

Identifizierung zelltypspezifischer Signale der Rezeptortyrosinkinasen c-Fms und TrkA anhand von Transkriptomanalysen in Epithelzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Björn Breyer
geboren am 30. Juli 1979 in Hannover

2012

Referentin: Prof. Dr. Teruko Tamura-Niemann

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 27. März 2012

**„Nur der Naturforscher ist verehrungswert, der uns das Fremdeste,
Seltsamste, mit seiner Lokalität, mit aller Nachbarschaft, jedesmal
in dem eigensten Elemente zu schildern und darzustellen weiß.“**

von

Johann Wolfgang von Goethe
deutscher Dichter
(1749 - 1832)

aus

Die Wahlverwandtschaften
(1809)

Zusammenfassung

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren, spielen eine Rolle bei der Differenzierung, der Proliferation und beim Überleben sowie bei Krebserkrankungen in mutierter und nicht mutierter Form. Die RTKs c-Fms und TrkA bewirken, nach Stimulation mit dem Makrophagen koloniestimulierenden Faktor-1 (CSF-1/M-CSF) bzw. dem Nerven-Wachstumsfaktor (NGF), Differenzierung von Makrophagen bzw. neuronalen Zellen. Beide RTKs, aber besonders c-Fms, das durch ein *Glucocorticoide Responsive Element* (GRE) im Promotor überexprimiert werden kann, sind in Krebsarten, wie z. B. Brustkrebs, nachgewiesen.

In dieser Arbeit wird untersucht, wie sich die beiden RTKs c-Fms und TrkA in Epithelzellen im Vergleich zu ihren differenzierenden Zellsystemen verhalten und ob sie zelltypspezifische Signale regulieren. Dafür werden verschiedene Krebszelllinien auf endogenes c-Fms untersucht. Weiterhin wird mit der hämatopoetische Vorläuferzellen transformierenden Δ TrkA-Mutante der Phänotyp in neuronalen Zellen bestimmt. Außerdem werden Transkriptomanalysen für c-Fms und TrkA in Epithelzellen durchgeführt und mit bekannten Daten verglichen.

Die Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo exprimiert c-Fms, aber nicht den Liganden CSF-1. Dennoch kann eine aktive, durch proteolytische Spaltung gebildete intrazelluläre Domäne (ICD) von c-Fms nachgewiesen werden. Hier wird erstmals gezeigt, dass die c-Fms-ICD Erk1/2, STAT3 und STAT5 aktiviert, eine Kernlokalisierung zeigt und das Kernlokalisierungssignal identifiziert worden ist. Die Transkriptomanalyse zeigt für c-Fms exprimierende HEK293-Epithelzellen und Makrophagen nach CSF-1-Stimulation nur drei gemeinsame Gene. In beiden Zellsystemen werden Gene der inflammatorischen Reaktion exprimiert, Zytokine und Zytokinrezeptoren für Makrophagen, für Epithelzellen hauptsächlich Zytokine. Für Δ TrkA wird ein Liganden-unabhängiger, zu Wildtyp-TrkA nach NGF-Stimulation, vergleichbarer Phänotyp in der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 gezeigt. TrkA zeigt eine zelltypspezifische biologische Reaktion, was anhand der Transkriptomanalyse mit 2,8 % gemeinsamen Genen für das TrkA/NGF-Signal in HEK293-Zellen im Vergleich zu PC12-Zellen und hämatopoetischen HMC-1-Zellen verdeutlicht wird.

RTKs zeigen in einer anderen, als ihrer ursprünglichen Umgebung, zelltypspezifische Reaktionen, die unterstützend an krebsfördernden Prozessen beteiligt sein können.

Schlagwörter: Rezeptortyrosinkinasen, Zelltypspezifität, Transkriptomanalysen

Abstract

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are membrane-bound growth factor receptors which are mainly involved in cell differentiation, proliferation and survival. Their mutated and non-mutated variants participate in cancer progression. The RTKs, c-Fms and TrkA, lead to differentiation of macrophages or neuronal cells, respectively, after stimulation with their corresponding growth factor, macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1/M-CSF) or nerve growth factor (NGF). Both RTKs are involved in cancers such as breast cancer. Here, expression of c-Fms can be induced by a glucocorticoid responsive element (GRE) in its promoter region.

In this thesis, the behaviour of c-Fms and TrkA in epithelial cells in comparison with their differentiating cell systems is examined and it is tested whether both systems regulate cell type specific signals. Endogenous c-Fms expression is investigated in different cancer cell lines. The phenotype of the hematopoietic progenitor cell transforming mutant Δ TrkA is studied in neuronal cells. Moreover, transcriptome analyses are performed for c-Fms and TrkA in epithelial cells and are compared with known data.

This thesis shows that the choriocarcinoma cell line BeWo expresses c-Fms but not its ligand CSF-1. However, an active intracellular domain (ICD) that is formed after proteolytic cleavage is detected. This thesis also shows for the first time that c-Fms-ICD activates Erk1/2, STAT3 and STAT5. It is localised in nucleus and the nuclear localisation signal is identified. Transcriptome analysis reveals only three common genes for c-Fms-expressing HEK293 and macrophages. Both cell systems express genes that are involved in the inflammatory response, cytokines and cytokine receptors in the case of macrophages and primarily cytokines in the case of epithelial cells. In the pheochromocytoma cell line PC12 Δ TrkA induces neurite outgrowth independent of ligand stimulation. This phenotype is comparable to that induced by wild type TrkA after NGF stimulation. TrkA shows a cell type specific biological reaction. This observation is elucidated by the transcriptome analysis showing 2.8 % common genes for the TrkA/NGF signal in HEK293 cells as compared with PC12 cells and hematopoietic HMC-1 cells.

If expressed in a cell type different from their origin tissue, RTKs show cell type specific reactions that may explain for their role in cancer progression.

Keywords: receptor tyrosine kinases, cell type specificity, transcriptome analyses

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.1 Allgemeines über Rezeptortyrosinkinasen.....	3
1.1.1.1 Struktureller Aufbau	3
1.1.1.2 Aktivierung der Kinasefunktion von Rezeptortyrosinkinasen.....	4
1.1.1.3 Rezeptortyrosinkinasen vermittelte Signalweiterleitung	6
1.1.1.4 Allgemeine Signaltransduktionswege von Rezeptortyrosinkinasen.....	8
1.1.1.4.1 Kaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase	9
1.1.1.4.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase Kaskade.....	10
1.1.1.4.3 Signalweg der Phospholipase-Cy	11
1.1.1.4.4 Signalkaskade über JAK-STAT	11
1.1.2 Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor TrkA	12
1.1.3 Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor c-Fms	14
1.2 Proteolytische Spaltung von Transmembranrezeptoren.....	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material	20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Bakterienkulturen.....	22
2.3 Zelllinien	22
2.4 Radioaktive Substanzen	22
2.5 Wachstumsfaktoren.....	22
2.6 Inhibitoren.....	23
2.7 siRNA	23
2.8 Transfektionsreagenzien	23
2.9 Desoxyribonukleinsäuren	23
2.9.1 Oligonukleotide	23
2.10 Plasmide.....	23
2.11 Enzyme	25
2.12 Kits	25
2.13 Antikörper	26
2.14 Sonstige Materialien	26
2.15 Geräte	27
2.16 Firmen	28
3 Methoden	30
3.1 Prokaryotische Kultivierungsmethoden	30

3.1.1	Wachstumsbedingungen und Kulturmedien für Bakterien	30
3.1.2	Bakterielle Transformation	30
3.1.2.1	Calciumchlorid-Methode.....	30
3.1.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	31
3.1.2.3	Transformation kompetenter Bakterien	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	32
3.2.1.1	Minipräparation mit QIAprep® Spin Miniprep Kit.....	32
3.2.1.2	Midipräparation mit QIAGEN® Plasmid Midi Kit.....	33
3.2.2	Enzymatische Modifizierung der DNA.....	34
3.2.2.1	Restriktionsenzymspaltung	34
3.2.2.2	Ligasereaktion.....	34
3.2.2.3	Dephosphorylierung	35
3.2.3	DNA-Elektrophorese im Agarose-Gel	36
3.2.3.1	Herstellung von Agarose-Gelen	36
3.2.3.2	Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese	36
3.2.3.3	Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.4	Aufreinigung von DNA	37
3.2.4.1	Aufreinigung von DNA mit dem NucleoSpin® Extract II Kit.....	37
3.2.4.2	Phenol/Chloroform-Extraktion	38
3.2.4.3	Ethanol-fällung	38
3.2.4.4	SureClean-Aufreinigung	38
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
3.2.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
3.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
3.2.8	Isolierung von RNA	41
3.2.8.1	Aufbereitung von RNA mit RNeasy® Mini Kits	41
3.2.8.2	Behandlung der RNA mit RNase-freier DNase	42
3.2.8.3	Auftrennung von RNA im Agarose-Gel	42
3.2.9	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion	42
3.2.10	Mikroarray Analyse	43
3.3	Eukaryotische Kultivierungsmethoden.....	44
3.3.1	Zellkulturmedien und Wachstumsbedingungen	44
3.3.1.1	Zellkulturmedien.....	44
3.3.1.2	Passagieren und Wachstumsbedingungen der Zellkulturen	44
3.3.2	Langzeitlagerung von Zellkulturen	45
3.3.3	Transfektion von Zellkulturen.....	45
3.3.3.1	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	46
3.3.3.2	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	46
3.3.3.3	Transiente Transfektion von PC12-Zellen	47
3.3.3.4	Transfektion von BeWo-Zellen mit siRNA	47
3.3.3.5	Transfektion von NIH3T3-Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien.....	48

3.3.3.6	Herstellung von stabilen SH-SY5Y-Zellen mit retroviraler Infektion	49
3.3.3.6.1	Transiente Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix-gp	49
3.3.3.6.2	Ernten der Retroviren	50
3.3.3.6.3	Bestimmung des Virentiters in SC-1 Zellen	50
3.3.3.6.4	FACS-Analyse	50
3.3.3.6.5	Infektion der Zielzellen SH-SY5Y	51
3.3.3.6.6	Sortieren der Zellen im Zellsorter	52
3.3.4	Soft-Agar-Assay mit NIH3T3-Zellen.....	52
3.3.5	Behandlung von Zelllinien mit Inhibitoren	53
3.3.5.1	Behandlung von BeWo-Zellen mit γ -Sekretase Inhibitor	53
3.3.5.2	Behandlung von HEK293-Zellen mit Imatinib Mesylat	53
3.3.6	Stimulation von Zelllinien mit Wachstumsfaktoren.....	53
3.3.6.1	Stimulation von HEK293-Zellen für Mikroarray Analysen.....	53
3.3.6.2	Stimulation von NIH3T3- und T15-Zellen	53
3.3.6.3	Stimulation von SH-SY5Y-Zellen	54
3.3.6.4	Stimulation von PC12-Zellen.....	54
3.3.6.5	Stimulation von 5T6-Zellen.....	55
3.4	Biochemische und zellbiologische Methoden	55
3.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	55
3.4.2	Zellfraktionierung von Zellen.....	56
3.4.3	Immunpräzipitation.....	56
3.4.4	Bestimmung der <i>in vitro</i> Kinaseaktivität (Kinase-Assay)	58
3.4.5	Endo-H-Behandlung	58
3.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
3.4.7	Western-Blot.....	60
3.4.8	Identifizierung von Proteinen im Immunoblot	61
3.4.9	Immunfluoreszenz.....	61
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Identifizierung eines alternativen Signalweges von c-Fms	63
4.1.1	c-Fms in Krebszellen	63
4.1.1.1	Nachweis von endogenem c-Fms-Transkript und dessen Liganden CSF-1 in Krebszelllinien.....	63
4.1.1.2	Lokalisation von endogenem c-Fms.....	64
4.1.2	Charakterisierung von c-Fms Banden in BeWo-Zellen	65
4.1.2.1	Überprüfung auf c-Fms Spezifität.....	65
4.1.2.2	Nachweis eines c-Fms Spaltungsproduktes.....	66
4.1.2.3	Identifizierung der Zellkompartimente für die c-Fms Banden	67
4.1.3	Intrazelluläre Domäne von c-Fms	67
4.1.3.1	Funktionalität der c-Fms ICD.....	67
4.1.3.2	Überprüfung der Lokalisation von c-Fms-ICD	68
4.1.4	Das RRK-Motiv ist essentiell für die Translokation der c-Fms-ICD in den Nukleus.....	69
4.1.4.1	Bereich des Kernlokalisierungssignals	69

4.1.4.2	Identifizierung des Kernlokalisierungssignals	70
4.1.5	Induktion von Signalwegen durch c-Fms-ICD	72
4.1.5.1	c-Fms-ICD induzierte Signalkaskaden	72
4.1.5.2	Einfluss von Imatinib Mesylat auf c-Fms-ICD	73
4.1.6	Vergleich von CSF-1-stimulierten Epithelzellen und Makrophagen	74
4.1.6.1	IPA Funktionsanalyse oder Einordnung der Mikroarray Daten nach biologischen Funktionen	75
4.1.6.2	Vergleich mit stimulierten Makrophagen	75
4.1.6.3	Proteinklassen Analyse	76
4.2	Charakterisierung von TrkA und seiner Leukämie induzierenden Mutante Δ TrkA in verschiedenen Zelllinien	77
4.2.1	Funktionsnachweis in humanen embryonalen Nierenzellen	77
4.2.1.1	Nachweis der Expression von Δ TrkA	77
4.2.1.2	Überprüfung der Kinase-Aktivität und des Glykosylierungsmusters	78
4.2.2	Überprüfung des Transformationspotentials von Δ TrkA in Fibroblasten	80
4.2.2.1	Expressions- und Phosphorylierungsnachweis	80
4.2.2.2	Soft-Agar-Assay zur Überprüfung der Koloniebildung	81
4.2.3	Funktionsanalyse der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y mit stabil integrierten TrkA-Konstrukten	81
4.2.3.1	FACS-Sortierung	81
4.2.3.2	Expression der stabil wt-TrkA exprimierenden SH-SY5Y-Zellen	82
4.2.3.3	Stabil wt-TrkA-exprimierende SH-SY5Y-Zellen mit Neuriten	83
4.2.4	Funktionsanalyse von Δ TrkA in PC12-Zellen	84
4.2.4.1	Differenzierung von PC12-Zellen	84
4.2.4.2	Expression von transient transfiziertem Δ TrkA in PC12-Zellen	85
4.2.4.3	Δ TrkA exprimierende PC12-Zellen bilden Neuriten	86
4.3	Transkriptomanalyse von TrkA in verschiedenen Zelllinien	87
4.3.1	Epithelzellen im Vergleich zu leukämischen Zellen	87
4.3.1.1	Überprüfung der NGF-Behandlung	87
4.3.1.2	Mikroarray Analyse für stimulierte TrkA exprimierende Epithelzellen	88
4.3.1.3	Vergleich mit stimulierten Leukämiezellen	89
4.3.2	Gegenüberstellung von drei unterschiedlichen TrkA Zellsystemen	90
4.3.2.1	Identifizierung von gemeinsam hochregulierten Genen	90
5	Diskussion	93
5.1	Nachweis von funktionsfähiger c-Fms-ICD im Zellkern von BeWo-Zellen	93
5.2	Mögliche Kommunikation zwischen Makrophagen und epithelialen Krebszellen	96
5.3	Der von Δ TrkA ausgelöste Phänotyp in PC12-Zellen korreliert mit dem von wt-TrkA nach NGF-Stimulation	99
5.4	Unterschiedliches Genprofil für NGF-stimuliertes TrkA in verschiedenen Zellsystemen	100
5.5	TrkA und c-Fms zeigen unterschiedliche Reaktion in der Epithelzelllinie HEK293	101

6	Literaturverzeichnis	103
7	Anlagen	119
8	Anhang.....	139
8.1	Abbildungsverzeichnis	139
8.2	Tabellenverzeichnis	140
8.3	Veröffentlichungen.....	141
8.3.1	Publikationen	141
8.3.2	Kurzbeiträge	141
8.4	Curriculum Vitae	142
8.5	Erklärung zur Dissertation	143
8.6	Danksagung	144

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
µg	M ikro g ramm
µL	M ikro l iter
µM	M ikro m olar
ADAM	eine Disintegrin und Metalloprotease (<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
AML	a kute m yeloische L eukämie
AMP-PNP	Adenosin-5'-[β,γ-imido]-triphosphat
APH-1	a nterior- p harynx-defective- 1
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS/aa	A minosäure (<i>amino acid</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat (<i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
Bad	B cl-2- a ssociated d eath promoter
Bcl-2	B - c ell l ymphoma 2
Bcl-x	B - c ell l ymphoma - e xtra
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTP	BisTrisPopan
bzw.	b eziehungs w eise
C-	Carboxy-
c-	zellulär
Ca ²⁺	Calcium
CCL2	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2 c hemokine (C -C motif) l igand 2
CCR2	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor c hemokine (C -C motif) r eceptor 2
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
c-Fms/CSF-1R	Makrophagen koloniestimulierender Faktor-1 Rezeptor (<i>macrophage colony-stimulating factor-1 receptor</i>)
Ci	Curie
CIAP	Kälberdarm alkalische Phosphatase (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
c-Kit	Stammzelleffektor Rezeptor

cm	Z entimeter
cm ²	Quadratcentimeter
c-Met/HGFR	Hepatozyten-Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>h</i> epatocyte <i>g</i> rowth <i>f</i> actor <i>r</i> eceptor)
CML	ch ronische m yeloische L eukämie
CMV	Zytomegalievirus (<i>c</i> ytomegalovirus)
CSF-1/M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor-1 (<i>m</i> acrophage <i>c</i> olony- <i>s</i> timulating <i>f</i> actor- 1)
DABCO	1,4-Diazabicyclo-2.2.2-octan
DAG	Diacylglycerol (<i>d</i> iacylglycerol)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>d</i> eoxyribonucleic <i>a</i> cid)
DNase	Desoxyribonuklease (<i>d</i> eoxyribonuclease)
dNTP	D esoxyribonukleosid t riphosphat
DTT	Dithiothreit
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	E scherichia c oli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermale Wachstumsfaktor (<i>e</i> pidermal <i>g</i> rowth <i>f</i> actor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptoren (<i>e</i> pidermal <i>g</i> rowth <i>f</i> actor <i>r</i> eceptor)
Endo H	Endoglykosidase H
ErbB	Familie der epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptoren
Erk	Extrazelluläre signalregulierte Kinase (<i>e</i> xtracellular signal- <i>r</i> egulated <i>k</i> inase)
<i>et al.</i>	und andere (<i>e</i> t <i>a</i> lia)
FACS	f luorescence a ctivated c ell s orting
FCS	Fötales Kälberserum (<i>f</i> etal <i>c</i> alf <i>s</i> erum)
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>f</i> ibroblast <i>g</i> rowth <i>f</i> actor <i>r</i> eceptor)
FITC	Fluorescein
Flt1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (<i>v</i> ascular <i>e</i> ndothelial <i>g</i> rowth <i>f</i> actor <i>r</i> eceptor 1)
Flt3	Fms-ähnliche Tyrosinkinase 3 (<i>F</i> ms-like <i>t</i> yrosine <i>k</i> inase 3)

Fms	f eline M cDonough s arcoma
Frs2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Substrat 2 (f ibroblast g rowth f actor r eceptor s ubstrate 2)
g	Gramm
Gab	Grb2-assoziiertes Bindeprotein (G rb2- a ssociated- b inding protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GEF	Guaninnukleotidaustauschprotein (g uanine nucleotide e xchange f actor)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gp	G lykoprotein
GPCRs	G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (G - p rotein- c oupled r eceptor s)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein (g uanine nucleotide-binding p rotein)
Grb2	Wachstumsfaktor Rezeptor gebundenes Protein 2 (g rowth factor r eceptor- b ound protein 2)
GRE	Glucocorticoide empfindlicher Bereich (g lucocorticoide r esponsive e lement)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat (g uanosine-5'- t riphosphate)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HA	H ämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (h orseradish p eroxidase)
HSC/HPC	hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen (h ematopoietic s tem/ p rogenitor c ells)
hTERT	menschliche Telomerase reverse Transkriptase (h uman t elomerase r everse t ranscriptase)
ICD	intrazelluläre Domäne (i ntra c ellulare d omain)
Ig	I mmunglobulin
IP	I mmunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat (i nositol 1,4,5- t ris p hosphate)
IPA	I ngenuity P athway A nalysis
iPS	i nduzierte p luripotente S tammzellen
IRK	Insulin-Rezeptor Kinase
IRK3P	dreifach phosphorylierte Insulin-Rezeptor Kinase
IRS	Insulin Rezeptor Substrat (i nsulin r eceptor s ubstrate)
JAK	Janus-Kinase (J anus k inase)

JNK	c-Jun N-terminale Kinase (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
K	Lysin
K1/K2	Kinasedomäne 1/2 (<i>kinase domain 1/2</i>)
kBq	Kilob equerel
kDa	Kiloda lton
KI	Kinase-I nsert
L	Liter
LPS	Lipo polysaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Methionin
M	Molar
mA	Milli ampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKAPK	MAPK aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MDM2	<i>murine double minute 2 protein</i>
MEK	Mitogen-aktivierte Erk Kinase (<i>mitogen-activated Erk kinase</i>)
mg	Milli gramm
min	Minute(n)
mL	Milli liter
mM	Milli molar
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	Asparagin
N-	Amino-
n. s.	n icht s ignifikant
NaAc	Natriumacetat
NaF	Natriumfluorid
NaVO ₄ ³⁻	Natriumorthovanadat
ng	Nano gramm
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nano meter

NP-40	Nonidet P-40
NRTKs	Nicht-Rezeptortyrosinkinassen (n on r eceptor t yrosine k inases)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P	Prolin
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PANTHER	P rotein A nalysis T hrough E volutionary R elationships
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (p olymerase c hain r eaction)
PDGFR	Blutplättchen-Wachstumsfaktor Rezeptor (p latelet- d erived g rowth f actor r eceptor)
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (p hosphoinositide- d ependent k inase 1)
PEN-2	Präsenilin-Verstärker-2 (p resenilin- e n <h2>hancer-2</h2>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH -Wert
PH	Pleckstrin homologe (p leckstrin h omology)
PI	P hosphatidyl i nositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase (p hosphatidyl i nositol- 3 - k inase)
PID	phospho-Tyrosin interagierende Domäne (p hosphotyrosine i nteracting d omain)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (p hosphatidyl i nositol 4,5- b is p hosphate)
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (p hosphatidyl i nositol-3,4,5- t ri p hosphate)
PKB/Akt	Proteinkinase B (p rotein k inase B)
PKC	Proteinkinase C (p rotein k inase C)
PLC	Phospholipase C (p hosphol i pase C)
PMA	P horbol-12- M yristat-13- A acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PS	Präsenilin (p re s enilin)
PTB	phospho-Tyrosin-bindende (p hosphotyrosine- b inding)
PTK	Protein Tyrosinkinase (p rotein t yrosine k inase)
pY	phosphoryliertes Tyrosin
Q	Glutamin

R	Arginin
RIP	regulierte Intramembranproteolyse (<i>regulated intramembrane proteolysis</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease (<i>ribonuclease</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	<u>ri</u> bosomale RNA
RSK	ribosomale S6 Kinase (<i>ribosomal S6 kinase</i>)
RT	R aum <u>t</u> emperatur
RT	<u>r</u> reverse T ranskriptase
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen (<i>receptor tyrosine kinases</i>)
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-Homologie 2 (<i>src-homology 2</i>)
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering RNA
STAT	Signalüberträger und Aktivator der Transkription (<i>signal transducers and activators of transcription</i>)
T/Thr	Threonin
TAE	T ris- A acetat- E DTA
TAM	tumorassoziierte Makrophage (<i>tumour-associated macrophage</i>)
TBE	T ris- B orat- E DTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Rhodamin
Trk	<u>t</u> ropomyosin <u>r</u> eceptor <u>k</u> inase
TrkA, B, C	Neurotrophin-Rezeptoren
U	Einheit (<i>unit</i>)
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
ÜNK	Ü bernacht <u>k</u> ultur
UV	U ltraviolett-Strahlung
V	Volt
v-	viral
v/v	Volumenanteil (<i>volume/volume</i>)

VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
W	Tryptophan
w/v	Gewichtsanteil (<u>w</u> eight/ <u>v</u> olume)
wt-	Wildtyp- (<u>w</u> ild <u>t</u> ype-)
WW	Proteindomäne mit zwei konservierten Tryptophanresten
X	beliebige Aminosäure
x	fach
Y/Tyr	Tyrosin
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
α-	anti-
ΔTrkA	Deletionsmutante von TrkA
Δ	ohne
ξ	hydrophile Aminosäure
Φ	hydrophobe Aminosäure

1 Einleitung

Für viele zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellbewegung oder morphologische Modifikationen benötigen vielzellige Organismen ein komplexes, interzelluläres Kommunikationssystem, damit individuelle Zellen auf unterschiedlichste Signale mit der entsprechenden intrazellulären Regulierung und Koordination reagieren können (Zwick *et al.*, 2001).

Die Kommunikation, um die verschiedenen Zellfunktionen in Gang zu setzen, erfolgt über Zytokine wie Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone, Chemokine oder Hormone. Viele dieser extrazellulären Signale aktivieren Zelloberflächenrezeptoren, die intrazelluläre Signalwege in Gang bringen, durch die die Regulierung der Genexpression erfolgt, und sich auf physiologische Vorgänge auswirken (Ullrich & Schlessinger, 1990; Bennisroune *et al.*, 2004).

Durch Genmutation oder Überexpression essentieller Signalmoleküle kann eine Störung innerhalb der aufeinander abgestimmten Prozesse auftreten. Diese fehlerhafte Regulierung kann zu physiologischen Veränderungen führen, durch die Krebs oder andere Erkrankungen, wie Diabetes oder Immunkrankheiten, ausgelöst werden könnten (Schlessinger, 2000).

Eine Vielzahl der Zelloberflächenrezeptoren, die für die Übertragung der extrazellulären Signale ins Zellinnere verantwortlich sind, werden, aufgrund ihres extrazellulären N-Terminus, zu den Typ-I-Transmembranproteinen zugeordnet (Chou & Elrod, 1999). Wegen ihrer strukturellen Merkmale werden diese Zelloberflächenrezeptoren innerhalb der Transmembranrezeptoren in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Hubbard & Till, 2000). Die zwei größten Klassen bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; *g*uanine nucleotide-binding *p*rotein-*c*oupled *r*eceptors), die nicht enzymatisch aktiv sind, und die Rezeptortyrosinkinasen (RTKs; *r*eceptor *t*yrosine *k*inases). Sie unterscheiden sich dadurch, dass die RTKs extrazelluläre Signale über eine intrinsische Tyrosinkinase Domäne ins Zellinnere übermitteln, während die GPCRs dafür einen heterotrimären Komplex mit G-Proteinen bilden müssen (Gutkind, 1998; van der Geer *et al.*, 1994). Auf die RTKs wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.1 Rezeptortyrosinkinasen

Die Rezeptortyrosinkinasen werden in die Gruppe der Proteinkinasen eingeordnet. Die Proteinkinasen bilden mit ungefähr 500 Genen die zweitgrößte Proteingruppe im menschlichen Genom, was ungefähr 2 % der gesamten Gene entspricht (Manning *et al.*, 2002).

Die Einteilung der Proteinkinasen erfolgt aufgrund ihrer Spezifität in drei Gruppen: Es existieren Proteinkinasen, die die Aminosäuren Serin/Threonin, die Aminosäure Tyrosin oder die Aminosäuren Serin/Threonin und Tyrosin phosphorylieren können (Krebs & Beavo, 1979). Die Proteintyrosinkinasen (PTK) katalysieren den Transfer von γ -Phosphat des Donors ATP auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines Proteinsubstrates (Hubbard & Till, 2000).

Die Gruppe der Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen besteht aus den zytoplasmatischen oder Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTKs) und den zellmembranständigen Rezeptortyrosinkinasen (Robinson *et al.*, 2000). Es sind 90 Tyrosinkinasen bekannt, von denen 58 zu den RTKs gezählt werden und in 20 Unterfamilien eingeteilt werden (Abbildung 1.1), sowie 32 Tyrosinkinasen ohne direkte Rezeptorbindung, die in 10 Unterfamilien aufgeteilt werden (Plowman *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2000; Abbildung 1.2).

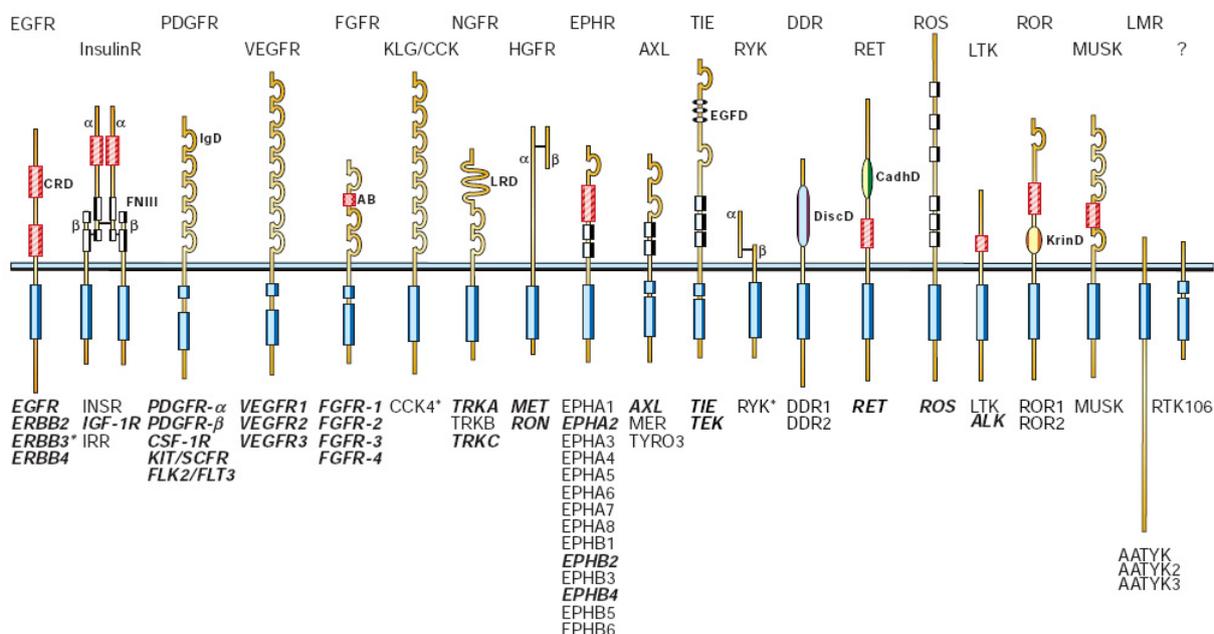


Abbildung 1.1: Familien der Rezeptortyrosinkinasen (aus Blume-Jensen & Hunter, 2001). Dargestellt sind die 20 Unterfamilien der RTKs aufgrund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne. Oberhalb der RTKs stehen die Familiennamen und darunter die bekannten Mitglieder. Fett und kursiv dargestellte RTKs sind an menschlichen Malignitäten beteiligt. RTKs mit einem Sternchen zeigen keine intrinsische Kinaseaktivität.

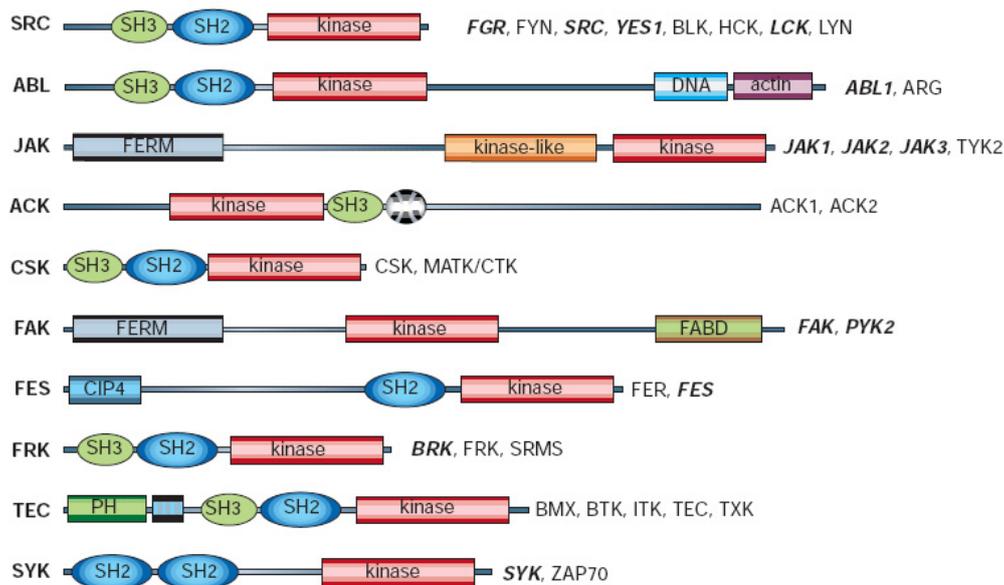


Abbildung 1.2: Familien der Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (nach Blume-Jensen & Hunter, 2001).
Die Familiennamen stehen auf der linken Seite und die jeweiligen Mitglieder auf der rechten. Fett und kursiv dargestellte NRTKs sind an menschlichen Malignitäten beteiligt.

1.1.1 Allgemeines über Rezeptortyrosinkinasen

1.1.1.1 Struktureller Aufbau

Wie bereits oben erwähnt, sind RTKs zellmembranständige Proteine. Sie kommen überwiegend als Monomere vor. Als Ausnahmen dazu gelten Vertreter der Insulin-Rezeptor Unterfamilie und der Hepatozyten-Wachstumsfaktor Rezeptor (c-Met/HGFR) Unterfamilie, die als Dimere vorliegen (Hubbard & Till, 2000). RTKs bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranen sowie einem zytoplasmatischen Abschnitt (Yarden & Ullrich, 1988).

Innerhalb des extrazellulären Bereiches sind in den verschiedenen Unterfamilien der RTKs unterschiedliche Domänen vorzufinden, wie Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen, Fibronectin Type III-ähnliche Domänen, EGF-ähnliche Domänen, cysteinreiche Domänen oder leucinreiche Domänen, um die gängigsten hier zu erwähnen (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Auch variiert die Anzahl dieser Domänen zwischen den Unterfamilien. Die extrazelluläre Region ist häufig N-glykosyliert und dient zur Bindung des Liganden (Hubbard & Till, 2000).

Durch den transmembranen Abschnitt sind die RTKs in der Zellmembran verankert, die von der hydrophoben und α -helikal vorliegenden Transmembrandomäne einmal durchspannt wird, und eine Verbindung zwischen der extrazellulären und zytoplasmatischen Region darstellt (Smith *et al.*, 1996; Yarden & Ullrich, 1988).

Der intrazelluläre Bereich von RTKs ist im Gegensatz zu der extrazellulären Region relativ einheitlich aufgebaut, bestehend aus der Juxtamembrandomäne, der katalytisch-aktiven Tyrosinkinasedomäne sowie des C-terminalen Endes (Ullrich & Schlessinger, 1990). In der bei allen RTKs hochkonservierten Tyrosinkinasedomäne, die bei einigen Unterfamilien durch eine Kinase-Insert (KI) Region zweigeteilt vorliegt, ist das aktive Zentrum mit einer ATP-Bindungsstelle lokalisiert, das die Autophosphorylierung des Rezeptors katalysiert, aber auch die Tyrosinphosphorylierung von Adapterproteinen und Enzymen (Schlessinger, 1988; Yarden & Ullrich, 1988).

1.1.1.2 Aktivierung der Kinasefunktion von Rezeptortyrosinkinasen

Für die Aktivierung der RTKs sind folgende Schritte notwendig: Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung von Tyrosinresten im zytoplasmatischen Bereich.

Die Ligandenbindung erfolgt im glykosylierten, extrazellulären Bereich der RTK (Yarden & Ullrich, 1988). Der Ligand, ein Polypeptid, bindet innerhalb des extrazellulären Bereiches an bestimmten Domänen (Hubbard & Till, 2000). So konnte zum Beispiel bei Untersuchungen der Kristallstruktur für den VEGF-Rezeptor Flt1, dieser hat sieben Ig-ähnliche Domänen, gezeigt werden, dass die Domäne zwei und drei für die VEGF-Bindung zuständig sind (Wiesmann *et al.*, 1997).

Mit der Bindung des Liganden geht die Dimerisierung zweier monomerer RTK Molekülen einher (Schlessinger, 2000). Für die Art der Dimerisierung gibt es verschiedene Varianten, die, wie von Lemmon und Schlessinger zusammengefasst, von Liganden-vermittelten Dimeren bis zu Rezeptor-vermittelten Dimeren reicht (Lemmon & Schlessinger, 2010). Bei den Liganden-vermittelten Dimeren dient der Ligand als Verbindung und die Rezeptoren stehen nicht in Kontakt, wie z. B. bei TrkA (Wehrman *et al.*, 2007), dagegen stehen bei den Rezeptor-vermittelten Dimeren die Rezeptoren in Verbindung und der Ligand hat keine direkte Beteiligung, wie z. B. bei den ErbB Rezeptoren (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind auch Kombinationen beider Varianten bekannt, wie z. B. bei c-Kit oder FGFR (Schlessinger *et al.*, 2000; Yuzawa *et al.*, 2007).

Die Dimere kommen sowohl als Homodimere, aus identischen RTKs bestehend, oder als Heterodimere vor, die sich aus zwei verschiedenen RTKs zusammensetzen, was für die RTKs EGFR, PDGFR und FGFR gezeigt wurde (Ekman *et al.*,

1999; Ueno *et al.*, 1992; Wallasch *et al.*, 1995). Vor der Ligandenbindung befinden sich die meist monomeren RTKs im inaktiven Zustand, der mit der Dimerisierung in einen aktiven Zustand umgewandelt wird, verbunden mit Konformationsänderungen innerhalb der beiden Rezeptoren (Schlessinger, 2002).

Die Liganden vermittelte Dimerisierung zieht die Aktivierung der Kinasefunktion mit sich. Dabei spielt die Autophosphorylierung von Tyrosinresten eine essentielle Rolle (Heldin, 1995). Durch die Konformationsänderung stehen die Kinasedomänen der beiden RTKs in einem derartigen Abstand zueinander, dass sie sich transphosphorylieren können (Bae & Schlessinger, 2010). Hierbei werden zwischen einer und drei Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife (*activation loop*) innerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert (Ullrich & Schlessinger, 1990). Dieses hat zur Folge, dass eine weitere Konformationsänderung erfolgt, bei der die Aktivierungsschleife das aktive Zentrum für die Bindung von ATP und Substrat frei gibt (Schlessinger, 2003; Abbildung 1.3).

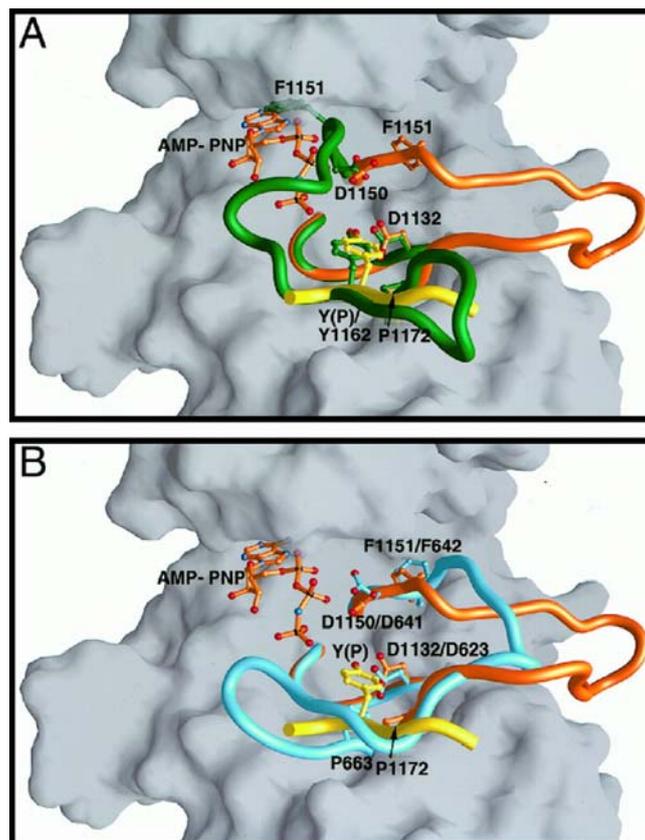


Abbildung 1.3: Die Aktivierungsschleife des Insulin Rezeptors und des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (aus Hubbard *et al.*, 1998).

(A) Gezeigt ist die Konformation der Aktivierungsschleife der unphosphorylierten Insulin-Rezeptor Kinase (IRK) in grün und der dreifach-phosphorylierten (IRK3P) in orange. Das Substrat ist gelb angefärbt. Mit AMP-PNP ist der ATP-Analog der IRK3P gezeigt. Kohlenstoffatome sind grün (IRK), orange (IRK3P) oder gelb (Substratpeptid), Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, und Phosphoratome schwarz dargestellt. (B) Gezeigt ist die Konformation der Aktivierungsschleife des unphosphorylierten Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR) in blau angefärbt sowie auch die Kohlenstoffatome von FGFR. Die Farben der Atome sind identisch zu A.

Weiterhin können auch Tyrosinreste in der Juxtamembran, in der Kinase-Insert (KI) Region und am C-terminalen Ende phosphoryliert werden, die im unphosphorylierten Zustand einen inhibierenden Effekt haben können (Hubbard, 2004; DiNitto *et al.*, 2010). Ebenso werden spezifische phospho-Tyrosin Bindungsstellen innerhalb der Kinasedomäne für intrazelluläre Signalmoleküle, wie Enzyme oder Adapterproteine, phosphoryliert (van der Geer & Hunter, 1990; Bae & Schlessinger, 2010).

1.1.1.3 Rezeptortyrosinkinasen vermittelte Signalweiterleitung

Die innerhalb der RTKs am weitesten verbreitetsten Bindungsstellen sind die Bindemotive für Proteine mit einer SH2 (*src-homology 2*)-Domäne oder PTB (*phosphotyrosine-binding*)-Domäne, die im Bereich von phosphorylierten Tyrosinresten binden können (Pawson & Scott, 1997).

Die SH2-Domänen wurden erstmals bei der Regulierung der Tyrosinkinase-Aktivität von v-Fps sowie bei Mitgliedern der Src-Familie beschrieben und umfassen eine Sequenz von etwa 100 Aminosäuren (AS) N-terminal von der Kinasedomäne (Sadowski *et al.*, 1986; DeClue *et al.*, 1987). Sie bilden die größte Klasse von phospho-Tyrosin-erkennenden Domänen (Pawson *et al.*, 2001). Für das menschliche Genom wurden 120 unterschiedliche SH2-Domänen in rund 110 verschiedenen Proteinen identifiziert (Liu *et al.*, 2006). In Abbildung 1.4 A ist eine kleine Auswahl von SH2-Domäne-enthaltenden Signaltransduktionsmolekülen wie Enzymen, Adapter- und Gerüstproteinen (*scaffold proteins*), regulatorischen Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren dargestellt (Schlessinger & Lemmon, 2003). Die Motive, über die Proteine mit SH2-Domänen interagieren, liegen C-terminal vom phosphorylierten Tyrosin (pY) und bestehen unter anderem aus einer der beiden Sequenzfolgen aus pY – ξ – ξ – Φ oder pY – Φ – X – Φ , in der ξ für hydrophile, Φ für hydrophobe und X für beliebige Aminosäuren steht (Songyang *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2008).

Eine weitere Klasse von phospho-Tyrosin-erkennenden Bereichen wird durch die phospho-Tyrosin-bindende (PTB, *phosphotyrosine-binding*) Domäne gebildet, die auch als phospho-Tyrosin interagierende Domäne (PID, *phosphotyrosine interacting domain*) bezeichnet wird (Kavanaugh & Williams, 1994). Die Art von Bindungsdomänen wurde erstmals für das Adapter- und Gerüstprotein (*scaffold protein*) Shc sowie für das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1) beschrieben (Blaikie *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1995). Sie werden aus bis zu 200 Aminosäuren gebildet

(Schlessinger & Lemmon, 2003). Für das menschliche Genom wurden bislang 60 Proteine mit PTB-Domänen identifiziert (Uhlik *et al.*, 2005). In Abbildung 1.4 B sind einige PTB-Domäne-besitzende Proteine dargestellt. Das Bindungsmotiv für PTB-Domänen besteht aus der AS-Sequenz N – P – X – pY (N = Asparagin; P = Prolin; X = beliebige AS; pY = phospho-Tyrosin), die im Vergleich zu den SH2-Domänen N-terminal zum phosphorylierten Tyrosin zu finden ist (Zhou *et al.*, 1995b; van der Geer *et al.*, 1995), allerdings ist das phospho-Tyrosin für Interaktionen nicht zwingend erforderlich (Zambrano *et al.*, 1997).

Die Proteine mit einer SH2- oder PTB-Domäne enthalten oftmals weitere Interaktionsdomänen, wie in Abbildung 1.4 auch zu sehen ist. So sind Proteine mit SH3-, WW- oder PDZ-Domäne Beispiele für die Protein-Protein Interaktion, wohingegen Proteine, die zum Beispiel eine PH-, C1-, C2-, PX- oder FYVE-Domäne enthalten, für die Phospholipid-Bindung bekannt sind (Lemmon & Schlessinger, 2010).

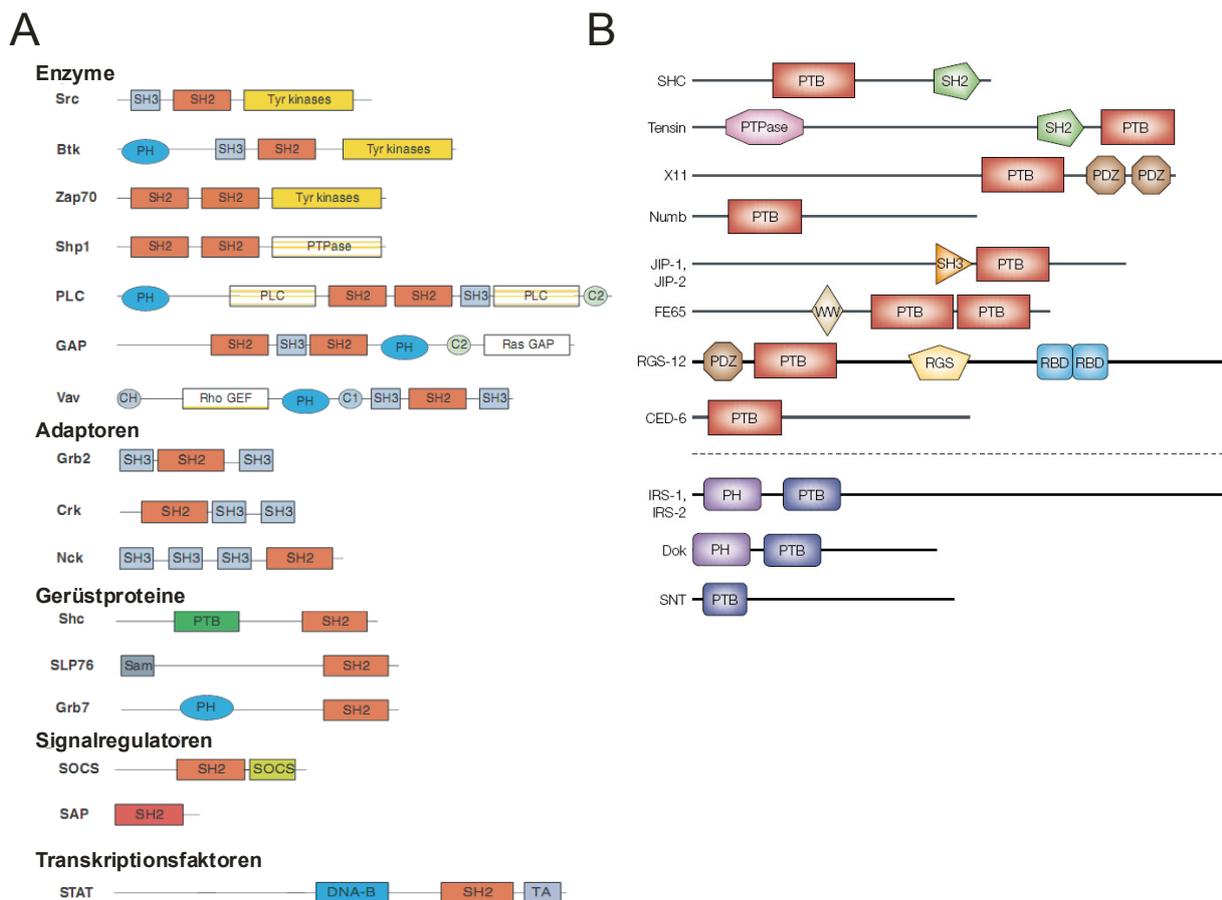


Abbildung 1.4: SH2- und PTB-Domänen enthaltende Proteine.

Die Signalweiterleitung der aktivierten RTKs erfolgt weitestgehend über Proteine mit phospho-Tyrosin interagierenden Domänen. **(A)** Gezeigt ist eine Auswahl von Proteinen mit SH2-Domäne, eingeteilt in ihre Proteinfamilie (modifiziert nach Schlessinger & Lemmon, 2003). **(B)** Dargestellt sind einige PTB-Domäne-enthaltende Proteine, eingeteilt in Shc-ähnliche (rote Box) und IRS-ähnliche (blaue Box) PTB-Domänen (aus Yaffe, 2002).

1.1.1.4 Allgemeine Signaltransduktionswege von Rezeptortyrosinkinasen

Die Aktivierung der RTKs durch Bindung des Liganden, Dimerisierung, Autophosphorylierung von Tyrosinresten und die Phosphorylierung von Signalmolekülen bildet den Beginn von wichtigen Signaltransduktionswegen. Zu diesen Signalwegen gehören auch die vier in Abbildung 1.5 dargestellten Hauptsignalkaskaden von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K-Akt (*phosphatidylinositol-3-kinase*), PLC- γ (*phospholipase C- γ*) und JAK-STAT (*Janus-kinase/signal transducers and activators of transcription*).

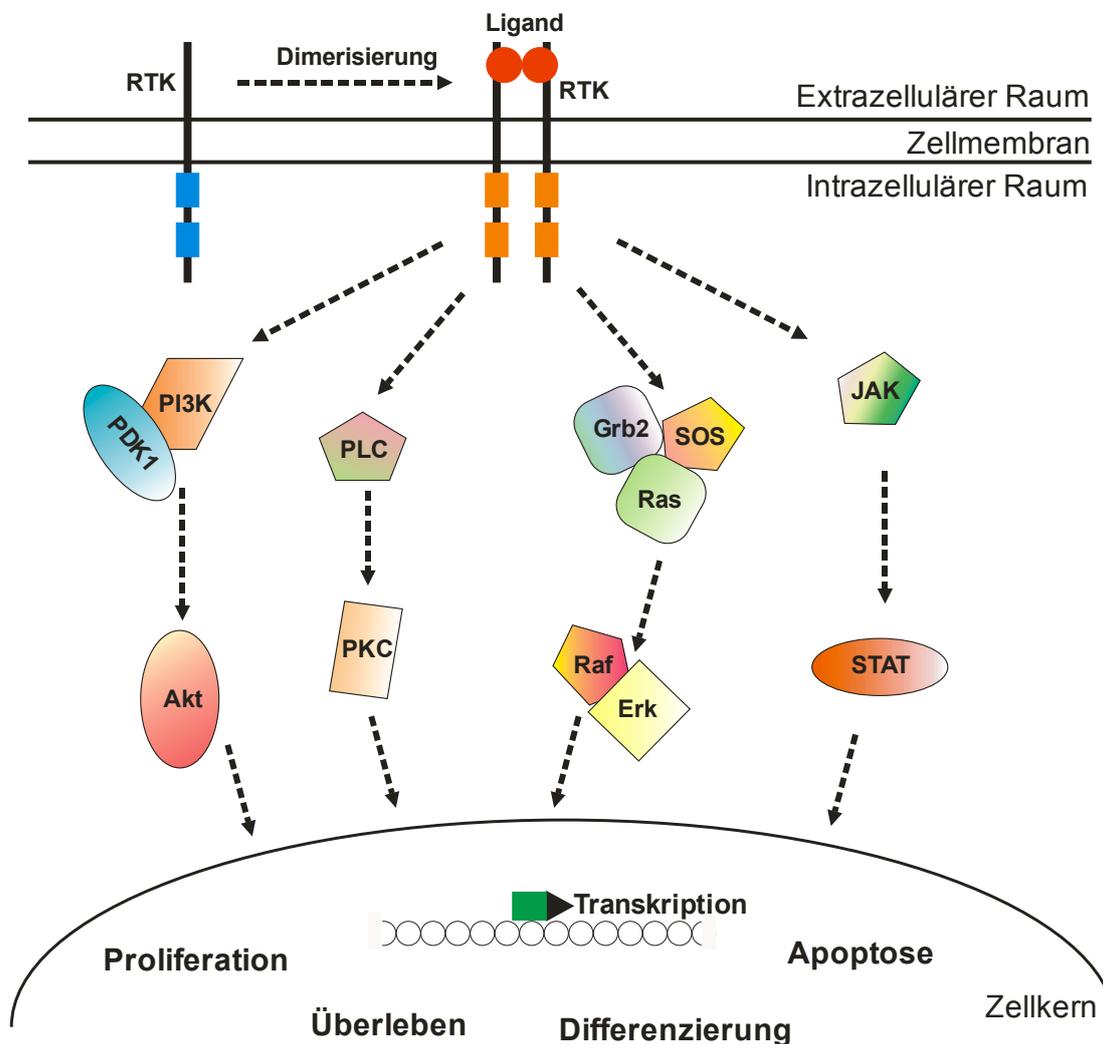


Abbildung 1.5: Hauptsignalkaskaden von RTKs.

Durch Bindung ihres Liganden werden RTKs dimerisiert und durch Phosphorylierung aktiviert. Über phospho-Tyrosine werden bei den verschiedenen RTKs unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst. Zu den gängigsten Signalwegen gehören die dargestellten Kaskaden über PI3K, PLC, MAPK und JAK-STAT. Die Kaskaden vermitteln meistens Signale in den Zellkern, die zur Proliferation, zum Überleben, zur Differenzierung oder zum programmierten Zelltod führen. Kinasedomäne blau = inaktiv, unphosphoryliert; Kinasedomäne orange = aktiv, phosphoryliert.

1.1.1.4.1 Kaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase

Die Kaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) verlaufen konventionell über aktivierte RTKs, Adapter- und Gerüstproteine, Guaninnukleotidaustauschproteine (GEF; *g*uanine nucleotide *e*xchange *f*actor) und kleine GTP-bindende Proteine der Ras/Rho-Familie. Daraufhin beginnt eine Serie von drei aufeinander folgende Kinasen: MAPK Kinasen Kinasen (MAPKKK) aktivieren durch Phosphorylierung MAPK Kinasen (MAPKK), die wiederum die Aktivierung von MAPK durch Phosphorylierung der Aminosäureresten Thr und Tyr im Motiv T E Y (Einbuchstabencode) der konventionellen MAPK bewirken. MAPK aktivieren ihrerseits durch Phosphorylierung verschiedene Substrate im Zytoplasma und im Zellkern, welche unterschiedliche zelluläre Prozesse regulieren (Cargnello & Roux, 2011).

Die MAPK Erk (*e*xtracellular signal-*r*egulated *k*inase) der Säugetiere ist die erste und am besten charakterisierte Kinase und ist Bestandteil der Raf-MEK-Erk1/2 MAPK-Signalkaskade (Boulton *et al.*, 1991; Boulton *et al.*, 1990). Das Spektrum identifizierter Substrate für Erk1/2 liegt bei über 200 Erk1/2-interagierenden Proteinen und umfasst Proteinkinasen wie u. a. die RSK (*r*ibosomal *S*6 *k*inase), eine MAPK-aktivierte Proteinkinase (MAPKAPK) (Sturgill *et al.*, 1988) und im Zellkern lokalisierte Substrate wie u. a. die Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, c-Myc und Elk1 (Marais *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 2003; von Kriegsheim *et al.*, 2009).

Die hier beschriebene, gradlinige Darstellung der Aktivierung von den MAPK Erk1/2 ist in zellulären Systemen viel komplexer in seiner Abfolge und kann über viele Alternativwege erfolgen (Burgering *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 2005).

Neben der Kaskade, die zur Aktivierung der MAPK Erk1/2 führt, gibt es drei weitere innerhalb der konventionellen MAPK: die Kaskade für p38 (Han *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994), JNK (*c*-*J*un *N*-terminal *k*inase) (Hibi *et al.*, 1993; Kyriakis & Avruch, 1990) und Erk5 (English *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995a). Die ersten beiden Kaskaden werden vorzugsweise durch zellulären und umgebenden Stress, wie UV-Bestrahlung, Hitzeschock, osmotischen Schock oder inflammatorische Zytokine aktiviert, während für Erk5 die Aktivierung sowohl auf diese Art in Gang gebracht werden kann als auch, wie bei der Kaskade für Erk1/2, über die Stimulierung von Wachstumsfaktoren läuft (Cuadrado & Nebreda, 2010; Bogoyevitch *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006).

1.1.1.4.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase Kaskade

Die Signalkaskade der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) stellt einen weiteren Signalweg der RTKs da. Die PI3K-Familie gehört zu den Lipidkinasen und wird aufgrund von ihrer Primärstruktur, ihrer Substratspezifität und der Art ihrer Regulation in drei Hauptklassen eingeteilt, wobei die Klasse I PI3K weiterhin in die Unterklassen I_A und I_B unterteilt wird (Domin & Waterfield, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Über RTKs erfolgt vorzugsweise die Aktivierung der Klasse I_A PI3K (Engelman, 2007). Die PI3K dieser Klasse bestehen aus einem heterodimären Komplex aus einer katalytischen p110- und einer regulatorischen p85-Untereinheit, über welche überwiegend die Stabilisierung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit erfolgt (Otsu *et al.*, 1991; Hiles *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1998; Katso *et al.*, 2001). Die Aktivierung der PI3K vollzieht sich durch Interaktion der regulatorischen Untereinheit entweder direkt an aktivierte RTKs oder indirekt über RTKs gebundene Adapterproteine der IRS-Familie oder Gab, aber auch durch direkte Aktivierung der katalytischen Untereinheit an Ras (Engelman *et al.*, 2006; Castellano & Downward, 2011). Im aktivierten Zustand phosphorylieren die PI3K Phosphatidylinositol (PI) und deren Derivate an der 3'-hydroxy Position des Inositolringes, wobei unter anderem das Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP₃) generiert wird (Fruman *et al.*, 1998; Cantley, 2002). Über PIP₃ werden die beiden PH-(pleckstrin homology) Domäne-enthaltenden Serin/Threoninkinasen PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) und die Proteinkinase B (PKB oder Akt) an die Zellmembran rekrutiert, wobei Akt durch PDK1 aktiviert wird (Alessi *et al.*, 1997; Currie *et al.*, 1999; Courtney *et al.*, 2010). Für Akt sind über 100 Substrate beschrieben, die überwiegend im Zytosol lokalisiert sind, allerdings sind auch einige im Zellkern phosphoryliert vorzufinden (Nicholson & Anderson, 2002; Manning & Cantley, 2007). Unter anderem phosphoryliert Akt das Protein Bad (Bcl-2-associated death promoter), welches dadurch nicht mehr in der Lage ist ein Heterodimer mit Bcl-x oder Bcl-2 zu bilden, stattdessen mit 14-3-3 assoziiert, wodurch die Bad-induzierte Apoptose unterdrückt wird (Zha *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel ist die Phosphorylierung von MDM2 durch Akt, was zur Translokation von MDM2 in den Zellkern führt, wo MDM2 die Funktion von p53 negativ reguliert (Mayo & Donner, 2001). Akt ist aber nicht nur an der Regulierung von Überlebenssignalen beteiligt, sondern spielt auch bei anderen zellulären Prozessen eine Rolle, wie zum Beispiel bei der Zellproliferation oder beim Zellwachstum (Manning & Cantley, 2007).

1.1.1.4.3 Signalweg der Phospholipase-C γ

Ein anderer Signalweg führt über die Phospholipasen C (PLC), von denen es bis heute 13 bekannte Isoformen gibt, die in sechs Familien unterteilt werden (Suh *et al.*, 2008). PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Abdel-Latif, 1986). Durch IP₃ wird die intrazelluläre Ca²⁺-Ausschüttung reguliert und zusammen mit DAG führt dieses zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Berridge & Irvine, 1984; Majerus *et al.*, 1986). PKC wurde als intrazellulärer Rezeptor für Phorbolester identifiziert, welche potentielle Tumorpromotoren darstellen (Ashendel, 1985). Des Weiteren sind PKCs an der Regulierung von Proliferation und Differenzierung involviert (Buchner, 1995; Clemens *et al.*, 1992). Dafür müssen PKC-vermittelte Signale in den Zellkern gelangen, was sowohl durch direkte Translokation von PKCs in den Zellkern erreicht wird, aber auch indirekt über Signalwege, wie etwa MAPK, die Signale in den Zellkern leiten (Buchner, 2000).

Die Familie der PLC- γ wird aus den beiden Isoformen PLC- γ_1 und PLC- γ_2 gebildet, die über RTKs und NRTKs aktiviert werden können (Carpenter & Ji, 1999). Während PLC- γ_1 in Zellen allgegenwärtig exprimiert wird, kommt PLC- γ_2 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen vor (Liao *et al.*, 2002). Außerdem besteht für die Isoformen von PLC- γ die Möglichkeit in Abwesenheit einer Tyrosin-Phosphorylierung über PIP₃, ein Produkt von PI3K, zur Aktivierung zu gelangen (Bae *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998).

1.1.1.4.4 Signalkaskade über JAK-STAT

Der JAK-STAT Signalweg verläuft über die beiden Proteinfamilien der Janus-Kinasen (JAKs) und der Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (STATs). Die Aktivierung von STATs kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: den Janus-Kinase (JAK)-abhängigen und den JAK-unabhängigen Weg (Andl *et al.*, 2004). Erstmals wurde der JAK-abhängige Signalweg im Zusammenhang mit Interferon beschrieben (Schindler *et al.*, 1992). Nach der Bindung eines Liganden wird sein Rezeptor dimerisiert, was dazu führt, dass die Rezeptor-assoziierten JAKs in unmittelbarer Nähe zueinander gelangen und sich gegenseitig transphosphorylieren und aktivieren (Rawlings *et al.*, 2004). Die aktivierten JAKs phosphorylieren auch die Rezeptoren, an welche Monomere STATs mit ihren SH2-Domänen binden, die ebenfalls über die JAKs phosphoryliert werden und ihre Aktivierung erlangen (Tu *et*

al., 2011). Die aktivierten STATs bilden Homo- oder Heterodimere und werden über Importin in den Zellkern transportiert, wo sie als Transkriptionsfaktor an die DNA binden (Levy & Darnell, 2002; McBride *et al.*, 2002; Sandberg *et al.*, 2004). Dieser JAK-abhängige Signalweg ist nicht nur für Zytokinrezeptoren beschrieben, sondern auch für den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (Andl *et al.*, 2004).

Die Aktivierung von STATs kann aber auch über den JAK-unabhängigen Weg erfolgen (Leaman *et al.*, 1996). Dabei werden die STATs von der Src-Kinase, welche über aktivierte RTKs, wie z. B. EGFR oder PDGFR, ihre Aktivierung erhält, am Tyrosinrest phosphoryliert (Rawlings *et al.*, 2004). Es ist zwar eine Assoziation von STATs mit RTKs beschrieben, allerdings konnte eine direkte Aktivierung bislang nicht gezeigt werden (Darnell, 1997). Eine zweite Variante der JAK-unabhängigen Aktivierung von STATs findet über MAPK statt, welche die meisten STATs an einem Serin in der Nähe des C-Terminus phosphoryliert (Rawlings *et al.*, 2004).

1.1.2 Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor TrkA

Der Rezeptor für den Nerven-Wachstumsfaktor (NGF; *n*erve *g*rowth *f*actor) TrkA bildet mit TrkB und TrkC die Unterfamilie VII der Rezeptortyrosinkinase (Abbildung 1.1), die Familie der Trk-Rezeptoren (Barbacid, 1994). Der strukturelle Aufbau des extrazellulären Bereiches ist ähnlich und besteht, wie in Abbildung 1.6 für TrkA zu sehen ist, aus zwei cysteinreichen Gruppen, die drei Reihen leucinreicher Motive flankieren, gefolgt von zwei C2-Typ Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen (Schneider & Schweiger, 1991). Über die zweite Ig-ähnliche Domäne von TrkA erfolgt vorzugsweise die Bindung des Liganden NGF (Kaplan *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 2001). Wie bei allen RTKs wird auch bei TrkA der extrazelluläre Bereich durch eine Transmembrandomäne mit dem intrazellulären Bereich, in welchem die Tyrosinkinase-Domäne lokalisiert ist, verbunden (Huang & Reichardt, 2003).

Die Aktivierung für das menschliche TrkA erfolgt durch die Autophosphorylierung von den Aminosäuren Y670, Y674 und Y675 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne (Cunningham *et al.*, 1997). Weiterhin werden zwei Tyrosinreste außerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert, in der Juxtamembran-Domäne Y490 und am C-Terminus Y785 (Stephens *et al.*, 1994). Die Phosphorylierungsstellen bilden für Adapterproteine mit SH2- oder PTB-Domäne Anbindungsstellen, wodurch die Signalwege MAPK, PI3K und PLC- γ_1 aktiviert werden (Kaplan & Miller, 1997; Reichardt, 2006). Über pY490 interagieren Shc, das Fibroblasten-Wachstumsfaktor-

Rezeptor Substrat 2 (Frs2) und einige andere Adapter mit TrkA, während an pY785 PLC- γ_1 rekrutiert wird (Stephens *et al.*, 1994; Meakin *et al.*, 1999).

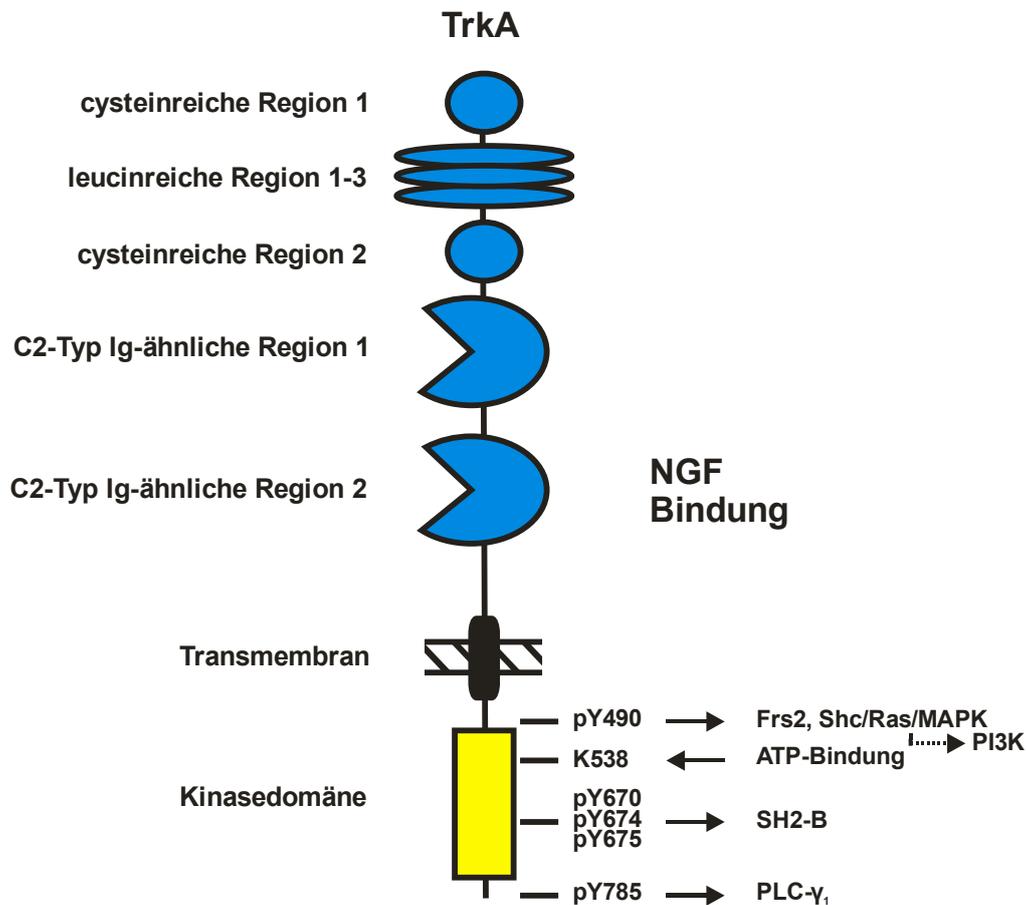


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des menschlichen Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptors TrkA (modifiziert nach Bibel & Barde, 2000).

Das Schema zeigt den strukturellen Aufbau von TrkA. Im extrazellulären Bereich werden drei leucinreiche Regionen von zwei cysteinreichen Regionen flankiert, gefolgt von zwei Ig-ähnlichen Regionen vom Typ C2. Die Bindung vom Liganden NGF erfolgt über die zweite Ig-ähnliche Region. Nach der Transmembran-Domäne folgt die Kinasedomäne mit ihren Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren Y490, Y670, Y674, Y675 und Y785 und der ATP-Bindungsstelle bei der Aminosäure K538. Über die phosphorylierten Tyrosine erfolgt die Bindung verschiedener Signalmoleküle, über die wiederum die Signalkaskaden MAPK, PI3K oder PLC- γ_1 aktiviert werden.

Für TrkA ist beschrieben, dass es an der Differenzierung und dem Überleben bestimmter Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems beteiligt ist (Snider, 1994). Aber TrkA spielt nicht nur eine Rolle in der Differenzierung. In hämatopoetischen Zellen, wie etwa für B-Zellen, konnte für TrkA gezeigt werden, dass es zur Differenzierung und Proliferation führt (Coppola *et al.*, 2004). Weiterhin ist TrkA in Leukämie-Zellen mit akuter myeloischer Leukämie (AML) (Li *et al.*, 2009b) und chronischer myeloischer Leukämie (CML), wie zum Beispiel in der Zelllinie K562 (Kaebisch *et al.*, 1996), gefunden worden. In Anwesenheit des Medikaments Imatinib verursacht TrkA in Leukämie-Zellen Überleben und Proliferation (Koch *et al.*, 2008;

Dutta *et al.*, 2011). Für TrkA ist auch beschrieben, dass es in der Entwicklung von verschiedenen Krebsarten involviert ist, wie zum Beispiel Lungen- oder Brustkrebs (Ricci *et al.*, 2001; Lagadec *et al.*, 2009).

In mutierter Form ist TrkA auch in anderen Krebserkrankungen entdeckt worden, darunter in akuter myeloischer Leukämie (Reuther *et al.*, 2000), Schilddrüsen- (Greco *et al.*, 1993), Prostata- (George *et al.*, 1998) und Kolonkarzinom (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Entdeckt wurde TrkA als Fusionsprotein aus einem Kolonkarzinom isoliert, wobei ein Teil des extrazellulären Bereiches von TrkA durch Tropomyosin ersetzt ist und ursprünglich als *tropomyosin receptor kinase* (trk) bezeichnet worden ist (Martin-Zanca *et al.*, 1986 & 1989). Dadurch liegt TrkA nicht nur dauerhaft aktiviert vor, sondern auch im Zytosol lokalisiert (Mitra *et al.*, 1987). Die in der akuten myeloischen Leukämie gefundene mutierte Form von TrkA, Δ TrkA, ist ebenfalls dauerhaft aktiviert, allerdings bedingt durch das Fehlen von 75 Aminosäuren im extrazellulären Bereich, wodurch der Hauptbereich der zweiten Ig-ähnlichen Region fehlt und zur Liganden-unabhängigen Dimerisierung führt (Reuther *et al.*, 2000). In hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen (*hematopoietic stem/progenitor cells*; HSC/HPC) offenbart Δ TrkA ein leukämogenes Potential (Meyer *et al.*, 2007).

1.1.3 Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor c-Fms

Der Rezeptor für den Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (CSF-1 oder M-CSF) ist c-Fms, der auch als CSF-1R bezeichnet wird (Sherr *et al.*, 1985). Innerhalb der RTKs hat c-Fms die Zugehörigkeit zu der Unterfamilien III (Abbildung 1.1), in die auch die RTKs c-Kit, FLT3 und PDGFR α & β gehören, die zusammen die Familie der PDGF-Rezeptoren bilden (Yarden & Ullrich, 1988). Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf Ig-ähnlichen Domänen (Abbildung 1.7). Dabei bindet der Ligand über die ersten drei Domänen (Wang *et al.*, 1993) und die vierte Ig-ähnliche Domäne ist an der Dimerisierung beteiligt (Carlberg & Rohrschneider, 1994). Der strukturelle Aufbau ist wie bei allen RTKs, mit dem Unterschied, dass die Kinasedomäne durch die Kinase-Insert (KI) Domäne in die Kinasedomäne 1 (K1), mit der ATP-Bindungsstelle bei Aminosäure K616 für das menschliche c-Fms, und in die Kinasedomäne 2 (K2), mit der Aktivierungsschleife in der Hauptkinase unterteilt vorliegt (Sherr, 1990).

Nach der Dimerisierung von c-Fms erfolgt innerhalb des intrazellulären Bereiches von c-Fms die *trans*-Autophosphorylierung an acht Tyrosinresten, die als Bindungsstellen für Adapterproteine fungieren können (Li & Stanley, 1991; Yeung & Stanley, 2003; Abbildung 1.7). Zwei Phosphorylierungsstellen sind in der Juxtamembran identifiziert worden (Joos *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1995), die für das menschliche c-Fms bei Aminosäure Y546 und Y561 liegen. Innerhalb der KI Domäne befinden sich bei den Aminosäuren Y699, Y708, Y723 beim menschlichen c-Fms drei Tyrosinreste, die phosphoryliert werden (Tapley *et al.*, 1990; Reedijk *et al.*, 1992). Eine weitere Phosphorylierungsstelle liegt in der Aktivierungsschleife der Hauptkinase Domäne an der Aminosäure Y809 des menschlichen c-Fms (Roussel *et al.*, 1990). Außerdem wurden zwei weitere Phosphorylierungsstellen am

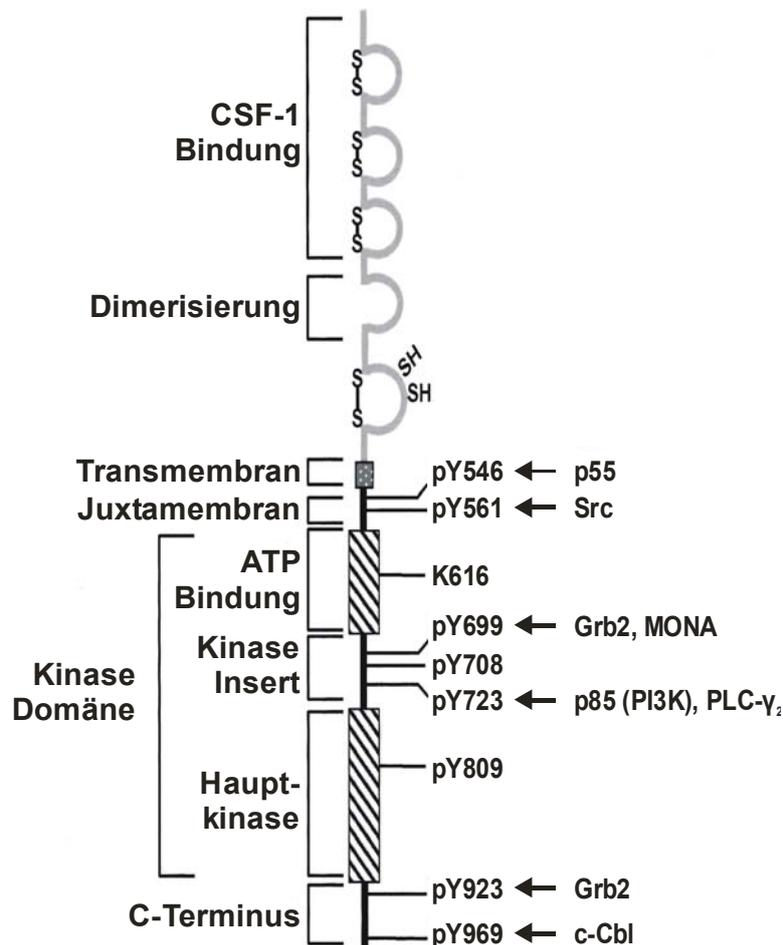


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des menschlichen Makrophagen koloniestimulierenden Faktor-Rezeptors c-Fms (modifiziert nach Yeung & Stanley, 2003).

Das Schema zeigt den strukturellen Aufbau von c-Fms. Im extrazellulären Bereich sind fünf Ig-ähnliche Regionen gezeigt, von denen die ersten drei der Bindung von CSF-1 dienen und die vierte bei der Dimerisierung involviert ist. Auf die fünfte Ig-ähnliche Region folgt der intrazelluläre Bereich mit der Transmembrandomäne, der Juxtamembrandomäne, der geteilten Kinasedomäne mit der ATP-Bindungsstelle bei Aminosäure K616, der Kinase-Insert Domäne und der Hauptkinase und abschließend dem C-Terminus. Innerhalb des intrazellulären Bereiches sind acht phosphorylierte Tyrosinreste (Y546, Y561, Y699, Y708, Y723, Y809, Y923 und Y969) zu finden, über die die Aktivierung der Signalwege MAPK, PI3K und PLC- γ_2 erfolgt.

C-terminalen Ende identifiziert (Mancini *et al.*, 1997 & 2002), die im menschlichen c-Fms bei Aminosäure Y923 und Y969 liegen. Über die verschiedenen pY-Bindungsstellen werden Signalmoleküle aktiviert, die Signalwege in Gang setzen, wie MAPK über Grb2, PI3K über p85 oder PLC- γ_2 (Reedijk *et al.*, 1992; van der Geer & Hunter, 1993, Bourette *et al.*, 1997; Abbildung 1.7).

Ist c-Fms aktiviert, führt es in seiner normalen Funktion zur Differenzierung, Überleben und Aktivierung von phagozytischen Zellen wie Makrophagen und Osteoklasten (Stanley *et al.*, 1983; Cecchini *et al.*, 1997). Weiterhin ist beschrieben, dass c-Fms an der Entwicklung der Prostata (Ide *et al.*, 2002) und weiblichen Milchdrüse (Pollard & Hennighausen, 1994) sowie der Trophoblasten Implantation und Differenzierung der Plazenta beteiligt ist (Pampfer *et al.*, 1992).

c-Fms wurde als zelluläres Homolog zum retroviralen Onkogen v-Fms des Susan McDonough Stamm des Katzen Sarkomvirus identifiziert, woher auch die Bezeichnung für Fms (*feline* ***McDonough*** *sarcoma*) stammt (Heisterkamp *et al.*, 1983; McDonough *et al.*, 1971). Auch wurde c-Fms in einer Vielzahl von Krebsarten epithelialen Ursprungs nachgewiesen, wie Brust-, Eierstock-, Lungen oder Prostatakrebs (Kacinski, 1997; Ramakrishnan *et al.*, 1989; Ide *et al.*, 2002).

Für c-Fms sind zwei Promotoren beschrieben. Einer befindet sich im Exon 2 und ist ein spezifischer Promotor von c-Fms in Makrophagen und der andere liegt im Exon 1 und wird nur von Trophoblasten reguliert (Hume *et al.*, 1997). Das menschliche c-Fms wird in einigen Brustkrebs-Zelllinien durch Glucocorticoide hormonell reguliert und führt zu erhöhter Transkriptbildung und Proteinexpression (Flick *et al.*, 2002; Sapi *et al.*, 1995).

1.2 Proteolytische Spaltung von Transmembranrezeptoren

Zellmembrangebundene Proteine, wie RTKs, werden nicht nur über ihre Liganden reguliert, sondern es besteht auch die Möglichkeit, dass sie proteolytisch gespalten werden durch einen Vorgang, der als regulierte Intramembranproteolyse (RIP) bezeichnet wird (Brown *et al.*, 2000). RIP besteht aus zwei Prozessen: der Abspaltung des extrazellulären Bereiches durch Metalloproteasen und der Spaltung der Transmembrandomäne durch intramembranspaltende Proteasen (Ancot *et al.*, 2009). Durch diese Prozesse wird eine intrazelluläre Domäne (ICD) gebildet, die degradiert wird oder an der Signaltransduktion im Zytosol bzw. im Zellkern beteiligt sein kann (Lichtenthaler *et al.*, 2011).

Die Abspaltung des extrazellulären Bereiches, welche auch als *Ectodomain Shedding* bezeichnet wird, erfolgt unter anderem über Mitglieder der ADAM Metalloproteasen, wie ADAM10 oder ADAM17, die auch als Sheddasen bezeichnet werden (Brou *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2002; Abbildung 1.8, Bild 2). Die anfängliche Spaltung der Ektodomäne ist notwendig, damit die Spaltung der Transmembrandomäne durch den γ -Sekretase-Komplex erfolgen kann (Brown *et al.*, 2000). Der γ -Sekretase-Komplex besteht jeweils aus einer Untereinheiten von Präsenilin (PS), PEN-2 (*presenilin-enhancer-2*), APH-1 (*anterior-pharynx-defective-1*) und Nicastrin (Sato *et al.*, 2007). Die katalytische Untereinheit Präsenilin kommt in zwei homologen Formen, PS1 und PS2, vor (Wolfe, 2009) und Nicastrin übernimmt im γ -Sekretase-Komplex die Funktion des Substrat-Akzeptors (Shah *et al.*, 2005; Abbildung 1.8). Unterdessen fungieren APH-1, mit einer seiner drei Isoformen, APH-1aS, APH-1aL oder APH-1b, und PEN-2 als Stabilisatoren und Regulatoren des γ -Sekretase-Komplexes (Luo *et al.*, 2003; Francis *et al.*, 2002).

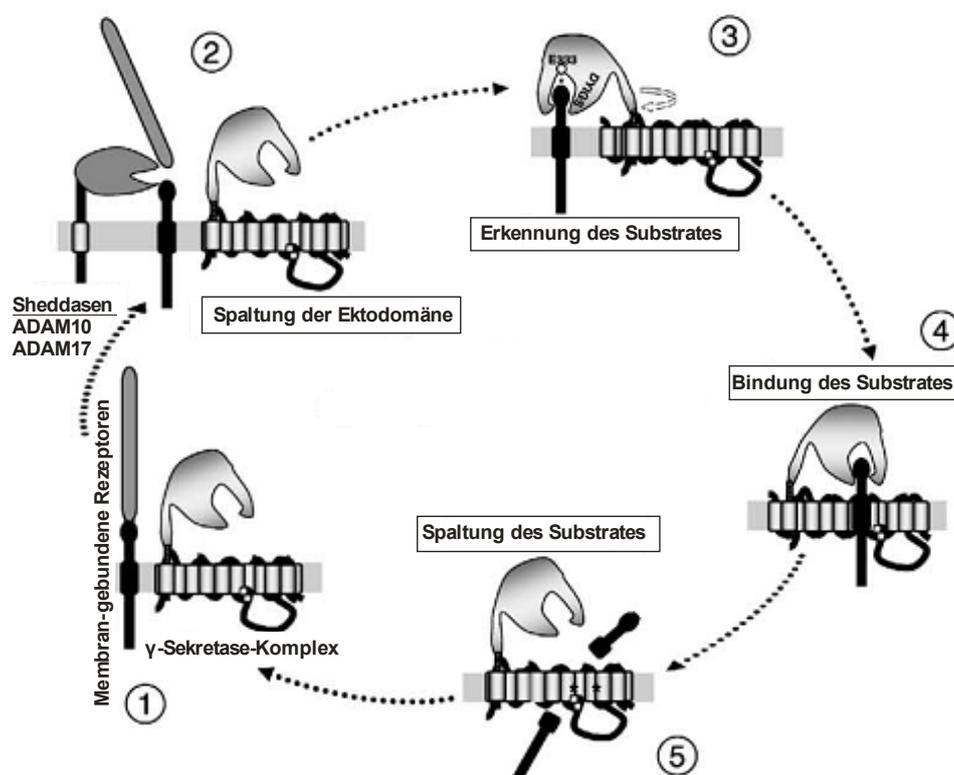


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der regulierten Intramembranproteolyse (RIP; modifiziert nach Shah *et al.*, 2005).

Dargestellt ist der Zyklus der regulierten Intramembranproteolyse (RIP). Rezeptor-Proteine, wie RTKs, und der γ -Sekretase-Komplex sind in der Plasmamembran lokalisiert (1). Über membranständige Proteasen, wie die Sheddasen ADAM10 und ADAM17, erfolgt die Abspaltung der Ektodomäne (2). Über Nicastrin erfolgt die Substrat-Erkennung (3). Das gebundene Substrat wird in den katalytischen Bereich von Präsenilin verlagert (4). Durch den γ -Sekretase-Komplex wird das Substrat in der Transmembrandomäne gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (ICD) entsteht (5).

Die klassischen Beispiele für RIP sind der Notch-Signalweg und das Zerschneiden des Amyloid-Vorläuferproteins APP (Ebinu & Yankner, 2002), welche dadurch ihre Aktivität erlangen. Die bei der Spaltung freigesetzten ICDs von Notch und APP gelangt in den Zellkern und interagieren dort mit DNA-bindenden Proteinen (Schroeter *et al.*, 1998; Cao & Sudhof, 2001). Auch für eine Vielzahl von RTKs wurde die proteolytische Spaltung über RIP gezeigt (Ancot *et al.*, 2009). Dazu gehören unter anderem die Tyrosinkinase ErbB4 (Zeng *et al.*, 2009), c-Met (Schelter *et al.*, 2010), c-Kit (Cruz *et al.*, 2004), TrkA (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999), c-Fms (Wilhelmsen & van der Geer, 2004) und Ryk (Lyu *et al.*, 2008), bei denen die Abspaltung der Ektodomäne über ADAM10 oder ADAM17 verläuft. Unter diesen wurde für FGFR3 festgestellt, dass die Spaltung des extrazellulären Bereiches über Cathepsine erfolgt (Degnin *et al.*, 2011). Weiterhin ist für TrkA, FGFR3 und ErbB4 gezeigt worden, dass die löslichen ICDs an Tyrosinresten phosphoryliert sind und Signalwege aktiviert werden können. Für die Funktion der ICD von ErbB4 wird vermutet, dass es im Zellkern als Transaktivator fungiert, und es wurde berichtet, dass es als nukleäres Chaperon für STAT5A agiert (Ni *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004). Die ICD von c-Fms wurde in Makrophagen nachgewiesen, wo es auch im Zellkern vorzufinden ist und es im Proteasom degradiert wird, allerdings ist die Funktion für die c-Fms-ICD nicht bekannt (Wilhelmsen & van der Geer, 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden Rezeptortyrosinkinasen c-Fms und TrkA sind dafür bekannt, dass sie in Anwesenheit ihrer Liganden CSF-1 bzw. NGF zur Zelldifferenzierung führen. Während bei TrkA die Behandlung mit NGF in neuronalen Vorläuferzellen zur Ausbildung von Neuriten führt, ist c-Fms nach Behandlung mit CSF-1 an der Differenzierung von phagozytischen Zellen wie Makrophagen und Osteoklasten beteiligt. Neben der Differenzierung gibt es auch Hinweise darauf, dass c-Fms und TrkA an verschiedenen Krebserkrankungen beteiligt sind. So ist für beide unter anderem die Expression in Brustkrebs beschrieben (Tamimi *et al.*, 2008; Descamps *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wird die Fragestellung bearbeitet, wie sich die beiden RTKs c-Fms und TrkA in der Epithelzelllinie HEK293 im Vergleich zu ihren differenzierenden Zellsystemen verhalten und ob sie unterschiedliche zelltypspezifische Signale regulieren.

Zur Charakterisierung des zelltypspezifischen Verhaltens wurde zum einen c-Fms in Krebszellen und zum anderen die Leukämie induzierende Mutante Δ TrkA in neuronalen Zellen untersucht.

Es ist bekannt, dass proteolytische Spaltung bei RTKs eine intrazelluläre Domäne (ICD) freisetzen kann. Dies ist für c-Fms in Makrophagen aber auch in hTERT immortalisierten Epithelzellen beschrieben (Wilhelmsen & van der Geer, 2004; Li *et al.*, 2009a). Allerdings ist unklar, welche Rolle diese spielt. Daher wurde in c-Fms endogen exprimierenden Krebszelllinien die c-Fms-ICD identifiziert und anschließend charakterisiert.

Für TrkA ist die Deletionsmutante Δ TrkA beschrieben. Die Deletion bewirkt eine Daueraktivierung von Δ TrkA, die in Fibroblasten und Epithelzellen zur Transformation führt (Reuther *et al.*, 2000). Bislang ist nicht bekannt, welchen Phänotypen Δ TrkA in neuronalen Zellsystemen ausbildet und ob es sich in diesen vergleichbar zu wt-TrkA verhält.

Schließlich wurden zur Charakterisierung der c-Fms- und TrkA-Signale in Epithelzellen auf molekularer Ebene Transkriptomanalysen mittels Mikroarrays durchgeführt, die mit bereits veröffentlichten Daten verglichen wurden.

2 Material

2.1 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
6-Amino-n-hexan-säure	Serva
Acrylamid / Bisacrylamid	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) kristallisiertes Dinatriumsalz	Boehringer/Roche
Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva
BactoAgar	Difco
Benzamidin	Sigma
BisTrisPopan (BTP)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DNA Marker	Fermentas
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer
Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)	Gibco BRL/PAA
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Boehringer/Roche
FCS (Fötales Kälberserum)	PAA
Formaldehyd 37%	Merck
G418-Sulfat (Geneticin)	Gibco BRL
Glutamin	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Ham's F12	Gibco
HCl	Merck
Hefe-Extrakt	Roth
HEPES	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Merck

Laminin	Sigma
Leibovitz L15	PAN
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Molekulargewichtsmarker, Roti [®] -Mark Prestained	Roth
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth
Mowiol	Höchst AG
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumfluorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumpyruvat	Sigma
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Merck
Nonidet P-40	Sigma
Penicillin	PAN
Pepton	Difco
Pferdeserum	seromed
Phenol	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)	Sigma
Polybrene	Sigma
Polyornithin	Sigma
RNase Inhibitor	QIAGEN
RPMI1640	Biochrom
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Stickstoff	Linde
Streptomycin	PAN
TBE (5x)	Sigma
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin)	Serva
Trasylol	Bayer
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100 (Octophenolpolyethylen-glykolether)	Serva
Tween20	Roth
Zinkchlorid	Merck

2.2 Bakterienkulturen

Alle verwendeten Bakterienstämme sind Abkömmlinge des *E. coli* Sicherheitsstamms K12, welchem die Gene für die Pathogenität fehlen. K12 besitzt keine Toxine, keine Fimbrienadhäsine, kein Eisenaufnahmesystem, keine Plasmide und ein reduziertes O-Antigen.

HB101: F⁻, hsdS20 (r-B, m-B), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK-2, rpsL20(str_R), xyl- 5, mtl-1, supE44 (Bolivar *et al.*, 1977; Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)

Dieser Bakterienstamm wird bevorzugt zur Transformation von Ligationsansätzen verwendet.

DH5α: F⁻, recA1, endA1, gyrA96 (nal⁺), thi, hsdR17, supE44, relA1 (Gibco BRL)
Aus diesem Stamm gewonnene DNA eignet sich besser zur Sequenzierung als die aus HB101.

2.3 Zelllinien

5T6	stabil TrkA-exprimierende HEK293-Zellen (Koch <i>et al.</i> , 2008)
A-431	epidermoide Karzinom-Zelllinie, DSMZ ACC 91
A-549	Lungenkarzinom-Zelllinie, DSMZ ACC 107
BeWo	Chorionkarzinom-Zelllinie, DSMZ ACC 458
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen, DSMZ ACC 305
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie, DSMZ ACC 57
MDA-MB-231	Brustkarzinom-Zelllinie; ATCC HTB-26
NIH 3T3	Maus-Fibroblasten etabliert aus NIH Swiss Embryos (Jainchill <i>et al.</i> , 1969); DSMZ ACC 59
PC12	Phäochromozytom-Zellen aus Ratte, DSMZ ACC 159
Phoenix-gp	Verpackungszelllinie für Retroviren auf HEK 293-Basis (von G. Nolan); zur Verfügung gestellt von Dr. J. Meyer
SC-1	Mausfibroblasten-Zellen, ATCC CRL-1404; zur Verfügung gestellt von Dr. J. Meyer
SH-SY5Y	menschliche Neuroblastoma-Zelllinie, DSMZ ACC 209
T15	stabil TrkA-exprimierende NIH3T3 (Koch <i>et al.</i> , 2008)

2.4 Radioaktive Substanzen

γ [³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) Hartmann, Amersham

2.5 Wachstumsfaktoren

CSF-1 PeptoTech Inc.
NGF (aus Maus Submaxillardrüsen 7S) Boehringer/Roche

2.6 Inhibitoren

Compound E	Alexis Biochemicals
STI 571	Novartis Pharma AG

2.7 siRNA

c-Fms/CSF-1R siRNA (h)	Santa Cruz
control siRNA A	Santa Cruz

2.8 Transfektionsreagenzien

Nanofectin Kit	PAA
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Polyfect® Transfection Reagent	QIAGEN
Magnet assisted Transfection	IBA

2.9 Desoxyribonukleinsäuren

λ-DNA	Boehringer/Roche
Oligonukleotide	Eurofins MWG Operon

2.9.1 Oligonukleotide

c-Fms (human)	vorwärts	5'-CAG AGC CAG GAC TAT CAA TGC-3'
	rückwärts	5'-CTG GCT GAG CAC ACG ATC T-3'
CSF-1 (human)	vorwärts	5'-ACG ACA TGG CTG GGC TCC CT-3'
	rückwärts	5'-TTC TCC AGC AAC TGG AGA GGT G-3'
ACTB (human)	vorwärts	5'-CCC AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT-3'
	rückwärts	5'-GTC CCG GCC AGC CAG GTC CAG-3'
T7		5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

2.10 Plasmide

pEGPF-C2 (Clontech)

Dieses Plasmid kodiert für das Protein GFP und enthält eine Kanamycinresistenz

c-Fms cDNA

Die cDNA von c-Fms in einem retroviralen Vektor des feline Sarkoma-Virus. Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Roussel aus Memphis, USA.

pEGPF-C2 c-Fms-ICD

Ein Derivat vom pEGFP-Plasmid, das für GFP kodiert und die intrazelluläre Domäne von c-Fms. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pEGPF-C2 c-Fms-ICD K616M

Ein Derivat vom pEGFP-Plasmid, das für GFP kodiert und die intrazelluläre Domäne von c-Fms. Dabei ist die kodierende Sequenz für die Aminosäure 616 von Lysin zu Methionin ausgetauscht, wodurch die Kinasefunktion inaktiviert wird. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pEGPF-C2 c-Fms-ICD Δ 676-711

Ein Derivat vom pEGFP-Plasmid, das für GFP kodiert und die intrazelluläre Domäne von c-Fms. Dabei ist die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 676 bis 711 entfernt, in dem mögliche Kernlokalisierungssignale lokalisiert sind. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pEGPF-C2 c-Fms-ICD RRK/AAA

Ein Derivat vom pEGFP-Plasmid, das für GFP kodiert und die intrazelluläre Domäne von c-Fms. Dabei ist die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 676 bis 678 vom Motiv Arginin Arginin Lysin zu Alanin Alanin Alanin ausgetauscht, eine mögliche Kernlokalisierungssignal-Motiv. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pEGPF-C2 c-Fms-ICD K678Q

Ein Derivat vom pEGFP-Plasmid, das für GFP kodiert und die intrazelluläre Domäne von c-Fms. Dabei ist die kodierende Sequenz für die Aminosäure 678 von Arginin zu Glutamin ausgetauscht, in einem möglichen Motiv für ein Kernlokalisierungssignal. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

HA pCMV 5 c-Fms-ICD

Ein Derivat vom HA pCMV 5-Plasmid, das für einen HA-Anhang und die c-Fms-ICD kodiert. Es enthält eine Ampicillinresistenz. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pCMV-Tag3 c-Fms-ICD

Ein Derivat vom pCMV Tag3-Plasmid (Stratagene), das für einen myc-Anhang und die c-Fms-ICD kodiert. Es enthält eine Kanamycinresistenz. Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Niemann-Seyde aus Hannover, Physiologische Chemie.

pcDNA3.1 B (Invitrogen)

Dieses Plasmid enthält eine Ampicillinresistenz.

pcDNA3.1 B wt-TrkA

Ein Derivat vom pcDNA3.1 B-Plasmid, das für wt-TrkA kodiert. Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Koch aus Hannover, Physiologische Chemie.

pcDNA3.1 B ΔTrkA

Ein Derivat vom pcDNA3.1 B-Plasmid, das für ΔTrkA kodiert. In das Plasmid über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* eingefügt. Generiert in dieser Arbeit.

pBABEpuro ΔTrkA

Ein retroviraler Vektor der ΔTrkA kodiert. Es enthält eine Ampicillinresistenz. Zur Verfügung gestellt von Dr. Z. Li aus Hannover, Experimentelle Hämatologie mit Genehmigung von Dr. G. Reuther aus Tampa, USA.

R511

Ein retroviraler Vektor, der zur Verfügung gestellt wurde von Dr. A. Koch aus Hannover, Physiologische Chemie. Enthält eine Ampicillinresistenz.

R511 Δ TrkA

Ein Derivat vom retroviraler Vektor R511, der für Δ TrkA kodiert. In den Vektor über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* eingefügt. Generiert in dieser Arbeit.

TrkA cDNA

Die cDNA von TrkA in einem retroviralen Vektor. Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Barbacid aus Madrid, Spanien.

HR269 HACD34

Ein gamma retroviraler Vektor auf der Basis des murinen Leukämievirus. Kodiert für einen HA-Anhang und das Glykoprotein CD34. Hergestellt in der Experimentellen Hämatologie, MHH und zur Verfügung gestellt von Dr. J. Meyer.

HR295 wtHATrkA

Ein gamma retroviraler Vektor auf der Basis des murinen Leukämievirus. Kodiert für einen HA-Anhang und wt-TrkA. Hergestellt in der Experimentellen Hämatologie, MHH und zur Verfügung gestellt von Dr. J. Meyer.

HR297 HA Δ TrkA

Ein gamma retroviraler Vektor auf der Basis des murinen Leukämievirus. Kodiert für einen HA-Anhang und Δ TrkA. Hergestellt in der Experimentellen Hämatologie, MHH und zur Verfügung gestellt von Dr. J. Meyer.

2.11 Enzyme

DNase I, RNase-frei	QIAGEN, Invitrogen
Endo-H	New England Biolabs
Kalbsdarm alkalische Phosphatase (1U/ μ L)	Boehringer/Roche
Restriktionsendonukleasen	Stratagene, Fermentas, New England Biolabs
Reverse Transkriptase	QIAGEN
RNase A	QIAGEN
T4-DNA Ligase	Promega, Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/ μ l)	Fermentas
Trypsin (5x)	Gibco BRL

2.12 Kits

BigDye™ Terminator	Perkin-Elmer
DNA-Sequenzier-Kit BigDye™ Terminator,	Perkin-Elmer
Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, Two Color	Agilent
Omniscript RT Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
Whole Human Genome Microarray Kit	Agilent

2.13 Antikörper

α -Akt, polyklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -c-Fms, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz
α -Erk1/2, polyklonal aus Kaninchen	Promega
α -GAPDH, monoklonal aus Maus	Santa Cruz
α -GPF, monoklonal aus Maus	Santa Cruz
α -HA, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz
α -Histon H3, polyklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -HSP70, polyklonal aus Ziege	Santa Cruz
α -Kaninchen IgG-FITC	Sigma
α -Kaninchen mit HRP-gekoppelt	Santa Cruz
α -Lamin A/C (4C11), monoklonal aus Maus	Cell Signaling
α -Maus-IgA, polyklonal aus Kaninchen	Sigma
α -Maus IgG-FITC	Sigma
α -Maus IgG-TRITC	Sigma
α -Maus mit HRP-gekoppelt	Santa Cruz
α -Myc (9E10), monoklonal aus Maus	Santa Cruz
α -phospho-Akt (Ser473; D9E), monoklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -phospho-Erk1/2, polyklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -phospho-STAT3, polyklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -phospho-STAT5, polyklonal aus Kaninchen	Cell Signaling
α -phospho-Tyrosin (pY99), monoklonal aus Maus	Santa Cruz
α -phospho-Y708 c-Fms, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz
α -STAT3, monoklonal aus Maus	BD Transduction Laboratories
α -STAT5, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz
α -THOC5, aus Kaninchen	Bethyl Laboratories
α -Transferrin Rezeptor, monoklonal aus Maus	Zymed Laboratories
α -TrkA (B3), monoklonal aus Maus	Santa Cruz
α -TrkA (C14), polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz
α -Ziege mit HRP-gekoppelt	Santa Cruz

2.14 Sonstige Materialien

12-Loch-Platten	Nunc
24-Loch-Platten	Nunc
6-Loch-Platten	Nunc

Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Chromatographie-Papier, Whatman 3MM	Pierce
Einmal-Sterilfilter (0,2µm)	Schleicher & Schuell
Eppendorfreaktionsgefäße	Sarstedt
FACS-Gefäße	Greiner
Filmkassetten Cronex high plus	DuPont
Filmkassetten ohne Verstärkerfolie	Siemens
Filterspitzen	Biozym
Gewebekulturflaschen mit Filter	Nunc, TPP
Kryoröhrchen	Nalgene, Falcon
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell
Petrischalen 15 cm, quadratisch	Greiner
Petrischalen für die Gewebekultur	Greiner
Petrischalen rund	Greiner
Röntgenfilm X-OMAT™	Kodak
sterile Spritzen 10 ml	Braun
Sterilfilter	Nalgene
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt
Zentrifugengefäße 15ml	Sarstedt
Zentrifugengefäße 50ml	Falcon

2.15 Geräte

ABI Prism 310 Sequencer	Perkin-Elmer
Bakterienschüttler	GFL
Bioimager BAS-1500 Fujifilm	Fuji Photo Film
Brutschränke	Memmert
CO ₂ -Inkubator	Thermoquest
DS-Fil digitale Farbkamera	Nikon
Durchflußzytometer (FACScalibur)	Becton-Dickinson
Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt Von Keutz
Elektroporator	Bio-Rad
Eppendorfzentrifuge 5804 (R)	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Forschungsmikroskop "Universal"	Zeiss
Geldokumentationsanlage	Intas
Geltrockner	Zentralwerkstatt Von Keutz
Heizblock	Eppendorf
Kocher	Köttermann
LAS4000	GE Healthcare Bio-Science
Nikon Eclipse TE 300 Mikroskop	Nikon
Steril-Werkbank	Heraeus Christ

Stromspannungsquelle	Biometra
Thermocycler	Biometra
Tisch-Ultrazentrifuge	Beckmann
Tischzentrifuge	Eppendorf
UV-Lampe	Vilber Lourmat
Vortex	Eppendorf
Wasserbad	Köttermann
Westernblot-Kammer	Zentralwerkstatt Von Keutz
Zählkammer	Kühn & Bayer

2.16 Firmen

Alexis Biochemicals	San Diego, USA
Amersham Life Sci.	Braunschweig, Deutschland
Bayer	Leverkusen, Deutschland
BD Transduction Laboratories	San Jose, USA
Beckmann Instruments	Palo Alto, USA
Becton-Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Bethyl Laboratories	Montgomery, USA
BIO 101	La Jolla, USA
Bio Rad	Richmond, USA
Biochrom KG	Berlin, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Boehringer/Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Branson	USA
Braun	Melsungen, Deutschland
Clontech	Palo Alto, USA
Cytomation Inc.	Dubrillion, Helska Sys.
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco	Detroit, USA
DuPont	Bad Homburg, Deutschland
Dynal	Oslo, Norwegen
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
Eurogentech	Seraing, Belgien
Falcon	Heidelberg, Deutschland
Fuji Photo Film	Kanagawa, Japan
GE Healthcare Bio-Science	Uppsala, Schweden
Genomed	Bad Oeynhausen, Deutschland
GFL	Burgwedel, Deutschland
Gibco BRL	Eggenstein, Deutschland

Greiner GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Christ	Köln, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Höchst AG	Frankfurt/M., Deutschland
ICN	Eschwege, Deutschland
Intas	Göttingen, Deutschland
Invitrogen	Groningen, Niederlande
Kodak	New Haven, USA
Köttermann	Hänigsen, Deutschland
Kühn & Bayer	Nidderau, Deutschland
Memmert	Schwabach, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Nalgene (Nalge Nunc Int.)	Rochester, USA
New England Biolabs	Beverly, USA
Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Novartis Pharma AG	Basel, Schweiz
Nunc (Nalge Nunc nt.)	Rochester, USA
PAA Lab.	Cölbe, Deutschland
PAN	Aidenbach, Deutschland
Perkin-Elmer	Forster City, USA
Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Pierce	Rockford, IL, USA
Promega	Madison, USA
QIAGEN	Hilden, Deutschland
Quantum Biotech. Inc.	Montreal, CAN
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz	Biotech. Santa Cruz, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Schleicher und Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Siemens	Frankfurt/M., Deutschland
Sigma	München, Deutschland
Sorvall/Du Pont Instruments	Bad Nauheim, Deutschland
Stratagene	La Jolla, USA
Terumo Europe	Leuven, Belgien
Thermoquest	Engelsbach, Deutschland
Transduction-Laboratories	Kensington, USA
UBI	Lake Placid, USA
Vilber Lourmat	Cedéx, Frankreich
Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Zentralwerkstatt Von Keutz	Reiskirchen, Deutschland

3 Methoden

3.1 Prokaryotische Kultivierungsmethoden

3.1.1 Wachstumsbedingungen und Kulturmedien für Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien ist für die Isolierung von Plasmid-DNA (3.2.1) und die Herstellung von kompetenten Bakterien (3.1.2.2) erforderlich. Für die Isolierung von Plasmid-DNA wird eine Übernachtskultur (ÜNK) mit einer Bakterien-Einzelkolonie von einer 2YT-Agar-Platte in 3 mL 2YT-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum überimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Bakterienkultur wird entweder nach 12 – 16 h in einem Eppendorfgefäße bei Raumtemperatur für 3 min mit 8.000 rpm abzentrifugiert und ist für die Aufbereitung in einer Minipräparation (3.2.1.1) verfügbar oder wird nach 5 – 6 h im Verhältnis 1:100 in 50 – 100 mL 2YT-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum überimpft und für 12 – 16 h bei 37 °C inkubiert. Diese Kultur wird für 10 min mit 5.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und ist für die Aufbereitung in einer Midipräparation (3.2.1.2) verfügbar.

<u>2YT-Medium</u>	1 % Hefe-Extrakt (w/v)
	1,6 % Pepton (w/v)
	0,5 % NaCl (w/v)
<u>2YT-Agar-Platten</u>	2 % Agar (w/v)
	2YT-Medium
	autoklavieren
<u>Antibiotika</u>	100 µg/mL Ampicillin
	25 µg/mL Kanamycin

3.1.2 Bakterielle Transformation

3.1.2.1 Calciumchlorid-Methode

(nach Cohen *et al.*, 1972)

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterien, die von Natur aus nicht in der Lage sind, DNA mit hoher Effizienz aufzunehmen, wird durch die Behandlung derselben mit Calciumchlorid (CaCl₂) ermöglicht. So behandelte Bakterien bezeichnet man als „kompetent“. Diese Methode kann zur Vermehrung der DNA verwendet werden. Positive Transformanten lassen sich durch Antibiotika-Resistenzen selektieren, die auf den Plasmiden kodiert sind.

3.1.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einem geeigneten *E. coli*-Stamm (2.2) wird eine Einzelkolonie in 5 mL 2YT-Medium ohne Antibiotikum überimpft und über Nacht herangezogen. Von dieser Vorkultur werden 500 μ L in 50 mL 2YT-Medium angeimpft und für 2 – 4 h bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen, was in etwa einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/mL entspricht. Danach wird die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis gestellt, bevor sie bei 4 °C für 10 Minuten mit 4.000 rpm erneut abzentrifugiert wird. Das Pellet wird, mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens, in eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien abermals zentrifugiert werden. Dieses Pellet wird dann mit 200 μ L eiskalter CaCl₂-Lösung für $1,5 \times 10^8$ Zellen, was etwa zwei bis vier Transformationsansätzen entspricht, vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 1/15 Volumenteilen Glycerin werden die kompetenten Bakterien in Stickstoff eingefroren und können so für mehrere Wochen bei -70 °C aufbewahrt werden.

Calciumchlorid-Lösung 50 mM CaCl₂
10 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.1.2.3 Transformation kompetenter Bakterien

Für jede Transformation werden 50 – 100 μ L kompetente Bakterien eines *E. coli*-Stammes (2.2) mit 50 – 100 ng Plasmid-DNA (3.2.1) oder 10 μ L eines Ligationsansatzes (3.2.2.2) für 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird für 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und für weitere 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend werden 150 – 200 μ L vorgewärmtes 2YT-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und 45 min bei 37 °C und 180 rpm im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Transformationsansätze auf antibiotikumhaltige 2YT-Agar-Platten ausplattiert, wobei Transformationen mit den Ligationsansätzen komplett und die Transformationen mit Plasmid-DNA nur mit einem Fünftel des Ansatzes ausgestrichen werden. Nach 12 – 16 h Inkubation bei 37 °C sind einzelne Bakterien-Kolonien zu erkennen. Diese werden für die Aufbereitung der Plasmid-DNA in einer Mini- (3.2.1.1) oder Midipräparation (3.2.1.2) mit sterilen Zahnstochern in 3 mL 2YT-Medium mit Antibiotikum überimpft und zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die hier genannten DNA-Präparationsverfahren basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode von (Birnboim & Doly, 1979). Dabei macht man sich die unterschiedlichen Eigenschaften von genomischer Bakterien-DNA und Plasmid-DNA zunutze. Bei der alkalischen Lyse der Bakterienzellwand werden die linearen Stränge der hochmolekularen genomischen DNA der Bakterien irreversibel denaturiert. Die kovalent geschlossenen, ringförmigen Stränge der Plasmid-DNA dagegen können nicht voneinander getrennt werden. Diese erhalten bei der anschließenden Neutralisation ihre native Konformation zurück, während die chromosomale DNA mit den Zellwandtrümmern pelletiert wird.

Die Firma QIAGEN, deren Kits hier verwendet werden, arbeitet mit Verfahren, die die DNA bei hohen Salzkonzentrationen auf eine Silica-Membran (QIAprep[®] Miniprep Kit) oder bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem bestimmten pH-Wert an einer Anionenaustauscher-Matrix (QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit) binden.

3.2.1.1 Minipräparation mit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit

Das Bakterienpellet einer Übernachtskultur (3.1.1) wird in 250 µL eiskaltem Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien werden mit 250 µL Puffer P2 für bis zu 5 min bei RT lysiert und anschließend mit 350 µL Puffer N3 neutralisiert. Zelltrümmer und SDS-Salze werden bei RT mit 13.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wird dann auf die QIAprep-Säule gegeben und durch Zentrifugation für 30 – 60 s auf die Membran gebunden. Die Membran wird mit 500 µL Puffer PB und anschließend 750 µL Puffer PE gewaschen. Zur möglichst vollständigen Entfernung der Salze des PB-Puffers kann der Puffer PE bis zu 5 min bei RT in der Säule stehengelassen werden, bevor er abzentrifugiert wird. Mit einer weiteren Zentrifugation von 1 min werden Reste des Puffers PE entfernt, bevor die DNA von der Säule mit 50 µL Puffer EB oder H₂O eluiert werden kann.

<u>Puffer P1</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/mL	RNase
<u>Puffer P2</u>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS (w/v)

Puffer N3, PE und PB Die genauen Inhaltsstoffe werden von der Firma QIAGEN nicht genannt.

Puffer EB 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.2.1.2 Midipräparation mit QIAGEN® Plasmid Midi Kit

Das Pellet wird in 4 mL Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 mL Puffer P2 erfolgt die Lyse für bis zu 5 min bei RT. Mit der anschließenden Zugabe von 4 mL des eiskalten Puffers P3 wird die Suspension vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden bei 4 °C für 30 min mit 5.000 rpm abzentrifugiert.

Während der Zentrifugation wird die QIAGEN-Säule 100 mit 4 mL Puffer QBT äquilibriert. Der gereinigte Überstand wird auf die Säule geladen und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA bindet an die Membran in der Säule. Die Membran wird zweimal mit 10 mL Puffer QC gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 5 mL Puffer QF eluiert wird. Durch die Zugaben von 3,5 mL Isopropanol wird die Plasmid-DNA bei RT präzipitiert. Die DNA wird für 1 h bei 4 °C mit 5.000 rpm pelletiert, bevor sie anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen wird. Die Plasmid-DNA wird an der Luft getrocknet und darauf folgend in 200 – 400 mL Puffer TE oder H₂O aufgenommen. Wird die Plasmid-DNA zur Transfektion von Zellkulturen verwendet, werden alle Schritte nach der DNA-Fällung mit Isopropanol unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Puffer P1 und P2 siehe 3.2.1.1 Minipräparation

Puffer P3 2,55 M K-Acetat, pH 4,8

Puffer QBT 750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol (v/v)
0,15 % Triton X-100 (v/v)

Puffer QC 1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol (v/v)

Puffer QF 1,6 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol (v/v)

Puffer TE 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

3.2.2 Enzymatische Modifizierung der DNA

3.2.2.1 Restriktionsenzymspaltung

(Maniatis *et al.*, 1982)

Restriktionsendonukleasen führen an bestimmten meist palindromischen Erkennungssequenzen oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche in die DNA ein. Dabei entstehen entweder stumpfe (*blunt*) oder 5'- bzw. 3' überhängende (*sticky*) Enden, die anschließend spezifisch durch eine DNA-Ligase (3.2.2.2) wieder miteinander verbunden werden können. Restriktionsendonukleasen stellen damit ein nützliches Werkzeug zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle dar.

Die Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen werden nach den empfohlenen Reaktionsbedingungen der Hersteller durchgeführt. Dabei werden 1 – 5 Einheiten (*Units*) Enzym/ μg DNA eingesetzt. Der Verdau wird für mindestens 1 h bis maximal 24 h bei der vorgeschriebenen Temperatur von 37 °C durchgeführt. Bei Spaltungen mit unterschiedlichen Enzymen wird entweder ein Reaktionspuffer des Herstellers verwendet, bei dem beide Enzyme über ihre optimale Funktion verfügen, oder es wird zunächst das Enzym verwendet, welches die niedrigere Ionenkonzentration benötigt, um nach dem Einstellen auf die höhere Ionenkonzentration, die Spaltung mit dem zweiten Enzym anzuschließen.

Das Volumen der zugegebenen Restriktionsendonukleasen sollte nicht mehr als 1/10 des gesamten Restriktionsansatzes betragen, da der Aufbewahrungspuffer des Enzyms Glycerin enthält und dies in zu hoher Konzentration die Reaktion stört.

Die gewünschten DNA-Fragmente werden nach dem Restriktionsverdau über ein Agarose-Gel getrennt und isoliert (3.2.3). Wird bei Plasmiden nur mit einem Enzym geschnitten unterbleibt dieser Schritt. Die DNA wird dann durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.4.2) oder mit der Aufreinigungslösung SureClean (3.2.4.4) von den Restriktionsenzymen befreit.

Die Herstellung von R511 ΔTrkA und pcDNA 3.1 B ΔTrkA erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*. Über diese beiden Stellen wurde das ΔTrkA -Fragment auch aus dem Konstrukt pBABEpuro ΔTrkA herausgeschnitten.

3.2.2.2 Ligasereaktion

Unter Verwendung der T4-DNA-Ligase können doppelsträngige DNA-Fragmente mit kompatiblen überstehenden oder stumpfen Enden, die unter anderem bei der

Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstehen (3.2.2.1), zur Herstellung rekombinanter DNA miteinander verknüpft werden (Weiss *et al.*, 1968). Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert-DNA sollte dabei zwischen 1:1 und 1:10 liegen, in den meisten Fällen wurde ein Vektor : Insert Verhältnis von 1:3 oder 1:5 zusammengegeben. Um sicherzustellen, dass eine Religation von Vektoren auszuschließen ist, wird als Kontrolle ein Ansatz ohne Insert-DNA pipettiert. Die Ligation wird bei 4 °C für 12 – 16 h inkubiert, bevor die ligierten Plasmid-DNAs durch Transformation in kompetenten Bakterien (3.1.2.3) zur Vermehrung gebracht werden können.

Die einzusetzende Menge an Insert-DNA kann folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\frac{\text{Masse des Vektors in ng} \times \text{Größe des Inserts in bp}}{\text{Größe des Vektors in bp}} \times \text{Molverhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Masse der Insert DNA in ng}$$

<u>Ligaseansatz</u>	50-100 ng	Vektor-DNA
	x ng	Insert-DNA
	1 µL	10 x Ligasepuffer
	1 µL	T4-DNA-Ligase (3 U/µL)
	mit H ₂ O auf 10 µL füllen	

<u>10 x Ligasepuffer</u>	300 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP

3.2.2.3 Dephosphorylierung

Um Religationen von Plasmiden zu verhindern, die beispielsweise nur eine Schnittstelle für eine bestimmte Restriktionsendonuklease enthalten, können die Plasmide mit alkalischer Phosphatase behandelt werden. Die Kälberdarm alkalische Phosphatase (CIAP; *calf intestine alkaline phosphatase*) katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen der DNA. Dazu werden geschnittene Plasmid-DNAs für 30 min bei 37 °C mit CIAP behandelt und anschließend aufgereinigt (3.2.4).

<u>Reaktionsansatz</u>	20 µL	Restriktionsspaltansatz
	2 µL	Reaktionspuffer
	0,5 µL	alkalische Phosphatase
<u>Reaktionspuffer</u>	500 mM	Tris/HCl, pH 9
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	ZnCl ₂

3.2.3 DNA-Elektrophorese im Agarose-Gel

(Johnson & Grossman, 1977)

Die Elektrophorese mit Agarose-Gelen dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle durch das elektrophoretische Feld eines Agarose-Gels umgekehrt proportional zum \log_{10} ihrer Molekulargewichte (Helling *et al.*, 1974). Die aufgetrennten DNA-Banden können nach der Elektrophorese durch das fluoreszierende, interkalierende Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.2.3.1 Herstellung von Agarose-Gelen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Horizontal-Elektrophoresen mit Kammern der Größe 5 x 7,5 cm und 11 x 14 cm wurden 1 %ige und 2 %ige Gele verwendet.. Die Agarose wird durch Erhitzen im TAE-Puffer gelöst und zum Erhärten in eine Elektrophoresekammer gegossen. Ein Plastikamm mit rechteckigen Zähnen hinterlässt in dem erstarrten Gel Aussparungen zum Auftragen der Proben.

<u>kleines 1 %iges Agarose-Gel</u> (5 x 7,5 cm)	0,25 g 25 mL	Agarose 1 x TAE-Puffer
<u>großes 1 %iges Agarose-Gel</u> (11 x 14 cm)	0,8 g 80 mL	Agarose 1 x TAE-Puffer
<u>großes 2 %iges Agarose-Gel</u> (11 x 14 cm)	1,6 g 80 mL	Agarose 1 x TAE-Puffer
<u>1 x TAE-Puffer</u>	40 mM 5 mM 1 mM	Tris, pH 8 NaAc EDTA

3.2.3.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese

Vor dem Auftragen werden DNA-Proben mit 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 8 - 10 V/cm Gel-Länge, bis die Bromphenolblau-Farbfront etwa 3/4 des Gels durchlaufen hat. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 15 – 30 min gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Sollen die DNA-Fragmente aufgereinigt werden (3.2.4.1), ist es erforderlich, dass die jeweiligen Banden

gegeben. Es folgen die Schritte wie sie oben beschrieben sind. Die aufgereinigten DNA-Fragmente werden anhand eines Aliquots im Photometer (3.2.7) und über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) auf die Menge bestimmt und überprüft.

Puffer NT, NT3 und NE Die genauen Inhaltsstoffe werden von der Firma MACHEREY-NAGEL nicht genannt.

3.2.4.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wird mit 1 Volumen (1:1) versetzt und gründlich durchgemischt. Anschließend werden durch Zentrifugation mit 14.000 rpm für 15 min bei RT zwei Phasen gebildet, in der die obere, wässrige Phase die DNA beinhaltet, während in der unteren, organischen Phase die Proteine enthalten sind. Die in der wässrigen Phase befindliche DNA-Lösung wird vorsichtig abpipettiert und einer Ethanol-fällung (3.2.4.3) unterworfen.

3.2.4.3 Ethanol-fällung

Zu der DNA-Lösung aus der wässrigen Phase der Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.4.2). werden ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat mit pH 5,2 und 2 – 3 Volumen absoluter Ethanol gegeben. Die DNA wird bei RT für 15 min mit 14.000 rpm pelletiert. Zur Entfernung der Salze wird das Pellet mit 400 µL 70 % Ethanol gewaschen, anschließend bei RT oder 37 °C getrocknet und in H₂O wiederaufgenommen.

3.2.4.4 SureClean-Aufreinigung

Die Extraktion von DNA-Fragmenten wird auch mit der SureClean-Lösung durchgeführt. Bei der Verwendung von der SureClean-Lösung wird diese Lösung in einem Verhältnis von 1:1 mit DNA-Lösungen versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wird die DNA pelletiert. Danach wird der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol im doppelten Volumen der Ausgangslösung versetzt und für 10 s durchgemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 14.000 rpm für 10 min bei RT wurde die DNA nach der Entfernung des Überstandes an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) kann DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase *in vitro* spezifisch amplifiziert werden, dabei ist es auch möglich gezielte Veränderungen einzubringen.

Bei einer PCR wird zunächst die doppelsträngige DNA denaturiert, was durch Erhitzen auf 94 – 96 °C erreicht wird. Anschließend folgt ein Schritt, in dem kurze komplementäre Oligonukleotide (Primer) bei einer Temperatur von 55 – 65 °C an die einzelsträngige DNA binden. Darauf folgend wird mit der DNA-Polymerase über das 3'-Ende der Primer ein komplementärer Strang entlang des DNA-Stranges synthetisiert, was beim Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase bei Temperaturen zwischen 68 – 72 °C erfolgt.

<u>PCR-Reaktionsansatz</u>	5 µL	10 x PCR-Puffer
	2 µL	10 mM dNTP-Gemisch
	1,5 µL	25 mM MgCl ₂
	2 µL	10 µM je Primer
	1,0 µL	DNA (100 ng/µL)
	0,2-1 µL	Taq DNA-Polymerase (1-5 U/µL) auf 50 µL mit sterilem H ₂ O
<u>10 x PCR-Puffer</u>	100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
<u>dNTP-Gemisch</u>	2,5 mM	dATP
	2,5 mM	dCTP
	2,5 mM	dGTP
	2,5 mM	dTTP

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Da es Thermocycler mit beheizbarem Deckel und ohne beheizten Deckel gibt, müssen die Reaktionsansatz, welche in einem Thermocycler ohne Deckelheizung laufen gelassen werden, mit Mineralöl überschichtet werden. Die Reaktion läuft anschließend unter folgenden Bedingungen im Thermocycler ab, in dem die Schritte zwischen initialer Denaturierung und finaler Elongation in einer Schleife durchlaufen werden.

<u>PCR-Programm</u>	3 min	94 °C	initiale Denaturierung
	1 min	94 °C	Denaturierung
Schleife	1 min	55 °C	Primerhybridisierung
30x	3 min	72 °C	Elongation
	10 min	72 °C	finale Elongation
	∞ min	4 °C	

Die Zeiten und die Temperaturen der Primerhybridisierung werden auf die jeweils zu erstellenden Fragmente optimiert. Die erhaltenen Produkte werden über ein Agarose-Gel, wie unter 3.2.3 beschrieben, überprüft und gegebenenfalls aufbereitet.

3.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Einige Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism 310 Sequenziergerät der Firma Perkin-Elmer und dem entsprechenden DNA-Sequenzier-Kit (BigDye™ Terminator) durchgeführt. Außerdem wurden auch Proben an die Firma GATC versendet, die entsprechend die Sequenzierungen durchgeführt haben.

Die Methode der Sequenzierung basiert auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger, 1981; Sanger *et al.*, 1977). In einer PCR-Reaktion werden mit vier verschiedenen Farbstoffen markierte 2',3'-didesoxynukleotide in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut, was zu einem kontrollierten, statistisch verteilten Kettenabbruch am 3'-Ende mit spezifischer Fluoreszenzfärbung der letzten Base führt. Im Sequenziergerät werden diese PCR-Produkte in einer Kapillare gelelektrophoretisch aufgetrennt. Am Ende der Kapillare wird dann mit Hilfe eines Lasers das Fluoreszenzsignal des ankommenden DNA-Stranges gelesen. Ein Computer erstellt anhand der Abfolge der Fluoreszenzmarkierungen die DNA-Sequenz.

Dazu wurden 250 ng einer DNA-Minipräparation mit 3 – 10 ng Primer versetzt und mit HPLC-Wasser auf ein Volumen von 8 µL gebracht. Nach Zugabe von 2 µL Reaktionslösung wird die Sequenzierreaktion im Thermocycler gestartet.

<u>PCR-Programm</u>	30 s	96 °C	Denaturierung
Schleife	15 s	50 °C	Primerhybridisierung
25x	4 min	60 °C	Elongation
	∞ min	4 °C	

Nachdem die Sequenzier-PCR durchgelaufen ist, wird jeder Ansatz einer Ethanol-fällung unterzogen, wie in 3.2.4.3 beschrieben. Danach wird die Probe in 25 µL HiDi-Lösung oder H₂O aufgenommen.

3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Plasmid-DNA, aber auch von RNA, wird bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wird ein Aliquot der zu messenden Proben im NanoDrop

ND-1000 Spektrometer gemessen und die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure wird in ng/ μ L angezeigt. Die Proben werden auch mit der Ration von der Absorption von 260 nm und 280 nm auf ihre Verunreinigung überprüft.

3.2.8 Isolierung von RNA

3.2.8.1 Aufbereitung von RNA mit RNeasy® Mini Kits

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt unter der zu Hilfenahme des RNeasy® Mini Kits der Firma QIAGEN. Dabei werden die Zellen zunächst mit einem stark denaturierenden Guanidin-Thiocyanat-enthaltenden Puffer lysiert, der RNasen inaktiviert. Dadurch wird die Isolierung von intakter RNA über ein Puffersystem mit hoher Salzkonzentration und anschließender Bindung an einer Silica-Membran ermöglicht.

Die Aufreinigung von RNA wird mit 5×10^6 – 1×10^7 Zellen durchgeführt. Die Zellen werden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und in 600 μ L Puffer RLT mit 6 μ L β -Mercaptoethanol lysiert. Mit einer 20-Gauge Kanüle und einer RNase-freien Spritze werden die lysierten Zellen durch mehrmaliges Durchpressen homogenisiert und mit einem Volumen 70 %igen Ethanol vermischt. Diese Lösung wird auf eine RNeasy-Säule gegeben und nach Zentrifugation mit 10.000 rpm für 30 s bei RT mit 700 μ L Puffer RW1 gewaschen. Anschließend wird die Membran mit der gebundenen RNA zweimal mit 500 μ L Puffer RPE gewaschen durch Zentrifugation mit 10.000 rpm für 30 s bzw. 2 min bei RT. Nach einer weiteren Zentrifugation um die Reste des Puffers RPE zu entfernen, wird die RNA mit 30 μ L RNase-freiem H₂O eluiert.

Die RNA wird einem DNA-Verdau (3.2.8.2) unterzogen, bevor sie photometrisch auf ihre Konzentration (3.2.7) bestimmt und über ein RNA-Agarose-Gel (3.2.8.3) überprüft wird. Weiterhin wird die isolierte RNA bei der Umschreibung in cDNA mit reverser Transkriptase (3.2.9) und im Mikroarray (3.2.10) verwendet.

Puffer RLT, RW1 und RPE

Die genauen Inhaltsstoffe werden von der Firma MACHEREY-NAGEL nicht genannt.

1 x Phosphat-gepufferte Salzlösung (1 x PBS)

10 g/L	NaCl
0,25 g/L	KCl
1,42 g/L	Na ₂ HPO ₄
0,3 g/L	KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

auf 1 L mit H₂O auffüllen und autoklavieren

3.2.8.2 Behandlung der RNA mit RNase-freier DNase

Zur Sicherstellung, dass die isolierte RNA keine DNA enthält wird mit einer RNase-freien DNase I ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurde zuvor die RNA-Konzentration bestimmt, da von der DNase I eine Einheit (U; *unit*) für 1 µg RNA eingesetzt werden soll. Der Verdau erfolgte bei RT für 30 min.

<u>Reaktionsansatz</u>	1 µg	RNA
	1 µL	10 x DNase I Reaktionspuffer
	1 µL	DNase I (1 U/µL)
	mit RNase-freiem H ₂ O auf 10 µL einstellen	
<u>10 x DNase I Reaktionspuffer</u>	200 mM	Tris/HCl, pH 8,4
	20 µL	MgCl ₂
	500 µL	KCl

Nach dem Verdau wird die Proben erneut über eine RNeasy-Säule aus dem RNeasy® Mini Kit aufgereinigt. Dafür wird der Ansatz mit RNase-freiem H₂O auf 100 µL eingestellt und mit 350 µL Puffer RLT vermischt. Auf die Zugabe von 250 µL Ethanol (96 – 100 %) folgt die Aufreinigung wie für die RNA-Aufbereitung unter 3.2.8.1 beschrieben.

3.2.8.3 Auftrennung von RNA im Agarose-Gel

Zur Überprüfung der RNA wird ein Aliquot in einer Agarose-Gelelektrophorese laufen gelassen. Anhand von der 28S und 18S rRNA Banden lässt sich intakte RNA erkennen. Das Verhältnis von 28S rRNA zu 18S rRNA von 2:1 ist ein Indiz dafür, dass es keine Degradation der mRNA gibt.

<u>kleines 1 %iges Agarose-Gel</u> (5 x 7,5 cm)	0,25 g	Agarose
	5 mL	5 x TBE-Puffer (Sigma)
	20 mL	DEPC-H ₂ O
	2 µL	Ethidiumbromid

3.2.9 Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion

Durch das Enzym reverse Transkriptase (RT) lassen sich aus RNA *in vitro* komplementäre DNA-Einzelstränge (cDNA, complementary DNA) synthetisieren. Für die Herstellung von cDNA wird das Omniscript® Reverse Transcription Kit von QIAGEN verwendet. Mit einem Oligo dT-Primer, der spezifisch mit dem Poly-A Ende von mRNAs hybridisiert, umschreibt die RT mRNA in cDNA.

Reaktionsansatz

2 μ L 10X Buffer RT
2 μ L dNTP-Mix (5 mM je dNTP)
2 μ L Oligo dT primer (10 μ M)
2,5 μ L RNase Inhibitor (4 U/ μ l)
1 μ L Omniscript RT (4 U)
bis zu 2 μ g Gesamt-RNA einsetzen
mit RNase freiem Wasser auf 20 μ L füllen

Bevor der Reaktionsansatz zusammen pipettiert wird, erfolgt eine fünfminütige Denaturierung der RNA bei 65 °C und wird danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz zusammenpipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Um überprüfen zu können, inwieweit bestimmte Transkripte vorhanden sind, wird eine PCR (3.2.5) auf einem Aliquot der cDNA mit Primer-Paaren, die in unterschiedlichen Exons der zu detektierenden Transkripte lokalisiert sind, durchgeführt.

3.2.10 Mikroarray Analyse

Mit Mikroarray-Analysen wird die Hoch- bzw. Runterregulierung von Transkripten untersucht. Hier wird das *Whole Human Genome Microarray*-Kit (G4112F, ID 014850) der Firma Agilent Technologies eingesetzt, das 45015 Oligonukleotide Proben enthält, was dem vollständigen menschlichen Transkriptom entspricht. Für den Mikroarray wird das *Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, Two Color* (#5188-5340) der Firma Agilent Technologies nach den Angaben des Herstellers für die Synthese von cRNA verwendet. Die Fragmentierung, die Hybridisierung und die Waschschrte für die cRNA werden ebenfalls exakt nach dem empfohlen Protokoll des Herstellers *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.5* (Details sind auf <http://www.agilent.com> nachzusehen) durchgeführt, allerdings mit der Ausnahme, dass 4 μ g markierte cRNA für die Hybridisierung verwendet wird. Die Mikroarrays werden im Mikroarray Scanner G2505 B der Firma Agilent Technologies ausgelesen und mit der „Feature Extraction Software V9.5.3.1“ extrahiert und normalisiert unter Verwendung der Extraktionsprotokollsdtei GE2-v5_95_feb07.xml.

Die Durchführung des Mikroarrays erfolgt in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. O. Dittrich-Breiholz im Institut für Physiologische Chemie (MHH, Hannover) und mit der Unterstützung von Frau H. Schneider.

Die Mikroarray-Datensätze wurden mit den Internet-basierten Computerprogrammen *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) bzw. *Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships* (PANTHER) auf biologische Funktionen bzw. die Protein-Klassifizierung untersucht.

3.3 Eukaryotische Kultivierungsmethoden

3.3.1 Zellkulturmedien und Wachstumsbedingungen

3.3.1.1 Zellkulturmedien

<u>5T6,A-431, A-549, HEK293, HeLa, NIH3T3, Phoenix-gp, SC-1, T15</u>	DMEM mit 4,5 g/L Glukose (PAA) + 10 % FCS (v/v) + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin G + 100 U/mL Streptomycin
<u>SH-SY5Y</u>	DMEM mit 4,5 g/L Glukose (PAA) + 15 % FCS (v/v) + 2 mM L-Glutamin
<u>PC12</u>	RPMI 1640 Medium (BIOCHROM AG) + 10% Pferdeserum (v/v) + 5 % FCS (v/v) + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin G + 100 U/mL Streptomycin
<u>MDA-MB-231</u>	Leibovitz's L15-Medium (PAN) + 10 % FCS (v/v) + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin G + 100 U/mL Streptomycin
<u>BeWo</u>	Ham's F12 (Gibco) + 15 % FCS (v/v) + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin G + 100 U/mL Streptomycin

3.3.1.2 Passagieren und Wachstumsbedingungen der Zellkulturen

Die Zellkulturen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Brutschrank kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen (alle Zelllinien außer PC12) werden bei einer Konfluenz von 80 – 90 % passagiert. Die HEK293-Zellen und 5T6-Zellen lassen sich auch durch mehrmaliges pipettieren von der Zellkulturplatte lösen. Bei den anderen Zelllinien wird das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung oder einer

Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, um sie vom Boden der Zellkulturplatte zu lösen. Mit der Zugabe des entsprechenden Mediums werden die Zellen aufgenommen, durch mehrmaliges pipettieren vereinzelt und bei RT für 5 min mit 1.000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkulturplatten ausplattiert in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10. Die Zellen werden 2 – 3 Tage passagiert.

Die PC12-Zellen werden zunächst von der Zellkulturplatte herunter gespült und dann durch Zentrifugation, wie oben beschrieben, pelletiert. Daraufhin werden sie in frischem Medium aufgenommen und in einem Verhältnis 1:5 ausplattiert. Die Umsetzung erfolgt alle 3 – 4 Tage.

<u>Trypsin-Lösung</u>	0,5 % Trypsin (v/v) in 1 x PBS verdünnen
<u>Trypsin/EDTA</u>	0,05 % Trypsin (v/v) 0,02 % EDTA (v/v) In 1 x PBS verdünnen

3.3.2 Langzeitlagerung von Zellkulturen

Für die Langzeitlagerung werden die Zellen zunächst mit 1.000 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Das Zellpellet wird in Einfriermedium aufgenommen, dass aus 70% des Kulturmediums, 20 % FCS und 10% DMSO besteht, und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die einzufrierenden Zellen werden daraufhin langsam heruntergekühlt bei -20 °C für 4 h, bevor die Röhrchen für 24 h bei -80 °C gelagert werden und abschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen kurz bei 37 °C erwärmt, die Zellsuspension in geeignetem Medium aufgenommen, mit 1.000 rpm 5 min bei RT abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

3.3.3 Transfektion von Zellkulturen

Mit der Transfektion ist es möglich, wie bei der bakteriellen Transformation, Fremd-DNA, aber auch RNA, in die Zellen einzubringen. Dabei wird unterschieden zwischen der transienten Transfektion, bei der die Expression zeitlich beschränkt erfolgt, und der stabilen Transfektion, bei der ein Einbau ins Genom stattfindet und eine dauerhaft Expression ermöglicht wird.

3.3.3.1 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in HEK293-Zellen erfolgt mit der *Polyfect*[®] *Transfection Reagent* der Firma QIAGEN. Diese Transfektionsreagenz ist ein kationisches Dendrimer und bildet mit DNA einen Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird und den Transport von intakter DNA zum Zellkern bewirkt.

Dazu werden 24 h vor der Transfektion $1,2 \times 10^6$ HEK293-Zellen mit 5 mL Wachstumsmedium in einer 6 cm Zellkulturplatte ausplattiert, um die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion bei einer Konfluenz von 60 – 70 % zu haben. Vor der Transfektion wird das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und 4 mL frisches Medium hinzugefügt. Für den Transfektionsmix werden 10 µg DNA eingesetzt und mit serumfreien und antibiotikafreiem Medium auf ein Volumen von 150 µL aufgefüllt, bevor 20 µL *Polyfect*[®] dazugegeben werden und alles vermischt wird. Der Komplex wird für 5 – 10 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 24 – 48 h werden die Zellen zu Protein-Lysaten (3.4.3) verarbeitet, zur Aufbereitung von RNA (3.2.8) oder zur Kinase-Aktivitätsbestimmung (3.4.3) verwendet. Bei einigen Durchführungen wird vor der Aufbereitung eine Behandlung mit chemischen Reagenzien (3.3.5.2) oder Wachstumsfaktoren (3.3.6.1) notwendig.

verwendete Plasmide

pEGFP-C2 c-Fms-ICD (538-977)
 c-Fms cDNA
 pcDNA3.1 B (Leervektor)
 pcDNA3.1 B wt-TrkA
 pcDNA3.1 B ΔTrkA
 pBABEpuro ΔTrkA

3.3.3.2 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Für die Transfektion von HeLa-Zellen wird auch die Transfektionsreagenz *Polyfect*[®] verwendet. Es werden Vertiefungen einer 6-Loch-Platte mit 4×10^5 HeLa-Zellen in 3 mL Medium ausgesät. Zur Transfektion wird das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 2,1 mL frisches Medium zu den Zellen gegeben. Danach wird 1,5 µg DNA mit serumfreien und antibiotikafreiem Medium auf 100 µL aufgefüllt, mit 12 µL *Polyfect*[®] durchmischt und für 5 – 10 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. Anschließend wird der Transfektionskomplex tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen werden 24 h nach der Transfektion zur Aufbereitung von Protein-Lysaten (3.4.1) oder für die

Immunfluoreszenz (3.4.9) eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz werden die Vertiefungen vor dem Aussähen mit beschichteten Deckgläschen ausgelegt.

verwendete Plasmide

pEGFP-C2 (Leervektor)
 pEGFP-C2 c-Fms-ICD
 pEGFP-C2 c-Fms-ICD K616M
 pEGFP-C2 c-Fms-ICD K678Q
 pEGFP-C2 c-Fms-ICD RKK/AAA
 pEGFP-C2 c-Fms-ICD Δ 676-711
 HA pCMV 5 c-Fms-ICD
 pCMV-Tag3 c-Fms-ICD

3.3.3.3 Transiente Transfektion von PC12-Zellen

Um PC12-Zellen zu transfizieren, wird die Transfektionsreagenz *Lipofectamine™ 2000* der Firma Invitrogen benutzt. Mit dieser Reagenz, die aus kationischen Lipiden besteht, kann die DNA einen Komplex bilden und zum Zellkern transportiert werden. In Vertiefungen einer 24-Loch-Platte werden jeweils $2,5 \times 10^5$ PC12-Zellen in 250 μ L Medium ohne Antibiotika ausgesät. Für die Transfektion wird 0,5 μ g DNA und 1 μ L *Lipofectamine™ 2000* jeweils mit 50 μ L serumfreien und antibiotikafreien Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin werden beide Ansätze zusammengegeben, vermischt und werden für weitere 20 min bei RT inkubiert, um den DNA-*Lipofectamine™ 2000* Komplex zu bilden. Anschließend wird die Lösung tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und für 4 – 6 h in den Inkubator gestellt, bevor ein Mediumwechsel durchgeführt wird. Die transfizierten PC12-Zellen werden entweder zu Protein-Lysaten (3.4.1) aufgearbeitet oder zur Protein-Detektion mittels Immunfluoreszenz (3.4.9) eingesetzt, wofür sie auf beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit NGF stimuliert werden (3.3.6.4).

verwendete Plasmide

pcDNA3.1 B (Leervektor)
 pcDNA3.1 B wt-TrkA
 pcDNA3.1 B Δ TrkA
 pEGFP-C2 (Leervektor)

3.3.3.4 Transfektion von BeWo-Zellen mit siRNA

Für die Transfektion von BeWo-Zellen mit siRNA wurde die Methode der *Magnet Assisted Transfection* (MATra) der Firma IBA angewendet. Dafür werden am Tag vor der Transfektion in Vertiefungen einer 24-Loch-Platte 2×10^5 BeWo-Zellen in 500 μ L

ausplattiert. Zur Transfektion wird 0,6 µg siRNA mit serumfreien und antibiotikafreiem Medium auf ein Volumen von 50 µL eingestellt und nach der Zugabe von 0,6 µL MATra-si Perlen für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgt wird das Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. Nun wird der siRNA-Perlen-Mix auf die Zellen pipettiert und vermischt. Nach dem Mischen wird die Platte auf eine Magnetplatte gestellt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Daran anschließend wird die Zellkulturplatte von der Magnetplatte entfernt und für 48 h im Brutschrank kultiviert, wobei zwischendurch ein Wechsel des Mediums erfolgt. Nach den 48 h Inkubation werden die Zellen zu Protein-Lysaten (3.4.1) verarbeitet.

verwendete siRNA

c-Fms siRNA
control siRNA

3.3.3.5 Transfektion von NIH3T3-Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Herstellung von NIH3T3-Zellen mit stabiler Expression von Proteinen wird das *Nanofectin* Transfektionskit der Firma PAA eingesetzt. Das aus zwei Komponenten bestehenden *Nanofectin* ist ein positiv-geladenes Polymer, das in einem porigen Nanopartikel eingebettet ist und eine DNA-bindende Kapazität besitzt.

In Vertiefungen einer 12-Loch-Platte werden jeweils 2×10^5 NIH3T3-Zellen mit 2 mL Medium ausgesät. Für die Transfektion werden 2 µg DNA und 6,4 µL *Nanofectin* jeweils in 50 µL Diluent verdünnt. Beide Verdünnungen werden vereint und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der DNA-*Nanofectin* Komplex tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und nach 6 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 h erfolgt ein erneuter Mediumwechsel, diesmal mit der Zugabe des Selektionsantibiotikums Neomycin (G418) im Verhältnis 1:200. Die Zellen werden für 2 – 3 Wochen in Medium und unter G418-Selektion kultiviert und bei Bedarf auf größere Zellkulturplatten passagiert. Zur Isolierung von Klonen werden einzelne Kolonien an der Außenseite der Zellkulturplatte markiert und jeweils mit Whatman-Papier, das einem Durchmesser von etwa 0,5 cm hat und in 0,5 Trypsin getränkt wurde, bedeckt. Die Filterpapiere werden nach einigen Minuten Inkubation in 6 cm Zellkulturplatten mit 5 mL Medium plus G418 überführt. Die am Filter haftenden Zellen lösen sich ab, wachsen an den Boden der Zellkulturplatte an und können sich vermehren. Die stabil transfizierten Zellen werden im Soft-Agar-Assay eingesetzt oder für Protein-Lysate verwendet.

<u>verwendete retrovirale Vektor-Plasmide</u>	R511 (Leervektor) R511 Δ TrkA
--	---

3.3.3.6 Herstellung von stabilen SH-SY5Y-Zellen mit retroviraler Infektion

Die Durchführung der retroviralen Infektion erfordert Räumlichkeiten der Sicherheitsstufe S2 nach dem Gentechnikgesetz. Da die retroviralen Vektoren und die Verpackungszelllinie Phoenix-gp von Dr. J. Meyer und Dr. Z. Li (MHH, Experimentelle Hämatologie) zur Verfügung gestellt worden sind, wird das Verfahren in den Räumlichkeiten der Experimentellen Hämatologie und mit deren Unterstützung durchgeführt.

3.3.3.6.1 Transiente Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix-gp

Für die Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix-gp werden 24 h vor der Transfektion 5×10^5 Phoenix-gp-Zellen in eine 10 cm Zellkulturplatte mit 10 mL Wachstumsmedium ausgesät. Um die Zellen zu transfizieren, wird am nächsten Tag das Wachstumsmedium entfernt und durch 10 mL Transfektionsmedium mit 25 μ M Chloroquin ersetzt. Für die Transfektion werden 5 μ g des retroviralen Vektor-Plasmids, 2 μ g syngag, 0,5 μ g VSV-g und 50 μ L CaCl_2 (2,5 M) in ein Eppendorfgefäß pipettiert und auf 500 μ L mit H_2O aufgefüllt. In ein 14 mL Spitzboden-Gefäß werden 500 μ L 2 x HBS vorgelegt und der DNA- CaCl_2 -Mix unter Bildung von Luftblasen dazugetropft. Dieses Gemisch wird tröpfchenweise auf die Phoenix-gp-Zellen im Transfektionsmedium verteilt und für 6 – 12 h im Brutschrank inkubiert, bevor das alte Medium abgenommen wird und 8 mL frisches Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben wird.

<u>verwendete retrovirale Vektor-Plasmide</u>	HR269 HACD34 HR295 wtHAtrkA HR297 HA Δ TrkA
<u>Transfektionsmedium</u>	DMEM mit Glutamin + 10 % FCS + 1 % Natriumpyruvat + 100 U/mL Penicillin G + 100 U/mL Streptomycin + 20 mM HEPES
<u>Chloroquin-Stammlösung</u>	25 mM Chloroquin in 1 x PBS
<u>2,5 M CaCl_2-Lösung</u>	36,75 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit destillierten H_2O auf 100 mL füllen

<u>2 x HBS</u>	50 mM	Hepes, pH 7,05
	280 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	12 mM	Dextrose
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄

3.3.3.6.2 Ernten der Retroviren

Zur Ernte der Retroviren wird das Medium alle 8 – 12 h mit einer sterilen Spritze abgenommen und die Zellen mit frischem Transfektionsmedium versorgt. Die abgenommenen Überstände werden durch einen 0,22 µm Sterilfilter in Eppendorfgefäße filtriert und bei -80 °C aufbewahrt. Es werden fünf Überstände geerntet, da danach der Titer der Virusproduktion auf ein unbrauchbares Niveau absinkt.

3.3.3.6.3 Bestimmung des Virentiters in SC-1 Zellen

Zur Virustiterbestimmung wird die murine Fibroblasten-Zelllinie SC-1 eingesetzt. Dazu werden 24 h vor der Bestimmung jeweils 1×10^5 SC-1-Zellen mit 3 mL Wachstumsmedium in Vertiefungen einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wird ein Aliquot der virushaltigen Überstände von der Abnahme nach 48 h und 72 h aufgetaut und bis zur Infektion bei 4 °C auf Eis aufbewahrt. Anschließend wird das Medium der SC-1-Zellen abgenommen und der virushaltige Überstand mit 10 µL und 50 µL direkt auf die Zellen pipettiert, bevor 800 µL Wachstumsmedium mit Protaminsulfat (4 µg/mL) auf die Zellen gegeben wird. Es folgt eine Zentrifugation von 1 h mit 2.000 rpm bei 37 °C und eine sechsstündige Inkubation der infizierten Zellen im Brutschrank. Danach werden die Vertiefungen mit Wachstumsmedium ohne Protaminsulfat auf das Ausgangsvolumen von 3 mL aufgefüllt. Die Zellen werden für weitere 36 h kultiviert mit einem Wechsel des Mediums nach 12 h. Daran anschließend werden die infizierten SC-1-Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet.

Protaminsulfat-Stammlösung

4 mg/mL in 1 x PBS

3.3.3.6.4 FACS-Analyse

Das Medium der infizierten Zellen wird abgenommen und die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen. Durch trypsinieren werden die Zellen gelöst, mit einer 1 mL Spritze vereinzelt und in ein FACS-Röhrchen mit 1 mL 1 x PBS überführt. Die Zellen

werden für 5 min bei 1.200 rpm bei 4 °C zentrifugiert und mit 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 150 µL 1 x PBS resuspendiert und durch Zugabe eines IgG-FITC-Antikörper für die Referenz und eines HA-FITC-Antikörper für die infizierten Zellen bei 4 °C für 30 min markiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 1 x PBS werden die Zellen in 450 µL 1 x PBS aufgenommen und im FACSCalibur-Gerät auf positive Zellen untersucht. Im nachfolgenden ist mit dem Überstand nach 72 h weitergearbeitet worden, weshalb auch nur für diesen Zeitpunkt der Virustiter angegeben wird.

<u>Virustiter der Überstände nach 72 h</u>	HR269 HACD34	4,45 x 10 ⁶
	HR295 wtHAtrkA	6,27 x 10 ⁶
	HR297 HAΔTrkA	2,80 x 10 ⁶

3.3.3.6.5 Infektion der Zielzellen SH-SY5Y

Für die Infektion der Zielzellen SH-SY5Y mit dem virushaltigen Überstand von der Abnahme nach 72 h werden in Vertiefungen einer 6-Loch-Platte 2 x 10⁵ und 4 x 10⁵ SH-SY5Y-Zellen in 3 mL Wachstumsmedium ausgesät. Das Verhältnis von Virus zu Zielzelle wird als Multiplizität der Infektion (MOI; *Multiplicity of infection*) angegeben, wobei eine MOI von 1 bedeutet, dass Viruspartikel und Zielzellen im gleichen Verhältnis vorliegen. Die MOI lässt sich ermitteln, indem die Anzahl der Viren durch die Anzahl der ausplattierten Zellen geteilt wird, was beispielsweise für HR297 HAΔTrkA eine MOI von 14 bei 2 x 10⁵ Zellen bzw. 7 bei 4 x 10⁵ Zellen ergibt. Zur Vergleichbarkeit werden die anderen beiden Überstände auch mit einer MOI von 14 bei 2 x 10⁵ Zellen bzw. einer MOI von 7 bei 4 x 10⁵ Zellen eingesetzt.

Für die Infektion wird das entsprechende Volumen der Überstände mit Transfektionsmedium auf 3 mL aufgefüllt, auf die Zellen gegeben und 7 µg/mL Polybrene dazupipettiert. Danach werden die Zellen für 1 h mit 2.000 rpm bei RT zentrifugiert und vor einem Mediumwechsel für etwa 24 h im Brutschrank kultiviert.

Zur Überprüfung der Infektion werden die infizierten SH-SY5Y, wie bei der Virustiterbestimmung beschrieben (3.3.3.6.3), für die FACS-Analyse (3.3.3.6.4) vorbereitet und untersucht.

<u>Polybrene-Stammlösung</u>	7 mg/mL in 1 x PBS
<u>Sortierungspuffer</u>	1 x PBS
	+ 4 % FCS
	+ 2 mM EDTA

3.3.3.6.6 Sortieren der Zellen im Zellsorter

Für das Sortieren von infizierten Zellen werden die Zellen zunächst für zwei Wochen weiter kultiviert, bevor sie für die Zellsortierung vorbereitet werden. Dazu wird das Medium zunächst abgenommen, die Zellen in 1 x PBS gewaschen und mit 0,02 % EDTA von der Zellkulturplatte gelöst. Daraufhin werden die Zellen in Medium aufgenommen, vereinzelt und gezählt. Es werden 4×10^6 Zellen jedes Ansatzes für die Zellsortierung eingesetzt und die restlichen Zellen weiter in Kultur gehalten. Die Zellen für die Sortierung werden dreimal mit 1 mL Sortierungspuffer gewaschen, wobei sie jedes Mal mit 1.200 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert werden. Schließlich werden die Zellen in 1 mL Sortierungspuffer resuspendiert und nach der Zugabe von 5 µL HA-FITC Antikörper für 30 min bei 4 °C markiert. Erneut werden die Zellen dreimal gewaschen, bevor sie für die Sortierung in 2 mL Sortierungspuffer aufgenommen werden. Zur Sortierung wurde das Gerät XDP der Firma Beckman-Coulter aus der Zentralen Forschungseinrichtung Zellsortierung der MHH unter der Leitung von Dr. M. Ballmaier. Das Prinzip der Zellsortierung beruht auf einem Durchflowzytometer. Dabei werden lebendige Zellen, die durch FITC grün gefärbt sind, von Zelltrümmern und nicht-infizierten Zellen getrennt. Die positiv sortierten Zellen werden in Vertiefungen einer 6-Loch-Platte ausplattiert und weiterkultiviert.

3.3.4 Soft-Agar-Assay mit NIH3T3-Zellen

Mit dem Soft-Agar-Assay wird untersucht, inwieweit die stabil transfizierten NIH3T3 (3.3.3.4) in der Lage sind ohne spezifischen Untergrund Kolonien auszubilden. Dazu werden jeweils 1,5 mL aufgekochter 1,4 % Agar und 1,5 mL 2 x DMEM vermischt und das 3 mL 0,7 % Agar-1 x DMEM-Gemisch wird auf je eine 6 cm Zellkulturplatte gegeben. Nachdem sich der Agar nach 30 – 60 min verfestigt hat, werden 1×10^5 der stabilen NIH3T3-Zellen in 250 µL Wachstumsmedium darauf pipettiert. Direkt danach wird vom aufgekochten 1,1 % Agar 1,5 mL mit dem identischen Volumen 2 x DMEM vermischt und über die Zellen gegeben. Die Platten werden für 30 min zum Verfestigen stehen gelassen, bevor sie in den Brutschrank gestellt werden. Die Platten werden inkubiert. Die Bildung von Kolonien ist zu beobachten.

1,4 % Agar

0,7 g BactoAgar
in 50 mL H₂O lösen und autoklavieren

1,1 % Agar

0,55 g BactoAgar
in 50 mL H₂O lösen und autoklavieren

2 x DMEM

13,42 g	DMEM
+ 3,7 g	NaHCO ₃
+ 20 %	FCS
+ 2 %	Penicillin G
+ 2 %	Streptomycin
+ 2 %	L-Glutamin
mit H ₂ O auf 500 mL einstellen	

3.3.5 Behandlung von Zelllinien mit Inhibitoren**3.3.5.1 Behandlung von BeWo-Zellen mit γ -Sekretase Inhibitor**

Für die Behandlung mit dem γ -Sekretase Inhibitor Compound E wurde ein identisches Volumen an BeWo-Zellen auf einer 6 cm Zellkulturplatte ausplattiert. Nachdem ausplattieren, wird zu vier Ansätze 5 μ M Compound E dazugegeben und für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h inkubiert. Für den 0 h Wert werden unbehandelte Zellen verwendet. Nach den angegebenen Zeitpunkten werden die Zellen zu Protein-Lysaten (3.4.1) aufgearbeitet.

3.3.5.2 Behandlung von HEK293-Zellen mit Imatinib Mesylat

Mit Imatinib Mesylat wird bei Tyrosinkinase die ATP-Bindungsstelle blockiert, wodurch die Phosphorylierung von Substraten unterbunden wird. Es werden mit pEGFP-C2 c-Fms-ICD transfizierte HEK293-Zellen verwendet, die einmal mit 10 μ M Imatinib Mesylat für 2 h behandelt werden und einmal zum Vergleich unbehandelt. Aus beiden Ansätzen werden Protein-Lysate (3.4.1) hergestellt.

3.3.6 Stimulation von Zelllinien mit Wachstumsfaktoren**3.3.6.1 Stimulation von HEK293-Zellen für Mikroarray Analysen**

Für die Stimulation von HEK293-Zellen werden diese zuvor mit c-Fms cDNA transfiziert und anschließend für 16 h in serumfreien Medium kultiviert. Daraufhin erfolgt entweder eine Kultivierung der Zellen für weitere 8 h mit dem Wachstumsfaktor CSF-1 (100 ng/mL) oder unstimuliert. Danach werden beide Ansätze zu RNA verarbeitet (3.2.8).

3.3.6.2 Stimulation von NIH3T3- und T15-Zellen

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen und T15-Zellen werden jeweils in zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Platte mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen in serumfreien

Medium ausgesät und 24 h nach dem Ausplattieren wird jeweils ein Ansatz für 15 min mit NGF (100 ng/mL) stimuliert. Anschließend werden alle Ansätze zur für eine Immunpräzipitation (3.4.3) eingesetzt und ein Teil davon für die Aufbereitung von Protein-Lysaten verwendet.

3.3.6.3 Stimulation von SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen, die retroviral infiziert wurden, und unbehandelte SH-SY5Y-Zellen werden mit einem identischen Aliquot auf 6 cm Zellkulturplatten ausplattiert und über einen Zeitraum von sieben Tagen im Wachstumsmedium und unter Zugabe des Wachstumsfaktors NGF (100 ng/mL) kultiviert. Es werden im Lichtmikroskop Bilder bei einer 10 x Vergrößerung vor Beginn der NGF-Stimulation und nach sieben Tagen aufgenommen. Das Medium wird dabei alle 3 Tage gewechselt.

3.3.6.4 Stimulation von PC12-Zellen

Bevor die Schwimnzellen PC12 stimuliert werden können, müssen Zellkulturplatten mit einer Polyornithin-Laminin-Beschichtung versehen werden, da PC12-Zellen dadurch an den Zellboden haften können.

Für die Beschichtung wird sterile Polyornithin-Lösung für 4 h oder über Nacht auf Zellkulturplatten geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O werden die Platten unter der Sterilwerkbank getrocknet und Laminin für 4 h oder über Nacht auf die Platte gebracht. Anschließend wird die Platte mit 1 x PBS gewaschen und kann entweder sofort verwendet werden oder mit 1 x PBS im Kühlschrank bis zur Nutzung gelagert werden.

Durch die Stimulation mit NGF bilden PC12-Zellen Neuriten aus und differenzieren zu nervenähnlichen Zellen. Auf zweibeschriftete Platten wird ein identisches Aliquot von PC12-Zellen ausgesät und über einen Zeitraum von 9 Tagen im Wachstumsmedium kultiviert. Dabei erfolgt bei einem Ansatz die Zugabe des Wachstumsfaktors NGF (100 ng/mL), während der andere unstimuliert bleibt. In Verlauf der Kultivierung wird das Medium jeden zweiten Tag erneuert. Am zweiten und neunten Tag nach Beginn der NGF-Stimulation wird im Lichtmikroskop mit einer 10 x Vergrößerung die Differenzierung dokumentiert.

Weiterhin werden die transient transfizierten PC12-Zellen (3.3.3.3) unter anderem im Doppelansatz auf beschichtete Zellkulturplatten und für Protein-Lysate ausgesät. Je ein Ansatz bleibt unbehandelt und einer wird mit 100 ng/mL NGF-stimuliert. Beide

Ansätze werden nach drei Tagen in der Immunfluoreszenz (3.4.9) untersucht bzw. nach 15 min zu Protein-Lysaten (3.4.1) verarbeitet.

<u>Polyornithin-Lösung</u>	150 mM	Boratpuffer, pH 8,3
	0,5 mg/mL	Polyornithin
<u>Laminin</u>	10 µg/mL	in 1 x PBS

3.3.6.5 Stimulation von 5T6-Zellen

Die stabil TrkA-exprimierenden 5T6-Zellen werden auf 6 cm Zellkulturplatten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen in serumfreien Medium ausplattiert und 16 h kultiviert. Danach werden die Zellen entweder mit dem Wachstumsfaktor NGF (100 ng/mL) für 8 h stimuliert oder unstimuliert für weitere 8 h kultiviert. Da aus den stimulierten und unstimulierten 5T6-Zellen sowohl RNA-Lysate (3.2.8) als auch Protein-Lysate hergestellt werden (3.4.1), ist der Versuch doppelt angesetzt worden.

3.4 Biochemische und zellbiologische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten erfolgt zur Untersuchung von Proteinen. Dazu wird zunächst von den Zellen das Medium abgenommen, wobei für die PC12-Zellen dafür für 5 min bei 1.000 rpm bei RT abzentrifugiert werden. Anschließend werden die Zellen in 1 x PBS gewaschen und nach Zugabe eines Lysispuffers werden die Zellen lysiert. Um die Zelltrümmer vom Proteingemisch zu trennen, wird für 2 min mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Eppendorfgefäße überführt. Die hergestellten Lysate werden in einer SDS-PAGE (3.4.6) aufgetrennt.

<u>Lysispuffer</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	150 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	100 µM	NaVO ₄ ³⁻
	0,1 %	SDS (v/v)
	1 %	Triton X-100 (v/v)
	1 %	Trasylol (v/v)
<u>SDS-Auftragspuffer Stammlösung</u>	10 mL	20 % SDS
	10 mL	Glycerin
	8 mL	1M Tris/HCl, pH 6,8
	72 mL	H ₂ O

<u>1 x SDS-Auftragspuffer</u>	1 mL	SDS-Auftragspuffer-Stammlösung
	80 µL	0,1 % Bromphenolblaulösung
	50 µL	β-Mercaptoethanol

3.4.2 Zellfraktionierung von Zellen

Mit der Zellfraktionierung ist es möglich festzustellen in welchem Kompartiment der Zelle ein bestimmtes Protein lokalisiert ist. Dabei werden mit unterschiedlicher Zentrifugationsgeschwindigkeit zuerst die Zytoplasma-Fraktion, danach die Membran-Fraktion und schließlich die Zellkern-Fraktion isoliert.

Um dieses zu erreichen werden BeWo-Zellen im Fraktionierungslysispuffer lysiert und mit 3.500 rpm für 10 min zentrifugiert. Im Überstand ist die zytoplasmatische Fraktion enthalten. Durch erneute Zugabe des Fraktionierungslysispuffers, Resuspendierung des Pellets und Zentrifugation mit 8.600 rpm für 10 min wird die Membran-Fraktion im Überstand isoliert. Das Pellet enthält die Nukleusfraktion und wird direkt im 1 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die hergestellten Lysate werden im SDS-PAGE eingesetzt und anschließend weiter untersucht.

Für HeLa-Zellen wird auch eine Fraktionierung durchgeführt, allerdings nur in lösliche und unlösliche Fraktionen. Dabei wird derselbe Fraktionierungslysispuffer eingesetzt wie zu vor, mit dem Unterschied, dass 0,1 % statt 0,5 % NP40 eingesetzt werden. Die im Überstand befindliche Fraktion enthält die löslichen Bestandteile und wird mit 4 x SDS-Auftragspuffer vermischt, während im Zellpellet die unlösliche ist und mit 1 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen wird.

<u>Fraktionierungslysispuffer</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	137 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	100 µM	NaVO ₄ ³⁻
	0,5 %	NP-40 (v/v)
	1 %	Trasytol (v/v)

3.4.3 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation wird ein Protein mittels eines spezifischen Antikörpers aus einem Zelllysat isoliert. In dieser Arbeit werden die transient transfizierten HEK293-Zellen und 5T6-Zellen für die Bestimmung der Kinaseaktivität sowie die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen und T15-Zellen zur Aufkonzentrierung immunpräzipitiert.

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität werden $2,4 \times 10^6$ Zellen auf eine 10 cm Zellkulturplatte ausplattiert. Nach 24 h wird das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 mL 1 x PBS von der Platte gelöst und gewaschen. Abhängig von der Zellzahl werden 100 – 200 μ L Lysispuffer auf die Zellen geben und auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min mit 13.000 rpm bei RT werden die Zelltrümmer pelletiert und der Überstand auf zwei frische Eppendorfgefäße aufgeteilt. Zu einem Teil der Überstände wird für den Auftrag auf ein SDS-PAGE (3.4.6) 4 x SDS-Auftragspuffer gegeben und der andere mit dem Kinase-Lysispuffer auf 500 μ L aufgefüllt. Der aufgefüllte Ansatz wird außerdem mit 10 μ L TrkA-Antikörper C14 vermischt und bei 4 °C schüttelnd für 2 – 4 inkubiert. In der Zwischenzeit wird in Formaldehyd fixierter *Staphylococcus aureus* (Stamm Cowan I) dreimal in Kinase-Lysispuffer gewaschen, bevor 40 μ L davon zum Lysat-Antikörper-Mix pipettiert werden und für 30 – 60 bei 4 °C inkubiert wird. Danach wird der Antikörperkomplex für 2 min mit 13.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet zweimal in Kinase-Waschpuffer gewaschen. Daraufhin folgenden wird das Pellet in einen Kinase-Assay (3.4.4) eingesetzt.

Für die Aufkonzentrierung von Proteinen wird ähnlich verfahren. Die Aufbereitung unterscheidet sich in der Zelldichte von 2×10^5 Zellen in Vertiefungen einer 6-Loch-Platte sowie dem Protein A Sepharose™ und dem eingesetzten Volumen von 75 μ L des TrkA-Antikörper C-14. Vor der Komplexbildung mit der Sepharose wird wie bei den Proben des Kinase-Assays ein Aliquot für den Western-Blot abgenommen und mit 4 x SDS-Auftragspuffer versetzt. Der Sepharose-Antikörper-Lysate-Mix wird nach dreimaligem Waschen mit einem Tropfen 4 x SDS-Auftragspuffer und 30 μ L 1 x SDS-Auftragspuffer resuspendiert und wird für eine SDS-PAGE (3.4.6) verwendet.

<u>Kinase-Lysispuffer</u>	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7
	50 mM	NaF
	10 mM	EDTA
	1,2 %	Triton X 100 (v/v)
	1 %	Trasylol (v/v)
<u>4 x SDS-Auftragspuffer Stammlösung</u>	40 mL	20 % SDS
	40 mL	Glycerin
	32 mL	1M Tris/HCl, pH 6,8
	98 mL	H ₂ O
<u>4 x SDS-Auftragspuffer</u>	1 mL	SDS-Auftragspuffer-Stammlösung
	320 μ L	0,1 % Bromphenolblaulösung
	200 μ L	β -Mercaptoethanol

<u>Kinase-Waschpuffer</u>	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7
	40 mM	NaF
	10 mM	EDTA
	1 M	NaCl
	0,2 %	Triton X 100 (v/v)
	1 %	Trasytol (v/v)

3.4.4 Bestimmung der *in vitro* Kinaseaktivität (Kinase-Assay)

Mit dem Kinase-Assay kann nachgewiesen werden, dass Tyrosinkinasen die Fähigkeit besitzen ihre Substratproteine und sich selbst an Tyrosinresten zu phosphorylieren (Autophosphorylierung). Dabei wird in einer *in vitro* Kinasereaktion die enzymatische Aktivität mit Hilfe von radioaktiv markiertem ATP gezeigt. Die Kinase überträgt den markierten γ -ständigen Phosphatrest des ATP auf einen Tyrosinrest und Manganionen des Kinasepuffers fungieren dabei als Kofaktoren.

Die bei der Immunpräzipitation hergestellten *Staphylococcus aureus*-Pellets werden in 10 μ L BTP-Lösung resuspendiert und für 30 min bei RT in 30 μ L Reaktionsgemisch inkubiert. Mit der Zugabe von 250 μ L Quenchpuffer wird der Einbau des radioaktiven Phosphats gestoppt, da unmarkiertes ATP in diesem Puffer im Überschuss vorliegt. Der radioaktiv markierte Immunkomplex auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, pelletiert und der Überstand verworfen. Ein Ansatz wird mit 30 μ L 1 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und der andere bei der Endo-H Behandlung (3.4.5) weiterverwendet.

Reaktionsgemisch	20 μ L	25 mM BTP, pH 6
	5 μ L	100 mM MnCl ₂
	4 μ L	100 μ M ATP
	1 μ L	³² P- γ -ATP (370 kBq)
Quenchpuffer	100 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7
	10 mM	EDTA
	40 mM	NaF
	1 mM	ATP

3.4.5 Endo-H-Behandlung

Mit der Endoglykosidase H (Endo-H) werden mannosereiche N-glykosylierte Zuckerketten gespalten, während komplexe N-glykosylierte Zuckerketten resistent gegen eine Spaltung sind. Da komplexe Zuckerketten erst im Golgi-Apparat bei Glykoproteinen aufgebaut werden, kann zwischen reifen und unreifen Glykoproteinformen unterschieden werden.

Für die Untersuchung auf die reife und unreife Form, werden die Pellets des zweiten Ansatzes des Kinase-Assays 9 μL H_2O aufgenommen und nach der Zugabe von 1 μL 10 x *Glycoprotein-Denaturing Buffer* wird der Ansatz für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend werden 7 μL H_2O , 2 μL *G5 Reaction Buffer* und 1 μL Endo-H mit dem Ansatz vermischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Daraufgehend werden die Proben mit 4 x SDS-Auftragspuffer für eine SDS-PAGE (3.4.6) vorbereitet.

3.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellysate sind Proteingemische, die über das Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden können (Davis, 1964; Laemmli, 1970). Dazu werden Polyacrylamidflachgele mit einer Größe von 9 x 6 cm und einem Acrylamid-Anteil von 7,5 % oder 11 % hergestellt, was von die Größe der zu detektierenden Proteine abhängig ist. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, erfolgt ein aufkochen derselbigen im Wasserkocher für 5 min. Anschließend werden die Proben kurz abzentrifugiert und bis zum Auftrag auf Eis aufbewahrt.

Die Elektrophorese erfolgt zunächst bei 70 mA, damit das Proteingemisch ins Sammelgel einlaufen kann. Sobald das Proteingemisch das Trenngel erreicht hat wird eine Stromstärke von bis zu 140 mA angelegt. Insgesamt wird das Gel laufen gelassen bis der Bromphenolblau-Marker das Gel gerade verlassen hat, was etwa 1,5 – 2 h dauert. Das Gel kann nun einem Western-Blot unterzogen werden oder bei radioaktiv markierten Proteinen zur Autoradiographie auf einer Vakuumapparatur getrocknet werden.

<u>Trenngel</u>	<u>(7,5 %)</u>	<u>(11 %)</u>	
	1,5 mL	2,2 mL	Acrylamid-Lösung
	2,25 mL	2,25 mL	1M Tris/HCl, pH 8,8
	2,25 mL	1,55 mL	H_2O
	30 μL	30 μL	20 % SDS
	6 μL	6 μL	TEMED
	20 μL	20 μL	10 % APS-Lösung
<u>Sammelgel</u>	<u>(5 %)</u>		
	0,334 mL		Acrylamid-Lösung
	0,25 mL		1M Tris/HCl, pH 6,8
	1,4 mL		H_2O
	10 μL		20 % SDS
	3 μL		TEMED
	10 μL		10 % APS-Lösung

<u>Acrylamid-Lösung</u>	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bis-Acrylamid
<u>1x Laufpuffer</u>	3,03 g	Tris
	14,22 g	Glycin
	1 g	SDS
	auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

3.4.7 Western-Blot

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mittels der Western-Blot-Methode auf eine Transfermembran übertragen werden (Kyhse-Andersen, 1984), um anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert und charakterisiert zu werden (Towbin *et al.*, 1979). Das in dieser Arbeit verwendet Blotverfahren wird als „halbtrockenes“ (*semi-dry*) bezeichnet.

Nachdem Abbau der Gelelektrophorese-Apparatur wird das Proteingel ohne das Sammelgel für 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Transfermembran, aus PVDF oder Nitrozellulose bestehend, wird ebenfalls äquilibriert, allerdings in Anodenpuffer II, wobei die PVDF-Membran vorher für 30 s in Methanol getränkt wird und mit H₂O gewaschen wird. Der Transfer erfolgt in einer Blot-Kammer, die aus zwei graphitbeschichteten Kunststoffplatten besteht. Die Anode wird mit Anodenpuffer I, die Kathode mit Kathodenpuffer befeuchtet. Dazwischen wird der Blot wie folgt aufgeschichtet:

Anode

- 2 mit Anodenpuffer I getränkte Whatman-3-MM Filterpapiere
- 1 mit Anodenpuffer II getränktes Whatman-3-MM Filterpapier
- Nitrozellulose-Membran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 3 mit Kathodenpuffer getränkte Whatman-3-MM Filterpapiere

Kathode

Die Proteine werden nun mit 0,8 – 1 mA/cm² Gel auf die Membran transferiert. Je nach Acrylamidkonzentration dauert der Transfer zwischen 30 min für 7,5 % Gele und 45 min für 11 % Gele.

<u>Anodenpuffer I</u> (pH 10,4)	300 mM	Tris
	20 %	Methanol
<u>Anodenpuffer II</u> (pH 10,4)	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
<u>Kathodenpuffer</u> (pH 9,4)	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
	40 mM	6-Amino-n-Hexansäure

3.4.8 Identifizierung von Proteinen im Immunoblot

Nach dem Transfer der Proteine auf die Transfermembran wird diese für mindestens 30 min mit 2–3 % BSA in TBS-T abgesättigt, um eine unspezifische Antikörperbindung auszuschließen. Über Nacht erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:1.000 – 1:5.000) in Absättigungslösung oder TBS-T bei 4°C oder RT. Am darauffolgenden Tag wird die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T bei RT schwenkend gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:20.000) erfolgt für 1 h bei RT, bevor die Membran erneut dreimal mit TBS-T für 10 min schwenkend gewaschen wird. Zur Detektion wird die Membran für 2 min in einem 1:1 Gemisch aus *SuperSignal[®] West Femto Stable Peroxide Buffer* und *SuperSignal[®] West Femto Luminol/Enhancer Solution* der Firma ThermoScientific inkubiert, bevor die Ergebnisse im LAS4000 System der Firma GE Healthcare dokumentiert werden.

<u>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)</u>	137 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl, pH 7,6
<u>TBS-T</u>	0,1 % Tween20 (v/v) in TBS
<u>Absättigungslösung</u>	2 – 3 % BSA (w/v) in TBS-T

3.4.9 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz werden Proteine sichtbar gemacht, die sich in der Zelle befinden oder an der Zellmembran. Die BeWo-Zellen werden dabei auf endogenes c-Fms untersucht, während mit den HeLa-Zellen die Lokalisation der c-Fms-ICD untersucht wird. Bei den PC-12-Zellen wird mittels Immunfluoreszenz untersucht, viele Zellen Neuriten ausgebildet haben.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenz werden zunächst die auf Deckgläschen ausplattierten Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit der Fixierlösung auf ihren Untergrund fixiert. Anschließend werden die Zellen wieder gewaschen, mit der Permeabilisierungs-Lösung für 1 min auf Eis permeabilisiert und zweimal gewaschen. Das Permeabilisieren wird unterlassen, wenn nur extrazelluläre Proteine betrachtet werden sollen. Unspezifische Bindungen werden durch dreimalige Behandlung mit Block-Lösung für 10 min bei RT abgesättigt. Der primäre Antikörper wird in Block-Lösung verdünnt. 100 µL der Antikörperlösung wird pro Deckglas (1,5 x 1,5 cm) verwendet. Die Flüssigkeit wird durch das Auflegen eines zu recht geschnittenen Stücks Parafilm auf dem ganzen Glas verteilt. Die Inkubation mit

Antikörpern findet für 1 – 1,5 h in einer Feuchtkammer bei 37 °C statt. Als Feuchtkammer dient eine Petrischale, die wassergetränkte Papiertücher enthält. Nach Entfernen des primären Antikörpers wird dreimal mit Block-Lösung gewaschen, bevor der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper zugegeben wird. Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wird wieder gewaschen. Dann werden Präparate auf Deckgläschen mit einem Tropfen Mowiol-Lösung auf einen Objektträger eingebettet. Die Mowiol-Lösung trocknet über Nacht bei RT. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden 25 µg/mL DAPI auf die Zellen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgt im konventionellen Fluoreszenzmikroskop oder im konfokalen Fluoreszenzmikroskop und wird zur Veranschaulichung durch Bilder dokumentiert.

Fixierlösung 3 % PFA (w/v)
 0,9 mM CaCl₂
 0,5 mM MgCl₂
 in 1 x PBS, pH 7,4

3 g PFA werden bei 50 °C in 80 ml H₂O mit 100 µL 2 M NaOH gelöst. Es werden 10 mL 10 x PBS zugefügt, der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls mit HCl nachgestellt. Das Volumen wird mit H₂O auf 100 mL aufgefüllt.

Permeabilisierungs-Lösung 0,5 % Triton X-100 (v/v)
 in 1 x PBS

Block-Lösung 10 % FCS (v/v)
 in 1 x PBS

Mowiol-Lösung

6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol werden zusammengegeben und 2 h stehen gelassen, dann werden 12 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugefügt. Die Mischung wird 10 min bei 50 °C gerührt und anschließend 20 min mit 5.000 rpm bei RT zentrifugiert.

Vor Gebrauch wird DABCO (25 mg/mL) zugefügt. Die Lösung wird bei -20°C gelagert.

primärer Antikörper	c-Fms (C-20), 1:25 TrkA (B3), 1:20 Lamin A/C, 1:200 Maus IgA; 1:50
sekundärer Antikörper	Maus IgG-TRITC, 1:700 Maus IgG-FITC Kaninchen IgG-FITC, 1:1000

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung eines alternativen Signalweges von c-Fms

Der Rezeptor für den Makrophagen koloniestimulierenden Faktor c-Fms ist überwiegend an der Differenzierung von phagozytischen Zellen, wie Makrophagen und Osteoklasten, beteiligt (Dai *et al.*, 2002). c-Fms ist darüber hinaus auch in Krebszellen nachzuweisen. In mehr als 90 % der menschlichen Brustkrebszellen konnte die Expression von c-Fms gezeigt werden. Aufgrund des Expressionsniveaus von c-Fms lässt sich eine Prognose über den Erkrankungsverlauf aufstellen (Kacinski *et al.*, 1988; Toy *et al.*, 2005).

4.1.1 c-Fms in Krebszellen

4.1.1.1 Nachweis von endogenem c-Fms-Transkript und dessen Liganden CSF-1 in Krebszelllinien

Zunächst wurde in sechs verschiedenen Krebszelllinien überprüft, ob diese c-Fms endogen exprimieren. Bei den bereits charakterisierten humanen Zelllinien handelt es sich um die epidermoide Karzinom-Zelllinie A-431, die Lungenkarzinom-Zelllinie A-549, die Brustkarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, die Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo, die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa sowie die künstlich transformierten, embryonalen Nierenepithel-Zellen HEK293.

Für die BeWo, HeLa und MDA-MB-231 Zelllinien war die Expression von endogenem c-Fms bereits bekannt (Kirma *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 1989). In geringem Maße konnte es auch in der Zelllinie A-549 nachgewiesen werden (Filderman *et al.*, 1992). Mit einer spezifischen c-Fms RT-PCR konnte das c-Fms-Transkript neben den aufgezählten Zelllinien auch in den Zelllinien HEK293 und A-431 detektiert werden (Abbildung 4.1, oberes Panel).

Darüber hinaus wurden die sechs Zelllinien auf den Liganden von c-Fms, den koloniestimulierenden Faktor-1 (CSF-1), untersucht. Bei fünf Zelllinien konnte das Transkript vom CSF-1 Gen detektiert werden, für die A-549 Zellen abermals im geringeren Ausmaß. Für die BeWo-Zelllinie war kein Transkript nachzuweisen (Abbildung 4.1, mittleres Panel).

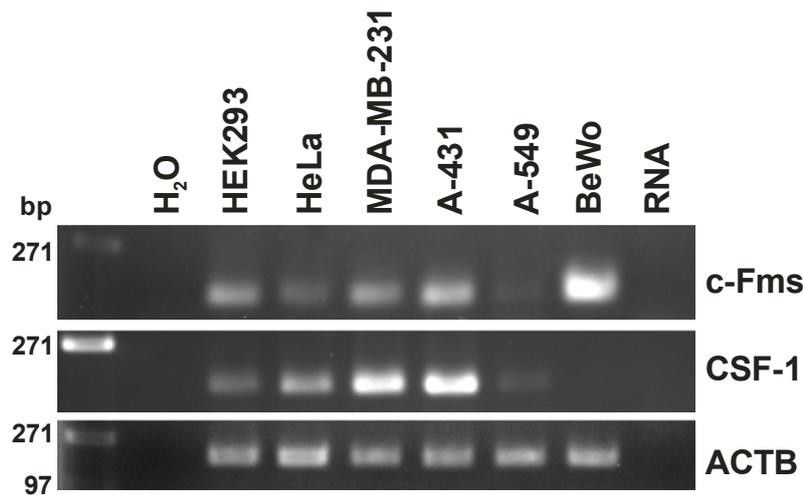


Abbildung 4.1: Expression von c-Fms und CSF-1 in Krebszelllinien.

Die gesamte RNA von den Zelllinien HEK293, HeLa, MDA-MB-231, A-431, A-549 und BeWo wurde mittels reverser Transkriptase (RT)-PCR auf die Expression von c-Fms (oberes Panel) und CSF-1 (mittleres Panel) hin untersucht. ACTB (unteres Panel) diente als Ladungskontrolle. bp: Basenpaare des DNA Längenstandards.

4.1.1.2 Lokalisation von endogenem c-Fms

Die Lokalisation von endogenem c-Fms wurde in den Zelllinien HeLa, A-431 und BeWo mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Bei der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa sowie der epidermoiden Karzinom-Zelllinie A-431 konnte eine schwache Färbung in der perinukleären Region beobachtet werden. In der Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo hingegen war mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie die perinukleäre Lokalisation von c-Fms deutlich sichtbar, weshalb hier nur die BeWo-Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.2). Zur Bestätigung der Lokalisation im Nukleus wurde mittels Aufnahmen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop zum einen c-Fms (Abbildung 4.3, linkes Bild, grün) gezeigt und zum anderen die Kernmembran, durch Lamin A/C angefärbt (Abbildung 4.3, mittleres Bild, rot).

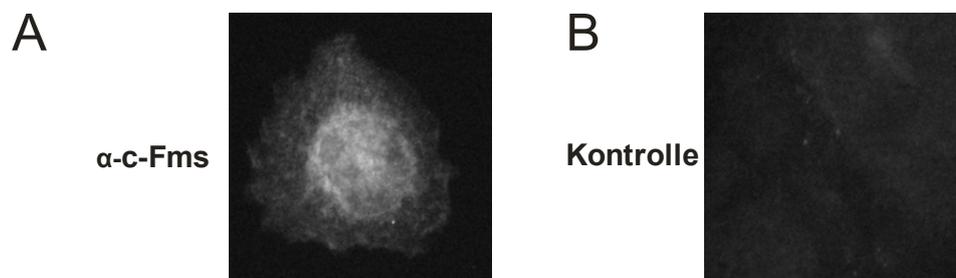


Abbildung 4.2: Lokalisation von endogenem c-Fms in BeWo-Zellen im konventionellen Fluoreszenzmikroskop.

BeWo-Zellen wurden ausgesät und fixiert. Zur Detektion wurde als primärer Antikörper ein für das C-terminale Ende von c-Fms spezifischer (A) bzw. ein Maus IgA Antikörper verwendet (B). Ein FITC-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen IgG wurde als sekundärer Antikörper verwendet.

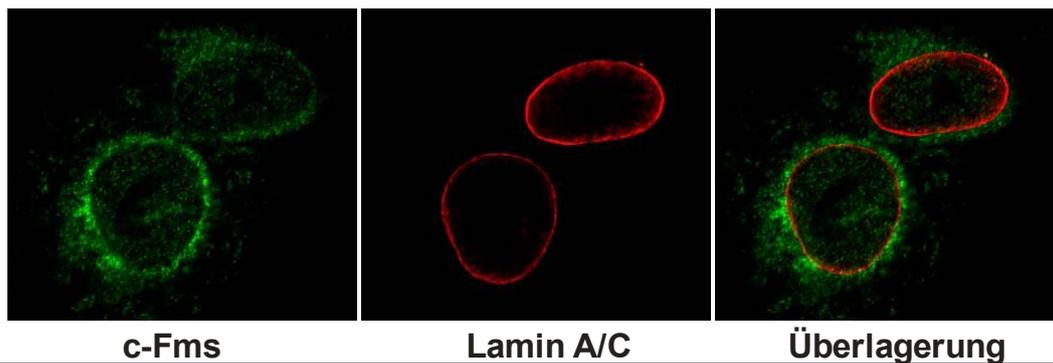


Abbildung 4.3: Lokalisation von endogenem c-Fms mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.
 BeWo-Zellen wurden ausgesät und fixiert. Die Detektion erfolgte mit einem für das C-terminale Ende von c-Fms spezifischen Antikörper und FITC-konjugiertem Antikörper gegen Kaninchen IgG (linkes Panel, grün) bzw. mit Lamin A/C und TRITC-konjugiertem Antikörper gegen Maus IgG (mittleres Panel, rot). Im rechten Panel ist die Überlagerung der beiden Bilder zu sehen.

4.1.2 Charakterisierung von c-Fms Banden in BeWo-Zellen

4.1.2.1 Überprüfung auf c-Fms Spezifität

Für die HeLa-Zellen sowie MDA-MB-231 Zellen war es sowohl schwierig c-Fms in der Immunfärbung als auch durch c-Fms-Antikörper im Immunoblot nachzuweisen, was auch für die Epidermoidkarzinom Zelllinie A-431 galt. Dagegen konnten jedoch mit den BeWo-Zellen sechs Banden detektiert werden (Abbildung 4.4, Kontrolle): gp150 und gp130 (gp150/130 Fms), p80 und p75 (B1/2), p55 (B3) und p50 (*).

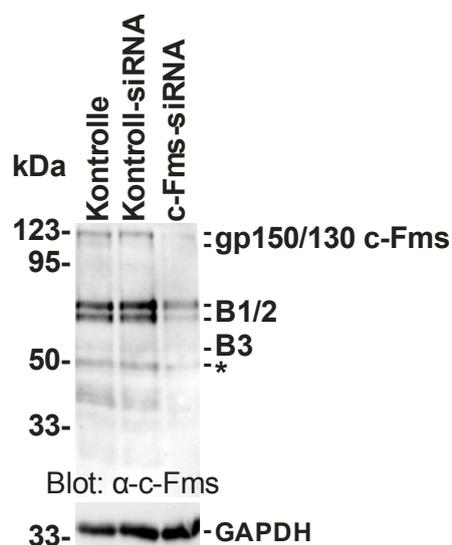


Abbildung 4.4: Spezifität von c-Fms-spezifischen Banden in BeWo-Zellen.

Aus transfizierten BeWo-Zellen wurden Zellextrakte mit 0,1 % SDS und 1 % Triton X-100 im Lysispuffer hergestellt. Für die Transfektion wurden die Zellen zum einen nur mit der Transfektionsreagenz behandelt und zum anderen wurde Kontroll-siRNA bzw. spezifische c-Fms-siRNA verwendet. Im Immunoblot wurde ein c-Fms C-Terminus-spezifischer bzw. GAPDH Antikörper zur Detektion angewendet.

gp150/130 c-Fms: c-Fms Glykoproteine; B1/2 und B3: mögliche proteolytische Abbauprodukte von c-Fms; Sternchen: potentielle c-Fms-ICD.

In BeWo-Zellen konnte mit transfizierter spezifischer c-Fms-siRNA gezeigt werden, dass sich die Intensität der sechs c-Fms Banden im Vergleich zur Kontroll-siRNA um etwa die Hälfte reduzieren ließ (Abbildung 4.4, Kontroll-siRNA und c-Fms siRNA). Dies deutet darauf hin, dass alle Banden c-Fms spezifisch sind.

4.1.2.2 Nachweis eines c-Fms Spaltungsproduktes

Für Rezeptortyrosinkinasen wie ErbB2, ErbB4, c-Fms und c-Met ist über die Abspaltung der extrazellulären Domäne berichtet worden (Ancot *et al.*, 2009; Wilhelmsen & van der Geer, 2004), dem sogenannten *Ectodomain-Shedding*, welches durch bestimmte Metalloproteinasen der ADAM-Familie erfolgt. Die Abspaltung der Ektodomäne fungiert als Kontrollpunkt für eine weitere Protease, den γ -Sekretase-Komplex, der die intramembrane Spaltung bewirkt.

Durch die Chemikalie Compound E, ein Inhibitor für γ -Sekretase, wurde über einen Zeitraum von acht Stunden überprüft, ob eine der sechs Banden, die mit dem spezifischen c-Fms Antikörper nachgewiesen wurden, das c-Fms Abbauprodukt durch den γ -Sekretase Komplex darstellt. Dabei konnte eine Verstärkung der B3 Bande bei 55 kDa nach zwei Stunden gezeigt werden (Abbildung 4.5). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die B3 Bande ein Produkt des *Shedding*-Prozesses ist und die 50 kDa Bande vermutlich das Produkt der Spaltung an der inneren Zellmembran durch γ -Sekretase ist.

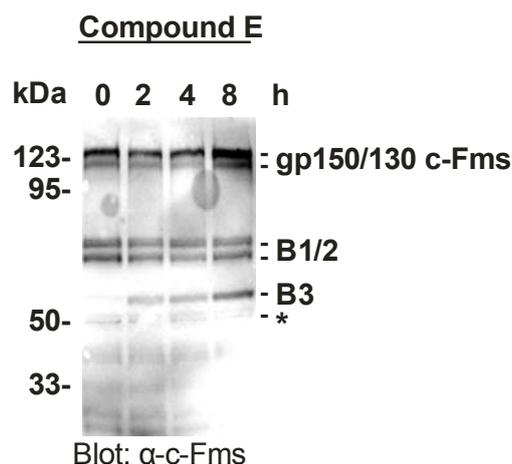


Abbildung 4.5: γ -Sekretase Inhibitor Compound E führt zur Verstärkung der B3 Bande. BeWo-Zellen wurden über einen Zeitraum bis zu acht Stunden mit dem γ -Sekretase Inhibitor Compound E (5 μ M) behandelt, bevor Zellextrakte mit einem 0,1 % SDS und 1 % Triton X-100 enthaltenden Lysispuffer hergestellt wurden und im Immunoblot ein spezifischer Antikörper für das C-terminale Ende von c-Fms verwendet wurde.

4.1.2.3 Identifizierung der Zellkompartimente für die c-Fms Banden

Durch eine Zellfraktionierung sollte überprüft werden, in welchem Zellkompartiment die verschiedenen Bande nachzuweisen sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass die p80 und p75 Banden sich in der Membranfraktion befinden und die 50 kDa Bande überwiegend in der Nukleusfraktion zu detektieren war. Des Weiteren konnte für die 50 kDa Bande gezeigt werden, dass diese tyrosinphosphoryliert ist (Abbildung 4.6).

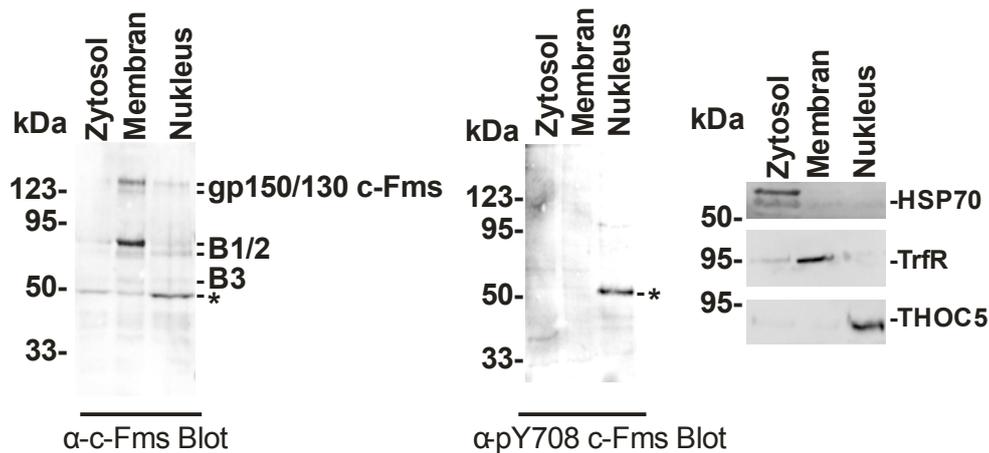


Abbildung 4.6: Lokalisation der Zellkompartimente der sechs c-Fms Banden.

Aus BeWo-Zellen wurden Zellextrakte hergestellt unter der Verwendung von 0,5 % NP-40 im Lysispuffer. Durch Zentrifugation bei 800 x g wurde die zytoplasmatische (Zytosol) und mit 5000 x g die membrangebundene Fraktion (Membran) erhalten, während im Zellpellet die Nukleusfraktion (Nukleus) enthalten ist. Die Fraktionen wurden im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern für den c-Fms C-Terminus (linkes Panel) und phospho-c-Fms (pY708 c-Fms; mittleres Panel) analysiert. Außerdem wurde im Immunoblot mit Antikörpern für das Hitzeschockprotein 70 (HSP70), den Transferrinrezeptor (TrfR) und die THO Komplex Untereinheit 5 (THOC5) die Spezifität der Fraktion untersucht (rechtes Panel).

4.1.3 Intrazelluläre Domäne von c-Fms

4.1.3.1 Funktionalität der c-Fms ICD

Die Funktionalität der c-Fms-ICD wurde mit Hilfe der hergestellten Fusionsproteine GFP-c-Fms-ICD, HA-c-Fms-ICD und myc-c-Fms-ICD (Abbildung 4.7) überprüft. Dazu wurden HeLa Zellen mit diesen Konstrukten, dem Leervektor und der Kinase inaktiven Mutante GFP-c-Fms-ICD-K616M transfiziert.

Mit einem spezifischen c-Fms-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte zur Expression gebracht wurden. Für alle drei c-Fms-ICD Konstrukte konnte auch die Phosphorylierung von c-Fms nachgewiesen werden. Für das ICD K616M Konstrukt war, wie zu erwarten, keine Phosphorylierung zu sehen (Abbildung 4.8).

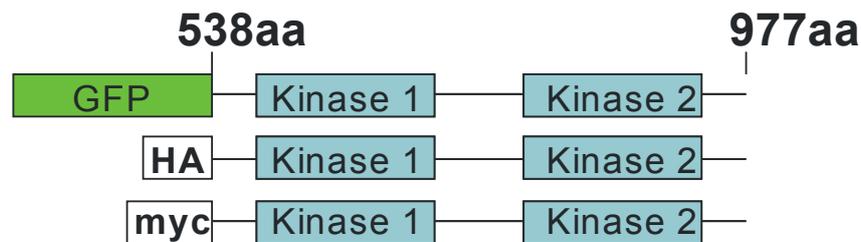


Abbildung 4.7: Darstellung der Fusionsproteine für c-Fms-ICD.

Schematische Darstellung der Fusionsproteine GFP, HA oder myc mit der c-Fms intrazellulären Domäne (ICD) am C-terminalen Ende, die sich von Aminosäure 538 bis 977 erstreckt und die Kinasedomäne 1 und Kinasedomäne 2 enthält. aa = Aminosäure

Beim GFP-c-Fms-ICD Konstrukt konnte eine stärkere Phosphorylierung nachgewiesen werden als bei den beiden anderen Konstrukten, was daran liegen könnte, dass GFP Dimere bilden kann (Shaner *et al.*, 2007).

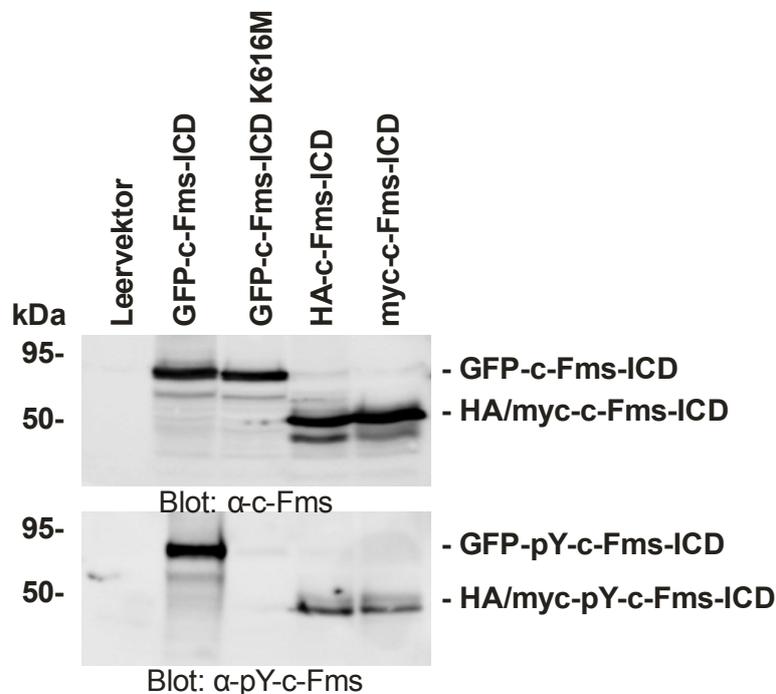


Abbildung 4.8: Expressionsüberprüfung der c-Fms-ICD Fusionsproteine.

In HeLa-Zellen wurden die Konstrukte GFP-c-Fms-ICD, HA-c-Fms-ICD und myc-c-Fms-ICD, das Konstrukt für die Kinase negativ-Mutante (GFP-c-Fms-ICD K616M) sowie der Leervektor als Kontrolle nach Transfektion zur Expression gebracht und Zellextrakte hergestellt. Im Immunoblot wurden die Extrakte mittels Antikörper auf c-Fms Spezifität (oberes Panel) und auf die phospho-c-Fms Spezifität (unteres Panel) analysiert. Leervektor: pEGFP-N2.

4.1.3.2 Überprüfung der Lokalisation von c-Fms-ICD

Zur Feststellung in welchem Zellkompartiment die c-Fms-ICD nachzuweisen ist, wurden Zelllysate unter Verwendung von 0,1 % NP-40 für eine lösliche und eine unlösliche Fraktion hergestellt. Die lösliche Fraktion enthält das Zytoplasma,

während sich in der unlöslichen Fraktion Kompartimente des Zytoskeletts und des Nukleus befinden.

Die c-Fms-ICD konnte in beiden Fraktionen mit einem c-Fms-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die c-Fms-ICD in beiden Fraktionen phosphoryliert ist, was mit einem phospho-Tyrosin c-Fms Antikörper sichtbar gemacht wurde. Mit spezifischen Antikörpern für GAPDH (Z) bzw. Histon H3 (N) konnte gezeigt werden, dass die Fraktionen sauber aufgereinigt wurden (Abbildung 4.9).

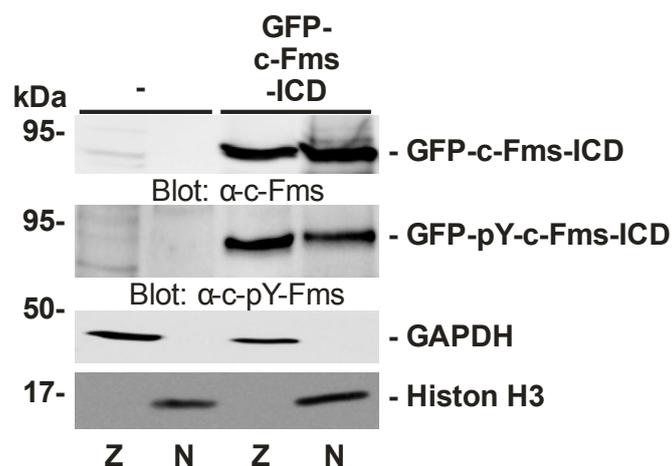


Abbildung 4.9: GFP-c-Fms-ICD Fusionsprotein ist im Zellkern nachweisbar.

HeLa-Zellen wurden untransfiziert oder transfiziert mit dem GFP-c-Fms-ICD Konstrukt mit 0,1 % NP-40 im Lysispuffer zu Zellextrakten verarbeitet. Die lösliche Fraktion (Z) im Zellüberstand enthält die zytoplasmatischen und membrangebundenen Bestandteile. Die unlösliche Fraktion (N) im Pellet beinhaltet die Zellkerne und das Zytoskelett. Die Fraktionen wurden im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern für den c-Fms C-Terminus (oberes Panel) und phospho-Tyrosin c-Fms (pY-c-Fms; mittleres Panel) analysiert. Mit den Antikörpern gegen GAPDH und Histon H3 wurde die Spezifität der Fraktionen gezeigt. Z = Zytoplasma; N = Nukleus

4.1.4 Das RRK-Motiv ist essentiell für die Translokation der c-Fms-ICD in den Nukleus

4.1.4.1 Bereich des Kernlokalisierungssignals

In Abbildung 4.10 ist der Sequenzabschnitt von c-Fms gezeigt, in dem mögliche Kernlokalisierungssignale vorhanden sind. Der Bereich erstreckt sich von Aminosäure 674 bis 726. Die möglichen Kernlokalisierungssignale sind rot hervorgehoben. Bei Aminosäure 699, 708 und 723 sind Tyrosin-Phosphorylierungsstellen schwarz hervorgehoben und mit darüberstehendem „P“ sichtbar gemacht. Die Kinase-Insert Domäne von c-Fms beginnt bei Aminosäure 682. Bei Aminosäure 699 und 723 sind die Bindungsstellen für die Bindungspartner Grb2 und PI3K bzw. PLC-γ dargestellt.

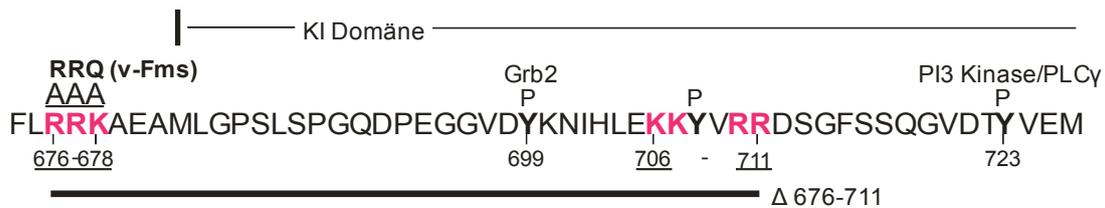


Abbildung 4.10: Ausschnitt der Aminosäuresequenz des menschlichen c-Fms Proteins.

Dargestellt ist der Ausschnitt der Aminosäuresequenz vom menschlichen c-Fms Protein von Aminosäure 674 bis 726, mit dem Beginn der Kinase-Insert (KI) Domäne bei Aminosäure M682. Mögliche Kernlokalisierungssignale sind rot markiert (RRK bei 676 bis 678 sowie KK bei 706/707 und RR bei 710/711) und Tyrosinphosphorylierungsstellen bei Aminosäure 699, 708 und 723 sind schwarz hervorgehoben mit ihren Bindungsproteinen. Weiterhin ist der Bereich einer Mutante gezeigt, bei der die Aminosäuren 676 bis 711 deletiert wurden (Δ 676-711). Oberhalb der Aminosäuren 676 bis 678 sind zwei Motive abgebildet, die für eine AAA-Mutante bzw. eine RRQ-Mutante (Motiv aus v-Fms) codieren.

4.1.4.2 Identifizierung des Kernlokalisierungssignals

Durch den Hinweis aus Abbildung 4.9, dass c-Fms-ICD im Zellkern nachzuweisen ist, sollte dies mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Dazu wurden zunächst HeLa-Zellen mit dem GFP-c-Fms-ICD Konstrukt transfiziert, anschließend fixiert und mit DAPI der Zellkern angefärbt. Für GFP-c-Fms-ICD konnte eine klare Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden, was bei der Überlagerung von der GFP- und DAPI-Färbung erkenntlich wird (Abbildung 4.11, GFP-c-Fms-ICD).

Weiterhin wurde untersucht, an welcher Stelle sich das verantwortliche Kernlokalisierungssignal in der Sequenz befindet. Dazu wurde zunächst eine Deletionsmutante hergestellt, bei der die drei möglichen Kernlokalisierungssignale zwischen Aminosäure 676 bis 711 (Abbildung 4.10, bei Δ 676-711) im entsprechenden DNA-Abschnitt fehlte. Für dieses Konstrukt konnte keine Kernlokalisation gezeigt werden (Abbildung 4.11, GFP-c-Fms-ICD Δ 676-711).

Um den Bereich für das Kernlokalisierungssignal weiter eingrenzen zu können, wurde zum einen der Bereich mit dem Motiv RRK bei Aminosäure 676 bis 678 und zum anderen der mit dem Motiv KK-RR bei Aminosäure 706 bis 711 deletiert (KK-RR). Hierbei konnte für die Deletion des RRK-Motives keine Überlagerung mit dem Zellkern gezeigt werden, während für die KK-RR Deletion keinerlei Beeinflussung der Lokalisation sichtbar war. Zur Bestätigung, dass es sich bei dem RRK-Motiv um das Kernlokalisierungssignal für die c-Fms-ICD handelt, wurden die Aminosäuren RRK durch AAA bzw. RRQ ersetzt. Auch für diese Mutanten war keine Kernlokalisation zu detektieren, was hier exemplarisch anhand der RRK/AAA-Mutante gezeigt wurde (Abbildung 4.11, GFP-c-Fms-ICD RRK/AAA).

Außerdem wurde untersucht, ob die Kinaseaktivität Auswirkungen auf die Kernlokalisierung hat. Hierfür wurde die c-Fms-ICD K616M-Mutante verwendet, bei der das ATP-Bindungsmotiv fehlt. Dabei konnte eine Kernlokalisierung gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass die Kinaseaktivität die Translokation in den Zellkern nicht beeinflusst (Abbildung 4.11, GFP-c-Fms-ICD K616M).

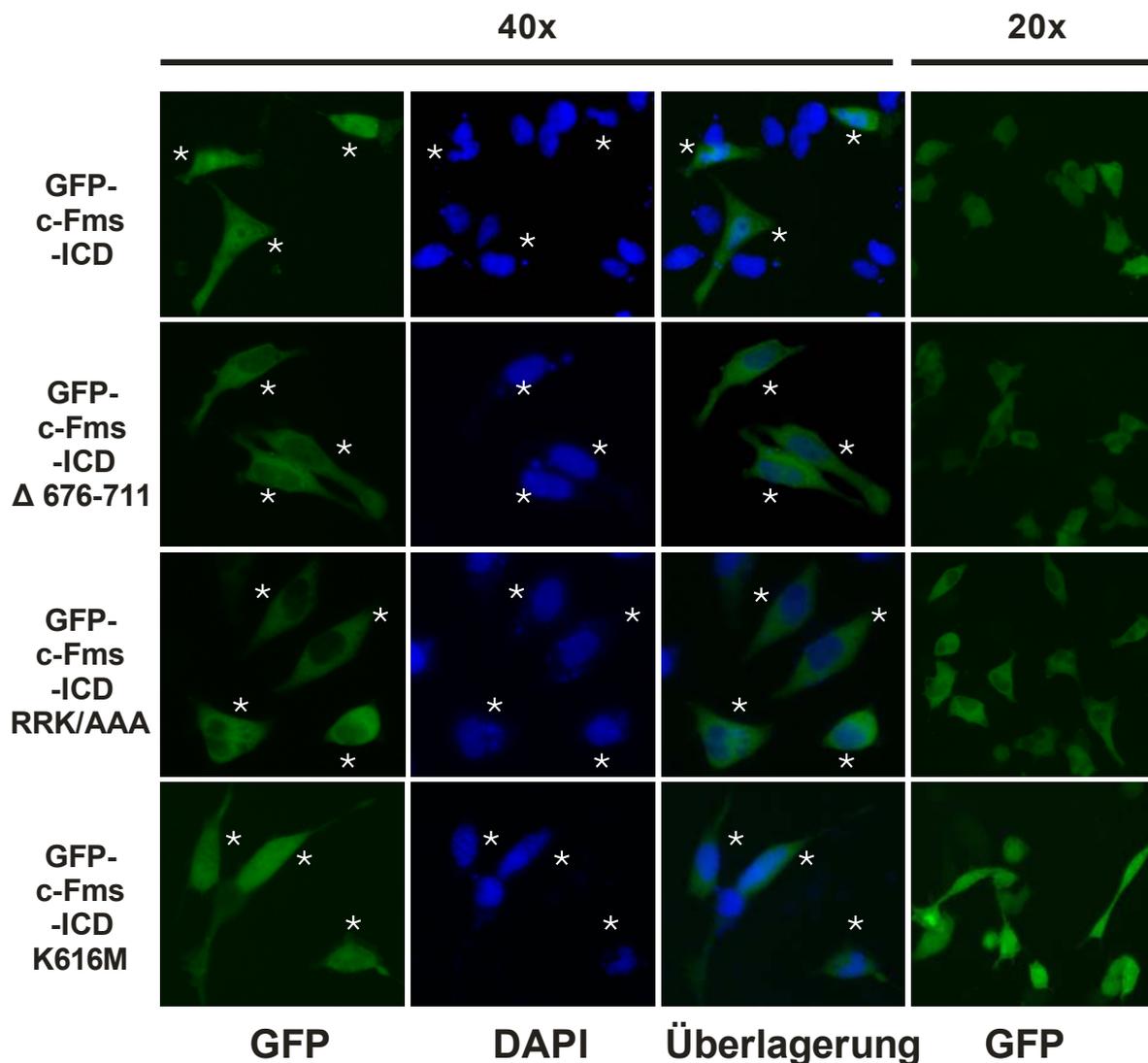


Abbildung 4.11: Kernlokalisationsüberprüfung von c-Fms-ICD und deren Mutanten.

Auf Deckgläschen ausplattierte HeLa-Zellen wurden mit dem Konstrukt GFP-c-Fms-ICD sowie den Mutanten GFP-c-Fms-ICD Δ 676-711, GFP-c-Fms-ICD RRK/AAA und GFP-c-Fms-ICD K616M transfiziert. Nach der Anfärbung des Zellkerns mit DAPI wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In den ersten drei Spalten von links wurden die Zellen bei 40-facher Vergrößerung (40x) betrachtet, in der vierten bei 20-facher Vergrößerung (20x). Von links nach rechts ist zunächst die Expression der GFP-Konstrukte, die DAPI-Färbung, gefolgt von der Überlagerung beider Aufnahmen zu sehen und abschließend ein größerer Ausschnitt des GFP-Signals. Die Sternchen weisen auf transfizierte Zellen hin.

4.1.5 Induktion von Signalwegen durch c-Fms-ICD

4.1.5.1 c-Fms-ICD induzierte Signalkaskaden

Um die Auswirkungen der c-Fms-ICD zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den Konstrukten GFP-c-Fms-ICD, GFP-c-Fms-ICD K616M, GFP-c-Fms-ICD K678Q und GFP-Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und auf die Expression von c-Fms, phospho-c-Fms, STAT3, phospho-STAT3, STAT5, phospho-STAT5, Erk1/2, phospho-Erk1/2, Akt und phospho-Akt überprüft.

Dabei konnte mit der GFP-c-Fms-ICD die Phosphorylierung für STAT3, STAT5 und Erk1/2, aber nicht für Akt, gezeigt werden. Dies war weder beim GFP-Leervektor noch bei GFP-c-Fms-ICD K616M der Fall. Bei GFP-c-Fms-ICD K678Q konnte ebenfalls eine Phosphorylierung für STAT3 und Erk1/2 nachgewiesen werden, aber im geringeren Ausmaß als für GFP-c-Fms-ICD (Abbildung 4.12).

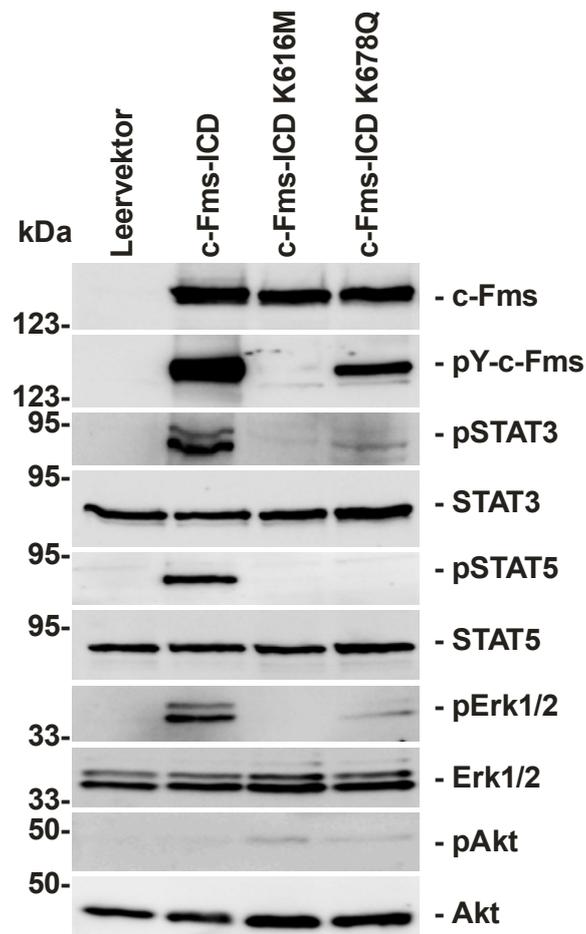


Abbildung 4.12: c-Fms-ICD induzierte Signalkaskaden.

HeLa Zellen wurden mit dem Leervektor pEGFP-N2, GFP-c-Fms-ICD, GFP-c-Fms-ICD K616M und GFP-c-Fms-ICD K678Q transfiziert und nach 24 Stunden lysiert. Mittels Immunoblot wurden die Zelllysate mit spezifischen Antikörpern gegen c-Fms, phospho-c-Fms, STAT3, phospho-STAT3, STAT5, phospho-STAT5, Erk1/2, phospho-Erk1/2, Akt sowie phospho-Akt untersucht.

Da die nicht kernlokalisierte Mutante GFP-c-Fms-ICD K678Q wie GFP-c-Fms-ICD die Moleküle STAT3 und Erk1/2 phosphoryliert, ist es fraglich, ob die Kernlokalisierung eine wichtige Rolle für diese Signalwege spielt.

4.1.5.2 Einfluss von Imatinib Mesylat auf c-Fms-ICD

Um zu verifizieren, ob die Phosphorylierung von c-Fms und der Signalmoleküle durch die Aktivierung der c-Fms Tyrosinkinase bedingt ist, wurden HEK293-Zellen mit GFP-c-Fms-ICD transfiziert. Nach einer zweistündigen Behandlung mit und ohne Imatinib Mesylat, wurden Lysate hergestellt und im Immunoblot auf die Expression von c-Fms, STAT3 und Erk1/2 und deren Phosphorylierung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Imatinib Mesylat weder die Tyrosin-Phosphorylierung von c-Fms, noch phosphoryliertes STAT3 und phosphoryliertes Erk1/2 nachzuweisen waren, die bei der unbehandelten GFP-c-Fms-ICD zu sehen waren (Abbildung 4.13).

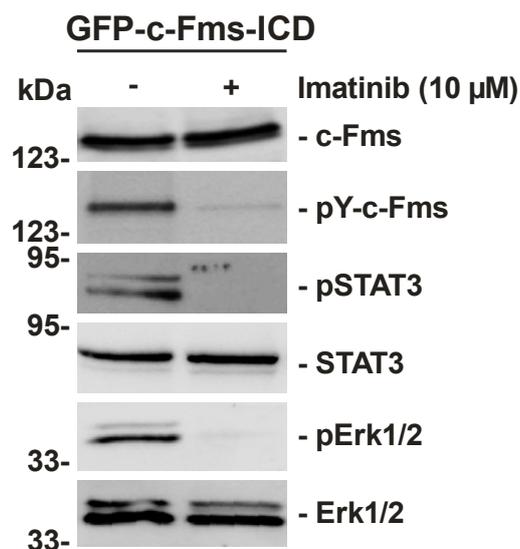


Abbildung 4.13: Behandlung mit Imatinib hemmt c-Fms-ICD und dessen Signale.

In HEK293-Zellen wurde GFP-c-Fms-ICD transfiziert und Zelllysate hergestellt mit und ohne Behandlung von Imatinib (10 μ M) für zwei Stunden. Mittels spezifischer Antikörper wurde die Expression von c-Fms, phospho-c-Fms, STAT3, phospho-STAT3, Erk1/2 sowie phospho-Erk1/2 im Immunoblot untersucht.

4.1.6 Vergleich von CSF-1-stimulierten Epithelzellen und Makrophagen

In hämatopoetischen Zellen ist die Bedeutung von c-Fms ausreichend beschrieben. Um einen besseren Einblick zu erlangen, welche Auswirkungen c-Fms in nicht-hämatopoetischen Zellen hat, sollte c-Fms in der Epithelzelllinie HEK293 mittels Mikroarray auf die Genregulation untersucht werden.

Für die Untersuchung wurden HEK293-Zellen transient mit dem menschlichen c-Fms Gen transfiziert und für 16 Stunden im serumfreien Medium inkubiert, bevor sie für 20 Minuten bzw. acht Stunden mit CSF-1 (100 ng/mL) im serumfreien Medium stimuliert wurden. Für die Durchführung des Mikroarrays wurde aus den Zellen die RNA isoliert und die weitere Bearbeitung erfolgte anschließend in der zentralen Mikroarray-Abteilung des SFB566 (O. Dittrich-Breiholz, MHH; siehe 3.2.10).

Die Auswertung erfolgte durch drei Parameter:

- 1.) für das arithmetische Mittel der Signale mit einem Wert von ≥ 10 ,
- 2.) einem Wert der Probe von $\geq 0,5$ und
- 3.) einem Verhältnis von Probe zur Kontrolle mit einem Wert von $\geq 2,0$.

Dabei konnte eine Hochregulierung von 97 Transkripten für 20 Minuten und 172 Transkripten für die acht Stunden Stimulation gezeigt werden, von denen aber nur neun Gene für beide Zeitpunkte überlappend waren (Abbildung 4.14).

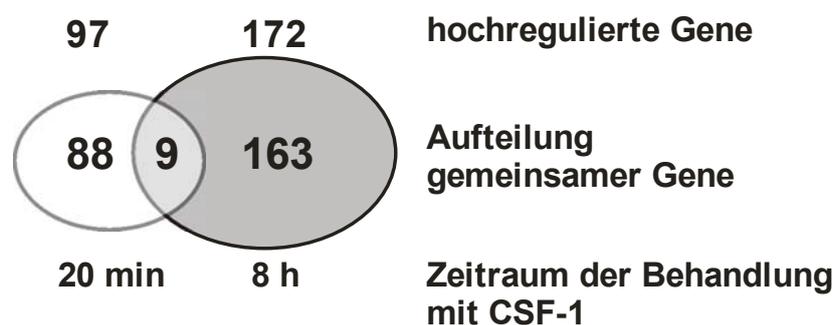


Abbildung 4.14: Venn-Diagramm von hochregulierten Genen in c-Fms überexprimierenden HEK293-Zellen nach CSF-1 Behandlung für 20 Minuten und acht Stunden.

Dargestellt ist die Anzahl der hochregulierten Gene aus einem Mikroarray von HEK293-Zellen transfiziert mit GFP-c-Fms-ICD und Behandlung mit CSF-1 für 20 Minuten (20 min) und acht Stunden (8 h). Im Vergleich konnten neun Gene identifiziert werden, die in beiden Arrays hochreguliert sind.

4.1.6.1 IPA Funktionsanalyse oder Einordnung der Mikroarray Daten nach biologischen Funktionen

Um die Ergebnisse der Mikroarrays besser einordnen zu können, wurden die hochregulierten 97 Gene für die 20 Minuten bzw. 172 Gene für die acht Stunden CSF-1-stimulierten HEK293-Zellen auf ihre biologische Bedeutung hin untersucht.

Dafür wurden die Daten bei der Internet-basierenden Anwendung *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems, Mountain View, CA) hochgeladen. Von den 97 hochgeladenen Genen, der 20 Minuten CSF-1-Stimulation in HEK293-Zellen, wurden alle erkannt (Anhang Tabelle 1). Dagegen wurde von den 172 hochgeladenen Genen für die acht Stunden CSF-1-stimulierten HEK293-Zellen die Gene SPANXA2/SPANXD sowie VCX/VCX3 als Duplikate eingeordnet, so dass letztendlich 170 hochregulierte Gene gelistet wurden (Anhang Tabelle 2). Von diesen Genen konnte für 86 bzw. 143 eine Funktions- und Signalwegsanalyse erfolgen.

4.1.6.2 Vergleich mit stimulierten Makrophagen

Für das Makrophagen System ist das Expressionsprofil für c-Fms induzierte Gene von Irvine *et al.* (Irvine *et al.*, 2009) nach sechsstündiger Stimulation mit CSF-1 gezeigt worden. In dieser Veröffentlichung wurde über eine Hochregulierung von 88 Genen berichtet, die zum Vergleich mit den Epithelzellen bei IPA eingespeist wurden.

Beim Vergleich zwischen den hochregulierten Genen für Makrophagen und Epithelzellen konnten nur die drei gemeinsamen Gene, ACOX2, CCL7 und CCL2 in beiden Systemen identifiziert werden. Da alle drei Gene bei acht Stunden stimulierten Epithelzellen vorzufinden waren, wurden die weiteren Analysen ausschließlich mit diesem Zeitpunkt fortgeführt.

Weiterhin wurden die beiden Datensätze im IPA der Funktionsanalyse unterzogen. Obwohl nur drei gemeinsame Gene identifiziert wurden, konnte überraschenderweise für beide Zellsysteme in der Kategorie „Krankheiten und Störungen“ als Spitzenfunktion die „inflammatorische Reaktion“ ausgegeben werden. Bei den Makrophagen wurde die Unterkategorie „Rekrutierung/Rekrutierung von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen“ mit einer Signifikanz von 2,06E-06 am höchsten klassifiziert. Demgegenüber wurde bei den Epithelzellen die Unterkategorie „Zellbewegung/Zellbewegung von Monozyten“ mit einer Signifikanz von 9,06E-11 eingestuft.

4.1.6.3 Proteinklassen Analyse

Als nächstes wurden die beiden Datensätze von HEK293-Zellen (8 h CSF-1) und Makrophagen (6 h CSF-1) in die Internet-basierende Anwendung PANTHER (***P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships*; Thomas *et al.*, 2003) zur Proteinklassen Analyse eingespeist. Die Anwendung gibt die Signifikanz bestimmter funktionaler Kategorien zwischen den Genen an, die aufgrund der Präsenz im Vergleich zur Gesamtzahl in den repräsentierten Kategorien bemessen wird.

Für HEK293-Zellen mit acht Stunden CSF-1-Stimulation wurde festgestellt, dass hochregulierte Gene der inflammatorischen Reaktion in der Kategorie Chemokine und Interleukine mit Werten von $p=1,21E-04$ bzw. $p=4,87E-02$ signifikant sind. Dagegen wurde für die sechs Stunden CSF-1-behandelten Makrophagen in diesen Kategorien nur eine Signifikanz von $1,28E-03$ bzw. keine Signifikanz (n.s.) gezeigt.

Stattdessen wurde für die Makrophagen in den Kategorien Zytokinrezeptoren und Immunglobulinrezeptoren Superfamilie eine Signifikanz von $2,50E-03$ bzw. $3,08E-02$ für hochregulierte Gene gezeigt, während bei den HEK293-Zellen diese beiden Kategorien nicht signifikant repräsentiert wurden.

Im Mikroarray der HEK293-Zellen wurden die Gene MMP1, MMP10 und MMP12 hochreguliert, die zu den Metalloproteinasen zählen und bei der PANTHER-Auswertung eine Kategorie bilden, welche mit einer Signifikanz von $1,44E-02$ bewertet wird, für die Makrophagen ist diese Kategorie nicht signifikant. Die Kategorie der Peptidhormone ist ebenfalls nur bei den HEK293-Zellen mit $p=6,63E-03$ signifikant (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: PANTHER Analyse der hochregulierten Gene von c-Fms exprimierenden HEK293-Zellen nach acht Stunden Stimulation mit CSF-1 im Vergleich zu Makrophagen regulierten Genen nach sechs Stunden CSF-1-Stimulation aus Irvine *et al.*, 2009 (ausgewählte Daten).

PANTHER Proteinklassen	HEK293-Zellen (p-Wert)	Makrophagen (p-Wert) (nach Irvine <i>et al.</i> 2009)
Zytokine/Chemokine	1,21E-04	1,28E-03
Zytokine/Interleukin Superfamilie	4,87E-02	n.s.
Peptidhormone	6,63E-03	n.s.
Metalloproteasen	1,44E-02	n.s.
Rezeptoren/Zytokinrezeptoren	n.s.	2,50E-03
Rezeptoren/Immunglobulin Rezeptor Superfamilie	n.s.	3,08E-02

n.s = nicht signifikant

4.2 Charakterisierung von TrkA und seiner Leukämie induzierenden Mutante Δ TrkA in verschiedenen Zelllinien

Der Nervenwachstumsrezeptor TrkA spielt in der Differenzierung, der Proliferation, dem Überleben, der Apoptose und der Transformation von Zellen eine Rolle.

So ist für TrkA bekannt, dass in der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 bei Anwesenheit von seinem Liganden NGF Differenzierung stattfindet, die sich durch den Auswuchs von Neuriten äußert (Greene & Tischler, 1976). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei den hämatopoetischen Zellen HMC-1 und K562 die Behandlung mit Imatinib und NGF zur Proliferation und zum Überleben führt (Koch *et al.*, 2008). Außerdem wurde für die TrkA Mutante Δ TrkA, die ursprünglich aus Leukämiezellen isoliert wurde, nachgewiesen, dass diese in Fibroblasten- und Epithelzellen ein Potential zur Transformation besitzt (Reuther *et al.*, 2000).

Mit Hilfe der onkogenen Mutante Δ TrkA sollte untersucht werden, ob zellspezifische Signalmoleküle oder die Signalintensität für die verschiedenen Phänotypen verantwortlich sind. Die karzinogene Mutante Δ TrkA wird verwendet, da sie daueraktiv sein soll und im Vergleich mit dem Wildtyp-TrkA (wt-TrkA) die Überlegung besteht, dass ein anderer Phänotyp ausgebildet werden könnte.

Um dieses überprüfen zu können wurden wt-TrkA und Δ TrkA in verschiedenen Zelllinien zur Expression gebracht: der Epithelzelllinie HEK293, der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y sowie der Phäochromozytom-Zelllinie PC12.

4.2.1 Funktionsnachweis in humanen embryonalen Nierenzellen

4.2.1.1 Nachweis der Expression von Δ TrkA

Das neu generierte Δ TrkA Konstrukt im Vektor pcDNA3.1, der über einen CMV-Promotor verfügt, wurde auf seine Funktionalität untersucht. Zur Überprüfung wurde es zusammen mit dem Konstrukt pcDNA3.1 wt-TrkA, dem Leervektor sowie dem Δ TrkA Ursprungskonstrukt pBABEpuro Δ TrkA, das über ein LTR-Element (*long terminal repeat*) zur Expression führt, verglichen. Dazu wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten transient transfiziert, nach 24 Stunden für die Analyse im Immunoblot lysiert und mit einem spezifischen Antikörper auf die Expression von TrkA untersucht. Als Positivkontrolle für wt-TrkA wurde ein Zelllysat aus einer im

Labor vorhandenen stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zelllinie (Koch *et al.*, 2008) hergestellt.

So wurde gezeigt, dass sowohl Δ TrkA als auch wt-TrkA zur Expression gebracht werden konnte (Abbildung 4.15).

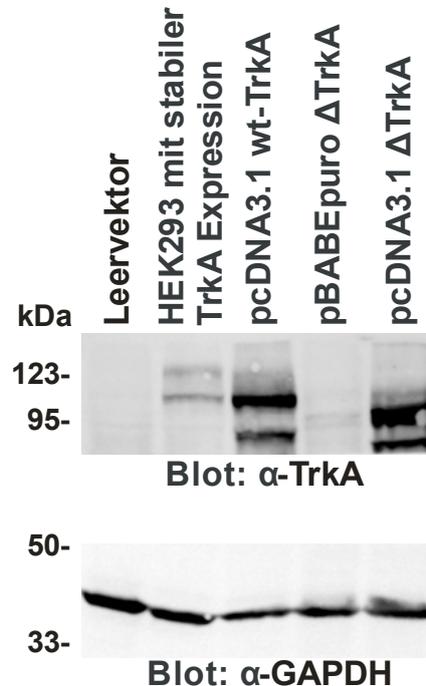


Abbildung 4.15: Expressionsüberprüfung von Δ TrkA in HEK293-Zellen.

Zellextrakte aus stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen und aus transfizierten HEK293-Zellen mit den Konstrukten pcDNA3.1 wt-TrkA, pcDNA3.1 Δ TrkA sowie dem Leervektor und pBABEpuro Δ TrkA wurden im Immunoblot auf die Expression von TrkA und GAPDH mit spezifischen Antikörpern überprüft.

4.2.1.2 Überprüfung der Kinase-Aktivität und des Glykosylierungsmusters

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Δ TrkA zur Expression gebracht wurde, sollte untersucht werden, inwieweit die Kinasefunktion aktiv ist. Dafür wurden erneut die Konstrukte pcDNA3.1 Δ TrkA, pcDNA3.1 wt-TrkA, der Leervektor und, als Positivkontrolle für Δ TrkA, das Konstrukt pBABEpuro Δ TrkA in HEK293-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden zu Zellextrakten verarbeitet. Auch aus den stabil TrkA-überexprimierenden HEK293-Zellen wurde ein Zellextrakt hergestellt, welches als wt-TrkA Kontrolle verwendet wurde.

Die Zellextrakte wurden für eine Immunpräzipitation (IP) mit einem TrkA spezifischen Antikörper verwendet. Nach der Zugabe von radioaktiv-markiertem [32 P]- γ -ATP wurde ein Teil zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Kinase verwendet. Der andere Teil wurde mit dem Enzym Endo-H behandelt, um zu überprüfen inwieweit

eine Mannose-reiche Glykosylierung an der Aminosäure Asparagin vorlag (Abbildung 4.16).

Bei der IP konnten die erwarteten Banden detektiert werden, was zeigt, dass die Funktion der Kinase vorhanden ist. Durch den Endo-H Ansatz konnte gezeigt werden, dass die reife Formen von TrkA bei 140 kDa bzw. 115 kDa bei Δ TrkA (Abbildung 4.16, gelbe Sterne) vom Endo H-Abbau unberührt bleiben, während die unreife Formen von TrkA bei 110 kDa bzw. 98 kDa bei Δ TrkA (Abbildung 4.16, rote Sterne) durch Endo H deglykosyliert worden sind.

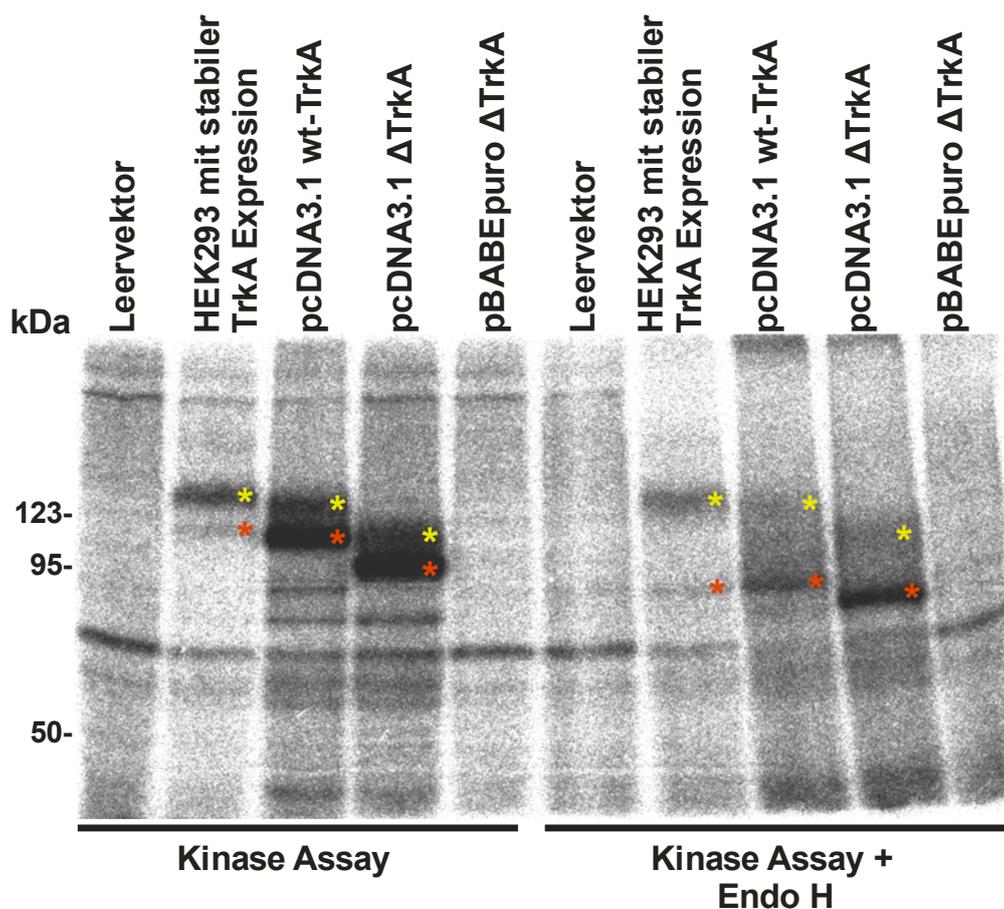


Abbildung 4.16: TrkA Immunpräzipitation für Kinase-Assay und Endo-H-Behandlung.

Zellextrakte aus stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen und aus transfizierten HEK293-Zellen mit den Konstrukten pcDNA3.1 wt-TrkA, pcDNA3.1 Δ TrkA sowie dem Leervektor und pBABEpuro Δ TrkA wurden mit einem TrkA spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Ansätze wurden mit [32 P]- γ -ATP markiert (Kinase Assay) sowie einer Behandlung mit dem Enzym Endo H unterzogen (Kinase Assay + Endo H). Die gelben Sterne zeigen die reife Form und die roten Sterne weisen auf die unreife Form hin, die mit Endo H abgebaut worden sind.

4.2.2 Überprüfung des Transformationspotentials von Δ TrkA in Fibroblasten

4.2.2.1 Expressions- und Phosphorylierungsnachweis

Zur weiteren Untersuchung wurden Mausfibroblasten Zellen (NIH3T3) mit dem Konstrukt R511 Δ TrkA und dem Leervektor stabil transfiziert. Durch Selektion konnten einzelne Klone gewonnen werden. Zusammen mit einer stabilen wt-TrkA-exprimierenden Zelllinie von NIH3T3 (Koch *et al.*, 2008) wurden aus diesen Zellen, nach der Stimulation mit NGF (100 ng/mL) für 15 Minuten, Lysate hergestellt und im Immunoblot auf Tyrosinphosphorylierung, TrkA sowie auf Akt und Erk1/2 als auch auf deren Phosphorylierungen hin untersucht.

In Abbildung 4.17 ist zu sehen, dass für die stabile wt-TrkA-Zelllinie nach 15 Minuten NGF-Behandlung eine phospho-Tyrosin Bande detektiert werden konnte, dagegen nicht bei der unbehandelten Probe. Für Δ TrkA war sowohl beim stimulierten als auch beim unstimulierten Ansatz eine leichte Phosphorylierung nachzuweisen (Abbildung 4.17; α -pY99). Für die TrkA Expression konnte sowohl für wt-TrkA als auch Δ TrkA in beiden Ansätzen ein ähnliches Expressionslevel gezeigt werden (Abbildung 4.17; α -TrkA).

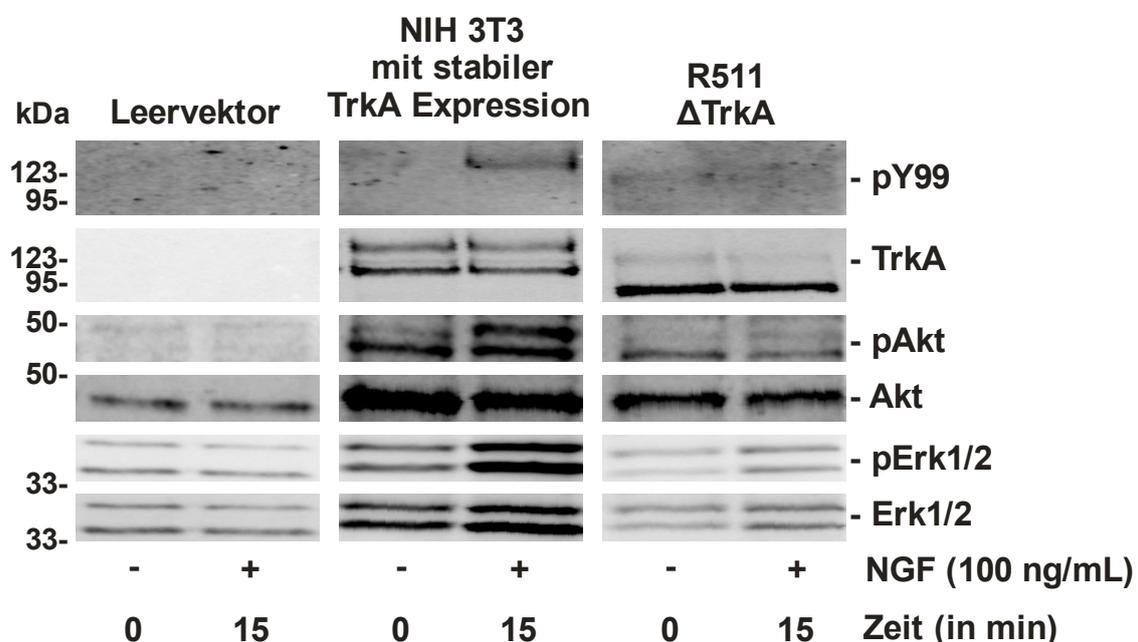


Abbildung 4.17: NGF-Stimulation von wt-TrkA und Δ TrkA in NIH3T3-Zellen.

Die Mausfibroblasten-Zellen NIH3T3 wurden mit R511 Δ TrkA und dem Leervektor transfiziert. Durch Selektion konnten Einzelklone gewonnen werden. Diese Zellen und stabil wt-TrkA-exprimierende NIH3T3-Zellen wurden für 24 Stunden im serumfreien Medium kultiviert, nach 15 Minuten NGF-Behandlung (100 ng/mL) oder unbehandelt zu Zellextrakten lysiert und im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-Tyrosin (pY99), TrkA, Akt und Erk1/2 sowie deren Phosphorylierungen untersucht.

Bei der Überprüfung auf Signale der Signalkaskade konnte für wt-TrkA eine deutliche Erhöhung für die Phosphorylierung von Akt und Erk1/2 nach 15 Minuten NGF-Stimulation gezeigt werden. Im Vergleich dazu konnte für Δ TrkA sowohl ohne als auch mit NGF-Stimulation kaum eine Erhöhung von phospho-Akt und phospho-Erk1/2 detektiert werden.

Generell konnte mit der phospho-Tyrosin Bande bei den unstimulierten Δ TrkA exprimierenden NIH3T3-Zellen gezeigt werden, dass diese eine Liganden-unabhängige Aktivität mit sich bringt. Im Vergleich zur phospho-Tyrosin Bande der NGF-stimulierten wt-TrkA Zellen fällt diese Aktivität allerdings sehr gering aus.

4.2.2.2 Soft-Agar-Assay zur Überprüfung der Koloniebildung

Da in der Literatur für Δ TrkA das Potential zur Transformation in Fibroblasten und Epithelzellen beschrieben wurde (Reuther *et al.*, 2000), wurden die stabil exprimierenden NIH3T3-Zellen von wt-TrkA und Δ TrkA im Soft-Agar-Assay eingesetzt, um sie auf Koloniebildung zu überprüfen.

Nach vier Tagen Inkubation wurden die Soft-Agar Platten auf Kolonien überprüft, allerdings konnte weder für den Wildtyp, wie zu erwarten war, allerdings auch für Δ TrkA keine Koloniebildung nachgewiesen werden. Stattdessen war zu beobachten, dass die Zellen apoptotisch waren. Hierdurch konnten die Ergebnisse aus dem vorigen Abschnitt bestätigt werden, dass Δ TrkA keine starke Aktivität aufweist.

4.2.3 Funktionsanalyse der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y mit stabil integrierten TrkA-Konstrukten

Dass wt-TrkA nach NGF-Behandlung in der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y zur Ausbildung von Neuriten mit Wachstumskegel führt, folglich eine morphologische Differenzierung durchläuft, ist bereits bekannt (Lavenius *et al.*, 1995; Poluha *et al.*, 1995). Wie es sich bei der daueraktiven Variante von TrkA, dem Δ TrkA, verhält, wurde in SH-SY5Y Zellen untersucht.

4.2.3.1 FACS-Sortierung

Wie in Abschnitt 3.3.3.6 beschrieben, wurden wt-TrkA und Δ TrkA, beide mit einem HA-Anhang an der extrazellulären Domäne, sowie der Leervektor über retrovirale

Integration ins Genom der SH-SY5Y Zellen eingeführt. Um die erfolgreiche Integration zu überprüfen, wurden die drei Ansätze mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen HA, der mit FITC gekoppelt ist, markiert und mit einem FACS (fluorescence activated cell sorting) Gerät auf positive Zellen sortiert. Alle drei Ansätze wurden sortiert. Dabei wurde schon sichtbar, dass die Ausbeute für die Δ TrkA positiven Zellen mäßig war. Bei der weiteren Kultivierung der positiv sortierten Zellen gingen die Zellen mit Δ TrkA verloren. Es kann vermutet werden, dass sie entweder in Apoptose gingen oder sich ausdifferenziert haben. Die anderen beiden Ansätze wurden allerdings weiter überprüft, um sicher zu gehen, dass die Expression von TrkA in diesem System grundsätzlich möglich ist.

4.2.3.2 Expression der stabil wt-TrkA exprimierenden SH-SY5Y-Zellen

Zur Überprüfung wurde von den Neuroblastoma SH-SY5Y-Zellen mit stabiler wt-TrkA- und Leervektor-Expression Zellextrakte hergestellt.

Mit einem spezifischen Antikörper gegen TrkA konnte gezeigt werden, dass TrkA nur in den stabil wt-TrkA-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 4.18; α -TrkA). Um zu zeigen, dass auch das angehängte HA-Protein zur Expression kam, wurden die Lysate auf die HA-Expression überprüft und für wt-TrkA-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen konnte es korrelierend zum TrkA-Nachweis detektiert werden (Abbildung 4.18; α -HA). Für die stabilen Leervektor-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen konnte das HA-Protein aufgrund seiner geringen Größe nicht gezeigt werden. Zur Vergleichbarkeit, dass die Proben mit gleicher Proteinmenge aufgetragen worden sind, wurde die Akt-Expression überprüft (Abbildung 4.18; α -Akt).

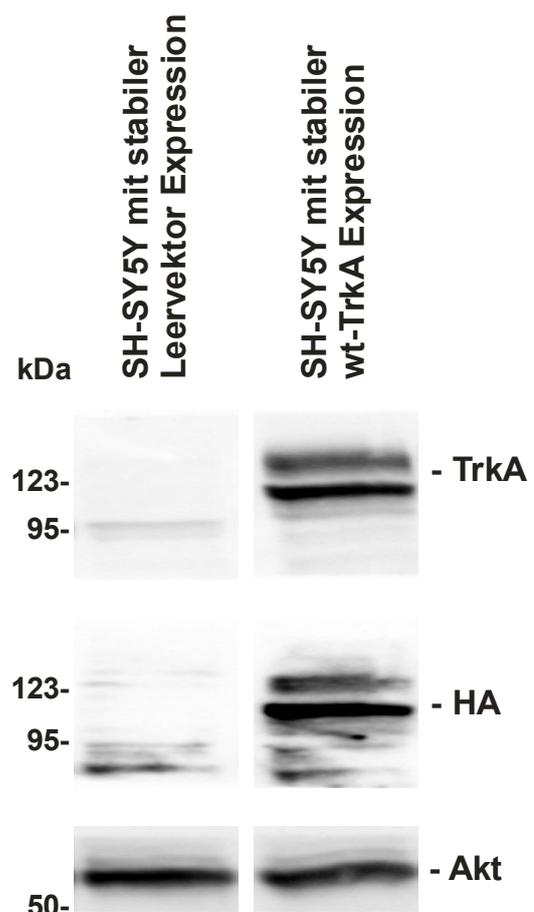


Abbildung 4.18: Expressionsnachweis von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler wt-TrkA und Leervektor Expression.

Zellextrakte von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Expression von wt-TrkA und Leervektor wurden im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen TrkA, HA und Akt überprüft.

4.2.3.3 Stabil wt-TrkA-exprimierende SH-SY5Y-Zellen mit Neuriten

Wie bereits erwähnt, ist es bekannt, dass wt-TrkA Überexpression in den SH-SY5Y-Zellen funktionsfähig ist und zur Ausbildung von Neuriten führt. Um zu überprüfen, ob die SH-SY5Y Zellen mit stabiler Expression von wt-TrkA auch dazu fähig sind, wurden diese und SH-SY5Y Zellen mit stabiler Expression des Leervektors, aber auch die SH-SY5Y in ihrer ursprünglichen Form, ausplattiert und für sieben Tage mit NGF (100 ng/mL) stimuliert.

In der Abbildung 4.19 ist deutlich zu sehen, dass bei den stabil wt-TrkA-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen die Neuritenbildung sehr stark ausgeprägt ist. Bei den anderen Zelllinien sind zwar kleine Ansätze zu erkennen, allerdings wird ein Auswuchs erst als Neurit bezeichnet, wenn dieser der doppelten Länge der Zelle entspricht. Für die SH-SY5Y-Zellen könnte dies vereinzelt zutreffen, wie es bei der Stimulierung über sieben Tage sichtbar wird, allerdings ist gut zu erkennen, dass die stabil wt-TrkA-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen nach siebentägiger NGF-Behandlung deutlich flacher sind, was einen Hinweis darauf gibt, dass sie ausdifferenziert sein könnten. Bei Δ TrkA exprimierenden SH-SY5Y-Zellen konnte nach dem Sortieren ein ähnliches Erscheinungsbild nicht beobachtet werden.

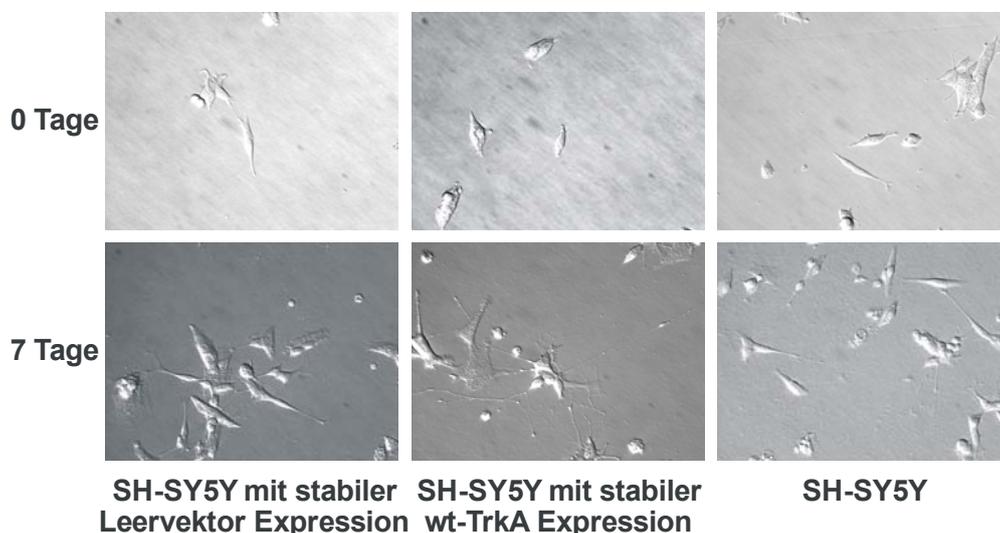


Abbildung 4.19: NGF-Stimulation von stabil wt-TrkA-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen führt zu Neuritenausbildung.

SH-SY5Y-Zellen in ihrer Ursprungsform sowie mit stabiler Expression von wt-TrkA bzw. Leervektor wurden für sieben Tage mit NGF (100 ng/mL) behandelt. In der oberen Reihe sind die Zellen vor dem Beginn der NGF-Behandlung dargestellt und in der unteren Reihe nach sieben Tagen NGF-Behandlung.

Da in den SH-SY5Y-Zellen keine Klarheit darüber erlangt werden konnte, ob die Expression von Δ TrkA in diesen Zellen zur Differenzierung führt, wurde Δ TrkA in einem weiteren neuronalen Zellsystem zur Expression gebracht.

4.2.4 Funktionsanalyse von Δ TrkA in PC12-Zellen

Das TrkA-System ist in den Phäochromozytom Zellen PC12 am besten untersucht und dient zur Untersuchung vieler biologischer Abläufe, die durch NGF-Stimulation induziert werden. Die PC12-Zellen bilden nach NGF-Behandlung Neuriten aus und gehen, wie schon bei den SH-SY5Y-Zellen zu sehen war, eine morphologische Differenzierung ein. Wie sich wt-TrkA auf die Zellen auswirkt, ist zahlreich gezeigt worden, welchen Einfluss die daueraktive Δ TrkA Variante auf die PC12-Zellen hat, soll hier untersucht werden.

4.2.4.1 Differenzierung von PC12-Zellen

Zunächst einmal wurden PC12-Zellen auf Polyornithin-Laminin beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert und über zwei und neun Tage mit NGF stimuliert. Parallel dazu wurden Zellen zur Kontrolle ohne Stimulation ausgesät.

Bei den NGF behandelten Zellen ist bereits nach zwei Tagen der erste Ansatz von Neuritenbildung zu beobachten und nach neun Tagen ein deutliches Neuritennetzwerk zu erkennen (Abbildung 4.20; rechts). Die Kontrollzellen ohne NGF-Stimulation sind dagegen immer noch abgerundet und ohne jegliche Neuritenansätze (Abbildung 4.20 links).

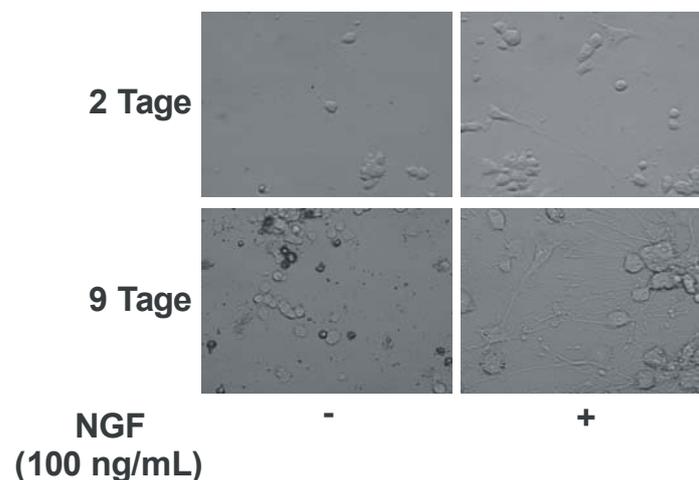


Abbildung 4.20: Stimulation mit NGF führt zur Differenzierung von PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden auf Polyornithin-Laminin beschichtete Zellkulturplatten gesät und entweder mit oder ohne NGF (100 ng/mL) für zwei bzw. neun Tage stimuliert. Die Bilder wurden unter Verwendung des Hoffman'schen Modulationskontrast-Verfahrens bei einer 20x Vergrößerung aufgenommen.

4.2.4.2 Expression von transient transfiziertem Δ TrkA in PC12-Zellen

Aus transient transfizierten PC12-Zellen mit den Konstrukten pcDNA3.1 wt-TrkA, pcDNA3.1 Δ TrkA und dem Leervektor wurden Lysate hergestellt und auch eine Stimulation mit NGF angesetzt, aus denen ebenfalls Zellextrakte hergestellt wurden. In Abbildung 4.21 wurde überprüft, ob die transfizierten Konstrukte in den PC12-Zellen zur Expression gebracht werden konnten. Dieses wurde nachgewiesen durch die Verwendung eines TrkA spezifischen Antikörpers mit dem die Expression von TrkA sichtbar gemacht wurde. Außerdem wurde mit dem Protein GAPDH gezeigt, dass die Ansätze vergleichbar aufgetragen wurden.

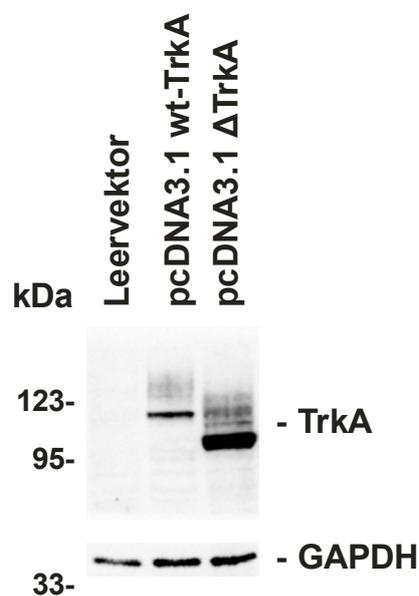


Abbildung 4.21: Transient transfizierte PC12-Zellen exprimieren Δ TrkA.

Aus PC12-Zellen wurden, nach der transienten Transfektion mit den Konstrukten pcDNA3.1 wt-TrkA, pcDNA3.1 Δ TrkA und dem Leervektor, Zellextrakt hergestellt, deren TrkA- und GAPDH-Expression mit spezifischen Antikörpern gezeigt wurde.

Bei der Untersuchung von Signalmolekülen der Signalkaskade von TrkA konnte für Δ TrkA in nicht stimulierter Umgebung eine leichte basale Aktivierung von phosphoryliertem Erk1/2 gezeigt werden, die allerdings nach der Behandlung mit NGF mit der Aktivierung von wt-TrkA vergleichbar ist, was vermutlich durch die Erk1/2 Stimulierung des endogenen wt-TrkAs in PC12-Zellen bedingt ist (Abbildung 4.22). Dagegen war keine basale Erhöhung für das phospho-Akt Level von Δ TrkA im Vergleich zu wt-TrkA zu erkennen.

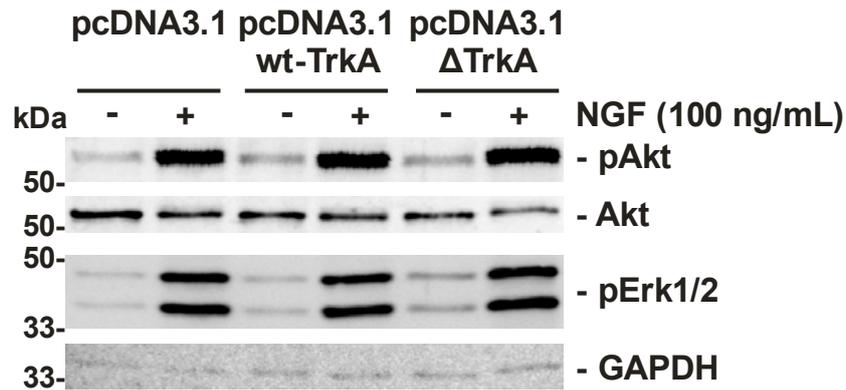


Abbildung 4.22: Basale phospho-Erk1/2 Aktivierung durch Δ TrkA in PC12-Zellen.

Aus PC12-Zellen wurden, nach der transienten Transfektion mit den Konstrukten pcDNA3.1 wt-TrkA, pcDNA3.1 Δ TrkA und dem Leervektor und einer Stimulation mit NGF (100 ng/mL), Zellextrakte hergestellt, die mit spezifischen Antikörpern gegen Akt und phospho-Akt, phospho-Erk1/2 und GAPDH im Immunoblot untersucht wurden.

4.2.4.3 Δ TrkA exprimierende PC12-Zellen bilden Neuriten

PC12-Zellen wurden ausgesät und mit den pcDNA3.1 Konstrukten wt-TrkA und Δ TrkA und einem GFP-Konstrukt transfiziert und für drei Tage sowohl mit als auch ohne NGF-Stimulation kultiviert. In der Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf die Neuritenbildung untersucht. Um transfizierte Zellen zu identifizieren, wurde ein spezifischer Antikörper gegen TrkA verwendet, der mit einem FITC-gekoppelten Antikörper markiert wurde.

Dabei war zu beobachten, dass ohne NGF-Behandlung Δ TrkA mehr Zellen mit Neuritenbildung aufzuweisen hatte als wt-TrkA. Mit der Zugabe von NGF gleich sich die Ausbildung von Neuriten für diese Zellen mit der für wt-TrkA an (Abbildung 4.23).

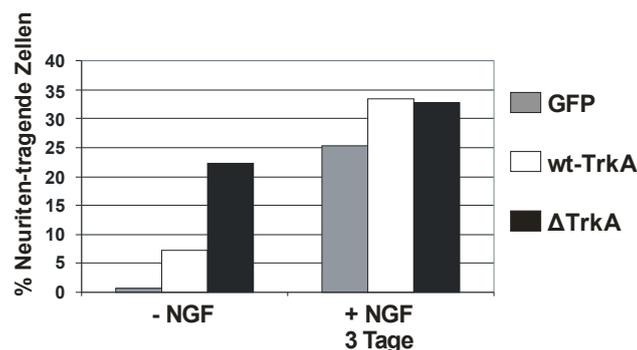


Abbildung 4.23: Neuritenbildung bei Δ TrkA in PC12-Zellen ohne NGF-Stimulation.

PC12-Zellen wurden mit den pcDNA3.1 Konstrukten wt-TrkA und Δ TrkA und einem GFP Konstrukt transfiziert und für drei Tage mit und ohne NGF-Stimulation (100 ng/mL) kultiviert. Dargestellt ist wie viel Prozent der Zellen mit und ohne NGF Stimulation nach drei Tagen Neuriten ausgebildet haben.

Da Δ TrkA ohne Liganden Differenzierung auslöst, lässt sich mutmaßen, dass auch in den Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y Δ TrkA zur Differenzierung geführt haben könnte.

4.3 Transkriptomanalyse von TrkA in verschiedenen Zelllinien

Wie im vorigen Kapitel 4.2 gezeigt wurde, unterscheiden sich TrkA und seine daueraktive Mutante Δ TrkA darin, dass die Mutante auch ohne Stimulation durch den Liganden NGF zur Differenzierung führt. Ebenfalls konnte damit gezeigt werden, dass beide TrkA-Formen in gleichen Zellsystemen denselben Phänotyp ausbilden.

Da für TrkA bekannt ist, dass es in verschiedenen Zellsystemen zu verschiedenen biologischen Reaktionen führt, wie Proliferation in leukämischen Mastzellen (Dutta *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2008) und Differenzierung in neuronalen Zellen, sollte, mit Hilfe von stabil TrkA-exprimierenden Epithelzellen, untersucht werden, ob es Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Phänotypen in unterschiedlichen Zellsystemen auf Transkriptomebene gibt.

Dafür wurden die stabilen TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen für die Transkriptomanalyse im Mikroarray vorbereitet und mit bereits veröffentlichten Mikroarray Daten für die genannten Zellsysteme verglichen (Dijkmans *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2011).

4.3.1 Epithelzellen im Vergleich zu leukämischen Zellen

Für die Transkriptomanalyse wurden die stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen zunächst für 16 Stunden im serumfreien Medium kultiviert, bevor sie für weitere acht Stunden mit NGF (100 ng/mL) behandelt oder unbehandelt weiter in Kultur gehalten wurden. Anschließend wurden die Zellen entweder zur Überprüfung im Immunoblot zu Lysaten verarbeitet oder zur Isolierung der Gesamt-RNA verwendet, um diese für eine Mikroarray Analyse einzusetzen, wie im Methodenabschnitt 3.2.10 beschrieben.

4.3.1.1 Überprüfung der NGF-Behandlung

Um die NGF-Stimulation zu überprüfen, wurden die Lysate im Immunoblot auf die Expression von TrkA und Tyrosinphosphorylierung, aber auch auf Erk1/2 und Akt sowie deren aktivierten Formen mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in den behandelten und in den unbehandelten Zellen TrkA exprimiert wird (Abbildung. 4.25, α -TrkA). Des Weiteren wurde für die acht Stunden NGF-stimulierten Zellen mit einem spezifischen phospho-Tyrosin Antikörper (pY99) Banden detektiert (Abbildung 4.24, pY99), die bei den unbehandelten Zellen nicht sichtbar waren, und aufgrund der NGF-Induktion zu

erkennen sind. Während bei Erk1/2 und Akt für die behandelten und unbehandelten Zellen eine entsprechende Bande detektiert wurde, konnte die Aktivierung von Erk1/2 und Akt nur für die NGF-behandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.24, unteren vier Panels), was einen weiteren Hinweis darauf gab, dass die NGF-Stimulation erfolgreich verlaufen war.

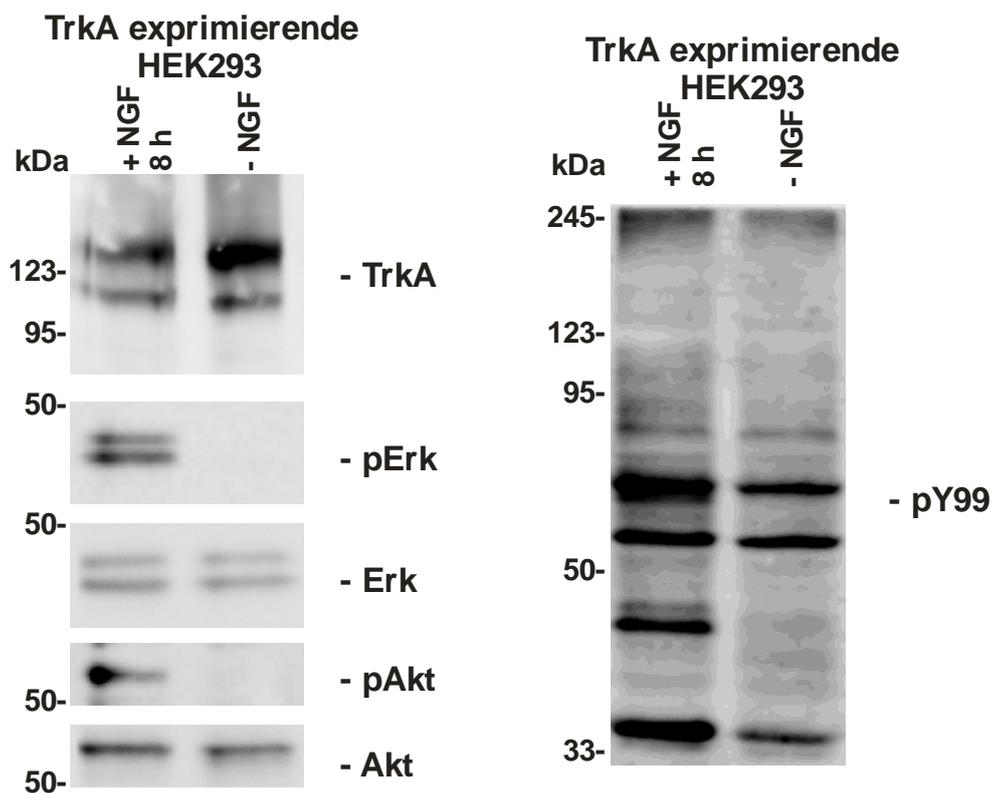


Abbildung 4.24: Überprüfung der NGF-Stimulation in stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen.

Aus stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen wurden Zellextrakte hergestellt, nachdem sie für 16 Stunden im serumfreien Medium kultiviert wurden und anschließend für 8 Stunden mit NGF stimuliert wurden. Die Lysate wurden im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen TrkA, phospho-Erk1/2, Erk1/2, phospho-Akt, Akt und phospho-Tyrosin (pY99) auf die entsprechende

4.3.1.2 Mikroarray Analyse für stimulierte TrkA exprimierende Epithelzellen

Nachdem die NGF-Stimulation im Immunoblot auf ihre Funktionalität überprüft wurden, konnte die RNA nach ihrer Isolierung in der Mikroarray Abteilung des SFB566 (O. Dittrich-Breiholz, MHH) für die Durchführung des Mikroarrays weiterbearbeitet werden (siehe 3.2.10).

Für die Auswertung der Mikroarray Daten wurden die Filterkriterien mit den Parametern für das arithmetische Mittel der Signale auf ≥ 50 , für den Wert der Probe auf $\geq 2,0$ und für das Verhältnis von Probe zur Kontrolle auf $\geq 2,0$ eingestellt.

Dabei konnte für 673 Transkripte nach acht Stunden NGF-Stimulation eine Hochregulierung festgestellt werden, die zur weiteren Analyse in das internetbasierende IPA Analyseprogramm eingespeist wurden. Von den 673 Genen wurde das Gen IFRG15 als TOR1AIP2-Duplikat eingeordnet, so dass schließlich 672 hochregulierte Gene gelistet wurden (Anhang Tabelle 3).

4.3.1.3 Vergleich mit stimulierten Leukämiezellen

Das Expressionsprofil für TrkA induzierte Gene nach vier Stunden Imatinib-Behandlung mit anschließender zweistündigen NGF-Stimulation wurde für die Leukämiezelllinie HMC-1 bei Dutta et al. beschrieben (Dutta *et al.*, 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass 121 Gene hochreguliert wurden. Um diese Gene mit den Epithelzellen vergleichen zu können, wurde der Datensatz bei IPA eingespeist.

Der direkte Vergleich der Expressionsprofile von Epithelzellen und Leukämiezellen zeigte, dass für beide Systeme 45 gemeinsame hochregulierte Gene identifiziert werden konnten (Abbildung 4.25).

Dabei liegt der Anteil der gemeinsam hochregulierten Gene für die HMC-1 bei 37,2 %, während es bei den Epithelzellen 7,2 % sind.

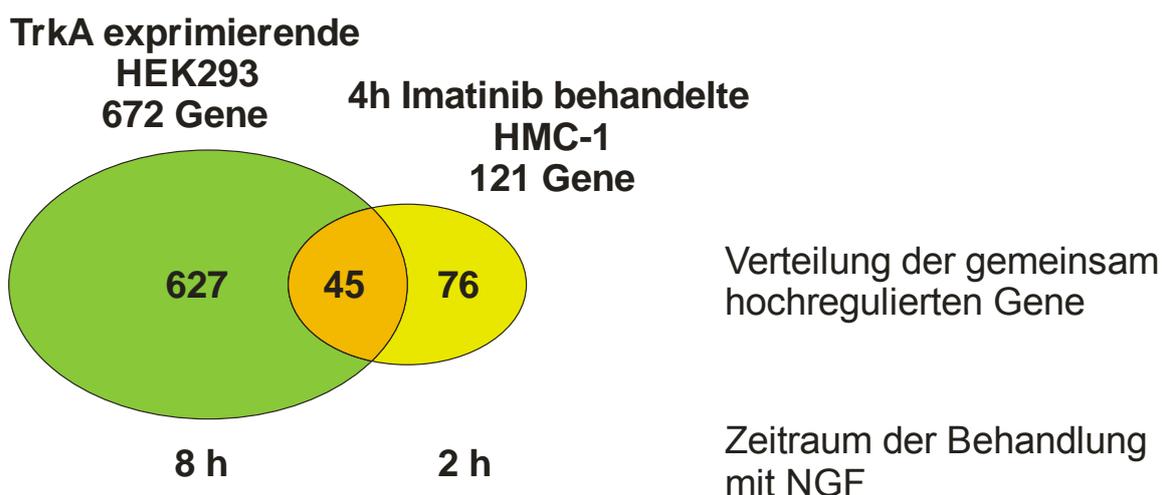


Abbildung 4.25: Venn-Diagramm von hochregulierten Genen von stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen und den Mastzellen HMC-1 nach NGF-Behandlung.

Dargestellt ist die Anzahl der hochregulierten Gene für Mikroarrays von stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen nach Behandlung mit NGF für acht Stunden (8 h) und HMC-1 Zellen nach vier Stunden Imatinib-Behandlung und zweistündiger (2 h) NGF-Behandlung (nach Dutta *et al.*, 2011). Beim Vergleich wurden 45 Gene identifiziert, die in beiden Arrays hochreguliert sind.

Die beiden Datensätze wurden anschließend bei IPA auf ihre Funktionen analysiert. Von den 672 hochregulierten Genen der Epithelzellen gingen dabei 565 Gene in die Funktionsanalyse ein und von den 121 hochregulierten Genen der HMC-1 113 Gene. Dabei wurde überraschenderweise für beide Zellsysteme in der Kategorie „Physiologisches Entwicklungssystem und Funktion“ als Spitzenfunktion die „Gewebeentwicklung“ ausgegeben, wobei für die Epithelzellen die Unterfunktion „Entwicklung/Gewebeentwicklung“ bei einer Signifikanz von $1,62E-17$ und die Unterfunktion „Entstehung/Entstehung von Gewebe“ für die HMC-1 Zellen bei einer Signifikanz von $4,50E-12$ am höchsten eingestuft wurden und etwa 56 % aller gemeinsam hochregulierten Gene enthält. In dieser Kategorie wurde für die HMC-1 auch noch die Funktion „hämatologisches Entwicklungssystem und Funktion“ ($p=9,16E-11$ bis $7,88E-04$), sowie die Funktion „Hämatopoese“ ($p=9,16E-11$ bis $7,88E-04$) aufgeführt, die für die Epithelzellen nicht ausgewiesen wurde, stattdessen wurde die Funktion „embryonale Entwicklung“ ($p=9,46E-13$ bis $3,70E-04$) aufgelistet.

4.3.2 Gegenüberstellung von drei unterschiedlichen TrkA Zellsystemen

4.3.2.1 Identifizierung von gemeinsam hochregulierten Genen

Als nächstes wurden die beiden Mikroarray Datensätze von den leukämischen Mastzellen HMC-1 und den Epithelzellen mit dem Expressionsprofil von PC12-Zellen verglichen. Wie bei Dijkmans *et al.* (Dijkmans *et al.*, 2009) beschrieben wurde, konnte nach einer zweistündigen NGF-Behandlung von PC12-Zellen eine Hochregulierung von 251 Genen gezeigt werden. Diese Gene wurden bei IPA eingespeist, wo 166 der hochregulierten Gene identifiziert werden konnten.

Wie in Abbildung 4.26 dargestellt, wurde der Datensatz der hochregulierten Gene von PC12-Zellen mit den Datensätzen von HMC-1 und Epithelzellen verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass zwischen den Epithelzellen und PC12-Zellen 30 und zwischen PC12- und HMC-1-Zellen 23 gemeinsame Gene vorliegen. Weiterhin wurde gezeigt, dass in allen drei Mikroarray Datensätzen 19 gemeinsam hochregulierte Gene vorzufinden waren, die in Tabelle 4.2 aufgelistet sind.

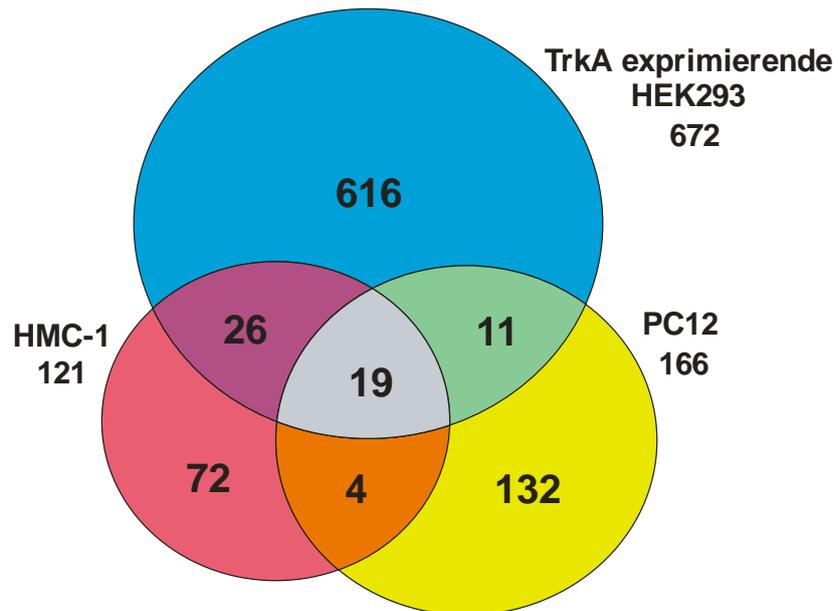


Abbildung 4.26: Venn-Diagramm von hochregulierten Genen von stabil TrkA-exprimierenden HEK293-, HMC-1- und PC12-Zellen.

Dargestellt ist die Anzahl der hochregulierten Gene aus Mikroarrays von stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen nach NGF-Behandlung für acht Stunden und HMC-1 Zellen nach vier Stunden Imatinib-Behandlung und anschließend zweistündiger NGF-Behandlung (nach Dutta *et al.*, 2011) sowie PC12-Zellen nach zwei Stunden NGF-Stimulation (nach Dijkmans *et al.*, 2009). Im Vergleich konnten 19 gemeinsame Gene identifiziert werden, die in den drei Arrays hochreguliert wurden. Außerdem wird gezeigt, dass zwischen den HEK293- und HMC-1- bzw. PC12-Zellen 45 bzw. 30 Gene überlappen und zwischen HMC-1 und PC12-Zellen 23 Gene.

Tabelle 4.2: Gemeinsam hochregulierte Gene von PC12-, HMC-1- und stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen nach NGF-Induktion (nach IPA)

Symbol	Beschreibung
Enzyme	
RRAD	Ras-related associated with diabetes
Kinasen	
TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)
Liganden-abhängige Zellkernrezeptoren	
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
Phosphatasen	
DUSP5	dual specificity phosphatase 5
DUSP6	dual specificity phosphatase 6
Transkriptionsregulatoren	
ATF3	activating transcription factor 3
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1
EGR1	early growth response 1
EGR2	early growth response 2
EGR4	early growth response 4
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOSL1	FOS-like antigen 1
JUNB	jun B proto-oncogene
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)
NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)
ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
Transporter	
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
Andere	
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A

5 Diskussion

5.1 Nachweis von funktionsfähiger c-Fms-ICD im Zellkern von BeWo-Zellen

Bei der Untersuchung der sechs humanen Krebszelllinien A-431, A-549, BeWo, HeLa, MDA-MB-231 und HEK293 wurde das Transkript von c-Fms in allen Zelllinien detektiert. Ebenso war es möglich das Transkript für den Liganden CSF-1 nachzuweisen, außer für die BeWo-Zellen, was auch bereits bekannt war (Horiguchi *et al.*, 1988).

Das endogene c-Fms Protein wurde dagegen nur in BeWo-Zellen eindeutig nachgewiesen. Im Immunoblot wurden zunächst sechs Banden im Zellextrakt von BeWo-Zellen detektiert. Zur Überprüfung der sechs Banden auf die c-Fms Spezifität wurde mit siRNA gegen c-Fms gezeigt, dass alle sechs Banden spezifisch für c-Fms sind. Die beiden oberen Banden stellen die bekannten Glykoproteine gp150 und gp130 c-Fms dar (Tamura *et al.*, 1989), während die anderen vier Banden mögliche Degradationsprodukte sein könnten.

Da für RTKs bekannt ist, dass die proteolytische Spaltung eine Rolle bei der Entstehung von löslichen, intrazellulären Domänen (ICDs) spielt (Ancot *et al.*, 2009), kam es zu der Vermutung, dass endogen exprimiertes c-Fms in BeWo-Zellen der proteolytischen Spaltung unterliegen könne.

Tatsächlich wurde unter Verwendung des γ -Sekretase Inhibitors Compound E beobachtet, dass sich die 55 kDa c-Fms Bande innerhalb von zwei Stunden anhäufte. Damit wurde gezeigt, dass die 55 kDa Bande von c-Fms ein Substrat des γ -Sekretase Komplexes ist und die 50 kDa Bande das mögliche Produkt der proteolytischen Spaltung von c-Fms ist, welches in BeWo-Zellen die c-Fms-ICD repräsentiert.

Für p388D1-Makrophagen wurde ebenfalls eine lösliche ICD von c-Fms nach Behandlung mit PMA oder LPS beschrieben, die teilweise in den Zellkern transloziert und im Proteasom degradiert wird (Wilhelmsen & van der Geer, 2004). Zudem wurde gezeigt, dass in hTERT immortalisierten Epithelzellen c-Fms und seine ICD im Zellkern detektierbar sind (Li *et al.*, 2009a).

Demgegenüber ist es hier erstmals möglich gewesen in der Krebszelllinie BeWo eine endogene c-Fms-ICD ohne Behandlung mit Reagenzien und ohne Stimulation nachzuweisen. Für die 50 kDa Bande von c-Fms in BeWo-Zellen wurde die Lokalisation im Zellkern durch Zellfraktionierung verdeutlicht. In der Immunfluoreszenz wurde für die BeWo-Zellen hauptsächlich eine perinukleäre Lokalisation gezeigt, jedoch auch eine schwache im Zellkern. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem mit Hilfe des GFP-c-Fms-ICD Fusionsproteins das Motiv RRK bei Aminosäure 676-678 als Kernlokalisierungssignal identifiziert werden.

Wie oben erwähnt, wurde für Makrophagen ebenfalls eine c-Fms-ICD beschrieben, die teilweise in den Zellkern translozieren kann, wie es auch für die c-Fms-ICD aus der Krebszelllinie BeWo zutrifft. Während die c-Fms-ICD bei Makrophagen im Proteasom degradiert wird, konnte für die BeWo-Zellen gezeigt werden, dass die ICD stabil im Zellkern vorliegt.

Eventuell könnte es daran liegen, dass Metalloproteinasen in Krebszellen häufig vermehrt exprimiert werden (Kessenbrock *et al.*, 2010). Dadurch, dass in normalen, unstimulierten Zellen die Aktivität der Metalloproteinasen nicht so stark wie in Krebszellen ist, wird weniger c-Fms-ICD gebildet, kann aber auch schneller vom Proteasom erkannt und degradiert werden. Bei Krebszellen könnte erhöhte Metalloproteinase-Aktivität zur erhöhten c-Fms-ICD Bildung führen, wodurch ein Überschuss an c-Fms-ICD im Zytoplasma entstehen könnte und auch den Transport in den Zellkern beeinflussen könnte.

In BeWo-Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die endogene c-Fms-ICD nicht nur ohne Liganden-Stimulation im Zellkern vorliegt, sondern auch aktiv ist, was im Immunoblot mit einem phospho-Tyrosin Antikörper nachgewiesen worden ist. Mit dem Fusionsprotein GFP-c-Fms-ICD konnte zudem beobachtet werden, dass die Überexpression der funktionsfähigen c-Fms-ICD zur Phosphorylierung von Erk1/2, STAT3 und STAT5 führt. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch mit der endogenen c-Fms-ICD aus den BeWo-Zellen die Vermittlung von Signalen möglich sein könnte.

Die Aktivierung der c-Fms-ICD kann im Zusammenhang mit einer Konformationsänderung in der Juxtamembran-Domäne stehen. Für die Juxtamembran-Domäne konnte für Typ III RTKs, wie c-Fms, eine inhibitorische Funktion durch eine WW-ähnliche Domäne gezeigt werden (Irusta *et al.*, 2002), die

möglicherweise durch die proteolytische Spaltung aufgehoben wird und folglich die Aktivierung der c-Fms-ICD in BeWo-Zellen induziert.

Die proteolytische Spaltung spielt normalerweise eine Rolle beim Abbau von RTKs. Während bei RTKs durch Liganden konventionelle Signalwege aktiviert werden, kann mit Beginn des RTKs-Abbaus keine Liganden-vermittelte Signalweiterleitung mehr erfolgen. Der Abbau der RTKs wird meist durch Metalloproteinasen, wie ADAM17 oder ADAM10, eingeleitet, die die extrazelluläre Domäne der RTKs abspalten können, und dadurch die Liganden-vermittelte Signalweiterleitung unterbinden. Durch den γ -Sekretase-Komplex erfolgt die Spaltung der intrazellulären Domäne, die schließlich im Proteasom degradiert werden kann (Kopan & Ilagan, 2004). Für andere Rezeptoren als RTKs, wie den Notch-Rezeptor und den Toll-like Rezeptor 9, ist die proteolytische Spaltung zwingend notwendig, damit sie ihre Aktivität erlangen (Kopan & Ilagan, 2009; Park *et al.*, 2008). Bislang ist die biologische Funktion von löslichen ICDs der RTKs, die auch im Zellkern vorzufinden sind, nicht vollkommen geklärt. Ein hypothetischer Signalweg für die c-Fms-ICD ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

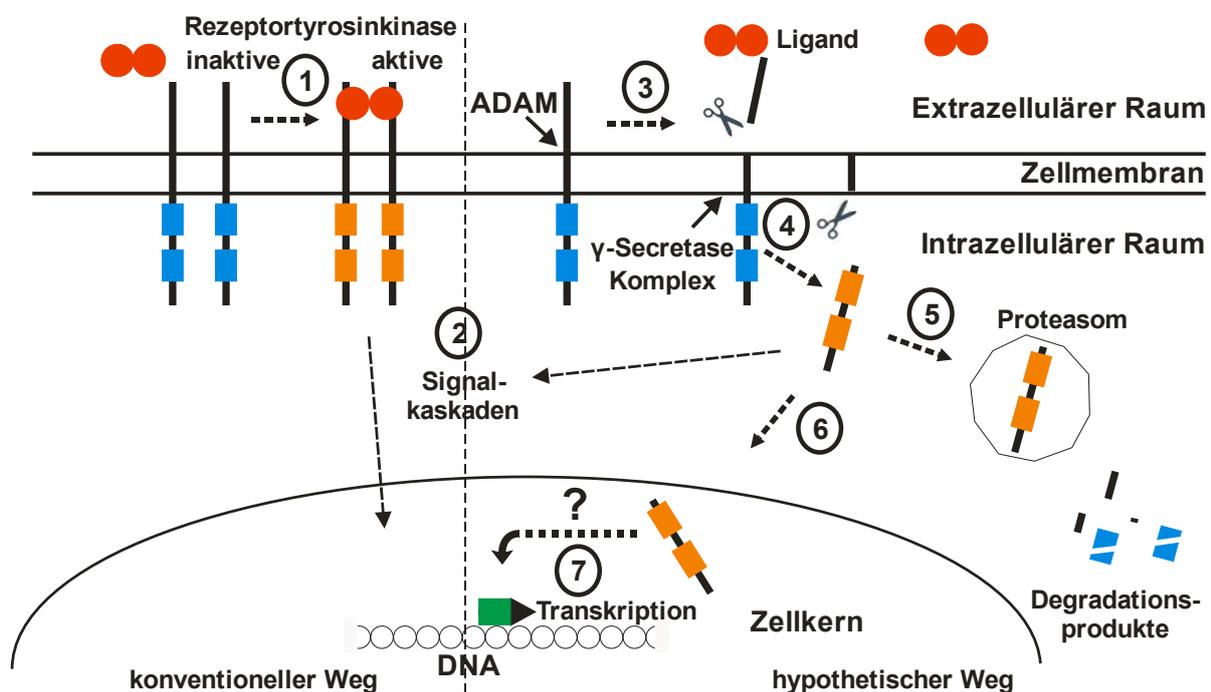


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des konventionellen c-Fms-Weges und eines hypothetischen c-Fms-ICD Weges in Krebszelllinien und Makrophagen.

Durch Bindung des Liganden erfolgt eine Aktivierung von c-Fms (1). Die Aktivierung von c-Fms löst verschiedene Signalkaskaden aus, die in den Zellkern weitergeleitet werden. Die Signalkaskaden werden auch von der c-Fms-ICD reguliert (2). Vertreter aus der Familie der ADAM-Metalloproteasen spalten möglicherweise die extrazelluläre Domäne von c-Fms ab (3). Durch den γ -Sekretase-Komplex erfolgt die Spaltung der ICD (4). Über das Proteasom erfolgt der Abbau der ICD (5). Über das Kernlokalisierungssignal gelangt die ICD in den Zellkern (6). Die ICD könnte im Zellkern als Aktivator der Transkription fungieren (7).

Die ICD von ErbB4 wird als eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase beschrieben, die im Zellkern vorzufinden ist (Linggi *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2001). Daneben wurde auch eine Beteiligung von der ErbB4-ICD bei der Transformation der Mäuse-Brustdrüsen-Zelllinie c57MG beschrieben, aber auch, dass die ErbB4-ICD als Transaktivator fungieren kann (Lynch *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2005).

Welche Funktion die c-Fms-ICD ausübt und ob sich diese von der normalen Funktion von c-Fms unterscheidet, muss weiter untersucht werden.

5.2 Mögliche Kommunikation zwischen Makrophagen und epithelialen Krebszellen

Neben der Entwicklung von Makrophagen spielen CSF-1 und c-Fms auch eine Rolle in der normalen Physiologie der Brust und bei Brustkrebs (Sapi, 2004). Für CSF-1 ist beschrieben, dass es im normalen Brustepithel in geringem Maße exprimiert wird, während in Brusttumoren ein hohes Niveau dokumentiert wird (Lawicki *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2001; Scholl *et al.*, 1994). CSF-1 kann darüber hinaus auch als ein möglicher Biomarker für postmenopausalen Brustkrebs fungieren (Tamimi *et al.*, 2008).

Im Hinblick auf die generelle Rolle von c-Fms in Krebszellen mit epitheliale Ursprung wurden c-Fms-regulierte Gene in HEK293-Zellen, die exogenes c-Fms überexprimieren, in einer Transkriptomanalyse untersucht und mit Daten einer Transkriptomanalyse von Makrophagen verglichen (Irvine *et al.*, 2009).

Der Vergleich der Transkriptomanalysen von CSF-1 stimulierten Makrophagen und Epithelzellen ergab, dass weniger als 2 % der hochregulierten Gene der Epithelzellen in beiden Zellsystemen gemeinsam vorkommen. Erstaunlicherweise zeigten beide Zellsysteme aber trotzdem die gleiche biologische Reaktion, wie mit der IPA-Funktionsanalyse in der Kategorie „Krankheiten und Störungen“ für die Funktion „inflammatorische Reaktion“ gezeigt wird. Dabei werden für die Makrophagen Zytokine und Zytokinrezeptoren hochreguliert, während es bei den Epithelzellen hauptsächlich Zytokine sind.

Makrophagen werden über ausgeschüttete chemotaktische Faktoren von Tumorzellen angezogen und für metastasierende Zellen ist das Eindringen von Makrophagen geschildert (Leek *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2001). Die so genannten tumorassoziierten Makrophagen (TAM) spielen sowohl bei tumorverhindernden Mechanismen, wie etwa der Antigen-Präsentation von progressiven Tumoren (Auger

& Ross, 1992), als auch bei tumorfördernden Aktionen, wie z. B. bei der Metastasierung von Brustkrebszellen, eine Rolle (Leek & Harris, 2002). Die Kommunikation zwischen Brustkrebszellen und Makrophagen erfolgt über parakrine Signale. Bei diesem Modell wird CSF-1 in den Brustkrebszellen gebildet und führt zur Stimulation von Makrophagen, die wiederum EGF produzieren, das bei den Brustkrebszellen zur Zellmigration und Zellinvasion führt (Goswami *et al.*, 2005; Wyckoff *et al.*, 2004). Unabhängig davon sind in Brustkrebszellen auch autokrine Signale beschrieben, in dem CSF-1 und sein Rezeptor c-Fms exprimiert werden und die Zellinvasion fördern (Patsialou *et al.*, 2009).

Ähnlich wie in den ausgewiesenen Interaktionsmöglichkeiten für Tumorzellen und Makrophagen, ist es möglich, dass die hier gezeigten Daten einen Hinweis auf Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen über parakrine Signale geben (Abbildung 5.2). Die Transkriptomanalyse führt zu der Hypothese, dass Krebszellen epithelialen Ursprungs durch endogene CSF-1-Stimulation dazu befähigt werden unterschiedliche Chemokine und Interleukine zu exprimieren. Diese Zytokine könnten dafür verantwortlich sein, dass Makrophagen ihre Aktivierung erlangen bzw. beeinflusst werden. Für das in der Transkriptomanalyse der Epithelzellen hochregulierte Zytokin CCL2 ist beispielsweise beschrieben, dass es mit dem in inflammatorischen Monozyten exprimierten Rezeptor CCR2 interagieren kann und dadurch die Bildung von Brustkrebs-Metastasen erleichtert wird (Qian *et al.*, 2011). Die Makrophagen ihrerseits sind nach CSF-1-Stimulation in der Lage weitere Zytokine und Rezeptoren auszubilden. Diese Liganden könnten bei den Tumorzellen dazu führen, dass sie verstärkt mit Makrophagen in Verbindung treten und damit die Makrophagen eine aktive Rolle in der Tumorentwicklung einnehmen. Neben der Hochregulierung von Zytokinen konnte in Tumorzellen auch eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gezeigt werden. Diese Metalloproteinasen fungieren als ein wichtiges Element bei der Zellinvasion und Metastasierung von Tumorzellen. Damit die Krebszellen aus ihrem ursprünglichen Gewebe herauswandern können, ebenso wie beim Eindringen an einen anderen Ort, ist es erforderlich, dass ein Abbau der extrazellulären Matrix erfolgt, welcher durch eine Vielzahl von MMPs übernommen wird (Gialeli *et al.*, 2011; Page-McCaw *et al.*, 2007).

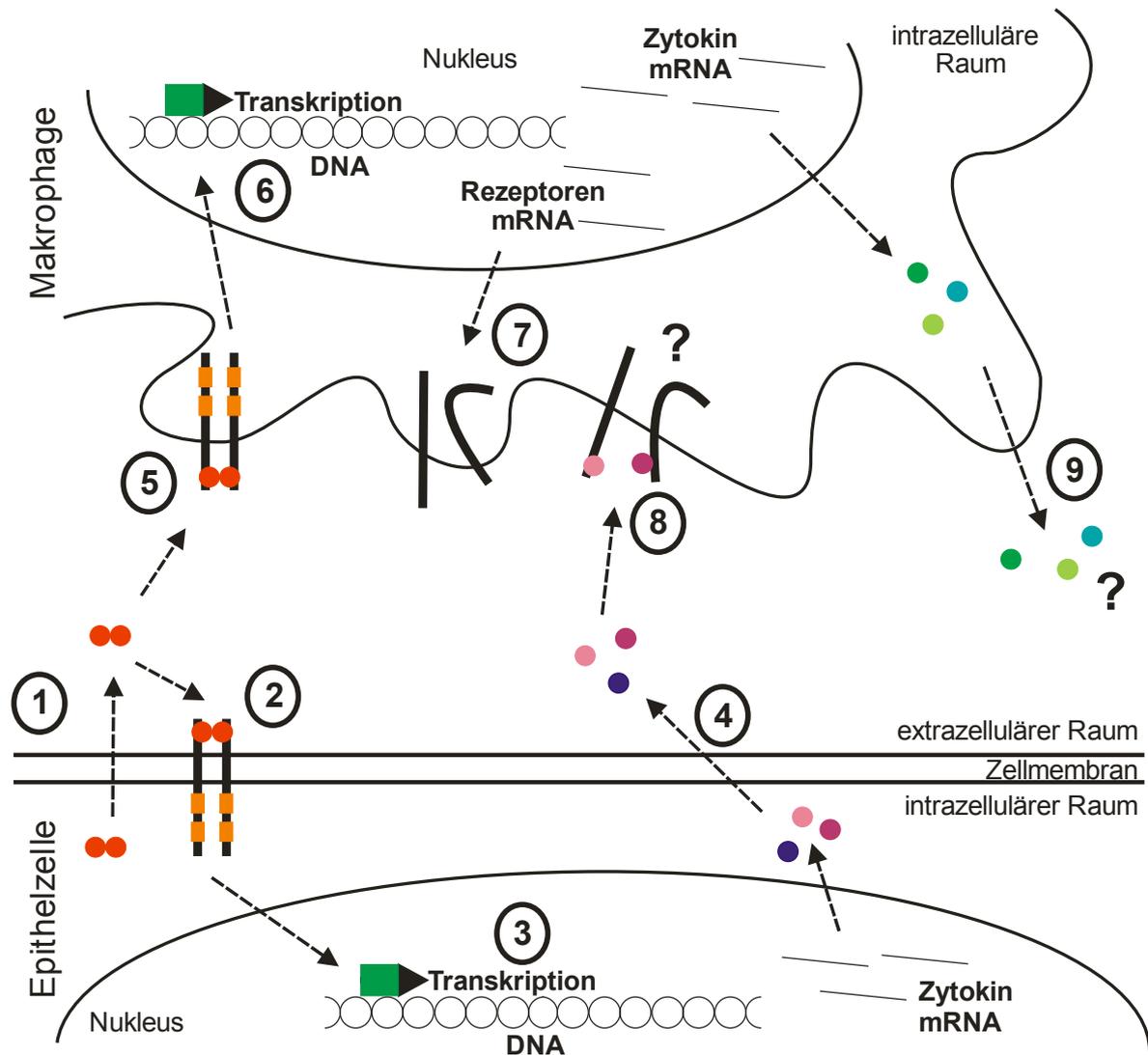


Abbildung 5.2: Hypothetisches Kommunikationsmodell zwischen epithelialen Krebszellen und Makrophagen durch autokrine und parakrine Signalübertragung.

In Epithelzellen exprimiertes CSF-1 wird aus der Zelle heraustransportiert (1). Das ausgeschüttete CSF-1 führt zur autokrinen Aktivierung von c-Fms in den Epithelzellen (2). Durch das autokrine Signal aktivierte Signalkaskaden führen zur Transkription von Zytokin mRNA in den Epithelzellen (3). Die Zytokin-Transkripte werden im intrazellulären Raum translatiert und in den extrazellulären Raum ausgeschüttet (4). In Makrophagen erfolgt die Aktivierung von c-Fms parakrine durch das ausgeschüttete CSF-1 der Epithelzellen (5). Die parakrine Signalübertragung bewirkt die Transkription von Rezeptor und Zytokin mRNA im Zellkern der Makrophagen (6). Die Rezeptor-Transkripte werden an die Zellmembran der Makrophagen transportiert (7). Über die ausgeschütteten Zytokine der Epithelzellen könnte eine weitere Aktivierung der Makrophagen erfolgen (8). Die Zytokin-Transkripte aus (6) werden im intrazellulären Raum der Makrophagen translatiert und in den extrazellulären Raum transportiert. Dort können sie weitere Prozesse regulieren (9).

5.3 Der von Δ TrkA ausgelöste Phänotyp in PC12-Zellen korreliert mit dem von wt-TrkA nach NGF-Stimulation

Über die Autophosphorylierungsstellen von RTKs können unterschiedliche Signalwege in Gang gebracht werden. Die verschiedenen RTKs unterscheiden sich auch in der Anzahl ihrer Autophosphorylierungsstellen außerhalb der Aktivierungsschleife. Während für c-Fms acht Stellen identifiziert wurden, von denen für fünf die Signalweiterleitung bekannt ist, konnten für TrkA fünf nachgewiesen werden, wobei hauptsächlich über die Aminosäuren Y490 und Y785 die Bindung von Signalproteinen erfolgt. Über diese beiden Stellen werden die Signalwege von PI3K, MAPK und PLC- γ_1 aktiviert. Diese drei Signalwege, die auch generelle Wege von RTKs darstellen, werden von TrkA sehr wahrscheinlich in allen Zellen ausgelöst, wodurch die Frage aufkommt, wieso unterschiedliche biologische Reaktionen nachzuweisen sind.

Am Beispiel von TrkA lassen sich in verschiedenen Zellsystemen sehr unterschiedliche biologische Reaktionen beobachten: in neuronalen Zellen wie SH-SY5Y- und PC12-Zellen vermittelt TrkA Differenzierung (Drubin *et al.*, 1985; Poluha *et al.*, 1995), in Leukämie- (HMC-1) und HCC-Zellen Proliferation (Jin *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2008). In einer Patientenprobe einer akuten myeloischen Leukämie wurde darüber hinaus eine onkogene Mutante, Δ TrkA gefunden (Reuther *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, wie sich Δ TrkA in verschiedenen Zelltypen verhält. Das onkogene Potential von Δ TrkA wurde in der Epithelzelllinie RIE-1 und in der Fibroblasten-Zelllinie Rat-1 gezeigt (Reuther *et al.*, 2000), konnte hier aber weder in der Epithelzelllinie HEK293 noch der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 bestätigt werden. Dies könnte auf mögliche Unterschiede in den verschiedenen Zellsystemen zurückzuführen sein. Indes führte die Expression in PC12-Zellen zur Liganden-unabhängigen Differenzierung, wie sie auch bei wt-TrkA nach NGF-Stimulation ausgelöst wird. Die zwar geringe aber vorhandene Daueraktivität, die in hämatopoetischen Vorläuferzellen offenbar zur Transformation genügt (Newrzela *et al.*, 2008), führt in neuronalen Zellen zur Differenzierung, was darauf hindeutet, dass TrkA-Signale in diesem Zellsystem spezifisch in diese Richtung interpretiert werden.

5.4 Unterschiedliches Genprofil für NGF-stimuliertes TrkA in verschiedenen Zellsystemen

Neben den bereits publizierten, unterschiedlichen biologischen Reaktionen auf TrkA-Aktivierung in verschiedenen Zellsystemen deuten auch die Δ TrkA Experimente in diese Richtung. Die hier gezeigte Liganden-unabhängige Differenzierung von PC12-Zellen, in Anwesenheit von der ursprünglich aus Leukämiezellen isolierten Mutante Δ TrkA, gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass zelltypspezifische Reaktionen bei RTKs stattfinden.

Um dies auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die in dieser Arbeit von TrkA stabil exprimierenden HEK293-Zellen nach achtstündiger NGF-Behandlung durchgeführte Transkriptomanalyse mit Transkriptomanalyse-Datensätzen von hämatopoetischen HMC-1-Zellen (Dutta *et al.*, 2011), bei denen NGF in Anwesenheit von Imatinib zur Proliferation führt (Koch *et al.*, 2008), und von PC12-Zellen, in denen die Behandlung mit NGF Differenzierung auslöst (Dijkmans *et al.*, 2009), verglichen.

Beim Vergleich von Epithelzellen mit den hämatopoetischen HMC-1-Zellen konnten 45 gemeinsame Gene identifiziert werden, von denen etwa ein Drittel als Transkriptionsregulatoren ausgewiesen wurden. Interessanterweise wurden beide Zellsysteme in der Kategorie „Gewebeentwicklung“ eingeordnet. Da für die beiden Zellsysteme ansonsten eher zelltypspezifische Funktionen, wie „Hämatopoese“ oder „hämatopoetisches Entwicklungssystem und Funktion“ für die HMC-1 bzw. „embryonale Entwicklung“ für die HEK293-Zellen, zugeordnet wurden, lässt sich sagen, dass zwar ein kleines, gemeinsames Genspektrum abgedeckt wird, sie aber auch deutlich ein zelltypspezifisches Genspektrum aufweisen.

Im Vergleich mit den PC12-Zellen konnten für alle drei Datensätze sogar nur 19 gemeinsame Gene identifiziert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass TrkA nach NGF-Stimulation zwar einen gemeinsamen Gensatz in verschiedenen Zellsystemen mit unterschiedlichen Phänotypen hat, es aber auch ein wesentlich größeres Spektrum an Genen gibt, welches die Systeme unterscheidet. Passend zum unterschiedlichen Phänotyp findet also tatsächlich auch eine unterschiedliche Genregulation statt.

Bei TrkA werden in den verschiedenen Zellsystemen die unterschiedlichen Phänotypen durch die gleichen Hauptsignalwege reguliert. Es könnte darüber hinaus die Möglichkeit bestehen, dass es Signalwege gibt, die zelltypspezifisch sind, aber ob es reicht, einen Wechsel zu einem anderen Phänotyp zu bewirken, ist fraglich.

Sicherlich gibt es bei den verschiedenen Zellsystemen epigenetische Regulationsmechanismen, die für die zelltypspezifische Aktivierbarkeit bestimmter Gene verantwortlich sind. Es ist unter anderem für induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) beschrieben, dass der ursprüngliche Zelltyp die molekularen und funktionellen Eigenschaften beeinflusst, was anhand eines unterscheidbaren, epigenetischen Musters in verschiedenen Zelltypen durch eine DNA-Methylierungsanalyse gezeigt wurde (Polo *et al.*, 2010). Ob epigenetische Veränderungen in verschiedenen Zellsystemen tatsächlich für die Expression zelltypspezifischer Gene verantwortlich sind, müsste weiter untersucht werden.

5.5 TrkA und c-Fms zeigen unterschiedliche Reaktion in der Epithelzelllinie HEK293

Für alle RTKs, folglich auch für c-Fms und TrkA, ist beschrieben worden, dass sie auf eine kleine Anzahl von „Kernprozessen“ Einfluss nehmen, zu denen unter anderem die Signalwege von PI3K und MAPK gehören (Lemmon & Schlessinger, 2010).

Es stellte sich die Frage, inwieweit zwei RTKs in einem identischen Zellsystem einen gemeinsamen Satz an Genen hochregulieren. Beim Vergleich der Transkriptomanalysen von c-Fms und TrkA wurden 25 gemeinsame Gene identifiziert, die von beiden Rezeptoren nach Stimulation mit ihren Liganden induziert wurden (Abbildung 5.3). Anhand der geringen Anzahl an gemeinsamen Genen lässt sich sagen, dass die beiden RTKs c-Fms und TrkA in der Epithelzelllinie HEK293 zwar einen Satz an gemeinsamen Genen regulieren, es aber auch ein deutlich größeres Spektrum an Genen gibt, die sich innerhalb dieser beiden RTKs unterscheiden. Es könnte ein Hinweis dafür sein, dass RTKs in einem Zellsystem auch rezeptorspezifische Reaktionen aufweisen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Interpretation der Gesamtheit der Signale ebenso wie ihre zeitliche und örtliche Verteilung in einer unterschiedlichen Genexpression resultieren könnte (Lemmon & Schlessinger, 2010). Ein Indiz dafür könnte die Beobachtung aus der Arbeitsgruppe sein, dass bei der Überexpression von c-Fms in HeLa-Zellen nach PMA-Behandlung ebenfalls die ICD von c-Fms gebildet wurde und zeitgleich eine Reduzierung vom Wildtyp c-Fms Rezeptor

auszumachen war. Dagegen konnte bei HeLa-Zellen mit überexprimiertem TrkA dieses nicht wahrgenommen werden.

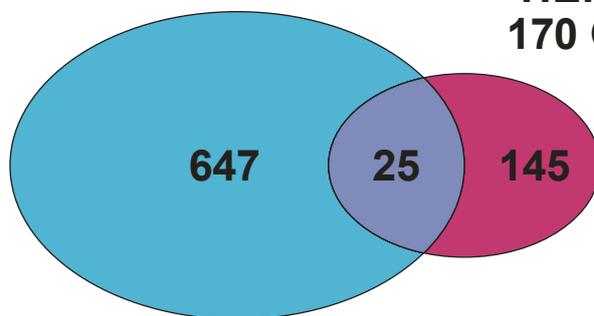
Die ICD ist generell ein Zwischenprodukt des Abbaus von RTKs. Bei c-Fms konnte für die ICD nachweisbar die Aktivierung von intrazellulären Signalen gezeigt werden. Eventuell könnte die Regulierung der Abschaltung von RTKs oder auch der Aufenthaltsort von RTKs und ihren ICDs, eine Rolle dabei spielen, welche Signalkaskaden eine RTK ansteuert.

TrkA-exprimierende

HEK293
672 Gene

c-Fms-exprimierende

HEK293
170 Gene



647

25

145

Verteilung der gemeinsam hochregulierten Gene

8 h

8 h

Zeitraum der Behandlung mit NGF bzw. CSF-1

Abbildung 5.3: Venn-Diagramm von hochregulierten Genen von c-Fms- bzw. stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen nach CSF-1- bzw. NGF-Behandlung für acht Stunden.

Dargestellt ist die Anzahl der hochregulierten Gene für Mikroarrays von stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen nach Behandlung mit NGF für acht Stunden (8 h) und c-Fms-überexprimierten HEK293-Zellen nach acht Stunden (8 h) CSF-1-Behandlung. Die Anzahl der hochregulierten Gene wurde über IPA ermittelt und enthält keine Duplikate. Beim Vergleich wurden 25 Gene identifiziert, die in beiden Arrays hochreguliert sind.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Latif AA. (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev*, **38**, 227-72.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB and Cohen P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, **7**, 261-9.
- Alonso G, Koegl M, Mazurenko N and Courtneidge SA. (1995). Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors. *J Biol Chem*, **270**, 9840-8.
- Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C and Tulasne D. (2009). Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene*, **28**, 2185-95.
- Andl CD, Mizushima T, Oyama K, Bowser M, Nakagawa H and Rustgi AK. (2004). EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**, G1227-37.
- Ashendel CL. (1985). The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **822**, 219-42.
- Auger MJ and Ross JA. (1992). The biology of the macrophage. In Lewis CE and McGee JOD (eds.), *The macrophage*, IRL Press, Oxford, 1-74.
- Bae JH and Schlessinger J. (2010). Asymmetric tyrosine kinase arrangements in activation or autophosphorylation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cells*, **29**, 443-8.
- Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS and Rhee SG. (1998). Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, **273**, 4465-9.
- Barbacid M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, **25**, 1386-403.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G and Hubert P. (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, **50**, 23-38.
- Berridge MJ and Irvine RF. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**, 315-21.
- Bibel M and Barde YA. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, **14**, 2919-37.
- Birnboim HC and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Blaikie P, Immanuel D, Wu J, Li N, Yajnik V and Margolis B. (1994). A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem*, **269**, 32031-4.
- Blume-Jensen P and Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-65.

- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY and Ng DC. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta*, **1804**, 463-75.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH and Falkow S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J and Cobb MH. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, **249**, 64-7.
- Boulton TG, Gregory JS and Cobb MH. (1991). Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry*, **30**, 278-86.
- Bourette RP, Myles GM, Choi JL and Rohrschneider LR. (1997). Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma2 by the M-CSF receptor is necessary for differentiation signaling. *Embo J*, **16**, 5880-93.
- Boyer HW and Roulland-Dussoix D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol*, **41**, 459-72.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA and Israel A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, **5**, 207-16.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB and Goldstein JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, **100**, 391-8.
- Buchner K. (1995). Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J Biochem*, **228**, 211-21.
- Buchner K. (2000). The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**, 1-11.
- Burgering BM, de Vries-Smits AM, Medema RH, van Weeren PC, Tertoolen LG and Bos JL. (1993). Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol*, **13**, 7248-56.
- Cantley LC. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655-7.
- Cao X and Sudhof TC. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-20.
- Cargnello M and Roux PP. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **75**, 50-83.
- Carlberg K and Rohrschneider L. (1994). The effect of activating mutations on dimerization, tyrosine phosphorylation and internalization of the macrophage colony stimulating factor receptor. *Mol Biol Cell*, **5**, 81-95.
- Carpenter G and Ji Q. (1999). Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res*, **253**, 15-24.
- Castellano E and Downward J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*, **2**, 261-74.

- Cecchini MG, Hofstetter W, Halasy J, Wetterwald A and Felix R. (1997). Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Mol Reprod Dev*, **46**, 75-83; discussion 83-4.
- Chen RH, Abate C and Blenis J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10952-6.
- Chou KC and Elrod DW. (1999). Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins*, **34**, 137-53.
- Clemens MJ, Trayner I and Menaya J. (1992). The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci*, **103 (Pt 4)**, 881-7.
- Cohen SN, Chang AC and Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-4.
- Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, Chen B, Haddad el B, Yin J, Nussenzweig A, Subramaniam A and Tessarollo L. (2004). Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development*, **131**, 5185-95.
- Courtney KD, Corcoran RB and Engelman JA. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*, **28**, 1075-83.
- Cruz AC, Frank BT, Edwards ST, Dazin PF, Peschon JJ and Fang KC. (2004). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. *J Biol Chem*, **279**, 5612-20.
- Cuadrado A and Nebreda AR. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, **429**, 403-17.
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR and Greene LA. (1997). Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem*, **272**, 10957-67.
- Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR and Lucocq J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J*, **337 (Pt 3)**, 575-83.
- Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V and Stanley ER. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, **99**, 111-20.
- Darnell JE, Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-5.
- Davis BJ. (1964). Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **121**, 404-27.
- DeClue JE, Sadowski I, Martin GS and Pawson T. (1987). A conserved domain regulates interactions of the v-fps protein-tyrosine kinase with the host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9064-8.
- Degnin CR, Laederich MB and Horton WA. (2011). Ligand activation leads to regulated intramembrane proteolysis of fibroblast growth factor receptor 3. *Mol Biol Cell*, **22**, 3861-73.

- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP and Hondermarck H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, **276**, 17864-70.
- Diaz-Rodriguez E, Cabrera N, Esparis-Ogando A, Montero JC and Pandiella A. (1999). Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*, **11**, 1421-30.
- Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Fitzsimons CP and Vreugdenhil E. (2009). Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res*, **1249**, 19-33.
- DiNitto JP, Deshmukh GD, Zhang Y, Jacques SL, Coli R, Worrall JW, Diehl W, English JM and Wu JC. (2010). Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J Biochem*, **147**, 601-9.
- Domin J and Waterfield MD. (1997). Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett*, **410**, 91-5.
- Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM and Kirschner MW. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*, **101**, 1799-807.
- Dutta P, Koch A, Breyer B, Schneider H, Dittrich-Breiholz O, Kracht M and Tamura T. (2011). Identification of novel target genes of nerve growth factor (NGF) in human mastocytoma cell line (HMC-1 (V560G c-Kit)) by transcriptome analysis. *BMC Genomics*, **12**, 196.
- Ebinu JO and Yankner BA. (2002). A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron*, **34**, 499-502.
- Ekman S, Thuresson ER, Heldin CH and Ronnstrand L. (1999). Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene*, **18**, 2481-8.
- Engelman JA. (2007). The role of phosphoinositide 3-kinase pathway inhibitors in the treatment of lung cancer. *Clin Cancer Res*, **13**, s4637-40.
- Engelman JA, Luo J and Cantley LC. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, **7**, 606-19.
- English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S and Cobb MH. (1995). Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem*, **270**, 28897-902.
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA and Schlessinger J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J*, **17**, 414-22.
- Filderman AE, Bruckner A, Kacinski BM, Deng N and Remold HG. (1992). Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer Res*, **52**, 3661-6.
- Flick MB, Sapi E and Kacinski BM. (2002). Hormonal regulation of the c-fms proto-oncogene in breast cancer cells is mediated by a composite glucocorticoid response element. *J Cell Biochem*, **85**, 10-23.

- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS and Curtis D. (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, **3**, 85-97.
- Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, **67**, 481-507.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW and Ward CW. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, **110**, 763-73.
- George DJ, Suzuki H, Bova GS and Isaacs JT. (1998). Mutational analysis of the *TrkA* gene in prostate cancer. *Prostate*, **36**, 172-80.
- Gialeli C, Theocharis AD and Karamanos NK. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Febs J*, **278**, 16-27.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE and Condeelis JS. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res*, **65**, 5278-83.
- Greco A, Mariani C, Miranda C, Pagliardini S and Pierotti MA. (1993). Characterization of the *NTRK1* genomic region involved in chromosomal rearrangements generating *TRK* oncogenes. *Genomics*, **18**, 397-400.
- Greene LA and Tischler AS. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2424-8.
- Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD and O'Neill TJ. (1995). Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol*, **15**, 2500-8.
- Gutkind JS. (1998). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, **17**, 1331-42.
- Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-11.
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena Illert A, von Figura K and Saftig P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, **11**, 2615-24.
- Heisterkamp N, Groffen J and Stephenson JR. (1983). Isolation of *v-fms* and its human cellular homolog. *Virology*, **126**, 248-58.
- Heldin CH. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-23.
- Helling RB, Goodman HM and Boyer HW. (1974). Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, **14**, 1235-44.

- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A and Karin M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7**, 2135-48.
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF and et al. (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*, **70**, 419-29.
- Horiguchi J, Sherman ML, Sampson-Johannes A, Weber BL and Kufe DW. (1988). CSF-1 and C-FMS gene expression in human carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **157**, 395-401.
- Huang EJ and Reichardt LF. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **72**, 609-42.
- Huang H, Li L, Wu C, Schibli D, Colwill K, Ma S, Li C, Roy P, Ho K, Songyang Z, Pawson T, Gao Y and Li SS. (2008). Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 768-84.
- Hubbard SR. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 464-71.
- Hubbard SR, Mohammadi M and Schlessinger J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **273**, 11987-90.
- Hubbard SR and Till JH. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, **69**, 373-98.
- Hume DA, Yue X, Ross IL, Favot P, Lichanska A and Ostrowski MC. (1997). Regulation of CSF-1 receptor expression. *Mol Reprod Dev*, **46**, 46-52; discussion 52-3.
- Ide H, Seligson DB, Memarzadeh S, Xin L, Horvath S, Dubey P, Flick MB, Kacinski BM, Palotie A and Witte ON. (2002). Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14404-9.
- Irusta PM, Luo Y, Bakht O, Lai CC, Smith SO and DiMaio D. (2002). Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Biol Chem*, **277**, 38627-34.
- Irvine KM, Andrews MR, Fernandez-Rojo MA, Schroder K, Burns CJ, Su S, Wilks AF, Parton RG, Hume DA and Sweet MJ. (2009). Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J Leukoc Biol*, **85**, 278-88.
- Jainchill JL, Aaronson SA and Todaro GJ. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**, 549-53.
- Johnson PH and Grossman LI. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry*, **16**, 4217-25.
- Joos H, Trouliaris S, Helftenbein G, Niemann H and Tamura T. (1996). Tyrosine phosphorylation of the juxtamembrane domain of the v-Fms oncogene product is required for its association with a 55-kDa protein. *J Biol Chem*, **271**, 24476-81.
- Jin W, Lee JJ, Kim MS, Son BH, Cho YK and Kim HP. (2011). DNA methylation-dependent regulation of TrkA, TrkB, and TrkC genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **406**, 89-95.

- Kacinski BM, Carter D, Mittal K, Kohorn EI, Bloodgood RS, Donahue J, Donofrio L, Edwards R, Schwartz PE, Chambers JT and et al. (1988). High level expression of *fms* proto-oncogene mRNA is observed in clinically aggressive human endometrial adenocarcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **15**, 823-9.
- Kacinski BM. (1997). CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract. *Mol Reprod Dev*, **46**, 71-4.
- Kaebisch A, Brokt S, Seay U, Lohmeyer J, Jaeger U and Pralle H. (1996). Expression of the nerve growth factor receptor c-TRK in human myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol*, **95**, 102-9.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV and Parada LF. (1991). The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, **252**, 554-8.
- Kaplan DR and Miller FD. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 213-21.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J and Waterfield MD. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 615-75.
- Kavanaugh WM and Williams LT. (1994). An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science*, **266**, 1862-5.
- Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, **141**, 52-67.
- Kirma N, Hammes LS, Liu YG, Nair HB, Valente PT, Kumar S, Flowers LC and Tekmal RR. (2007). Elevated expression of the oncogene *c-fms* and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing *c-fms* expression. *Cancer Res*, **67**, 1918-26.
- Koch A, Scherr M, Breyer B, Mancini A, Kardinal C, Battmer K, Eder M and Tamura T. (2008). Inhibition of Abl tyrosine kinase enhances nerve growth factor-mediated signaling in Bcr-Abl transformed cells via the alteration of signaling complex and the receptor turnover. *Oncogene*, **27**, 4678-89.
- Kopan R and Ilagan MX. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 499-504.
- Kopan R and Ilagan MX. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, **137**, 216-33.
- Krebs EG and Beavo JA. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem*, **48**, 923-59.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-9.
- Kyriakis JM and Avruch J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*, **265**, 17355-63.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.

- Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, Toillon RA, Oxombre B, Hondermarck H and Le Bourhis X. (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*, **28**, 1960-70.
- Lavenius E, Gestblom C, Johansson I, Nanberg E and Pahlman S. (1995). Transfection of TRK-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth Differ*, **6**, 727-36.
- Lawicki S, Szmitekowski M and Wojtukiewicz M. (2006). The pretreatment plasma level and diagnostic utility of M-CSF in benign breast tumor and breast cancer patients. *Clin Chim Acta*, **371**, 112-6.
- Leaman DW, Pisharody S, Flickinger TW, Commane MA, Schlessinger J, Kerr IM, Levy DE and Stark GR. (1996). Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 369-75.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-46.
- Lee JD, Ulevitch RJ and Han J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 715-24.
- Leek RD, Lewis CE and Harris AL. (1997). The role of macrophages in tumor angiogenesis. In Bicknell R, Lewis CE and Ferrara N (eds.), *Tumour Angiogenesis*, Oxford University Press Oxford, 81-89.
- Leek RD and Harris AL. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **7**, 177-89.
- Lemmon MA and Schlessinger J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **141**, 1117-34.
- Levy DE and Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 651-62.
- Li NF, Kocher HM, Salako MA, Obermueller E, Sandle J and Balkwill F. (2009a). A novel function of colony-stimulating factor 1 receptor in hTERT immortalization of human epithelial cells. *Oncogene*, **28**, 773-80.
- Li W and Stanley ER. (1991). Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *Embo J*, **10**, 277-88.
- Li Z, Beutel G, Rhein M, Meyer J, Koenecke C, Neumann T, Yang M, Krauter J, von Neuhoff N, Heuser M, Diedrich H, Gohring G, Wilkens L, Schlegelberger B, Ganser A and Baum C. (2009b). High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood*, **113**, 2028-37.
- Liao HJ, Kume T, McKay C, Xu MJ, Ihle JN and Carpenter G. (2002). Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem*, **277**, 9335-41.
- Lichtenthaler SF, Haass C and Steiner H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*, **117**, 779-96.

- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG and Pollard JW. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*, **193**, 727-40.
- Linggi B, Cheng QC, Rao AR and Carpenter G. (2006). The ErbB-4 s80 intracellular domain is a constitutively active tyrosine kinase. *Oncogene*, **25**, 160-3.
- Liu BA, Jablonowski K, Raina M, Arce M, Pawson T and Nash PD. (2006). The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol Cell*, **22**, 851-68.
- Liu BA, Jablonowski K, Raina M, Arce M, Pawson T and Nash PD. (2006). The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol Cell*, **22**, 851-68.
- Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G and Xu H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*, **278**, 7850-4.
- Lynch CC, Vargo-Gogola T, Martin MD, Fingleton B, Crawford HC and Matrisian LM. (2007). Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res*, **67**, 6760-7.
- Lyu J, Yamamoto V and Lu W. (2008). Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell*, **15**, 773-80.
- Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS and Wilson DB. (1986). The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*, **234**, 1519-26.
- Mancini A, Niedenthal R, Joos H, Koch A, Trouliaris S, Niemann H and Tamura T. (1997). Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. *Oncogene*, **15**, 1565-72.
- Mancini A, Koch A, Wilms R and Tamura T. (2002). c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. *J Biol Chem*, **277**, 14635-40.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. (1982). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Manning BD and Cantley LC. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **129**, 1261-74.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-34.
- Marais R, Wynne J and Treisman R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, **73**, 381-93.
- Martin-Zanca D, Hughes SH and Barbacid M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*, **319**, 743-8.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T and Barbacid M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol*, **9**, 24-33.
- Mayo LD and Donner DB. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11598-603.

- McBride KM, Banninger G, McDonald C and Reich NC. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *Embo J*, **21**, 1754-63.
- McDonough SK, Larsen S, Brodey RS, Stock ND and Hardy WD, Jr. (1971). A transmissible feline fibrosarcoma of viral origin. *Cancer Res*, **31**, 953-6.
- Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ and Verdi JM. (1999). The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem*, **274**, 9861-70.
- Meng S, Chen Z, Munoz-Antonia T and Wu J. (2005). Participation of both Gab1 and Gab2 in the activation of the ERK/MAPK pathway by epidermal growth factor. *Biochem J*, **391**, 143-51.
- Meyer J, Rhein M, Schiedlmeier B, Kustikova O, Rudolph C, Kamino K, Neumann T, Yang M, Wahlers A, Fehse B, Reuther GW, Schlegelberger B, Ganser A, Baum C and Li Z. (2007). Remarkable leukemogenic potency and quality of a constitutively active neurotrophin receptor, deltaTrkA. *Leukemia*, **21**, 2171-80.
- Mitra G, Martin-Zanca D and Barbacid M. (1987). Identification and biochemical characterization of p70TRK, product of the human TRK oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6707-11.
- Morton S, Davis RJ, McLaren A and Cohen P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *Embo J*, **22**, 3876-86.
- Newrzela S, Cornils K, Li Z, Baum C, Brugman MH, Hartmann M, Meyer J, Hartmann S, Hansmann ML, Fehse B and von Laer D. (2008). Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood*, **112**, 2278-86.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE and Carpenter G. (2001). gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science*, **294**, 2179-81.
- Nicholson KM and Anderson NG. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, **14**, 381-95.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M and Yokoyama S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, **110**, 775-87.
- Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N and et al. (1991). Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell*, **65**, 91-104.
- Page-McCaw A, Ewald AJ and Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 221-33.
- Pampfer S, Daiter E, Barad D and Pollard JW. (1992). Expression of the colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) in the human uterus and placenta. *Biol Reprod*, **46**, 48-57.
- Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM and Ploegh HL. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*, **9**, 1407-14.

- Patsialou A, Wyckoff J, Wang Y, Goswami S, Stanley ER and Condeelis JS. (2009). Invasion of human breast cancer cells in vivo requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor. *Cancer Res*, **69**, 9498-506.
- Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T and Hochedlinger K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, **28**, 848-55.
- Pawson T, Gish GD and Nash P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*, **11**, 504-11.
- Pawson T and Scott JD. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-80.
- Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D and Hunter T. (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13603-10.
- Pollard JW and Hennighausen L. (1994). Colony stimulating factor 1 is required for mammary gland development during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9312-6.
- Poluha W, Poluha DK and Ross AH. (1995). TrkA neurogenic receptor regulates differentiation of neuroblastoma cells. *Oncogene*, **10**, 185-9.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA and Pollard JW. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, **475**, 222-5.
- Ramakrishnan S, Xu FJ, Brandt SJ, Niedel JE, Bast RC, Jr. and Brown EL. (1989). Constitutive production of macrophage colony-stimulating factor by human ovarian and breast cancer cell lines. *J Clin Invest*, **83**, 921-6.
- Rawlings JS, Rosler KM and Harrison DA. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, **117**, 1281-3.
- Reedijk M, Liu X, van der Geer P, Letwin K, Waterfield MD, Hunter T and Pawson T. (1992). Tyr721 regulates specific binding of the CSF-1 receptor kinase insert to PI 3'-kinase SH2 domains: a model for SH2-mediated receptor-target interactions. *Embo J*, **11**, 1365-72.
- Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 1545-64.
- Reuther GW, Lambert QT, Caligiuri MA and Der CJ. (2000). Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, **20**, 8655-66.
- Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Bronzetti E, Cavazzana A, Cardillo G, Amenta F, Bisetti A and Barbolini G. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **25**, 439-46.
- Robertson AG, Banfield MJ, Allen SJ, Dando JA, Mason GG, Tyler SJ, Bennett GS, Brain SD, Clarke AR, Naylor RL, Wilcock GK, Brady RL and Dawbarn D. (2001). Identification and structure of the nerve growth factor binding site on TrkA. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 131-41.
- Robinson DR, Wu YM and Lin SF. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **19**, 5548-57.

- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T and Nebreda AR. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-37.
- Roussel MF, Shurtleff SA, Downing JR and Sherr CJ. (1990). A point mutation at tyrosine-809 in the human colony-stimulating factor 1 receptor impairs mitogenesis without abrogating tyrosine kinase activity, association with phosphatidylinositol 3-kinase, or induction of c-fos and junB genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6738-42.
- Ryan GR, Dai XM, Dominguez MG, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Russell RG, Pollard JW and Stanley ER. (2001). Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood*, **98**, 74-84.
- Sadowski I, Stone JC and 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**, 4396-408.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sandberg EM, VonDerLinden D, Ostrov DA and Sayeski PP. (2004). Jak2 tyrosine kinase residues glutamic acid 1024 and arginine 1113 form a hydrogen bond interaction that is essential for Jak-STAT signal transduction. *Mol Cell Biochem*, **265**, 161-9.
- Sanger F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*, **214**, 1205-10.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sapi E, Flick MB, Gilmore-Hebert M, Rodov S and Kacinski BM. (1995). Transcriptional regulation of the c-fms (CSF-1R) proto-oncogene in human breast carcinoma cells by glucocorticoids. *Oncogene*, **10**, 529-42.
- Sapi E. (2004). The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 1-11.
- Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C and Wolfe MS. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem*, **282**, 33985-93.
- Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C and Kruger A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem*, **285**, 26335-40.
- Schindler C, Shuai K, Prezioso VR and Darnell JE, Jr. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*, **257**, 809-13.
- Schlessinger J. (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **13**, 443-7.

- Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-25.
- Schlessinger J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, **110**, 669-72.
- Schlessinger J. (2003). Signal transduction. Autoinhibition control. *Science*, **300**, 750-2.
- Schlessinger J and Lemmon MA. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, **2003**, RE12.
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ and Mohammadi M. (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*, **6**, 743-50.
- Schneider R and Schweiger M. (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene*, **6**, 1807-11.
- Scholl SM, Pallud C, Beuvon F, Hacene K, Stanley ER, Rohrschneider L, Tang R, Pouillart P and Lidereau R. (1994). Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst*, **86**, 120-6.
- Schroeter EH, Kisslinger JA and Kopan R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, **393**, 382-6.
- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T and Yu G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, **122**, 435-47.
- Shaner NC, Patterson GH and Davidson MW. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*, **120**, 4247-60.
- Sherr CJ. (1990). Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood*, **75**, 1-12.
- Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT and Stanley ER. (1985). The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*, **41**, 665-76.
- Smith SO, Smith CS and Bormann BJ. (1996). Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol*, **3**, 252-8.
- Snider WD. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, **77**, 627-38.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, **72**, 767-78.
- Stanley ER, Guilbert LJ, Tushinski RJ and Bartelmez SH. (1983). CSF-1--a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J Cell Biochem*, **21**, 151-9.
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA and Kaplan DR. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, **12**, 691-705.
- Sturgill TW, Ray LB, Erikson E and Maller JL. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, **334**, 715-8.

- Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S and Ryu SH. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, **41**, 415-34.
- Tamimi RM, Brugge JS, Freedman ML, Miron A, Iglehart JD, Colditz GA and Hankinson SE. (2008). Circulating colony stimulating factor-1 and breast cancer risk. *Cancer Res*, **68**, 18-21.
- Tamura T, Brost H, Kabisch A, Lampert F, Hadwiger-Fangmeier A and Niemann H. (1989). Detection of fms-oncogene-specific tyrosine kinase activity in human leukemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, **115**, 235-41.
- Tapley P, Kazlauskas A, Cooper JA and Rohrschneider LR. (1990). Macrophage colony-stimulating factor-induced tyrosine phosphorylation of c-fms proteins expressed in FDC-P1 and BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, **10**, 2528-38.
- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A and Narechania A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*, **13**, 2129-41.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Toy EP, Bonafe N, Savlu A, Zeiss C, Zheng W, Flick M and Chambers SK. (2005). Correlation of tumor phenotype with c-fms proto-oncogene expression in an in vivo intraperitoneal model for experimental human breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, **22**, 1-9.
- Tu Y, Zhong Y, Fu J, Cao Y, Fu G, Tian X and Wang B. (2011). Activation of JAK/STAT signal pathway predicts poor prognosis of patients with gliomas. *Med Oncol*, **28**, 15-23.
- Ueno H, Gunn M, Dell K, Tseng A, Jr. and Williams L. (1992). A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*, **267**, 1470-6.
- Uhlik MT, Temple B, Bencharit S, Kimple AJ, Siderovski DP and Johnson GL. (2005). Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol*, **345**, 1-20.
- Ullrich A and Schlessinger J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-12.
- van der Geer P and Hunter T. (1990). Identification of tyrosine 706 in the kinase insert as the major colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-stimulated autophosphorylation site in the CSF-1 receptor in a murine macrophage cell line. *Mol Cell Biol*, **10**, 2991-3002.
- van der Geer P and Hunter T. (1993). Mutation of Tyr697, a GRB2-binding site, and Tyr721, a PI 3-kinase binding site, abrogates signal transduction by the murine CSF-1 receptor expressed in Rat-2 fibroblasts. *Embo J*, **12**, 5161-72.
- van der Geer P, Hunter T and Lindberg RA. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- van der Geer P, Wiley S, Lai VK, Olivier JP, Gish GD, Stephens R, Kaplan D, Shoelson S and Pawson T. (1995). A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr Biol*, **5**, 404-12.

- Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G and Waterfield MD. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*, **22**, 267-72.
- von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, Sumpton D, Bienvenut W, Morrice N, Yamada K, Lamond A, Kalna G, Orton R, Gilbert D and Kolch W. (2009). Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol*, **11**, 1458-64.
- Vidal GA, Naresh A, Marrero L and Jones FE. (2005). Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem*, **280**, 19777-83.
- Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W and Ullrich A. (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J*, **14**, 4267-75.
- Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L, Khosravi-Far R, Hinchliffe KA, Boot-Handford RP and Tournier C. (2006). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ*, **13**, 2099-108.
- Wang ZE, Myles GM, Brandt CS, Lioubin MN and Rohrschneider L. (1993). Identification of the ligand-binding regions in the macrophage colony-stimulating factor receptor extracellular domain. *Mol Cell Biol*, **13**, 5348-59.
- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H and Garcia KC. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*, **53**, 25-38.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC and Richardson CC. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem*, **243**, 4543-55.
- Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA and de Vos AM. (1997). Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, **91**, 695-704.
- Wilhelmsen K and van der Geer P. (2004). Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced release of the colony-stimulating factor 1 receptor cytoplasmic domain into the cytosol involves two separate cleavage events. *Mol Cell Biol*, **24**, 454-64.
- Williams CC, Allison JG, Vidal GA, Burow ME, Beckman BS, Marrero L and Jones FE. (2004). The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol*, **167**, 469-78.
- Wolfe MS. (2009). gamma-Secretase in biology and medicine. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 219-24.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J and Condeelis J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*, **64**, 7022-9.
- Yaffe MB. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 177-86.
- Yarden Y and Ullrich A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 443-78.

-
- Yeung YG and Stanley ER. (2003). Proteomic approaches to the analysis of early events in colony-stimulating factor-1 signal transduction. *Mol Cell Proteomics*, **2**, 1143-55.
- Yu J, Wjasow C and Backer JM. (1998). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem*, **273**, 30199-203.
- Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I and Schlessinger J. (2007). Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*, **130**, 323-34.
- Zambrano N, Buxbaum JD, Minopoli G, Fiore F, De Candia P, De Renzis S, Faraonio R, Sabo S, Cheetham J, Sudol M and Russo T. (1997). Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *J Biol Chem*, **272**, 6399-405.
- Zeng F, Xu J and Harris RC. (2009). Nedd4 mediates ErbB4 JM-a/CYT-1 ICD ubiquitination and degradation in MDCK II cells. *Faseb J*, **23**, 1935-45.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619-28.
- Zhou G, Bao ZQ and Dixon JE. (1995a). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **270**, 12665-9.
- Zhou MM, Harlan JE, Wade WS, Crosby S, Ravichandran KS, Burakoff SJ and Fesik SW. (1995b). Binding affinities of tyrosine-phosphorylated peptides to the COOH-terminal SH2 and NH2-terminal phosphotyrosine binding domains of Shc. *J Biol Chem*, **270**, 31119-23.
- Zwick E, Bange J and Ullrich A. (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer*, **8**, 161-73.

7 Anlagen

Tabelle 7.1: Liste von hochregulierten Genen nach CSF-1-Stimulation für 20 Minuten in HEK293-Zellen (nach IPA)

Symbol	Systematischer Name	Beschreibung	Induktion
Zytokine			
IL10	NM_000572	interleukin 10	2,04
TNFSF10	NM_003810	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,45
Enzyme			
ABHD2	NM_007011	abhydrolase domain containing 2	2,04
ACOX2	NM_003500	acyl-CoA oxidase 2, branched chain	2,14
CCNO	NM_021147	cyclin O	2,35
COX7A1	NM_001864	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	2,16
CYP2E1	NM_000773	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	2,34
DMGDH	NM_013391	dimethylglycine dehydrogenase	2,06
FN1	NM_212482	fibronectin 1	2,53
GALC	NM_000153	galactosylceramidase	2,11
GNA12	NM_007353	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	2,30
HAS3	NM_138612	hyaluronan synthase 3	2,04
HSD3B1	NM_000862	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	2,20
HSD3B7	NM_025193	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	2,39
KLB	NM_175737	klotho beta	2,56
MAN1C1	NM_020379	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	2,69
PDE4A	NM_006202	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	2,15
PLA2G4C	NM_003706	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	2,42
RAB39	NM_017516	RAB39, member RAS oncogene family	2,74
RHOH	NM_004310	ras homolog gene family, member H	2,07
SARDH	NM_007101	sarcosine dehydrogenase	3,07
SEPT3	NM_145733	septin 3	2,64
UBASH3B	NM_032873	ubiquitin associated and SH3 domain containing B	2,85
Wachstumsfaktoren			
TGFB1	NM_000660	transforming growth factor, beta 1	2,18
Ionenkanäle			
KCNQ2	NM_172108	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	2,50
TPCN2	AL137479	two pore segment channel 2	2,26
TRPC4	NM_016179	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	3,08
Kinasen			
ACVRL1	NM_000020	activin A receptor type II-like 1	2,58
AKT3	NM_005465	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	2,68
HSPB8	NM_014365	heat shock 22kDa protein 8	3,65
PTK2B	NM_173174	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	2,19
Peptidasen			
AGTPBP1	AJ437018	ATP/GTP binding protein 1	3,36
HTRA3	NM_053044	HtrA serine peptidase 3	2,19
SOLH	NM_005632	small optic lobes homolog (Drosophila)	2,07

TLL1	NM_012464	tolloid-like 1	2,58
Transkriptionsregulatoren			
CTNNB1	NM_001904	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	2,45
DLX6	NM_005222	distal-less homeobox 6	2,39
EGR3	NM_004430	early growth response 3	2,24
JUNB	NM_002229	jun B proto-oncogene	2,03
MBD1	NM_015845	methyl-CpG binding domain protein 1	2,10
MYCL1	NM_005376	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	2,24
RCOR2	NM_173587	REST corepressor 2	2,02
RREB1	NM_002955	ras responsive element binding protein 1	2,07
SOX10	NM_006941	SRY (sex determining region Y)-box 10	2,35
TAL1	NM_003189	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	2,62
TBX4	NM_018488	T-box 4	3,03
TEF	NM_003216	thyrotrophic embryonic factor	2,11
TP73	NM_005427	tumor protein p73	2,49
ZNF45	NM_003425	zinc finger protein 45	2,37
Translationsregulatoren			
EEF1A1	NM_001402	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	2,04
EFTUD1	NM_024580	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	3,01
G-Protein gekoppelte Rezeptoren			
HTR5A	NM_024012	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A	2,47
NPR2	NM_003995	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)	2,14
Transmembranrezeptoren			
CEACAM1 (includes others)	NM_001024912	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	2,25
LRP1	NM_002332	low density lipoprotein receptor-related protein 1	2,27
Transporter			
ATP11A	NM_032189	ATPase, class VI, type 11A	2,04
ATP6V1C2	NM_144583	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	3,31
CDH23	NM_022124	cadherin-related 23	2,54
SLC23A3	NM_144712	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 3	2,10
TRPA1	NM_007332	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1	2,10
Andere			
ANK3	AK126851	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	2,07
COBL1	BX649112	COBL-like 1	2,03
COL4A1	NM_001845	collagen, type IV, alpha 1	2,57
COL4A5	NM_033380	collagen, type IV, alpha 5	2,25
COL5A1	NM_000093	collagen, type V, alpha 1	2,54
DENND2C	NM_198459	DENN/MADD domain containing 2C	2,02
DOCK8	NM_203447	dedicator of cytokinesis 8	2,27
DYSF	NM_003494	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)	2,06
DZIP1L	NM_173543	DAZ interacting protein 1-like	2,26
FST	NM_013409	follistatin	2,54
GAS2L1	NM_152236	growth arrest-specific 2 like 1	2,56
GIMAP8	NM_175571	GTPase, IMAP family member 8	2,12
HSPA1A/ HSPA1B	NM_005345	heat shock 70kDa protein 1A	2,07
ICAM5	NM_003259	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin	2,12
KRT6C	NM_173086	keratin 6C	2,61
LAMA1	NM_005559	laminin, alpha 1	4,37

MATN2	NM_030583	matrilin 2	2,81
MDN1	NM_014611	MDN1, midasin homolog (yeast)	2,10
MOBP	NM_182935	myelin-associated oligodendrocyte basic protein	2,06
NBPF11 (includes others)	NM_015383	neuroblastoma breakpoint family, member 11	2,08
NHEJ1	AL050185	nonhomologous end-joining factor 1	2,06
NKG7	NM_005601	natural killer cell group 7 sequence	2,03
NPAS3	NM_022123	neuronal PAS domain protein 3	2,16
PAQR7	NM_178422	progesterin and adipoQ receptor family member VII	2,00
PHF21A	NM_016621	PHD finger protein 21A	2,78
PRDM7	NM_052996	PR domain containing 7	2,03
RASSF5	NM_182665	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	2,88
RBM33	NM_053043	RNA binding motif protein 33	2,21
RFPL1-AS1	NR_002727	RFPL1 antisense RNA 1 (non-protein coding)	2,36
RNF144A	NM_014746	ring finger protein 144A	2,33
SERPIND1	NM_000185	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	2,30
SGTB	NM_019072	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta	2,07
SRGAP3	NM_014850	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	2,02
STON2	BX648249	stonin 2	2,00
VAV2	NM_003371	vav 2 guanine nucleotide exchange factor	2,56
ZNF221	NM_013359	zinc finger protein 221	2,11
ZNF341	NM_032819	zinc finger protein 341	2,03

Tabelle 7.2: Liste von hochregulierten Genen nach CSF-1-Stimulation für acht Stunden in HEK293-Zellen (nach IPA)

Symbol	Systematischer Name	Beschreibung	Induktion
Zytokine			
CCL2	NM_002982	chemokine (C-C motif) ligand 2	2,30
CCL26	NM_006072	chemokine (C-C motif) ligand 26	2,08
CCL7	NM_006273	chemokine (C-C motif) ligand 7	5,88
CXCL11	NM_005409	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	2,01
EDN1	NM_001955	endothelin 1	2,58
IFNA8	NM_002170	interferon, alpha 8	3,60
IL13	NM_002188	interleukin 13	2,58
IL36G	NM_019618	interleukin 36, gamma	3,36
IL8	NM_000584	interleukin 8	2,00
Enzyme			
ACOX2	NM_003500	acyl-CoA oxidase 2, branched chain	2,18
BCO2	NM_031938	beta-carotene oxygenase 2	2,89
CA3	NM_005181	carbonic anhydrase III, muscle specific	2,78
CD38	NM_001775	CD38 molecule	2,59
COX7A1	NM_001864	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	2,09
CPO	NM_173077	carboxypeptidase O	5,50
CYB5R2	NM_016229	cytochrome b5 reductase 2	2,65
CYP2C9	NM_000771	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	2,58
CYP2E1	NM_000773	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	2,31
DBH	NM_000787	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)	2,37
DMGDH	NM_013391	dimethylglycine dehydrogenase	2,09
FUT3	NM_000149	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)	2,48

GALNT14	NM_024572	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14)	2,46
GALNT8	NM_017417	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8 (GalNAc-T8)	3,14
GNG3	NM_012202	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	2,11
GNGT1	NM_021955	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1	2,18
GNMT	NM_018960	glycine N-methyltransferase	2,76
GSTT2/GSTT2B	NM_000854	glutathione S-transferase theta 2	2,07
HGD	NM_000187	homogentisate 1,2-dioxygenase	2,40
HHATL	NM_020707	hedgehog acyltransferase-like	2,33
HSD3B1	NM_000862	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	3,64
LDHAL6B	NM_033195	lactate dehydrogenase A-like 6B	2,16
LGSN	NM_016571	lengsin, lens protein with glutamine synthetase domain	2,52
MYH2	NM_017534	myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	2,52
NLGN3	NM_018977	neuroligin 3	3,52
OPLAH	NM_017570	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	2,04
OVGP1	NM_002557	oviductal glycoprotein 1, 120kDa	2,14
PLA2G12B	NM_032562	phospholipase A2, group XIIIB	2,22
PLA2G2E	NM_014589	phospholipase A2, group IIE	2,11
PTGS1	NM_000962	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2,57
RRAD	NM_004165	Ras-related associated with diabetes	2,62
SRD5A2	NM_000348	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2)	3,59
TRIM63	NM_032588	tripartite motif containing 63	3,08
G-Protein gekoppelte Rezeptoren			
CXCR4	NM_001008540	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2,06
NPR3	NM_000908	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atriuretic peptide receptor C)	2,27
OR51E2	NM_030774	olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 2	2,12
TRHR	NM_003301	thyrotropin-releasing hormone receptor	2,05
Ionenkanäle			
CNGA1	NM_000087	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	3,19
KCNE2	NM_172201	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	3,32
TPCN2	AL137479	two pore segment channel 2	2,79
Kinasen			
DYRK1A	NM_130436	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	2,29
LCK	NM_005356	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	2,45
TEX14	NM_198393	testis expressed 14	2,03
Peptidasen			
ADAM32	NM_145004	ADAM metallopeptidase domain 32	2,07
C1S	NM_001734	complement component 1, s subcomponent	3,05
MMP1 (includes EG:300339)	NM_002421	matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)	2,30
MMP10	NM_002425	matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)	8,97
MMP12	NM_002426	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)	2,73
SPPL3	AK097149	signal peptide peptidase-like 3	2,84
USP6	NM_004505	ubiquitin specific peptidase 6 (Tre-2 oncogene)	2,07
Transkriptionsregulatoren			
CREB5	NM_182898	cAMP responsive element binding protein 5	2,43
CSRNP3	NM_024969	cysteine-serine-rich nuclear protein 3	2,42
EGR1	NM_001964	early growth response 1	3,70

EGR3	NM_004430	early growth response 3	4,72
EPC1	NM_025209	enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)	2,16
FOS	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2,63
FOSB	NM_006732	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2,14
FOSL1	NM_005438	FOS-like antigen 1	2,42
RCOR1	NM_015156	REST corepressor 1	2,16
RNF112	NM_007148	ring finger protein 112	2,03
TBX15	NM_152380	T-box 15	2,99
TP63	NM_003722	tumor protein p63	2,21
ZFP36	NM_003407	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	3,02
ZNF483	NM_133464	zinc finger protein 483	2,00

Transmembranrezeptoren

CLEC4A	NM_016184	C-type lectin domain family 4, member A	2,43
DNER	NM_139072	delta/notch-like EGF repeat containing	2,36
HLA-G	NM_002127	major histocompatibility complex, class I, G	2,27
LILRB3	NM_006864	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	2,17
LRP1B	NM_018557	low density lipoprotein receptor-related protein 1B	2,03
SELE	NM_000450	selectin E	2,60

Transporter

ABCC2	NM_000392	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	2,08
HBA1/HBA2	NM_000517	hemoglobin, alpha 1	2,28
NPC1L1	NM_013389	NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1	2,12
PDZK1	NM_002614	PDZ domain containing 1	2,50
SLC17A8	NM_139319	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 8	3,38
SLC22A16	NM_033125	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 16	2,34
SLC6A4	NM_001045	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	2,13
SLC7A9	NM_014270	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 9	2,55
SMC4	AK002200	structural maintenance of chromosomes 4	2,05
TF	NM_001063	transferrin	2,01

Andere

ACRC	NM_052957	acidic repeat containing	2,41
AGT	NM_000029	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	3,00
AKAP5	NM_004857	A kinase (PKA) anchor protein 5	2,10
AKAP8L	AL133576	A kinase (PKA) anchor protein 8-like	2,34
ANGPTL4	NM_139314	angiopoietin-like 4	2,78
ANKDD1A	NM_182703	ankyrin repeat and death domain containing 1A	2,57
ARC	NM_015193	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	3,44
ATAD3A/ATAD3B	AB033099	ATPase family, AAA domain containing 3A	2,42
BCL2A1	NM_004049	BCL2-related protein A1	2,07
CALML4	NM_033429	calmodulin-like 4	2,11
CAMP	NM_004345	cathelicidin antimicrobial peptide	2,73
CCDC116	NM_152612	coiled-coil domain containing 116	3,16
CCDC13	AK058196	coiled-coil domain containing 13	3,54
CDH22	NM_021248	cadherin 22, type 2	3,76
CGA	NM_000735	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	2,17
CLEC3B	NM_003278	C-type lectin domain family 3, member B	2,05
CLIP3	NM_015526	CAP-GLY domain containing linker protein 3	2,23
CPNE4	NM_130808	copine IV	2,22

CTAG1B (includes others)	NM_139250	cancer/testis antigen 1B	2,74
DEFB103A/ DEFB103B	NM_018661	defensin, beta 103B	4,60
DKK4	NM_014420	dickkopf homolog 4 (<i>Xenopus laevis</i>)	2,12
DNAH17	NM_003727	dynein, axonemal, heavy chain 17	2,10
FOLR3	NM_000804	folate receptor 3 (gamma)	2,55
GADD45B	NM_015675	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	2,32
GALP	NM_033106	galanin-like peptide	5,06
GNLY	NM_006433	granulysin	2,65
GRINL1A	AK074767	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A	2,21
GSG1L	NM_144675	GSG1-like	3,14
HBG1	NM_000559	hemoglobin, gamma A	2,57
HIST1H1C	NM_005319	histone cluster 1, H1c	2,07
HIST1H3A (includes others)	NM_003530	histone cluster 1, H3a	2,22
HIST2H2AA3/ HIST2H2AA4	NM_003516	histone cluster 2, H2aa3	2,14
ICOS	NM_012092	inducible T-cell co-stimulator	2,23
ITGB2	NM_000211	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	2,90
LIMS3-LOC440895	BC094740	LIMS3-LOC440895 readthrough	2,05
LINCR	NM_001080535	neuralized homolog 3 (<i>Drosophila</i>) pseudogene	2,08
LOC100507397	AB018295	hypothetical LOC100507397	2,84
LRRC43	NM_152759	leucine rich repeat containing 43	2,17
LY6K	NM_017527	lymphocyte antigen 6 complex, locus K	2,38
MCF2	NM_005369	MCF.2 cell line derived transforming sequence	3,09
MLPH	NM_024101	melanophilin	5,38
MOBP	NM_182935	myelin-associated oligodendrocyte basic protein	2,42
MUC20	NM_152673	mucin 20, cell surface associated	2,19
MYL4	NM_002476	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic	2,21
MYOZ2	NM_016599	myozenin 2	2,28
N4BP2L1	NM_052818	NEDD4 binding protein 2-like 1	2,30
NEFH	NM_021076	neurofilament, heavy polypeptide	2,98
NHLH1	NM_005598	nescient helix loop helix 1	3,87
OCIAD2	NM_001014446	OCIA domain containing 2	3,57
PAGE2/PAGE2B	NM_207339	P antigen family, member 2B	2,12
PER1	BC028207	period homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	2,23
PER2	NM_022817	period homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	2,19
PLIN2	NM_001122	perilipin 2	2,54
PNOC	NM_006228	prepronociceptin	3,74
RFPL1-AS1	NR_002727	RFPL1 antisense RNA 1 (non-protein coding)	3,31
RFPL3-AS1	NR_001450	RFPL3 antisense RNA 1 (non-protein coding)	2,12
RHOXF1	NM_139282	Rhox homeobox family, member 1	2,39
RIBC2	NM_015653	RIB43A domain with coiled-coils 2	2,90
SCG5	NM_003020	secretogranin V (7B2 protein)	2,34
SERPINA3	NM_001085	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	2,02
SERPINB2	NM_002575	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	9,84
SHC3	NM_016848	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	2,25
SOCS3	NM_003955	suppressor of cytokine signaling 3	4,41
SPANXA2 (includes others)	NM_032417/ NM_013453	SPANX family, member A2	3,23/ 3,10
SPANXN3	NM_001009609	SPANX family, member N3	9,51
SPDYA	NM_001008779	speedy homolog A (<i>Xenopus laevis</i>)	2,47
TEKT3	NM_031898	tektin 3	2,65

TFPI2	NM_006528	tissue factor pathway inhibitor 2	5,37
TMEM146	NM_152784	transmembrane protein 146	4,20
TNN	NM_022093	tenascin N	2,46
TNXB	NM_019105	tenascin XB	2,14
TSPAN8	NM_004616	tetraspanin 8	2,16
UBD	NM_006398	ubiquitin D	2,14
UBL4B	NM_203412	ubiquitin-like 4B	2,96
VCX2	NM_016378	variable charge, X-linked 2	2,29
VCX3A	NM_016379/	variable charge, X-linked 3A	2,17/
(includes others)	NM_013452		2,15
VWCE	NM_152718	von Willebrand factor C and EGF domains	2,04
WDR66	NM_144668	WD repeat domain 66	2,30
YIPF7	NM_182592	Yip1 domain family, member 7	2,02
ZBTB1	NM_014950	zinc finger and BTB domain containing 1	2,59
ZC3H12D	AK090441	zinc finger CCCH-type containing 12D	4,91

Tabelle 7.3: Liste von hochregulierten Genen nach NGF-Stimulation für acht Stunden in stabil TrkA-exprimierenden HEK293-Zellen (nach IPA)

Symbol	Systematischer Name	Beschreibung	Induktion
Zytokine			
CLCF1	NM_013246	cardiotrophin-like cytokine factor 1	2,02
CNTF	NM_170768	ciliary neurotrophic factor	2,76
CXCL14	NM_004887	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	9,35
EDN1	NM_001955	endothelin 1	2,36
FAM3C	NM_014888	family with sequence similarity 3, member C	2,37
IL11	NM_000641	interleukin 11	22,45
IL12A	NM_000882	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	10,11
LIF	NM_002309	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	2,33
SPRED2	NM_181784	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	5,87
WNT4	NM_030761	wingless-type MMTV integration site family, member 4	5,79
Enzyme			
ACER3	NM_018367	alkaline ceramidase 3	2,24
AGPAT9	NM_032717	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	2,23
ALDH1A2	NM_170697	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	2,78
ARL5B	NM_178815	ADP-ribosylation factor-like 5B	4,31
ASNS	NM_001673	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	4,03
B3GAT1	NM_018644	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)	23,38
B3GNT2	NM_006577	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	2,73
BCAT1	NM_005504	branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic	3,96
C1GALT1	NM_020156	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	2,06
CA13	NM_198584	carbonic anhydrase XIII	4,08
CA2	NM_000067	carbonic anhydrase II	3,14
CARS	NM_001014438	cysteinyl-tRNA synthetase	3,24
CDC23	BC010944	cell division cycle 23 homolog (S. cerevisiae)	2,42
CHST11	NM_018413	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	3,33
CHST9	NM_031422	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 9	4,64
CRY1	NM_004075	cryptochrome 1 (photolyase-like)	3,73
CTBP1	AL137653	C-terminal binding protein 1	2,39
CTH	NM_001902	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	3,35
CYB5R2	NM_016229	cytochrome b5 reductase 2	12,79
CYCS	NM_018947	cytochrome c, somatic	2,19

CYP26A1	NM_057157	cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	2,28
DDO	NM_003649	D-aspartate oxidase	14,87
DDX10	NM_004398	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10	3,00
DDX21	NM_004728	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	2,50
DHRS9	NM_005771	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	2,71
DHX36	NM_020865	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	2,07
DHX37	NM_032656	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37	3,23
DIMT1L	NM_014473	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)	2,45
DPYSL4	NM_006426	dihydropyrimidinase-like 4	3,86
EPHX4	NM_173567	epoxide hydrolase 4	2,12
ERO1L	NM_014584	ERO1-like (S. cerevisiae)	2,49
FADS3	NM_021727	fatty acid desaturase 3	2,67
FBXL7	NM_012304	F-box and leucine-rich repeat protein 7	10,25
GALNT13	NM_052917	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GalNAc-T13)	2,41
GALNTL1	NM_020692	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	2,44
GARS	NM_002047	glycyl-tRNA synthetase	2,89
GBE1	NM_000158	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	2,49
GCH1	NM_000161	GTP cyclohydrolase 1	3,44
GEM	NM_005261	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	5,62
GLS	AF158555	glutaminase	3,03
GNL2	NM_013285	guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar)	2,42
GOT1	NM_002079	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	2,14
GPT2	NM_133443	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	2,94
GTPBP4	NM_012341	GTP binding protein 4	2,34
HELB	NM_033647	helicase (DNA) B	2,15
HMGCS1	NM_002130	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	5,98
HSD11B2	NM_000196	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	2,51
HSPA8	NM_006597	heat shock 70kDa protein 8	2,13
IMPAD1	NM_017813	inositol monophosphatase domain containing 1	2,43
LIG4	NM_002312	ligase IV, DNA, ATP-dependent	4,11
LIPG	NM_006033	lipase, endothelial	4,20
LIPH	NM_139248	lipase, member H	2,28
LSS	NM_001001438	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	2,29
MARS2	NM_138395	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	2,54
MRPS30	NM_016640	mitochondrial ribosomal protein S30	2,37
MTHFD1L	NM_015440	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	2,17
MTHFD2	NM_006636	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	2,14
MYO5B	NM_001080467	myosin VB	3,38
NARS	NM_004539	asparaginyl-tRNA synthetase	2,41
NEDD4L	NM_015277	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	2,60
NSUN2	NM_017755	NOP2/Sun domain family, member 2	2,40
ODC1	NM_002539	ornithine decarboxylase 1	2,92
OPLAH	NM_017570	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	2,41
OXCT2	NM_022120	3-oxoacid CoA transferase 2	2,93
PCYT1A	NM_005017	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha	3,18
PGAP1	NM_024989	post-GPI attachment to proteins 1	2,22
PIGL	NM_004278	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L	2,40
PMM2	NM_000303	phosphomannomutase 2	2,47
PNPT1	NM_033109	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,33
POLR1E	BC017766	polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa	2,07
PPME1	NM_016147	protein phosphatase methylesterase 1	2,15

PSAT1	NM_058179	phosphoserine aminotransferase 1	2,60
PTGS2	NM_000963	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	6,19
QSOX1	NM_002826	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1	2,76
RAB20	NM_017817	RAB20, member RAS oncogene family	3,42
RAB33A	NM_004794	RAB33A, member RAS oncogene family	2,20
RAB39	NM_017516	RAB39, member RAS oncogene family	6,41
RAB39B	NM_171998	RAB39B, member RAS oncogene family	2,25
RABL3	NM_173825	RAB, member of RAS oncogene family-like 3	2,84
RALA	NM_005402	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)	2,06
RAP2C	NM_021183	RAP2C, member of RAS oncogene family	2,55
RHEBL1	NM_144593	Ras homolog enriched in brain like 1	7,43
RNMT	NM_003799	RNA (guanine-7-) methyltransferase	2,59
RPP30	NM_006413	ribonuclease P/MRP 30kDa subunit	2,12
RRAD	NM_004165	Ras-related associated with diabetes	6,97
RRM2	NM_001034	ribonucleotide reductase M2	2,37
SAR1A	NM_020150	SAR1 homolog A (S. cerevisiae)	2,25
SAT1	NM_002970	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	3,51
SBNO1	AK074256	strawberry notch homolog 1 (Drosophila)	2,55
SCLY	AF175767	selenocysteine lyase	2,12
SETX	NM_015046	senataxin	5,01
SH3GL2	NM_003026	SH3-domain GRB2-like 2	2,03
SMPD3	NM_018667	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)	2,38
SRXN1	NM_080725	sulfiredoxin 1	2,23
ST3GAL5	NM_003896	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	3,48
ST8SIA2	NM_006011	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	2,68
TARS	NM_152295	threonyl-tRNA synthetase	2,38
TFB2M	NM_022366	transcription factor B2, mitochondrial	2,79
TNFAIP3	NM_006290	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3,28
TRIM9	NM_052978	tripartite motif containing 9	4,22
TTL (includes EG:150465)	NM_153712	tubulin tyrosine ligase	2,10
TXNDC2	NM_032243	thioredoxin domain containing 2 (spermatozoa)	2,83
UPP1	NM_181597	uridine phosphorylase 1	9,12
YOD1	NM_018566	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (S. cerevisiae)	2,03
ZCCHC6	NM_024617	zinc finger, CCHC domain containing 6	2,31
Wachstumsfaktoren			
AREG/ AREGB	NM_001657	amphiregulin	18,85
CTGF	NM_001901	connective tissue growth factor	6,38
FGF18	NM_003862	fibroblast growth factor 18	2,14
FGF2	NM_002006	fibroblast growth factor 2 (basic)	2,16
FGF5	NM_004464	fibroblast growth factor 5	2,35
HBEGF	NM_001945	heparin-binding EGF-like growth factor	5,32
IGF2	NM_001007139	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	5,75
INHBA	NM_002192	inhibin, beta A	5,34
TGFB1	NM_000660	transforming growth factor, beta 1	5,64
VEGFA	NM_003376	vascular endothelial growth factor A	2,23
Ionenkanäle			
CATSPER1	NM_053054	cation channel, sperm associated 1	18,54
CLIC5	NM_016929	chloride intracellular channel 5	3,15
KCNE1L	NM_012282	KCNE1-like	2,83
KCNK5	NM_003740	potassium channel, subfamily K, member 5	2,03
KCTD12	NM_138444	potassium channel tetramerisation domain containing 12	10,51
KCTD13	NM_178863	potassium channel tetramerisation domain containing 13	2,86

RYR1	NM_000540	ryanodine receptor 1 (skeletal)	2,14
Kinasen			
AK2	NM_001625	adenylate kinase 2	2,21
BAIAP2	NM_017450	BAI1-associated protein 2	4,51
CAMKV	NM_024046	CaM kinase-like vesicle-associated	2,82
CDK14	NM_012395	cyclin-dependent kinase 14	2,29
CDKL1	NM_004196	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	2,13
DLG3	NM_021120	discs, large homolog 3 (Drosophila)	2,41
EPHA2	NM_004431	EPH receptor A2	10,54
EPHB2	NM_004442	EPH receptor B2	2,37
FER	NM_005246	fer (fps/fes related) tyrosine kinase	2,39
FLT1	NM_002019	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	7,65
HK2	NM_000189	hexokinase 2	2,65
HSPB8	NM_014365	heat shock 22kDa protein 8	6,43
HUS1	NM_004507	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	2,20
KALRN	AK125979	kalirin, RhoGEF kinase	2,97
LYN	NM_002350	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	2,86
NDRG1	NM_006096	N-myc downstream regulated 1	3,68
NRP2	NM_201264	neuropilin 2	2,50
PANK3	NM_024594	pantothenate kinase 3	2,74
PDXK	NM_003681	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	2,28
PFKP	NM_002627	phosphofructokinase, platelet	3,43
PRKCA	NM_002737	protein kinase C, alpha	2,29
PRPS2	NM_002765	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	2,76
RFK	NM_018339	riboflavin kinase	2,13
RIOK1	NM_031480	RIO kinase 1 (yeast)	2,23
RIPK2	NM_003821	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	2,12
SGK1	NM_005627	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	2,04
STK38L	NM_015000	serine/threonine kinase 38 like	2,51
STK4	NM_006282	serine/threonine kinase 4	2,76
TRIB1	NM_025195	tribbles homolog 1 (Drosophila)	2,82
TRIB3	NM_021158	tribbles homolog 3 (Drosophila)	2,67
Liganden-abhängige Zellkernrezeptoren			
NR4A1	NM_002135	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	4,14
NR4A2	NM_006186	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	2,19
NR4A3	NM_173198	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	2,84
VDR	NM_001017535	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	2,49
Peptidasen			
ADAMTS1	NM_006988	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	3,19
ADAMTS20	AK023228	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 20	2,34
C1S	NM_001734	complement component 1, s subcomponent	2,06
CTRL	NM_001907	chymotrypsin-like	2,67
DPP9	NM_139159	dipeptidyl-peptidase 9	2,11
MMP10	NM_002425	matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)	19,15
MMP12	NM_002426	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)	3,84
PLAU	NM_002658	plasminogen activator, urokinase	2,00
PSEN2	NM_000447	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)	3,00
PSMD14	NM_005805	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	2,14
PSME3	NM_005789	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	2,36
SEN5	NM_152699	SUMO1/sentrin specific peptidase 5	2,11
TOR1A	NM_000113	torsin family 1, member A (torsin A)	2,06
USP15	NM_006313	ubiquitin specific peptidase 15	2,20

USP17 (includes others)	NM_201402	ubiquitin specific peptidase 17	2,35
USP3	NM_006537	ubiquitin specific peptidase 3	2,17
USP31	NM_020718	ubiquitin specific peptidase 31	2,19
Phosphatasen			
CDC14A	NM_003672	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	2,14
DUSP1	NM_004417	dual specificity phosphatase 1	2,39
DUSP5	NM_004419	dual specificity phosphatase 5	5,19
DUSP6	NM_001946	dual specificity phosphatase 6	3,98
INPP1	NM_002194	inositol polyphosphate-1-phosphatase	3,88
INPP4B	NM_003866	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	2,73
PDCD1	NM_005018	programmed cell death 1	2,15
PDP2	NM_020786	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2	2,51
PPM1E	NM_014906	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1E	2,05
PPP2R2C	NM_020416	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	5,29
PPP3R1	NM_000945	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha	2,22
Transkriptionsregulatoren			
AFF4	NM_014423	AF4/FMR2 family, member 4	3,06
ANKRD57	NM_023016	ankyrin repeat domain 57	2,32
ARID5B	NM_032199	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	2,85
ATF3	NM_004024	activating transcription factor 3	2,46
ATF4	NM_001675	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	2,26
BATF3	NM_018664	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	4,09
BCL10	NM_003921	B-cell CLL/lymphoma 10	2,37
BHLHE40	NM_003670	basic helix-loop-helix family, member e40	2,51
CBFA2T3	NM_005187	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	18,31
CBL	NM_005188	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	2,34
CCRN4L	NM_012118	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)	2,53
CEBPB	NM_005194	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	3,16
CEBPD	NM_005195	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	2,61
CEBPE	NM_001805	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	3,15
CEBPG	NM_001806	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	2,29
CELF3	NM_007185	CUGBP, Elav-like family member 3	2,95
CITED1	NM_004143	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	2,16
CSRNP1	NM_033027	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	5,02
DDIT3	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3	2,42
EGR1	NM_001964	early growth response 1	155,57
EGR2	NM_000399	early growth response 2	24,19
EGR3	NM_004430	early growth response 3	27,12
EGR4	NM_001965	early growth response 4	7,69
ELK4	NM_001973	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	2,51
ELL2	NM_012081	elongation factor, RNA polymerase II, 2	2,31
EOMES	NM_005442	eomesodermin	2,37
ETV1	NM_004956	ets variant 1	8,05
ETV4	NM_001986	ets variant 4	11,10
ETV5	NM_004454	ets variant 5	47,47
FOS	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	15,89
FOSB	NM_006732	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	3,68
FOSL1	NM_005438	FOS-like antigen 1	14,86
FOSL2	NM_005253	FOS-like antigen 2	2,22
FOXA1	NM_004496	forkhead box A1	5,04
GABPB1	NM_002041	GA binding protein transcription factor, beta subunit 1	2,59
GBX2	NM_001485	gastrulation brain homeobox 2	2,94

GLIS3	NM_001042413	GLIS family zinc finger 3	2,34
GTF2H1	NM_005316	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	2,24
HDAC4	NM_006037	histone deacetylase 4	3,13
HIC1	NM_006497	hypermethylated in cancer 1	2,65
ID4	NM_001546	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	3,72
IRX4	NM_016358	iroquois homeobox 4	6,85
JUNB	NM_002229	jun B proto-oncogene	5,62
KLF5	NM_001730	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	2,12
LBH	NM_030915	limb bud and heart development homolog (mouse)	4,41
MAFF	NM_012323	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	5,75
MAFG	NM_002359	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)	2,24
MAX	NM_145114	MYC associated factor X	2,16
MBD2	NM_015832	methyl-CpG binding domain protein 2	2,24
MDM2	NM_002392	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	2,35
MSX1	NM_002448	msh homeobox 1	2,14
MYBBP1A	NM_014520	MYB binding protein (P160) 1a	2,77
NAA15	NM_057175	N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	2,22
NAB2	NM_005967	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)	2,42
NFATC1	NM_172390	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	3,65
NFKBIB	NM_002503	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	2,78
NFYA	NM_002505	nuclear transcription factor Y, alpha	3,17
NPAS2	NM_002518	neuronal PAS domain protein 2	3,51
NRL	NM_006177	neural retina leucine zipper	2,43
OLIG2	NM_005806	oligodendrocyte lineage transcription factor 2	5,20
OVOL2	NM_021220	ovo-like 2 (Drosophila)	2,88
PAWR	NM_002583	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	2,13
PIAS2	NM_004671	protein inhibitor of activated STAT, 2	2,33
PTRF	NM_012232	polymerase I and transcript release factor	2,80
RCOR1	NM_015156	REST corepressor 1	2,60
RELB	NM_006509	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	2,22
RNF14	NM_004290	ring finger protein 14	2,06
SERTAD1	NM_013376	SERTA domain containing 1	4,25
SNAI1	NM_005985	snail homolog 1 (Drosophila)	3,03
SNAI3	NM_178310	snail homolog 3 (Drosophila)	2,72
SNAPC2	NM_003083	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2, 45kDa	2,22
SOX8	NM_014587	SRY (sex determining region Y)-box 8	4,24
SUFU	NM_016169	suppressor of fused homolog (Drosophila)	2,41
TAF13	NM_005645	TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 18kDa	4,56
TAF1A	NM_005681	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa	2,33
TAF5	NM_006951	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 100kDa	2,26
TAF5L	NM_001025247	TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	2,26
TAF7L	NM_024885	TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 50kDa	4,70
TBX2	NM_005994	T-box 2	2,24
TBX21	NM_013351	T-box 21	2,19
TCF7	NM_003202	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	2,57
TRIM29	NM_012101	tripartite motif containing 29	2,96
TTF2	BC030058	transcription termination factor, RNA polymerase II	2,72
WT1	NM_024424	Wilms tumor 1	3,65

WWTR1	NM_015472	WW domain containing transcription regulator 1	2,31
XBP1	NM_005080	X-box binding protein 1	2,95
ZBTB7B	NM_015872	zinc finger and BTB domain containing 7B	3,15
ZFP36	NM_003407	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	6,04
ZNF35	NM_003420	zinc finger protein 35	2,46
ZNF37A	NM_001007094	zinc finger protein 37A	2,33
ZNF593	NM_015871	zinc finger protein 593	2,16
Translationsregulatoren			
CELF1	NM_198700	CUGBP, Elav-like family member 1	2,75
EIF2B2	NM_014239	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	2,05
EIF2C2	NM_012154	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2	2,49
EIF4E	NM_001968	eukaryotic translation initiation factor 4E	2,33
ETF1	NM_004730	eukaryotic translation termination factor 1	2,17
GFM1	NM_024996	G elongation factor, mitochondrial 1	2,87
HBS1L	AJ459827	HBS1-like (S. cerevisiae)	2,21
IGF2BP2	NM_006548	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	2,01
MTRF1L	NM_019041	mitochondrial translational release factor 1-like	2,51
G-Protein gekoppelte Rezeptoren			
C3AR1	NM_004054	complement component 3a receptor 1	3,09
GABBR2	NM_005458	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	3,60
GPR126	NM_198569	G protein-coupled receptor 126	2,13
GPR56	NM_201525	G protein-coupled receptor 56	2,34
GPRC5A	NM_003979	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	2,59
LTB4R2	NM_019839	leukotriene B4 receptor 2	2,73
OR7E24	NM_001079935	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 24	2,06
OR7E5P	AK055955	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 5 pseudogene	2,20
P2RY2	NM_176072	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	2,55
PTAFR	NM_000952	platelet-activating factor receptor	2,48
Transmembranrezeptoren			
ASGR1	NM_001671	asialoglycoprotein receptor 1	4,87
CLEC4A	NM_016184	C-type lectin domain family 4, member A	2,21
F3	NM_001993	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	5,22
FGFRL1	NM_001004356	fibroblast growth factor receptor-like 1	3,08
FRRS1	NM_001013660	ferric-chelate reductase 1	2,93
IL10RA	NM_001558	interleukin 10 receptor, alpha	2,31
IL15RA	NM_172200	interleukin 15 receptor, alpha	3,17
IL1RAP	NM_134470	interleukin 1 receptor accessory protein	2,15
IL27RA	NM_004843	interleukin 27 receptor, alpha	2,40
IL2RB	NM_000878	interleukin 2 receptor, beta	3,54
IL4R	NM_000418	interleukin 4 receptor	2,24
IL6R	NM_000565	interleukin 6 receptor	4,76
PLXNA1	NM_032242	plexin A1	2,38
RELT	NM_032871	RELT tumor necrosis factor receptor	2,53
SRCRB4D	NM_080744	scavenger receptor cysteine rich domain containing, group B (4 domains)	2,90
TNFRSF10D	NM_003840	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	2,62
Transporter			
ABCB1	NM_000927	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	3,33
ABCF2	NM_007189	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	2,57
ANKH	NM_054027	ankylosis, progressive homolog (mouse)	2,57
ATP1B1	NM_001677	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	2,11
ATP6V1C1	NM_001695	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1	2,23
CPLX1	NM_006651	complexin 1	4,04
FABP5	NM_001444	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	2,10

FLJ43855	NR_003083	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 10, pseudogene	2,70
GJA1	NM_000165	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	2,65
GJB2	NM_004004	gap junction protein, beta 2, 26kDa	4,17
GJC2	NM_020435	gap junction protein, gamma 2, 47kDa	2,77
GOSR2	NM_004287	golgi SNAP receptor complex member 2	2,10
HPCAL4	NM_016257	hippocalcin like 4	2,01
KPNA2	NM_002266	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	2,70
KPNA4	NM_002268	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	2,34
MCL1	NM_021960	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	2,90
NUP50	NM_007172	nucleoporin 50kDa	2,27
NUPL1	AB007870	nucleoporin like 1	2,67
OSTBETA	NM_178859	organic solute transporter beta	2,51
PANX1	NM_015368	pannexin 1	3,10
PEA15	NM_003768	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	3,28
SCFD2	NM_152540	sec1 family domain containing 2	2,29
SEC24D	NM_014822	SEC24 family, member D (<i>S. cerevisiae</i>)	2,46
SEH1L	NM_031216	SEH1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	3,22
SLC12A2	NM_001046	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	2,78
SLC16A7	NM_004731	solute carrier family 16, member 7 (monocarboxylic acid transporter 2)	3,22
SLC1A3	NM_004172	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	2,36
SLC25A25	NM_001006641	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	3,30
SLC25A32	NM_030780	solute carrier family 25, member 32	2,92
SLC27A2	NM_003645	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	2,33
SLC2A1	NM_006516	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	2,26
SLC30A10	NM_018713	solute carrier family 30, member 10	3,93
SLC30A7	NM_133496	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7	2,08
SLC38A1	NM_030674	solute carrier family 38, member 1	2,13
SLC39A3	NM_213568	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3	2,61
SLC41A2	NM_032148	solute carrier family 41, member 2	4,05
SLC4A7	NM_003615	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	2,47
SLC6A15	NM_018057	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15	2,52
SLC6A6	NM_003043	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	2,35
SLC7A11	NM_014331	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	31,50
SLC7A5	NM_003486	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	3,55
SLC7A6	NM_003983	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 6	2,38
SLCO5A1	NM_030958	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	3,25
SNX5	BC002724	sorting nexin 5	2,15
STX11	NM_003764	syntaxin 11	2,27
STX3	NM_004177	syntaxin 3	2,23
TMEM104	AK000262	transmembrane protein 104	2,17
VTI1A	NM_145206	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (yeast)	2,40
XPO4	NM_022459	exportin 4	3,51
Andere			
ACRC	NM_052957	acidic repeat containing	3,86
ALS2	AK023024	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)	3,05
AMIGO2	NM_181847	adhesion molecule with Ig-like domain 2	3,59

ANKRD20A3 (includes others)	NM_001012421	ankyrin repeat domain 20 family, member A3	2,10
ANKRD37	NM_181726	ankyrin repeat domain 37	3,17
ARAP2	NM_015230	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	2,21
ARC	NM_015193	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	5,46
ARHGAP8/ PRR5- ARHGAP8	BC059382	Rho GTPase activating protein 8	2,17
ARID3B	NM_006465	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)	3,09
ARRDC4	NM_183376	arrestin domain containing 4	4,44
ASB7	NM_024708	ankyrin repeat and SOCS box containing 7	2,03
ATXN7L2	NM_153340	ataxin 7-like 2	2,02
BICD1	BC010091	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	2,30
BSPRY	NM_017688	B-box and SPRY domain containing	2,16
BVES	NM_147147	blood vessel epicardial substance	3,12
C13orf15	NM_014059	chromosome 13 open reading frame 15	3,52
CABP7	NM_182527	calcium binding protein 7	3,03
CALCA	NM_000728	calcitonin-related polypeptide alpha	7,97
CCDC58	NM_001017928	coiled-coil domain containing 58	2,01
CCDC59	NM_014167	coiled-coil domain containing 59	2,07
CCDC86	NM_024098	coiled-coil domain containing 86	3,03
CCNA1	NM_003914	cyclin A1	22,80
CCND2	NM_001759	cyclin D2	2,22
CCNJ	NM_019084	cyclin J	2,06
CD24	L33930	CD24 molecule	4,00
CD44	NM_000610	CD44 molecule (Indian blood group)	3,61
CD55	NM_000574	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	2,75
CD68	NM_001251	CD68 molecule	2,58
CDH15	NM_004933	cadherin 15, type 1, M-cadherin (myotubule)	2,22
CDKN1A	NM_078467	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	3,38
CEP97	NM_024548	centrosomal protein 97kDa	2,26
CGA	NM_000735	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	6,22
CHAC1	NM_024111	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	2,02
CHORDC1	NM_012124	cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1	2,56
CLU	NM_203339	clusterin	2,91
COBL	NM_015198	cordon-bleu homolog (mouse)	2,41
COL25A1	NM_032518	collagen, type XXV, alpha 1	3,48
COQ10B	NM_025147	coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)	2,75
CORO1A	NM_007074	coronin, actin binding protein, 1A	2,84
CORO1C	NM_014325	coronin, actin binding protein, 1C	2,15
CPEB2	NM_182485	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	3,92
CREM	NM_183013	cAMP responsive element modulator	2,47
CYR61	NM_001554	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	3,36
DCHS1	NM_003737	dachsous 1 (Drosophila)	3,21
DCUN1D5	NM_032299	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)	2,42
DNAJA1	NM_001539	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	2,15
DOCK5	NM_024940	dedicator of cytokinesis 5	3,73
DPH2	NM_001384	DPH2 homolog (S. cerevisiae)	2,54
DPH3	NM_206831	DPH3, KT111 homolog (S. cerevisiae)	2,55
DUS3L	NM_020175	dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)	2,83
DYNLL2	NM_080677	dynein, light chain, LC8-type 2	2,03
EBNA1BP2	NM_006824	EBNA1 binding protein 2	4,02
EID3	NM_001008394	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3	4,53
EMP1	NM_001423	epithelial membrane protein 1	9,68

EPB41L5	BC032822	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	2,85
ERRFI1	NM_018948	ERBB receptor feedback inhibitor 1	2,18
FAM105B	NM_138348	family with sequence similarity 105, member B	2,27
FAM118B	NM_024556	family with sequence similarity 118, member B	2,10
FAM123A	NM_152704	family with sequence similarity 123A	7,68
FAM13A	NM_014883	family with sequence similarity 13, member A	2,68
FAM57A	NM_024792	family with sequence similarity 57, member A	2,32
FAM83H	NM_198488	family with sequence similarity 83, member H	2,74
FAM8A1	NM_016255	family with sequence similarity 8, member A1	2,24
FAM91A1	NM_144963	family with sequence similarity 91, member A1	2,06
FBLIM1	NM_017556	filamin binding LIM protein 1	2,81
FLNC	NM_001458	filamin C, gamma	3,30
FLRT1	NM_013280	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	11,37
FNDC3B	BC012204	fibronectin type III domain containing 3B	2,07
FNDC5	NM_153756	fibronectin type III domain containing 5	2,80
FRMD4B	AB023230	FERM domain containing 4B	2,27
G0S2	NM_015714	G0/G1 switch 2	3,02
GAB2	NM_012296	GRB2-associated binding protein 2	2,00
GADD45B	NM_015675	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	5,91
GAL	NM_015973	galanin prepropeptide	8,13
GDAP1L1	NM_024034	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	2,83
GPR137B	NM_003272	G protein-coupled receptor 137B	2,72
GPSM1	BC009979	G-protein signaling modulator 1	2,27
GRB10	NM_001001555	growth factor receptor-bound protein 10	4,31
GRB2	NM_002086	growth factor receptor-bound protein 2	2,63
GRPEL2	NM_152407	GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)	2,16
HAUS2	NM_018097	HAUS augmin-like complex, subunit 2	2,72
HEATR1	NM_018072	HEAT repeat containing 1	2,10
HEG1	AB033063	HEG homolog 1 (zebrafish)	2,21
HHIP	AK074711	hedgehog interacting protein	2,41
HN1	NM_001002033	hematological and neurological expressed 1	2,16
HSPA13	NM_006948	heat shock protein 70kDa family, member 13	2,31
HSPA1A/ HSPA1B	NM_005345	heat shock 70kDa protein 1A	5,14
HSPA1L	NM_005527	heat shock 70kDa protein 1-like	2,64
HSPA4	NM_002154	heat shock 70kDa protein 4	2,22
HSPA4L	NM_014278	heat shock 70kDa protein 4-like	2,03
HSPB3	NM_006308	heat shock 27kDa protein 3	2,20
HSPC159	NM_014181	galectin-related protein	2,73
HSPH1	NM_006644	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2,18
HUS1B	NM_148959	HUS1 checkpoint homolog b (S. pombe)	2,37
IER2	NM_004907	immediate early response 2	2,97
IER3	NM_003897	immediate early response 3	5,57
IFRD1	NM_001007245	interferon-related developmental regulator 1	2,79
IMP4	NM_033416	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	2,32
INA	NM_032727	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	2,78
INSIG1	NM_198336	insulin induced gene 1	4,44
JPH3	BC008690	junctional protein 3	4,20
KBTBD8	NM_032505	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	2,27
KCTD9	AF130091	potassium channel tetramerisation domain containing 9	2,21
KIF26B	NM_018012	kinesin family member 26B	2,82
KIF5C	NM_004522	kinesin family member 5C	2,93
KLHL18	NM_025010	kelch-like 18 (Drosophila)	2,40
KRT14	NM_000526	keratin 14	2,94
KRT17	NM_000422	keratin 17	3,26
KRTDAP	NM_207392	keratinocyte differentiation-associated protein	2,46

LARP1B	NM_032239	La ribonucleoprotein domain family, member 1B	2,68
LARP4	NM_199190	La ribonucleoprotein domain family, member 4	2,03
LGALS7/ LGALS7B	NM_002307	lectin, galactoside-binding, soluble, 7	2,16
LONRF2	NM_198461	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	3,57
LONRF3	NM_024778	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	5,79
LRRC8B	NM_015350	leucine rich repeat containing 8 family, member B	3,07
LRRC8E	NM_025061	leucine rich repeat containing 8 family, member E	2,61
LSG1	NM_018385	large subunit GTPase 1 homolog (S. cerevisiae)	2,39
LTV1	NM_032860	LTV1 homolog (S. cerevisiae)	2,62
LY6K	NM_017527	lymphocyte antigen 6 complex, locus K	8,94
LYSMD2	NM_153374	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	3,14
MAFB	NM_005461	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	3,03
MAK16	NM_032509	MAK16 homolog (S. cerevisiae)	3,31
MANF	NM_006010	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	2,26
MAP1LC3B	NM_022818	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	2,07
MARVELD3	NM_052858	MARVEL domain containing 3	3,63
MCF2L	AK022184	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like	5,43
MDM4	BX640923	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)	2,03
MED10	NM_032286	mediator complex subunit 10	2,37
MED12L	NM_053002	mediator complex subunit 12-like	2,07
METRNL	NM_001004431	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	3,81
MFSD2A	NM_032793	major facilitator superfamily domain containing 2A	5,71
MID2	NM_012216	midline 2	2,23
MIER1	NM_020948	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)	2,09
MLPH	NM_024101	melanophilin	10,85
MON1A	NM_032355	MON1 homolog A (yeast)	2,25
MPZL1	NM_003953	myelin protein zero-like 1	2,57
MREG	NM_018000	melanoregulin	2,91
MSI2	NM_170721	musashi homolog 2 (Drosophila)	2,22
MTHFD2L	NM_001004346	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	2,85
MYBPC3	NM_000256	myosin binding protein C, cardiac	2,53
N4BP3	NM_015111	NEDD4 binding protein 3	3,44
NCS1	NM_014286	neuronal calcium sensor 1	2,18
NEFM	NM_005382	neurofilament, medium polypeptide	5,15
NEURL	NM_004210	neuralized homolog (Drosophila)	2,68
NF2	NM_181831	neurofibromin 2 (merlin)	2,45
NIPA1	NM_144599	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1	2,06
NKD2	NM_033120	naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	2,49
NOL10	NM_024894	nucleolar protein 10	2,22
NOL6	NM_022917	nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	3,38
NOL9	NM_024654	nucleolar protein 9	2,05
NPPC	NM_024409	natriuretic peptide C	4,76
NPTX1	NM_002522	neuronal pentraxin I	3,26
NPTX2	NM_002523	neuronal pentraxin II	4,40
NUDCD1	NM_032869	NudC domain containing 1	2,20
NUFIP1	NM_012345	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1	2,11
OAF	NM_178507	OAF homolog (Drosophila)	2,48
OGFOD1	NM_018233	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1	2,27
OR7E156P	NR_002171	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 156 pseudogene	2,11
OTUD4	NM_199324	OTU domain containing 4	2,03
OXR1	AK096148	oxidation resistance 1	3,96
PAK1IP1	NM_017906	PAK1 interacting protein 1	2,65
PAQR3	NM_001040202	progesterin and adipoQ receptor family member III	2,15

PAQR5	NM_017705	progesterin and adipoQ receptor family member V	3,57
PCDH17	NM_001040429	protocadherin 17	2,93
PCDH8	NM_002590	protocadherin 8	2,56
PCGF5	NM_032373	polycomb group ring finger 5	4,03
PGBD5	NM_024554	piggyBac transposable element derived 5	4,65
PHF20L1	NM_198513	PHD finger protein 20-like 1	2,08
PHF21B	NM_138415	PHD finger protein 21B	2,34
PHLDA1	NM_007350	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	4,19
PHLDA2	NM_003311	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	5,02
PINX1	NM_017884	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1	2,20
PLEKHB2	NM_017958	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	2,31
PMAIP1	NM_021127	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2,66
PPP1R9A	NM_017650	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	2,24
PRDM15	BC067102	PR domain containing 15	2,27
PRR7	NM_030567	proline rich 7 (synaptic)	2,32
PSMD12	NM_002816	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	3,19
PTH LH	NM_198965	parathyroid hormone-like hormone	2,27
PVR	NM_006505	poliovirus receptor	3,16
PWP2	NM_005049	PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast)	2,31
PYGO1	AL049925	pygopus homolog 1 (Drosophila)	2,21
RAB43	NM_198490	RAB43, member RAS oncogene family	2,16
RABGEF1	NM_014504	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	2,19
RAD18	NM_020165	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	2,47
RAPH1	NM_213589	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	2,29
RASSF5	NM_182665	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	2,05
RBBP5	NM_005057	retinoblastoma binding protein 5	2,08
RBM18	NM_033117	RNA binding motif protein 18	2,21
RBM19	NM_016196	RNA binding motif protein 19	2,51
RBM24	NM_153020	RNA binding motif protein 24	2,22
RBMXL2	NM_014469	RNA binding motif protein, X-linked-like 2	5,98
RBPM5	NM_194272	RNA binding protein with multiple splicing 2	3,67
REEP1	NM_022912	receptor accessory protein 1	2,16
REEP3	NM_001001330	receptor accessory protein 3	2,47
RERE	NM_012102	arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	2,11
RGS16	NM_002928	regulator of G-protein signaling 16	3,04
RGS4	NM_005613	regulator of G-protein signaling 4	3,10
RHBDD1	NM_032276	rhomboid domain containing 1	2,35
RNF122	NM_024787	ring finger protein 122	2,55
RNF19A	NM_183419	ring finger protein 19A	2,17
RNF24	NM_007219	ring finger protein 24	2,65
RPF2	NM_032194	ribosome production factor 2 homolog (S. cerevisiae)	3,71
RPS26	NM_001029	ribosomal protein S26	5,37
RRP15	NM_016052	ribosomal RNA processing 15 homolog (S. cerevisiae)	3,31
RRP9	NM_004704	ribosomal RNA processing 9, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	2,61
S100A2	NM_005978	S100 calcium binding protein A2	3,12
SAMD8	NM_144660	sterile alpha motif domain containing 8	2,17
SCG3	NM_013243	secretogranin III	3,69
SDAD1	NM_018115	SDA1 domain containing 1	2,12
SELS	NM_018445	selenoprotein S	2,03
SERPINB2	NM_002575	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	35,45
SERPINB8	NM_198833	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8	16,79
SERPINE2	NM_006216	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	3,08
SGTB	NM_019072	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta	2,29

SH2B3	NM_005475	SH2B adaptor protein 3	3,82
SH2D4A	NM_022071	SH2 domain containing 4A	3,64
SH2D5	AK124869	SH2 domain containing 5	2,46
SH3BGR2	NM_031469	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	2,05
SH3PXD2A	NM_014631	SH3 and PX domains 2A	2,71
SLC16A14	NM_152527	solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)	2,34
SLC45A3	NM_033102	solute carrier family 45, member 3	2,82
SMC5	NM_015110	structural maintenance of chromosomes 5	2,18
SOCS4	NM_199421	suppressor of cytokine signaling 4	2,82
SOCS7	NM_014598	suppressor of cytokine signaling 7	2,41
SPAG1	NM_003114	sperm associated antigen 1	2,75
SPAG9	BC007524	sperm associated antigen 9	2,19
SPANXA2 (includes others)	NM_013453	SPANX family, member A2	4,96
SPANXN3	NM_001009609	SPANX family, member N3	8,78
SPINK1	NM_003122	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	2,67
SPINK7	NM_032566	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)	3,04
SPINT1	NM_003710	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	3,01
SPRED1	NM_152594	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	3,35
SPRY2	NM_005842	sprouty homolog 2 (Drosophila)	6,05
SPRY4	NM_030964	sprouty homolog 4 (Drosophila)	8,19
SRRD	NM_001013694	SRR1 domain containing	2,53
ST7	NM_018412	suppression of tumorigenicity 7	2,19
STAMBPL1	NM_020799	STAM binding protein-like 1	4,36
STARD13	NM_178006	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13	2,02
STC2	NM_003714	stanniocalcin 2	5,50
SVEP1	NM_153366	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	2,78
TAC1	NM_003182	tachykinin, precursor 1	27,41
TBRG1	NM_032811	transforming growth factor beta regulator 1	2,40
TCERG1L	NM_174937	transcription elongation regulator 1-like	2,08
TFPI	NM_001032281	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	2,05
TFPI2	NM_006528	tissue factor pathway inhibitor 2	73,39
THADA	NM_198554	thyroid adenoma associated	3,06
THBS2	NM_003247	thrombospondin 2	3,87
TIMP1	NM_003254	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	2,91
TJP1	NM_003257	tight junction protein 1 (zona occludens 1)	2,01
TMC7	NM_024847	transmembrane channel-like 7	2,45
TMEM138	NM_016464	transmembrane protein 138	2,24
TMEM22	NM_025246	transmembrane protein 22	3,42
TMEM33	NM_018126	transmembrane protein 33	3,56
TMEM79	NM_032323	transmembrane protein 79	3,11
TMEM88	NM_203411	transmembrane protein 88	2,50
TNFRSF12A	NM_016639	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	8,98
TNFRSF21	NM_014452	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	2,32
TNFRSF9	NM_001561	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	2,30
TOR1AIP2	NM_022347/ NM_145034	torsin A interacting protein 2	2,32/ 2,20
TRIM15	NM_033229	tripartite motif containing 15	2,81
TRMT6	NM_015939	tRNA methyltransferase 6 homolog (S. cerevisiae)	2,65
TSR1	NM_018128	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)	2,32
TTLL11	NM_194252	tubulin tyrosine ligase-like family, member 11	2,98
TTLL7	NM_024686	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	2,08
TUBA1C	NM_032704	tubulin, alpha 1c	2,09

TUBA4A	NM_006000	tubulin, alpha 4a	2,64
TUBB2A	NM_001069	tubulin, beta 2A	5,14
TUBB4	NM_006087	tubulin, beta 4	2,49
TUBB6	NM_032525	tubulin, beta 6	3,08
U2AF1L1	BC104811	zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 1	2,39
UBQLN1	NM_053067	ubiquilin 1	2,10
UBXN8	NM_005671	UBX domain protein 8	2,00
UFM1	NM_016617	ubiquitin-fold modifier 1	2,39
UTP11L	NM_016037	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)	2,37
UTP15	NM_032175	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)	4,57
UTP20	NM_014503	UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	2,50
VASN	NM_138440	vasorin	3,22
VMP1	BC024020	vacuole membrane protein 1	4,43
WDR35	NM_001006657	WD repeat domain 35	2,25
WDR36	NM_139281	WD repeat domain 36	3,43
WDR55	NM_017706	WD repeat domain 55	2,27
WNT10B	NM_003394	wingless-type MMTV integration site family, member 10B	2,07
WNT3A	NM_033131	wingless-type MMTV integration site family, member 3A	3,37
WNT6	NM_006522	wingless-type MMTV integration site family, member 6	6,45
XIAP	NM_001167	X-linked inhibitor of apoptosis	2,30
YRDC	NM_024640	yrdC domain containing (E. coli)	4,07
ZBTB24	NM_014797	zinc finger and BTB domain containing 24	3,50
ZBTB40	NM_014870	zinc finger and BTB domain containing 40	2,33
ZCCHC12	NM_173798	zinc finger, CCHC domain containing 12	25,39
ZCCHC2	BC006340	zinc finger, CCHC domain containing 2	2,86
ZFAND3	NM_021943	zinc finger, AN1-type domain 3	2,49
ZFAND5	NM_006007	zinc finger, AN1-type domain 5	2,38
ZNF121	NM_001008727	zinc finger protein 121	2,65
ZNF26	NM_019591	zinc finger protein 26	2,49
ZNF286A	NM_020652	zinc finger protein 286A	2,13
ZNF365	NM_014951	zinc finger protein 365	3,35
ZNF461	NM_153257	zinc finger protein 461	2,49
ZNF469	AB058761	zinc finger protein 469	3,52
ZNF540	NM_152606	zinc finger protein 540	3,24
ZNF641	NM_152320	zinc finger protein 641	3,18
ZNF649	NM_023074	zinc finger protein 649	2,18
ZNF697	NM_001080470	zinc finger protein 697	2,46

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1:	FAMILIEN DER REZEPTORTYROSINKINASEN (AUS BLUME-JENSEN & HUNTER, 2001).....	2
ABBILDUNG 1.2:	FAMILIEN DER NICHT-REZEPTORTYROSINKINASEN (NACH BLUME-JENSEN & HUNTER, 2001).	3
ABBILDUNG 1.3:	DIE AKTIVIERUNGSSCHLEIFE DES INSULIN REZEPTORS UND DES FIBROBLASTEN-WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTORS (AUS HUBBARD <i>ET AL.</i> , 1998).	5
ABBILDUNG 1.4:	SH2- UND PTB-DOMÄNEN ENTHALTENDE PROTEINE.....	7
ABBILDUNG 1.5:	HAUPTSIGNALKASKADEN VON RTKS.	8
ABBILDUNG 1.6:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MENSCHLICHEN NERVEN-WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTORS TRKA (MODIFIZIERT NACH BIBEL & BARDE, 2000).....	13
ABBILDUNG 1.7:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MENSCHLICHEN MAKROPHAGEN KOLONIESTIMULIERENDEN FAKTOR-REZEPTORS C-FMS (MODIFIZIERT NACH YEUNG & STANLEY, 2003).	15
ABBILDUNG 1.8:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REGULIERTEN INTRAMEMBRANPROTEOLYSE (RIP; MODIFIZIERT NACH SHAH <i>ET AL.</i> , 2005).....	17
ABBILDUNG 4.1:	EXPRESSION VON C-FMS UND CSF-1 IN KREBSZELLINIEN.	64
ABBILDUNG 4.2:	LOKALISATION VON ENDOGENEM C-FMS IN BEWo-ZELLEN IM KONVENTIONELLEN FLUORESZENZMIKROSKOP.	64
ABBILDUNG 4.3:	LOKALISATION VON ENDOGENEM C-FMS MITTELS KONFOKALER FLUORESZENZMIKROSKOPIE.	65
ABBILDUNG 4.4:	SPEZIFITÄT VON C-FMS-SPEZIFISCHEN BANDEN IN BEWo-ZELLEN.....	65
ABBILDUNG 4.5:	γ-SEKRETASE INHIBITOR COMPOUND E FÜHRT ZUR VERSTÄRKUNG DER B3 BANDE.....	66
ABBILDUNG 4.6:	LOKALISATION DER ZELLKOMPARTIMENTE DER SECHS C-FMS BANDEN.....	67
ABBILDUNG 4.7:	DARSTELLUNG DER FUSIONSPROTEINE FÜR C-FMS-ICD.	68
ABBILDUNG 4.8:	EXPRESSIONSÜBERPRÜFUNG DER C-FMS-ICD FUSIONSPROTEINE	68
ABBILDUNG 4.9:	GFP-C-FMS-ICD FUSIONSPROTEIN IST IM ZELLKERN NACHWEISBAR. ...	69
ABBILDUNG 4.10:	AUSSCHNITT DER AMINOSÄURESEQUENZ DES MENSCHLICHEN C-FMS PROTEINS.	70
ABBILDUNG 4.11:	KERNLOKALISATIONSÜBERPRÜFUNG VON C-FMS-ICD UND DEREN MUTANTEN.	71
ABBILDUNG 4.12:	C-FMS-ICD INDUZIERT SIGNALKASKADEN.	72
ABBILDUNG 4.13:	BEHANDLUNG MIT IMATINIB HEMMT C-FMS-ICD UND DESSEN SIGNALE.	73
ABBILDUNG 4.14:	VENN-DIAGRAMM VON HOCHREGULIERTEN GENEN IN C-FMS ÜBEREXPREMIERENDEN HEK293-ZELLEN NACH CSF-1 BEHANDLUNG FÜR 20 MINUTEN UND ACHT STUNDEN.....	74
ABBILDUNG 4.15:	EXPRESSIONSÜBERPRÜFUNG VON ΔTRKA IN HEK293-ZELLEN.....	78

ABBILDUNG 4.16:	TRKA IMMUNPRÄZIPITATION FÜR KINASE-ASSAY UND ENDO-H-BEHANDLUNG.....	79
ABBILDUNG 4.17:	NGF-STIMULATION VON WT-TRKA UND Δ TRKA IN NIH3T3-ZELLEN.	80
ABBILDUNG 4.18:	EXPRESSIONSNACHWEIS VON SH-SY5Y-ZELLEN MIT STABILER WT-TRKA UND LEERVEKTOR EXPRESSION.....	82
ABBILDUNG 4.19:	NGF-STIMULATION VON STABIL WT-TRKA-EXPRIMIERENDEN SH-SY5Y-ZELLEN FÜHRT ZU NEURITENAUSBILDUNG.	83
ABBILDUNG 4.20:	STIMULATION MIT NGF FÜHRT ZUR DIFFERENZIERUNG VON PC12-ZELLEN.....	84
ABBILDUNG 4.21:	TRANSIENT TRANSFIZIERTE PC12-ZELLEN EXPRIMIEREN Δ TRKA.	85
ABBILDUNG 4.22:	BASALE PHOSPHO-ERK1/2 AKTIVIERUNG DURCH Δ TRKA IN PC12-ZELLEN.....	86
ABBILDUNG 4.23:	NEURITENBILDUNG BEI Δ TRKA IN PC12-ZELLEN OHNE NGF-STIMULATION.	86
ABBILDUNG 4.24:	ÜBERPRÜFUNG DER NGF-STIMULATION IN STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN.....	88
ABBILDUNG 4.25:	VENN-DIAGRAMM VON HOCHREGULIERTEN GENEN VON STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN UND DEN MASTZELLEN HMC-1 NACH NGF-BEHANDLUNG.	89
ABBILDUNG 4.26:	VENN-DIAGRAMM VON HOCHREGULIERTEN GENEN VON STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-, HMC-1- UND PC12-ZELLEN.....	91
ABBILDUNG 5.1:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KONVENTIONELLEN C-FMS-WEGES UND EINES HYPOTHETISCHEN C-FMS-ICD WEGES IN KREBSZELLINIEN UND MAKROPHAGEN.	95
ABBILDUNG 5.2:	HYPOTHETISCHES KOMMUNIKATIONSMODELL ZWISCHEN EPITHELIALEN KREBSZELLEN UND MAKROPHAGEN DURCH AUTOKRINE UND PARAKRINE SIGNALÜBERTRAGUNG.....	98
ABBILDUNG 5.3:	VENN-DIAGRAMM VON HOCHREGULIERTEN GENEN VON C-FMS- BZW. STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN NACH CSF-1- BZW. NGF-BEHANDLUNG FÜR ACHT STUNDEN.....	102

8.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 4.1:	PANTHER ANALYSE DER HOCHREGULIERTEN GENE VON C-FMS EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN NACH ACHT STUNDEN STIMULATION MIT CSF-1 IM VERGLEICH ZU MAKROPHAGEN REGULIERTEN GENEN NACH SECHS STUNDEN CSF-1-STIMULATION AUS IRVINE ET AL. 2009 (AUSGEWÄHLTE DATEN).	76
TABELLE 4.2:	GEMEINSAM HOCHREGULIERTE GENE VON PC12-, HMC-1- UND STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN NACH NGF-INDUKTION (NACH IPA)	92
TABELLE 7.1:	LISTE VON HOCHREGULIERTEN GENEN NACH CSF-1-STIMULATION FÜR 20 MINUTEN IN HEK293-ZELLEN (NACH IPA)	119
TABELLE 7.2:	LISTE VON HOCHREGULIERTEN GENEN NACH CSF-1-STIMULATION FÜR ACHT STUNDEN IN HEK293-ZELLEN (NACH IPA).....	121
TABELLE 7.3:	LISTE VON HOCHREGULIERTEN GENEN NACH NGF-STIMULATION FÜR ACHT STUNDEN IN STABIL TRKA-EXPRIMIERENDEN HEK293-ZELLEN (NACH IPA)	125

8.3 Veröffentlichungen

8.3.1 Publikationen

Dutta P, Koch A, **Breyer B**, Schneider H, Dittrich-Breiholz O, Kracht M and Tamura T. (2011). Identification of novel target genes of nerve growth factor (NGF) in human mastocytoma cell line (HMC-1 (V560G c-Kit)) by transcriptome analysis. *BMC Genomics*, **12**, 196.

Koch A, Scherr M, **Breyer B**, Mancini A, Kardinal C, Battmer K, Eder M and Tamura T. (2008). Inhibition of Abl tyrosine kinase enhances nerve growth factor-mediated signaling in Bcr-Abl transformed cells via the alteration of signaling complex and the receptor turnover. *Oncogene*, **27**, 4678-89.

Niemann-Seyde S, **Breyer B**, Schneider H, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Tamura T, Koch A. Fms tyrosine kinase induces genes that are involved in inflammatory response in cancer cells, however these are different from those in macrophages.

In der Vorbereitung

8.3.2 Kurzbeiträge

Breyer B., Klebba-Färber S., Li Z., Meyer J., Tamura-Niemann T., Koch A.. (2009). Identification of novel binding partners of TrkA. *International Symposium: Signal Transduction and Disease*. Poster P9; DOI: 10.3288/contoo.paper.318. Trinational Fall Meeting 2009 of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology, Aachen 2009

8.4 Curriculum Vitae

Name:	Breyer
Vorname:	Björn
geboren am:	30. Juli 1979
in:	Hannover
Nationalität:	deutsch
Schulbildung:	
1992-1999	Elsa-Brändström-Schule, Gymnasium, Hannover Abitur
1990-1992	Peter-Petersen-Schule, Orientierungsstufe, Hannover
1986-1990	Peter-Petersen-Schule, Grundschule, Hannover
Wehrdienst:	
1999-2000	Wehrdienst, Luftwaffensicherungsstaffel Ahlhorn
Studium:	
01/2006	Diplom (<u>Note</u> : sehr gut)
03/2005 – 01/2006	Diplomarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover im Institut für Virologie bei Prof. Dr. Thomas. F. Schulz <u>Titel der Arbeit</u> : „Charakterisierung des 5' untranslatierten Bereiches des K15-Gens des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus“
10/2002 – 12/2005	Studium der Biologie an der Universität Hannover
Beruflicher Werdegang:	
seit 09/2007	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Teruko Tamura-Niemann zum Zwecke der Promotion
01/2006 – 03/2007	Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Virologie, Medizinische Hochschule Hannover
01/2005 – 03/2005	Betreuung von Studenten der Biologie im Kurs „Molekulargenetisches Grundpraktikum“, Universität Hannover
12/2002 – 01/2005	Studentische Hilfskraft bei der cell-pharm GmbH, Hannover
09/2002 – 02/2003	Betreuung von Studenten der Biologie im Kurs „Genetisch-Mikrobiologisches Grundpraktikum“, Universität Hannover

8.5 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**Identifizierung zelltypspezifischer Signale der Rezeptortyrosinkinasen c-Fms
und TrkA anhand von Transkriptomanalysen in Epithelzellen**

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 05.01.2012

Björn Breyer

8.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei allen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren bis zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Bei Prof. Dr. Teruko Tamura-Niemann möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Unterstützung, in jeglicher Hinsicht, bedanken.

Einen ganz herzlichen Dank richte ich an Prof. Dr. Walter Müller, der sich bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Alexandra Koch für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und ihre ständige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Danke für Deine außerordentlich gute Betreuung und ständige Bereitschaft für Fragen und Diskussionen zur Verfügung zu stehen.

Ein aufrichtiger Dank geht auch an Prof. Dr. Matthias Gaestel, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit fertig zu stellen.

Bei Dr. Oliver Dittrich-Breiholz, Heike Schneider und Thorsten Glomb möchte ich mich für die Unterstützung bei den Mikroarrays bedanken. Auch gilt mein Dank PD Dr. Zhixiong Li, Dr. Johann Meyer und Elke Barczak, die mir bei der Durchführung der retroviralen Infektion hilfreich zur Seite standen und vor allem durch die Bereitstellung der Konstrukte. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Mariano Barbacid, Dr. Martine Roussel und Dr. Gary Reuther, dass ich deren Konstrukte verwenden durfte. Auch für das herrliche Arbeitsklima unter den Kollegen der Physiologischen Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich meinen Dank aussprechen. Ein besonderer Dank meinerseits gilt dabei Sabine, Sheetal, Susanne, Hai und Shashank sowie den ehemaligen Kollegen Annalisa, Anuja, Priyanka und Omar. Sabine danke ich für ihre tägliche Unterstützung im Laboralltag und ihre positive Ausstrahlung. Susanne gilt ein großer Dank für die Bereitstellung der Konstrukte.

Für das Korrekturlesen möchte ich mich bei meinen drei fleißigen Engeln bedanken, dass ihr Euch die Zeit genommen habt. Weiterhin danke ich meinen Freunden für ihre moralische Unterstützung und die gelegentlichen Abwechslungen sowie für euer Verständnis, dass ich mich in letzter Zeit so rar gemacht habe.

Ein sehr spezieller Dank geht an meine Eltern, meine Schwester und alle, die mir am Herzen liegen, für jegliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.