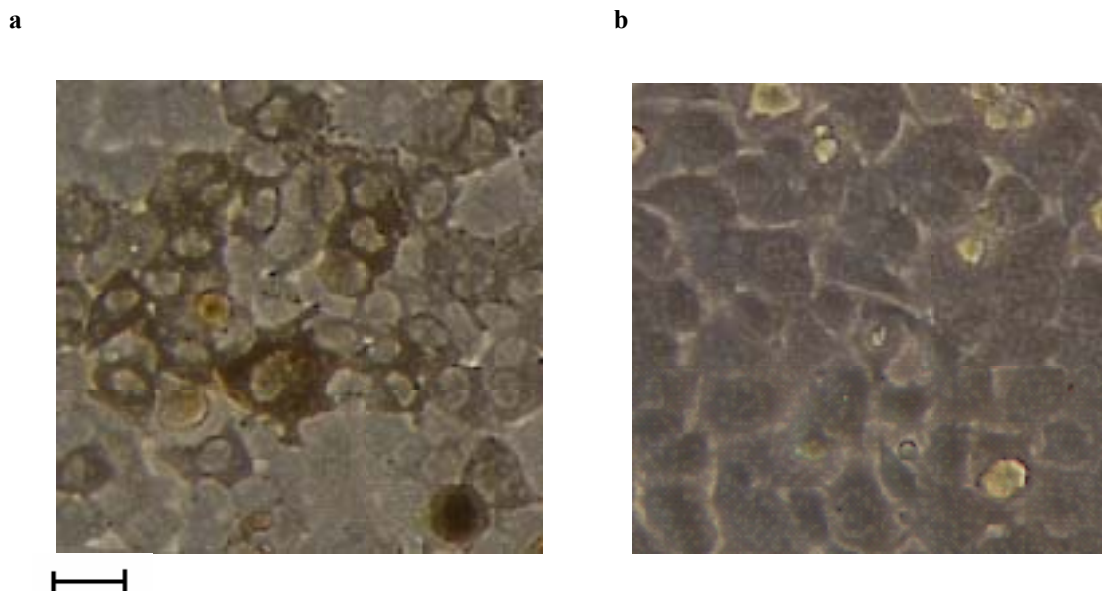


Abb.22: Mikroskopische Abbildung von wildtypischen melan-a mit ausdifferenzierten, pigmentierten Zellen (a) und den HER-mrk exprimierenden melan-a Hm im unter EGF-Stimulation transformierten Phänotyp ohne Melaninsynthese (b) (|---| entspricht 50µm).

Ergebnisse

4.2.1. Analyse der Expression von Bcl-X_L und Mcl-1 nach Stimulation von HER-mrk in melan-a Hm Zellen

Stimulation des HER-mrk Rezeptors in melan-a Hm Zellen führte zu einer STAT5 Phosphorylierung und damit Aktivierung (Wellbrock, unveröffentlicht). Mittels Northern Blot Analyse wurde nun untersucht, ob die mrk-Kinase wie in Ba/F3 Zellen auch in Melanozyten in der Lage ist, dadurch die *bcl-X* Transkription zu induzieren (Abb.23).

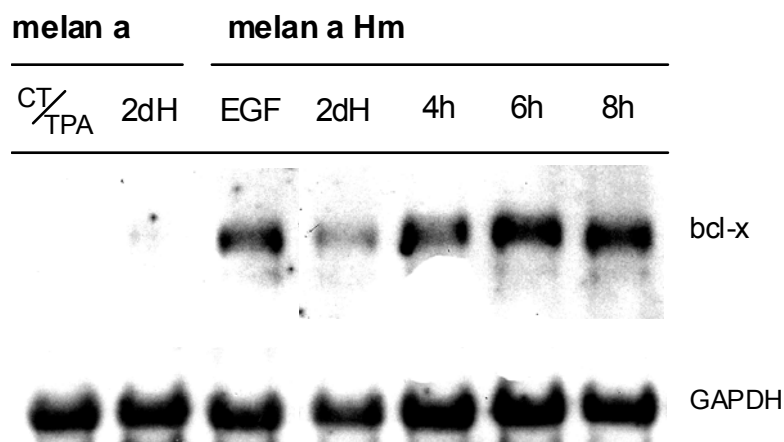


Abb.23: Northern Blot Analyse mit einer heterologen (humanen) *bcl-X* Sonde: Mit EGF stimulierte melan-a Hm Zellen zeigten eine Induktion der *bcl-X* Transkription 4-6 Stunden nach Stimulation. Für die Northern Blot Analyse wurden die Melanozyten 2mal mit PBS gewaschen und in DMEM/FCS ohne weitere Zusätze zwei Tage inkubiert und dann mit EGF (100ng/ml) stimuliert. Für die RNA-Extraktion geerntet wurden die Zellen direkt aus Kultur vor der Hungerphase (CT/TPA und EGF), nach 2 Tagen ohne Wachstumsfaktoren in DMEM/FCS (2dH) und 4-8h nach EGF-Stimulation.

Tatsächlich zeigte sich in melan-a Hm Zellen eine EGF-abhängige *bcl-X_L* Transkription: Zum einen sank die Menge an *bcl-X_L* RNA nach zwei Tagen ohne EGF-Zusatz (2dH, Abb.23) im Vergleich zu in EGF kultivierten Zellen ab. Zum anderen wurde durch erneute EGF-Stimulation dieser Zellen bereits nach 4h eine starke Aktivierung der *bcl-X* Transkription erzeugt, die auch nach 8h noch nachweisbar war (Abb.23). Auch in Melanozyten führt die mrk-Kinase somit zu einer Induktion der *bcl-X* Transkription.

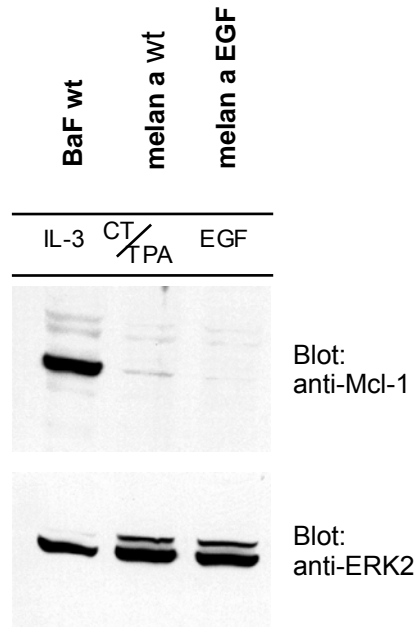
Die wildtypischen melan-a Zellen hingegen zeigten keine Bcl-X_L Expression nach Cholera-toxin/TPA-Stimulation (CT/TPA; Abb.23).

Die Expression von Mcl-1 wurde auf Proteinebene mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Im Gegensatz zur starken Expression in IL-3 stimulierten Ba/F3 Zellen

Ergebnisse

(BaF wt) wurde Mcl-1 in melan-a Zellen, wenn überhaupt, nur gering exprimiert (Abb.24) und scheint folglich für die Antiapoptose dieser Zellen keine große Rolle zu spielen.

Abb.24: Western Blot Analyse mit 50µg Proteinlysate gegen Mcl-1 (40kDa); ERK-2 (42kDa) als Ladekontrolle



4.2.2. Analyse der Aktivierung von STAT1, 3 und 5 in humanen Melanomzelllinien und der Fischmelanomzelllinie PSM

Vom Xiphophorus-Melanom und der Xmrk exprimierenden Xiphophorus-Melanomzelllinie PSM war bekannt, daß STAT5 konstitutiv aktiviert ist und daß der Malignitätsgrad der Xiphophorus-Tumoren nicht nur mit der Expressionsstärke von Xmrk, sondern auch mit der Aktivierungsstärke von STAT5 korreliert ist (Wellbrock et al, 1998b). Dies zeigt, welche bedeutende Rolle STAT5 im Fischmelanom spielt. Deshalb interessierte uns, ob STAT5 auch im humanen Melanom aktiviert ist. Untersucht wurden vier verschiedene kutane Melanomzelllinien, nämlich Bro, D10, A375 und SK-Mel28 und die Xiphophorus Melanomzelllinie PSM.

Dabei wurde erneut die Extraktion aktivierter STAT-Proteine über ihre spezifische DNA-Bindung eingesetzt (siehe 3.3.3) und aktiviertes STAT1, 3 und 5 dann in der Western Blot Analyse mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. EGF-stimulierte A431-Zellen dienten als Positivkontrolle (Abb.25).

Ergebnisse

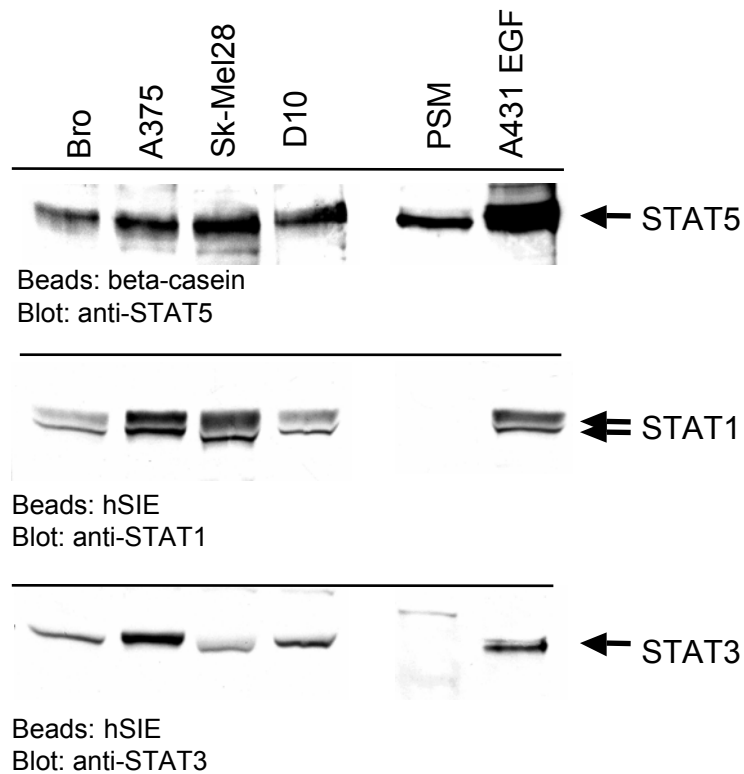


Abb.25: Western Blot Analyse mit Detektion von STAT5, 1 und 3 nach Extraktion der DNA-bindenden aktivierten STAT-Proteine mit Oligo-gekoppelten Magnetobeads (3.3.3.) aus Proteinlysate mit einer Menge von 1mg Gesamtprotein.

STAT5 zeigte in allen getesteten humanen Melanomzelllinien und in PSM-Zellen DNA-Bindung, während STAT1 und 3 in PSM-Zellen nicht aktiviert vorliegen und auch in den humanen Melanomzelllinien ein heterogenes Aktivierungsmuster zeigen. EGF stimulierte A431 Zellen dienen als Positivkontrolle.

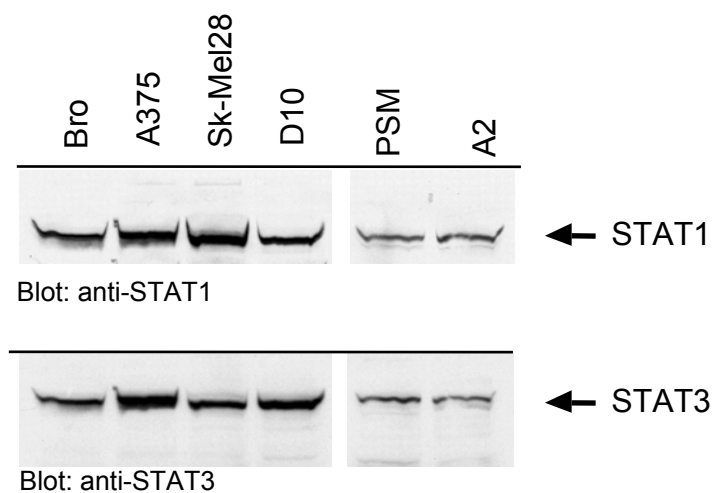


Abb.26: Expression von STAT1 und 3 in den humanen Melanomzelllinien Bro, A375, Sk-Mel28 und D10 sowie in PSM und A2-Zellen, auch zur Testung der Kreuzreaktivität der Antikörper gegen STAT1 und 3 in Fischzellen mit Hilfe der Western Blot Analyse. Wie auch in den humanen Melanomzelllinien wird STAT 1 und 3 in PSM-Zellen und A2-Zellen exprimiert.

Ergebnisse

Die Experimente zeigten, daß STAT5 (95kDa) nicht nur in PSM-Zellen von *Xiphophorus* eine konstitutive DNA-Bindungsaktivität aufweist, sondern auch in allen untersuchten humanen Melanomzelllinien (Bro, A375, Sk-Mel28 und D10). STAT1 (α/β ; p91/84) und 3 (89kDa) hingegen waren in PSM-Zellen, obwohl dort exprimiert (Abb.26), nicht konstitutiv aktiviert (Abb.25). Bei den humanen Melanomzelllinien zeigte sich ein heterogenes Muster: A375 und Sk-Mel28 wiesen eine stärkere STAT1-Aktivierung auf als Bro und D10, während STAT3 eine stärkere Aktivierung in A375 und D10 zeigte (Abb.25).

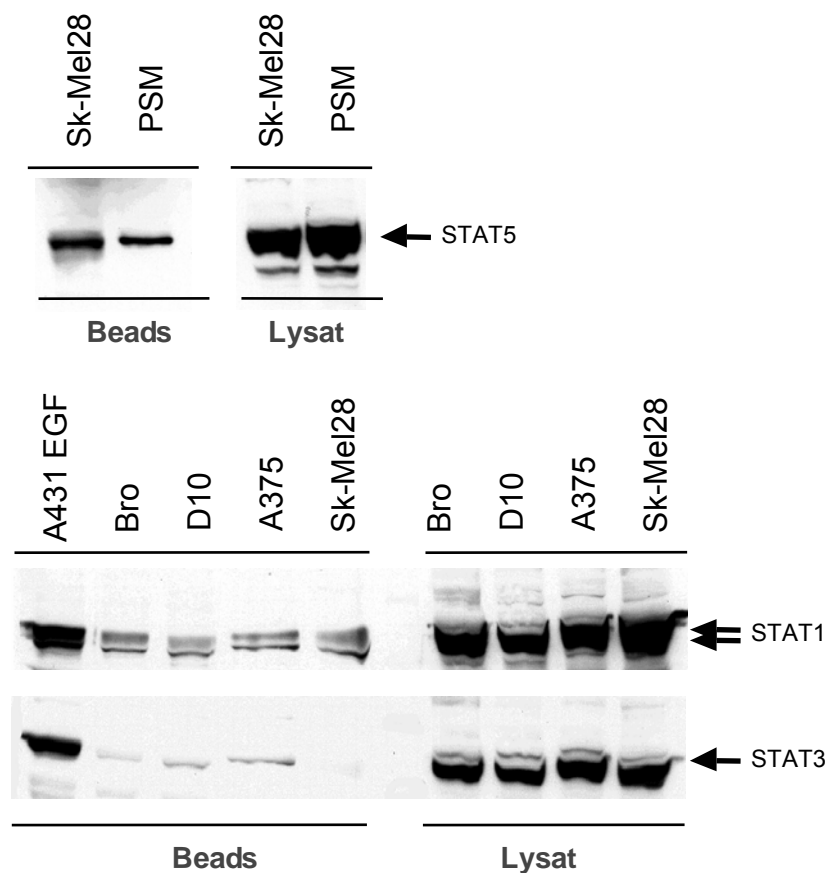


Abb.27: Western Blot Analyse zum Vergleich der Proteinmenge an aktivierten und nicht aktivierten STAT-Proteinen. Die Proteinlysate mit ausschliesslich aktivierten STAT-Proteinen stammten aus einer Dynabeads-Extraktion aus 1mg Gesamtprotein, während das Gesamtlysate 50µg Gesamtprotein enthielt.

Um das Verhältnis von aktivierten STAT-Proteinen zu nicht aktivierten STAT-Proteinen einschätzen zu können, wurden in einem weiteren Versuch zu den STAT-Proteinextrakten aus der Dynabeads-Extraktion (aus 1mg Gesamtprotein) 50µg Gesamtproteinlysate für eine Western Blot Analyse aufgetragen und mit den

Ergebnisse

entsprechenden STAT-Antikörpern detektiert (Abb.27). Dieser Vergleich zeigte, daß die STAT1 und 3-Aktivierung in den humanen Melanomzelllinien minimal ist und wohl nur durch die hohe Sensitivität der Dynabeads-Methode nachweisbar wird, während die aktivierten STAT5-Proteine einen größeren Teil der Gesamt-STAT5-Proteine ausmachen und die STAT5-Aktivierung folglich eine bedeutendere Rolle spielt.

4.2.3. Analyse der Expression von Bcl-X_L und Pim-1 und der Aktivierung der MAP-Kinase in humanen Melanomzelllinien

Nachdem sich in den humanen Melanomzelllinien eine konstitutive STAT5-Aktivität gezeigt hatte, wurde anschließend die Expression der STAT5-Zielgene *bcl-X* und *pim-1* mittels Western Blot Analyse untersucht. Zudem interessierte uns auch die Aktivität der MAP-Kinase in den humanen Melanomzellen, da von der mrk-Kinase in Fischmelanomzellen sowie auch bei Expression im Ba/F3 Zellsystem bekannt war, daß sie zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges führt (Abb.28).

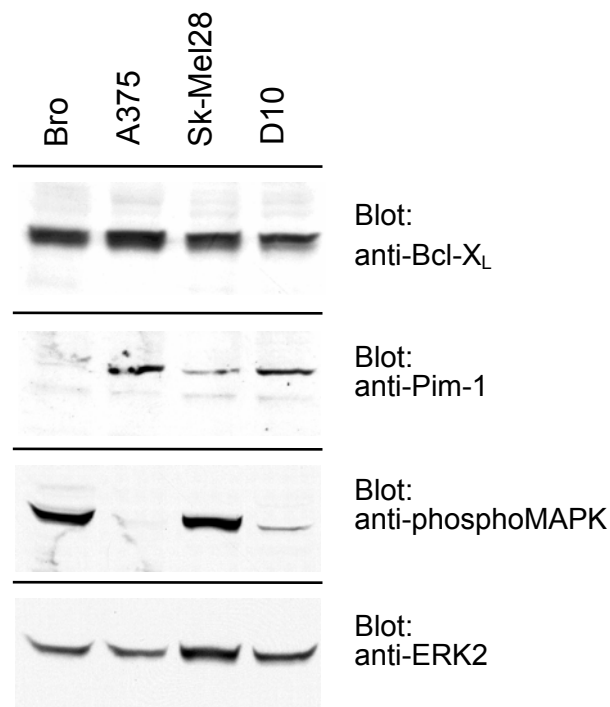


Abb.28: Western Blot Analyse mit Detektion der Proteine Bcl-X_L (26kDa), Pim-1 (32kDa) und phosphorylierter MAP-Kinase (42kDa) in den humanen Melanomzelllinien Bro, A375, Sk-Mel28 und D10: Bcl-X_L wurde in allen Zelllinien exprimiert, während Pim-1 ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigte. Ebenso wurde die MAP-Kinase in den verschiedenen humanen Melanomzelllinien unterschiedlich stark phosphoryliert und damit aktiviert. 50µg Proteinlysate, Anti-ERK-2 als Ladekontrolle

Ergebnisse

Die Experimente zeigten, daß Bcl-X_L in allen untersuchten humanen Melanomzelllinien exprimiert wird. Während Pim-1 vor allem in A375 und D10 exprimiert wurde, zeigte die Aktivität der MAPK interessanterweise ein entgegengesetztes Muster, d.h. sie wurde am stärksten in Bro und Sk-Mel28 phosphoryliert. Die Detektion von ERK-2 diene als Ladekontrolle (Abb.28).

Eine Analyse der Bcl-X_L Expression in PSM-Zellen und Xiphophorusmelanom war wegen fehlender Antikörperkreuzreaktivität zu den Fischproteinen sowie fehlender Kreuzhybridisierung der Bcl-X_L Sonde im Northern Blot leider nicht möglich (ohne Abb.), die Expression von Pim-1 konnte in PSM-Zellen bereits gezeigt werden (Wellbrock et al, 1998b).

5. Diskussion

5.1. Signaltransduktion im Ba/F3 Zellsystem

5.1.1. Die Rolle von HER-mrk im Ba/F3 Zellsystem

Stimulation des HER-mrk Rezeptors führt im Gegensatz zum EGF-R zum Langzeitüberleben von Ba/F3 Zellen

Ein zur Erforschung der Signaltransduktion von zellmembranständigen Rezeptoren wie den Rezeptortyrosinkinasen etabliertes System ist das Ba/F3 Zellsystem. Ba/F3 Zellen, eine murine pro-B-Zelllinie (Palacios und Steinmetz, 1985), eignen sich aufgrund ihrer Faktorabhängigkeit für Proliferation und Langzeitüberleben sehr gut, um mitogene und antiapoptotische Signalwege zu untersuchen. Physiologischerweise sind Ba/F3 Zellen abhängig von einer Stimulation des IL-3 Rezeptors. IL-3 Entzug führt zum Wachstumsstopp und in die Apoptose. Zur Untersuchung der durch Xmrk induzierten Signaltransduktion wurde eine mit EGF stimulierbare Rezeptorchimäre HER-mrk, deren extrazellulärer Anteil vom humanen EGF-Rezeptor und deren intrazellulärer Anteil von Xmrk stammt (Wittbrodt et al, 1992), in Ba/F3 Zellen exprimiert (Wellbrock et al, 1998). Aktivierung dieser Rezeptorchimäre durch EGF-Stimulation führt zur IL-3 Unabhängigkeit dieser Zellen. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß dies durch eine Homodimerisierung von HER-mrk hervorgerufen wird, da Ba/F3 Zellen keine Rezeptoren der EGF-Rezeptorfamilie exprimieren (Riese et al, 1995). Neben der bereits bekannten Induktion der Proliferation durch die mrk-Kinase konnte im Rahmen dieser Arbeit die Inhibierung der Apoptose durch HER-mrk gezeigt werden. Stimulation der mrk Kinase führt folglich auch zur Induktion antiapoptotischer Signalwege.

Stimulation des aus der gleichen Familie stammenden humanen EGF-Rezeptors hingegen, wird er in Ba/F3 Zellen exprimiert, führt nach Dimerisierung zwar zu Rezeptorautophosphorylierung (Riese et al, 1996b) und DNA-Synthese (Collins et al, 1988), nicht aber zu Zellvermehrung. Die Zellen treten in die S-Phase des Zellzyklus ein, zeigen aber keine Progression zu G2/M und teilen sich folglich nicht (Shibuya et al, 1992). Eine Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors mit HER2 allerdings hat in Ba/F3 Zellen Proliferation und Überleben zur Folge, woraus abgeleitet werden kann, daß durch diese Heterodimerisierung zusätzliche für das Überleben wichtige Signalwege induziert werden (Riese et al, 1996a und b). Darüberhinaus führt Cotransfektion von HER2 und dem EGF-Rezeptor in die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 - im Gegensatz zu

Diskussion

jeweils isolierter Transfektion - zur Transformation der Zellen (Kokai et al, 1989). In Pigmentzellen wird HER2 in Melanozyten wie Melanomen (Peris et al, 1991; Easty und Bennett, 2000), der EGF-R hingegen sehr viel häufiger in Melanomen als in melanozytären Nävi exprimiert (de Wit et al, 1992; Rodeck 1993). Somit könnte eine Heterodimerisierung von HER2 und dem EGF-R neben seiner Rolle beim Mammakarzinom (DiGiovanna et al, 1998) auch für die Progression des Melanoms wichtig sein. Zwar konnte durch Verwendung monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor bei Melanomen keine Wachstumsinhibierung beobachtet werden (Rodeck et al, 1991), was aber eine Aktivierung über HER2 und dadurch induzierte gemeinsame Signaltransduktion nicht ausschließt. In der Fischmelanomzelllinie PSM hingegen konnte durch Verwendung des spezifischen Xmrk Tyrosinkinaseinhibitors Tyrphostin AG555, das Wachstum der Xiphophorus Melanomzellen inhibiert werden (Wellbrock et al, 1998a). Xmrk spielt im Xiphophorus Melanom folglich eine entscheidende Rolle bei der Proliferation. Dies zeigen auch die Experimente mit HER-mrk in Ba/F3 Zellen, da hier eine Aktivierung von HER-mrk zu Proliferation und Langzeitüberleben führt. Die mrk-Kinase agiert dabei als Homodimer wie ein EGF-R/HER2 Heterodimer. Dies macht Xmrk zu einem einzigartigen Modellrezeptor, um die Rolle von RTKs im Melanom zu untersuchen.

Die Proliferationsstärke, aber nicht die Antiapoptose ist bei HER-mrk exprimierenden BaF Hm Zellen abhängig von der Rezeptordichte

Die Unterschiede in Proliferation und Langzeitüberleben zwischen HER-mrk exprimierenden BaF Hm Zellen und EGF-R exprimierenden BaF HER Zellen beruhen nicht auf einer verschieden starken Rezeptorexpression in den verschiedenen Zelllinien. Auch BaF Hm Zellklone mit geringerer Rezeptordichte als die getesteten BaF HER-Klone zeigten bei Rezeptorstimulation im Gegensatz zu letzteren Antiapoptose. Allerdings konnte ein Einfluß der Rezeptordichte innerhalb der Zellklone auf die Stärke der DNA-Synthese im H₃-Thymidineinbau festgestellt werden. Mit zunehmender Rezeptordichte stieg der radioaktive Einbau an. Dieser Effekt war innerhalb der BaF HER-Klone, die nur eine geringe DNA-Syntheseaktivität besaßen, gering. Stattdessen hatte eine stärkere EGF-R Expression in BaF HER Zellen bereits eine Zunahme der Basalaktivität der Rezeptoren zur Folge, die sich durch eine verstärkte Autophosphorylierung und erhöhte DNA-Synthese unstimulierter Zellen bemerkbar machte. Möglicherweise ist dies die Folge einer erleichterten Dimerisierung der Rezeptoren. Die Zunahme der DNA-Syntheseleistung mit ansteigender Rezeptordichte

Diskussion

bei den BaF Hm-Klonen führte aber nicht zu einem schnelleren Wachstum der Zellklone. Diese war in Langzeitwachstumsstudien bei allen BaF Hm-Klonen etwa gleich.

Serumzusatz zum Nährmedium verstärkt die Proliferation von Ba/F3 Zellen und ist für deren Langzeitüberleben notwendig

In den Experimenten zu Proliferation und Apoptose fiel auf, daß Serumzusatz (FCS) zum RPMI-Medium einen Einfluß auf das Langzeitüberleben der Zellen hat. Ohne diesen Zusatz stimulierte Ba/F3 Zellen zeigten im H_3 -Thymidineinbau nur die Hälfte des Einbaus von IL-3/FCS bzw EGF/FCS stimulierten Zellen. Shi et al (1997) konnten zeigen, daß IL-3 Stimulation in Abwesenheit von Serum in Ba/F3 Zellen initial zu einer DNA-Synthese führt, die der in Anwesenheit von FCS entspricht, allerdings nach einem Maximum bei 10 Stunden nach Stimulation stetig abfällt. FCS Zusatz ohne spezifische Rezeptorstimulation hingegen führt zu keiner signifikant gesteigerten DNA-Synthese. Bei der Untersuchung des Apoptoseverhaltens zeigten IL-3 stimulierte Ba/F3 Zellen bzw EGF stimulierte BaF Hm Zellen ohne FCS Zusatz DNA-Fragmentierung. FCS scheint folglich Cofaktoren für eine erfolgreiche antiapoptotische Signaltransduktion zu liefern. Zudem verzögert es die Apoptose im Vergleich zu unstimulierten Zellen, was man daraus schließen kann, daß bei der DNA-Extraktion noch größere DNA-Fragmente vorhanden sind. Shi et al (1997) konnten Transferrin und Lysophosphatsäure (LPA) als zwei Faktoren ausmachen, die Serum ersetzen können. Diese führen wie Serum zu einer Induktion der Transkription von *bcl-2*. Somit wird die durch den IL-3 Rezeptor induzierte Bcl-2 Expression durch im Serum enthaltene Faktoren verstärkt und könnte dadurch das Verhältnis zugunsten antiapoptotischer Proteine verschieben (Shi et al, 1997). Serum scheint folglich verschiedene Faktoren zu liefern, die die Proliferation verstärken und zum Langzeitüberleben beitragen.

5.1.2. Die mrk-Kinase und ihre Signalwege

STAT5 wird im Gegensatz zu STAT1 und 3 direkt durch die Kinasedomäne von HER-mrk aktiviert

Untersuchung der STAT Aktivierung durch die carboxyterminal verkürzten HER-mrk Mutanten Hm Δ 1075 und Hm Δ 1006 haben Aufschluß über Art und Ort der STAT

Diskussion

Aktivierung gegeben. Stimulation von Hm Δ 1075, eine Rezeptormutante, die nur noch zwei substratbindende Phosphotyrosine aufweist, führte wie beim kompletten HER-mrk Rezeptor zu einer STAT5 Aktivierung und zwar in etwa gleicher Stärke. Überraschenderweise führte aber auch die Hm Δ 1006 Mutante, die bei intakter Kinasedomäne keine C-terminalen Substratbindungsstellen besitzt, zu einer Aktivierung von STAT5. Diese Aktivierung war allerdings schwächer als die durch HER-mrk und Hm Δ 1075 induzierte. Aber auch nach Stimulation dieser Mutante konnte STAT5 in Fluoreszenzuntersuchungen im Kern der Ba/F3 Zellen nachgewiesen werden und führte zur Induktion der STAT5 Zielgene *pim-1* und *cis* (Morcinek et al, 2002). Entgegen der etablierten Vorstellung, daß die STAT-Aktivierung über eine Bindung an phosphorylierte Tyrosine am Carboxyterminus des Rezeptors erfolgt (Bowman et al, 2000), bedarf es bei der mrk Kinase folglich keiner Phosphotyrosinbindungsstelle. Das bedeutet, daß STAT5 auch phosphotyrosinunabhängig an die RTK binden und direkt durch die mrk Kinase aktiviert werden kann. Dazu paßt die Beobachtung, daß STAT5 mit unstimuliertem wie stimuliertem HER-mrk Rezeptor sowie mit der Rezeptormutante Hm Δ 1006 copräzipitiert werden konnte (Morcinek et al, 2002), allerdings nur nach Aktivierung der mrk Kinase eine Tyrosinphosphorylierung aufwies. STAT5 ist demnach konstitutiv mit HER-mrk assoziiert und wird bei Rezeptorstimulation aktiviert. Da die STAT5 Aktivierung bei Hm Δ 1006 jedoch schwächer war als bei HER-mrk, scheinen carboxyterminale Phosphotyrosinbindungsstellen für eine volle STAT5 Aktivierung nötig, möglicherweise indem sie die Bindung an den Rezeptor stabilisieren. Für die Aktivierung von STAT1 und 3 hingegen bedarf es carboxyterminaler Substratbindungsstellen, da die HER-mrk Mutante Hm Δ 1006 diese nicht aktivieren konnte.

Die Daten für die mit Xmrk eng verwandten RTKs sind sehr widersprüchlich. Beim EGF-R wurde in epidermalen A431 Zellen eine konstitutive Assoziation von STAT1, 3 und 5 an den EGF-R mit Phosphorylierung bei Rezeptorstimulation gesehen. Dabei war die Bindung an den Rezeptor unabhängig, aber die Phosphorylierung der STATs abhängig von einer funktionsfähigen SH2-Domäne (Olayioye et al, 1999), d.h. die Phosphotyrosin/SH2-Domäne-Interaktion war nicht für die Bindung der STAT-Proteine an den EGF-R in A431 Zellen, aber für deren Aktivierung durch Phosphorylierung wichtig. David et al (1996) hingegen konnten in NR6 Zellen (murine Fibroblasten) auch bei EGF-R Mutanten ohne C-terminale Phosphotyrosinbindungsstellen sogar eine Aktivierung von STAT1, 3 und 5 nachweisen, während sich bei unseren Untersuchungen an HER-mrk ein unterschiedliches Verhalten von STAT1/3 und STAT5 abzeichnete. Passend zu unseren Ergebnissen führten Deletionsmutanten des

Diskussion

EGF-Rs ohne C-terminale Phosphotyrosine in der Sequenz YXXQ in A431 Zellen zum Verlust der STAT1 und 3 Aktivierung (Coffer und Kruijer, 1995). Auch bei HER-mrk ist die Sequenz des juxtamembranären Y-1061 Motivs YVNQ (Wellbrock et al, 1999). Dies könnte somit eine Bindungsstelle für STAT1 und 3 darstellen, die bei der HmΔ1006 Mutante nicht vorhanden ist. Diese durch verschiedene Gruppen gesehenen Unterschiede in der STAT-Aktivierung hängen vermutlich von den unterschiedlichen Zellsystemen ab. Einigkeit herrscht aber in der Beobachtung, daß eine funktionsfähige Kinasedomäne für eine STAT-Aktivierung notwendig ist. Eine Kinase-defiziente HER-mrk Mutante führte genauso wenig zu einer STAT-Aktivierung (Morcinek et al, 2002) wie Kinase-defiziente EGF-R Mutanten (Leaman et al, 1996; David et al, 1996).

In Übereinstimmung mit den für Xmrk beschriebenen Befunden wurde bei verschiedenen Zytokinrezeptoren wie dem GM-CSFRβ, gp130 (IL-6 Rezeptor) und dem Epo-R eine phosphotyrosinunabhängige STAT5 Aktivierung gesehen (Mui et al, 1995; Okuda et al, 1999; Fujitani et al, 1997; Damen et al, 1995). Diese war wie bei den HER-mrk Mutanten auch bei in Ba/F3 Zellen exprimierten Epo-R Deletionsmutanten stärker, wenn noch ein substratbindendes Phosphotyrosin vorhanden war (Damen et al, 1995). Fujitani et al (1997) beschreiben für gp130 des IL-6 Rezeptors in Ba/F3 Zellen ebenfalls zwei Wege der STAT-Aktivierung, nämlich eine phosphotyrosinunabhängige STAT5 Aktivierung über direkte Bindung an die JH2 Domäne der Jak Kinase sowie eine phosphotyrosinabhängige Aktivierung von STAT3. Die mrk Kinasedomäne hat eine hohe Ähnlichkeit mit der JH2 Domäne von Jak. STAT5 könnte folglich direkt an diese Kinasedomäne binden und durch diese bei Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden. Zwar kann eine Beteiligung von Jak-Kinasen bei dieser Bindung bisher nicht sicher ausgeschlossen werden, es wurde aber bereits gezeigt, daß Jak-Kinasen für eine STAT-Aktivierung durch RTKs wie den EGF-R und den PDGF-R nicht notwendig sind (Leaman et al, 1996; David et al, 1996; Vignais et al, 1996). Auch bei HER-mrk ist die Aktivierung von STAT1 und 3 abhängig von C-terminalen Substratbindungsstellen. Das spricht auch bei HER-mrk für eine unterschiedliche Weise der Assoziation und Aktivierung dieser STAT-Proteine.

Die mrk Kinase induziert die Transkription des STAT5-Zielgenes *bcl-X*

Für den Transkriptionsfaktor STAT5 wird neben einer Induktion von Zellproliferation (Mui et al, 1996; Friedmann et al, 1996; Nakamura et al, 1996; Damen et al, 1995) und -differenzierung (Nosaka et al, 1999) in verschiedenen Zellen auch eine antiapoptotische Wirkung diskutiert. Hämatopoetische Zellen aus STAT5a/b doppel-

Diskussion

defizienten Mäusen, die Störungen in Größe, Brustentwicklung, Fruchtbarkeit und eine Immundefizienz haben (Teglund et al, 1998), z.B. zeigen ein vermehrtes apoptotisches Absterben, das mit einer ektopen Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L in diesen Zellen verhindert werden kann (Kieslinger et al, 2000). Im Ba/F3 Zellsystem wurde gezeigt, daß aktiviertes STAT5 neben einer Induktion der STAT5-Zielgene *cis* und *pim-1* (Mui et al, 1996; Quelle et al, 1996) auch zu einer Induktion von *bcl-X* führt (Onishi et al, 1998; Dumon et al, 1999; Nosaka et al, 1999).

Northern Blot und RT-PCR Analysen haben gezeigt, daß die mrk-Kinase in Ba/F3 Zellen die *bcl-X* Transkription induzieren kann. Interessanterweise ist auch der HmΔ1006 Mutante, die zwar die Kinasedomäne aber carboxyterminal keine substratbindenden Phosphotyrosine besitzt, eine Aktivierung von STAT5 in schwächerer Form und eine Induktion der Bcl-X_L Expression möglich. Der EGF-R hingegen kann in diesem Zellsystem passend zur fehlenden STAT5 Aktivierung auch keine *bcl-X* Transkription induzieren. Darüberhinaus führt eine in Ba/F3 Zellen exprimierte dominant negative STAT5-Mutante zu einer reduzierten *bcl-X* Transkription (Dumon et al, 1999). Folglich korreliert die Expression von Bcl-X_L in Ba/F3 Zellen gut mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT5.

Neben STAT5 werden in Ba/F3 Zellen noch andere Signalmoleküle diskutiert, die zu einer *bcl-X* Transkription führen, so z.B. die PI3K (Leverrier et al, 1999) und die MAPK (Kinoshita et al, 1995b; Leverrier et al, 1997). Allerdings zeigen EGF-R stimulierte Ba/F3 Zellen zwar eine Aktivierung der PI3K und der MAPK, nicht aber eine *bcl-X* Induktion. Santos et al (2001) konnten zeigen, dass die Bcl-X_L Expression in Ba/F3 Zellen, die TEL-Jak2 Transfusionsproteine exprimieren, weder durch den PI3K Inhibitor Ly294002 noch durch den MAPK Inhibitor PD98059 beeinflusst wurde.

Die Bedeutung von Bcl-X_L für das Überleben von Ba/F3 Zellen hat sich in Experimenten von Thomas et al (1998) gezeigt, bei denen durch retrovirale Insertionsmutagenese Ba/F3-Klone erzeugt wurden, die unabhängig von IL-3 Langzeitüberleben, aber keine Proliferation zeigten. In diesen Klonen wurde durchweg eine Überexpression von Bcl-X_L gefunden. Die Induktion der *bcl-X* Genexpression allein ist allerdings nicht ausreichend, um Langzeitüberleben in Ba/F3 Zellen zu sichern. So führt Stimulation der noch *bcl-X* Transkription induzierenden HER-mrk Mutante HmΔ1006 in Ba/F3 Zellen nicht zum Langzeitüberleben. Dies paßt zu Beobachtungen anderer Gruppen, die bei Überexpression von Bcl-X_L in Ba/F3 Zellen zwar eine verzögerte Apoptose, nicht aber Langzeitüberleben beobachtet haben (Kuribara et al, 1999; Mathieu et al, 2001).

Diskussion

Stimulation des HER-mrk Rezeptors führt zur Induktion der Transkription von *bcl-2* und *mcl-1* in Ba/F3 Zellen

Weitere antiapoptotische Proteine aus der Bcl-2 Familie, bei denen eine Beteiligung bei Signalkaskaden in Ba/F3 Zellen bekannt ist, sind Bcl-2 und Mcl-1. Ihre Transkription in Ba/F3 Zellen wird durch Stimulation des IL-3 Rezeptors induziert (Kinoshita et al, 1995a; Miyazaki et al, 1995; Wang et al, 1999). Zwar gibt es vereinzelt Autoren, die berichten, daß sie keine Induktion von *bcl-2* durch den IL-3 Rezeptor in Ba/F3 Zellen gesehen haben, doch unterscheiden sich deren Experimente im Zeitfenster. So hat Leverrier et al (1997) z.B. die *bcl-2* Transkription in der Northern Blot Analyse 1,5h nach IL-3 Stimulation untersucht, während das Transkript in den hier durchgeführten RT-PCRs erst nach 3 h darstellbar war. Auch die mrk-Kinase führt im Gegensatz zum EGF-R in Ba/F3 Zellen zu einer Induktion von *bcl-2*, allerdings mit 6h nach Stimulation langsamer als der IL-3 Rezeptor. Und sogar die C-terminal verkürzte HER-mrk Mutante HmΔ1006 ist dazu in der Lage, was die Frage nach den beteiligten Signalketten aufwirft.

Denkbar wäre eine Induktion von *bcl-2* über den Transkriptionsfaktor STAT5, da der *bcl-2* Promotor wie das *bcl-X* Gen für diesen Transkriptionsfaktor eine Bindungssequenz enthält. Im Ba/F3 Zellsystem sind die Daten dazu unterschiedlich: Lord et al (2000) beschreiben zwar eine Induktion von *bcl-X*, *bcl-2* und *c-myc* bei STAT5 Überexpression, allerdings weisen die meisten Daten darauf hin, daß dieser Weg in Ba/F3 Zellen nicht entscheidend ist. Konstitutiv aktives STAT5 führte bei Nosaka et al (1999) nicht zu einer stärkeren Bcl-2 Expression und dominant negatives STAT5 konnte eine *bcl-2* Induktion bei Stimulation des IL-3 Rezeptors nicht verhindern (Dumon et al, 1999).

Ein weiterer diskutierter Signalweg ist die Induktion von *bcl-2* über Ras. So zeigten GM-CSFR-β_c-Mutanten, die keine MAPK aktivieren können, in 32D Zellen keine Bcl-2 Expression, während aktiviertes Ras die *bcl-2* Transkription induzierte (Kinoshita et al, 1995a). Da allerdings auch die HER-mrk Mutante HmΔ1006 *bcl-2* induziert, aber nicht den Shc/MAPK-Weg aktiviert, muß die *bcl-2* Induktion bei der mrk Kinase über einen anderen Signalweg ablaufen. Möglich wäre eine Beteiligung des PI3K-Weges, da dieser auch von HmΔ1006 aktiviert wird. Ahmed et al (1997) haben anhand des IL-2Rβ in Ba/F3 Zellen gezeigt, daß dieser über eine Aktivierung der PI3K und Akt zu einer *bcl-2* Induktion führt. Allerdings führt eine durch den EGF-R induzierte Aktivierung der PI3K und von Akt in Ba/F3 Zellen nicht zu einer *bcl-2* Induktion (Miyazaki et al, 1995; Shi et al, 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre aber auch ein zur *bcl-2* Transkription führender Signalweg, der direkt über die mrk-Kinase Domäne mit JH2-ähnlicher

Diskussion

Struktur aktiviert wird, da auch konstitutiv aktives Jak2 in Ba/F3 Zellen zu einer Bcl-2 Expression führt (Sakai et al, 1997).

Der Einsatz der Inhibitoren Rapamycin und Wortmannin könnte weiterhelfen, den tatsächlich durch die mrk Kinase genutzten Signalweg einzugrenzen. Rapamycin führt in Ba/F3 Zellen neben einer Inhibition der p70S6K zu einer Inhibition der *bcl-2* Transkription (Miyazaki et al, 1995). Wortmannin hingegen könnte eine Beteiligung der PI3K an der *bcl-2* Induktion aufzeigen. Interessanterweise führen beide Inhibitoren in Ba/F3 Zellen zwar zu einer Hemmung in der Zellproliferation, aber nur Wortmannin auch zu einer Apoptose der Zellen (Wang et al, 1999). Somit spielt Bcl-2 im Ba/F3 Zellsystem möglicherweise eine untergeordnete Rolle. Wie bei Bcl-X_L führt eine Überexpression von Bcl-2 zwar zu einer Verzögerung der Apoptose, nicht aber zu einem Langzeitüberleben der Zellen (Miyazaki et al, 1995; Mathieu et al, 2001). In durch virale Insertionsmutagenese erzeugten Ba/F3-Klonen hingegen, die keine Proliferation, aber Langzeitüberleben zeigten, hat man stets eine Überexpression von Bcl-X_L, nicht aber von Bcl-2 gefunden (Leverrier et al, 1999). Auch können im Gegensatz zu Bcl-X_L von Bcl-2 nur geringe mRNA und Proteinnengen in Ba/F3 Zellen nachgewiesen werden (Kinoshita et al, 1995a). Diese geringe Expression von Bcl-2 erschwerte die Untersuchung eines weiteren Aspektes der Bcl-2 Aktivierung. So hängt die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 neben dessen Expressionsstärke auch mit dessen Serinphosphorylierung zusammen (May et al, 1994). Der Nachweis dieser Aktivierung von Bcl-2 war anhand von Bcl-2 Immunpräzipitation und der Anwendung Phosphoserinspezifischer Antikörper in der Western Blot Analyse nicht möglich. Für die Untersuchung dieses Aspektes scheint eine Bcl-2 Überexpression in Ba/F3 Zellen nötig, wie sie May et al (1994) zum Nachweis der Phosphorylierung genutzt haben.

Neben der Induktion von *bcl-2* gibt es durch Untersuchungen auf Proteinebene erste Hinweise, daß die mrk-Kinase auch eine Mcl-1 Expression induziert. In verschiedenen Zellen sind vielfältige Signalwege über die PI3K, die MAPK (Huang et al, 2000) oder Jak/STAT (Puthier et al, 1999) beschrieben, die zu einer *mcl-1* Transkription führen. Im Ba/F3 Zellsystem diskutiert man die Beteiligung eines PI3K abhängigen Signalwege über eine Aktivierung von Akt und folgender CREB-Bindung an den CRE-Promotor von *mcl-1* und eines PI3K unabhängigen Signalweges über eine SIE Promotorsequenz des Gens (Wang et al, 1999). Diese Wege könnten auch bei Xmrk zu einer *mcl-1* Induktion führen, was man durch den Einsatz geeigneter Inhibitoren wie z.B. Wortmannin herausfinden könnte. Während Wortmannin zu einem Einleiten der Apoptose in Ba/F3 Zellen führt, die etwa dem Verhalten unter IL-3 Entzug entspricht,

Diskussion

und zu einer Hemmung der *mcl-1* Transkription, kann konstitutiv aktive Akt Kinase oder eine Überexpression von Mcl-1 den Zellen kein Langzeitüberleben vermitteln (Wang et al, 1999). Der PI3K-Weg scheint somit notwendig, aber nicht ausreichend für die Antiapoptose und ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege ist deshalb wahrscheinlich.

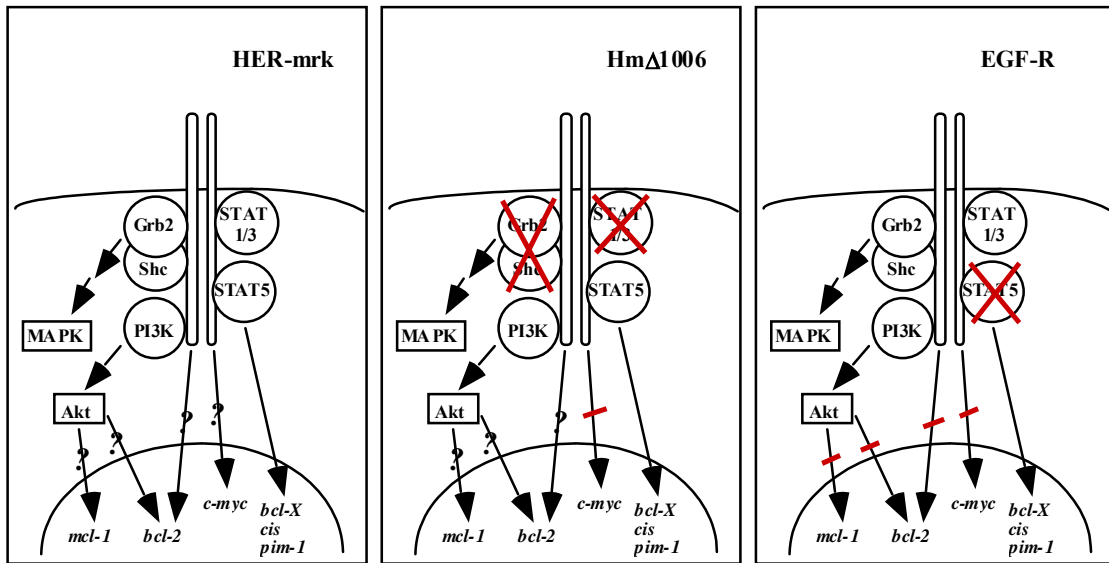
5.1.3. Antiapoptotische und mitogene Signalwege der mrk-Kinase

Um Aufschluß über die für Proliferation und Aufrechterhaltung der Antiapoptose durch die mrk Kinase wichtigen Signalwege zu bekommen, wurden diese anhand der in Ba/F3 Zellen exprimierten Rezeptoren EGF-R, HER-mrk und der Mutanten Hm Δ 1006 und Hm Δ 1075 untersucht. Für die Differenzierung von mitogenen und antiapoptotischen Signalwegen in Ba/F3 Zellen war v.a. die Hm Δ 1006 Mutante von Interesse, die zwar eine intakte Kinasedomäne, aber keine substratbindenden Phosphotyrosine besitzt. Ba/F3 Zellen, die Hm Δ 1006 exprimieren, zeigen bei Rezeptorstimulation eine DNA-Synthese, die etwa 2/3 der von BaF Hm Zellen entspricht. Diese ist folglich bedeutend stärker als die von BaF HER Zellen. Allerdings führt auch die DNA-Synthese in BaF Hm Δ 1006 Zellen nicht zur Zellvermehrung und die Zellen werden wie EGF-R exprimierende Ba/F3 Zellen apoptotisch. Die nächst längere Rezeptormutante Hm Δ 1075 besitzt zwei substratbindende Phosphotyrosine und zeigt in Proliferation und Langzeitüberleben ein Bild wie der komplette HER-mrk Rezeptor. Zwei substratbindende Phosphotyrosine und die durch diese induzierten Signalwege sind folglich für eine erfolgreiche mitogene und antiapoptotische Signaltransduktion ausreichend.

In Abbildung 29a sind die nun bekannten Signalwege von HER-mrk, der Rezeptormutante Hm Δ 1006 und des EGF-Rezeptors dargestellt, die für alle drei Rezeptoren untersucht wurden. Während die Stimulation von HER-mrk die Antiapoptose der Ba/F3 Zellen gewährleistet, reichen die durch Hm Δ 1006 und den EGF-R induzierten Signalwege dafür nicht aus. Interessanterweise induzieren Hm Δ 1006 und der EGF-R aber unterschiedliche Signalwege, die zwar zu DNA-Synthese, in der jeweiligen Kombination aber nicht zu Langzeitüberleben führen.

Diskussion

a



b

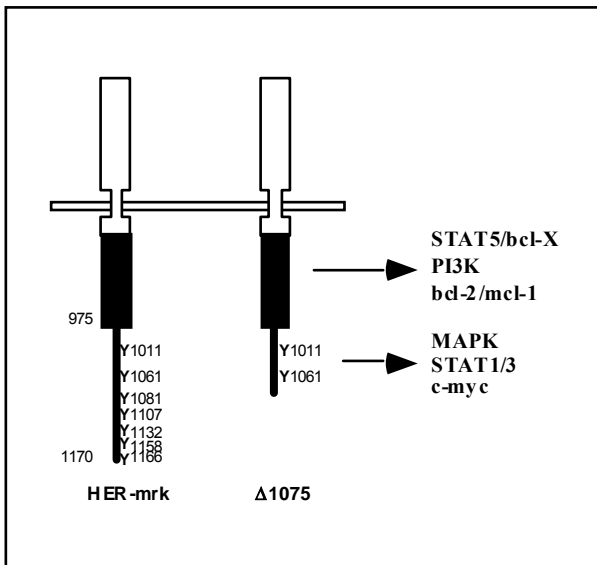


Abb.29:

(a) Signaltransduktionsmodell für die Rezeptoren HER-mrk, der C-terminal verkürzte Rezeptormutante HmΔ1006 und den EGF-R in Ba/F3 Zellen.

Während HER-mrk alle dargestellten Signalwege induziert, aktiviert HmΔ1006 STAT1 und 3 und die MAPK nicht und induziert keine *c-myc* Expression. Der EGF-R hingegen führt zu keiner STAT5 Aktivierung und kann neben den STAT5 Zielgenen auch die Gene *mcl-1*, *bcl-2* und *c-myc* nicht induzieren.

(b) Zuordnung der durch die mrk Kinase induzierten Signalwege zum Rezeptor. HmΔ1075 kann in Ba/F3 Zellen alle für Proliferation und Überleben wichtigen Signalwege einleiten. Während die Aktivierung des MAPK-Weges und von STAT1 und 3 sowie die Induktion von *c-myc* des C-terminalen Endes von mrk bedürfen, können STAT5 und die PI3K sowie die Genexpression von *bcl-2* und *mcl-1* durch die Kinasedomäne direkt aktiviert werden.

Die Rolle von *c-myc*

Vergleicht man die verschiedenen Signalwege, die durch HmΔ1006 und den EGF-R aktiviert werden, so fällt auf, daß *c-myc* von beiden im Gegensatz zu HER-mrk nicht induziert wird (Shibuya et al, 1992; Morcinek et al, 2002) und man könnte folglich

Diskussion

schließen, daß c-Myc in der Antiapoptose eine wichtige Rolle spielt. Für c-Myc ist im Ba/F3 Zellsystem gezeigt worden, daß eine Überexpression nicht zum Langzeitüberleben der Zellen führt (Miyazaki et al, 1995), c-Myc Überexpression plus Stimulation des EGF-Rezeptors hingegen schon (Shibuya et al, 1992). Ebenso zeigte Stimulation einer Deletionsmutante des Thrombopoetin Rezeptors (c-mpl) in Ba/F3 Zellen, daß eine Induktion des MAPK-Weges, der PI3K und von *c-fos* und *c-myc* Langzeitüberleben vermitteln kann. Eine Inhibition der PI3K mit Wortmannin hingegen führte in die Apoptose (Dorsch et al, 1997). Darüberhinaus konnte eine IL-2R β -Mutante, die *bcl-2*, *c-myc* und den MAPK-Weg induziert, ebenfalls keine Antiapoptose vermitteln (Zamorano et al, 1998). Um diese zu gewährleisten, ist folglich neben einer MAPK-Aktivierung eine Aktivierung des PI3K-Weges und eine Induktion von *c-myc* nötig. Allerdings ist c-Myc scheinbar durch andere antiapoptotische Signalwege ersetzbar, denn umgedreht konnte durch den Tyrosinkinaseinhibitor Genistein die IL-3 Rezeptor induzierte c-Myc Expression in Ba/F3 ohne Folgen auf das Zellüberleben inhibiert werden. Es zeigte sich aber eine Reduktion der DNA-Syntheseleistung der Zellen (Kinoshita et al, 1995a). C-Myc scheint folglich seine Rolle in der Induktion der Zellproliferation zu haben und es wird ihm eine Funktion bei der Zellzyklusprogression zugeschrieben (Shibuya et al, 1992). Eine fehlende c-Myc Expression durch Hm Δ 1006 und den EGF-R könnte somit die fehlende Zellvermehrung bei noch erhaltener DNA-Syntheseleistung erklären.

Die Rolle der PI3K

Der PI3K-Weg hingegen scheint für die Erhaltung der Antiapoptose eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde neben einer Bcl-X_L Überexpression auch konstitutiv aktives Akt in durch virale Insertionsmutagenese hergestellten IL-3 unabhängigen Ba/F3 Zellklonen gefunden (Mathieu et al, 2001). Darüberhinaus führte Inhibition von IL-3 stimulierten Ba/F3 Zellen mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin oder Ly294002 zur Apoptose der Zellen (Wang et al, 1999; von Gise et al, 2001; Rosa Santos et al, 2000). Die Daten über Experimente mit Expression dominant negativer Proteine in Ba/F3 Zellen sind hingegen widersprüchlich. Dominant negatives Akt führte bei von Gise et al (2001) in Ba/F3 Zellen zur Apoptose, während dominant negative PI3K bei Craddock et al (1999) keinen Effekt zeigte. Eine in Ba/F3 Zellen exprimierte Rezeptorchimäre aus EGF-R extrazellulär und der Leukozytentyrosinkinase (LTK) intrazellulär, die bei Stimulation zum Langzeitüberleben der Zellen führt, läßt diese bei Mutation der für die PI3K-Aktivierung nötigen Phosphotyrosinbindungstelle hingegen apoptotisch werden (Ueno et al, 1997). Ein für die Antiapoptose wichtiger Weg der PI3K-Aktivierung scheint die Phosphorylierung des apoptotischen Proteins Bad durch Akt zu sein, das dadurch von

Diskussion

14-3-3 Protein gebunden wird und deshalb nicht mehr mit Bcl-X oder Bcl-2 dimerisieren und dieses so inhibieren kann (Datta et al, 1999). Der Nachweis dieser Bad-Phosphorylierung gestaltet sich jedoch als schwierig und konnte in Ba/F3 Zellen im Rahmen dieser Arbeit und auch durch andere Gruppen (Kuribara et al, 1999; Mathieu et al, 2001) trotz nachgewiesener Akt-Phosphorylierung nicht detektiert werden. Eine Aktivierung des PI3K-Weges alleine gewährleistet allerdings nicht die Antiapoptose der Zellen, da der EGF-R und Hm Δ 1006 in Ba/F3 Zellen kein Langzeitüberleben vermitteln.

Die Rolle von STAT5

Die Bedeutung von STAT5 für das Zellüberleben konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden. So führt eine dominant negative STAT5 Mutante in Ba/F3 Zellen zu einer Hemmung der Zellproliferation und einem Ansteigen apoptotischer Zellen (Mui et al, 1996; Dumon et al, 1999). In Bcr-Abl transformierten Ba/F3 Zellen schützt eine hohe konstitutive STAT5-Aktivität die Zellen vor Etoposid- oder durch Serumentzug induzierter Apoptose (Ahmed et al, 1998). Andere Autoren haben gezeigt, daß eine konstitutiv aktive STAT5-Mutante in Ba/F3 Zellen zu IL-3 Unabhängigkeit führt (Onishi et al, 1998; Nosaka et al, 1999). Warum die STAT5-Aktivierung in BaF Hm Δ 1006 Zellen im Gegensatz dazu nicht für eine Antiapoptose ausreicht, kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise ist dies auf eine stärkere STAT5 Aktivität der konstitutiv aktiven STAT5-Mutante verglichen mit der nach Stimulation von Hm Δ 1006 zurückzuführen oder aber es handelt sich um eine sogenannte gain-of-function Mutation, die zusätzliche Signalwege induziert. So führte die konstitutiv aktive STAT5-Mutante bei Nosaka et al (1999) in Ba/F3 Zellen neben einer Induktion von *bcl-X* und *pim-1* auch zu einer Induktion von *c-myc*. Die HER-mrk Rezeptormutante Hm Δ 1006 ist dazu nicht in der Lage (Morcinek et al, 2002). Auch bei leukämieassoziierten TEL-JAK Fusionsproteinen, die Ba/F3 Zellen autonomes Wachstum verleihen, hat man neben konstitutiv aktivem STAT5 eine Induktion weiterer Signalwege wie *c-myc*, *c-fos* und *c-jun* gefunden (Lacronique et al, 2000). CD16/Jak2 Chimären führen in Ba/F3 Zellen nach Crosslinking über CD16 Antikörper darüberhinaus zur Aktivierung des Shc/MAPK-Weges (Sakai et al 95).

Aber auch STAT1 und 3 scheinen eine Rolle bei der Antiapoptose zu spielen. HER-mrk und der IL-3 Rezeptor vermitteln Langzeitüberleben und aktivieren die STAT-Proteine 1, 3 und 5. Der EGF-R und Hm Δ 1006 hingegen, die die Apoptose der Ba/F3 Zellen nicht verhindern können, aktivieren nur jeweils einen STAT-Weg, nämlich der EGF-R STAT1 und 3 und Hm Δ 1006 STAT5. Folglich reicht die Aktivierung eines dieser Signalwege für ein Zellüberleben nicht aus. Demoulin et al (1999) konnten mit IL-9

Diskussion

Rezeptormutanten in Ba/F3 Zellen zeigen, daß Mutanten, die entweder STAT5 oder STAT1/3 nicht aktivieren können, dennoch zum Langzeitüberleben von Ba/F3 Zellen führen, während Mutanten, die weder STAT1/3 noch STAT5 aktivieren, die Apoptose nicht verhindern können (Demoulin et al, 1999). Folglich muß zumindest einer der beiden STAT-Wege für ein Langzeitüberleben aktiviert werden, was die entscheidende Rolle der STAT-Proteine in der antiapoptotischen Signaltransduktion zeigt. Allerdings müssen darüber hinaus noch andere Signalwege aktiviert werden, um das antiapoptotische Signaling zu vervollständigen. Die HER-mrk Rezeptormutante Hm Δ 1006 und auch der EGF-R aktivieren neben STAT-Proteinen auch die PI3K, deren wichtige Rolle für die Antiapoptose bereits diskutiert wurde. Beide Wege zusammen reichen jedoch noch nicht für ein Langzeitüberleben der Zellen aus. Es muß folglich noch ein dritter Signalweg angeschaltet werden.

Die Rolle der MAPK

Da die HER-mrk Rezeptormutante Hm Δ 1006 nicht in der Lage ist, den MAPK-Weg zu aktivieren stellte sich die Frage, ob eine Aktivierung des MAPK-Weges die antiapoptotische Signaltransduktion komplettieren würde. Für den MAPK-Weg wird neben der Induktion mitogener Signale ebenfalls eine antiapoptotische Funktion diskutiert (Jarpe et al, 1998). So konnten Ba/F3 Zellen, die eine IL-3 Rezeptormutante exprimieren, die keine MAPK aktivieren und den Zellen kein Langzeitüberleben vermitteln kann, durch aktiviertes Ras gerettet werden (Kinoshita et al, 1995a). Darüberhinaus führt eine in Ba/F3 Zellen exprimierte dominant negative MEK-Mutante zum Absterben der Zellen unter IL-3 Stimulation, während eine konstitutiv aktive MEK die Apoptose bei IL-3 Entzug verzögert, aber nicht aufhalten kann (von Gise et al, 2001). Diese über ein Retrovirus eingebrachte konstitutiv aktive MEK wurde in BaF Hm Δ 1006 exprimiert (BaF Hm Δ 1006 Δ Stu) und das Verhalten der Zellen bezüglich Langzeitüberleben beobachtet. Tatsächlich ergänzte die Aktivierung des MAPK-Weges die Signaltransduktion von Hm Δ 1006 so, daß die diesen Rezeptor exprimierenden Ba/F3 Zellen nun unter EGF-Stimulation proliferierten und überlebten (Morcinek et al, 2002). Es scheinen somit STAT5 und die MAPK in der antiapoptotischen und mitogenen Signaltransduktion zusammenzuwirken. Dazu gibt es auch vielfältige Hinweise in der Literatur: So führen IL-beta_c-Rezeptormutanten, die Ba/F3 Zellen faktorunabhängig machen, zu einer Aktivierung von STAT5 und der MAPK (Jenkins et al, 1998). Ebenso aktivieren CD16/Jak2 Chimären, die in Ba/F3 Zellen über eine konstitutiv aktive Jak-Kinase Langzeitüberleben vermitteln, STAT5 sowie die MAPK (Sakai et al, 1995). Stimulation einer transgen in Ba/F3 Zellen exprimierten Flt3-RTK führt zur Aktivierung der MAPK, nicht aber zur Aktivierung von STAT5, was eine

Diskussion

Verzögerung, aber keine Unterdrückung der Apoptose zur Folge hat. Eine häufig in AML-Blasten gefundene mutierte konstitutiv aktive Flt3-RTK hingegen, die Ba/F3 Zellen autonomes Wachstum verleiht, aktiviert beide Wege - die MAPK und STAT5 (Hayakawa et al, 2000).

Wie diese Interaktion von STAT5 und der MAPK aussieht, ist noch nicht genau untersucht worden. Diskutiert wird zum einen, daß die MAPK über eine Serinphosphorylierung von STAT5 dessen Transkriptionsaktivität reguliert (Beadling et al, 1996), zum anderen soll der MAPK-Weg auch die Transkription des STAT5-Zielgenes *bcl-X* induzieren (Kinoshita et al, 1995b; Leverrier et al, 1997). In BaF Hm Δ 1006 Zellen aber konnte durchaus eine dem HER-mrk Rezeptor ebenbürtige Transkription der STAT5-Zielgene *bcl-X*, *cis* und *pim-1* nachgewiesen werden, obwohl die Hm Δ 1006 Mutante nicht die MAPK aktiviert. Deshalb ist ein Zusammenwirken durch die Genexpression verschiedener antiapoptotisch wirkender Proteine wahrscheinlich.

Natürlich könnte in BaF Hm Δ 1006 Δ Stu Zellen auch eine Interaktion von Bcl-2 statt STAT5/Bcl-X_L mit der MAPK für die Antiapoptose verantwortlich sein. Dies könnte man durch Einsetzen des Inhibitors Rapamycin klären, der die Expression von Bcl-2 inhibiert. Allerdings fand Zamorano et al (1998), daß eine IL-2R β -Mutante, die kein STAT5, aber *bcl-2*, *c-myc* und die MAPK induziert bzw aktiviert, in Ba/F3 Zellen nicht die Apoptose verhindern kann. Somit reicht eine Aktivierung von Bcl-2 und der MAPK nicht für Antiapoptose aus. Ob hier jedoch auch eine Aktivierung der PI3K bestand, ist allerdings nicht untersucht worden.

In Zusammenschau verschiedener in Ba/F3 Zellen beschriebener Rezeptor-Signalweg-Varianten (siehe Übersicht Abb.30) kann folglich festgehalten werden, daß für die antiapoptotische Signaltransduktion in Ba/F3 Zellen eine Interaktion von mindestens drei Signalwegen notwendig ist. Dabei wurde bei allen in Ba/F3 Zellen exprimierten Rezeptortypen/-mutanten, die Langzeitüberleben vermitteln, eine Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Weges gefunden (oder nicht beide untersucht). Wird einer dieser beiden Signalwege nicht induziert oder inhibiert, werden die Zellen apoptotisch (Kinoshita et al, 1995a; Ueno et al, 1997; Okuda et al, 1999; Wang et al, 1999). Allerdings reicht die Aktivierung dieser beiden Signalwege nicht aus, um die Apoptose der Zellen zu verhindern, da der EGF-R in Ba/F3 Zellen zwar beide aktiviert, aber kein Langzeitüberleben vermitteln kann (Shibuya et al, 1992). Es ist folglich noch ein dritter Signalweg zur Vervollständigung der antiapoptotischen Signaltransduktion in Ba/F3 Zellen entscheidend. Neben einer Induktion von *c-myc* (Shibuya et al, 1992; Dorsch et

Diskussion

al, 1997) ist dies meist die Aktivierung des STAT5-Signalweges (Sakai et al, 1995; Jenkins et al, 1998; Hayakawa et al, 2000).

Langzeitüberleben

Rezeptor	CD16/Jak2	HmΔ1006ΔStu	EGF-R + c-Myc	Thrombopoetin-R Mutante (mpl)
Signalwege	STAT5 MAPK PI3K kein c-myc	STAT5 MAPK PI3K kein c-myc	STAT1/3, nicht 5 MAPK PI3K c-myc	keine STATs MAPK PI3K c-myc
Zitat	Sakai et al (1995) Dijkers et al (1999)	Morcinek et al (2002)	Shibuya et al (1992)	Dorsch et al (1997)

Apoptose

Rezeptor	IL-4 R	HmΔ1006	EGF-R
Signalwege	STAT5 keine MAPK PI3K c-myc	STAT5 keine MAPK PI3K kein c-myc	STAT1/3, nicht 5 MAPK PI3K kein c-myc
Zitat	Leverrier et al (1997) Lischke et al (1998) Hinton et al (1999)	Morcinek et al (2002)	Shibuya et al (1992) Morcinek et al (2002)

Abb.30: Vergleich verschiedener in Ba/F3 Zellen exprimierter Rezeptoren bezüglich ihrer Signaltransduktion und deren Effekt: Langzeitüberleben oder Apoptose

Die (im Text) diskutierten Signalwege, die für Antiapoptose zwingend notwendig sind, wurden fett gedruckt. Dies sind immer die Aktivierung der PI3K und der MAPK und eines dritten Signalweges. Nach Analyse der bisher veröffentlichten Daten scheint entweder c-myc oder STAT5 zur Vervollständigung des antiapoptotischen Signals nötig. Untersuchte Signalwege, die nicht aktiviert werden sind durch „kein“ in der Tabelle gekennzeichnet.

5.2. Signaltransduktion in Pigmentzellen

HER-mrk führt auch bei Expression in murinen Melanozyten zur Aktivierung des STAT5/Bcl-X_L Signalweges

Da in der Fischmelanomzelllinie PSM eine starke konstitutive Aktivität von STAT5 gefunden wurde (Wellbrock et al, 1998b; Baudler et al, 1999), die mit der Expression von Xmrk und der Malignität der Melanome korreliert (Wellbrock et al, 1998b), stellte sich die Frage, ob die mrk Kinase auch in Pigmentzellen zur STAT5 Aktivierung führt. Expression und Stimulation des HER-mrk Rezeptors mit EGF in melan-a Hm Zellen führt zum neoplastischen Phänotyp der Melanozyten mit verstärkter Proliferation, Verlust der Kontakthemmung und Dedifferenzierung, was sich u.a. durch den Verlust der Pigmentierung der Zellen zeigt (Wellbrock et al, 2002). Unter TPA/Choleratoxin kultivierte wildtypische melan-a Zellen hingegen zeigen einen differenzierten Phänotyp mit Melaninproduktion. Untersuchung des STAT5/Bcl-X_L Signalweges ergab, daß in melan-a Hm Zellen Stimulation von HER-mrk neben der Aktivierung von STAT5 (C. Wellbrock, persönliche Mitteilung) zu einer starken Induktion der *bcl-X_L* Transkription nach 4h führt. In mit TPA/Choleratoxin behandelten wildtypischen melan-a Zellen wird Bcl-X_L hingegen kaum exprimiert. Auch Arita et al (2000) konnten zeigen, dass TPA in Melanozyten zwar *bcl-2*, nicht aber *bcl-X* induziert. Eine Expression von Bcl-X_L könnte somit eine entscheidende Rolle in den frühen Teilschritten des Transformationsprozesses von Pigmentzellen spielen.

STAT5 ist in humanen Melanomzelllinien konstitutiv aktiv

Basierend auf den Ergebnissen in murinen Melanozyten und der Fischmelanomzelllinie PSM war es naheliegend, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 in humanen Melanomen zu untersuchen, v.a. da bekannt ist, dass im Melanom neben Bcl-2 auch Bcl-X_L sehr häufig überexprimiert wird (Leiter et al, 2000).

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Melanomzelllinien Bro, D10, Sk-Mel28 und A375 wurde durchweg eine konstitutive Aktivität von STAT5 gefunden, während STAT1 und 3 in den verschiedenen Zelllinien ein heterogenes Aktivitätsmuster zeigen und insgesamt nur gering aktiviert werden. So liegt STAT1 in A375 und Sk-Mel28 Zellen z.T. aktiviert vor, nicht aber in Bro und D10. Während A375 Zellen und Sk-Mel28 IFN-sensibel sind, ist von D10 Zellen deren IFN-Resistenz bekannt (Pansky et al, 2000). Da STAT1 eine wichtige Rolle als Signalübertragungsmolekül der IFN-

Diskussion

Rezeptoren zukommt, könnte die Aktivität von STAT1 ein Hinweis auf das Funktionieren dieses Signalweges und somit auch der IFN-Sensibilität von Melanomen sein. STAT3 hingegen liegt in A375 und D10 Zellen, nicht aber in Sk-Mel28 und Bro aktiviert vor. Für A375 Zellen wurde somit neben der Aktivierung von STAT5 auch eine DNA-Bindung von STAT1 und 3 – wenn auch schwächer – nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Kortylewski et al (1999), die mittels EMSA (Electromobility shift assay) keine basale Aktivität von STAT1 und 3 in A375 Zellen gefunden haben. Allerdings könnte die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Aktivierung von STAT1 und 3 in den verschiedenen Zelllinien möglicherweise auf der hohen Sensitivität der Purifikationsmethode mit Matrix-gebundenen spezifischen Oligonukleotiden beruhen. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte keine nukleäre Lokalisation von STAT1 in den humanen Melanomzelllinien gezeigt werden. Für STAT5 hingegen bestätigten sich dessen Aktivierung in den meisten getesteten Melanomzelllinien durch die Lokalisation von STAT5 im Zellkern. Dabei war die Verteilung zwischen nukleärem und zytoplasmatischen STAT5 in den verschiedenen Zelllinien allerdings unterschiedlich. So war STAT5 in Bro und A375 Zellen fast nur im Zellkern detektierbar, während in D10 und Sk-Mel28 Zellen auch eine zytoplasmatische Färbung nachweisbar war (Wellbrock, nicht veröffentlicht).

Bisher wurden für humane Melanome v.a. Daten bezüglich der Proteine STAT1 und 3 erhoben, die aufgrund ihres inhibierenden Einflusses auf das Melanomwachstum das Interesse auf sich gezogen haben (Kortylewski et al, 1999; Lazar-Molnar et al, 2000). Zum einen wird ein wachstumsinhibierender Effekt durch Interferon (IFN) und seinen Rezeptor beschrieben, indem über eine Rekrutierung von Jak1 und Tyk2 die STAT-Proteine STAT1 und 2 phosphoryliert und damit aktiviert werden. Nach Bindung an p48 bilden diese den Transkriptionsfaktor ISGF3, translozieren in den Zellkern und führen dort zur Transkription von Genen mit einer ISRE (IFN-stimulated response element) Bindungsstelle im Promotor (Boehm et al, 1997). In Melanomen fortgeschrittenen Stadiums wurden Mutationen gefunden, die zu einem defizienten IFN/STAT Signalweg führen und so zu einer IFN-Resistenz. Dabei scheint v.a. eine reduzierte STAT1 Expression von entscheidender Bedeutung (Wong et al, 1997; Pansky et al, 2000). IFN-Resistenz aufgrund einer STAT1 Defizienz wurde aber auch in anderen Tumoren, wie kutanen T-Zellymphomen (Sun et al, 1998) und dem Mammakarzinom (Kolla et al, 1996) beschrieben. Zum anderen wird auch STAT3 im Melanom eine wachstumsinhibierende Funktion zugeschrieben. Stimulation der gp130 Rezeptorkette durch Zytokine vom Typ des IL-6 (z.B. IL-6, OSM) führt über die Jak-Kinasen Jak1,2 und Tyk2 zur Aktivierung von STAT1 und 3 (Stahl et al, 1995; Gerhartz et al, 1996), wobei in A375 Zellen gezeigt wurde, daß STAT3 einen stärkeren

Diskussion

antiproliferativen Effekt hat als STAT1. Dabei führt STAT3 zu einer Induktion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27/Kip1 und damit zu einem Zellzyklusstop in der G1-Phase (Fontaine et al, 1998; Kortylewski et al, 1999). P27/Kip1 und auch ein weiterer Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor p21/WAF1 sind in IL-6 resistenten Melanomzelllinien häufig nicht oder nur gering exprimiert und könnten so durch fehlende Hemmung die Proliferation fördern (Kortylewski et al, 1999; Florenes et al, 1999).

In Ba/F3 Zellen konnte gezeigt werden, daß die Expression von dominant negativem STAT1 die wachstumsinhibierende Wirkung des IFNs sogar umkehrt, d.h. daß IFN die Proliferation der Zellen dann sogar fördert und den physiologischen Ba/F3-Wachstumsfaktor IL-3 ersetzen kann (Asao und Fu, 2000). Somit wird ein zunächst hemmendes Medikament durch eine erworbene STAT1 Defizienz zu einem Wachstumsfaktor, was im Hinblick auf das breite Spektrum der IFN-Therapie bei Malignomen wie auch dem Malignen Melanom alarmierend ist. Tatsächlich aber könnte gerade das in Ba/F3 Zellen ebenfalls durch IFN aktivierte STAT5 (Jaster et al, 1999) für die Proliferation dieser Zellen bei IFN-Stimulation eine wichtige Rolle spielen.

Die Bedeutung von STAT5 für Proliferation und Antiapoptose von Melanomzellen hat sich in Experimenten gezeigt, bei denen A375 Zellen mit dominant negativem STAT5 transient transfiziert wurden, bei dem der C-terminale Anteil von STAT5 durch GFP (grün fluoreszierendes Protein) ersetzt ist. Dies führte nach 1-2 Tagen im Gegensatz zur Kontrolltransfektion mit reinem GFP zu einer Inhibition der Zellproliferation um etwa 80% und einem dramatischen Ansteigen an apoptotischen Melanomzellen. Nach 4 Tagen war keine STAT5-GFP exprimierende Zelle mehr detektierbar, wohingegen reines GFP exprimierende Zellen unbeeinflusst waren (Wellbrock, nicht veröffentlicht). STAT5 scheint folglich im Gegensatz zu der wachstumsinhibierenden Funktion von STAT1 und 3 eine proliferationsfördernde Rolle in humanen Melanomzelllinien zu spielen und darüberhinaus auch eine herausragende Rolle für die Unterdrückung der Apoptose und somit die Aufrechterhaltung der Unsterblichkeit von humanen Melanomzellen zu haben.

Immunhistologische Färbungen gegen STAT5 an humanen Melanom-Schnittpräparaten zeigen, daß STAT5 regelmäßig auch in vivo nukleär lokalisiert und folglich aktiviert vorliegt und unterstreichen die Bedeutung von STAT5 für das humane maligne Melanom (Wellbrock et al, nicht veröffentlicht).

Diskussion

Expression der STAT5 Zielgene *bcl-X* und *pim-1* in humanen Melanomzelllinien

Nachdem für STAT5 in humanen Melanomzelllinien neben der nukleären Lokalisation auch eine spezifische konstitutive DNA-Bindung gezeigt werden konnte, wurden auch STAT5-Zielgene auf ihre Expression untersucht. Das *bcl-X* Gen stellt ein STAT5-Zielgen dar, das für ein antiapoptotisches Protein kodiert und von dem in murinen Melanozyten gezeigt wurde, dass seine Induktion mit der Aktivierung von STAT5 einhergeht. Überexpression von Bcl-X_L wird in bis zu 100% der bereits metastasierten humanen Melanome gefunden (Leiter et al, 2000) und u.a. für deren Strahlenresistenz verantwortlich gemacht, indem es dem über p53 aktivierten proapoptotischen Protein Bax entgegenwirkt (Chao und Korsmeyer, 1998; Dahm-Daphi, 2000). Auch die humanen Melanomzelllinien Bro, D10, Sk-Mel28 und A375 zeigten passend zur konstitutiven Aktivität von STAT5 durchweg eine Expression von Bcl-X_L. In den mit dominant negativem STAT5 (STAT5-GFP) transfizierten A375 Zellen konnte nach Isolierung der GFP-positiven Zellen eine deutlich reduzierte Bcl-X_L Expression in diesen Zellen nachgewiesen werden (Wellbrock, nicht veröffentlicht). Dies deutet darauf hin, daß die Bcl-X_L Expression in Melanomzellen STAT5 abhängig ist und daß Bcl-X_L eine bedeutende Rolle in der antiapoptotischen Signaltransduktion von Melanomzellen spielt. In Übereinstimmung dazu stehen Untersuchungen mit *bcl-X* antisense Oligonukleotiden in humanen Melanomzelllinien wie z.B. den A375 Zellen, die die Bcl-X_L Expression reduzieren und dadurch die Apoptosebereitschaft und Chemosensibilität der Melanomzellen erhöhen (Heere-Ress et al, 2002; Olie et al, 2002). Darüberhinaus zeigte sich, daß Melanomzelllinien, die gegenüber CD95-induzierter Apoptose resistent sind, sich durch besonders hohe Bcl-X_L und Bcl-2 Proteinlevel auszeichnen (Ugurel et al, 1999). Bcl-X_L scheint folglich eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Antiapoptose von Melanomzellen zu spielen, während es von Bcl-2 auch Untersuchungen gibt, die eine verminderte Expression in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten feststellten (Tang et al, 1998; Selzer et al, 1998).

Pim-1 hingegen, ein weiteres STAT5-Zielgen mit mitogenen sowie antiapoptotischen Eigenschaften (Lilly und Kraft, 1997), das auch im Fischmelanom exprimiert wird (Wellbrock et al, 1998b), zeigte ein heterogenes Expressionsmuster in den verschiedenen humanen Melanomzelllinien. Es wird in A375 und D10 Zellen exprimiert, in Sk-Mel28 nur schwach und in Bro gar nicht, korreliert folglich auffallend mit der Aktivierung von STAT3. Für STAT3 ist eine Induktion der Pim-1 Expression in Ba/F3 Zellen bei der Signaltransduktion des IL-6 Rezeptors beschrieben (Shirogane et

Diskussion

al, 1999), der auch von Melanomzellen exprimiert wird. Ob STAT3 bei der Induktion von *pim-1* in Melanomen eine Rolle spielt, ist allerdings bisher nicht untersucht worden. Allerdings wird Pim-1 in Bro Zellen, die aus einem sehr aggressiven Primärmelanom stammen (Lockshin et al, 1985) nicht exprimiert und scheint folglich an der Malignität der Melanome nicht entscheidend mitzuwirken. Und auch in den mit HER-mrk transfizierten murinen Melanozyten ließ sich mit der Northern Blot Analyse keine *pim-1* Expression nachweisen (ohne Abb.), was möglicherweise eine untergeordnete Rolle von Pim-1 im Pigmentzellsystem von Maus und Mensch bedeutet.

Mcl-1 wird in den murinen Melanozyten melan-a und den humanen Melanomzelllinien Bro, D10, Sk-Mel28 und A375 nicht exprimiert

Weder TPA/Choleratoxin stimulierte wildtypische noch EGF stimulierte HER-mrk exprimierende murine Melanozyten zeigten eine Mcl-1 Expression. Ebenso fand sich auch keine Mcl-1 Expression in den vier untersuchten humanen Melanomzelllinien (ohne Abb.). Mcl-1 scheint folglich im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen in Pigmentzellen und dem Melanom eine untergeordnete Rolle zu spielen, was zu Daten von Selzer et al (1998) paßt, die eine verringerte Mcl-1 Expression in Melanomzellen gefunden haben.

Verschiedene humane Melanomzelllinien zeigen eine unterschiedlich starke MAPK-Kinase Aktivität

Von Untersuchungen im Ba/F3 Zellsystem und der Fischmelanomzelllinie PSM ist bekannt, daß die mrk Kinase zu einer starken Aktivierung des MAPK-Weges führt und auch im Xiphophorus Melanom findet sich eine starke konstitutive MAPK-Aktivität (Wellbrock und Schartl, 1999). In den humanen Melanomzelllinien Bro, D10, Sk-Mel28 und A375 hingegen konnte eine sehr unterschiedliche MAPK-Aktivität nachgewiesen werden. Während Bro und Sk-Mel28 Zellen eine starke MAPK-Aktivität aufweisen, zeigen D10 und A375 Zellen eine minimale MAPK-Aktivität. Die Bro Zelllinie stammt aus einem hochaggressiven Primärmelanom (Lockshin et al, 1985) und Sk-Mel28 wurden aus einer Melanommetastase etabliert (Cornil et al, 1991). Die starke MAPK-Aktivität in diesen beiden Zelllinien könnte folglich mit deren Metastasierungsfähigkeit korrelieren.

Diskussion

Konstitutiv aktives Ras führt in murinen Melanozyten zur Zelltransformation, mit Tumorigenität bei Injektion in Mäuse (Dotto et al, 1989). In humanen Melanomen findet man allerdings nur in etwa 15% der untersuchten Fälle konstitutiv aktives Ras, dann aber besonders häufig in nodulären (NMM) und metastasierten Melanomen (Jafari et al, 1995; Borner et al, 1999; Satyamoorthy et al, 2003). Im Superfiziell Spreitenden Melanom (SSM) fanden Jafari et al (1995) in keinem Fall eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Weges, bei fortgeschrittenen metastasierten Melanomen scheint die MAPK jedoch immer aktiviert (Satyamoorthy et al, 2003). Tower et al (2002) konnten zeigen, daß ERK1/2 in Melanomzellen die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) induziert. Der Abbau von interstitiellem Kollagen durch diese Protease kann die Tumorinvasion und Metastasierung erleichtern. Tatsächlich führt eine MAPK-Inhibition mit U0126 oder PD98059 neben einer Wachstumshemmung zu einer Suppression der Zellinvasion von A375 Zellen (Ge et al, 2002).

Neben dieser Wirkung der MAPK wurde aber auch die Inhibition der Apoptose über eine Induktion der Bcl-2 Expression in humanen Melanomzelllinien gezeigt (Borner et al, 1999). Inhibierung der MAPK durch proteolytische Spaltung mit Anthraxtoxin führt zur Apoptose in humanen Melanomzellen (Koo et al, 2002). Auch Inhibierung mit dem MAPK-Inhibitor PD98059 sensibilisiert Melanomzellen für Apoptose (Mandic et al, 2001).

Eine konstitutive Aktivität der MAPK scheint somit nicht entscheidend für die Melanomentwicklung zu sein, sondern für die Tumorprogression, da die MAPK erst in späteren Tumorstadien aktiviert vorliegt (Jafari et al, 1995; Satyamoorthy et al, 2003).

6. Zusammenfassung

Überexpression der konstitutiv aktiven Rezeptortyrosinkinase Xmrk im Zahnkarpfen *Xiphophorus* führt zur Ausbildung maligner Melanome. Dabei korreliert die Malignität der Melanome mit der Stärke der Expression dieser Rezeptortyrosinkinase (Wittbrodt et al, 1989). Expressionsstudien in transgenen Medaka-Fischen haben gezeigt, daß Xmrk allerdings nur in bestimmten Geweben wie Hirn, Epithelien, Auge und Pigmentzellen zur Tumorbildung führt. Das Tumorspektrum ist dabei ligandenunabhängig (Winkler et al, 1994). Zellen, die durch Xmrk transformiert werden können, scheinen somit über entsprechende Komponenten der durch Xmrk induzierten intrazellulären Signaltransduktion verfügen zu müssen. Bisher wurde eine Reihe von Signalproteinen identifiziert, die von Xmrk rekrutiert und aktiviert werden. Dazu gehören die PLC- γ , die Adapterproteine Shc und Grb2, die PI3K, die Fyn-Kinase aus der Familie der Src-Kinasen und der Transkriptionsfaktor STAT5 (Wellbrock et al, 2002).

Um die Signaltransduktion von Xmrk in induzierbarer Form untersuchen zu können, wurde eine mit EGF stimulierbare Rezeptorchimäre HER-mrk, deren extrazellulärer Anteil vom humanen EGF-R und deren intrazellulärer Anteil von Xmrk stammt, in der IL-3 abhängigen murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 exprimiert. Ba/F3 Zellen stellen aufgrund ihrer Faktorabhängigkeit für Proliferation und Antiapoptose ein ideales Zellsystem zur Untersuchung der durch die mrk Kinase ausgelösten zellulären Antworten dar. EGF-Stimulation dieser als BaF Hm bezeichneten Zellen führt zu IL-3 unabhängigem Wachstum und zu Langzeitüberleben. Stimulation des aus der gleichen Genfamilie stammenden EGF-Rezeptors hingegen, wird er in Ba/F3 Zellen exprimiert, kann kein Langzeitüberleben vermitteln. Erste Untersuchungen zeigten, daß das durch HER-mrk vermittelte Langzeitüberleben in Ba/F3 Zellen nicht auf einer höheren Rezeptorexpression verglichen mit den EGF-R exprimierenden Zellen beruht. Allerdings korreliert die Rezeptordichte mit der DNA-Syntheseleistung der Ba/F3 Zellen.

Durch verschiedene carboxyterminal verkürzte HER-mrk Rezeptormutanten wurde eine unterschiedliche Anzahl von Substratbindungsstellen von Xmrk deletiert. Expression dieser HER-mrk Rezeptormutanten in Ba/F3 Zellen zeigte, daß für die Auslösung der Replikation der DNA keine C-terminale Substratbindungsstelle notwendig ist, während für eine Vollendung der Zellteilung mit Zellvermehrung und für Langzeitüberleben zwei membrannahe Substratbindungsstellen ausreichend sind. Der Vergleich der durch die verschiedenen Rezeptoren induzierten Signalwege bzw. der Substratinteraktionen

Zusammenfassung

von HER-mrk, seinen Mutanten und dem EGF-R gab Hinweise auf für die Antiapoptose entscheidende Signalwege.

Untersuchungen zur Aktivierung von STAT1, 3 und 5 zeigten, daß HER-mrk zu einer Aktivierung aller drei STAT-Proteine führt, während der EGF-R in Ba/F3 Zellen nur STAT1 und 3, nicht aber STAT5 aktivieren kann. Mit zunehmender HER-mrk Rezeptordichte nimmt die Stärke der STAT5 Aktivierung zu. Die HER-mrk Rezeptormutanten zeigten überraschenderweise, daß für die Aktivierung von STAT5 durch HER-mrk keine carboxyterminale Substratbindungsstelle notwendig ist, diese aber möglicherweise durch Stabilisierung der Rezeptorbindung seine Aktivierung verstärken. Für die Aktivierung von STAT1 und 3 hingegen sind carboxyterminale Substratbindungsstellen entscheidend.

Das für ein antiapoptotisches Protein kodierende STAT5-Zielgen *bcl-X* wurde als HER-mrk Zielgen identifiziert. Auch die schwächere STAT5 Aktivierung durch die trunkierte HER-mrk Rezeptormutante Hm Δ 1006 hatte eine *bcl-X* Transkription zur Folge, während der EGF-R *bcl-X* nicht induzierte.

Untersuchungen weiterer antiapoptotischer Signalwege zeigten, daß die mrk-Kinase sowie ihre Rezeptormutante Hm Δ 1006 im Gegensatz zum EGF-R auch zu einer Induktion von *bcl-2* führen. Da diese Mutante kein Langzeitüberleben vermittelt, ist somit die Induktion der Genexpression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-X_L und Bcl-2 nicht ausreichend für Antiapoptose. Folgeexperimente zeigten, daß die Rezeptormutante Hm Δ 1006 den MAPK-Weg nicht aktiviert. Ektopre Expression von konstitutiv aktiver MEK in BaF Hm Δ 1006 allerdings rettet die Zellen vor der Apoptose (Morcinek et al, 2002). Eine Aktivierung des MAPK-Weges ohne Induktion des STAT5/Bcl-X_L Signalweges – wie bei Stimulation des humanen EGF-Rs in Ba/F3 Zellen – ist aber auch nicht ausreichend für Antiapoptose. Es bedarf somit der Kombination mehrerer antiapoptotischer Signalwege, nämlich der Aktivierung der MAPK, der PI3K und entweder des STAT5/Bcl-X_L Weges oder eine Induktion von *c-myc*.

Expression der Rezeptorchimäre HER-mrk in murinen Melanozyten führt bei Stimulation der mrk-Kinase zur Transformation der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke Induktion von *bcl-X* nach HER-mrk Stimulation in den Melanozyten nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung humaner Melanomzelllinien, die in der Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen oft ein sehr unterschiedliches Muster zeigen, konnte eine konstitutive Aktivität von STAT5 in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, während STAT1 und 3 nur eine schwache und inhomogene Basalaktivität aufwiesen. Es zeigt sich folglich ein ähnliches Bild wie im Xiphophorus-Melanom, in dem ausschließlich STAT5 konstitutiv aktiv ist.

Zusammenfassung

Die untersuchten humanen Melanomzelllinien zeigten durchweg eine Expression von Bcl-X_L. Andere Signalwege wie z.B. die Aktivierung der MAPK hingegen zeigten ein heterogenes Muster bei den verschiedenen Zelllinien. Erste Experimente in A375 Zellen deuten darauf hin, daß die Expression von dominant negativem STAT5 zur Reduktion der *bcl-X* Transkription und zur Apoptose der Zellen führt (Wellbrock, unveröffentlicht). Der STAT5/Bcl-X_L Signalweg scheint folglich ganz entscheidend für die Antiapoptose von Melanomen zu sein.

Zukünftige Arbeiten sollten diese an humanen Melanomzelllinien erhaltenen Daten in histologischen Schnitten von humanen Melanomen verschiedener Stadien verifizieren und zeigen, ob eine Aktivierung von STAT5 auch dort nachgewiesen werden kann und möglicherweise prognostische Aussagekraft besitzt.

Summary

Overexpression of the constitutively active receptor tyrosine kinase Xmrk, a member of the EGF-R family, in the fish *Xiphophorus* leads to the formation of malignant melanoma. The degree of malignancy of these melanomas correlates with the expression level of Xmrk (Wittbrodt et al, 1989). Studies in transgenic Medaka fish showed that Xmrk only induced tumour formation in distinct tissues like brain, epithelia, eye and pigment cells. This tissue specificity was ligand independent (Winkler et al, 1994). This showed that cells, which can be transformed by Xmrk need to have the appropriate components of the Xmrk signal transduction pathways. Until now PLC- γ , the adaptor proteins Shc and Grb2, PI3K, the Src kinase Fyn and the transcription factor STAT5 (Wellbrock et al, 2002) have been identified as signalling proteins recruited and activated by Xmrk.

To further investigate the mrk kinase induced signal transduction the receptor chimera HER-mrk was expressed in the IL-3 dependent pro-B cell line Ba/F3. This receptor chimera consists of the extracellular part of the human EGF receptor and the intracellular part of Xmrk. EGF stimulation, therefore, leads to mrk specific signalling in Ba/F3 cells. Ba/F3 cells represent a sensitive system to measure mitogenic as well as anti-apoptotic signalling because of their factor dependence. In HER-mrk expressing Ba/F3 cells EGF can replace the physiological growth factor IL-3 for proliferation and long term survival. In contrast stimulation of the EGF receptor if expressed in Ba/F3 cells does not have this effect.

Zusammenfassung

The long term survival triggered by HER-mrk was not based on higher receptor densities of HER-mrk expressing Ba/F3 cells compared to EGF-R expressing ones. Even a strong EGF-R expression could not mediate long term survival whereas even a low HER-mrk receptor expression was sufficient. Within the HER-mrk expressing clones, however, the DNA synthesis of the Ba/F3 cells increased with higher receptor densities.

Expression of C-terminal truncated HER-mrk receptor mutants in Ba/F3 cells showed that for induction of DNA synthesis no C-terminal substrate binding site is needed and that to complete cell division and for long term survival the two membrane proximal binding sites are important. This made it possible to define the crucial pathways for antiapoptotic signalling.

Further analysis revealed that Her-mrk activates STAT1, 3 and 5 proteins, whereas the EGF-R could only activate STAT1 and 3, but not STAT5 in Ba/F3 cells. With increasing HER-mrk receptor densities activation of STAT5 increased. Strikingly, the HER-mrk receptor mutants showed that STAT5 activation by HER-mrk is not dependent on one of the known substrate binding sites but that C-terminal phosphotyrosines enhance the activation of STAT5, possibly by stabilizing the binding to the receptor. For the activation of STAT1 and 3, however, C-terminal substrate binding sites are needed.

With regard to antiapoptotic signalling pathways a possible induction of the STAT5 target gene *bcl-X* has been investigated. Indeed, HER-mrk leads in contrast to the EGF-R to an induction of *bcl-X* transcription. Even the weaker STAT5 activation by the HER-mrk receptor mutant Hm Δ 1006 is followed by *bcl-X_L* expression.

Investigation of other antiapoptotic signalling pathways showed that the mrk kinase also leads to an induction of *bcl-2* expression in contrast to the EGF-R. Strikingly this was also seen for the receptor mutant Hm Δ 1006, which is not able to mediate long term growth in Ba/F3 cells. Therefore induction of the expression of the antiapoptotic proteins *bcl-X_L* and *bcl-2* seems not to be sufficient for long term survival. Further experiments showed that Hm Δ 1006 is not able to activate the MAPK pathway. Ectopic expression of constitutively active MEK in BaF Hm Δ 1006, however, rescued the cells from apoptosis (Morcinek et al, 2002). Activation of the MAPK pathway without the induction of further antiapoptotic pathways like STAT5/*bcl-X_L* – as seen after EGF stimulation of EGF receptor expressing Ba/F3 cells – was not sufficient for an antiapoptotic effect. This suggests that a combination of both pathways is needed.

Expression of the receptor chimera HER-mrk in murine melanocytes induces transformation of the cells under treatment with EGF. With this study it could be shown that mrk stimulation in these melanocytes leads to a strong induction of *bcl-X* which

Zusammenfassung

seems to be based on the activation of STAT5. Investigation of different human melanoma cell lines which often show varying expression of different receptor tyrosine kinases revealed constitutive activation of STAT5 in all of the tested cell lines. STAT1 and 3 however were only weakly activated and showed different activation patterns in the melanoma cell lines. Therefore in human melanoma cell lines a similar picture as for the Xiphophorus melanoma was found.

While *bcl-X_L* could not be investigated in the fish melanoma due to lacking cross reactivity of the antibody, northern probes and RT-PCR primers, the human melanoma cell lines showed expression of *bcl-X_L*. Other pathways like the activation of MAPK, however, displayed a heterogenous activation pattern in the different cell lines. First experiments in A375 cells gave evidence that expression of dominant negative STAT5 is followed by reduction of *bcl-X* transcription and apoptosis of the cells (Wellbrock, unpublished). The STAT5/*bcl-X_L* pathway therefore seems to be crucial for antiapoptosis in melanomas.

Experiments in the future should show if this role of STAT5 can be verified in human melanoma sections as well and if STAT5 activation possibly correlates with the aggressiveness of the tumors as seen in the Xiphophorus melanoma.

7. Anhang

7.1. Rezeptordichtebestimmung (zu 4.1.2.1.)

7.1.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von mAB 108.1

Die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) eines Antikörpers entspricht derjenigen Konzentration, bei der die Hälfte der Rezeptoren Antikörper gebunden haben, d.h. die halbe Sättigung erreicht ist. Um sicher zu sein, daß bei der Rezeptordichtebestimmung möglichst alle Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit Erstantikörper abgesättigt werden können und um Auswirkungen von Pipettierungenauigkeiten möglichst gering zu halten, wurde der Antikörper in einer Konzentration von $2x K_D$ eingesetzt, ein Bereich, bei dem die Antikörperbindung fast in der Sättigung ist.

Die K_D -Wert-Bestimmung wurde mit BaF HER3-Zellen in einer Doppelbestimmung mit ansteigenden Konzentrationen von Erstantikörper, nämlich 1nM, 5nM, 10nM, 50nM, 100nM und 200nM durchgeführt (3.1.5.). Das Ergebnis zeigt Abb.31.

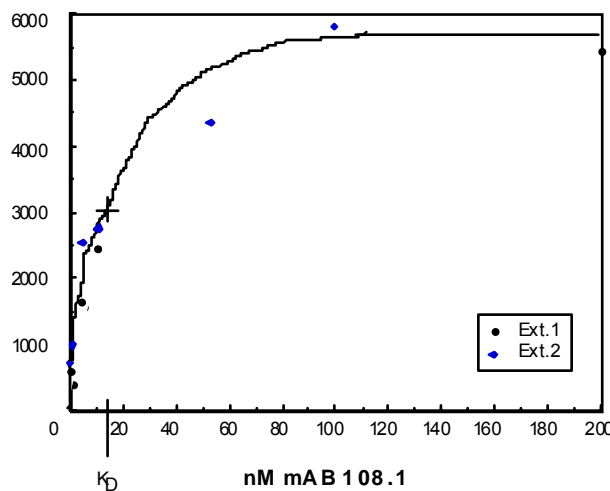


Abb.31: K_D -Wert-Bestimmung des mAB 108.1-Antikörpers an BaF HER3 Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen (Extinktion 1 und 2); K_D -Wert = 15nM

Der K_D -Wert von mAB 108.1 lag bei etwa 15nM, die Sättigung war bei etwa 80nM erreicht. In den Experimenten eingesetzt wurden 40nM, ein Wert zwischen $2x K_D$ und erreichter Sättigung.

Anhang

7.1.2. Einfluß der Zellzahl auf das Lichtsignal beim Zell-ELISA

Zunächst wurde versucht, ob man die Rezeptorzahl der verschiedenen Ba/F3 Zellklone genau bestimmen kann, wenn man das nach Antikörperdetektion der EGF-Rezeptoren in ELISA-Technik erhaltene Chemilumineszenzsignal von A431 Zellen, die etwa 2×10^6 EGF-Rezeptoren pro Zelle an ihrer Oberfläche exprimieren, mit dem von den Ba/F3 Zellen vergleicht. Dazu war es zunächst nötig, herauszufinden, ob die unterschiedliche Morphologie der Zellen und damit eine unterschiedliche Ausbreitung gleicher Zellzahlen im „Well“, einen Einfluß auf das Lichtsignal hat.

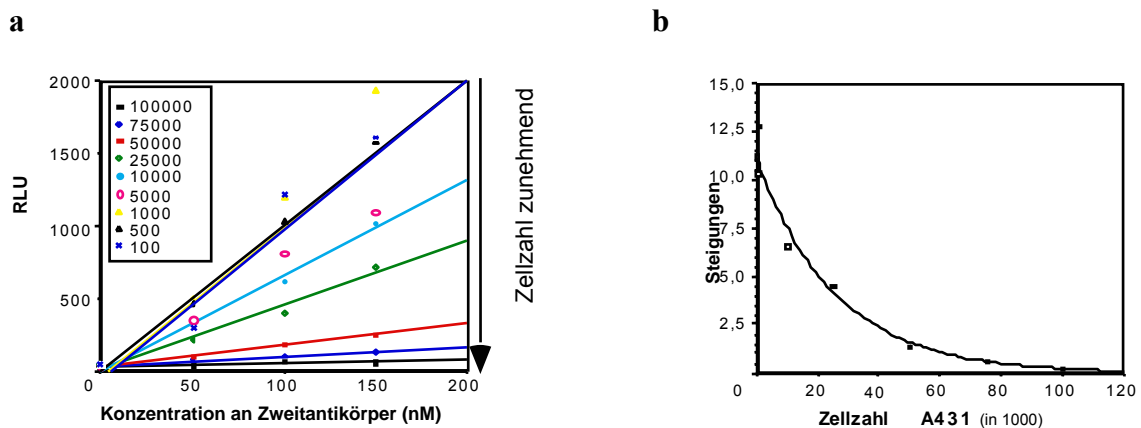


Abb.32: Einfluß der Zellzahl auf das Chemilumineszenzsignal (a) und Darstellung der Veränderung anhand der Steigungen der Geraden aus a (b). Mit zunehmender Zellzahl sank das Lichtsignal bei gleicher Menge Zweitantikörper in nicht linearer Weise.

In Vorversuchen wurden unterschiedlich viele A431 Zellen pro „Well“ ausgesät, und zwar von nur 100 Zellen bis 1×10^5 Zellen pro „Well“. Dazu wurde zu jeder Reihe ebenfalls in ansteigenden Konzentrationen Zweitantikörper (ohne Erstantikörper) pipettiert, und zwar in 0nM, 50nM, 100nM und 150nM. Jede Zelldichte-Reihe hatte folglich vier Meßwerte, die eine Gerade ergeben sollten, da das Lichtsignal proportional zur Menge an Zweitantikörper ansteigt. Die Zelldichte-Reihen konnten dann untereinander verglichen werden, um zu sehen, ob sich das Signal allein durch das Vorhandensein unterschiedlicher Zelldichten verändert. Abb.32a zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Zelldichte-Reihen. Man kann ersehen, daß unterschiedliche Zellkonzentrationen tatsächlich einen Einfluß auf das Lichtsignal hatten, denn je mehr Zellen pro „Well“ ausgesät wurden, desto schwächer wurde das Signal. Dementsprechend hätte natürlich auch eine unterschiedliche Zellmorphologie einen Einfluß. Ein direkter Vergleich der Rezeptordichte von adhärent wachsenden A431-

Anhang

Zellen zu Ba/F3 Zellen ist folglich nicht möglich, v.a. da sich solche Lichtsignaleinflüsse (wie hier bei den ansteigenden A431-Zellzahlen) nicht linear verhalten (Abb.32b).

7.2. Vorversuch DNA-Leitern (4.1.3.)

In Vorversuchen wurde zunächst aus unterschiedlichen Veröffentlichungen die beste DNA-Extraktionsmethode für die Leiterdarstellung gesucht; und zwar nach Suzuki et al (1998), Iwama et al (1996), Xie et al (1997) und eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Methode (Schartl).

Eigene Methode (Schartl): siehe 3.3.1.

Iwama: Puffer => 10mM Tris, pH8

100mM NaCl

25mM EDTA

1% SDS

frisch Proteinase K dazu (100µg/ml)

Die Zellen werden mit diesem Lysepuffer versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 10min Zentrifugation wird die DNA-Lösung (der Überstand) in ein frisches Gefäß überführt und kann gefällt werden.

Xie: Puffer => 20mM Tris, pH8

8mM EDTA

0,2% Triton

20min bei Raumtemperatur inkubieren, dann 10min zentrifugieren, den Überstand mit Proteinase K versetzen und im Anschluß die DNA fällen.

Suzuki: Puffer => 10mM Tris, pH8

1mM EDTA

10mM NaCl

0,5% Triton

20min auf Eis inkubieren, dann 10min zentrifugieren und DNA aus Überstand fällen.

Anhang

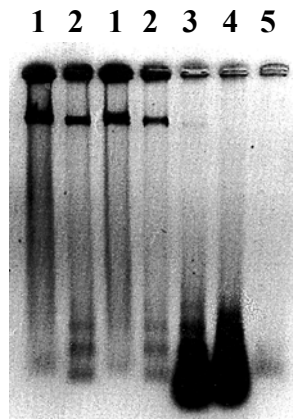


Abb.33: DNA-Leitern mit verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden aus Ba/F3 Zellen:

- 1 Schartl, Zellen unter IL-3
- 2 Schartl, Zellen 2 Tage gehungert
- 3 Iwama, Zellen 2 Tage gehungert
- 4 Xie, Zellen 2 Tage gehungert
- 5 Suzuki, Zellen 2 Tage gehungert

Diese Versuche zeigten, dass die in der Arbeitsgruppe entwickelte Methode für die DNA-Extraktion aus den Ba/F3 Zellen am geeignetsten ist, da die apoptotischen Leitern sowie die genomische DNA als Extraktionskontrolle schön darstellbar sind (Abb.33). Bei Iwama und Xie verschwanden die Leitern in einer Wolke und die genomische DNA wurde nur mangelhaft mitextrahiert. Die Methode nach Suzuki hingegen zeigte kaum DNA (Abb.33).

Literaturverzeichnis

- Adam and Schartl, M.** (1992). Molecular cloning, structural characterization, and analysis of transcription of the melanoma oncogene of xiphophorus. *Pigment Cell Res* 2, 173-180
- Ahmed, N.N., Grimes, L., Bellacosa, A., Chan, T.O., Tsiichlis, P.N.** (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3627-3632
- Ahmed, M., Dusanter-Fourt, I., Bernard, M., Mayeux, P., Hawley, R.G., Bennardo, T., Novault, S., Bonnet, M.L., Gisselbrecht, S., Varet, B., Turban, A.G.** (1998). BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line. *Oncogene* 16, 489-496
- Ahuja and Anders** (1976). A genetic concept of the origin of cancer, based in part upon studies of neoplasms in fishes. *Prog Exp Tumor Res.* 20, 380-397
- Alessi, D.R., Jamies, S.R., Downes, C.P., Homes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B. and Cohen, P.** (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol.* 7, 261
- Anders, F.** (1991). Contributions of the Gordon-Kosswig melanoma system to the present concept of neoplasia. *Pigm Cell Res* 4, 7-29
- Arita, Y., Santiago-Schwarz, F., Coppock, D.L.** (2000). Survival mechanisms induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in normal human melanocytes include inhibition of apoptosis and increased Bcl-2 expression. *Melanoma Res* 10, 412
- Asao, H., Fu, X.Y.** (2000). Interferon-gamma has dual potentials in inhibiting or promoting cell proliferation. *J Biol Chem* 275, 867-874
- Baudler, M., Schartl, M. and Altschmied, J.** (1999). Specific activation of a STAT Family Member in Xiphophorus melanoma cells. *Exp. Cell Res* 249, 212-220
- Beadling, C., Babbage, Ng.J., Cantrell, D.A.** (1996). Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *EMBO J* 15, 1902-1913
- Belches, A.P., Haskell, M.D., Parsons, S.J.** (1997). Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci* 2, d501-518
- Becker, D., Lee, O.L., Rodeck, U. and Herlyn, M.** (1992). Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* 7, 2303-2313

- Bennett, D.C., Cooper, P.J., Hart, I.R.** (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int. J. Cancer* 39, 414-418
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C.** (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev. Immunol* 15, 749-795
- Borner, C., Schlagbauer-Wadl, H., Fellay, I., Selzer, E., Polterauer, P., Jansen, B.** (1999). Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma in vitro and in SCID mice. *Melanoma Res* 9, 347-350
- Borowski, P., Kornetzky, L., Heiland, M., Roloff, S., Weber, W., Laufs, R.** (1996). Characterization of the C-terminal domain of ras-GTPase-activating protein (ras-GAP) as substrate for epidermal growth factor receptor and p60c-src kinase. *Biochem Mol Bio Int* 39, 635-646
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R.** (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488
- Bradford, M.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
- Bromberg, J. and Darnell, J.E. Jr.** (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-2473
- Buday, L.** (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422, 187-204
- Burgering, B.M.T. and Coffey, P.J.** (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3OH kinase signal transduction. *Nature (Lond)* 376, 599-602
- Carey, T.E., Takahashi, T., Resnick, L.A., Oettgen, H.F. and Old, L.J.** (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: Mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3278-3282
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J.** (1998). Bcl-2 Family: Regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395-419
- Chung, J., Kuo, C.J., Crabtree, G.R., Blenis, J.** (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227-1236
- Cirri, P., Chiarugi, P., Marra, F., Raugeri, G., Camici, G., Manao, G., Ramponi, G.** (1997). C-Src activates both STAT1 and STAT3 in PDGF-stimulated NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 493-497

- Coffer, P.J. and Kruijer, W.** (1995). EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 74-81
- Cohen, S.** (1986). Nobel lecture. Epidermal growth factor. *Biosci Rep* 6, 1017-1028
- Collins, M., Downward, J., Miyajima, A., Maruyama, K., Arai, K. and Mulligan, R.** (1988). Transfer of functional EGF receptors to an IL3-dependent cell line. *J Cell Phys* 137, 293-298
- Compagni, A. and Christofori, G.** (2000). Millenium mini-review: Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 83 (1), 1-5
- Cornil, I., Theodorescu, D., Man, S., Herlyn, M., Jambrosic, J., Kerbel, R.S.** (1991). Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6028-6032
- Craddock, B.L., Orchiston, E.A., Hinton, H.J., Welham, M.J.** (1999). Dissociation of apoptosis from proliferation, protein kinase B activation and BAD phosphorylation in interleukin-3-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Biol Chem* 274, 10633
- Cross, M. and Dexter, M.T.** (1991). Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64, 271-280
- Cross, D.A.E., Alessi D.R., Cohen, P., Andjelkovich, L. and Hemmings, B.A.** (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature (Lond)* 378, 785-789
- Dahm-Daphi, J.** (2000). P53: Biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlenther Onkol* 176, 278-285
- Damen, J.E., Wakao, H., Miyajima, A., Kros, J., Humphries, R.K., Cutler, R.L., Krystal, G.** (1995). Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J.* 14, 5557-5568
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E.** (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Gen Develop* 13, 2905-2927
- David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S.A., Wells, A., Larner, A.C., Johnson, G.R.** (1996). STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. *J Biol Chem* 271, 9185-9188
- Davidson, W.R.** (1967). The Egyptian Medical Papyri. In: Brothwell, D., Sandison, A.T. (Hrsg.) *Disease in Antiquity*. Springfield (Thomas)
- Demoulin, J.B., Van Roost, E., Stevens, M., Groner, B., Renaud, J.C.** (1999). Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9. *J Biol Chem* 274, 25855-25861

de Wit, P.E.J., Moretti, S., Koenders, P.G., Weterman, M.A.J., van Muijen, G.N.P., Gianotti, B., et al (1992). Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J Invest Dermatol* 99, 168-173

Dhanasekaran, N. and Reddy, E.P. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447-1455

DiGiovanna, M.P., Lerman, M.A., Coffey, R.J., Muller, W.J., Cardiff, R.D., Stern, D.F. (1998). Active signalling by Neu in transgenic mice. *Oncogene* 17, 1877-1884

Dijkers, P.F., van Dijk, T.B., de Groot, R.P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J-W.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. (1999). Regulation and function of protein kinase B and MAP kinase activation by the IL-5/GM-CSF/IL-3 receptor. *Oncogene* 18, 3334-3342

Dimitrijevic, N., Winkler, C., Wellbrock, C., Altschmied, J., Duschl, J., Scharl, M. (1998). Activation of the Xmrk proto-oncogene of Xiphophorus by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* 16, 1681-1690

Dorsch, M., Fan, P.D., Danial, N.N., Rothman, P.B., Goff, S.P. (1997). The thrombopoietin receptor can mediate proliferation without activation of the Jak-STAT pathway. *J Exp Med* 186, 1947-1955

Dotto, G.P., Moellmann, G., Ghosh, S., Edwards, M. and Halaban, R. (1989). Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol* 109, 3115-3128

Dudeck, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Bimbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT. *Science (Wash DC)* 275, 661-665

Duke, R.C., Ojcius, D.M. und Young, J. (1997). Die Apoptose - Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum* 2, 26-35

Dumon, S., Santos, S.C., Debierre-Grockiego, F., Gouilleux-Gruart, V., Cocault, L., Boucheron, C., Mollat, P., Gisselbrecht, S., Gouilleux, F. (1999). IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 18, 4191-4199

Easty, D.J., Ganz, S.E., Farr, C.J., Lai, C., Herlyn, M. and Bennett, D.C. (1993). Novel and known protein tyrosine kinases and their abnormal expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 101, 679-684

Easty, D.J., Guthrie, B.A., Maung, K., Farr, C.J., Lindberg, R.A., Toso, R.J., Herlyn, M. and Bennett, D.C. (1995a). Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up-regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression. *Cancer Res* 55, 2528-2532

- Easty, D.J., Herlyn, M. and Bennett, D.C.** (1995b). Abnormal protein tyrosine kinase gene expression during melanoma progression and metastasis. *Int J Cancer* 60, 129-136
- Easty, D.J., Mitchell, P.J., Patel, K., Florenes, V.A., Spritz, R.A. and Bennett, D.C.** (1997). Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 71, 1061-1065
- Easty, D.J., Bennett, D.C.** (2000). Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res* 10, 401-411
- Eccles, S.A., Modjtahedi, H., Box, G., Court, W., Sandle, J. and Dean, C.J.** (1995). Significance of the c-erb family receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as targets for immunotherapy. *Invasion Metastasis* 14, 337-348
- Ellerbroek, S.M., Hudson, L.G. and Stack, M.S.** (1998). Proteinase requirements of epidermal growth factor-induced ovarian cancer cell invasion. *Int J Cancer* 78, 331-337
- Fadeel, B., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B.** (2000). The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 14, 1514-1525
- Favoni, R.E. and de Cupis, A.** (2000). The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: New targets for a novel pharmacological approach. *Pharm Rev* 52, 179-206
- Fedi, P., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A.** (1997). Growth factors. In: *Cancer medicine*, Holland, J.F., Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D.W. and Weichselbaum, R.R. pp 41-64. Williams and Wilkins: Baltimore, MD
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983a). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983b). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterpart. *Nature* 301, 89-92
- Fleming, M.G., Howe, S.F., Graf, L.H.Jr** (1994). Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in nevi and melanomas. *Am J Dermatopathol* 16, 383-391
- Florenes, V.A., Lu, C., Bhattacharya, N., Rak, J., Sheehan, C., Slingerland, J.M., Kerbel, R.S.** (1999). Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 18, 1023-1032
- Fontaine, V., Mahieu, M., Content, J.** (1998). Interferon-gamma and interleukin-6 inhibit proliferation in human melanoma cells by different signalling pathways. *Melanoma Res* 8, 24-30

Frank, D.A., Roberston, M.J., Bonni, A., Ritz, J. and Greenberg, M.E. (1995). Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7779-7783

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.P., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. and Tsichlis, P.N. (1995). The protein kinase encoded by the AKT proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736

Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C. (1997). Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437

Friedmann, M.C., Migone, T.-S., Russell, S.M., Loenard, W.J. (1996). Different interleukin 2 receptor β -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2077-2082

Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K., Hirano, T. (1997). An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14, 751-761

Funasaka, Y., Boulton, T., Cobb, M., Yarden, Y., Fan, B., Lyman, S.D., Williams, D.E., Anderson, D.M., Zakut, R., Mishima, Y., Halaban, R. (1992). C-Kit-kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas. *Mol Biol Cell* 3, 197-209

Furlanetto, R.W., Harwell, S.E., Baggs, R.B. (1993). Effects of insulin-like growth factor receptor inhibition on human melanomas in culture and in athymic mice. *Cancer Res* 53, 2522-2526

Ge, X., Fu, Y.M., Meadows, G.G. (2002). U0126, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase inhibitor, was examined in human A375 melanoma cells. *Cancer Lett* 179, 133-140

Gerhartz, C., Heesil, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C., Graeve, L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 271, 12991-12998

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423

- Gomez, A., Wellbrock, C., Gutbrodt, H., Dimitrijevic, N., Scharl, M.** (2001). Ligand independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 276, 3333-3340
- Gordon, M.** (1927). The genetics of a viviparous top-minnow platypoecilus; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 12, 253
- Gordon, M.** (1959). The melanoma cell as an incompletely differentiated pigment cell. In "Pigment Cell Biology". Gordon M. (ed.). Academic Press, New York: 215
- Haenszel, W. and Kurihara, M.** (1968). Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 40, 43-68
- Halaban, R., Kwon, B.S., Ghosh, S., Delli Bovi, P. and Baird, A.** (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanoma. *Oncogene Res.* 3, 177-186
- Halaban, R., Rubin, J.S., White, W.** (1993). Met and HGF-SF in normal melanocytes and melanoma cells. *EXS* 65, 329-339
- Halaban, R.** (1994). Signal transduction in normal and malignant melanocytes. *Pigment Cell Res* 7, 89-95
- Halaban, R.** (1996). Growth factors and melanomas. *Semin Oncol* 23, 673-681
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hanks, S.K., Qinn, A.M., Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., Naoe, T.** (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 19, 624-631
- Heere-Ress, E., Thallinger, C., Lucas, T., Schlagbauer-Wadl, H., Wacheck, V., Monia, B.P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jansen, B.** (2002). Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int J Cancer* 99, 29-34
- Heldin, C.H.** (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223
- Heldin, C.H.** (1996). Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv* 27, 7-24

Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Kirschmann, D.A., Gardner, L.M., Boldt, H.C., Meyer, M., Pe'er, J., Folberg, R. (1998). Regulation of uveal melanoma interconverted phenotype by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). *Am J Pathol* 152, 855-863

Henson, E.S., Gibson, E.M., Villanueva, J., Bristow, N.A., Haney, N., Gibson, S.B. (2003). Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 89, 1177

Herlyn, M., Kath, R., Williams, N., Valyi-Nagy, I., Rodeck, U. (1990). Growth-regulatory factors for normal, premalignant and malignant human cells in vitro. *Adv Cancer Res* 54, 213-234

Herman, J.G. (1999). Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 9, 359-367

Hinton, H.J., Welham, M.J. (1999). Cytokine-induced protein kinase B activation and Bad phosphorylation do not correlate with cell survival of hemopoietic cells. *J Immunol* 162, 7002-7009

Holt, S.E. and Shay, J.W. (1999). Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180, 10-18

Houghton, A.N., Real, F.X., Davis, L.J., Cordon-Cardo, C. and Old, L.J. (1987). Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J exp Med* 164, 812-829

Huang, H.M., Huang, C.J., Yen, J.J. (2000). Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* 96, 1764-1771

Humm, D.G. and Young, R.S. (1956). The embryological origin of pigment cells in platyfish-swordtail hybrids. *Zoologica* 14, 1-10

Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* 50, 823

Hunter, T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270

Hunter, T. (1997). The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil Trans Roy Soc B* 353, 583-605

Hynes and Stern (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198, 165-184.

Iwama, A., Yamagichi, N. and Suda, T. (1996). STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *EMBO J* 15, 5866-5875

Jäättelä, M. (1999). Minireview: Escaping cell death: survival Proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248, 30-43

Jafari, M., Papp, T., Kirchner, S., Diener, U., Henschler, D., Burg, G., Schiffmann, D. (1995). Analysis of ras mutations in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 23-30

Jarpe, M., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G., Gelfand, E., Johnson, G. (1998). Anti-apoptotic *versus* pro-apoptotic signal transduction: Checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* 17, 1475

Jaster, R., Tschirch, E., Bittorf, T., Brock, J. (1999). Role of STAT5 in interferon- α signal transduction in Ba/F3 cells. *Cell Signal* 11, 331-335

Jenkins, B.J., Blake, T.J., Gonda, T.J. (1998). Saturation mutagenesis of the beta subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor shows clustering of constitutive mutations, activation of ERK MAP kinase and STAT pathways, and differential beta subunit tyrosine phosphorylation. *Blood* 92, 1989-2002

Johnson, G.L. and Vaillancourt, R.R. (1994). Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 6, 230-8)

Kallman, K.D. (1975). The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: *Vertebrates of Genetic Interest.* (Edit. King, R.C.), 81-132 (New York: Plenum Press).

Kanter-Lewensohn, L., Dricu, A., Wang, M., Wejde, J., Kiessling, R., Larsson, O. (1998). Expression of the insulin-like growth factor-1 receptor and its anti-apoptotic effect in malignant melanoma: a potential therapeutic target. *Melanoma Res* 8, 389-397

Karasuyama, H. and Melchers, F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18, 97-104

Kieslinger, M., Woldman, I., Moriggl, R., Hofmann, J., Marine, J.C., Ihle, J.N., Beug, H., Decker, T. (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev* 14, 232-244

Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., Miyajima, A. (1995a). Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *EMBO J* 14, 266-275

Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., Miyajima, A. (1995b). Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 10, 2207-2212

Kokai, Y., Myers, J.N., Wada, T., Brown, V.I., LeVea, C.M., Davis, J.G., Dobashi, K., Greene, M.I. (1989). Synergistic Interaction of p185c-neu and the EGF Receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58, 287-292

Kolla, V., Lindner, D.J., Weihua, X., Borden, E.C., Kalvakolanu, D.V. (1996). Modulation of interferon (IFN)-inducible gene expression by retinoic acid. *J Biol Chem* 271, 10508-10514

Koo, H.M., VanBrocklin, M., McWilliams, M.J., Leppla, S.H., Duesbery, N.S., Woude, G.F. (2002). Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3052-3057

Kortylewski, M., Heinrich P. C., Mackiewicz A., Schniertshauer U., Klingmüller U., Nakajima K., Hirano T., Horn F. and I. Behrmann (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18, 3742-3753.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. and Craig, R.W. (1993). Mcl-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl Acad Sci USA* 90, 3516-3520

Kuhn, C., Vielkind, U. and Anders, F. (1979). Cell cultures derived from embryos and melanoma of poeciliid fish. *In Vitro* 15, 537-544

Kuo, C.J., Chung, J., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J. Crabtree, G.R. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358, 70-73

Kuribara, R., Kinoshita, T., Miyajima, A., Shinjyo, T., Yoshihara, T., Inukai, T., Ozawa, K., Look, T., Inaba, T. (1999). Two distinct interleukin-3-mediated signal pathway, Ras-NFIL3 (E4BP4) and bcl-X, regulate the survival of murine pro-B Lymphocytes. *Mol Cell Biol* 19, 2754-2762

Lacronique, V., Boureux, A., Monni, R., Dumon, S., Mauchauffe, M., Mayeux, P., Gouilleux, F., Berger, R., Gisselbrecht, S., Ghysdael, J., Bernard, O.A. (2000). Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 95, 2076

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lassam, N. and Bickford, S. (1992). Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 7, 51-56

Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D., Schlessinger, J. (1989). Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8, 421-427

Lazar-Molnar, E., Hegyesi, h., Toth, S., Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12, 547-554

- Leaman, D.W., Pisharody, S., Flickinger, T.W., Commane, M.A., Schlessinger, J., Kerr, I.M., Levy, D.E., Stark, G.R.** (1996). Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16, 369
- Leiter, U., Schmid, R.M., Kaskel, P., Peter, R.U., Krahn, G.** (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 292, 225-232
- Leu, C.M., Chang, C., Hu, C.** (2000). Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 19, 1665-1675
- Leverrier, Y., Thomas, J., Perkins, G.R., Mangeney, M., Collins, M.K.L., Marvel, J.** (1997). In bone marrow derived Baf-3 cells, inhibition of apoptosis by IL-3 is mediated by two independent pathways. *Oncogene* 14, 425-430
- Leverrier, Y., Thomas, J., Mathieu, A.L., Low, W., Blanquier, B., Marvel, J.** (1999). Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* 6, 290-296
- Lilly, M., Kraft, A.** (1997). Enforced expression of the Mr 33,000 Pim-1 kinase enhances factor-independent survival and inhibits apoptosis in murine myeloid cells. *Cancer Res* 57, 5348-5355
- Lin, C.R., Chen, W.S., Lazar, C.W., Carpenter, C.W., Gill, G.N., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G.** (1986). Protein Kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. *Cell* 44, 839
- Lin, P., Buxton, J.A., Acheson, A., Radziejewsky, C., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., Channon, K.M., Hale, L.P., Dewhirst, M.W., George, S.E., Peters, K.G.** (1998). Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8829-8834
- Lin, E.Y., Piepkorn, M., Garcia, R., Byrd, D., Tsou, R., Isik, F.F.** (1999). Angiogenesis and vascular growth factor receptor expression in malignant melanoma. *Plast Reconstr Surg* 104, 1666-1674
- Lischke, A., Pagany, M., Kammer, W. and Friedrich, K.** (1996). A chemiluminescence-based method for the detection and quantification of antigen-antibody interactions on the surface of eukaryotic cells. *Anal Biochem* 236, 322-326
- Lischke, A., Moriggl, R., Brandlein, S., Berchtold, S., Kammer, W., Sebald, W., Groner, B., Liu, X., Hennighausen, L., Friedrich, K.** (1998). The interleukin-4 receptor activates STAT5 by a mechanism that relies upon common gamma-chain. *J Biol Chem* 273, 31222-31229

Lockshin, A., Giovanella, B.C., De Ipolyi, P.D., Williams, L.J., Mendoza, J.T., Yim, S.O., Stehlin, J.S. (1985). Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. *Cancer Res* 45 (1), 345-350

Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D., Nelson, B.H. (2000). The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol* 164, 2533-2541

Mäueler, W., Barnekow, A., Eigenbrodt, E., Raulf, F., Falk, H.F., Telling, A. and Schartl, M. (1988). Different regulation of oncogene expression in tumor and embryonal cells of Xiphophorus. *Oncogene* 3, 113-122

Malitschek, B., Wittbrodt, J., Fischer, P., Lammers, R., Ullrich, A. and Schartl, M. (1994). Autocrine stimulation of the Xmrk receptor tyrosine kinase in Xiphophorus melanoma cells and identification of a source for the physiological ligand. *J Biol Chem* 269, 10423

Mandic, A., Viktorsson, K., Heiden T., Hansson, J., Shoshan, M.C. (2001). The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma Res* 11, 11-19

Martin, G.S. (1970). Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227, 1021-1023

Mathieu, A.L., Gonin, S., Leverrier, Y., Blaquier, B., Thomas, J., Dantin, C., Martin, G., Baverel, G., Marvel, J. (2001). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway protects against interleukin-3 starvation but not DNA damage-induced apoptosis. *J Bio Chem* 276, 10935-10942

May, W.S., Tyler, P.G., Ito, T., Armstrong, D.K., Qatsha, K.A. and Davidson, N.E. (1994). Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 269, 26865-26870

Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfrancone, L. und Pelicci, P.G. (1997). Opposit effects of the p52^{shc}/p46^{shc} and p66^{shc} splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signaling pathway. *EMBO J.* 16, 706-716

Minshall, C., Arkins, S., Dantzer, R., Freund, G.G., Kelley, K.W. (1999). Phosphatidylinositol 3'-Kinase, but not S6-Kinase, is required for insulin-like growth factor-I and IL-4 to maintain expression of Bcl-2 and promote survival of myeloid progenitors.

Miyazaki, T., Liu, Z.-J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E.L., Perlmutter, R.M., Taniguchi, T. (1995). Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and Ick cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81, 223-231

- Morcinek, J.C., Weisser, C., Geissinger, E., Scharthl, M., Wellbrock, C.** (2002). Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene* 21, 1668-1678
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.** (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790
- Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N., Miyajima, A.** (1995). Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J* 14, 1166-1175
- Mui, A.L., Wakao, H., Kinoshita, T., Kitamura, T., Miyajima, A.** (1996). Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J* 15, 2425-2433
- Nagata, Y. and Todokoro, K.** (1996). Interleukin 3 activates not only JAK2 and STAT5, but also Tyk2, STAT1 and STAT3. *Biochem Biophys Res* 221, 785-789
- Nakamura, N., Chin, H., Miyasaka, N., Miura, O.** (1996). An epidermal growth factor receptor/Jak2 tyrosine kinase domain chimera induces tyrosine phosphorylation of Stat5 and transduces a growth signal in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 274, 17209
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Winkler, A.B., Cavaliere, R., Bigotti, A. and Ullrich, A.** (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int J Cancer* 52, 197-201
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Di Renzo, M.F., Prat, M., Bigotti, A., Cavaliere, R., Comoglio, P.G.** (1993). Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 68, 746-750
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. et al** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43
- Nocka, K., Tan, J.C., Chiu, E., Chu, T.Y., Ray, P., Traktman, P. and Besmer, P.** (1990). Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J* 9, 1085-1813
- Noonan, F.P., Otsuka, T., Bang, S., Anver, M.R., Merlino, G.** (2000). Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice. *Cancer Res* 60, 3738-3743
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, k., Mui, S., Kitamura, T.** (1999). Stat5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* 18, 4754-4765

Nowak, F., Jacquemin-Sablon, A., Pierre, J. (1997). Expression of the activated p185erbB2 tyrosine kinase in human epithelial cells leads to MAP kinase activation but does not confer oncogenicity. *Exp Cell Res* 231, 251-259

Ohtani-Fujita, N. Fujita, T. Aoike, a., Osifchin, N.E., Robbins, P.D. und Sakai, T. (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 8, 1063-1067

Okuda, K., Foster, R., Griffin, J.D. (1999). Signaling domains of the beta c chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 872, 305-312

Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., Hynes, N.E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274, 17209-17218

Olie, R.A., Hafner, C., Kuttel, R., Sigrist, B., Willers, J., Dummer, R., Hall, J., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U. (2002). Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J Invest Dermatol* 118, 505-12

Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., Kitamura, T. (1998). Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* 18, 3871-3879

Ortega, O., Pack, G.T. (1966). On the Antiquity of Melanoma. In: *Cancer* 19, 607-610

Palacios, R. and Steinmetz, M. (1985). Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41, 727-734

Pansky, A., Hildebrand, P., Fasler-Kan, E., Baselgia, L., Ketterer, S., Beglinger, C., Heim, M.H. (2000). Defective JAK-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon- α . *Int J Cancer* 85, 720-725

Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature (Lond)* 373, 573

Peris, K., Cerroni, L., Chimenti, S., Soyer, H.P., Kerl, H., Hofler, H. (1991). Proto-oncogene expression in dermal naevi and melanomas. *Arch Dermatol Res* 283, 500-505

Petch, L.A., Harris, J., Raymond, V.W., Blasband, A., Lee, D.C. and Earp, H.S. (1990). A truncated secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol Cell Biol* 10, 2973-2982

Prescott, D.M. und Flexer, A.S. (1990). Krebs: Fehlsteuerung von Zellen; Ursachen und Konsequenzen; Spektrum der Wissenschaft

Puthier, D., Bataille, R., Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 29, 3945-3950

Quelle, F.W., Wang, D., Nosaka, T., Thierfelder, W.E., Stravopodis, D., Weinstein, Y., Ihle, J.N. (1996). Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol Cell Biol* 16, 1622-1631

Quong, R.Y., Bickford, S.T., Ing, Y.L., Terman, B., Herlyn, M. and Lassam, N.J. (1994). Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma Res* 4, 313

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400

Raffioni, S. and Bradshaw, R.A. (1992). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9121-5

Reed, J.C., Tsujimoto, Y., Alpers, J.D., Croce, C.M. and Nowell, P.C. (1987). Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 236, 1295-1298

Riese, D.J., Raaij, T.M. van, Plowman, G.D., Andrews G.C. and Stern, D.F. (1995). The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15, 5770-5776

Riese, D.J., Bermingham, Y., Raaij, T.M. van, Buckley, S., Plowman, G.D. and Stern, D. (1996a). Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erb-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin- β . *Oncogene* 12, 345-353

Riese, D.J., Kim, E.D., Elenius, K., Buckley, S., Klagsbrun, M., Plowman, G.D., Stern, D.F. (1996b). The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- α , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to neu, erbB-3 and erbB-4. *J Biol Chem* 271, 20047-20052

Rodeck, U. and Herlyn, M. (1991). Growth factors in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 10, 89-101

Rodeck, U., Melber, K., Kath, R., Menssen, H.D., Varello, M., Atkinson, B., Herlyn, M. (1991). Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J Invest Dermatol* 97, 20-26

Rodeck, U. (1993). Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev* 12, 219-226

Rodriguez-Tarduchy, G., Collins, M. and Lopez-Rivas, A. (1990). Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J* 9, 2997-3002

Rogler, C.E., Yang, D., Rossetti, L., Donohoe, J., Alt, E., Chang, C.J., Rosenfeld, R., Neely, K. and Hintz, R. (1994). Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J Biol Chem* 269, 13779-13784

Rosa Santos, S.C., Dumon, S., Mayeux, P., Gisselbrecht, S., Gouilleux, F. (2000). Cooperation between STAT5 and phosphatidyl 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 19, 1164-1172

Rusciano, D., Lin, S., Lorenzoni, P., Casella, N., Burger, M.M. (1998). Influence of hepatocyte growth factor/scatter factor on the metastatic phenotype of B16 melanoma cells. *Tumour Biol* 19, 335-345

Sadowski, I., Stone, J.C., Pawson, T. (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* 6, 4396-4408

Sakai, I., Nabell, L., Kraft, A.S. (1995). Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J Biol Chem* 270, 18420-18427

Sakai, I., Kraft, A. (1997). The kinase domain of Jak2 mediates induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 272, 12350-12358

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Second Edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Santos, S.C., Monni, R., Bouchaert, I., Bernard, O., Gisselbrecht, S., Gouilleux, F., Penard-Lacronique, V. (2001). Involvement of the NF-kappaB pathway in the transforming properties of the TEL-Jak2 leukemogenic fusion protein. *FEBS Lett* 497, 148-152

Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., Weber, B.L., Van Belle, P., Elder, D.E., Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 63, 756-759

Schartl, M. (1988). A sex chromosomal restriction-fragment-length marker linked to melanoma-determining Tu loci in Xiphophorus. *Genetics* 119, 679-685

Schartl, M. (1995). Platyfish and swordtails: a genetic system for the analysis of molecular mechanisms in tumor formation. *Trends Genet* 11, 185-189

Selzer, E., Schlagbauer-Wadl, H., Okamoto, I., Pehamberger, H., Potter, R., Jansen, B. (1998). Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 8, 197-203

Shi, Y., Wang, R., Sharma, A., Gao, C., Collins, M., Penn, L., Mills, G.B. (1997). Dissociation of Cytokine Signals for Proliferation and Apoptosis. *J Immunol* 159, 5318

Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto K. and Taniguchi, Y. (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: Demonstration of a novel role for c-myc. *Cell* 70, 57-67

Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J.M.M., Shima, D.T., Hibi, M., Hirano, T. (1999). Synergistic roles for pim-1 and c-myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709-719

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., Press, M.F. (1989). Studies of Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707

Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Grugnara, C. and Lodish, H.F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-91

Soussi, T. (2000). The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation (Review). *Ann N Y Acad Sci* 910, 121-137

Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353

Stern, D.F. and Kamps, M.P. (1988). EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J* 7, 995

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. and Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570

Stracke, M.L., Engel, J.D., Wilson, L.W., Rechler, M.M., Liotta, L.A., Schiffmann, E. (1989). The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264, 21544-21549

Sun, W.H., Pabon, C., Alsayed, Y., Huang, P.P., Jandeska, S., Uddin, S., Platanias, L.C., Rosen, S.T. (1998). Interferon- α resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* 91, 570-576

- Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P.** (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 296, 15-19
- Suzuki, J., Kaziro, Y., Koide, H.** (1998). Synergistic action of R-Ras and IGF-1 on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-1 control distinct anti-apoptotic kinase pathways. *FEBS Lett* 437, 112-116
- Tang, L., Tron, V.A., Reed, J.C., Mah, K.J., Krajewska, M., Li, G., Zhou, X., Ho, V.C., Trotter, M.J.** (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4, 1865-1871
- Teglund, S., McKay, C., Schuezt, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. and Ihle, J.N.** (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850
- Thomas, J., Leverrier, Y., Marvel, J.** (1998). Bcl-X is the major pleiotropic anti-apoptotic gene activated by retroviral insertion mutagenesis in an IL-3 dependent bone marrow derived cell line. *Oncogene* 16, 1399-1408
- Tower, G.B., Coon, C.C., Benbow, U., Vincenti, M.P., Brinckerhoff, C.E.** (2002). Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1586, 265-274
- Toyota, M. and Issa, J.P.** (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 9, 349-357
- Tsatsanis, C. and Spandidos, D.A.** (2000). The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). *Int J Mol Med* 5 (6), 583-590
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M.** (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. und Croce, C.** (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443
- Ueno, H., Honda, H., Nakamoto, T., Yamagata, T., Sasaki, K., Miyagawa, K., Mitani, K., Yazaki, Y., Hirai, H.** (1997) The phosphatidylinositol 3' kinase pathway is required for the survival signal of leukocyte tyrosine kinase. *Oncogene* 14, 3067-3072
- Ugurel, S., Seiter, S., Rappl, G., Stark, A., Tilgen, W., Reinhold, U.** (1999). Heterogenous susceptibility to CD95-induced apoptosis in melanoma cells correlates with bcl-2 and bcl-x expression and is sensitive to modulation by interferon-gamma. *Int J Cancer* 82, 727-736

- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Liberman, T.A. and Schlessinger, J.** (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature (Lond)* 309, 418-425
- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A.** (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *A Rev Cell Biol* 10, 251-337
- van de Geer, P. and Pawson, T.** (1995). The PTB domain: A new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20, 277-280
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M.** (1988). Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442
- Vignais, M.L., Sadowski, H.B., Watling, D., Rogers, N.C., Gilman, M.** (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol* 16, 17759-17769
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 9, 138-141
- Von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-Siebelt, F., Rapp, U., Troppmair, J.** (2001). Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK-and Phosphatidyl 3-Kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* 21, 2324-2336
- Wakamatsu, Y.** (1981). Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res.* 41, 679-680
- Wang, H.G., Rapp, U.R. and Reed, J.C.** (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87, 629-638
- Wang, J., Chao, J., Chen, W., Kuo, M., Yen, J., Yang-Yen, H.** (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 19, 6195-6206
- Weiner, D.B., Liu, J., Cohen, J.A., Williams, W.V., Greene, M.I.** (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339, 230
- Wellbrock, C., Lammers, R., Ullrich, A. and Schartl, M.** (1995). Association between the melanoma-inducing receptor tyrosine kinase Xmrk and src family tyrosine kinases in Xiphophorus. *Oncogene* 10, 2135-2143
- Wellbrock, C., Fischer, P., Schartl, M.** (1998a). Receptor tyrosine kinase Xmrk mediates proliferation in Xiphophorus melanoma cells. *Int J Cancer* 76, 437-442

- Wellbrock, C., Geissinger, E., Gomez, A., Fischer, P., Friedrich, K. and Schartl, M.** (1998b). Signalling by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk leads to activation of STAT5 in Xiphophorus melanoma. *Oncogene* 16, 3047-3056
- Wellbrock, C. and Schartl, M.** (1999). Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59^{fyn}, Grb2 and Shc. *Eur J Biochem* 260, 275-283
- Wellbrock, C., Fischer, P. and Schartl, M.** (1999). PI3-Kinase is involved in mitogenic signaling by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xiphophorus melanoma receptor kinase in fish melanoma. *Exp Cell Res* 251, 340-349
- Wellbrock, C. and Schartl, M.** (2000). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59^{fyn} and the receptor tyrosine kinase Xmrk is involved in malignant transformation of pigment cells. *Eur J Biochem* 267, 3513-3522
- Wellbrock, C., Gomez, A. and Schartl, M.** (2002a). Melanoma Development and Pigment Cell Transformation in Xiphophorus. *Microsc Res Techniq* 58, 456-463
- Wellbrock, C., Weisser, C., Geissinger, E., Troppmair, J., Schartl, M.** (2002b). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 277, 6443-6454
- Whyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R.** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306
- Winkler, C., Wittbrodt, J., Lammers, R., Ullrich, A., Schartl, M.** (1994). Ligand-dependent tumor induction in medakafish embryos by a Xmrk receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene* 9, 1517-1525
- Wittbrodt, J., Lammers, R., Malitschek, B., Mäueler, W., Raulf, F., Telling, A., Robertson, S.M. and Schartl, M.** (1989). Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu Locus in Xiphophorus. *Nature* 341, 415-421
- Wittbrodt, J., Lammers, R., Malitschek, B., Ullrich, A. and Schartl, M.** (1992). The Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in Xiphophorus malignant melanoma. *EMBO J* 11, 4239-4246
- Wong, H., Anderson, W.D., Cheng, T., Riabowol, K.T.** (1994). Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. *Anal Biochem* 223, 251-258
- Wong, L.H., Krauer, K.G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M.J., Hersey, P., Tam, N.D., Edmondson, S., Devenish, R.J., Ralph, S.J.** (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 272, 28779-28785

Xie, K., Wang, Y., Huang, S., Xu, L., Bielenberg, D., Salas, T., McConkey, D., Jiang, W. and Fidler, I. (1997). Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene* 15, 771-779

Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 57, 443-478

Yayon, A., Ma, Y.S., Safran, M., Klagsbrun, M., Halaban, R. (1997). Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene* 14, 2999-3009

Yin, X.M., Oltvar, Z.N. and Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323

Zamorano, J., Wang, H.Y., Wang, R., Shi, Y., Longmore, G.D., Keegan, A.D. (1998). Regulation of cell growth by IL-2: Role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression. *J Immunol* 160, 3502-3512

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X. *Cell* 87, 619-28

Zhong, Z., Wen, Z. and Darnell, J. E. (1994). Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to EGF and IL-6. *Science* 264, 95-98

Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999). The EGF-receptor as a central transducer of heterologous signalling system. *Trends Pharmacol Sci* 20, 408-412

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection (Zelllinienbank)
Bcl	B cell lymphoma/leukaemia oder breakpoint cluster
BRCA-Gen	Breast Cancer Gen
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
Cpm	Counts per minute
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAG	1,2-Diacylglycerin
dATP	desoxy-ATP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetacid
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetacid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Electromobility shift assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EST	Expressed Sequence Tag
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
G418	Aminoglykosid-Antibiotikum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	gamma activating site
GEF	Guaninnucleotide Exchange factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLB	Glyoxal loading buffer
GRB	Glyoxal running buffer
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
h	Stunde
[H ³]	Tritium

HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HER	Humaner EGF-Rezeptor
HER-mrk	Chimäre aus HER und Xmrk
HGF/SF	Hepatocyte growth factor/Scatter factor
HNPCC	Hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase
hSIE	high affinity Serum inducible element
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der 50% inhibiert werden
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin-3
ISRE	Interferon stimulated response element
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB-medium	Luria-Bertani Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LPA	Lysophosphatsäure (Lysophosphatidic acid)
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAP-ERK-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NF	Neurofibromatose
NH ₄	Ammonium
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OLB	oligonucleotide labelling buffer
p53	Protein 53
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	= - log [H ⁺]
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNK	Polynucleotidkinase

pp60	Phosphoprotein 60
PSM	Platy-Swordtail-Melanoma
RAP	Rapamycin
R-Gen	Repressorgen
Rb	Retinoblastom
RLU	Relative light units
Rpm	Rounds per minute (=Upm)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH-Domäne	Src-homologe Domäne
SIE	Serum-induzierbares Element
Sos	Son of sevenless
SSC	Sodiumchlorid/Sodium-Citrat
SST	serum separator tube
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris-Cl	Tris-Puffer, pH mit HCL eingestellt
Tu-Gen	Tumorgen
U	Units (=Einheiten)
Upm	Umdrehung pro min
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
WO	Wortmannin
wt	Wildtyp
WT	Wilmstumor
XER	Xiphophorus EGF-R
X. maculatus	Xiphophorus maculatus
Xmrk	Xiphophorus Melanom Rezeptor Kinase

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Manfred Scharl für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, für die Auswahl dieses interessanten Themas, das mit einer Fülle verschiedenster Labortätigkeiten verbunden war, und für die optimale Betreuung. Gerade für letztere danke ich aber auch ganz herzlich der direkten Betreuerin meiner Arbeit Frau Dr. Wellbrock, die mir interlektuell sowie labortechnisch jederzeit zur Seite stand. Insgesamt danke ich der ganzen Arbeitsgruppe für die enge Zusammenarbeit und Hilfe beim Erlernen der verschiedenen Methoden und bei der Lösung etwaiger Probleme, ganz besonders aber bei Petra Fischer, die meine Zellen gepflegt hat, wenn ich ein paar Tage nicht da war, und bei Christin Weisser, die so manchen Blot abgebaut hat, wenn ich bis zur nächsten Vorlesung nicht ganz fertig geworden bin. Darüberhinaus danke ich allen für die entspannte Arbeitsatmosphäre, die vielen lustigen Stunden und auch den Trost, wenn mal etwas nicht klappen wollte.

Bei Frau Prof. Bröcker möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken und Ihren Beitrag, mich für die Dermatologie zu begeistern.

Desweiteren möchte ich mich bei Stephanie Brändlein aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Sebald, Physiologische Chemie II, für die Einarbeitung in die Zell-ELISA Technik zur Rezeptordichtebestimmung und in die Magnetobeads-Extraktionen aktivierter STAT-Proteine bedanken.

Dr. Fabrice Gouilleux, Institute Pasteur Paris, danke ich herzlich für die Überlassung des Bcl-X Plasmids für die Northern Blot Analysen.

Und zum Schluss möchte ich mich natürlich bei meinen Eltern bedanken, die meine Ausbildung so selbstverständlich unterstützt und gefördert haben und bei meinem Mann, der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet hat.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Jessica Cecile Hassel, geb. Morcinek
Geburtsdatum: 28.4.1975
Geburtsort: Port of Spain/Trinidad und Tobago

Schulbildung:

1981-1985 Georg-August-Zinn Schule (Grundschule) in Büdingen
1985-1994 Wolfgang Ernst Gymnasium in Büdingen

Studium:

Nov. 94 - März 95 Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März/April 95 Pflegepraktikum am Keokuk Area Hospital in Iowa, USA
Mai 95 – Mai 02 Humanmedizin an der Universität Würzburg
Praktisches Jahr: Chirurgie an der Tulane University, New Orleans und an der University of Minnesota, USA
Dermatologie und Innere Medizin an der Uniklinik Würzburg
Promotion: ab April 98 Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie I bei Prof. Dr. M. Scharl

Stipendien:

Mai 95 – Okt. 01 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
Juli 98 – April 99 Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs „Regulation des Zellwachstums“

Beruf:

Aug. 02 – Juli 03 Postdoktorandenstelle in der Dermatologischen Klinik des UniversitätsSpitals Zürich, Schweiz
Seit Sept. 03 AIP am St.Vincentius-Krankenhaus, Klinik für Innere Medizin in Heidelberg

Dossenheim, November 2003

Jessica Hassel