

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Genetik

Charakterisierung der Signaltransduktion und Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der Krebsprogression

Christiane Stadler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. phil. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Alfons Gierl
2. Hon.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich
(Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Die Dissertation wurde am 20.12.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.04.2005 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung für Molekularbiologie in der Zeit vom 8. September 2001 bis 31. November 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl und Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich ausgeführt.

1. Gutachter: _____

Herr Prof. Dr. Axel Ullrich, Abteilung für Molekularbiologie,
Max-Planck-Institut für Biochemie

2. Gutachter: _____

Herr Prof. Dr. Alfons Gierl, Institut für Genetik der TU München

Erklärung:

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München vorgelegte
Dissertationsarbeit mit dem Titel:

Charakterisierung der Signaltransduktion und Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der Krebsprogression

angefertigt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich (MPI für Biochemie, Martinsried) und Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl (Institut für Genetik der TU München) ohne sonstige Hilfe verfasst und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

München, den

Christiane Stadler

**Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.**

Albert Einstein

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kontrolle der Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung	1
1.1.1	Struktur der Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2	Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)	3
1.1.3	Zytosolische Substrate von Rezeptortyrosinkinasen	4
1.1.4	Die Mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase Kaskade	5
1.1.5	Die Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) Rezeptorfamilie	7
1.1.6	Liganden der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren	8
1.1.7	Der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 4 (FGFR4)	11
1.2	Fehlregulation von FGFR-Signalwegen und Tumorentstehung	13
1.2.1	Menschliche Krankheitssyndrome und Mutationen in den FGFR-Genen	14
1.3	Proteintyrosinphosphatasen (PTPn)	16
1.3.1	Physiologische Funktion der Proteintyrosinphosphatase SHP-2	17
1.4	Der LPA Rezeptor Edg 2	18
1.5	Die Proteinkinase Akt/PKB	19
1.6	Zielsetzung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Bezugsquellennachweis	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Enzyme	22
2.1.3	Radiochemikalien	22
2.1.4	"Kits" und sonstige Materialien	22
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Liganden	23
2.1.6	Inhibitoren	23
2.1.7	Medien und Puffer	23
2.1.7.1	Medium für E. coli Bakterien	23
2.1.7.2	Zellkulturmedien	24
2.1.8	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	24
2.1.9	Tiere	26
2.1.10	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)	26
2.1.11	Zelllinien	26
2.1.12	Antikörper	27
2.1.13	Plasmide und Oligonukleotide	29
2.1.13.1	Ausgangsvektoren	29
2.1.13.2	Spezifizierte Vektoren	29
2.1.13.3	Oligonukleotide	31
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1	Plasmidaufreinigung für analytische Zwecke	33
2.2.2	Plasmidaufreinigung für präparative Zwecke	33
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Enzymatische Behandlung von DNA	33
2.2.4.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	33
2.2.4.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	34
2.2.4.3	Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase	34
2.2.4.4	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	34
2.2.5	Gelelektrophorese von DNA	34
2.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.6.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	35
2.2.6.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien	35
2.2.7	Gezielte Mutagenese von DNA	35
2.2.7.1	Herstellung von uracilhaltiger Einzelstrang-DNA	36
2.2.7.2	Phosphorylierung des spezifischen Oligonukleotids	36
2.2.7.3	Synthese des mutierten Stranges	36
2.2.8	Sequenzierung	37
2.2.9	Arbeiten mit RNA	37
2.2.9.1	Präparation von RNA	37
2.2.9.2	RT-PCR	38
2.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
2.2.10.1	Amplifikation von DNA- und cDNA Fragmenten	38
2.2.10.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	39
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	39
2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	39
2.3.2	Mycoplasmamentest	40
2.3.3	Kalziumphosphat-Transfektion	40
2.3.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz	41
2.3.5	Radioaktive Markierung von HEK 293 Zellen	41
2.3.6	Retroviraler Gentransfer in humane Brustkrebszellen (MDA-MB-231)	41
2.4	Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper	42
2.4.1	Isolierung von Antigen zur Produktion polyklonaler Antikörper in Kaninchen	42
2.4.2	Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen	42
2.4.3	Affinitätsreinigung des Serums	42
2.4.3.1	Präparation der CNBr aktivierten Sepharose	43
2.4.3.2	Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie	43
2.5	Methoden zur Bearbeitung und Analyse von Proteinen	43
2.5.1	Expression und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	43
2.5.2	Dialyse von GST-Fusionsproteinen	44
2.5.3	Expression und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins in HEK 293 Zellen	44
2.5.4	Expression und Aufreinigung eines Histag-Proteins in HEK 293 Zellen	45
2.5.5	Stimulation und Triton X100-Lyse von eukaryontischen Zellen	46
2.5.6	Quantitative Proteinbestimmung	47
2.5.6.1	Proteinbestimmung mit dem "Micro BCA Protein Assay Kit"	47
2.5.7	Immunpräzipitation von Proteinen	47
2.5.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.5.9	Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	49
2.5.10	Western-Blot-Analyse	49
2.5.10.1	Vertikaler Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	49
2.5.10.2	Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran	50
2.5.10.3	Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	50
2.6	Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen	51
2.6.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine	51
2.6.2	Wundheilungsexperiment	51
2.6.3	Migrations- und Invasionstest	52
2.6.3.1	Migration	52
2.6.3.2	Invasion	52

2.6.3.3	Färben der Polykarbonatmembran	53
2.6.4	Fokusbildungstest	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Bedeutung und Expression des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus	54
3.1.1	Expression des FGFR4 in Brustkrebszelllinien auf mRNA-Ebene	55
3.1.2	Expression des FGFR4 auf Proteinebene	56
3.2	Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4	58
3.3	Herstellung und Test FGFR4-spezifischer FGF-Liganden	61
3.3.1	FGF8b-GST	62
3.3.2	FGF-19 myc-6xHis	63
3.4	Untersuchungen zur Signaltransduktion des FGF Rezeptors 4	65
3.4.1	VSV-pull down in HEK 293 Zellen	66
3.4.1.1	FGFR4-Konstrukte	66
3.4.2	Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern durch radioaktive Markierung	68
3.4.3	Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern durch Tyrosinphosphorylierung	70
3.4.4	Endogene FGFR4-Interaktionen	72
3.4.4.1	SHP-2 bindet an aktivierten FGFR4	73
3.4.5	Einfluss der PTP SHP-2 auf die Phosphorylierung des FGFR4	75
3.4.6	FGFR4 interagiert mit PLC γ	77
3.4.6.1	PLC γ bindet an Y754 des FGFR4	77
3.4.6.2	PLC γ bindet nur an aktiven FGFR4	78
3.5	FGFR-Heterodimerbildung	79
3.6	FGFR4 R388 besitzt kein onkogenes Potential	83
3.7	FGFR4 Gly388 zeigt Eigenschaften eines Tumorsuppressors in MDA-MB-231 Zellen	85
3.7.1	FGFR4-Expression in stabilen MDA-MB-231/FGFR4-Zelllinien	85
3.7.2	FGFR4 G388 hat einen suppressiven Effekt auf die Edg 2 Expression in MDA-MB-231 Zellen	86
3.7.3	Durch FGFR4 G388 wird die Akt-Kinase über einen alternativen Signalweg aktiviert	87
3.7.3.1	Wortmannin verhindert die EGF und LPA-induzierte Akt-Phosphorylierung	90
3.7.3.2	FGFR4 R388-Inaktivierung verringert die LPA-induzierte Akt-Phosphorylierung	91
3.7.4	Verstärkte EGFR-Aktivierung in MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen	93
3.7.5	FGFR4 G388 zeigt einen inhibierenden Effekt in Zell-physiologischen Untersuchungen	94
3.7.5.1	FGFR4 G388 blockiert die Migration	94
3.7.5.2	FGFR4 G388 inhibiert den LPA-induzierten Wundheilungsprozess	97
3.7.5.3	FGFR4 G388 blockiert die Invasion	100
3.7.5.4	FGFR4 G388 verhindert die Ausbildung von Ausläufern in der Matrigel-Matrix	101
4	DISKUSSION	103
4.1	Bindungspartner des FGFR4	103
4.2	FGFR Heterodimere	107
4.3	FGFR4 R388 wirkt nicht als Onkogen im Fokusbildungstest	108
4.4	FGFR4 G388 vermindert die Edg 2 Genexpression in MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien	109
4.5	Die Akt/PKB-Aktivierung in FGFR4 G388 und R388 exprimierenden MDA-MB-231 Zelllinien ist von unterschiedlichen Stimuli abhängig	110

Inhaltsverzeichnis

4.6	FGFR4 G388 wirkt <i>in vitro</i> als Suppressor in Tumor-physiologischen Untersuchungen	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
	CURRICULUM VITAE	138
	DANKSAGUNG	139

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Schematische Darstellung der Proteinphosphorylierung
Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen RTK-Familien
Abb. 3: Ras/MAP Kinase Signalkaskade über FGF Rezeptoren
Abb. 4: Kristallographisches Modell des FGF-2-FGFR1-Heparin Komplexes
Abb. 5: Schematische Darstellung des FGFR4
Abb. 6: Keimbahnmutationen in den FGF Rezeptoren 1, 2 und 3
Abb. 7: Vektorkarte des pSecTag-Vektors (Invitrogen)
Abb. 8: Chemilumineszenzreaktion des ECL-Systems
Abb. 9: Schematische Darstellung von RTK Transmembrandomänen
Abb. 10: cDNA-Filteranalyse der Genexpression des FGFR4 in verschiedenen Brustkrebszelllinien
Abb. 11: Endogene FGFR4-Expression in verschiedenen Brustkrebszelllinien und HEK 293-Zellen
Abb. 12: Die höchste MW-Bande des FGFR4 repräsentiert den membranständige Rezeptor
Abb. 13: Das FGFR4(Ex)-GST Fusionsprotein nach der FPLC-Aufreinigung
Abb. 14: Test des polyklonalen α FGFR4(Ex)1171-Antikörpers
Abb. 15: Test des polyklonalen α FGFR4(Ex)1171-Antikörpers nach der Reinigung über Affinitätschromatographie
Abb. 16: Test des polyklonalen Antikörpers FGFR4(Ex) 1171 in der Western-Blot-Analyse
Abb. 17: Aktivitätstest des Liganden FGF8b-GST in MDA-MB-231/FGFR4- und \sim /pLXSN-Zellen
Abb. 18: Test der HEK 293/FGF-19 myc-6xHis Klone
Abb. 19: FGF-19 myc-6xHis nach der Aufreinigung über FPLC
Abb. 20: Aktivitätstest und -vergleich des Liganden FGF-19 myc-6xHis
Abb. 21: Schematische Darstellung der verwendeten FGFR4-Konstrukte
Abb. 22: Detektion von Interaktionspartnern des FGFR4 mittels L-[³⁵S]-Methionin Markierung von HEK 293 Zellen und VSV-pull down
Abb. 23: FGFR4-VSV-pull down in HEK 293 Zellen zur Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern
Abb. 24: Rotiblu-Färbung zur Proteinsequenzierung mittels MALDI-TOF
Abb. 25: Endogene Interaktion von FGFR4 und SHP-2 in MDA-MB-453-Brustkrebszellen
Abb. 26: SHP-2 dephosphoryliert den FGF Rezeptor 4 im Überexpressionssystem
Abb. 27: Die Interaktion zwischen PLC γ und FGFR4 erfolgt über Y754 des FGFR4
Abb. 28: Die Bindung von PLC γ an FGFR4 findet nur bei aktivem Rezeptor statt.
Abb. 29: FGFR4 bildet Heterodimere mit FGFR1, 2 und 3 über die extrazelluläre Domäne
Abb. 30: FGFR4 R388 wirkt nicht als Onkogen im Fokusbildungstest
Abb. 31: FGFR4-Expression in MDA-MB-231/FGFR4 Klonen
Abb. 32: Reduzierter Edg 2-mRNA-Level in MDA-MB-231/FGFR4 G388 Klonen
Abb. 33: FGFR4- und Edg 2-mRNA-Level in stabilen FGFR4 G388 und R388 Klonen verschiedener Zelllinien
Abb. 34: In MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen wird Akt ausschließlich über EGF-Stimulation aktiviert.
Abb. 35: Akt-Aktivierung durch LPA in MDA-MB-231/pLXSN und FGFR4 R388-Zellen lässt sich durch Wortmannin inhibieren.
Abb. 36: Durch Inhibierung von FGFR4 R388 wird die Akt-Aktivierung gehemmt.

Abb. 37: In FGFR4 G388-Zellen wird EGFR stärker phosphoryliert.

Abb. 38: FGFR4 G388 inhibiert die Migration von stabilen MDA-MB-231 Zellen

Abb. 39: FGFR4 G388 blockiert die LPA-stimulierte Migration von MDA-MB-231 Zellen
im Wundheilungsexperiment

Abb. 40: FGFR4 vermindert die Invasivität von stabilen MDA-MB-231 Zellen

Abb. 41: FGFR4 G388 blockiert den Auswuchs von MDA-MB-231 Zellen auf einer Matrigel-
Matrix

Tabelle 1: FGF-Liganden und ihre Rezeptorspezifität

1 Einleitung

Zur Entwicklung eines vielzelligen Organismus und der Erhaltung seiner individuellen Lebensfunktionen muss die Möglichkeit der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen gewährleistet sein. Dies geschieht, indem interzelluläre Signale in intrazelluläre Signaltransduktionswege umgesetzt werden. Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung, -migration, -metabolismus, Adhäsion und Apoptose gehören zu den auf diese Weise regulierten Mechanismen.

Liganden in löslicher oder auch gebundener Form leiten durch ihre Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalweiterleitungskaskaden ein und regulieren so die Genexpression und die davon abhängigen physiologischen und biochemischen Prozesse. Eine der Hauptklassen dieser Zelloberflächenrezeptoren bilden die Rezeptortyrosinkinasen (RTKn), deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität äußerst bedeutend für die Signalübertragung extrazellulärer Stimuli in die Zelle ist (van der Geer *et al.*, 1994). Extrazelluläre Signale werden sowohl von transmembranständigen als auch zytoplasmatischen Tyrosinkinasen durch die Phosphorylierung einer Vielzahl zellulärer Substrate bis zum Zellkern weitergeleitet.

Das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Apoptose ist ein empfindliches System, bei dem Fehlfunktionen nur eines Kettenglieds dramatische Folgen haben können. Bei der Entstehung von Krankheiten mit unkontrolliertem Wachstum wie Krebs spielen fehlende negativ-regulatorische Mechanismen oder fehlerhafte Signalübertragungswege eine Rolle. Daran lässt sich die Bedeutung der exakten Einhaltung dieser Signalweiterleitungsprozesse für die zelluläre Kommunikation ersehen (Alroy and Yarden, 1997; Laird and Shalloway, 1997).

1.1 Kontrolle der Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung

Proteine können durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert bzw. deaktiviert werden. Die Phosphatgruppen werden von ATP auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin übertragen. Die dazu erforderlichen Enzyme sind die Proteinkinasen. Die wichtigste Gruppe der Proteinkinasen sind die Proteintyrosinkinasen. Obwohl der Gehalt an tyrosinhaltigen Phosphoproteinen in der Zelle sehr gering (ca. 0,1 %) ist, und der Hauptteil der Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten stattfindet, kommt den Proteintyrosinkinasen eine hohe Bedeutung in Bezug auf die Regulation von Prozessen wie Proliferation, Differenzie-

rung, Zelladhäsion und Zellzykluskontrolle zu (Hunter, 1995; Hunter and Sefton, 1980). Der Wirkungsmechanismus der Rezeptortyrosinkinasen besteht in der reversiblen Phosphorylierung von Tyrosinresten an der phenolischen Hydroxyl-Gruppe. Durch das in Abbildung 1 dargestellte ausgewogene Zusammenspiel von Proteintyrosinkinasen (PTKn) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPn), die Phosphat von Tyrosinresten entfernen, (Streuli, 1996; Sun and Tonks, 1994) wird die spezifische reversible Tyrosinphosphorylierung genauestens kontrolliert.

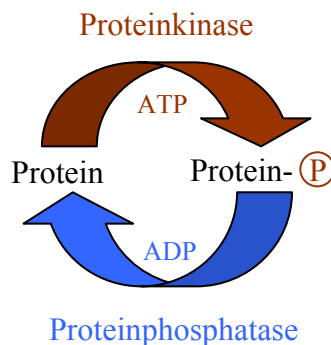


Abb. 1: Schematische Darstellung der Proteinphosphorylierung

1.1.1 Struktur der Rezeptortyrosinkinasen

Proteintyrosinkinasen werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe stellen die zytosolischen Tyrosinkinasen dar, die sich ausschließlich im Zytoplasma befinden (SRC- und JAK-Familie) und dort mit Proteinen, die an der Zellmembran lokalisiert sind, reagieren. Die zweite Gruppe umfasst Transmembranproteine, die sog. Rezeptortyrosinkinasen. Letztere Gruppe wird im Folgenden eingehender behandelt.

Die Rezeptortyrosinkinasen bilden eine Familie von mehr als 50 verschiedenen Transmembranproteinen mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne. Alle Mitglieder haben eine ähnliche Topologie aus drei miteinander verbundenen Domänen. Dem meist aminoterminal-glykosylierten, extrazellulären Teil folgt eine einzelne hydrophobe Transmembranhelix, die die Verbindung zum intrazellulären carboxyterminalen Bereich der Proteine schafft, welcher das enzymatisch aktive Zentrum birgt. Die größten strukturellen Varianzen zwischen den verschiedenen Familienmitgliedern liegen in der extrazellulären Domäne, die für die Spezifität der Ligandenbindung sorgt. Diese unterschiedlichen Bereiche dienen auch als Grundlage zu

einer Klassifizierung in 20 Unterfamilien, (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Plowman *et al.*, 1993; van der Geer *et al.*, 1994) die in Abbildung 2 dargestellt sind.

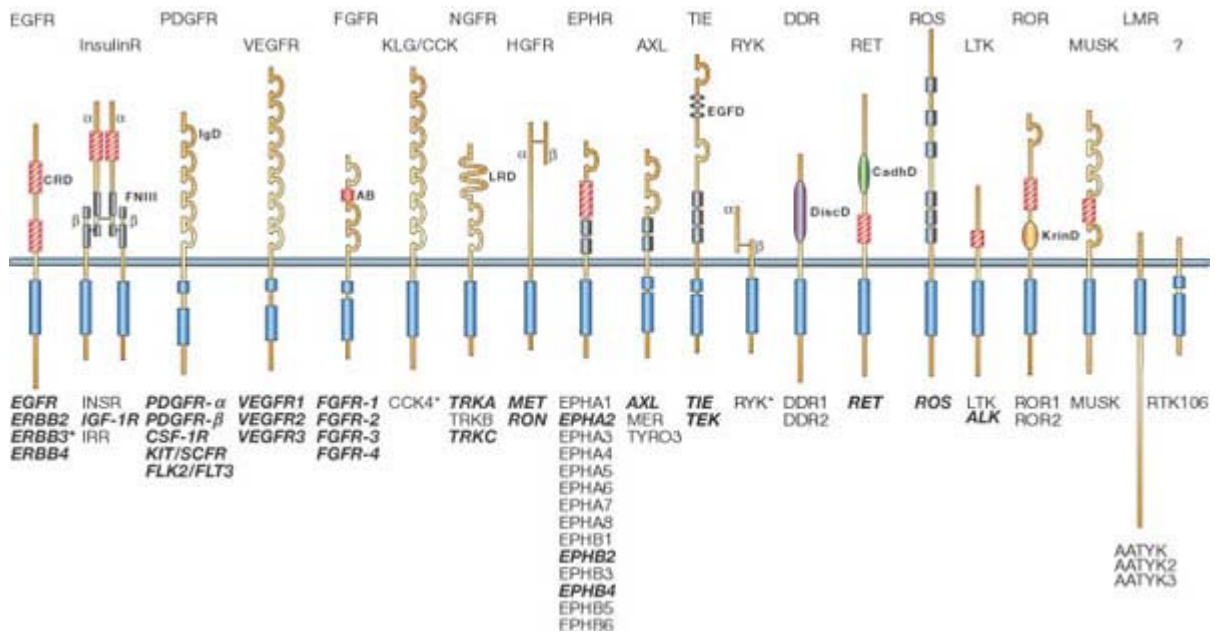


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen RTK-Familien

Die Abbildung zeigt 20 Unterfamilien, in welche Rezeptortyrosinkinasen aufgrund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (Blume-Jensen und Hunter 2001).

Die zytoplasmatischen Anteile, die aus der Juxtamembranregion, der Kinasedomäne und dem carboxyterminalen Bereich zusammengesetzt sind, zeigen weitaus geringere Unterschiede zwischen den Transmembranrezeptoren als die extrazellulären Domänen. Der intrazelluläre Teil setzt sich aus einer hochkonservierten Tyrosinkinasedomäne von ca. 250-300 Aminosäuren zusammen, die über eine ATP-Bindungsstelle verfügt. Dieses aktive Zentrum ist nach Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung für die Katalyse der Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der intrazellulären Domäne sowie der Tyrosinphosphorylierung von zellulären RTK-Substraten verantwortlich. Eine mögliche Variation innerhalb der Kinasedomäne ist eine Modifikation durch eine Insertionssequenz, wie sie z.B. bei der PDGF Rezeptorfamilie (*plateled derived growth factor*) vorliegt (Malarkey *et al.*, 1995). Weiterhin weisen die RTKs einen carboxyterminalen Bereich niedriger Homologie auf, der meist mehrere Autokatalysierungsstellen beinhaltet.

1.1.2 Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)

Der erste Schritt der Signalübertragung durch RTKs ist die Bindung des jeweiligen Liganden an seinen Rezeptor. Der Liganden-induzierten Konformationsänderung folgt in der Regel eine

Dimerisierung zweier Rezeptormonomere, wodurch die Transphosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste ermöglicht wird. Die Phosphorylierungsstellen liegen dabei häufig außerhalb der katalytischen Domäne am Carboxyterminus des Polypeptids und fungieren somit als mögliche Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine. Die Bindung zytosolischer Proteine an tyrosinphosphorylierte Proteinmotive stellt oftmals den initialen Schritt intrazellulärer Signalkaskaden dar (Songyang *et al.*, 1993).

Nach der Autophosphorylierung findet eine zweite Konformationsänderung statt, die der katalytischen Domäne die Möglichkeit bietet, verschiedene Substratmoleküle zu phosphorylieren (Lemmon and Schlessinger, 1994; Ullrich and Schlessinger, 1990).

Neben der Liganden-induzierten Aktivierung können RTKs auch ligandenunabhängig aktiviert werden. In den letzten Jahren wurde diese Transaktivierung von Transmembranproteinen, wie z.B. dem EGF Rezeptor (Daub *et al.*, 1996) und dem PDGF Rezeptor (Linseman *et al.*, 1995) nach Aktivierung G Protein-gekoppelter-Rezeptoren nachgewiesen. Außerdem kann auch die Inaktivierung von Proteintyrosinphosphatasen ausreichen, um die Tyrosinphosphorylierung von RTKs einzuleiten (Jallal *et al.*, 1992).

Innerhalb einer Unterfamilie können neben Homodimeren auch Heterodimere gebildet werden (Lemmon and Schlessinger, 1994), wie am Beispiel der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptorfamilie gezeigt wurde (Wallasch *et al.*, 1995). Für die Familie der FGF (*fibroblast growth factor*)-Rezeptoren wurde lediglich eine Homodimerisierung vorgeschlagen, während eine Heterodimerisierung der FGF-Liganden gezeigt werden konnte (DiGabriele *et al.*, 1998).

1.1.3 Zytosolische Substrate von Rezeptortyrosinkinasen

Nach ihrer Aktivierung initiieren RTKs durch Assoziation und Phosphorylierung von spezifischen Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden und geben dadurch den externen Stimulus an zytoplasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiter. Die Bindung von interagierenden Proteinen erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste über SH2 (*src-homology 2*)-Domänen (Mayer and Baltimore, 1993; Pawson, 1995) oder auch an PTB (*phosphotyrosine binding*) Bindungsmotive (Kavanaugh *et al.*, 1995). Die Selektivität dieser Interaktionen wird hierbei durch die SH2- oder PTB-Domäne und die das phosphorylierte Tyrosin umgebenden Aminosäuren bedingt (Songyang *et al.*, 1993; van der Geer and Pawson, 1995). Weiterhin besitzen viele Signalproteine auch SH3 (*src-homology 3*)-Domänen, welche an Prolin-reiche Regionen in Proteinen binden können (Yu *et al.*, 1994). Ein wichtiger Vertre-

ter der Signalproteine, die z.B. bei der mitogenen Signalübertragung von Bedeutung sind, ist das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*) (Lowenstein *et al.*, 1992). Mit Hilfe seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTKs wie beispielsweise dem EGFR aber auch mit Phosphotyrosinen von anderen Adapterproteinen wie SHC (*SH2-domain containing*) und Gab1 (*Grb2-associated binder-1*) interagieren. Über seine SH3 Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotidaustauschfaktor SOS (*son of sevenless*), wodurch nach Rezeptoraktivierung SOS zur Zellmembran in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras wandert (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Der von SOS katalysierte GTP/GDP-Austausch von Ras führt zu dessen Aktivierung, was eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation besitzt (Downward, 1997).

Ein anderes Adapterprotein, das besonders in der Signaltransduktion durch FGF Rezeptoren eine wichtige Funktion besitzt, ist das myristylierte, membranassoziierte SNT-1/FRS2 (*suc1-associated neurotrophic factor target 1/ FGF Rezeptor Substrat 2*) (Kouhara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). Nach Aktivierung von SNT-1/FRS2 durch den FGFR1 bindet Grb2 an SOS, das wiederum Ras zum FGFR1 rekrutiert. Auf diese Weise wird das FGFR vermittelte Signal an den Ras/MAP-Kinase Signalweg gekoppelt (Kouhara *et al.*, 1997).

Die Phosphatidyl-Phosphatase PLC γ (**Phospholipase C- γ**) ist ein weiteres Signalmolekül, das in der FGFR Signalkaskade von Bedeutung ist. Aktivierte PLC γ hydrolysiert Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphate zu den sekundären Signalvermittlern, dem sog. "*second messenger*", Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) sowie 1,2-Diacylglycerin (DAG). Die PLC γ wurde als ein 150 kDa Phosphoprotein identifiziert, das spezifisch nach Stimulation durch FGF-1 an den FGFR1 bindet (Burgess *et al.*, 1990). Die Bedeutung der PLC γ -Aktivierung durch FGF ist aber noch nicht genau bekannt, da eine FGFR-Mutante, die nicht mehr mit PLC γ interagieren kann, keine veränderten biologischen Eigenschaften zeigt (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994).

1.1.4 Die Mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase Kaskade

Die MAP-Kinasen stellen Bestandteile der Signaltransduktionskaskaden dar, die auf eine Reihe extrazellulärer Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Ernährungszustand, Streß oder induzierende Signale reagieren. Diese Kaskaden bestehen aus hochkonservierten Modulen, in denen eine MAP-Kinase durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten, denen eine Aminosäure zwischengeschaltet ist (T-X-Y), aktiviert wird. Die Phosphorylierung wird von der zweifach spezifischen MAP-Kinase Kinase (MEK oder MKK) ausgeführt, die wiederum von einer

MEK-Kinase aktiviert wird. Bisher konnten zehn Mitglieder der MAP-Kinase Familie in Säugerzellen identifiziert werden (Keyse, 1998).

Nach der Stimulation von RTKs spielt die Grb2/SOS-vermittelte Aktivierung von Ras eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort (Downward, 1997). Membranassoziertes und aktiviertes Ras führt zur Interaktion mit der Serin/Threoninkinase Raf-1 und somit zur Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran, wodurch Raf-1 phosphoryliert und aktiviert wird (Barnard *et al.*, 1998; Morrison and Cutler, 1997). Anschließend werden die Threonin/Tyrosinkinase MEK1 und MEK2 (MAP/ERK Kinasen 1 und 2) durch aktiviertes Raf-1 an spezifischen Serinresten phosphoryliert, wodurch diese aktiviert werden und nachfolgend die MAP Kinasen (*mitogen activated protein*) ERK1 und ERK2 aktivieren. Diese werden durch Tyrosin- und Threoninphosphorylierung des regulatorisch wichtigen TEY-Motivs modifiziert (Robinson and Cobb, 1997) und wandern daraufhin in den Zellkern, wo sie zahlreiche Transkriptionsfaktoren an Serinresten phosphorylieren (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Robinson and Cobb, 1997). Die MAP-Kinase Kaskaden gewährleisten damit eine effiziente Signalübermittlung von der Zellmembran zum Nukleus und führen zur dortigen Regulation der Genexpression. In Abbildung 3 ist diese Mehrkomponentenkaskade nach Stimulation von FGF Rezeptoren dargestellt.

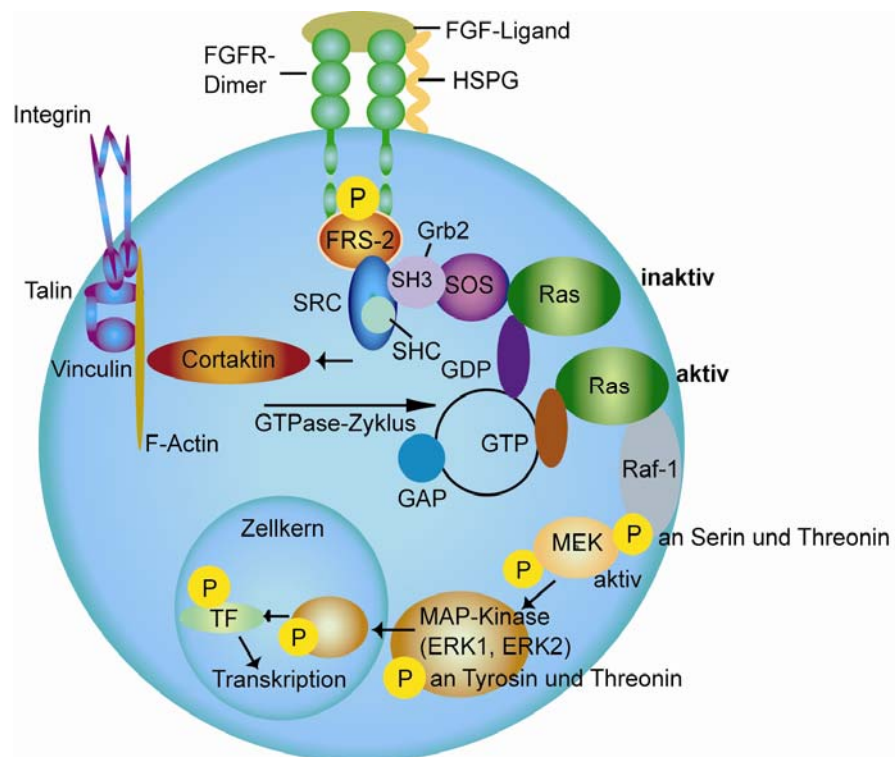


Abb. 3: Ras/MAP Kinase Signalkaskade über FGF Rezeptoren

Parallel zur ERK/MAP Kinase Kaskade gibt es in höheren eukaryontischen Systemen noch andere MAP Kinase Kaskaden, die je nach Stimulus die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen. Es handelt sich dabei um die zu den ERK1 und ERK2 homologen Kinasen JNK1 und JNK2 (c-jun N-terminale Kinase 1 und 2) und die nach ihrem scheinbaren Molekulargewicht bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Die Aktivierung der ERK und JNK MAP Kinase Kaskaden führt innerhalb kürzester Zeit zur Transkription der sogenannten *immediate early* Gene c-fos und c-jun, welche für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen von großer Bedeutung sind.

1.1.5 Die Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) Rezeptorfamilie

Zur Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren (FGFRn) gehören die vier Oberflächenrezeptoren FGFR1, (Dionne *et al.*, 1990) FGFR2, (Dionne *et al.*, 1990) FGFR3 (Keegan *et al.*, 1991) und FGFR4 (Partanen *et al.*, 1991). Die untereinander verwandten Proteine besitzen eine gemeinsame Struktur und bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindenden Domäne mit drei Immunglobulin-ähnlichen Schleifen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Region, die zwei katalytische Tyrosinkinasedomänen trägt. Die FGFRn sind an der Regulation von unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Migration oder Zellwachstum beteiligt.

Die Liganden, die diese Rezeptoren aktivieren, gehören der FGF-Familie an. Diese strukturell verwandten und Heparin-bindenden Polypeptide können als Mitogene wirken und unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen.

Die FGF-FGFR Interaktionen sind sehr komplex. Jeder Rezeptor hat die Fähigkeit, mehrere Liganden mit unterschiedlicher Affinität zu binden (Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Vainikka *et al.*, 1994). Außerdem sind Heparansulfatproteoglykane, die sich entweder auf der Oberfläche der Zelle oder in der extrazellulären Matrix befinden, essentiell für die Bindung von FGF-1 und FGF-2 an ihre Rezeptoren (Givol and Yayon, 1992).

Die extreme Vielseitigkeit der möglichen Signalwege wird u.a. durch die Existenz von mehreren Rezeptor-Isoformen des FGFR1, FGFR2 und FGFR3 möglich (Champion-Arnaud *et al.*, 1991; Dionne *et al.*, 1990; Hou *et al.*, 1991; Miki *et al.*, 1992). Diese Isoformen werden durch alternatives mRNA-Spleißen hervorgerufen. Auf diese Weise können durch transkriptionelle Kontrolle viele Rezeptorproteine mit strukturellen Permutationen in der extrazellulären, der

Juxtamembran- oder der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne erzeugt werden (Givol and Yayon, 1992). Ferner wurden für die Isoformen von FGFR1 und FGFR2 verschiedene biologische Funktionen vorgeschlagen. Beispielsweise wurden Spleißvarianten identifiziert, die verschiedene Liganden binden (Champion-Arnaud *et al.*, 1991; Miki *et al.*, 1992). Somit können Zellen durch gewebespezifisches RNA-Spleißen unterschiedliche Isoformen generieren, die verschiedene Funktionen oder Spezifitäten für Liganden ausüben.

Es gibt Anzeichen, dass Mitglieder der FGF Rezeptorfamilie sowie ihre Liganden in einigen Tumortypen von Bedeutung sind. Sie sind involviert in Prozesse des Tumorwachstums und der Gefäßneubildung (Angiogenese) von Tumoren (Bikfalvi *et al.*, 1997; Fernig and Gallagher, 1994). Neben seinem starken angiogenetischen Effekt wirkt FGF-2 auch als Mitogen für viele mesodermale und ektodermale Zellen (Burgess and Maciag, 1989). Interessanterweise zeigte sich in Plattenepithelkarzinomen aus der Kopf- und Halsregion eine erhöhte Expression der durch FGF-2 spezifisch aktivierten FGF Rezeptoren 1 und 2. In Brustkrebszellen werden diese beiden Rezeptoren ebenfalls in hohen Mengen exprimiert (Penault-Llorca *et al.*, 1995). Weiterhin konnte auch eine Amplifikation der FGFR1-, 2- und 3-Gene in Brustkrebs nachgewiesen werden (Adnane *et al.*, 1991).

1.1.6 Liganden der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren

In den letzten Jahren hat sich die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) als die wahrscheinlich größte Familie unter den Peptid-Wachstumsfaktoren herausgestellt. Bis heute konnten 23 verschiedene Mitglieder (FGF-1-23) dieser Familie in menschlichen Geweben identifiziert werden (Xie *et al.*, 1999). Die Funktionen der FGFs reichen von der Stimulierung des Wachstums einer großen Anzahl von Zelltypen bis zur Wirkung als Angiogenese Faktoren und neurotrophische Liganden.

Die Gruppe der FGF-Liganden gehört zur Klasse der monovalenten Moleküle, die nur jeweils ein Rezeptormolekül binden können (Schlessinger *et al.*, 1995). Es hat sich zudem gezeigt, dass FGF seine entsprechenden Rezeptoren nur aktivieren kann, wenn lösliches oder membrangebundenes Heparin zusätzlich vorhanden ist (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Studien zur Kristallstruktur des FGF-Heparin-Rezeptor Komplexes haben ergeben, dass - wie in Abbildung 4 gezeigt - Heparin FGF-Moleküle binden kann und auf diese Weise eine Brücke zwischen zwei FGF Rezeptoren herstellt (Plotnikov *et al.*, 2000).

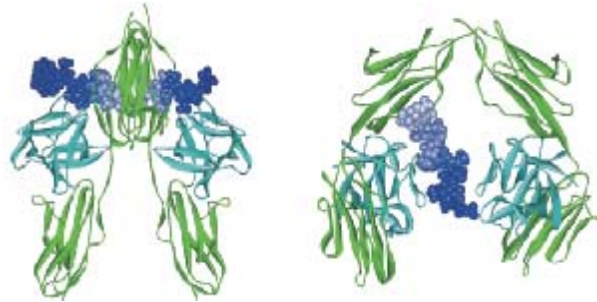


Abb. 4: Kristallographisches Modell des FGF-2-FGFR1-Heparin Komplexes
 FGFR ist in grün, FGF in zyan und Heparin in blau dargestellt (nach Pellegrini 2001).

Die am besten charakterisierten Mitglieder, die auch als erste entdeckt wurden, sind FGF-1 (aFGF) (Jaye *et al.*, 1986) und FGF-2 (bFGF) (Abraham *et al.*, 1986). Ihre regulatorische Funktion während der embryonalen Entwicklung und in physiologischen Prozessen wie der Angiogenese oder Wundheilung, war in den letzten Jahren von starkem Interesse. Sie zeigen die größte Expressionsbreite in den verschiedenen menschlichen Gewebetypen. In der Zwischenzeit sind sowohl FGF-1 als auch FGF-2 aus einer Reihe von verschiedenen Geweben isoliert worden und es konnte gezeigt werden, dass sich das mitogene Potential beider Faktoren auf eine große Anzahl verschiedener Zelltypen erstreckt (Burgess and Maciag, 1989). Besonders interessant ist, dass beide Faktoren beim Wachstum und auch bei der Steuerung der Wanderungseigenschaften von Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen (Burgess and Maciag, 1989; Folkman and Klagsbrun, 1987). Beides sind Prozesse, die der Neubildung von Blutgefäßen zugrunde liegen, und daher für die Versorgung eines wachsenden Tumors essentiell sind. Weiterhin besitzen weder FGF-1 noch FGF-2 ein Signalpeptid, welches für die klassischen sekretorischen Prozesse in der Zelle notwendig ist (Bugler *et al.*, 1991; Jaye *et al.*, 1986). Ein weiterer Unterschied zu anderen Liganden der RTK-Familie sind nukleäre Translokationssignale in der Aminosäuresequenz von FGF-1 und FGF-2 (Bugler *et al.*, 1991; Imamura *et al.*, 1990), die für die mitogenen Eigenschaften von FGF-1 von grundlegender Bedeutung sind (Imamura *et al.*, 1990).

Ein weiterer Fibroblasten Wachstumsfaktor ist FGF-3 (INT-2), dessen Gen ursprünglich als bevorzugte Insertionsstelle für den MMTV-Virus identifiziert wurde (Goldfarb *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 1986). FGF-3 scheint hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert zu werden und konnte bisher nicht in normalem ausdifferenziertem Gewebe nachgewiesen werden (Stamp *et al.*, 1992). FGF-4 und FGF-6 (K-FGF, HST) wurden bei der Suche nach Genen aus Magentumoren und Kaposi-Sarkomen, die NIH3T3 Zellen transformieren können,

entdeckt (Taira *et al.*, 1987). Die genaue biologische Funktion ist noch nicht bekannt. Auch FGF-5 wurde bei der Suche nach Tumorgenen gefunden, die NIH3T3 Zellen transformieren können (Zhan *et al.*, 1988), während FGF-7 (KGF) als wichtiges Mitogen für Keratinozyten identifiziert wurde (Finch *et al.*, 1989). FGF-7 ist außerdem, zusammen mit dem erst kürzlich identifizierten FGF-19, das einzige Mitglied der FGF-Familie, das spezifisch nur einen FGF Rezeptor aktivieren kann (Ornitz *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1999). Durch FGF-19, welcher ein eigenes Signalpeptid trägt, wird ausschließlich der FGF Rezeptor 4 aktiviert.

Alternatives Spleißen des humanen FGF-8 Gens ermöglicht die Kodierung von vier Protein-Isoformen (a, b, e, f), die sich in ihren transformierenden Eigenschaften unterscheiden. Die FGF-8 Isoformen aktivieren bevorzugt die FGF Rezeptoren 1-IIIc, 2-IIIc, 3-IIIc und 4. In Brust-, Ovarial- und Prostatakrebs wird FGF-8b überexprimiert. NIH3T3-Zellen werden durch FGF-8b morphologisch transformiert und erhalten einen tumorigenen Status. Im Gegensatz zu FGF-1 und -2 besitzen die FGF-8 Isoformen alle ein identisches Signalpeptid (MacArthur *et al.*, 1995b).

In Tabelle 1 sind die bisher identifizierten humanen Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) und ihre bisher aufgeklärten Bindungsspezifitäten zu den vier FGF Rezeptoren aufgezeigt:

Liganden	FGFR							
	1		2		3		4	
	IIIb	IIIc	IIIb	IIIc	IIIb	IIIc		
FGF-1	•	•	•	•	•	•	•	•
FGF-2	•	•		•			•	•
FGF-3	•		•					
FGF-4		•		•		•		•
FGF-5		•		•				
FGF-6		•		•				•
FGF-7			•					
FGF-8a	-	-	-	-	-	-	-	-
FGF-8b				•		•		•
FGF-8e						•		•
FGF-8f				•		•		•
FGF-9		•		•	•	•		•
FGF-10	•		•					
FGF-11								
FGF-12								
FGF-13							•	•
FGF-14								
FGF-16				•		•		•
FGF-17b		•		•		•		•
FGF-18		•		•		•		•
FGF-19								•
FGF-20				•		•		
FGF-21								
FGF-22			•					
FGF-23							•	

Tabelle 1: FGF-Liganden und ihre Rezeptorspezifität

•/• = Bindung

Mitglieder der FGF-Familie spielen häufig eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung, da sie sowohl als Onkogene zur Tumorentstehung beitragen, als auch als Angiogenese-Faktoren die weitere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen positiv beeinflussen können. Dies belegt auch die häufig erhöhte Expression von Genen der FGFs in verschiedenen Tumortypen, wie zum Beispiel in Nieren-, Brust- und Harnblasenkrebs.

1.1.7 Der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 4 (FGFR4)

Der FGFR4 wurde vor zehn Jahren aus der cDNA der Zelllinie K562 (Multiple Myelomische Leukämie) kloniert (Partanen *et al.*, 1991). Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% homolog zu den vorher bereits identifizierten FGFR1 und FGFR2 (Dionne *et al.*, 1990) und besitzt die charakteristischen strukturellen Komponenten der FGFR Proteinfamilie, wie die drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Teil und eine zweigeteilte Kinasedomäne im zytoplasmatischen Bereich (s. Abb. 5).



Abb. 5: Schematische Darstellung des FGFR4

IG = Immunglobulin-, TM = Transmembran-, JM = Juxtamembran-, TK = Tyrosinkinase-, KI = Kinasedomäne

Die Chromosomenlokalisierung im menschlichen Genom für das etwa 11,3 kb lange FGFR4-Gen (Kostrzewa and Muller, 1998) im Chromosomabschnitt 5q35.1-qter konnte im Zuge des Humangenomprojekts genau bestimmt werden.

Das Expressionsmuster des FGFR4 unterscheidet sich deutlich von dem des FGFR1 bzw. FGFR2 und auch von dem des FGFR3, der ebenfalls aus der cDNA der Zelllinie K562 kloniert wurde (Keegan *et al.*, 1991). Im 17-18 Wochen alten humanen Fetus und im adulten humanen Organismus wird der FGFR4 in mittlerer Stärke in der Niere, im Verdauungssystem, in der Bauchspeicheldrüse, Milz und Leber exprimiert, während er in großen Mengen in der Lunge vorkommt (Hughes, 1997; Partanen *et al.*, 1991). Im Gefäßsystem des Blutkreislaufs wird der FGFR4 besonders häufig in der Media exprimiert (Hughes, 1996), die hauptsächlich durch die glatte Muskulatur gebildet wird. Interessanterweise konnte in Maus-Embryonen während der Entwicklung der Muskelzellen gezeigt werden, dass der FGFR4 auch in diesem Fall stark exprimiert wird (Stark *et al.*, 1991).

Auch funktionelle Besonderheiten, die den FGFR4 von den anderen Mitgliedern der FGFR Proteinfamilie unterscheiden, sind in den letzten Jahren gefunden worden. Expression von FGFR1 in FGFR-negativen L6 Ratten Myoblasten induziert nach Stimulation mit FGF-1 die Tyrosinphosphorylierung von PLC γ , SHC, ERK-1, ERK-2 und FRS2, während in FGFR4 exprimierenden L6 Zellen nur sehr schwache oder gar keine Aktivierung dieser Proteine zu beobachten ist (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Auch die Fähigkeit der Rezeptoren, die Zellproliferation in BaF3-Zellen zu aktivieren, unterscheidet sich deutlich. Während die Proliferation von BaF3/FGFR1-Zellen sehr stark und von BaF3/FGFR3-Zellen etwas schwächer durch FGF-1 aktiviert wird (Ornitz and Leder, 1992; Wang *et al.*, 1994), konnte in BaF3/FGFR4-Zellen mit selbigem Liganden keine Induktion der Zellproliferation gefunden werden (Wang *et al.*, 1994). Weiterhin können L6/FGFR1- und L6/FGFR2-Zellen in Weichagar eingebettet wachsen („Soft Agar Assay“; Parameter für die Zelltransformation), wogegen L6/FGFR4-Zellen keine Kolonien in Weichagar bilden (Shaoul *et al.*, 1995). Zudem wird FGFR4 durch Heparin aktiviert und ist damit das erste Beispiel für eine RTK, die durch ein Polysaccharid stimuliert werden kann (Gao and Goldfarb, 1995).

Über die biologische Funktion des FGFR4 ist noch nicht sehr viel bekannt. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass Umlagerungen im Actin-Zytoskelett (*membrane ruffling*), die nach Stimulation durch FGF-1 in Brustkrebszellen, aber nicht in normalen Brustepithelzellen erfolgen, durch den FGFR4 kontrolliert werden (Johnston *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der FGFR4 eine Funktion bei der Zellmigration besitzt.

Eine Möglichkeit, die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen, ist die Generierung von Mäusen, in denen das Gen ausgeschaltet wurde (Knock-Out Mäuse). Während die Inhibierung des FGFR1 lethal ist (Deng *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994) und die des FGFR3 zu verlängerten Extremitäten-Knochen in Mäusen führt, erzeugt das Ausschalten des FGFR4-Gens einen wenig veränderten Phänotyp, der lediglich durch einen verstärkten Cholesterinstoffwechsel charakterisiert ist (Yu *et al.*, 2000). Eine Doppelmutante, in der das FGFR4- und das FGFR3-Gen ausgeschaltet sind, resultiert dagegen in einer dramatisch reduzierten Alveogenese in der Lunge (Weinstein *et al.*, 1998).

Die häufig beobachtete starke Expression von FGFR4 in Brust-, Pankreas- und Nierenkarzinomen (Jaakkola *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1994; Penault-Llorca *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1999) lässt auf eine wichtige Funktion des FGFR4 in der Tumorigenese schließen. Allerdings haben Experimente mit einem *in vivo* Pankreaskarzinom-Modell ergeben, dass weder die Ü-

berexpression noch die Inhibierung des FGFR4 einen Einfluss auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen haben (Olson *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der FGFR4 nicht bei der Tumorentstehung sondern bei der weiteren Progression der Tumoren von Bedeutung ist.

1.2 Fehlregulation von FGFR-Signalwegen und Tumorentstehung

Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch eine erhöhte Zellteilungsrate, den Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontaktinhibition sowie durch die Fähigkeit zur Metastasierung aus.

Die Zellen erwerben diese Merkmale in einem mehrstufigen Prozess, dessen biochemische Veränderungen aber noch weitgehend ungeklärt sind. Auch wie die verschiedenen Stufen ineinander übergehen und voneinander abhängen, ist nur in wenigen Punkten verstanden (Vogelstein and Kinzler, 1993).

Die Tumorbildung ist eine schrittweise Akkumulation von Fehlregulationen, die u.a. von Mutationen ausgelöst werden können. Die Ursachen für Mutationen können sehr unterschiedlich sein. Das Spektrum reicht von genetisch vererbten Veränderungen wie Fehlern bei der DNA-Replikation über extern-bedingte Schädigungen, z.B. durch UV- oder Röntgenstrahlen bis hin zu Viren, die Mutationen verursachen.

Gene, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert und von Mutationen betroffen sind, können aufgrund ihrer Funktion in zwei Kategorien - die der Onkogene und der Tumorsuppressorgene - eingeteilt werden. Der Aktivierung eines Protoonkogens zum Onkogen liegen oftmals Mutationen zugrunde, die entweder die Struktur des kodierten Proteins betreffen, was zu einer konstitutiven Aktivität des Proteins führen kann, oder in einer Konzentrationserhöhung des kodierten Proteins resultieren. Protoonkogene können in folgende Gruppen zusammengefasst werden (Hunter, 1991): Wachstumsfaktoren, Rezeptortyrosinkinasen und zytoplasmatische Tyrosinkinasen, regulatorische GTPasen, zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen, Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren.

Wachstumsfaktoren können parakrin, d.h. auf andere Zellen, oder autokrin, also auf die Zellen, die die Wachstumsfaktoren synthetisiert haben, wirken. Mittlerweile sind auch zahlreiche Beispiele für Onkogene bekannt, die für mutierte Formen von Rezeptortyrosinkinasen kodieren, und deren transformierenden Eigenschaften sich häufig auf ihre konstitutive Aktivierung

zurückführen lassen. Somit bewirkt die Mutation, dass die Tyrosinkinase-Aktivität ständig aktiv und nicht mehr der Kontrolle der Liganden unterworfen ist.

1.2.1 Menschliche Krankheitssyndrome und Mutationen in den FGFR-Genen

Schon seit einigen Jahren ist die wichtige Funktion von RTKn bei der Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs, bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Genamplifikation von HER2, aber auch die Überexpression anderer RTKn einen wichtigen Schritt während der Tumorentstehung darstellt. Auch Sequenzveränderungen, die nur in den Tumorzellen zu finden sind (somatische Mutationen) konnten u.a. im TGF (*transforming growth factor*) Rezeptor II (Markowitz *et al.*, 1995) und im FGFR3 nachgewiesen werden (Cappellen *et al.*, 1999; Chesi *et al.*, 1997). Neben dieser wichtigen Rolle von somatischen Mutationen während der Tumorentwicklung wurden in vielen RTK-Familien auch Keimbahnmutationen identifiziert, die zu schweren Krankheitsbildern führen.

So ist besonders die Familie der FGF Rezeptoren ein markantes Beispiel für RTKn, deren Veränderungen zu dominanten, autosomal vererbaren Krankheiten führen. In den FGF Rezeptoren 1-3 sind über 50 Mutationen gefunden worden, die krankhafte Veränderungen in den Skelettknochen auslösen (s. Abb. 6).

90 Prozent aller zwergwüchsigen Menschen (Achondroplasie) besitzen beispielsweise eine Punktmutation im FGFR3 Gen, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin in der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des Rezeptors führt. Es wird angenommen, dass diese stark geladene Aminosäure in der sonst hydrophoben Umgebung der Zellmembran zu einer verstärkten Signalbildung durch den Rezeptor beiträgt (Webster and Donoghue, 1996). Andere Mutationen in den FGFRn 1 und 2 konnten in Patienten mit craniosynostotischen Syndromen, wie z.B. Apert, Jackson-Weiss, Crouzon und Pfeiffer gefunden werden (Webster and Donoghue, 1997; Wilkie *et al.*, 1995). All diese Veränderungen in der Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine haben eine verstärkte Signalkapazität der Rezeptoren zur Folge.

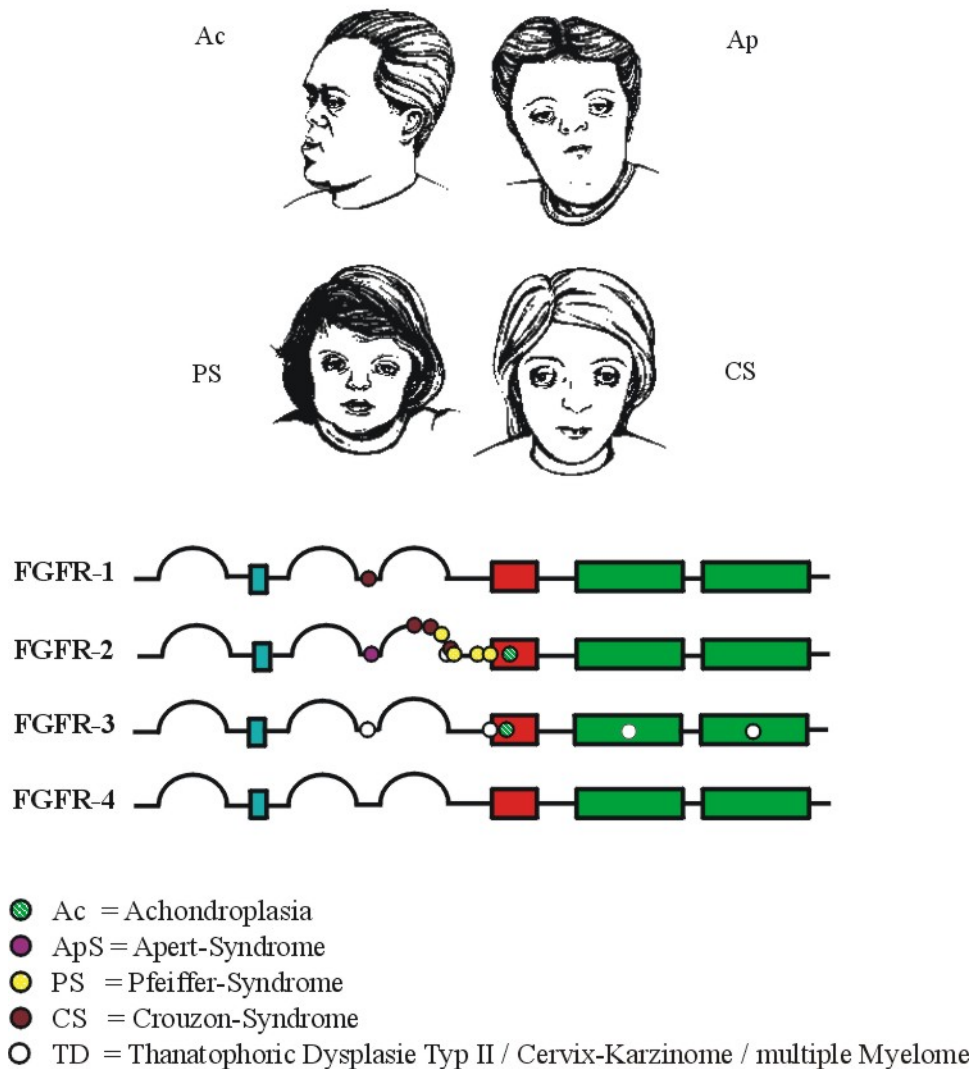


Abb. 6: Keimbahnmutationen in den FGF Rezeptoren 1, 2 und 3

Schematisch ist die Struktur der vier FGF Rezeptoren dargestellt. Mutationen im FGFR3, die in der neonatal lethalen Thanatophorischen Dysplasie TypII vorkommen, werden selten auch somatisch in Cervix-Karzinomen und multiplen Myelomen gefunden. Weiterhin ist eine Zuordnung der FGFR Genotypen mit den durch sie verursachten Entwicklungsstörungen dargestellt (nach Muenke & Schell; 1995).

Ein anderes Beispiel für eine RTK, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von vererbba- ren Krankheiten spielt, ist RET (*REarranged during Transfection*). In zwei verschiedenen Syndromen wurden Veränderungen im RET Gen gefunden. MEN2 (*multiple endokrine Ne- oplasie Typ 2*) ist eine autosomal vererbte Krankheit, die durch die Entstehung von medulären Thyroidkarzinomen definiert ist und sich durch Mutationen, welche die Aktivität des RET- Rezeptors erhöhen, auszeichnet. Andererseits besitzen 50% aller Patienten der Hirschsprung Krankheit Punktmutationen, die die Rezeptoraktivität von RET blockieren, oder zeigen einen

totalen Verlust des RET Gens (Edery *et al.*, 1997). In diesem Fall führt also die Aktivierung oder Inhibierung einer RTK zu zwei völlig unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Alle bisher beschriebenen Veränderungen von Genen sind äußerst selten und die Krankheiten, die durch sie hervorgerufen werden, betreffen nur einen kleinen Teil der Bevölkerung. Die sehr zahlreichen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) dagegen sind die am weitesten verbreiteten genetischen Variationen zwischen Individuen. Sie treten mit einer statistischen Häufigkeit von mindestens 1/1000 auf, d.h., dass sich die Nukleotidsequenz zweier nicht verwandter Individuen in etwa drei Millionen Positionen unterscheidet. SNPs sind evolutionär alte und stabile Mutationen und in menschlichen Populationen weit verbreitet. Ihre Verteilung ist unterschiedlich und wird mit etwa 1 pro 500 Nukleotiden für extragenetische und mit 1 pro 2000 Nukleotiden für intragenetische Regionen angegeben (Halushka *et al.*, 1999).

Es wird vermutet, dass die individuelle Verteilung der SNPs u.a. für Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und unterschiedliche Therapieerfolge innerhalb der Bevölkerung verantwortlich ist, da das Vorhandensein bestimmter SNPs mit einem erhöhten Risiko für eine Reihe von Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, Diabetes usw. (Brookes, 1999) korreliert. Weiterhin ist seit langem bekannt, dass SNPs und andere DNA Variationen in Genen für Medikamente-metabolisierende Enzyme (z.B. die Familie der Cytochrom P450- Proteine) Nebenwirkungen, Verträglichkeit und Effizienz von zahlreichen Medikamenten beeinflussen können (Evans and Relling, 1999; Linder *et al.*, 1997). Deshalb ist die Kenntnis dieser SNPs essentiell für das Verständnis der an der Krankheitsentstehung beteiligten Gene und deren (Fehl)-Funktionen.

1.3 Proteintyrosinphosphatasen (PTPn)

Sehr bald nach der Entdeckung der Tyrosinkinase gab es erste Hinweise auf die Existenz und Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen. Mit der vollständigen Aufreinigung und Sequenzanalyse der zytosolischen Phosphatase 1B wurde das erste Enzym einer neuen Phosphatasefamilie entdeckt, die spezifisch die Dephosphorylierung von Tyrosinresten katalysiert (Tonks *et al.*, 1988a, b). Während ein Sequenzvergleich mit Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen oder Alkalischer Phosphatase keine wesentlichen Übereinstimmungen ergab, konnte eine deutliche Homologie zu dem in Leukozyten exprimierten, membranständigen Protein CD45 gezeigt und eine hoch konservierte Proteintyrosinphosphatasedomäne identifiziert werden (Charbonneau *et al.*, 1989; Charbonneau *et al.*, 1988).

Diese Phosphatasedomäne besteht aus etwa 250 Aminosäuren und umfasst verschiedene hochkonservierte Bereiche. Das hierbei zentrale Motiv, ein Teil des katalytischen Zentrums, das für Proteintyrosinphosphatasen absolut charakteristisch ist, weist die Peptidsequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G auf, wobei X jeder beliebigen Aminosäure entsprechen kann (Zhang and Dixon, 1994).

Außerhalb der Phosphatasedomäne weisen Phosphatasen eine starke strukturelle Vielfalt auf. Auf der Basis dieser verschiedenen Strukturmerkmale und der Lokalisation innerhalb der Zelle werden analog den Proteintyrosinkinase transmembranäre und zytoplasmatische Proteintyrosinphosphatasen einander gegenübergestellt. Im Folgenden wird auf die zytoplasmatische Proteintyrosinphosphatase SHP-2 näher eingegangen.

1.3.1 Physiologische Funktion der Proteintyrosinphosphatase SHP-2

Im Gegensatz zu SHP-1, das im Rahmen der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelten Signaltransduktion eine negativ regulatorische Rolle einnimmt, kommt SHP-2 eine eher positiv regulatorische Funktion bei der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinase zu (Noguchi *et al.*, 1994). SHP-2 ist dabei maßgeblich in die zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 führenden Signaltransduktionswege involviert. Die Überexpression von Deletionsformen oder katalytisch inaktiven Mutanten führte daher zu einer deutlichen Inhibierung des Zellwachstums nach Ligandenstimulation. In Zusammenhang mit der positiven Funktion von SHP-2 bei der Signalübertragung steht die Beobachtung, dass SHP-2 als Adapter fungiert (Li *et al.*, 1994) und als solcher die Bindung von Grb2 beispielsweise an den PDGF Rezeptor vermitteln kann. Ebenfalls durch Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante konnte die Bedeutung von SHP-2 für die Aktivierung auch der c-Jun N-terminalen Kinase JNK nach Stimulierung des Insulin- sowie des EGF Rezeptors gezeigt werden, wobei SHP-2 oberhalb von Sos positiv regulatorisch auf den Ras-Signaltransduktionsweg Einfluss nimmt (Fukunaga *et al.*, 2000). Die Assoziation von SHP-2 mit dem SHP-Substrat 1 (SHPS-1)/SIRP-1 alpha, der die spezifische Erkennung der SHPS-1-Phosphotyrosinreste pY449 bzw. pY473 durch die amino- bzw. carboxyterminalen SH2-Domänen zugrunde liegt (Takeda *et al.*, 1998), wurde u.a. nach der Fibronectin-induzierten Vernetzung von Integrinen beobachtet und vermittelt hierbei die durch Integrin-Stimulation initiierte Aktivierung der MAP-Kinasen sowie Veränderungen der Zellmorphologie (Tsuda *et al.*, 1998). Der Ausbildung des SHP-2/SHPS-1-Komplexes kommt auch im Rahmen der LPA-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase eine

wichtige Rolle zu und wird hier sehr wahrscheinlich durch einen Rho-abhängigen Signalweg unter Beteiligung von FAK und Src-Kinasen vermittelt (Takada *et al.*, 1998).

1.4 Der LPA Rezeptor Edg 2

Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind pleiotrope Lipidmediatoren, die in hoher Konzentration im Serum vorkommen und von aktivierten Thrombozyten gebildet und ausgeschüttet werden. Auf Zellen im Bereich der Gefäßwand, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, üben LPA und S1P eine Vielzahl von Wirkungen aus. Diese umfassen u.a. die Umarrangierung des Zytoskeletts (Gohla *et al.*, 1998), die Anregung zur Proliferation (van Corven *et al.*, 1989), den Schutz vor Apoptose (Fang *et al.*, 1994), die Zellkontraktion, Chemotaxis, Zellmigration und -invasion (Fishman *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 1993).

Vor kurzem sind Zelloberflächenrezeptoren für LPA und S1P als Mitglieder der Edg-Unterfamilie (*endothelium differentiation gene*) der G Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) identifiziert worden (Kranenburg and Moolenaar, 2001; Pyne and Pyne, 2000). Drei LPA Rezeptoren - Edg 2, 4 und 7 (An *et al.*, 1998; An *et al.*, 1997; Bandoh *et al.*, 1999; Contos and Chun, 2000) - und die vier S1P-Rezeptoren Edg 1, 3, 5 und 6 wurden bislang beschrieben. Diese Rezeptoren binden an verschiedene Subtypen von G Proteinen und unterscheiden sich in ihrer Ligandenspezifität und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege.

Die LPA Rezeptoren sind untereinander hoch homolog und weit verbreitet. LPA spielt eine Rolle bei der Modulierung der Adenylatcyclase, der Stimulation der Phospholipase C (PLC) und der daraus resultierenden Ca^{2+} Freisetzung. Darüberhinaus vermittelt es die Phosphorylierung des *survival* Mediators Akt/Protein Kinase B (PKB) durch die PI3-Kinase und die transkriptionelle Regulierung von *immediate-early* Genen (Kranenburg and Moolenaar, 2001; Moolenaar, 1999; Moolenaar *et al.*, 1997; Pyne and Pyne, 2000). LPA Stimulation führt außerdem zur Aktivierung des Ras/MAP Kinase Signalwegs, der Bildung von Stressfasern durch Rho-Induktion und zur DNA-Synthese und Zellproliferation (Contos *et al.*, 2000).

In unterschiedlichen Zellkulturexperimenten konnte durch die Expression des Edg 2 Maus Homologs LPA1 ein Abrunden der Zellen, die Inhibierung der Adenylatcyclase, eine Aktivierung des *serum response-elements*, eine erhöhte Ca^{2+} Freisetzung, die Aktivierung der MAP Kinase, die Bildung von Stressfasern, der Einbau von BrdU, eine Apoptose Hemmung, die Freisetzung von Arachidonsäure und Produktion von Inositolphosphat beobachtet werden.

Dadurch wurde erwiesen, dass ein einzelner LPA Rezeptor verschiedene Signalwege einleiten kann (Contos *et al.*, 2000).

In vielen Zellsystemen wurde zudem die LPA-vermittelte Transaktivierung des EGF Rezeptors beschrieben (Fischer *et al.*, 2003). Da LPA mit zu den wirkungsvollsten Mitogenen zählt und vermutlich in die Entwicklung und Progression vieler Krebsarten involviert ist, sollte der Mechanismus der LPA Rezeptor-induzierten Aktivierung des Ras/MAP Kinase Signalwegs von höchstem Interesse hinsichtlich der Prävention der Krebsentstehung sein.

1.5 Die Proteinkinase Akt/PKB

Akt/PKB gehört zu den Serin/Threonin Kinasen und kommt in Säugetieren in drei Isoformen - Akt 1, 2 und 3 - vor, die strukturell eng miteinander verwandt sind. Die Isoformen bestehen aus drei funktionell verschiedenen Domänen: Einer N-terminalen Pleckstrin Homologie (PH) Domäne, einer zentralen katalytischen Domäne und einem C-terminalen Hydrophoben Motif (HM).

Die Proteinkinase B wird durch den Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-K) Signalweg aktiviert. Die Bildung der "*second messenger*" PIP3 und PIP2 ist für die Rekrutierung von Akt /PKB an die Membranoberfläche entscheidend. Die Akt/PKB-Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an mehreren Serin- und Threoninresten, die wichtigsten Phosphorylierungsorte aber sind Thr308 und Ser473. Vollständig aktiviertes Akt/PKB dissoziiert von der Plasmamembran und interagiert mit Proteinen, die im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert sind. Auf diese Weise werden durch Akt/PKB Gene aktiviert, deren Produkte in diverse zelluläre Prozesse involviert sind. Desweiteren spielt die Akt/PKB-Aktivierung eine Rolle in der Tumorigenese und Tumormetastasierung sowie in der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika (Marte and Downward, 1997; Scheid and Woodgett, 2001).

1.6 Zielsetzung

Im Zuge der Entschlüsselung des Humangenoms wurden zahlreiche genetische Veränderungen identifiziert, deren Bedeutung jedoch bislang in nur wenigen Fällen bekannt ist. Ein in dieser Arbeitsgruppe entdeckter SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) im Gen des humanen FGFR4, der an der Aminosäureposition 388 den Austausch eines Glycins gegen einen Argi-

ninrest zur Folge hat, konnte mit der Progression von Brust- und Kolonkarzinomen (Bange *et al.*, 2002), Weichteil-Sarkomen (Morimoto *et al.*, 2003), Plattenepithelkarzinomen aus der Mundrachenhöhle (Streit *et al.*, 2004) und Prostatakrebs (Wang *et al.*, 2004) in Verbindung gebracht werden. Zudem konnte eine Veränderung in der Motilität und auch in der Genexpression von Brustkrebszelllinien, welche die FGFR4 Arg388 Variante exprimieren, gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war der Signaltransduktionsweg des FGFR4 von besonderem Interesse, mit dem Hintergrund, Abweichungen in der Signalweiterleitung des FGFR4 Arg388 im Vergleich zu FGFR4 Gly388 aufzudecken.

Desweiteren wurde der Einfluß einer exogenen Expression des FGFR4 in der Gly388 oder Arg388 Form auf verschiedene physiologische Effekte von Brustkrebszelllinien beobachtet. Hierbei wurden die Auswirkungen einer stark reduzierten Genexpression des LPA Rezeptors Edg 2, die durch Expression des FGFR4 Gly388 hervorgerufen wurde, sowohl auf das migrative Verhalten der Zellen als auch auf den Akt-Kinase Signalweg genauer untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
BES (N,N-Bis(2-Hydroxyl) 2-amino-ethansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Chloroquine	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin [®] (G 418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1- piperazin- ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Humaninsulin [®] Normal 40	Lilly, Giessen
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe

TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Aldrich (Steinheim)
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase C.I.A.P.)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Klenow-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, New England
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
TaKaRa-LA-Taq-Polymerase	TaKaRa, Otsu, Japan
T4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

2.1.3 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

EASYTAG TM METHIONIN L-[³⁵ S]	1175 Ci/mmol
--	--------------

2.1.4 "Kits" und sonstige Materialien

ECL Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Hyperfilm TM MP	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
	Corning Incorporated, USA

MATRIGEL Invasionskammern	BD Biosciences, Pharmingen
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellkultureinsätze	Falcon, U.K.

2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF	Toyoba, Japan
FGF-1	Pepro Tech, USA
FGF-2	Pepro Tech, USA
FGF-8b-GST	diese Arbeit
FGF-19-His	diese Arbeit
Heparin	Sigma, Taufkirchen
LPA	Sigma, Taufkirchen
Sphingosin-1-Phosphat	Upstate Biotechnology, Lake Placid
Thrombin	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Inhibitoren

BB-94	British Biotech, Oxford
AG1478	Alexis, Grünberg
SU5402	Sugen Inc., Kalifornien
Wortmannin	Sigma, Taufkirchen

2.1.7 Medien und Puffer

2.1.7.1 Medium für E. coli Bakterien

LB-Medium	1,0% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	1,0% NaCl
	pH 7,2

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Zur Herstellung fester Nährböden wurde das Medium mit 1,5% Agar versetzt.

2.1.7.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze und fötales Kälberserum (FBS) wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glucose, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

MEM (Eagle) ohne Methionin mit 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

L-15 (Leibovitz) Medium mit L-Glutamin und L-Aminosäuren, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: 90% FBS, 10% DMSO

2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Acrylamidlösung (30/0,8%)	30,0% (w/v)	Acrylamid
	0,8% (w/v)	Bisacrylamid
BBS (2x)	50,0 mM	BES
	280,0 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 6,96 (NaOH)
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylencyanol
	30,0%	Glyzerin
	100,0 mM	EDTA pH 8,0
HBS (2x)	46,0 mM	HEPES pH 7,5
	274 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 7,00 (NaOH)
HNTG-Puffer	20,0 mM	Hepes pH 7,5
	150,0 mM	NaCl
	0,1%	Triton X-100
	10,0%	Glyzerin
	10,0 mM	Na ₄ P ₂ O ₇ (Tetra-Natrium-Pyrophosphat)

Laemmli-Puffer (2x)	65,0 mM 3,0% 30,0% 0,01% 5,0%	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau β -Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (Stammlösung)	50,0 mM 150,0 mM 1,0 mM 10,0% 1,0% 10,0 mM	Hepes pH 7,5 NaCl EDTA Glycerin Triton X-100 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
NET (10x)	150,00 mM 5,00 mM 50,00 mM 0,05%	NaCl EDTA Tris Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 , pH 7,4 (HCl)
SD-Transblot	50,0 mM 40,0 mM 20,0% 0,004%	Tris/HCl pH 7,5 Glycin Methanol SDS
Strip-Puffer	65,0 mM 2,0% 0,68%	Tris/HCl pH 6.8 SDS β -Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM 10 mM	Tris/Acetat EDTA pH 8,0 (Eisessig)
TE (10:0,1)	10,0 mM 1,0 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM 1918,0 mM 1,0%	Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS

2.1.9 Tiere

Die Produktion polyklonaler Antikörper fand durch Immunisierung von Chinchilla und neuseeländischen Kaninchen statt, die in der Versuchstierhaltung des Max-Planck-Instituts entsprechend den derzeit gültigen Bestimmungen und unter spezifischen, pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Für die weitere Arbeit wurden die Kaninchen nach der Immunisierung schmerzfrei durch den Tierpfleger getötet, um das Blut der Tiere ernten zu können.

2.1.10 Bakterienstämme (*E. coli*)

Die angegebenen *E. coli* Bakterienstämme wurden für Transformationen und zur Proteinexpression benutzt.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
BL21-CodonPlus(DE3)	B ⁻ , ompT, hsdS (r _B m _B), dcm ⁺ , Tet ^r , gal, λ(DE3), endA H+E [argU, proL, Cam ^r]	Stratagene
CJ236	dut-, ung-, thi-, relA-, Amp ^r	Kunkel, 1985
DH5α	F'/endA1 hsd17 (r _k m _k), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF), Amp ^r	Stratagene
SCS110	Dam-, Dcm-Methylase Defizienz, endA ⁻ , F'-Episom	Stratagene

2.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BT-474	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-20
BT-483	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	SUGEN
BT-549	Humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-122
BT-549/FGFR4 WT	Humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 G388, monoklonal	U3 Pharma
BT-549/FGFR4 MT	Humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 R388, monoklonal	U3 Pharma
BT-549/pLXSN	Humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN (Leervektor), Mix aus 3 monoklonalen Zellen	U3 Pharma
HEK 293	humane embryonale Nierenfibroblasten, transformiert mit humaner adenoviraler DNA Typ 5 (Ad 5)	ATCC CRL-1573
HEK 293/FGFR4(Ex)-GST	humane embryonale Nierenfibroblasten, exprimieren ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des FGFR4 und GST	d. AG

HEK 293/FGF19-myc-6xHis	humane embryonale Nierenfibroblasten, sezernieren den humanen Wachstumsfaktor FGF19 mit Myc- und 6xHis-tag	d. AG
MCF-7	Humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-22
MCF-7/FGFR4 G388	Humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 G388, monoklonal	U3 Pharma
MCF-7/FGFR4 R388	Humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 R388, monoklonal	U3 Pharma
MCF-7/pLXSN	Humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN (Leervektor), Mix aus 3 monoklonalen Zellen	U3 Pharma
MDA-MB-231/FGFR4 G388	humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 G388, monoklonal	d. AG
MDA-MB-231/FGFR4-R388	humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 R388, monoklonal	d. AG
MDA-MB-231/pLXSN	humane Brustadenokarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN (Leervektor), Mix aus 3 monoklonalen Zellen	d. AG
MDA-MB-361	humane Brustadenokarzinomzellen, metastatisch zum Gehirn	SUGEN
MDA-MB-435S	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-129
MDA-MB-435S/FGFR4 G388	humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 G388, monoklonal	U3 Pharma
MDA-MB-435S/FGFR4 R388	humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN/FGFR4 R388, monoklonal	U3 Pharma
MDA-MB-435S/pLXSN	humane Brustkarzinomzellen, stabil infiziert mit pLXSN (Leervektor), Mix aus 3 monoklonalen Zellen	U3 Pharma
MDA-MB-436	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ
MDA-MB-453	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-131
MDA-MB-468	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-132
Phoenix A	Modifizierte HEK293LiInie zur Produktion helfervirusfreier, amphotropher Retroviren	Nolan Lab, Stanford
Phoenix E	Modifizierte HEK293LiInie zur Produktion helfervirusfreier, ekotropher Retroviren	Nolan Lab, Stanford
ZR-75-1	humane Brustkrebszellen	SUGEN/P. Knyazev

2.1.12 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
αAkt1/2 (H-136)	Kaninchen, polyklonal, gegen Aminosäurereste 345-480 von Akt1	Santa Cruz Biotechnology
αEGFR 108.1	Maus, monoklonal gegen extrazelluläre Domäne des humanen EGFR	Lax <i>et al.</i> 1989
αEGFR UBI	Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytoplasmatischen Domäne des humanen EGFR als Fusionsprotein	Upstate Biotechnology, Lake Placid
α ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz Biotechnology
αFGFR-4 (C-16)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid im Carboxyterminus des FGFR4	Santa Cruz Biotechnology
αFGFR-4(Ex)	Kaninchen, polyklonal, gegen GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4	d. AG (C. Stadler)
αFGFR-4(Ex) 1171	Kaninchen, polyklonal, gegen GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4	diese Arbeit
αFGFR-4 4FA6D3C10	Maus, monoklonal, gegen extrazelluläre Domäne des FGFR4	d. AG (J. Bange)
αHA.11	Maus, monoklonal, gegen Influenza Hämagglutinin Epitop	Berkeley Antibody Company, Richmond
αHA	Maus, monoklonal, gegen Influenza Hämagglutinin Epitop	d. AG
αHis-probe	Kaninchen, polyklonal, gegen Polyhistidin Domänen	Santa Cruz Biotechnology
αMyc	Maus, monoklonal, gegen Myc-Epitop	d. AG (J. Bange)
αPhospho-p44/42 MAP Kinase (αP-Erk)	Kaninchen, polyklonal, gegen Thr202/Tyr204-Reste in p44 und p42 MAP Kinase	New England BioLabs
αPhospho-Akt	Kaninchen, polyklonal, gegen Ser473-Rest in Akt-Kinase	New England BioLabs
αPLCγ	Maus, monoklonal, gegen Peptid im Aminoterminus	Transduction Laboratories, Lexington
αPY4g10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	Upstate Biotechnology, Lake Placid
αSHP-2	Maus, monoklonal, gegen Peptid im Aminoterminus	Transduction Laboratories, Lexington
αSHP-2	Maus, monoklonal, gegen Peptid im Carboxyterminus	d. AG (R. Lammers)
αTubulin	Maus, monoklonal, gegen α -Tubulin T9026	Sigma, Taufkirchen
αVSVp5d4	Maus, monoklonal, (Klon P5D4) gegen VSV-Tag (Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus)	Roche Mannheim

Bei der Immundetektion von Proteinen sind sekundäre, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper verwendet worden.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1 : 10000	BioRad (München)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 50000	BioRad (München)
Esel gegen Schaf	1 : 25000	Dianova (Hamburg)

2.1.13 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.13.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (+) IG, SK (MCS)	Stratagene, Kalifornien
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus Mo-MuLV, SV40 Promotor	CLONTECH Laboratories (Miller und Rosman, 1989)
pGEX-5x-1	Expressionsvektor, Amp ^r , ori aus pBR322, interne lacI ^q -Genregion, tac Promotor, Glutathion-S-Transferase Genregion, Faktor Xa Erkennungsstelle, β-Lactamase Genregion	Pharmacia Biotech
pSecTag B	Expressionsvektor, Amp ^r , Zeocin ^r , CMV-immediate-early Promotor/enhancer, T7-Promotor, BGH poly A, ori aus pUC, Maus Igκ-Signalsequenz, c-myc Epitop, Polyhistidin tag, SV40 Promotor und poly A	Invitrogen, USA

2.1.13.2 Spezifizierte Vektoren

Vektor	Insert	Referenz
pcDNA3-VSVtag/ΔEx-TM FGFR4 G388	cDNA der intrazellulären Domäne des humanen FGFR4 G388	d. AG (C. Stadler)
pcDNA3-VSVtag/ΔEx-TM FGFR4 K503M	cDNA der intrazellulären Domäne des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter K503M-Mutation	d. AG (C. Stadler)
pcDNA3-VSVtag/FGFR4 G388	cDNA des humanen FGFR4 G388	diese Arbeit

pcDNA3-VSVtag/FGFR4 R388	cDNA des humanen FGFR4 R388	diese Arbeit
pcDNA3-VSVtag/FGFR4 K503M	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter K503M-Mutation	diese Arbeit
pcDNA3-VSVtag/FGFR4ΔTK2	humaner FGFR4 G388 mit deletierter Tyrosinkinasedomäne 2 (bp 1755-2406 deletiert)	diese Arbeit
pcDNA3-VSVtag/FGFR4ΔTK1	humaner FGFR4 G388 mit deletierter Tyrosinkinasedomäne 1 (bp 1394-1710 deletiert)	diese Arbeit
pcDNA3-VSVtag/FGFR4Δint G388	humaner FGFR4 G388, zytoplasmatischer Bereich (bp 1192-2406) deletiert	d. AG (H.-J. Berger)
pcDNA3-VSVtag/FGFR4Δint R388	humaner FGFR4 R388, zytoplasmatischer Bereich (bp 1192-2406) deletiert	d. AG (H.-J. Berger)
pcDNA3-HAtag/FGFR1	cDNA des humanen FGFR1	diese Arbeit
pcDNA3-HAtag/FGFR2	cDNA des humanen FGFR2	diese Arbeit
pcDNA3-HAtag/FGFR3	cDNA des humanen FGFR3	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 G388	cDNA des humanen FGFR4 G388	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 R388	cDNA des humanen FGFR4 R388	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 K503M	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter K503M-Mutation	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 Y642/643F	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter Y642/643F-Mutation	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 Y719F	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter Y719F-Mutation	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 Y754F	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter Y754F-Mutation	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4 Y754/764F	cDNA des humanen FGFR4 G388 mit eingeführter Y754/764F-Mutation	diese Arbeit
pLXSN/FGFR4Δint G388	humaner FGFR4 G388, zytoplasmatischer Bereich deletiert (bp 1188-2406 deletiert)	d. AG (H.-J. Berger)
pLXSN/FGFR4Δint R388	humaner FGFR4 R388, zytoplasmatischer Bereich deletiert (bp 1188-2406 deletiert)	d. AG (H.-J. Berger)
pSecTag B/FGF19	cDNA des humanen FGF19, G418-Resistenzgen	diese Arbeit

pRK5-RS-HA_{tag}/SHP-2	cDNA der humanen PTP SHP-2	d. AG (M. Stein-Gerlach)
pRK5-RS- HA_{tag} /SHP-2 C/S	cDNA der humanen PTP SHP-2 mit eingeführter C459S-Mutation	d. AG (M. Stein-Gerlach)
pSUPER-Retro		

2.1.13.3 Oligonukleotide

Oligo	Gen	Sequenz (5' → 3')	Position in cds	Verwendungszweck
F4TK1-EcoRIrev	FGFR4	GCGAATTCGAGCGGCCCTCACTGCTCCGAGG	1752-1729	Klonierung der Tyrosinkinasedomäne 1 des FGFR4 in pcDNA3-VSV _{tag} unter Einführung einer EcoRI -Schnittstelle, ohne STOP
F4TK2-XmaIfor	FGFR4	GCCCCGGGGGACCTCAGCCCGACGGTCCCTCGGAGC	1711-1737	Klonierung der Tyrosinkinasedomäne 2 des FGFR4 in pcDNA3-VSV _{tag} unter Einführung einer XmaI -Schnittstelle
F4-Y642/3F-ClaI	FGFR4	CTGGTTTTCTTAAGAAATCGATGTGGTGGAC	1940-1909	Einführung einer <u>Punktmutation</u> und einer ClaI -Schnittstelle in den FGFR4 zum Y642/3F-Austausch
F4-Y719F-SacI	FGFR4	ACTCACGCATCAGCCCGAAGAGCTCTG	2173-2147	Einführung einer <u>Punktmutation</u> und einer SacI -Schnittstelle in den FGFR4 zum Y719F-Austausch
F4-Y754F-XbaI	FGFR4	CAGGCGGAGGTCTAGAACTCTCAGAGACG	2277-2250	Einführung einer <u>Punktmutation</u> und einer XbaI -Schnittstelle in den FGFR4 zum Y754F-Austausch
FR1-BamHIfor	FGFR1	GCGGGATCCACCGCCATGTGGAGCTGGAAGTGCCTCC	1-22	Klonierung des FGFR1 in pcDNA3-HA _{tag} unter Einführung einer BamHI -Schnittstelle, mit Kozak-Sequenz und START
FR1-XbaIrev	FGFR1	GCGTCTAGAGCGGCGTTTGAGTCCGCCATTG	2460-2439	Klonierung des FGFR1 in pcDNA3-HA _{tag} un-

				ter Einführung einer XbaI -Schnittstelle, ohne STOP
FR2-BamHI-for	FGFR2	GCGGGATCCGCCACCATGGT CAGCTGGGGTCGTTTCATCTG	1-26	Klonierung des FGFR2 in pcDNA3-HA <i>tag</i> unter Einführung einer BamHI -Schnittstelle, mit Kozak-Sequenz und START
FR2-XbaIrev	FGFR2	GCGTCTAGATGTTTTAACACT GCCGTTTATGTGTG	2463-2438	Klonierung des FGFR2 in pcDNA3-HA <i>tag</i> unter Einführung einer XbaI -Schnittstelle, ohne STOP
FR3-KpnIfor	FGFR3	CGCGGTTACCGCCACCATGGG CGCCCCTGCCCTGCGCC	1-21	Klonierung des FGFR3 in pcDNA3-HA <i>tag</i> unter Einführung einer KpnI -Schnittstelle, mit Kozak-Sequenz und START
FR3-EcoRIrev	FGFR3	GCGAATTCCGTCCGCGAGCCC CCTACTGCT	2418-2398	Klonierung des FGFR3 in pcDNA3-HA <i>tag</i> unter Einführung einer EcoRI -Schnittstelle, ohne STOP
MUT	FGFR4	GAGGCGTTGTCTTTGAG CATC <u>A</u> TGACGGCCACAGTGCTGGC	1529-1489	Einführung einer <i>Punktmutation</i> in die intrazelluläre ATP-Bindedomäne des FGFR4 (K503M)
SV40for	Neomycin	GGCTCCGATATCCCAGGCAGG CAGAAGTATG		Klonierung des Neomycin-Resistenzgens aus pcDNA3 in pSecTagB unter Einführung einer EcoRV - Schnittstelle
SV40rev	Neomycin	GCACCCGATATCCAGGCTTTA CACTTTATGC		Klonierung des Neomycin-Resistenzgens aus pcDNA3 in pSecTagB unter Einführung einer EcoRV - Schnittstelle
SHP-2-1 siRNA		AAGAAUAUGGCGUCAUGCGU GdTdT		siRNA zur Inhibierung der Genexpression von SHP2
SHP-2-2 siRNA		AAGGGCACGAAUAUACAAAU AdTdT		siRNA zur Inhibierung der Genexpression von SHP2

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidaufreinigung für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) unter Anwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2 Plasmidaufreinigung für präparative Zwecke

Für die Transfektion von HEK 293 Zellen wurden größere und reinere DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zum Nullabgleich wurde der gleiche Puffer verwendet, in dem die Nukleinsäuren resuspendiert waren. Die Nukleinsäuren wurden in einer Verdünnung von 1:200 gemessen.

Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Zur Abschätzung der Verunreinigung der Lösung mit Proteinen mißt man die Absorption bei 280 nm und bildet den Quotienten OD_{260}/OD_{280} . Dieser liegt bei nicht verunreinigter DNA bei 1,8. Für RNA liegt dieser Wert bei 2,0.

2.2.4 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.4.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionen erfolgten mit Typ II Restriktionsendonukleasen, die meistens Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen mit palindromischer Struktur erkennen. Diese Enzyme schneiden die DNA im Gegensatz zu Typ III Restriktionsendonukleasen, bei denen Erkennungssequenz und Schnittstelle nicht identisch sind, innerhalb der palindromischen Erkennungsregionen. Dabei erzeugen sie entweder glatte (*blunt ends*) oder, bei versetzter Spaltung, überhängende (*sticky ends*) 3'- oder 5'-Enden.

Die Reaktionen erfolgten in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern für einen Zeitraum von 1-3 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Man achtete darauf, dass die Enzymmenge nie mehr als 10% des Volumens des gesamten Reaktionsansatzes betrug, da die Enzyme, die in 50% (v/v) Glycerin bei -20°C gelagert werden, unter Reaktionsbedingungen mit mehr als 5% (v/v) Glycerin sog. Sternaktivität zeigen. Diese stellt sich durch eine geringere Substratspezifität der Enzyme dar, wodurch diese die DNA auch an Stellen schneiden, die nicht der Erkennungssequenz entsprechen.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (ca. 1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

2.2.4.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Die Klenow (DNA Polymerase I, großes Fragment) kann zum Auffüllen von 5'-Überhängen (nach Restriktionsverdau) verwendet werden, um anschließend *blunt ends* für die Ligation zu erhalten.

Nach dem Restriktionsverdau, bei dem durch die Restriktionsenzyme 5'-Überhänge entstanden sind, wurde der Ansatz mit Hilfe von Qiagen-Säulen (QIAquick™ PCR Purification Kit) gewaschen und mit 44 µl Wasser eluiert. Zu dem Eluat wurden 5 µl 10x Klenow-Puffer (enthält 40 µM von allen vier dNTPs und 0,1 mg/ml BSA) und 1 Unit Klenow-Polymerase pro µg DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert.

Nach erneuter Reinigung des Ansatzes mit Hilfe der Qiagen-Säule wurde die DNA in einer *blunt end*-Ligation verwendet.

2.2.4.4 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und ÜN bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde direkt im Anschluß zur Transformation von Bakterien verwendet. Überschüssiger Ligationsansatz wurde bei 4°C gelagert.

2.2.5 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 bp bis 14 kb wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt, die mit Ethidiumbromid versetzt waren. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol. 6x DNA-Auftragungspuffer versetzt. Als Größenmarker wurde die 1 kb DNA Leiter von Gibco (Smart Ladder) aufgetragen, mit dessen Hilfe die Größe der linearisierten DNA Fragmente ermittelt werden konnte. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Die DNA Banden wurden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters photographiert (Polaroid 667). Durch Exposition der DNA im UV Licht bestand aber die Gefahr des sog. „Photoknickings“, wobei es zu chemischen Veränderungen der Nukleotide kommt. Um Mutationen der DNA durch das UV-Licht zu verhindern, wurde DNA, die in weiteren Experimenten verwendet wurde, mit

Hilfe eines Darkreaders (Clare Chemical Research) sichtbar gemacht. Dieses Gerät sendet Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm aus, und hat somit eine geringere denaturierende Kraft auf die DNA als UV-Licht mit 302 nm.

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des "QIAquick™ Gel Extraktion Kits" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

Für eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente aus einem präparativen Agarosegel war es wichtig, die Geltaschen nicht mit einer zu großen Menge an DNA zu überladen und die Elektrophorese so lange fortzusetzen, bis eine präzise Auftrennung erreicht war. Die zu isolierenden Banden wurden mit Hilfe eines Darkreaders mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Nach der Methode von Chung und Miller (1993) wurden *E. coli* Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden zum Animpfen einer 5 ml Übernachtskultur verwendet. 0,5 ml dieser stationären Bakterienkultur wurden in 250 ml Medium gegeben und bei 37°C bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt ($OD_{600} = 0,2-0,4$). Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 rpm, GSA-Rotor) und auf Eis in 100 ml TSB ("*Transformation and Storage Buffer*", LB-Medium mit 5% (v/v) DMSO, 10% PEG 4000 (w/v), 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$, pH 7,5 und mit 0,45 μm Filterspritze sterilfiltriert) resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend in 250/500 μl Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Transformationseffizienz war stets größer als 5×10^6 Klone/ μg DNA.

2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* wurden 10 μl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet, zu dem 20 μl 5x KCM-Lösung (500 mM KCl, 150 mM $CaCl_2$, 250 mM $MgCl_2$), 70 μl H_2O und 100 μl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert wurden. Der Ansatz wurde daraufhin 20 min auf Eis und anschließend 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1 ml 2xLB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in 50 μl LB-Medium, wurden die Reaktionsansätze auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

Mit Hilfe dieser Methode (nach Messing, 1983 und Kunkel, 1985) ist es möglich, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in eine bekannte DNA-Sequenz einzuführen.

2.2.7.1 Herstellung von uracilhaltiger Einzelstrang-DNA

Mit 100 μl einer CJ236 $\ddot{U}\text{N}$ -Kultur (*E. coli*-Stamm) wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen der fr \ddot{u} hen logarithmischen Phase bei 37°C gesch \ddot{u} telt. Diese Kultur wurde mit 1×10^8 Phagen infiziert (MOI 20) und $\ddot{U}\text{N}$ bei 37°C gesch \ddot{u} telt. In dieser Zeit synthetisieren die zur Infektion verwendeten M13 Phagen die einzelstr \ddot{a} ngige DNA, an der die Mutagenese durchgef \ddot{u} hrt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren in 1,2 ml Kulturmedium aus dem \ddot{U} berstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem \ddot{U} berstand durch Zugabe von 300 μl 20% PEG/NaCl bei RT f \ddot{u} r 20 min pr \ddot{a} zipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der \ddot{U} berstand vollst \ddot{a} ndig abgenommen. Das Phagensediment wurde in 300 μl TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 200 μl pufferges \ddot{a} tigtem Phenol/Chloroform mehrfach extrahiert. Nach der Abtrennung der w \ddot{a} ssrigen Phase wurde die einzelstr \ddot{a} ngige DNA durch Zugabe von 200 μl 7,5 M NH_4Ac (pH 7,5) und 800 μl absolutem Ethanol gef \ddot{a} llt und bei 4°C mit 13000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das DNA-Pr \ddot{a} zipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μl H_2O aufgenommen. Die Qualit \ddot{a} t der einzelstr \ddot{a} ngigen DNA wurde auf einem 1%igem Agarosegel \ddot{u} berpr \ddot{u} ft. Als Kontaminationskontrolle von doppelstr \ddot{a} ngiger DNA wurden zus \ddot{a} tzlich 100 ng unverdautes Plasmid auf das Agarosegel aufgetragen.

2.2.7.2 Phosphorylierung des spezifischen Oligonukleotids

F \ddot{u} r die Phosphorylierung des Oligonukleotids wurden folgende Reagenzien gemischt:

Oligonukleotid	100 pmol
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
MgCl_2	10 mM
DTT	5 mM
ATP	400 μM
	ad H_2O 30,0 μl

Dieser Ansatz wurde nach Zugabe von 1 μl PNK (4,50) f \ddot{u} r 30 min bei 37°C inkubiert und anschlie \ddot{s} end f \ddot{u} r 10 min auf 65°C erhitzt.

2.2.7.3 Synthese des mutierten Stranges

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids an den uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgenderma \ddot{s} en: 200 ng einzelstr \ddot{a} ngige DNA, 2-3 pmol phosphoryliertes Oligomer, 1 μl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden in einem 90°C warmen Heizblock 2 min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis auf 30°C heruntergek \ddot{u} hlt. Zur Synthese des komplement \ddot{a} ren Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1 μl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 20 mM DTT), 5 U T4-DNA Ligase (1 μl), 1 μg T4-Gen 32 Protein (0,5 μl) und 3 U T4-DNA Polymerase (1 μl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschlie \ddot{s} end 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 μl TE gestoppt. 10 μl Aliquots wurden nach \ddot{U} berpr \ddot{u} fung der Mutation zur Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien genutzt.

2.2.8 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten automatisiert mit Hilfe des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) gemäß der Kettenabbruchmethode. Die zu sequenzierende DNA wurde hierfür einer vorausgehenden PCR (s. 2.2.9) nach folgendem "ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencer"-Protokoll unterzogen:

Reaktionsansatz:

4,0 µl *Terminator Ready Reaction Mix* (TRR)
0,5 µg dsDNA
10,0 pmol Primer
ad 20,0 µl H₂O

PCR-Programm:

Amplifikation 25 Zyklen: 30 sec 96°C (Denaturierung)
 15 sec 45-60°C (Hybridisierung)
 4 min 60°C (Synthese)
abkühlen auf 4°C

Anschließend wurde die amplifizierte DNA durch Zugabe von 80 µl H₂O und 250 µl 100%igem Ethanol (RT) gefällt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT, wurde die DNA bei 13000 rpm für 20 min in einer Tischzentrifuge pelletiert, das Pellet in 250 µl 75%igem Ethanol (RT) gewaschen und erneut durch 5-minütige Zentrifugation pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand mit einer Kanüle abgesaugt, und das Pellet für eine Minute bei 90°C im Heizblock getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl "*Template Suppression Reagent*" (TSR) aufgenommen und in ein Sequenziergefäß überführt, das vorsichtig mit einem Septum verschlossen wurde. Die so präparierte DNA wurde dann bis zur Sequenzierung bei -20°C aufbewahrt und direkt vor der Sequenzierung für 2 min bei 90 °C inkubiert.

2.2.9 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore™-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

2.2.9.1 Präparation von RNA

Die Präparation von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) für die RNA Isolation nach Herstellerprotokoll ("*RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells*"). Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.2.9.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde die cDNA-Synthese nach der Hybridisierung der RNA mit einem spezifischen Oligomer und die PCR-Amplifikation der synthetisierten cDNA in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Um eventuelle Kontaminationen mit DNA auszuschließen, wurde jeder Versuchsansatz mit zwei Negativkontrollen durchgeführt, wobei bei der einen die RNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde (zur Kontrolle auf Kontaminationen), während bei der anderen die Reverse Transkriptase durch 1 µl H₂O ersetzt wurde.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

RNA	2-5 µg
<i>random primer</i> (10 pmol/µl)	1,0 µl
ad H ₂ O	10,0 µl

Nach 2-minütiger Hybridisierung bei 68°C und anschließender Inkubation für 10 min bei RT wurden folgende Reagenzien zu dem Ansatz zugegeben:

dNTP-Mix (10mM)	4,0 µl
5 x AMV-RT Puffer	4,0 µl
RNAse Inhibitor (40 E/ µl)	0,5 µl
AMV-Reverse Transkriptase	1,0 µl
H ₂ O	0,5 µl
	20,0 µl Endvolumen

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Pipettieren des Ansatzes 1 h bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit findet die cDNA Synthese statt. Anschließend konnte die cDNA zur Detektion bestimmter Gene einer PCR unterzogen werden.

2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.2.10.1 Amplifikation von DNA- und cDNA Fragmenten

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA
1 µl <i>sense</i> Oligomer, 10 pmol
1 µl <i>antisense</i> Oligomer, 10 pmol
5 µl 10x Pfu-Polymerase Puffer
(20 mM Tris/Cl, pH 8,0, 0.1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))

1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
 1 µl Pfu-Polymerase (0,1-0,5 U)
 ad 50 µl H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in dem Thermocycler „Progene“ der Fa. Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min	95°C	
Amplifikation 25-30 Zyklen:	0,5-1 min	95°C	(Denaturierung)
	0,5-1 min	X°C	(Hybridisierung)
	x min	72°C	(Synthese)
letzte Synthese:	8 min	72°C	
	abkühlen auf 4°C		

Die zur Hybridisierung erforderliche Temperatur X ist vom GC- und AT-Gehalt des Oligomers abhängig. Üblicherweise liegt sie zwischen 52 und 60°C.

Die Synthesezeit x ist von der Länge des zu amplifizierenden Stranges abhängig (pro Minute werden ca. 2000 bp amplifiziert).

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.2.10.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.2.10.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des "PCR Purification Kit" (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in sog. Einfriermedium bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des Coulter-Counters ZM der Firma Coulter.

2.3.2 Mycoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm-Schalen wurden deshalb routinemäßig mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht

2.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit CaCl₂ und einer BES-gepufferten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham and van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos and Ruddle, 1981). Daraus resultiert in dieser sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion meist auf einer 6-Loch Zellkulturschale (2 ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 2 µg DNA mit H₂O zu einem Volumen von 90 µl verdünnt, mit 10 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 100 µl BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ÜN bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreiem Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

Schalengröße	12-Lochplatte	6-Lochplatte	6 cm-Schale	10 cm-Schale
Schalenfläche	4 cm ²	10 cm ²	21 cm ²	57 cm ²
Zellzahl	180000	300000	800000	1,8-2,2 Mio.
Medienvolumen	1 ml	2 ml	4 ml	8 ml
DNA in H₂O_{bidest}	1 µg in 45 µl	2 µg in 90 µl	4 µg in 180 µl	8 µg in 360 µl
2,5 M CaCl₂	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl
2 x BBS (pH 6,96)	50 µl	100 µl	200 µl	400 µl
Gesamtvolumen	100 µl	200 µl	400 µl	800 µl
Hungermedium	0,5 ml	1,0 ml	2,0 ml	5,0 ml

2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test wurden Säugerzellen mit einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) wie beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt.

2.3.5 Radioaktive Markierung von HEK 293 Zellen

Diese sensitive Methode der Markierung von Proteinen mit radioaktivem Methionin dient der Aufklärung von Proteinwechselwirkungen. Dabei werden alle Proteine, die an das Protein von Interesse binden, unabhängig von einer Phosphorylierung nachgewiesen.

Zunächst wurden hierzu HEK 293 Zellen wie in 2.3.2 erläutert mit Plasmid-DNA transfiziert. Nach Kultivierung der transfizierten Zellen wurden die Zellen einmal mit Methionin-freiem MEM-Medium ohne FBS gewaschen und für 5 h-ÜN gehungert. Durch Zugabe von 40 μCi L- ^{35}S -Methionin pro ml Medium wurde das radioaktive Methionin während der folgenden 16–20 h in die neu synthetisierten Proteine eingebaut.

2.3.6 Retroviraler Gentransfer in humane Brustkrebszellen (MDA-MB-231)

Zu Herstellung von Zelllinien, welche einen bestimmten Rezeptor stabil exprimieren, wurden Phoenix A oder Phoenix E Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit der zu exprimierenden Rezeptor-cDNA in einem retroviralen Expressionsvektor pLXSN nach der unter 2.3.3 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert, mit dem Unterschied, dass eine HEPES-gepufferte Phosphatlösung (2x HBS: 46,0 mM HEPES pH 7,5, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,00 (NaOH)) verwendet wurde und den Zellen 5 min vor der Transfektion 25 μM Chloroquin zugegeben wurde, um lysosomale DNAsen zu inhibieren. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen zum Sammeln von Virusüberstand ü.N. mit 3,5 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde dann durch einen 0,45 μm Filter sterilfiltriert. Zur Infektion wurden die jeweiligen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und auf 6-Lochplatten usesät. 3 ml des gesammelten Virusüberstandes der transfizierten Phoenix A oder Phoenix E Zellen wurden auf die zu infizierenden Zellen gebracht und in Gegenwart von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren bei 37°C für 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 3 h erneut infiziert. Nach Abschluß der Infektionen wurde das Medium gewechselt und die Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgt mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

2.4 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

2.4.1 Isolierung von Antigen zur Produktion polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Von HEK 293 Zellen, die stabil mit dem Gen für das GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4 (Δ FGFR4-GST) transifiziert waren (J. Bange, d. AG), wurde alle zwei Tage Medium (DMEM mit 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin) mit dem darin sezernierten Protein geerntet. Das gesammelte, bei 4°C gelagerte Medium wurde vor der Proteinaufreinigung filtriert, um Zellbestandteile zu entfernen. Pro 1 l filtriertem Medium wurde 1 ml Glutathion-Sepharose ca. 16 h auf einem Magnetrührer bei geringer Umdrehungszahl im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit binden die Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose Matrix. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose Matrix in eine Chromatographiesäule (BioRad, München) überführt und dreimal mit eiskaltem 1x HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) gewaschen. Die Elution der GST-Fusionsproteine von der GSH-Sepharose erfolgte mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM DDT). Dazu wurde die Glutathion-Sepharose mit 10 ml Elutionspuffer 10-20 min bei RT inkubiert, zweimal aufgeschlemmt und danach das Eluat in 3 ml Fraktionen gesammelt. Zur Kontrolle wurden 10 μ l aus allen Fraktionen entnommen, mit 20 μ l 2x Laemmli-Puffer versetzt und mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s.2.5.8) aufgetrennt und analysiert.

Das restliche Eluat wurde ÜN in einer 10% Glycerin Lösung dialysiert (s. 2.5.2.) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.4.2 Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen

Als Antigene zur Immunisierung diente das Δ FGFR4-GST Fusionsprotein aus 2.4.1. Vor der Immunisierung wurden den Kaninchen zunächst an der Ohrvene ca. 2 ml Prä-Immuneserum abgenommen. Zur ersten Immunisierung wurden jeweils 500 μ g des Antigens mit dem gleichen Volumen „kompletten Freund's Adjuvanz“ (Sigma) versetzt und in einer Kanüle zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde den Kaninchen an mehreren Positionen subcutan injiziert. In gleicher Weise erfolgten Immunisierungen zwei und nochmals vier Wochen später, mit dem Unterschied, dass nun „nicht-komplettes Freund's Adjuvanz“ verwendet wurde. Acht Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet. Das Blut wurde ÜN bei 4°C zur Präzipitation des sogenannten Blutkuchens stehen gelassen. Anschließend wurde der flüssige Bestandteil abgenommen und 10 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nachfolgend schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C für 10 min. an. Danach wurde das Serum abgenommen, mit Natriumazid versetzt (Endkonzentration 0,02%).

2.4.3 Affinitätsreinigung des Serums

Um unspezifische Antikörper aus dem Serum zu entfernen, wurde dieses mittels Affinitätschromatographie über eine Zyanbromid aktivierte Sepharose-Säule (CNBr aktivierte Sepharose 4B, Pharmacia) mit daran gekoppeltem Antigen gereinigt.

2.4.3.1 Präparation der CNBr aktivierten Sepharose

500 µg des Antigens wurden zuvor ÜN bei 4°C gegen 500 ml Kopplungspuffer (100 mM Natriumhydrogencarbonat, 500 mM Natriumchlorid, pH 8,0) dialysiert.

Zunächst mussten 500-1000 mg der gefriergetrockneten CNBr aktivierten Sepharose für 15 min bei RT in 1 mM HCl-Lösung in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufquellen. Ein Gramm der Sepharose quillt dabei zu 3,5 ml Gel auf. Anschließend wurde das Gel mit 200 ml 1 mM HCl pro 1 g Sepharose in mehreren Fraktionen gewaschen (Zentrifugation bei RT und 2000 rpm). Nach einmaligem Waschen mit Kopplungspuffer wurde sofort 0,5-1 mg dialysiertes Antigen in einem Volumen von ca. 2 ml zugegeben. Dieser Schritt muss ohne zeitliche Verzögerung ablaufen, da die CNBr-Gruppen bei pH 8,0 aktiviert werden und schnell hydrolysieren. Durch 2stündige Rotation auf einem Drehrad wurde die Bindung des Antigens an die Säule ermöglicht. Die überschüssigen Bindungsstellen wurden daraufhin durch Zugabe von 15 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,0 und nochmaliger Inkubation auf dem Drehrad für 2 Stunden abgesättigt. Nicht-kovalent gebundene Proteine wurden dann durch einen viermaligen pH-Wechsel von pH 4,0 (100 mM Natriumacetat, 500 mM Natriumchlorid) und pH 8,0 (Kopplungspuffer) entfernt. Die so präparierte Säule wurde in 1x PBS-Puffer mit 0,02% Natriumazid bei 4°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

2.4.3.2 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Vor der Zugabe des Serums wurde die CNBr aktivierte Sepharose mit dem gekoppelten Antigen in 1x PBS-Puffer equilibriert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C ÜN unter Rotation auf einem Drehrad (50 ml Reaktionsgefäß). Am nächsten Morgen wurde das Serum mit der Sepharose in Fraktionen in eine Säule transferiert und nach Durchlaufen des Serums mehrfach mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte im Anschluß bei RT mit Elutionspuffer (100 mM Glycin, 150-300 mM Natriumchlorid, pH 2,5) in mehreren Fraktionen zu je 1 ml. Die Antikörper-Eluate wurden in Neutralisierungspuffer (100 mM Natriumhydrogenphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 11) aufgefangen, so dass der pH-Wert der Eluate bei pH 7,0-7,5 lag. Die Fraktionen wurden bei einer OD von 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine $OD_{280} = 1$ einer Antikörperkonzentration von 0,5 µg/µl. Anschließend wurden die Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration miteinander vereinigt und ÜN bei 4°C unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer gegen 250–500 ml 1x PBS-Puffer bzw. 1x NET-Puffer dialysiert. Am darauffolgenden Tag wurde der PBS-/NET-Dialysepuffer gegen 50% Glycerin in 1x PBS ausgewechselt und die Eluate wurden erneut ÜN bei 4°C im Dialysepuffer inkubiert. Die auf diese Weise einkonzentrierten Antikörperlösungen wurden in Aliquots bei –20°C aufbewahrt.

2.5 Methoden zur Bearbeitung und Analyse von Proteinen

2.5.1 Expression und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins in *E. coli*

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Systeme genutzt werden, um fremde, z.B. eukaryontische Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach der Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gereinigt werden.

Zunächst wurden *E. coli*-Zellen mit pGEX-5x-1-Fusionsvektoren transformiert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 100 ml

ampicillinhaltiges (200 µg/ml) LB-Medium mit zwei bis drei Bakterienkolonien angeimpft und ÜN bei 37°C bei 160 rpm geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde die ÜN-Kultur auf ein Endvolumen von 1 l mit frischem ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt und wiederum bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einem $OD_{600} = 0,4-0,5$ kultiviert. Bei Erreichen des OD_{600} -Werts erfolgte die Induktion der Bakterienkultur mit 1 M IPTG zu einer Endkonzentration von 0,2 mM. Das Fusionsprotein wurde dann bei 30°C während 5-8-stündigem Schütteln exprimiert. Nach einer Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 18 ml eiskaltem RSP-Puffer (1x PBS, 0,5 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 15 µg/ml Aprotinin, 0,75 mM PMSF und 0,5 mM DDT) zur Lyse der Bakterienzellen auf Eis resuspendiert. Zum weiteren Aufschluß der Zellen wurde die Suspension einer Ultraschallbehandlung unterzogen (3x 1 min, 70%). Die Zugabe von Triton X-100 (1% Endkonzentration) verhinderte eine Assoziation des Fusionsproteins mit bakteriellen Proteinen. Nach einer 5-minütigen Inkubation und ebenfalls 5-minütiger Zentrifugation bei 20000 rpm in einem SS-34 Rotor bei 4°C konnten unlösliches Material und noch intakte Zellen als Pellet von dem Fusionsprotein im Überstand getrennt werden. Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurden die Zellüberstände mit 1 ml Glutathion-Sepharose, ca. 16 h bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Während dieser Zeit binden die Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose Matrix. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose Matrix in eine Chromatographiesäule (BioRad, München) überführt und dreimal mit eiskaltem 1x HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM DTT). Zur Kontrolle wurden 10 µl aus allen Fraktionen entnommen und mit 20 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden dann mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

2.5.2 Dialyse von GST-Fusionsproteinen

Zur Entfernung des reduzierten Glutathions, das zur Eluierung der Fusionsproteine von der Glutathion-Sepharose-Matrix eingesetzt wurde, wurden die Proteinlösungen gegen Glycerin dialysiert. Dazu wurden die Lösungen in Dialyseschläuche pipettiert und in 2-5 l Dialysepuffer gegeben (10%-50% Glycerin, 1x PBS, H₂O). Der Austausch von reduziertem Glutathion gegen Glycerin erfolgte ÜN bei 4°C unter konstantem Rühren. Am nächsten Tag wurden die Proteinlösungen aus den Dialyseschläuchen in Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

2.5.3 Expression und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins in HEK 293 Zellen

In vielen Fällen werden mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren bakterielle Systeme genützt, um fremde, z.B. eukaryontische Proteine als Fusionsproteine mit einem Glutathion-S-Transferase (GST)-tag rekombinant zu exprimieren. Bei zytosolischen Proteinen von Eukaryonten, die grundsätzlich keine Glykosylierung aufweisen, ist die Expression in Prokaryonten eine schnelle und einfache Methode. Probleme stellen extrazelluläre, eukaryontische Proteine dar, da die von Prokaryonten synthetisierten Fusionsproteine nicht posttranslational modifiziert werden und damit die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Fusionsproteins verändert werden kann. Dies hat zur Folge, dass das GST-Fusionsprotein eine veränderte Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur besitzen kann. Eine veränderte Faltung des Proteins kann die Protein-Protein Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern verhindern. Wird das GST-Fusionsprotein zur Produktion von Antikörpern verwendet, so kann eine veränderte Faltung eine Veränderung der präsentierten

Epitope des Proteins verursachen und somit zur Produktion von unspezifischen Antikörpern führen.

Sollen eukaryontische Proteine als GST-Fusionsproteine exprimiert werden, die anschließend als Antigen für die Antikörperproduktion dienen, so wird für diese Aufgabenstellung ein eukaryontisches System zur Expression verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht die Produktion des nativen GST-Proteins.

Zur Expression der GST-Fusionsproteine wurden HEK 293 Zellen verwendet, da diese eine sehr kurze Generationszeit von ca. 20 Stunden haben. Die von den HEK 293 Zellen gebildeten GST-Fusionsproteine werden bei Vorhandensein ein Signalpeptids von den Zellen in das Medium sezerniert. Die Aufreinigung des Fusionsproteins aus gesammeltem Medium erfolgte über Affinitätschromatographie (Glutathion-S-Transferase Matrix) unter zu Hilfenahme des ÄKTA explorers (Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung des Programms Unicorn.

2.5.4 Expression und Aufreinigung eines Histag-Proteins in HEK 293 Zellen

Wie unter 2.5.3 für GST-Fusionsproteine beschrieben, wurden in HEK 293 Zellen auch Proteine mit einem C-terminalen Rest von sechs Histidinen mittels eines modifizierten pSecTag-Expressionsvektors hergestellt. Dieser Vektor trägt eine Igκ-Signalsequenz zur Gewährleistung einer guten Sezernierung des rekombinanten Proteins in das Zellmedium. Zusätzlich wurde ein Neomycinresistenzgen zur leichteren Selektion transfizierter HEK 293 Zellen mit dem Neomycin-Analogon Geneticin (G 418) in den Vektor eingefügt. Eine Vektorkarte ist in Abbildung 7 dargestellt, der Austausch des Resistenzgens wurde durch Pfeil markiert.

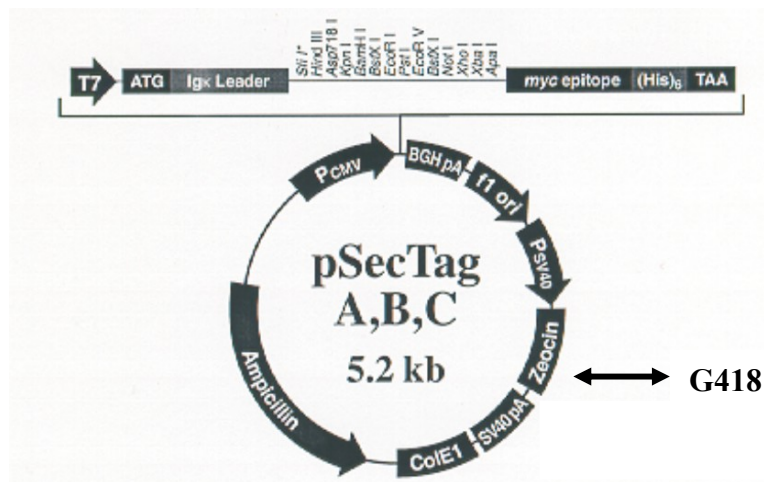


Abb. 7: Vektorkarte des pSecTag (Invitrogen)

Der eukaryontische Expressionsvektor pSecTag (Invitrogen), zeichnet sich durch eine N-terminale Igκ-Leitsequenz zur Sezernierung von Proteinen aus Zellen und ein C-terminales myc- und 6xHistag aus. „A, B, C“ steht für drei unterschiedliche Leseraster der *mcs*, in denen der Vektor erhältlich ist. Das Resistenzgen Zeocin wurde gegen Neomycin (G418) ausgetauscht.

Der Vorteil eines Histidinrests gegenüber einem GSTtag liegt in der geringen Größe, so dass Überlagerungen von Proteindomänen durch das tag weitgehend vermieden werden können. Histidinreste eignen sich deshalb auch besonders für kleinere Proteine, wie in diesem Fall für Liganden von rund 20 kD.

Die Aufreinigung der His-Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer ÄKTA explorer über eine HR5/5 Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit TALON Su-

perflow Metal Affinity Resin als Matrix (BD Biosciences Clontech, Heidelberg), die sich die spezifische Bindung von Proteinen mit mehrfachen Histidinresten an eine Cobalt gekoppelte Matrix zunutze macht.

Nachdem das *Histag*-Protein aus dem Medium an die Cobalt-Matrix gebunden hatte, wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glycerin, pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit Elutionspuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7,0) von den Cobalt-Gruppen gelöst und in mehreren Fraktionen aufgefangen. Je 10 µl der Fraktionen wurden mit 2xLämmli versetzt und über SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brilliant Blau Färbung getestet.

2.5.5 Stimulation und Triton X100-Lyse von eukaryontischen Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen 24 bis 48 h in serumfreiem Medium gehungert und anschließend für 10 min im 37°C-Inkubator mit Liganden inkubiert.

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert.

Zusätzlich wurden dem Lysepuffer vor der Verwendung frisch zugegeben:

10,0 µg/ml	Aprotinin
1,0 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
10,0 mM	Natriumfluorid (NaF)
2,0 mM	Natriumorthovanadat (pH 10,0) (Na_3VO_4)

Schalengröße	12-Lochplatte	6-Lochplatte	6 cm-Schale	10 cm-Schale	15 cm-Schale
Volumen an Lysepuffer	100 µl	150 µl	400 µl	750 µl	1000 µl

Da in den durchgeführten Experimenten der Gehalt an Tyrosinphosphorylierung eine große Rolle spielt, ist insbesondere der Zusatz der Phosphataseinhibitoren NaF und Na_3VO_4 , sowie das Pseudosubstrat für Phosphatasen Natriumpyrophosphat wichtig. PMSF und Aprotinin dagegen sind Proteaseinhibitoren, die einer möglichen Proteindegradation entgegen wirken.

Nach 10 Minuten Lyse auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) konnten unlösliche Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett abgetrennt werden. Der Überstand, der alle zytosolischen und die meisten membranständigen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entweder zur Immunpräzipitation weiterverwendet oder als Gesamtlysate benutzt.

2.5.6 Quantitative Proteinbestimmung

2.5.6.1 Proteinbestimmung mit dem "Micro BCA Protein Assay Kit"

Zur Proteinbestimmung wurde der "Micro BCA Protein Assay Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Kupfer-Ionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) durch verschiedene Seitengruppen von Aminosäuren (hauptsächlich Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin), die als Reduktionsmittel fungieren. Die Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Die Kupfer-Ionen werden durch BCA (Bicinchonische Säure) komplexiert und bilden die charakteristische violette Färbung, deren Extinktion in einem ELISA-Reader (Dynatech MR5000) gemessen wurde. Als Vergleichsstandard (Kalibrierungskurve) wurde eine Rinderseumalbumin-Konzentrationsreihe (100-2000 μg Protein/ml) eingesetzt.

2.5.7 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zelllysat dienen spezifische, an Protein-A- oder G-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann. Die Protein-A-/G-Sepharose wird in einer 20%igen ethanolischen Lösung aufbewahrt. Da Ethanol die Protein-Protein Wechselwirkungen stört, wurde die Sepharose dreimal mit 1x HNTG-Puffer gewaschen und schließlich eine 50%ige Suspension der Sepharose in HNTG hergestellt, mit der im weiteren gearbeitet wurde.

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein-A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes - Antikörper und Protein - erleichtert (Chenais *et al.*, 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 μl Protein-A-/G-Sepharose und 1-5 μl monoklonaler Antikörper oder 3-10 μl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer versetzten Zelllysaten gegeben und für 3-4 h oder ÜN bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 7000 rpm (1 min, 4°C) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit eiskaltem HNTG-Puffer gewaschen und in 50 μl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5 min bei 100°C aufgeköcht, um den Immunkomplex von der Protein-A/G-Sepharose zu lösen und anschließend für 1 min abzentrifugiert.

2.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Die Proteine erhalten zugleich eine negative Ladung, die nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung abhängt und so ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Weiterhin ist das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol dafür verantwortlich, dass intra- und intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine reduziert werden. So kommt eine Denaturierung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur zustande.

Es wurden stets vertikale Gelapparaturen (Atto Cooperation, Japan) verwendet. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige oder Gradienten (zwischen 7,5%-12,5%) SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Über die Trenngele wurde im Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Vor der Präparation der Gele wurden die Glasplatten, Abstandhalter und Kämmen gründlich gereinigt und getrocknet; anschließend wurden 2 Glasplatten, die durch einen Gummispacer getrennt werden, zusammengeklammert. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm; das Sammelgel hatte eine Größe von 14 x 3 cm und das Trenngel von 14 x 9,5 cm.

Nach Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (10%ige Lösung) zur vorgelegten Trenngellösung wurde diese sofort zwischen die Glasplatten gegossen und mit etwa 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesteckt. Nach ca. 15 min konnten die Gummidichtungen entfernt werden und die Gele in die Laufkammern (Atto Cooperation, Japan) gebracht werden. Die Kammern wurden mit Laufpuffer (1x Tris-Glycin-SDS) gefüllt, die Kämmen gezogen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült, um Acrylamidverunreinigungen wegzuwaschen. Nach 5minütigem Aufkochen der Proben wurden diese abzentrifugiert und mit einer Mikroliter[®] Spritze (Hamilton, Bonaduz) auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Sie erfolgte ÜN bei auf 6 mA begrenzter Stromstärke pro Gel. Die Gele wurden anschließend in Coomassie R250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert.

Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein	MW (in kD)	Protein	MW (in kD)
Myosin	205,00	Ovalbumin	42,70
β -Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,00
Phosphorylase b	97,40	Trypsin-Inhibitor	21,50
BSA	66,20	Lysozym	14,40

Proteingele von mittlerer Größe wurden nach folgendem, tabellarisch aufgeführtem Rezept angesetzt und sofort nach Zugabe von APS gegossen:

Trenngel	7,5%	10,0%	12,5%	15,0%
4 x Trenngelpuffer	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml
H₂O	9,80 ml	8,10 ml	6,40 ml	4,80 ml
Acrylamid (30%/0.8%)	5,00 ml	6,65 ml	8,35 ml	9,97 ml
100% TEMED	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l
10% APS	270 μ l	270 μ l	270 μ l	270 μ l

Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um die Bildung eines Meniskus zu verhindern.

Sammelgel	4,0%
4 x Sammelgelpuffer	1,62 ml
H₂O	4,80 ml
Acrylamid (30%/0,8%)	900,0 µl
100% TEMED	12,5 µl
10% APS	135,0 µl

2.5.9 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie R250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 15 min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Wasser getränkte Zellophanfolien gelegt und aufgespannt auf einen Rahmen für 3 h mittels eines Luftstroms getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet und dann auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Abhängig von der Signalstärke betrug die Länge der Exposition 12 h bis 1 Woche bei -80°C.

2.5.10 Western-Blot-Analyse

2.5.10.1 Vertikaler Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 3 h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, BA 85, 0,45 µM) auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Das in Transblot SD equilibrierte Gel wurde auf eine den Gelausmaßen entsprechend zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran gelegt, die zu beiden Seiten von mehreren Lagen Filterpapier umgeben war.

Blotaufbau:

<u>Kathode</u>
4 Lagen 3 mm Whatman-Papier
1 Lage Munktell-Papier
Acrylamidgel
<u>Nitrozellulosemembran</u>
1 Lage Munktell-Papier
4 Lagen 3 mm Whatman-Papier
<u>Anode</u>

Um Luftblasen zu vermeiden, die die Qualität des Blots stark vermindern könnten, wurden die zuvor in Transblot SD eingelegten Lagen an Filterpapier nach Auflegen stets geglättet und exakt übereinander geschichtet

2.5.10.2 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem erfolgten Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden diese für 1 min mit einer Lösung des roten Farbstoffs Ponceau S (2 g/l in 2% (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Unspezifisch angefärbte Bereiche der Nitrozellulose wurden mit destilliertem Wasser entfärbt, damit Banden des Proteinmarkers, der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper oder der Proteine des Zellysats sichtbar wurden. Dies diente neben dem Fixieren der Proteine auf der Membran zum einen dazu die „Markerbanden“ mit wasserfestem Kugelschreiber einzuzeichnen, zum anderen, um anhand der Antikörperbanden abzuschätzen, ob gleiche Mengen Protein aufgetragen worden waren. Die Nitrozellulose wurde dann durch mehrmaliges Waschen in 1x NET-Gelatine (0,25% Gelatine in 1 x NET) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose abgesättigt.

2.5.10.3 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Verfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen primären Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch einen sekundären Antikörper erkannt werden, welche an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN.

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 2 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, andernfalls wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Um die Haltbarkeit der Blotantikörperlösungen zu erhöhen, wurde Natriumazid (1:5000) hinzugegeben. So wird eine Kontamination der Lösung durch Mikroben vermieden, da das Azid einen hemmenden Einfluss auf deren Atmungskette hat.

Der Filter wurde ÜN bei 4°C mit der Primärantikörperlösung inkubiert, danach dreimal 20 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem sekundären Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

ECL ist ein nicht radioaktives System zur Detektion von spezifischen Antigenen auf einer stationären Phase. Die wesentlichen Komponenten des Systems sind Luminol und Wasserstoffperoxid, die in Anwesenheit von speziellen "Enhancern" (z.B. Phenol) eine Lumineszenz-Reaktion (s. Abb. 8) eingehen. Durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase

werden cyclische Diacylhydrazide wie Luminol im Alkalischen oxidiert. Das durch die Chemilumineszenz ausgesendete Licht (Maximum bei $\lambda = 428 \text{ nm}$) kann anschließend durch Exposition des mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckten Blots auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Das Maximum der Licht-Emission ist bei 5-20 min erreicht und klingt mit einer Halbwertszeit von etwa 60 min ab.

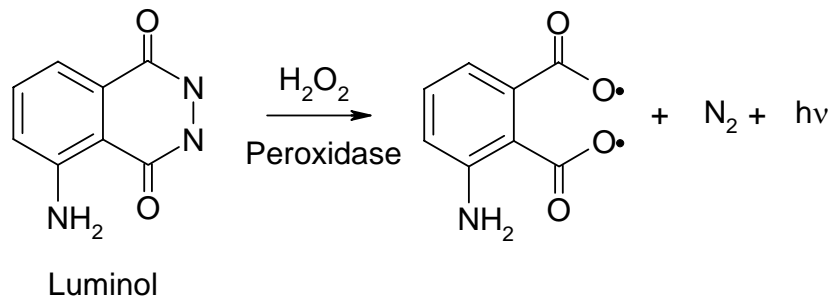


Abb. 8: Chemilumineszenzreaktion des ECL-Systems

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in "Strip"-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h in einem Warmwasserschüttler entfernt werden. Danach muss das β -Mercaptoethanol durch intensives Waschen mit NET-Gelatine für mindestens 4 Stunden vollständig entfernt werden, bevor die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden kann.

2.6 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

2.6.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation kann die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 24 bis 48 h in serumfreiem Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse wurden die Zellen für 2 bis 10 min mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G Proteingekoppelter Rezeptoren oder einer isotonischen KCl-Lösung zur Induktion der Membrandepolarisation stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 10 bis 30 min vorbehandelt. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin (α PY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot analysiert.

2.6.2 Wundheilungsexperiment

Ein Verfahren für die mikroskopische Detektion von Wunden in adhärenter Zellkultur sowie das Zufügen einer mechanischen Verletzung wurde von Swanson beschrieben (Swanson and McNeil,

1987). Dieses Vorgehen wurde erarbeitet für menschliche Epithelzellen, ist jedoch universell für die meisten typischen Zelllinien im Labor einsetzbar.

Wie bei Bange (Bange *et al.*, 2002) ausgeführt, wurden die jeweils zu untersuchenden Zellen (MDA-MB-231) mit stabil infiziertem FGFR4 (G388, R388) in 6-Lochplatten zur Konfluenz herangezogen und dann für 24 h gehungert. Mit einer Pipettenspitze wurde der Zellschicht eine möglichst gleichmäßige Wunde zugefügt und anschließend die abgelösten Zellen mit Medium gewaschen. Nach einer Inkubation der Zellen in Medium ohne Kälberserum mit verschiedenen Stimuli bzw. Inhibitoren für 10 h bei 37°C (5% CO₂) konnten die Zellen unter einem Mikroskop beobachtet und fotografiert werden.

2.6.3 Migrations-und Invasionstest

Ein *in vitro* Invasionsassay, um das invasive Potential von Tumorzellen zu quantifizieren, wurde erstmals von Albini (Albini *et al.*, 1987) beschrieben und basiert auf einer Weiterentwicklung der Experimente von Boyden (Boyden, 1962). In diesem Modell, welches eine Matrix von Komponenten der Basalmembran benutzt, kann die Zelladhäsion an die Matrix, lokale Degradierung dieser Matrix und gerichtete Bewegung von Zellen durch die Matrix bestimmt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass das Invasionspotential durch die Matrix nicht immer mit dem *in vivo* metastatischen Zellphänotyp korreliert. Andere wichtige Schritte bei der Metastasierung, wie Tumorentstehung, Tumorprogression und -promotion, Angiogenese, Koloniebildung und Durchdringung der körpereigenen Abwehrmechanismen können in diesem Modell nicht berücksichtigt werden. Oftmals werden Chemoattraktanten benutzt, um Migration zu lenken und anzuregen.

2.6.3.1 Migration

MDA-MB-231 Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in Standardmedium ohne FBS resuspendiert. In die untere Kammer einer 24-Lochplatte wurden 600 µl mit Serum oder Liganden versetztes Medium gefüllt und Zellkultureinsätze mit einer Polykarbonatmembran (Falcon™ Cell Culture Inserts, 6,5 mm Durchmesser, 8 µm Porengröße, BD Biosciences, Pharmingen) luftblasenfrei mit einer Pinzette eingesetzt. Anschließend wurden 1x10⁵ Zellen in 200 µl Medium ohne FBS auf der Membran ausgesät. Die Zellen durften innerhalb der nächsten 6-18 h in Richtung des Chemoattraktanten migrieren.

Anschließend wurden die Zellen auf der Oberseite des Filters mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt, die Membran wurde gefärbt und die Zellen im Mikroskop ausgezählt.

2.6.3.2 Invasion

Nach dem gleichen Schema wie in 2.6.4.1 beschrieben, erfolgt auch die Untersuchung der Invasivität von Zellen, mit dem Unterschied, das hier die Polykarbonatmembran mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel (BD BioCoat™ Growth Factor Reduced MATRIGEL™ Invasion Chamber, BD Biosciences, Pharmingen) beschichtet ist, welches die Basalmembran imitiert und durch das die Zellen hindurchwandern müssen. Nach der Rehydrierung des Matrigels für 2 h mit 0,5 ml Medium ohne FBS im 37°C-Inkubator bei 5% CO₂, wird das überschüssige Medium vorsichtig abgenommen. Anschließend werden die Zellen - wie bei der Migration - auf dem Matrigel ausgesät und können innerhalb der folgenden 18-24 h in Richtung des Chemoattraktanten in der unteren Kammer wandern.

2.6.3.3 Färben der Polykarbonatmembran

Bei Harvath (Harvath *et al.*, 1980) wurde erstmals eine Methode für Boyden Kammer Assays beschrieben, die darauf basiert, die nicht migrierten Zellen von der Membranoberfläche zu entfernen, die zur Unterseite durchgewanderten Zellen zu färben und unter einem Mikroskop auszu zählen. Über den Vergleich der Zellzahlen erhält man schließlich eine Aussage über die migrativen Eigenschaften von Zelllinien.

Zunächst wurden die Zellen auf der Membranunterseite in Methanol (100%) 10 min fixiert und anschließend mit einer Kristallviolettlösung (20,0% (v/v) Methanol, 0,5% (w/v) Kristallviolett) 10 min gefärbt. Nach mehrmaligen Waschen mit destilliertem Wasser konnte die Membran auf einem Objektträger mit einem Glasplättchen mit der glänzenden Seite nach oben fixiert und unter einem Mikroskop untersucht werden.

2.6.4 Fokusbildungstest

Um Proteine auf ihr onkogenes Potential zu testen, kann ein sog. Fokusbildungstest durchgeführt werden. Hierbei werden NIH3T3-Fibroblasten, die das zu untersuchende Protein nach Infektion exprimieren, auf die Bildung von Zellkolonien (Foci) hin beobachtet. Die Bildung dieser Foci beruht auf der Transformation der Fibroblasten, die dadurch ihre Kontaktinhibition verlieren. Je nach Anzahl und Größe der Foci, kann das onkogene Potential des Proteins als niedrig oder hoch eingeschätzt werden.

Die Infektion der NIH3T3-Fibroblasten erfolgte wie in 2.3.4 beschrieben mit virushaltigem Überstand von Phönix E-Zellen, die nach der Kalziumphosphatmethode transfiziert wurden. 36 h nach der Infektion wurden die Zellen auf 6 cm-Schalen umgesetzt und ab dem folgenden Tag alle 2 Tage für ca. 2 Wochen, bzw. bis sich Foci bildeten, mit frischem DMEM Medium mit 4% FBS versorgt. Als Positivkontrolle dienten HRas und v-Src infizierte NIH3T3, als Negativkontrolle mit Leervektor (pLXSN) infizierte Zellen. Waren eindeutige Foci zumindest bei der Postivkontrolle erkennbar, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Methanol fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und mit Wasser gewaschen (s. 2.6.4.3).

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung und Expression des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus

Die Fehlregulation von Tyrosinkinassen und -phosphatasen, die sowohl durch veränderte Expression als auch durch Mutationen des jeweiligen Gens hervorgerufen werden kann, spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung vieler Krankheiten. In dieser Arbeitsgruppe konnte eine noch nicht entdeckte Punktmutation in dem für den FGF Rezeptor 4 kodierenden Gen nachgewiesen werden (Bange *et al.*, 2002). Bei dieser Punktmutation handelt es sich um einen Austausch von Guanidin zu Adenosin an Position 1164 der Nukleotidsequenz und betrifft damit die Transmembranregion des FGFR4 an der Aminosäureposition 388. Das für die hydrophobe Aminosäure Glycin stehende Codon GGG wird hier in das für die stark hydrophile Aminosäure Arginin stehende Codon AGG überführt.

Punktmutationen in der Transmembrandomäne sind auch für den FGF Rezeptor 2 sowie den FGF Rezeptor 3 beschrieben worden. Sie sind äußerst selten und mit schweren Entwicklungsstörungen verbunden (Wilkie *et al.*, 1995). Auch für Neu, einem Mitglied der EGF Rezeptorfamilie, ist der Austausch von Alanin gegen Glutamat im Bereich der transmembranären Region bekannt, welche in Glioblastomen von Ratten gefunden wurde. (Bargmann and Weinberg, 1988). All diesen Veränderungen ist mit dem FGFR4 Arg388 Allel die Einführung einer stark geladenen Aminosäure in die hydrophobe Umgebung der Zellmembran gemeinsam (Abb. 9).

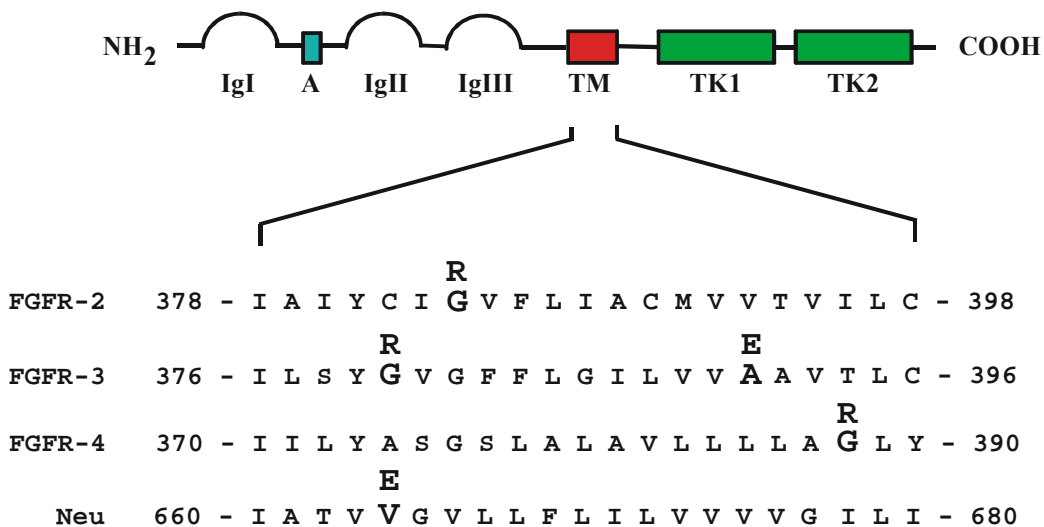


Abb. 9: Schematische Darstellung von RTK Transmembrandomänen.

Punktmutationen, die zu Veränderungen der Aminosäuresequenz und zu schweren Entwicklungsstörungen oder Krebs führen, sind hervorgehoben. Die jeweils neue Aminosäure ist darüber angegeben.

Aus in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen geht hervor, dass das FGFR4 Arg388 Allel bei Brustkrebspatientinnen mit einer deutlich reduzierten rezidivfreien Zeit korreliert ($p = 0.01$). Außerdem wurde das Arg388 Allel mit einer schlechteren Prognose bei Darmkrebs (Bange *et al.*, 2002) in Verbindung gebracht, sowie bei Patienten mit Weichteil-Sarkomen (Morimoto *et al.*, 2003), Plattenepithelkarzinomen aus der Mundrachenhöhle (Streit *et al.*, 2004) und Prostatakrebs (Wang *et al.*, 2004) als Faktor für eine schlechtere Überlebenschance ermittelt. Diese Beobachtungen legen eine Rolle des FGFR4 bei der Progression der Krebserkrankung nahe.

3.1.1 Expression des FGFR4 in Brustkrebszelllinien auf mRNA-Ebene

Die systematische Untersuchung der mRNA Mengen von Tyrosinkinasen und -phosphatasen in Tumorzellen kann wichtige Informationen über die Entstehung der Tumoren und ihre weitere Entwicklung liefern. Dies lässt sich am Beispiel der RTK HER2, deren Gen in 30% aller Brustkarzinome in mehr als einer Kopie vorkommt, beschreiben. Diese Genamplifikation führt zu einem erhöhten Spiegel an HER2 mRNA in den Tumorzellen. Untersuchungen ergaben, dass Patientinnen mit einer HER2 Genamplifikation früher ein Tumorrezidiv bilden und eine verkürzte Überlebenszeit haben (Slamon *et al.*, 1987).

Aus diesem Grunde wurde von P. Knyazev und Y. Cheburkin (d. AG) die Expressionsstärke von Tyrosinkinasen und -phosphatasen in 25 Brusttumor- und drei Brustepithel-Zelllinien (Hs578Bst, MCF-10A und Ac745) mit Hilfe von cDNA Arrays untersucht. Sie konnten zeigen, dass neben anderen RTKs besonders der FGFR4 in 30% der Tumorzelllinien stark bis sehr stark exprimiert ist. Diese Beobachtungen legen eine Rolle für den FGFR4 bei der Entstehung von Brusttumoren nahe.

In Abbildung 10 ist die relative Expression des FGFR4 in den untersuchten Zelllinien graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde der Genotyp der Zelllinien bzgl. der FGFR4-Allele durch PCR-Analyse und Restriktionsverdau identifiziert.

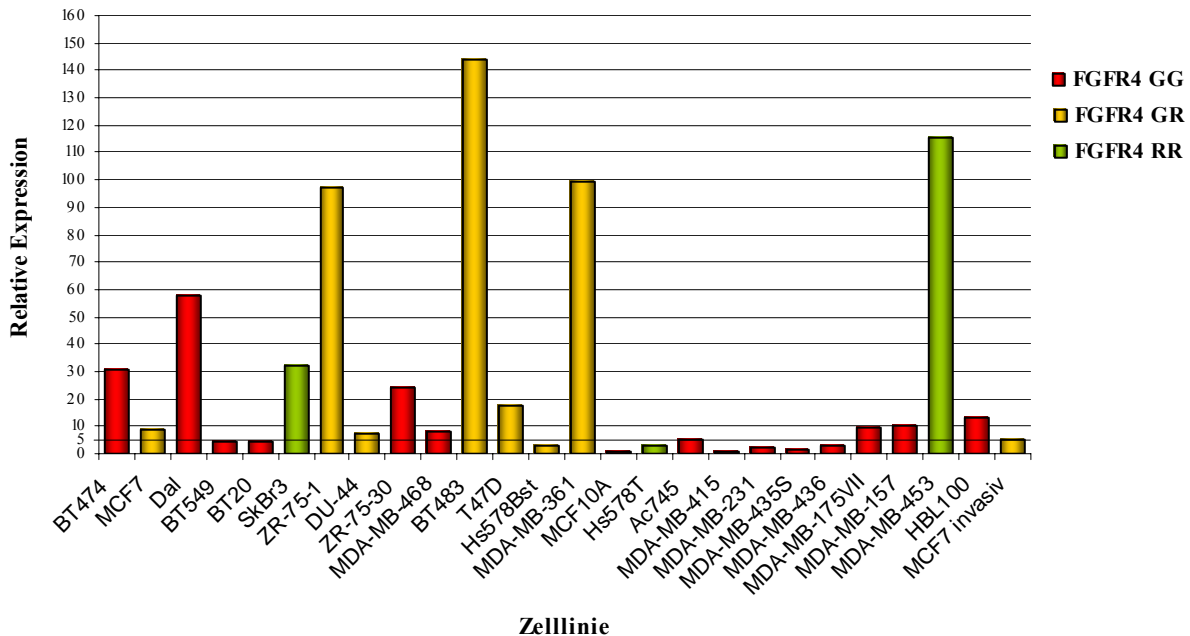


Abb. 10: cDNA-Filteranalyse der Genexpression des FGFR4 in verschiedenen Brustkrebszelllinien

cDNA-Filter wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus cDNA der entsprechenden Zelllinien hybridisiert. Die Werte der FGFR4-Expression wurden nach Subtraktion des Hintergrunds (pBluescript) gegen die Gesamtintensität aller Signale normalisiert (Array-Vision 5.1). Werte von 1-5 bedeuten keine Expression, 5-10 niedrige, 10-50 mittlere und 50-500 hohe Expression. Zusätzlich wurden anhand der genomischen DNA mittels PCR-Analyse die FGFR4-Allele – GG = homozygot Gly388, GR = heterozygot Gly/Arg, RR = homozygot Arg388 – in der jeweiligen Zelllinie bestimmt. Die Daten wurden von P. Knyazev und Y. Cheburkin ermittelt und zur Verfügung gestellt.

Invasive Zelllinien wie MDA-MB-231, -435S, -436 und MCF-7 („MCF-7 invasiv“) zeigen keinerlei FGFR4-Expression.

3.1.2 Expression des FGFR4 auf Proteinebene

Einige der Brustkrebszelllinien wurden zusätzlich auf die FGFR4-Expression auf Proteinebene hin untersucht. Die Werte aus den cDNA Arrays stimmen relativ gut mit den Expressionssignalen in der Western-Blot-Analyse überein (Abb. 11). Lediglich die Zelllinie BT474 gibt ein schwächeres Signal als erwartet.

Zusätzlich zu den Brustkrebszelllinien wurde die embryonale Nierenzelllinie HEK 293 in die Untersuchung aufgenommen, zumal diese im Laufe dieser Arbeit häufig als Expressionssystem für verschiedene FGFR4-Konstrukte gewählt wurde und deshalb der endogene Level an FGFR4 von Interesse war.

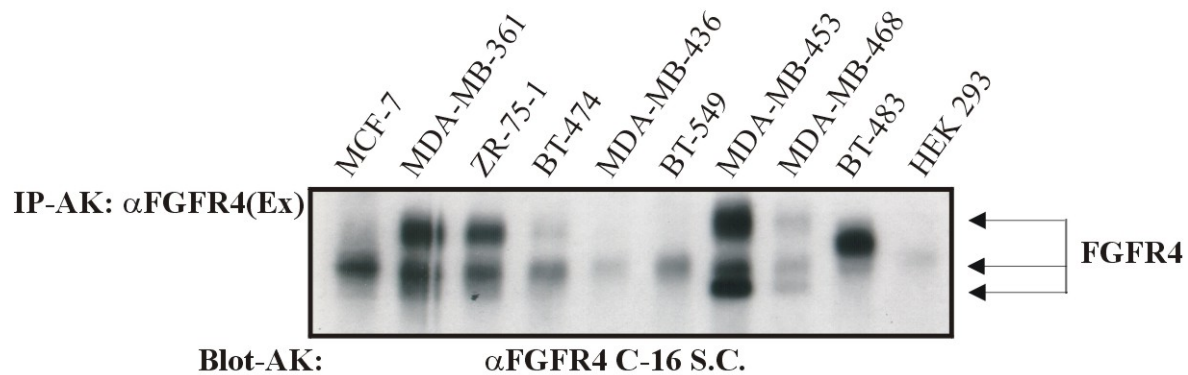


Abb. 11: Endogene FGFR4-Expression in verschiedenen Brustkrebszelllinien und HEK 293 Zellen

Je 800 µg Gesamtprotein wurden für eine Immunpräzipitation mit αFGFR4(Ex)-Antikörper eingesetzt. Die Proben wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit polyklonalem αFGFR4 C-16-Antikörper (Santa Cruz) im Western-Blot detektiert.

Auffallend ist das unterschiedliche Bandenmuster des Rezeptors in den Zelllinien, der sich - wie auch bei Partanen (Partanen *et al.*, 1991) beschrieben - meist als Doppelbande zeigt. Hierbei weist ein Rezeptor-Polypeptid ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 100 kD und das andere eines von etwa 116 kD auf. Möglicherweise ist dieser Unterschied bzgl. des Molekulargewichts in verschiedenen Glykosylierungs- und Phosphorylierungsgraden der Rezeptor-Polypeptide begründet. Das reine Proteinrückgrat des FGFR4 hat beispielsweise ein MW von nur 88 kD. (Partanen *et al.*, 1991) Möglicherweise handelt es sich aber auch um verschiedene Spleißvarianten, zumal die Zelllinien MDA-MB-453 und -468 sogar drei Rezeptorbanden aufweisen (s. Abb. 11). Für die Zelllinie MDA-MB-453 konnte in einem einfachen Versuch über die Abspaltung extrazellulärer Proteine bzw. Proteindomänen durch Trypsin (s. Abb. 12) gezeigt werden, dass die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht wie vermutet den membranständigen FGFR4 repräsentiert, der durch Liganden aktiviert werden kann.

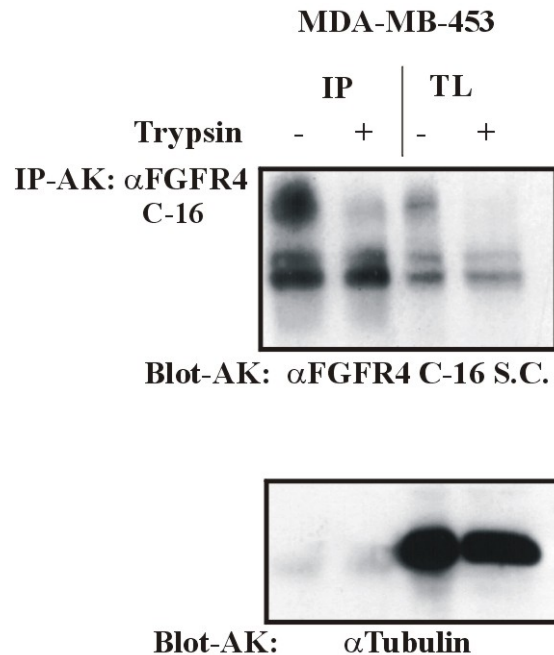


Abb. 12: Die höchste MW-Bande des FGFR4 repräsentiert den membranständigen Rezeptor

Zu 80% konfluente MDA-MB-453 Zellen wurden mit PBS gewaschen, 5 min in PBS-1x Trypsin bei 37°C inkubiert, anschließend in PBS aufgenommen und das Zellpellet abzentrifugiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen in PBS ohne Trypsin (-) inkubiert und ansonsten gleich behandelt. Nach der Lyse des Pellets wurde ein Teil des Lysats für eine Immunpräzipitation mit polyklonalem α FGFR4 C-16-Antikörper eingesetzt und ein Teil als Totallysat verwendet. Nach der Auftrennung der Proben über eine 7,5%ige SDS-PAGE wurde eine Western-Blot-Analyse ebenfalls mit α FGFR4 C-16-Antikörper durchgeführt. Gleiche Mengen Protein im Totallysat konnten im Kontrollblot mittels monoklonalen α Tubulin-Antikörpers nachgewiesen werden.

Die beiden Banden mit niedrigerem Molekulargewicht könnten - neben nicht membranständigen Spleißvarianten - noch nicht vollständig prozessierten oder nach der Aktivierung bereits internalisierten Rezeptor zeigen.

3.2 Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4

Um Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4 zu produzieren, wurde ein GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4 (Δ FGFR4-GST) verwendet, das in stabilen HEK 293T-Zellen (J. Bange) exprimiert wurde. Da Δ FGFR4-GST noch das Signalpeptid aber keine Transmembrandomäne mehr besitzt, wurde das Fusionsprotein aus den Zellen ausgeschleust und in das Medium abgegeben, so dass es aus diesem aufgereinigt werden konnte. Die folgende Abbildung 13 zeigt das Fusionsprotein in verschiedenen Fraktionen der Elution mit Glutathion-Puffer nach der Aufreinigung über FPLC:

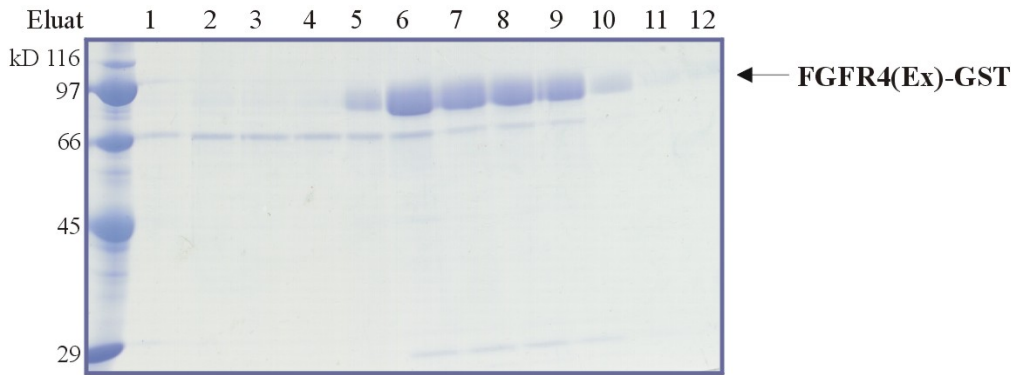


Abb. 13: Das FGFR4(Ex)-GST Fusionsprotein nach der FPLC-Aufreinigung

Dargestellt ist das aufgereinigte Fusionsprotein nach Auftrennung über ein 10%iges Gel mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau. Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Molekulargewichtstandards sind am linken Rand in kD angegeben.

Die Elutionen 5-10 wurden vereinigt und gegen 10% Glycerin zur Entfernung des Gluthations dialysiert. In dieser Form konnte das Fusionsprotein als Antigen zur Immunisierung eingesetzt werden.

Nach einer dreimaligen Immunisierung eines neuseeländischen Kaninchens konnte das Serum aus dem Blut des Kaninchens gewonnen und einem Spezifitätstest unterzogen werden, indem das Serum als Antikörper für eine FGFR4-Immunpräzipitation aus MDA-MB-453 Zelllysaten eingesetzt wurde. Abbildung 14 zeigt den FGFR4-Immunoblot des Experiments.

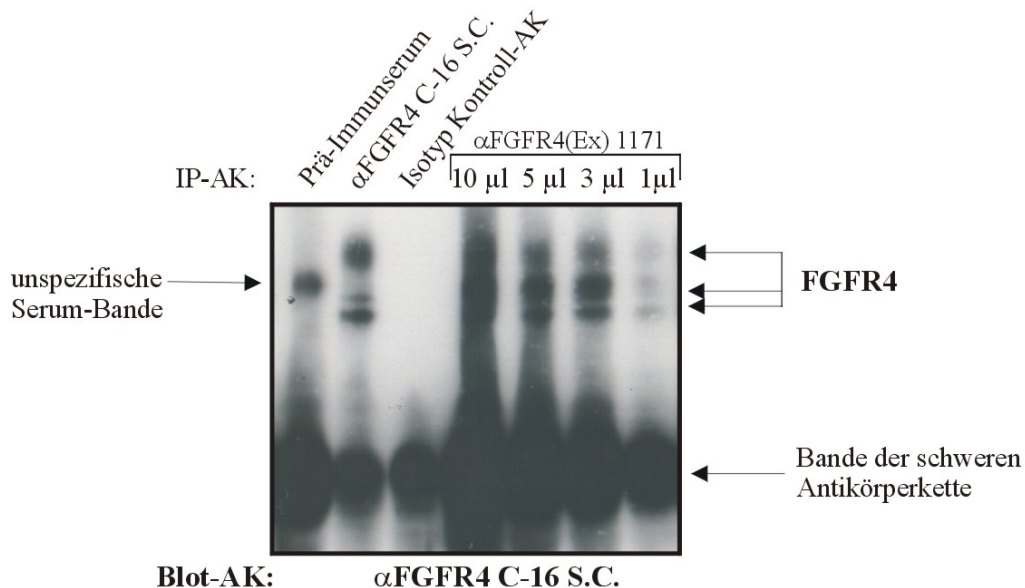


Abb. 14: Test des polyklonalen α FGFR4(Ex)1171-Antikörpers

800 μ g Gesamtprotein aus MDA-MB-453-Lysaten wurden für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Volumina von 10, 5, 3 und 1 μ l des polyklonalen FGFR4(Ex)-Antikörperserums, das gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4 gerichtet ist, wurden getestet. Als Negativkontrollen dienten 10 μ l Prä-Immuneserum des Kaninchens vor der Immunisierung und ein polyklonaler Antikörper gegen ein nicht-verwandtes Protein, der den gleichen Isotyp (IgG) wie α FGFR4(Ex) 1171 besitzt. Als Positivkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit α FGFR4 C16-Antikörper durchgeführt. Die Proben wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit polyklonalem α FGFR4 C-16-Antikörper (Santa Cruz) im Western-Blot detektiert.

Da bereits durch Zugabe von Prä-Immunsersum ein unspezifisches Signal etwa auf der Höhe des FGF Rezeptors 4 sichtbar war, das vermutlich durch dimerisierte Antikörper aus dem Serum zustande kommt, musste das FGFR4(Ex)-Antikörper-haltige Serum einer Affinitätschromatographie mit dem aufgereinigten Fusionsprotein FGFR4(Ex)-GST unterzogen werden. Zur Kontrolle der Affinitätschromatographie wurde eine Immunpräzipitation mit Lysaten der Zellen MDA-MB-453 durchgeführt, wobei verschiedene Mengen des gereinigten Antikörpers eingesetzt wurden, um die optimale Konzentration an Antikörper für eine Immunpräzipitation zu bestimmen. Abbildung 15 zeigt den FGFR4-Immuno-Blot.

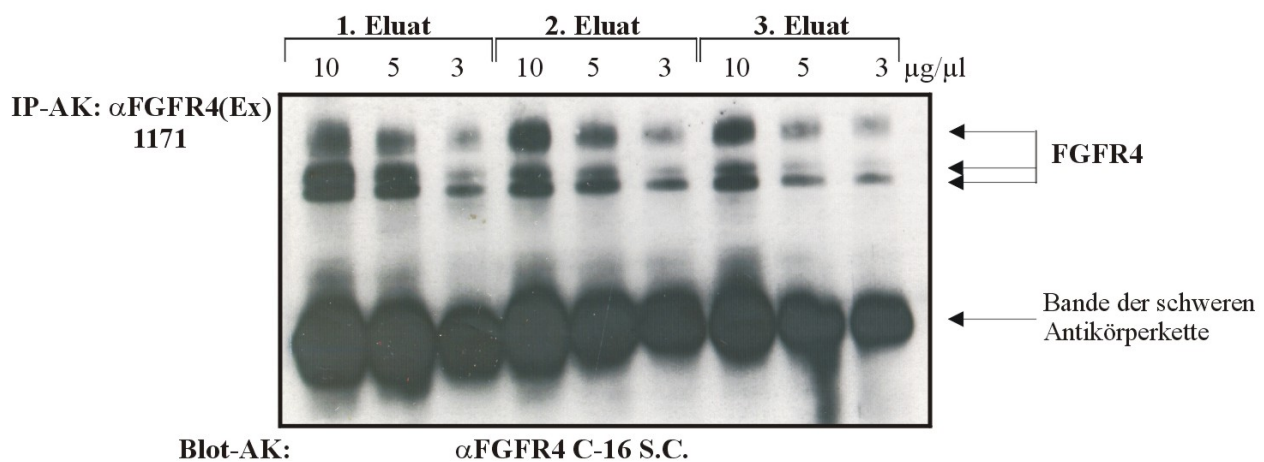


Abb. 15: Test des polyklonalen α FGFR4(Ex) 1171-Antikörpers nach der Reinigung über Affinitätschromatographie

800 µg Gesamtprotein aus MDA-MB-453-Lysaten wurden für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Konzentrationen von 3, 5 und 10 µg/µl polyklonalem α FGFR4(Ex)-Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4 gerichtet ist, wurden getestet. Die affinitätsgereinigten Antikörper stammen von drei aufeinanderfolgenden Elutionen. Die Proben wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit polyklonalem α FGFR4 C-16-Antikörper (Santa Cruz) im Western-Blot detektiert.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, erkennt der FGFR4(Ex) spezifisch den Rezeptor in MDA-MB-453 Zellen. Konzentrationen von 5 µg/µl aller drei Eluate sind für eine effiziente Immunpräzipitation ausreichend.

Um eine potentielle Funktionalität des Antikörpers in der Western-Blot-Analyse zu testen, wurden Immunpräzipitationen von FGFR4 aus MDA-MB-453 Zellen mit dem monoklonalen FGFR4 4FA6D10C3-Antikörper durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Nitrocellulosemembran anschließend mit drei verschiedenen Verdünnungen des Antikörpers FGFR4(Ex) 1171 inkubiert. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich wird, erkennt der Antikörper spezifisch den FGFR4 ab einer Verdünnung von 1:1000. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Antikörper stets in einer 1:500-Verdünnung eingesetzt.

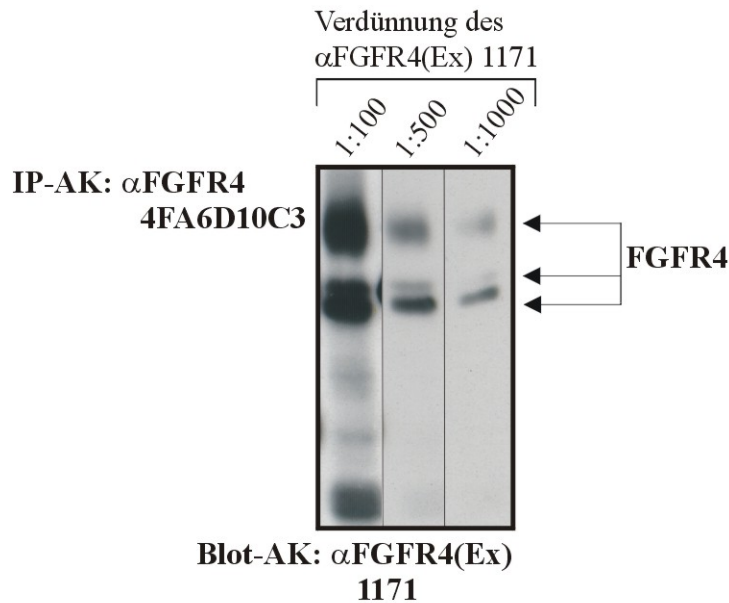


Abb. 16: Test des polyklonalen Antikörpers FGFR4(Ex) 1171 in der Western-Blot-Analyse

800 µg Gesamtprotein von MDA-MB-453-Lysaten wurden nach einer Immunpräzipitation mit monoklonalem αFGFR4 4FA6D10C3-Antikörper in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Western-Blot-Analyse wurde die Nitrozellulosemembran mit Verdünnungen von 1:100, 1:500 und 1:1000 des zu testenden Antikörpers FGFR4(Ex) 1171 inkubiert.

Die Spezifität des Antikörpers entspricht der des polyklonalen FGFR4 C-16-Antikörpers der Firma Santa Cruz.

3.3 Herstellung und Test FGFR4-spezifischer FGF-Liganden

FGF-8b ist eine der vier bei Menschen bisher identifizierten Isoformen des Liganden FGF-8. In vielen Brustkrebszelllinien konnte FGF-8b detektiert werden und es wurde gezeigt, dass NIH3T3-Zellen durch FGF-8b transformiert werden (MacArthur *et al.*, 1995a). Die FGF Rezeptoren 2IIIc, 3IIIc und 4 werden spezifisch von der Isoform FGF-8b aktiviert, wobei die Erstgenannten nicht in Brustkrebszellen vorkommen (Marsh *et al.*, 1999).

Der erste Ligand, der ausschließlich den FGFR4 aktiviert, ist FGF-19. Dieser wurde 1999 von Xie *et al.* entdeckt und als das bisher am weitesten entfernte Mitglied der FGF-Familie identifiziert. FGF-19 bindet mit hoher Affinität in Gegenwart von Heparin oder Heparansulfatproteoglykanen an FGFR4. Die Spezifität der Bindung ist durch einzigartige Sequenzmotive sowohl innerhalb des FGF-19 als auch des FGFR4 gegeben (Harmer *et al.*, 2004).

Da FGFR4 spezifisch durch diese beiden Liganden stimuliert wird, sollten sie im Rahmen dieser Arbeit in aktiver Form hergestellt werden.

3.3.1 FGF8b-GST

Der bereits klonierte FGF-8b (C. Stadler, Diplomarbeit 2001) wurde mittels eines bakteriellen Expressionssystems als GST-Fusionsprotein erzeugt. Die Aktivität des Liganden wurde durch Stimulation von MDA-MB-231 Zellen, die stabil FGFR4 exprimieren, überprüft. Dazu wurden gehungerte MDA-MB-231/FGFR4 G388 und - ~pLXSN als Negativkontrolle – für 10 min bei 37°C mit den in Abbildung 19 angegebenen Stimuli inkubiert. Nach der Zellyse und einer FGFR4 Immunpräzipitation konnte der Phosphorylierungsgrad des Rezeptors im Phosphotyrosin-Immunoblot bestimmt werden. Nach Entfernen des Phosphotyrosin-Antikörpers wurde die Membran mit FGFR4-Antikörperlösung inkubiert, um eine gleichmäßige FGFR4-Expression nachzuweisen. Abbildung 17 zeigt die FGFR4-Aktivierung durch FGF-8b-GST (ohne Zugabe von Heparin) im Vergleich zu FGF-1 und den dazugehörigen Expressionsblot. 500 ng/ml FGF8b-GST führen zu einer äquivalenten FGFR4-Phosphorylierung wie 10 ng/ml kommerzieller FGF-1.

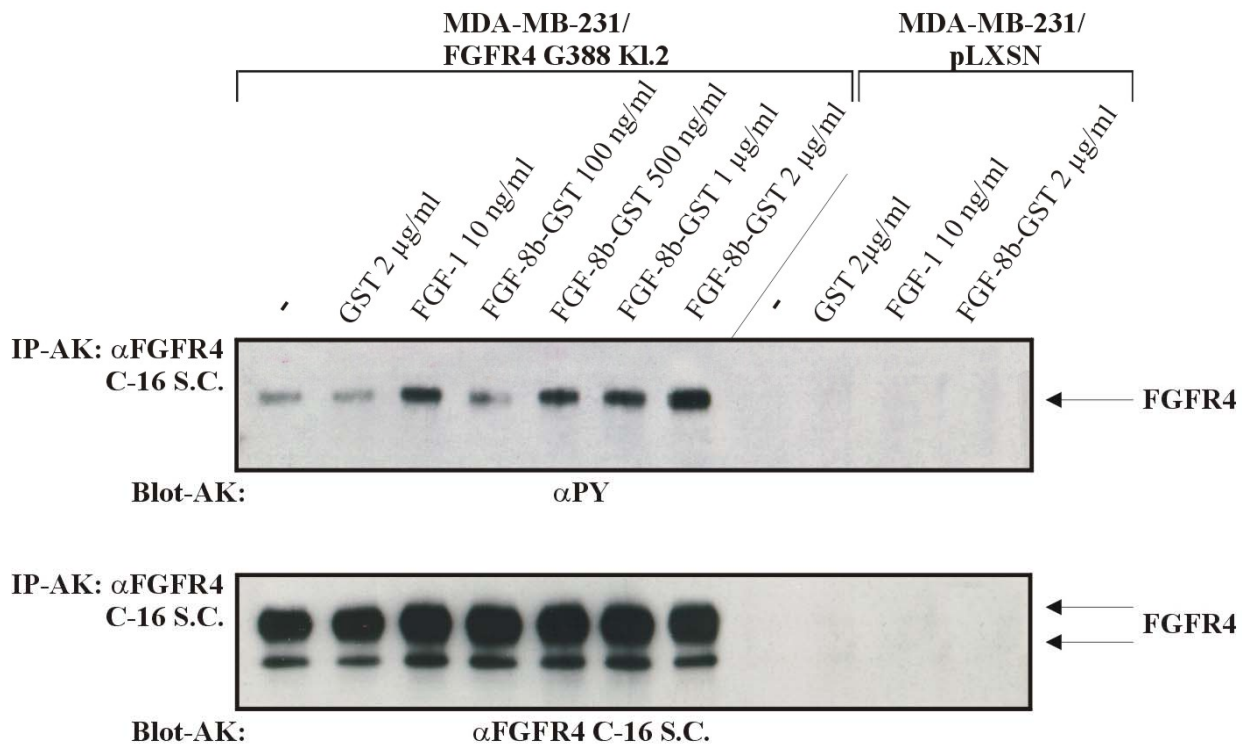


Abb. 17: Aktivitätstest des Liganden FGF8b-GST in MDA-MB-231/FGFR4- und ~pLXSN-Zellen

Stabil mit FGFR4 bzw. pLXSN-Leervektor infizierte MDA-MB-231 Zellen wurden bei 37°C für 10 min mit 2 µg/ml GST, 10 ng/ml FGF-1 oder FGF-8b-GST in Konzentrationen von 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert, FGFR4 durch polyklonalen αFGFR4 C-16-Antikörper (Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Proteine durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich eine Immunpräzipitation mit unstimulierten (-) Zellen durchgeführt. In der Western-Blot-Analyse ließ sich der Phosphorylierungsgrad des FGFR4 durch monoklonalen αPY-Antikörper detektieren. Die FGFR4-Expression konnte im Kontrollblot durch polyklonalen αFGFR4 C-16-Antikörper (Santa Cruz) bestätigt werden.

3.3.2 FGF-19 myc-6xHis

Zunächst wurde humaner FGF-19 aus cDNA der Colon-Adenokarzinomzelllinie SW480, die den Liganden zu einem stark erhöhten Level exprimiert (Xie *et al.*, 1999), amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide so gestaltet, dass der Ligand in Anlehnung an die Sequenz eines kommerziellen FGF-19 ohne potentiell Signalpeptid (AS 1-22) vervielfältigt wurde. Um eine möglichst hohe Aktivität und Spezifität des Liganden durch Prozessierung zu erlangen, wurden HEK 293 Zellen als eukaryontisches Expressionssystem gewählt wofür die Klonierung der FGF-19 cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pSecTag erfolgte. Dieser Vektor zeichnet sich neben einem C-terminalen myc- und 6xHis-tag insbesondere durch seine Igκ-Leitsequenz aus, die das Ausschleusen des Liganden aus der Zelle gewährleistet. Da HEK 293 Zellen später stabil mit dem Plasmid transfiziert werden sollten, wurde zur Erleichterung der Selektion das ursprüngliche Resistenzgen Zeozin durch Neomycin ersetzt (s. Abb. 7 in Material und Methoden). Eine Selektion mit Zeozin geht erfahrungsgemäß im Vergleich zu Neomycin sehr langsam vonstatten und liefert weit weniger eindeutige Ergebnisse.

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung wurden wie beschrieben HEK 293 Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und nach zwei Tagen für zwei Wochen mit 1 mg/ml G418 selektioniert. Nachdem einige der resistenten Zellkolonien zu monoklonalen Linien hochgezogen worden waren, konnten die Klone auf stabile Expression und Sezernierung des humanen FGF-19 hin untersucht werden. Dazu wurde sowohl das Lysat der Zellen als auch der Überstand für eine Immunpräzipitation mit His-Antikörper eingesetzt. Wie im Myc-Immunoblot in Abbildung 18 erkennbar, waren alle getesteten Klone positiv und sezernierten den Liganden ins Medium. Durch die Abspaltung der Leitsequenz erscheint der sezernierte FGF-19 myc-6xHis bei einem niedrigeren Molekulargewicht als der Ligand im Zytoplasma.

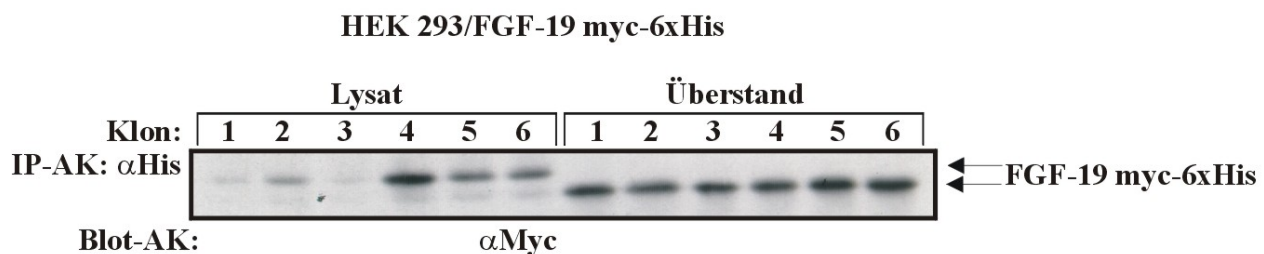


Abb. 18: Test der HEK 293/FGF-19 myc-6xHis Klone

HEK 293 Zellen wurden mit pSecTagB/FGF19 myc-6xHis transfiziert, für 14 Tage mit G418 selektioniert und anschließend als monoklonale Zellen hochgezogen. Von den Klonen wurden jeweils der Überstand, der den sezernierten Liganden enthalten sollte, und das Lysat für eine Immunpräzipitation mit polyklonalem αHis-Antikörper eingesetzt. Die Proben wurden durch 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit monoklonalem αMyc-Antikörper detektiert. Sezernierter FGF-19 myc-6xHis läuft aufgrund der Abspaltung der Igκ-Signalsequenz bei der Sekretion niedriger.

Zur Produktion des Liganden in größerem Maßstab wurde Klon 1 auf großen Zellkulturplatten herangezogen. Um bei der Aufreinigung über FPLC möglicherweise störendes Rinderserumalbumin auszuschließen, wurden die Zellen in Medium ohne FBS gehalten, das Medium am nächsten Tag geerntet und nochmals frisches Hungermedium auf die Zellen gegeben, welches wiederum am folgenden Tag gesammelt wurde. Nach Filtration und Zugabe von 2,5 µg/ml Benzoesäure - zum Verdau von DNA, die den Säulenfluss behindern kann - wurde der Ligand aus dem Medium über eine Cobalt-Matrix (BD TALON superflow metal affinity resin, BD Biosciences) in einer HR 5/5 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) mittels Affinitätschromatographie unter Zuhilfenahme des ÄKTA *explorers* gereinigt. Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen. Die folgende Abbildung 19 zeigt die Untersuchung der Fraktionen mit dem höchsten Peak bei 280 nm, von welchen je 30 µl aufgetragen wurden, in der Western-Blot-Analyse mit Myc-Antikörperlösung.

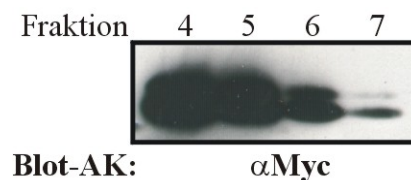


Abb. 19: FGF-19 myc-6xHis nach der Aufreinigung über FPLC

Je 30 µl der Fraktionen 4, 5, 6 und 7 des FGF-19 myc-6xHis-Eluats wurden in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und der Ligand in der Western-Blot-Analyse mit monoklonalem αMyc-Antikörper nachgewiesen.

Der Aktivitätstest des Liganden erfolgte durch Stimulation von L6-Rattenmyoblasten, die stabil FGFR4 exprimierten. Hierzu wurden die gehungerten Zellen für 10 min bei 37°C mit den in Abbildung 22 angegebenen Konzentrationen an Pervanadat, FGF-1, FGF-2 und FGF-8b-GST stimuliert und anschließend lysiert. Nach der Immunpräzipitation des FGFR4 und Auftrennung der Proben über SDS-PAGE, wurde der Phosphotyrosingehalt des FGFR4 im Phosphotyrosin-Immunoblot bestimmt. Nach Entfernen des Phosphotyrosin-Antikörpers und nachfolgender Inkubation der Membran mit FGFR4-Antikörperlösung konnte die Expression des Rezeptors gezeigt werden. Die stärkste Phosphorylierung zeigt sich bei Stimulation mit dem potenten Phosphataseinhibitor Pervanadat, gefolgt von FGF-19 myc-6xHis. Damit ließ sich die Aktivität des FGF-19 myc-6xHis bestätigen. Abbildung 20 zeigt das Signal des phosphorylierten FGFR4 im Phosphotyrosin-Immunoblot und den dazugehörigen FGFR4-Expressionsblot.

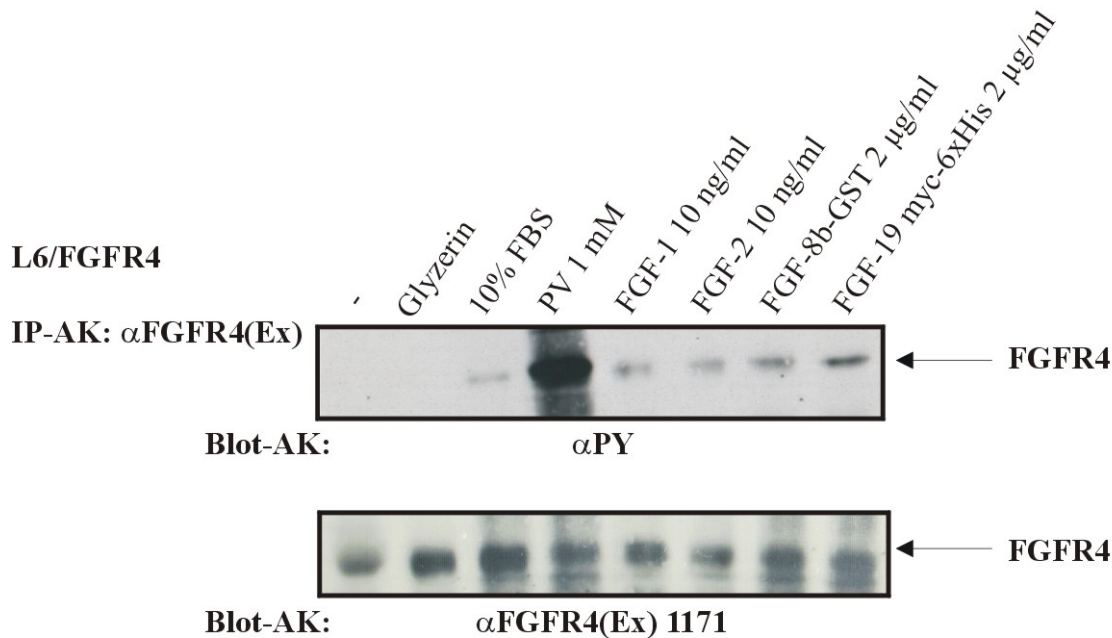


Abb. 20: Aktivitätstest und -vergleich des Liganden FGF-19 myc-6xHis

Stabile L6/FGFR4 Rattenmyoblasten auf 6-Lochplatten wurden für 24 h in DMEM/0% FBS gehungert. Die Stimulation erfolgte für 10 min bei 37°C mit 1 mM Pervanadat (PV), 10 ng/ml FGF-1, 10 ng/ml FGF-2, 2 μ g/ml FGF8b-GST oder 2 μ g/ml FGF-19 myc-6xHis. Als Kontrollen dienten unstimulierte (-), gehungerte Zellen, sowie mit Glycerin behandelte und in DMEM/10% FBS kultivierte Zellen. Nach der Lyse und FGFR4-Immünpräzipitation konnte die Phosphorylierung des Rezeptors in der Western-Blot-Analyse mit monoklonalem α PY-Antikörper nachgewiesen werden. Die FGFR4-Expression wurde anschließend im Kontrollblot mittels polyklonalen α FGFR4(Ex) 1171-Antikörpers detektiert.

FGFR4-Stimulationsexperimente wurden stets mit 2 μ g FGF-19 myc-6xHis ausgeführt.

3.4 Untersuchungen zur Signaltransduktion des FGF Rezeptors 4

Für die Aufklärung der Funktionsweise des gefundenen Polymorphismus im FGFR4 sind Informationen über die Signaltransduktion des Rezeptors von wesentlicher Bedeutung. Kenntnisse über potentielle Unterschiede in der Signalweiterleitung, die durch den Aminosäureaustausch hervorgerufen werden, könnten die Entwicklung eines spezifischen Therapeutikums ermöglichen. Allerdings ist bisher nur wenig über den intrazellulären Signalweg des FGFR4 bekannt. Die Schwierigkeit liegt in der vermutlich schwachen Kinaseaktivität des FGFR4 im Vergleich zu den anderen FGFRn. In FGFR4-stabil exprimierenden L6-Myoblasten konnte nach FGFR4-Aktivierung eine äußerst schwache Phosphorylierung der Map-Kinasen ERK-1 und ERK-2, des Adapterproteins SHC und der Phospholipase PLC γ (Wang *et al.*, 1994) gezeigt werden. In einer späteren Studie gelang es bei Überexpression eines myristylierten, konstitutiv aktiven FGFR4-Derivats, zusätzlich eine Aktivierung der Phosphatase SHP-2, der PI3-Kinase und der Transkrip-

tionsfaktoren STAT1 und 3 zu detektieren (Hart *et al.*, 2000). Eine Phosphorylierung dieser Signalübermittler durch FGF-Stimulation von myristiliertem Wildtyp-FGFR4 war nicht möglich.

In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, durch Überexpression verschiedener FGFR4-Konstrukte mit einem carboxyterminalen, elf Aminosäuren umfassendes Peptid aus dem grossen G-Protein des Vesikular Stomatitis Virus - einem sogenannten VSVtag - Interaktionspartner des FGFR4 zu identifizieren.

3.4.1 VSV-pull down in HEK 293 Zellen

Ein VSV-pull down eignet sich zur ersten Detektion von potentiellen Bindungspartnern eines Proteins. Da hierbei das zu untersuchende Protein künstlich überexprimiert wird, können zugleich für Interaktionen wichtige Bindedomänen durch Deletion entsprechender Bereiche ausfindig gemacht werden.

3.4.1.1 FGFR4-Konstrukte

Für den Versuch, mittels VSV-pull down Interaktionspartner des FGFR4 zu bestimmen, mussten zunächst diverse Varianten des FGFR4 in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3, der am 3'-Ende der *multiple cloning site* ein VSVtag mit nachfolgendem STOP-Codon trägt (J. Bange, d. AG), kloniert werden. Punktmutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen führen, wie der Austausch des für die ATP-Bindung essentiellen Lysins an Position 503 gegen Methionin - dies resultiert in dem dominant negativen FGFR4 K503M -, oder das Ersetzen der Tyrosine 642, 643, 719 und 754 durch Phenylalanin wurden wie in Material und Methoden beschrieben durch gezielte Mutagenese eingeführt. Die hier zu Phenylalanin mutierten Tyrosinreste entsprechen den in allen FGF Rezeptoren konservierten Tyrosinen. Nur diese Tyrosine sind autophosphorylierbar.

Durch Verdau mit Restriktionsenzymen oder PCR-Amplifikation wurden zudem diverse Deletionsmutanten kreiert, wie FGFR4 Δ Ex-TM, FGFR4 Δ Ex-TM K503M, FGFR4 Myr Δ Ex-TM, FGFR4 Δ TK1, FGFR4 Δ TK2. Die Mutante FGFR4 Δ intG388/R388 wurde von H.-J. Berger (d. AG) kloniert. Den mit „ Δ Ex-TM“ bezeichneten Mutanten fehlt die extrazelluläre und Transmembrandomäne von Aminosäure 1 bis 390. Das Myrsitilierungssignal im FGFR4 Myr Δ Ex-TM-Protein stammt aus Maus Src und wurde an das 5'-Ende der *multiple cloning site* des pcDNA3-Vektors kloniert (A. Weiss, d. AG). Bei „ Δ TK2“ wurde der Bereich nach der Kinasedomäne (KI) von Aminosäure 584 bis 802, also der Tyrosinkinasedomäne 2 und dem gesamten Carboxytermi-

nus entfernt. „ Δ TK1“ fehlen die Aminosäuren 464 bis 570, welche die Tyrosinkinasedomäne 1 umfassen; die Juxtamembrandomäne ist erhalten geblieben. Bei „ Δ int G388/R388“ sind nur noch die extrazelluläre und Transmembrandomäne von Aminosäure 1 bis 398 erhalten. Diese Mutante existiert in der Glycin (G388) und der Arginin (R388) Variante. „ Δ TM int-GST“ repräsentiert die extrazelluläre Domäne von Aminosäure 1-371. Diese Mutante wurde als Antigen zur Antikörperherstellung (3.2) und für Dimerisierungsstudien (3.5) verwendet.

In Abbildung 21 sind die verschiedenen Varianten des FGFR4-Proteins schematisch dargestellt.

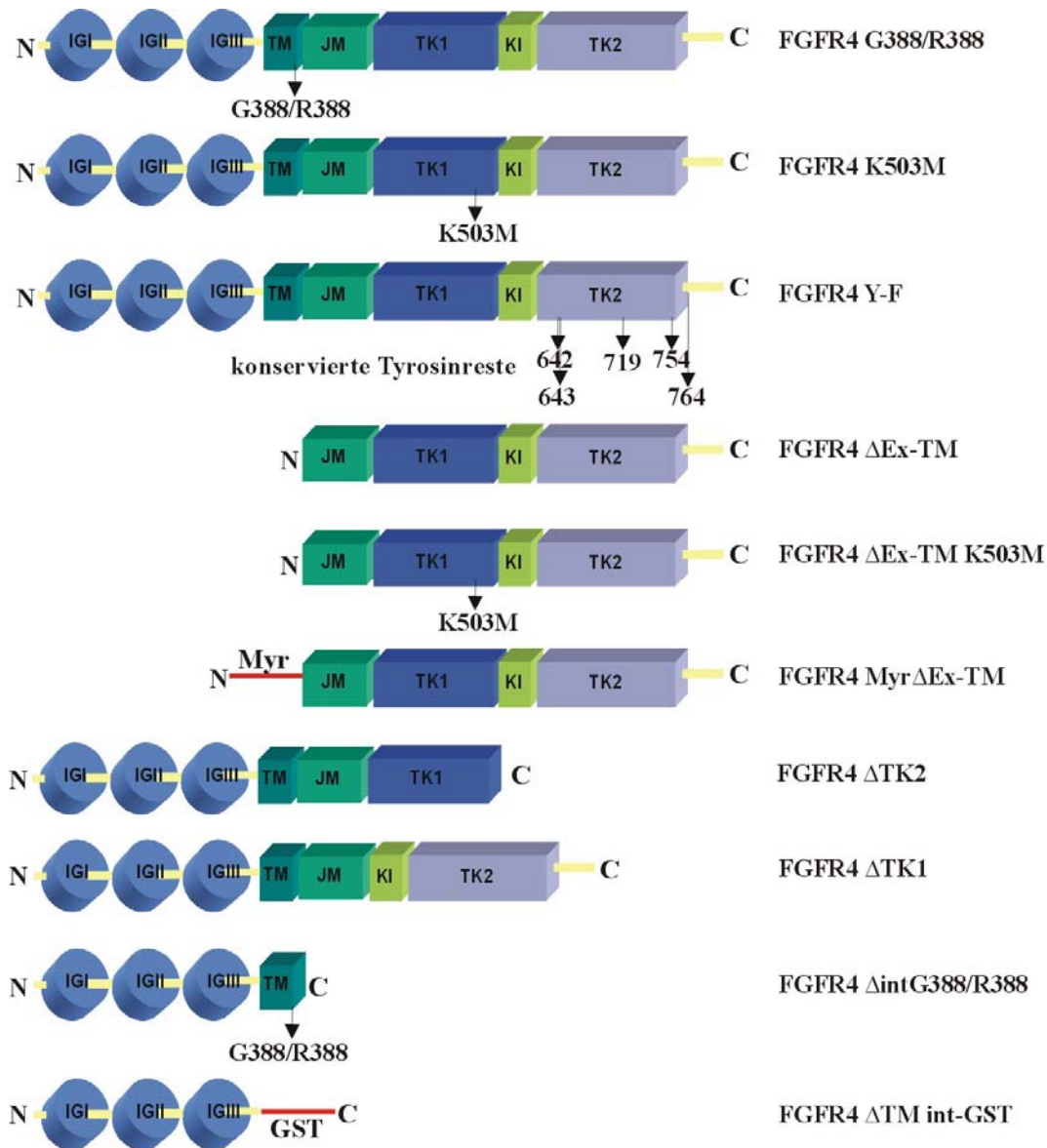


Abb. 21: Schematische Darstellung der verwendeten FGFR4-Konstrukte

C = Carboxyterminus, Ex = extrazelluläre Domäne, GST = Glutathion-S-Transferase, IG = Immunglobulin-domäne, int = intrazelluläre Domäne, JM = Juxtamembrandomäne, KI = Kinasedomäne, Myr = *msrc*-Myristilierungssignal, N = Aminoterminus, TK = Tyrosinkinasedomäne, TM = Transmembrandomäne
Aminosäuresubstitutionen und ihre Position in der Aminosäuresequenz sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.4.2 Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern durch radioaktive Markierung

Der Einbau von radioaktiv markiertem Methionin in Zellen stellt ein besonders sensitives System zum Nachweis von geringen Mengen an Bindungspartnern eines Proteins dar. Mit diesem Versuch können interagierende Proteine verschiedener Grösse sichtbar gemacht werden, um einen ersten Hinweis für weitere Untersuchungen zu geben.

Dieser Versuch wurde mit dem dominant negativen FGFR4 K503M, den Deletionsmutanten ohne extrazellulären- und Transmembranbereich (Δ Ex-TM) bzw. ohne Tyrosinkinasedomäne 1 (Δ TK1) oder 2 (Δ TK2) und den beiden natürlicher Weise vorkommenden Varianten mit Glycin oder Arginin in der Transmembrandomäne (G388/R388) durchgeführt. Nach einer Kalziumphosphat-Transfektion (s. Material und Methoden) wurden die HEK 293 Zellen in einem speziellen Medium, das kein Methionin enthält (MEM, Gibco), gehungert. Durch Zugabe von 35 S-markiertem L-Methionin und Inkubation für einige Stunden, konnten die Zellen den radioaktiven Schwefel bei der Translation in die Proteine einbauen. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen wie üblich lysiert. Vor der eigentlichen Immunpräzipitation mit VSV-Antikörper, der VSV-markierten FGFR4 mit dem daran gebundenen Proteinkomplex aus dem Lysat präzipitiert, wurden die Zelllysate einer Vorreinigung mit Protein-G-Sepharose ohne Antikörper unterzogen. Dadurch werden unspezifisch an Sepharose bindende Proteine aus dem Lysat filtriert und das Auftreten von falsch-positiven Banden minimiert, was besonders aufgrund der hohen Sensitivität dieses Experiments von Bedeutung ist. Nach der im Anschluß daran gefolgten VSV-Immunpräzipitation und mehrfachem Waschen der Sepharose, wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem das Gel unter Vakuum bei 80°C getrocknet worden war, wurde für mehrere Tage ein Röntgenfilm aufgelegt.

In diesem in Abbildung 22 gezeigten Autoradiogramm waren Banden mit einem scheinbaren MW von 108, 93, 83, 76, 68, 66, 60, 50, 44 und 40 kD detektierbar. Diese Proteinbanden erscheinen nicht in der Mock-Kontrolle, die von Zellen, die mit pcDNA3-Leervektor transfiziert wurden, stammt, was die Spezifität der Banden beweist. An die FGFR4 Deletionsmutante Δ Ex-TM binden zusätzlich einige Proteine von weniger als 40 kD, die nicht mit den anderen FGFR4-Proteinen präzipitiert wurden. Diese Proteine scheinen nur an FGFR4, der nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist, zu binden und wurden deshalb nicht weiter untersucht. Die prominenten Signale bei etwa 110, 93, 78 und 48 kD zeigen die verschiedenen FGFR4-Varianten.

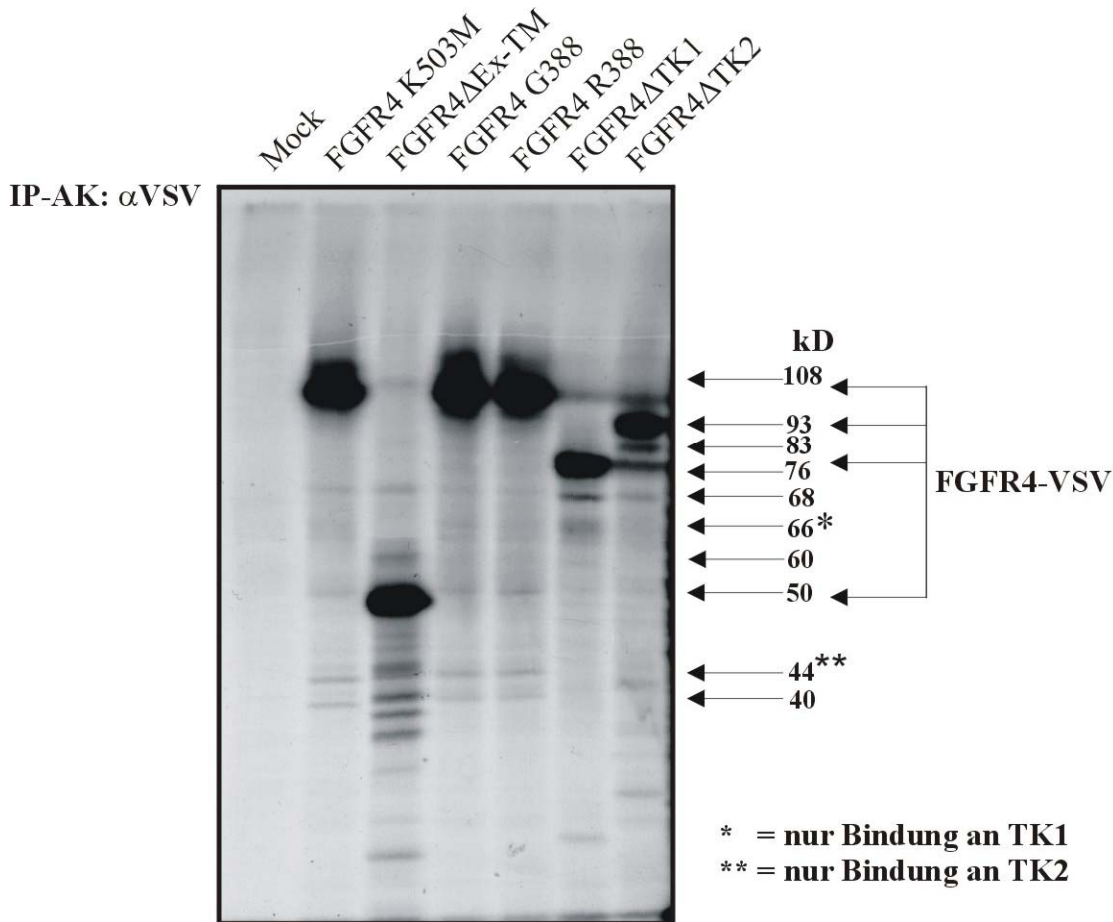


Abb. 22: Detektion von Interaktionspartnern des FGFR4 mittels L-[³⁵S]-Methionin Markierung von HEK 293 Zellen und VSV-pull down

HEK 293 Zellen wurden mit pcDNA3-VSVtag/FGFR4 K503M, -ΔEx-TM, -G388, -R388, -ΔTK1 und -ΔTK2 transfiziert. Als Negativkontrolle (Mock) diente eine Transfektion mit Leervektor. Am folgenden Tag wurde das DMEM/10% FBS-Medium durch Methionin-freies MEM/0% FBS ersetzt und nach vierstündiger Inkubation 40 μ Ci L-[³⁵S]-Methionin (NEN) pro ml Medium zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h wurden die Zellen lysiert und unspezifische Proteine durch Vorreinigung der Lysate mit Prä-Immunsereum und Protein-G-Sepharose entfernt. Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte mit monoklonalem α VSV-Antikörper. Im Anschluß an eine 10%ige SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilms für 40 h ein Autoradiogramm bei -80°C erstellt. Interaktionspartner erscheinen auf einer Höhe von etwa 108 kD, 93 kD, 83 kD, 76 kD, 68 kD, 66 kD, 60 kD, 50 kD, 44 kD und 40 kD

Überraschender Weise erscheint nur jeweils eine Bande nicht in den Deletionsmutanten der Tyrosinkinasedomänen. So scheint das 44 kD-Protein an Tyrosinkinasedomäne 1 zu binden, während das Protein von etwa 66 kD an Tyrosinkinasedomäne 2 bindet. Weiter fällt auf, dass durch den dominant negativen Rezeptor (K503M) die gleichen Proteine wie durch die aktiven Rezeptortypen (G388/R388) präzipitiert werden können. Dies deutet auf eine konstitutive Bindung der Proteine an den Rezeptor hin, so dass der Unterschied in der Aktivierung der Signalmoleküle liegen muss. Bei Präzipitation der Glycin-Variante sind die gleichen Proteine wie bei der Argi-

nin-Variante detektierbar. Vermutlich lässt sich die unterschiedliche Wirkung der beiden Varianten also nicht auf ein verändertes Bindungsverhalten zurückführen.

Im Folgenden sollten einige der hier präzipitierten Proteine identifiziert werden.

3.4.3 Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern durch Tyrosinphosphorylierung

Da durch die Methionin-Markierung nicht erkennbar wird, welche der interagierenden Proteine durch die Bindung an FGFR4 auch aktiviert werden, wurde bei diesem Versuch ein besonderes Augenmerk auf Tyrosin-phosphorylierte Proteine gelegt. Dies konnte durch einen VSV-*pull down* mit anschließender Western-Blot-Analyse und Detektion aktiver Proteinbindungspartner mittels eines Phosphotyrosin-Antikörpers realisiert werden. Auf diese Weise war es zum einen möglich, das Ergebnis der radioaktiven Methionin-Markierung zu verifizieren, zum anderen konnte vor allem gezeigt werden, dass alle gefundenen Proteine ausschließlich im Komplex mit aktivem FGFR4 phosphoryliert werden.

Bei der Durchführung des Experiments wurden folgende Rezeptorderivate eingesetzt: Zwei dominant negative Rezeptoren als Negativkontrollen, mit und ohne extrazellulären- und Transmembranbereich (FGFR4 K503M bzw. $\sim\Delta\text{Ex-TM K503M}$), die Deletionsmutante des normalen Rezeptors ohne extrazellulären- und Transmembranbereich ($\Delta\text{Ex-TM}$) und die beiden natürlichen Rezeptoren (G388 und R388). Nach Kalziumphosphat-Transfektion von HEK 293 Zellen, deren Lyse und darauffolgender Immunpräzipitation des FGFR4 mittels VSV-Antikörpers – FGFR4 entspricht hier den Banden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kD (FGFR4 in voller Länge) und 48 kD ($\Delta\text{Ex-TM}$) - wurden durch Tyrosinphosphorylierung aktivierte Proteine mit einem scheinbaren MW von 108, 95, 83, 76, 72, 68, 66, 60, 49 und 44 kD durch Phosphotyrosin-Antikörper identifiziert. Dies stimmt mit den durch radioaktive Methionin-Markierung erhaltenen Proteinbanden überein. Die Auftrennung des FGFR4-Proteinkomplexes und die Detektion der einzelnen Interaktionspartner im Phosphotyrosin-Blot sind in Abbildung 23 gezeigt.

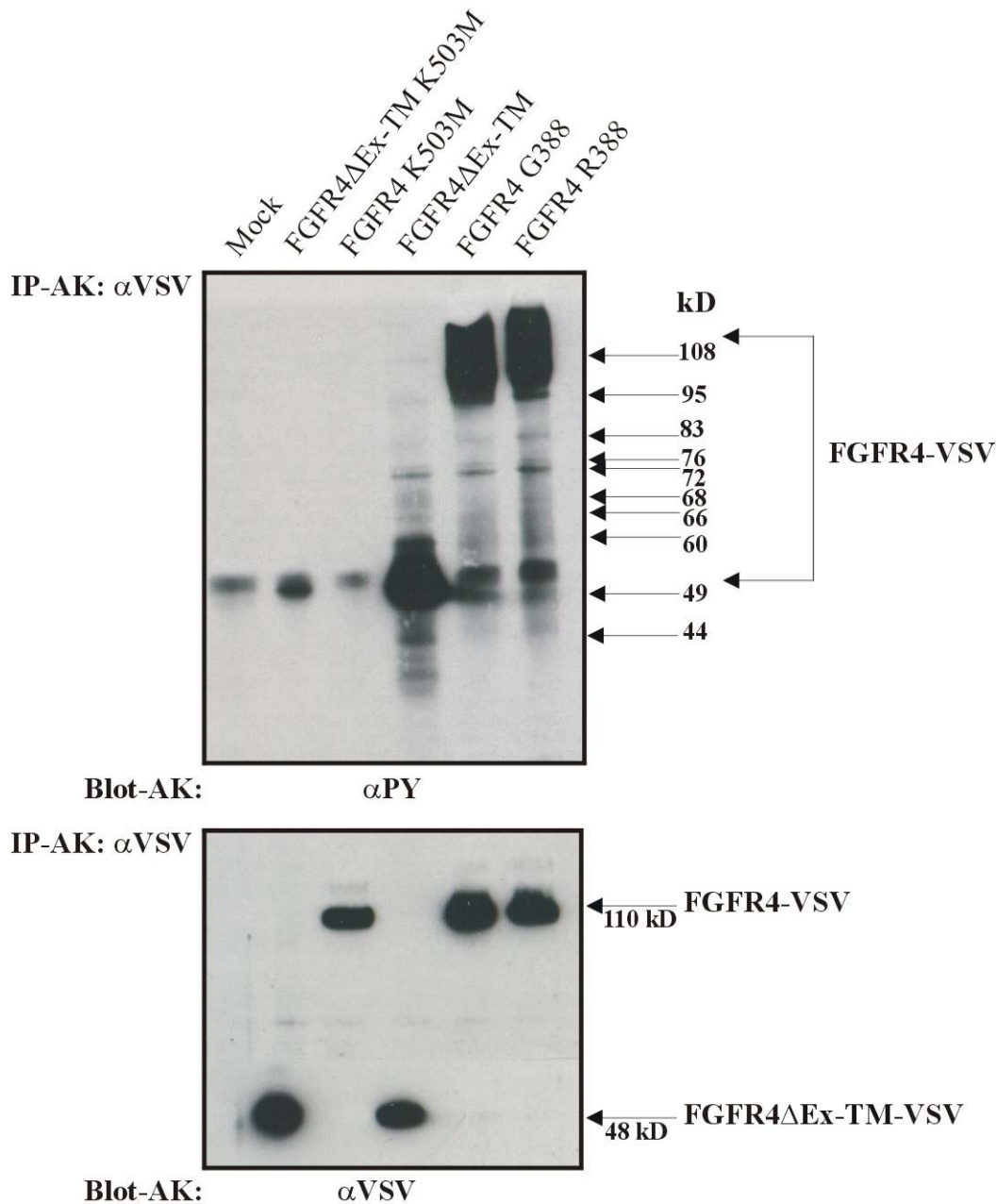


Abb. 23: FGFR4-VSV-pull down in HEK 293 Zellen zur Detektion von FGFR4-Interaktionspartnern

HEK 293 Zellen wurden mit pcDNA3-VSVtag/FGFR4 ΔEx-TM K503M, -K503M, -ΔEx-TM, -G388 und -R388 transfiziert. Als Negativkontrolle (Mock) diente eine Transfektion mit Leervektor. Nach der Lyse und Immunpräzipitation mit monoklonalem αVSV-Antikörper folgten eine SDS-PAGE in einem 7,5-12%igen Gradientengel und die Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Phosphotyrosinantikörper. Hierdurch konnten Assoziationspartner mit einem scheinbaren MW von ca. 108 kD, 95 kD, 83 kD, 76 kD, 72 kD, 68 kD, 66 kD, 60 kD, 49 kD und 44 kD detektiert werden. Die FGFR4-Expression wurde im Kontrollblot mittels monoklonalen αVSV-Antikörpers ermittelt.

In diesem Fall ließen sich bei den dominant negativen Rezeptoren keine Signale mehr erkennen. Dadurch konnte neben der Spezifität des *pull downs* auch die Bedeutung einer intakten ATP-Bindetasche für die Aktivierung der gebundenen Proteine erwiesen werden.

Während der Diplomarbeit (C. Stadler, 2001) wurde ein ähnlicher VSV-*pull down*-Versuch mit den beiden FGFR4-Deletionsmutanten FGFR4 Δ Ex-TM und \sim K503M durchgeführt. In diesem Versuch konnte die etwa 72 kD grosse Bande in einer zweiten Immunoblot-Analyse durch Entfernen des Phosphotyrosin-Antikörpers und Inkubation mit SHP-2-Antikörper als die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Im folgenden Abschnitt wurde die FGFR4-SHP-2-Wechselwirkung in einem endogenen System untersucht.

3.4.4 Endogene FGFR4-Interaktionen

Zur Überprüfung der eben genannten FGFR4-SHP-2-Wechselwirkung und zur Identifizierung weiterer Proteinbanden wurde eine Proteinsequenzierung der FGFR4-Interaktionspartner mit der MALDI-TOF Technologie durchgeführt. Dazu wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 gewählt, die hohe Mengen an FGFR4 exprimiert und die aufgrund einer konstitutiven Aktivierung des FGFR4, der hier homozygot in der R388-Variation vorliegt, keiner Stimulation bedarf.

Da für die Detektion von Proteinen durch Anfärben grössere Mengen als für eine Western-Blot-Analyse gebraucht werden, wurden für die FGFR4-Immunpräzipitation 16 mg Gesamtprotein eingesetzt. Zuvor wurde das Zelllysate in einer Vorreinigung ohne Antikörper, aber mit Protein-A-Sepharose, von unspezifisch an Sepharose bindenden Proteinen befreit. Nach der eigentlichen Immunpräzipitation mit FGFR4-Antikörper und Auftrennung der Vorreinigungs- und Immunpräzipitationsprobe in einem Gradientengel wurde das Gel in Rotiblu angefärbt. Durch Rotiblu werden nur Proteine und nicht das gesamte Gel gefärbt. Abbildung 24 zeigt das Gel bevor Proteinbanden für die Sequenzierung ausgeschnitten wurden.

Durch eine in der Abteilung für Proteinanalytik (AG Lottspeich) durchgeführte sog. MALDI-TOF, also eine Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie - TOF steht für „time-of flight“ - konnten neben SHP-2, das bei etwa 72 kD erscheint, zwei weitere Proteine identifiziert werden. Zum einen das Zinkfingerprotein 198 (ZNF198), welches bei ca. 170 kD läuft und die Phenylalanin-t-RNA Synthetase β -Untereinheit (HSPC173) mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 66 kD. Die markanten Banden bei etwa 50 und 95 kD repräsentieren Kaninchen Immunglobuline des IP-Antikörpers FGFR4(Ex). FGFR4 selbst läuft knapp unterhalb der höheren Immunglobulin-Bande. Die Sequenzierung anderer sichtbarer Proteinbanden blieb ergebnislos.

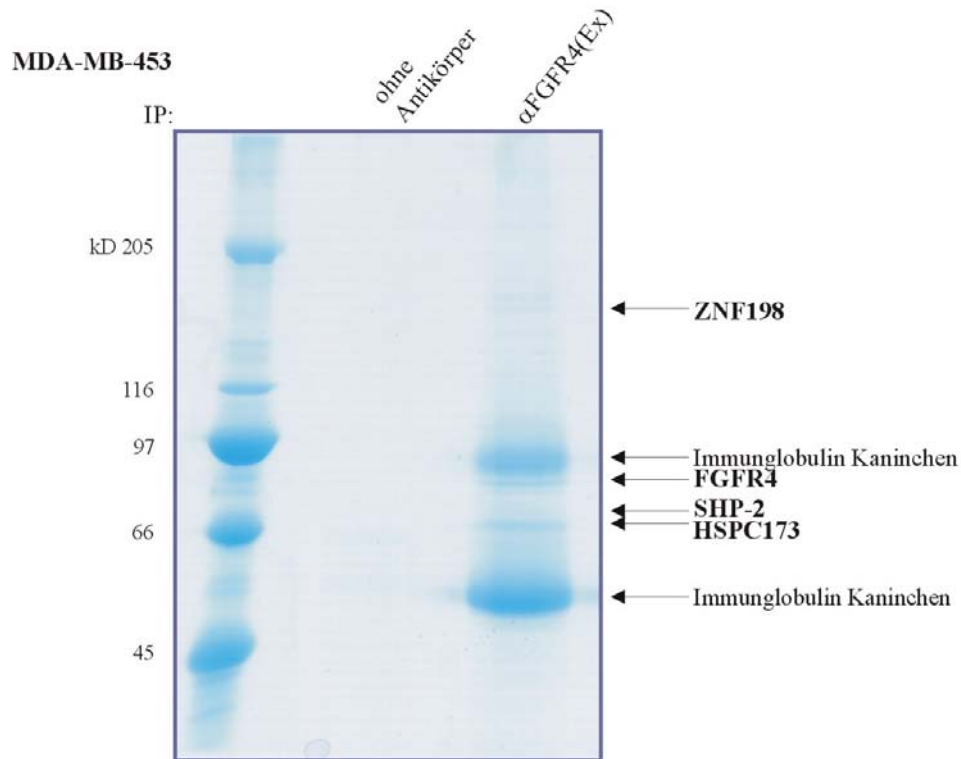


Abb. 24: Rotiblu-Färbung zur Proteinsequenzierung mittels MALDI-TOF

16 mg Gesamtprotein von MDA-MB-453 Zelllysaten wurden zunächst mit Protein-A-Sepharose ohne Antikörper für 3 h vorgereinigt und anschließend für eine FGFR4-Immunpräzipitation eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proben in einem Gradientengel wurde das Gel mit Rotiblu angefärbt. Proteinbanden wurden für eine MALDI-TOF Massenspektroskopie ausgeschnitten und analysiert (Kooperation mit AG Lottspeich). Identifizierte Proteine sind mit einem Pfeil markiert. Molekulargewichtstandards befinden sich am linken Rand.

Weiterführende Untersuchungen zu den FGFR4-Interaktionen mit HSPC173 und ZNF198 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr unternommen werden.

3.4.4.1 SHP-2 bindet an aktivierten FGFR4

Nachdem eine endogene Interaktion zwischen FGFR4 und SHP-2 durch Sequenzierung bestätigt werden konnte, war die Bedeutung eines aktiven Rezeptors für die Bindungsfähigkeit von Interesse. Um eine Aktivierungs-abhängige Bindung nachweisen zu können, wurden MDA-MB-453 Zellen mit dem FGFR- und VEGFR-Inhibitor SU5402 (3-[(3-(2-Carboxyethyl)-4-Methylpyrrol-2-yl)methylen]-2-Indolinon) inkubiert, welcher durch Anlagerung an die ATP-Bindestelle eine Konformationsänderung und damit die Inaktivierung der RTKn bewirkt (Mohammadi *et al.*, 1997). Bereits eine Inkubation der Zellen mit 20 μ M des Inhibitors für 15 min verhindert eine Phosphorylierung des FGFR4.

Für den Versuch wurden MDA-MB-453 Zellen bis zu 70%-Konfluenz kultiviert und für 24 h ohne Serum kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde mit dem Inhibitor SU5402 behandelt, während die andere Hälfte lediglich gehungert wurde. Nach der Zelllyse wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt, d.h. FGFR4 wurde mittels Antikörper präzipitiert und im Immunoblot auf eine Wechselwirkung mit SHP-2 mit Hilfe eines spezifischen SHP-2-Antikörpers hin überprüft. In Abbildung 25 lässt sich im SHP-2-Immunoblot die Bindung der Phosphatase an aktivierten FGFR4 erkennen. Die Inaktivierung des Rezeptors durch den Inhibitor ist, wie im Phosphotyrosin-Blot ersichtlich vollständig und verhindert die Bindung von SHP-2. Zusätzlich ist in diesem Blot ausschließlich in der Immunpräzipitation des aktiven FGFR4 eine phosphorylierte Bande bei etwa 72 kD zu sehen, die vermutlich von aktiviertem SHP-2 stammt. Noch zwei weitere Banden mit einem scheinbaren MW von ca. 80 und 85 kD treten hervor, die allerdings nicht identifiziert werden konnten. Durch SHP-2 Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse konnte eine gleichmäßige Expression in inhibierten wie in unbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

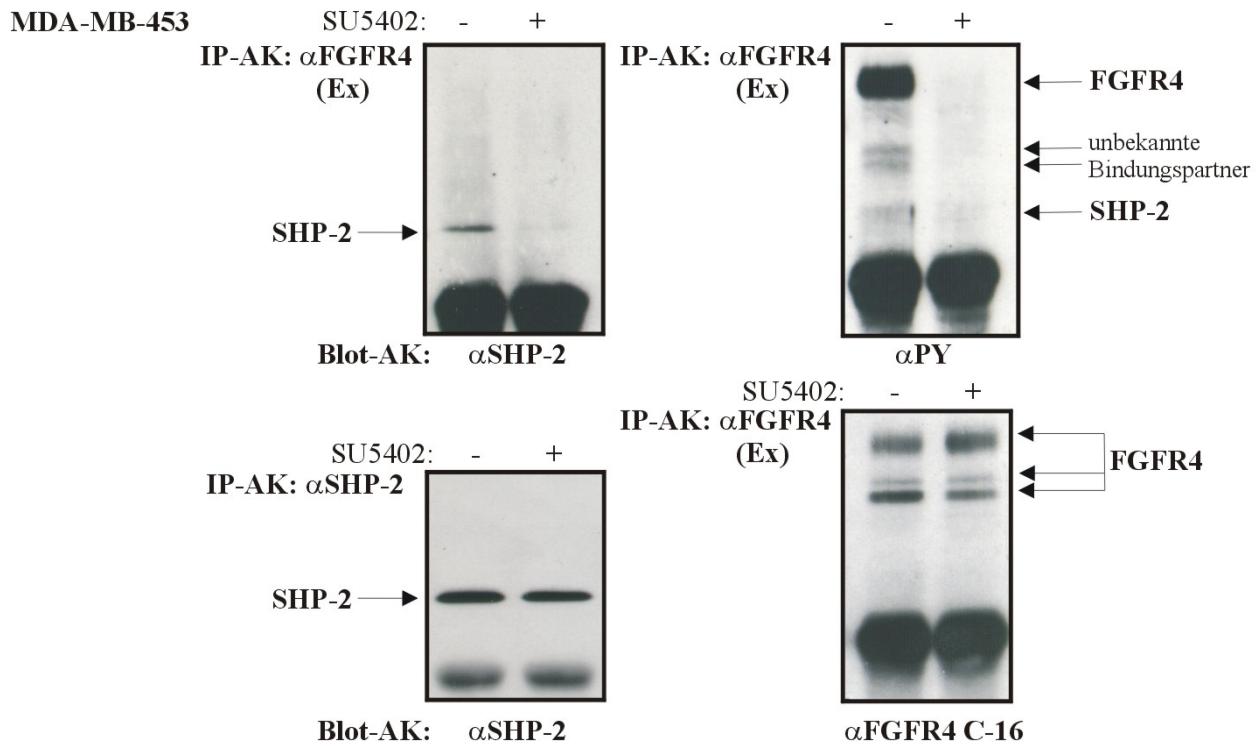


Abb. 25: Endogene Interaktion von FGFR4 und SHP-2 in MDA-MB-453-Brustkrebszellen

MDA-MB-453 Zellen wurden bis zu ca. 70% Konfluenz angezogen und für 24 h in L-15/0% FBS-Medium gehungert. Die Hälfte der Zellen wurde mit 20 μ M Tyrphostin SU5402 für 15 min bei 37°C zur Inhibierung des FGFR4 inkubiert und anschließend lysiert. Nach der Immunpräzipitation mit polyklonalem α FGFR4(Ex) bzw. monoklonalem SHP-2-Antikörper und Western-Blot-Analyse konnte eine Interaktion zwischen aktivem FGFR4 und SHP-2 durch polyklonalem α SHP-2-Antikörper nachgewiesen werden. Die Kontrollblots zeigen die FGFR4 und SHP-2 Expression - detektiert mit polyklonalem α FGFR4(Ex)- oder respektive α SHP-2-Antikörper - und die FGFR4-Phosphorylierung bzw. die erfolgreiche Inhibierung des Rezeptors - gezeigt mit monoklonalem α PY-Antikörper.

3.4.5 Einfluss der PTP SHP-2 auf die Phosphorylierung des FGFR4

Nach der Bestätigung einer endogenen Bindung der beiden Proteine war die Wirkungsweise der Phosphatase auf die Kinase von Interesse. Da Proteintyrosinphosphatasen im Wesentlichen ihre Bindungspartner an Tyrosinresten dephosphorylieren, sollte der FGFR4-Phosphorylierungsgrad bei Koexpression des FGFR4 in HEK 293 Zellen mit Wildtyp-SHP-2 (WT) im Vergleich mit dominant negativem SHP-2 (C/S) untersucht werden. Die Inaktivierung der Phosphatase ist durch den Austausch der Aminosäure Cystein zu Serin im aktiven Zentrum des Proteins gewährleistet.

Für den in Abbildung 26 gezeigten Versuch wurde der überexprimierte FGFR4-VSVtag mit VSV-Antikörper präzipitiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Tyrosinphosphorylierung im Immunoblot mittels Phosphotyrosin-Antikörperlösung untersucht. Nach Entfernen des Phosphotyrosinantikörpers von der Membran folgte eine zweite Inkubation mit VSV-Antikörperlösung. Hierdurch konnte die gleichmäßige Expression der beiden FGFR4-Varianten G388 und R388 gezeigt werden. Durch Auftrennung von Totallysatproben und Immunoblot-Analyse mit SHP-2-Antikörperlösung wurde die Expression von sowohl überexprimiertem als auch endogenem SHP-2 deutlich gemacht.

Da HEK 293 Zellen auch endogen SHP-2 exprimieren, konnte ein Einfluss der Phosphatase auf die FGFR4-Phosphorylierung in der Negativkontrolle (-) nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wird aus Abbildung 28 ersichtlich, dass FGFR4 bei Koexpression mit katalytisch inaktivem SHP-2 (C/S) eine deutlich stärkere Tyrosinphosphorylierung aufweist. Wildtyp SHP-2 wirkt demnach negativregulatorisch auf den FGFR4-Signalweg durch Dephosphorylierung.

Im Immunoblot der Totallysatproben wird deutlich, dass SHP-2 C/S stärker exprimiert wurde als SHP-2 WT. Demnach wäre der dephosphorylierende Effekt von SHP-2 WT auf den FGFR4 bei gleicher Expressionsstärke wie SHP-2 C/S vermutlich noch deutlicher als hier gezeigt werden konnte.

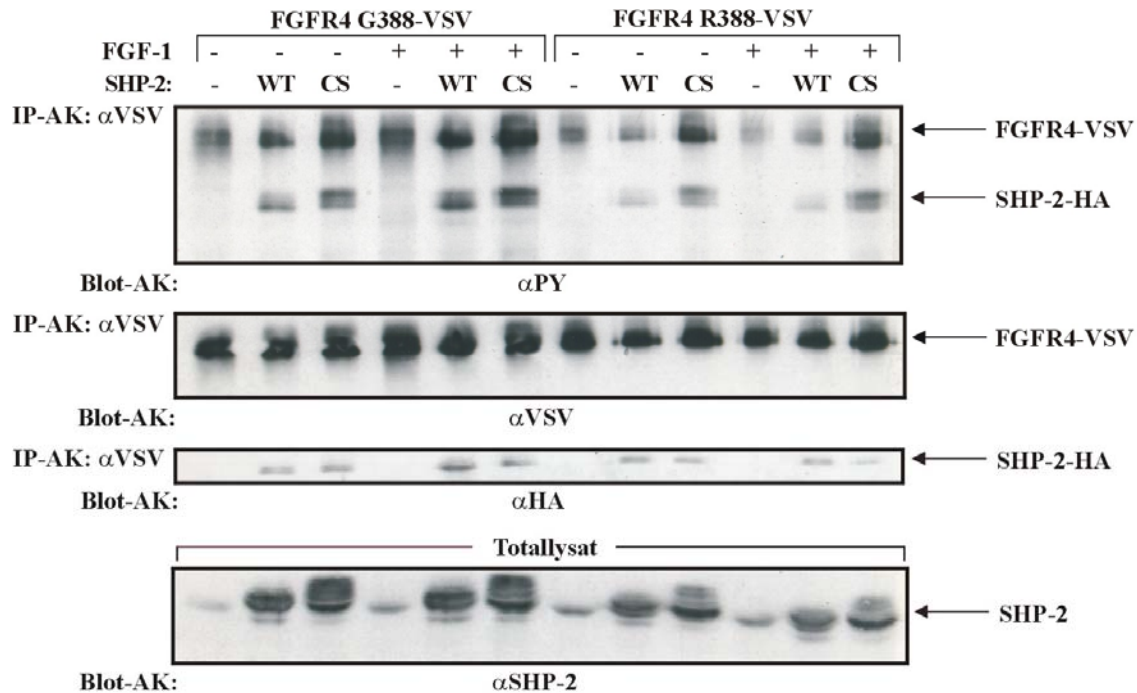


Abb. 26: SHP-2 dephosphoryliert den FGF Rezeptor 4 im Überexpressionssystem

HEK 293 Zellen auf 6-Lochplatten wurden in einem zweifachen Ansatz mit pcDNA3-VSVtag/FGFR4 G388 bzw. R388 und pRK5 RS-HAtag/SHP-2 WT bzw. ~ C/S kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente eine KoTransfektion mit pRK5 RS Leervektor und FGFR4. Nach 24-stündiger Inkubation in DMEM/0% FBS wurde die Hälfte der Zellen mit 10 ng/ml FGF-1 für 10 min bei 37°C stimuliert. Im Anschluß an die Lyse wurde der Phosphotyrosingehalt des FGFR4 nach Immunpräzipitation und Western-Blot mit monoklonalem α PY-Antikörper analysiert. Die Expression des FGFR4 wurde im Kontrollblot durch monoklonalen α VSV-Antikörper, die Bindung von SHP-2-HA an den Rezeptor in einem α HA-Immunoblot überprüft. Die Expression von SHP-2-HA wurde im Totallysat mittels polyklonalen α SHP-2-Antikörpers - statt α HA - in der Western-Blot-Analyse gezeigt, um auch endogenes SHP-2 zu detektieren.

Bemerkenswert ist auch die stärkere Dephosphorylierung der FGFR4 R388-Variante verglichen mit der G388-Variante. Möglicherweise zeigt sich hier ein Unterschied im Signal der beiden Varianten. Auch die im vorherigen Abschnitt gezeigte Interaktion zwischen FGFR4 und SHP-2 zeigt sich noch einmal deutlich durch eine bei etwa 72 kD laufende Bande im Phosphotyrosin-Immunoblot, die nach Entfernen des Phosphotyrosinantikörpers und einer zweiten Inkubation der Membran mit HA-Antikörperlösung als SHP-2-HA identifiziert werden konnte. Die Stimulation mit FGF-1 hat in diesem Überexpressionssystem keinen Einfluss auf die Phosphorylierung, zumal durch die hohe Anzahl an Rezeptoren in der Plasmamembran eine Autophosphorylierung durch spontane Dimerisierung nicht zu verhindern ist. Auch durch Transfektion geringster Konzentrationen FGFR4 (50 ng/ μ l) konnte die Basalphosphorylierung nicht ausgeschaltet werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.6 FGFR4 interagiert mit PLC γ

Eine direkte Interaktion zwischen PLC γ und FGFR1 ist bereits seit längerem bekannt. Dabei konnte der Tyrosinrest 766 als Bindungsstelle für die SH2-Domäne der PLC γ identifiziert werden (Mohammadi *et al.*, 1991). Auch eine leichte PLC γ -Phosphorylierung durch FGFR4-Aktivierung wurde gezeigt (Wang *et al.*, 1994).

3.4.6.1 PLC γ bindet an Y754 des FGFR4

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine direkte Bindung von PLC γ an FGFR4 in MDA-MB-231 Zellen, die stabil FGFR4 G388 bzw. R388 oder Mutanten der konservierten Tyrosine Y642, 643, 719, 754 und 764 exprimieren, nachgewiesen werden.

Hierzu wurden die genannten stabilen MDA-MB-231 Zellen in 10% FBS Medium kultiviert, lysiert und die Zelllysate für eine FGFR4-Immunpräzipitation eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurde die Nitrozellulosemembran knapp oberhalb des Molekulargewichtstandards bei 116 kD durchtrennt, so dass die untere Membran mit FGFR4-Antikörper und die obere mit PLC γ -Antikörper inkubiert werden konnte. Wie in Abbildung 27 eindeutig zu sehen ist, findet die beschriebene Interaktion tatsächlich statt und zwar über Tyrosin 754, das dem Tyrosinrest 766 im FGFR1 entspricht. Eine Zelllinie, die FGFR4 Y764F stabil exprimiert, stand nicht zur Verfügung, weshalb die Doppelmutante FGFR4 Y754/764F lediglich als Bestätigung für die Bindung über Y754 anzusehen ist.

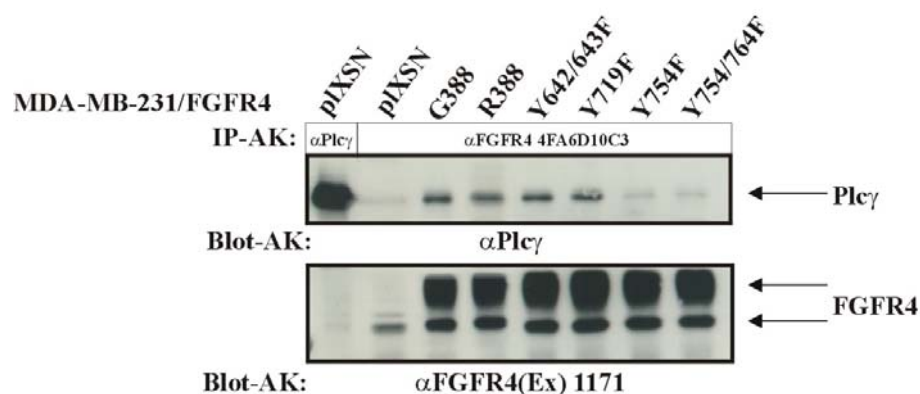


Abb. 27: Die Interaktion zwischen PLC γ und FGFR4 erfolgt über Y754 des FGFR4

MDA-MB-231 Zellen, die stabil FGFR4 G388, R388 bzw. die Tyrosin-Phenylalanin-Austauschmutanten Y642/643F, Y719F, Y754F oder Y754/764F exprimieren, und MDA-MB-231 Zellen, die mit pLXSN-Leervektor infiziert worden waren, wurden auf 10 cm-Schalen zu 80% Konfluenz in RPMI/10%-Medium angezogen. Nach Lyse und Immunpräzipitation mit monoklonalem α FGFR4-Antikörper bzw. monoklonalem α PLC γ -Antikörper als Positivkontrolle wurden die Proben in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western-Blot-Analyse konnte zum einen durch monoklonalen α PLC γ -Antikörper PLC γ als FGFR4-Interaktionspartner identifiziert werden, zum anderen durch polyclonalen α FGFR4(Ex) 1171-Antikörper die erfolgreiche Präzipitation des Rezeptors bewiesen werden.

3.4.6.2 PLC γ bindet nur an aktiven FGFR4

In MDA-MB-453 Zellen konnte durch Inhibierung der FGFR4 Aktivität mittels 20 μ M SU5402 für 15 min gezeigt werden, dass eine FGFR4-PLC γ Bindung nur bei aktiviertem Rezeptor erfolgt. Dazu wurden die Zellen gehungert, eine Hälfte wurde mit dem Inhibitor inkubiert, die andere direkt zur Lyse eingesetzt. Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern gegen FGFR4, VSV - dieser Antikörper besitzt den gleichen Isotyp wie der monoklonale FGFR4-Antikörper und diente als Spezifitätskontrolle - und PLC γ . Nach der Auftrennung über SDS-PAGE konnte in der in Abbildung 28 dargestellten Western-Blot-Analyse ein PLC γ Signal in der Probe mit aktivem FGFR4 und den beiden PLC γ -Immunpräzipitationen detektiert werden, während die Proben mit inaktivem FGFR4 und den Kontroll VSV-Immunpräzipitationen kein Signal aufweisen. Im FGFR4-Immunoblot wurde die gleichmäßige FGFR4 Präzipitation gezeigt. Durch Entfernen des FGFR4-Antikörpers und Inkubation mit Phosphotyrosin-Antikörperlösung konnte die erfolgreiche Inaktivierung des FGFR4 durch SU5402 bzw. der Phosphorylierungsgrad des Rezeptors in den nicht behandelten Zellen dokumentiert werden.

MDA-MB-453

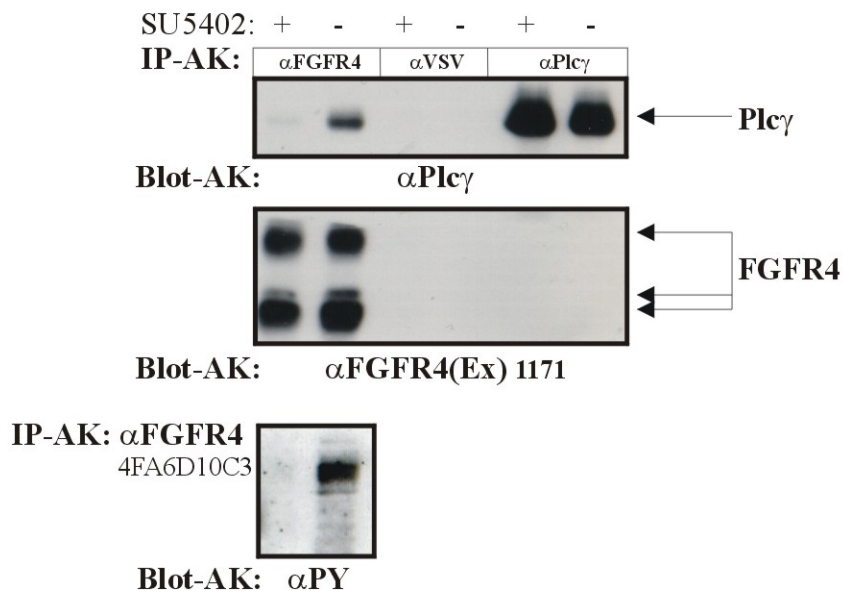


Abb. 28: Die Bindung von PLC γ an FGFR4 findet nur bei aktivem Rezeptor statt.

MDA-MB-453 Zellen wurden für 24 h gehungert und mit 20 μ M SU5402 für 15 min inkubiert oder unbehandelt gelassen. Nach Lyse und Immunpräzipitation mit monoklonalem α FGFR4-Antikörper, monoklonalem α VSV als Negativkontrolle bzw. monoklonalem α PLC γ -Antikörper als Positivkontrolle wurden die Proben in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western-Blot-Analyse konnte durch monoklonalen α PLC γ -Antikörper die PLC γ Bindung an aktiven FGFR4 und die gleichmäßige Expression in den SU5402-behandelten sowie den unbehandelten Zellen gezeigt werden. Durch polyklonalen α FGFR4(Ex) 1171-Antikörper ließ sich die erfolgreiche Präzipitation des Rezeptors beweisen. Nach Entfernen des FGFR4-Antikörpers wurde in einem PY-Immunoblot die Inhibierung des FGFR4 durch SU5402 und die Phosphorylierung in den unbehandelten Zellen nachgewiesen.

3.5 FGFR-Heterodimerbildung

Heterodimere bei RTKs sind vor allem in der Familie der EGFRs charakterisiert worden. Innerhalb der FGFR-Familie ist dieses Phänomen jedoch noch unbekannt. In dieser Arbeitsgruppe wurde von A. Roidl anhand von cDNA Array Analysen die Entdeckung gemacht, dass Doxorubicin-resistente Brustkrebszellen verstärkt FGFR4 und in gleichem Maße FGFR3 exprimieren (unveröffentlichte Daten). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine Heterodimerbildung von FGFR4 mit den drei Familienmitgliedern FGFR1, 2 und 3 im HEK 293-Überexpressionssystem untersucht. Dazu wurden verschiedene, bereits beschriebene (3.4.1.1.) FGFR4-VSVtag-Konstrukte und ein FGFR4 Δ TM int-GST-Konstrukt zusammen mit FGFR1, 2 oder 3-HAtag Plasmiden koexprimiert. Als Negativkontrollen dienten die Kinase Erk5 mit HAtag und die Phosphatase LAR mit VSVtag, da über Interaktionen zwischen Erk5 und FGFR4 bzw. LAR und FGFR1-3 keine Daten existieren. Außerdem wurden Koexpressionen mit pcDNA3-Leervektor durchgeführt. Durch diese Kontrollen sollte demonstriert werden, dass Interaktionen nicht über die beiden tags HA und VSV vermittelt werden. Außerdem wurden sie als Kontrollen für unspezifische Bindungen beigefügt.

Nach einer FGFR4-Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse mit HA-Antikörperlösung konnte gezeigt werden, dass FGFR4 die Fähigkeit besitzt, mit allen drei FGFRs Dimere auszubilden. Anhand der verschiedenen Deletionsmutanten des FGFR4 konnte die Region, die für diese Dimerbildung verantwortlich ist, auf die extrazelluläre Domäne eingeschränkt werden. Abbildung 29 zeigt die Dimerbildung von FGFR4 mit FGFR3 (Abb. 29A), FGFR2 (29B) und FGFR1 (29C). In allen drei Teilabbildungen A, B und C erscheint das HA-Signal bei Koexpression mit FGFR4 Δ Ex-TM so schwach wie in den Negativkontrollen. Demnach sind der extrazelluläre und/oder der Transmembranbereich, die hier deletiert wurden, für die Dimerbildung von entscheidender Bedeutung. Durch Deletion des gesamten zytoplasmatischen Bereichs (Δ int) bzw. der einzelnen Tyrosinkinasedomänen (Δ TK1 und Δ TK2) des FGFR4 wird die Fähigkeit zur Heterodimerisierung nicht gestört.

In Abbildung 29D wurde zusätzlich eine Deletionsmutante, welcher der extrazelluläre Bereich und die Transmembrandomäne fehlen, mit einem Myristilierungssignal verwendet, das die FGFR4-Mutante in der Plasmamembran verankert (FGFR4 Myr Δ Ex-TM). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass eine Dimerisierung des zytoplasmatischen Teils des FGFR4 mit FGFR1, 2 oder 3 aufgrund dessen Fluktuation im Zytoplasma verhindert wird. Da auch hier kein

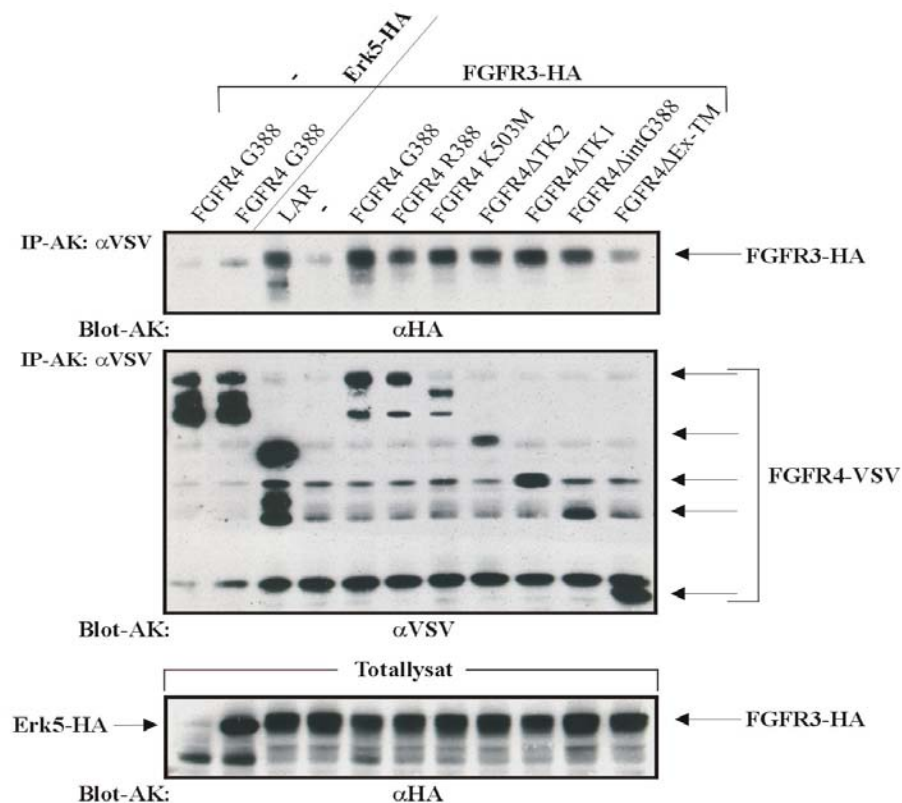
FGFR1, 2 oder 3-Signal detektierbar war, liegt der Grund tatsächlich in der Deletion des extrazellulären- und/oder Transmembranbereichs.

In Abbildung 29E konnte schließlich durch Koexpression der FGFRn 1, 2 und 3 mit der Mutante FGFR4 Δ TM int-GST, welcher der gesamte intrazelluläre Teil und die Transmembrandomäne fehlen, die extrazelluläre Domäne als Bindedomäne für die Heterodimerisierung bestimmt werden. In diesem Fall wurde ein GST *pull down* durchgeführt bevor die Proben wie üblich in der Western-Blot-Analyse mittels HA-Antikörperlösung analysiert wurden.

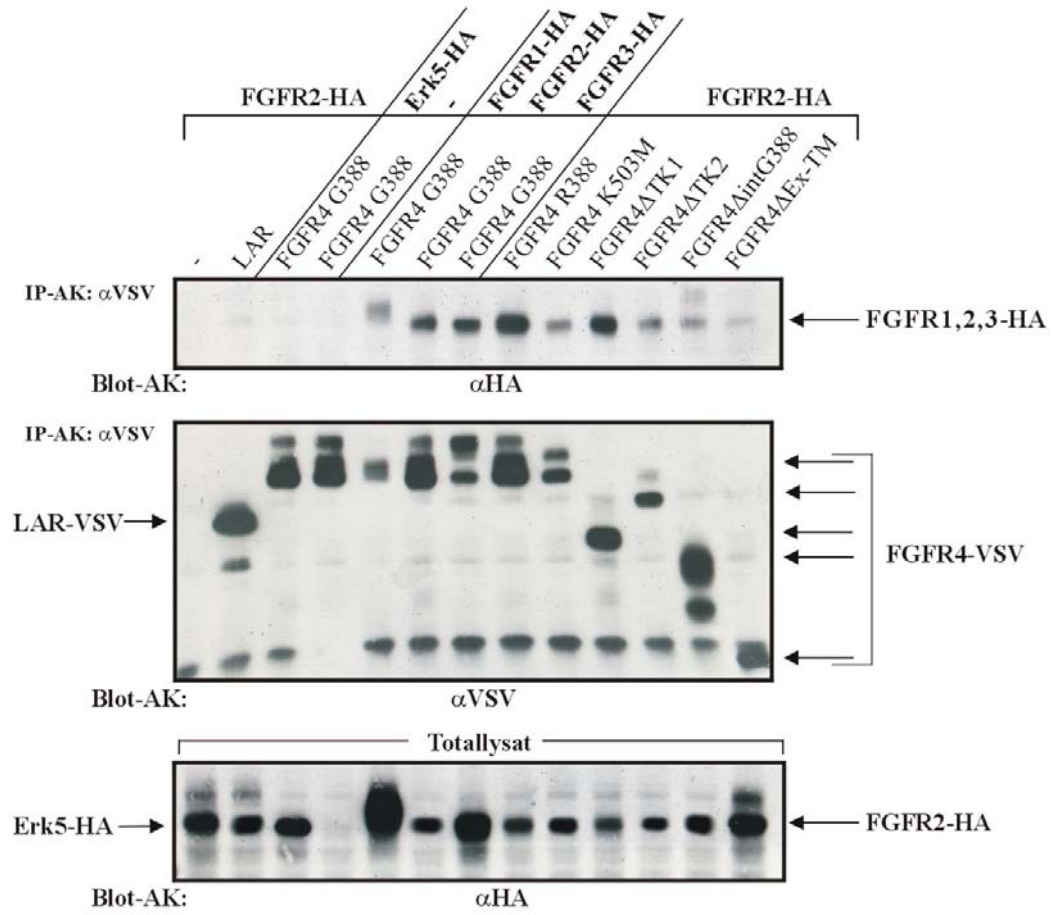
Bei der Untersuchung der Heterodimerbildung von FGFR4 mit FGFR3 ergab sich eine weitere Interaktion zwischen der eigentlich als Negativkontrolle verwendeten Phosphatase LAR und dem FGFR3 (Abb. 29A). Dies könnte auf eine weitere noch nicht entdeckte Interaktion hindeuten. Das FGFR3-HA Signal bei FGFR4 Δ Ex-TM Präzipitation ist ebenso schwach wie die Signale der Negativkontrollen und somit auf eine leichte Unspezifität zurückzuführen.

Nach Entfernen des primären HA-Antikörpers konnte die Expression der FGFR4-VSVtag Derivate durch Inkubation der Membran mit VSV- oder FGFR4-Antikörperlösung in allen fünf Teilexperimenten gezeigt werden. In den Immunoblots der Totallysate wird die gleichmäßige Expression der FGFRn-HAtag 1-3 in allen Transfektionen (Abb. 29A-D) und die Expression von Erk5-HAtag (Abb. 29A, B, D, E) deutlich.

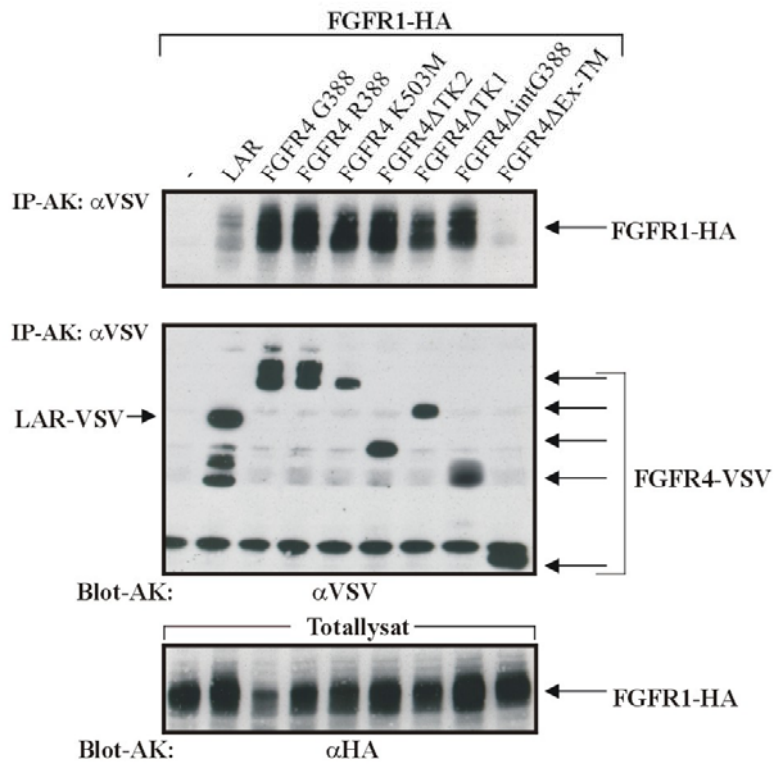
A



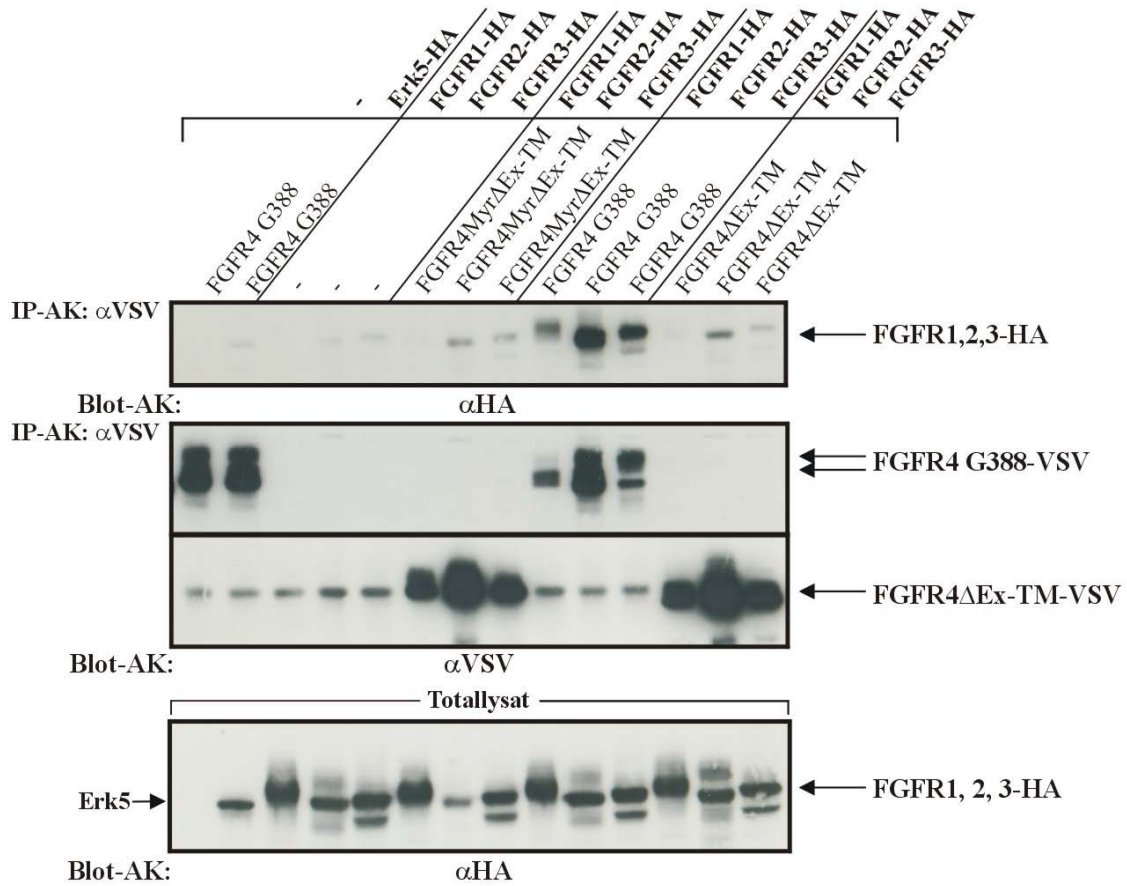
B



C



D



E

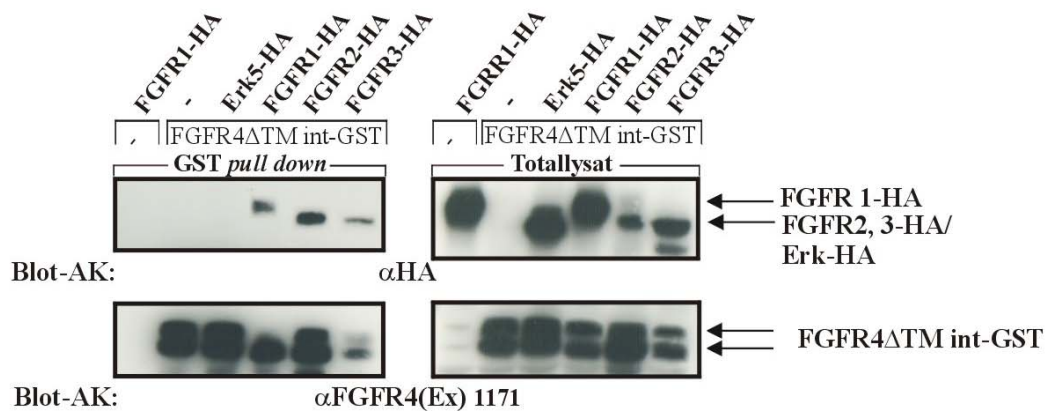


Abb. 29: FGFR4 bildet Heterodimere mit FGFR1, 2 und 3 über die extrazelluläre Domäne

HEK 293 Zellen auf 6-Lochplatten wurden mit verschiedenen FGFR4-VSV bzw. -GST-Konstrukten und FGFR1, 2 oder 3-HA-Konstrukten kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurden die Phosphatase LAR-VSV, die MAP-Kinase Erk5-HA bzw. Leervektor (-) transfiziert. Nach Lyse und VSV-Immünpräzipitation bzw. GST pull down (E) konnte im Western-Blot mittels eines monoklonalen α HA-Antikörpers eine Heterodimerisierung des FGFR4 mit den drei FGF Rezeptoren 1, 2 und 3 nachgewiesen werden. Die FGFR4 und LAR Expression konnte in der Immünpräzipitation mittels monoklonalen α VSV bzw. polyklonalen α FGFR4-Antikörpers und die FGFR1, 2, 3 und Erk Expression im Totallysat durch monoklonalen α HA-Antikörper nachgewiesen werden. A Heterodimerisierung von FGFR4 und FGFR3 B FGFR4 und FGFR2, zusätzliche Kontrollen mit FGFR1 und 3 C FGFR4 und FGFR1 D keine Heterodimerisierung bei FGFR4Myr Δ Ex-TM mit FGFR1, 2 bzw. 3 E Heterodimerisierung von FGFR1, 2, 3 mit extrazellulärer Domäne des FGFR4 (Deletion der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Bereichs)

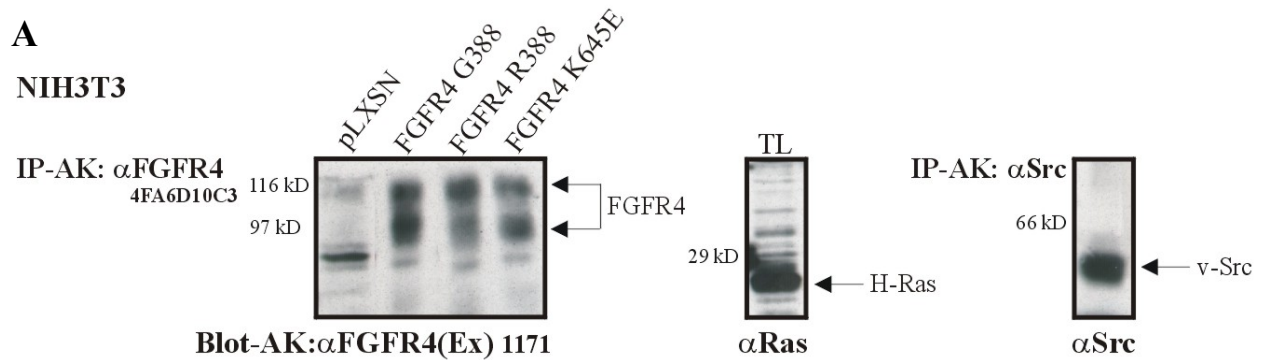
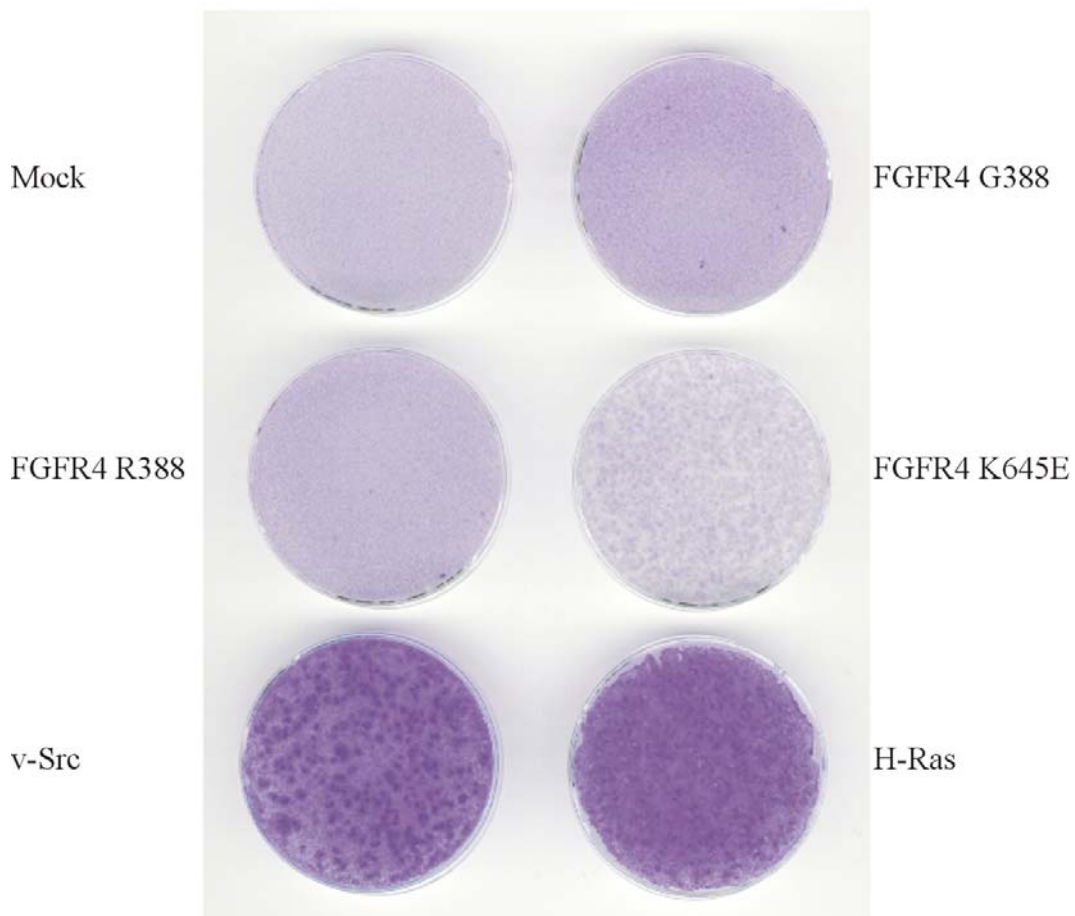
Aus cDNA Array Daten von diversen Brustkrebszellen (P. Knyazev, unveröffentlichte Daten) lässt sich eine mögliche Heterodimerisierung zwischen FGFR2 und FGFR4 in endogenen Zellsystemen herauslesen. In den Zelllinien ZR-75-1, BT483 und MDA-MB-361 werden die beiden RTKs gemeinsam besonders hoch exprimiert. FGFR3 ist in kaum einer der Brustkrebszelllinien nennenswert vorhanden, während FGFR1 nur in T47D-Zellen hoch exprimiert wird.

3.6 FGFR4 R388 besitzt kein onkogenes Potential

Normale Zellen proliferieren nur solange, bis sie in Kontakt zueinander treten und ringsherum von anderen Zellen umgeben sind. Der Verlust dieser sogenannten Kontaktinhibition ist eines der charakteristischen Merkmale von transformierten Zellen. In der Nagerfibroblastenzelllinie NIH3T3 lässt sich durch Infektion mit Onkogenen eine Transformation durch Verlust der Kontaktinhibition herbeiführen. Dadurch wachsen die transformierten Zellen in mehreren Schichten übereinander und bilden sogenannte Foci, die durch Kristallviolett färbung sichtbar werden.

Um den Einfluss von FGFR4 R388 auf diesen Prozess zu untersuchen wurden wie in Material und Methoden 2.6.5 beschrieben NIH3T3-Zellen mit virushaltigem Überstand von Phönix E-Zellen infiziert, welche FGFR4 G388 oder R388, die dominant aktive Mutante FGFR4 K645E oder die Onkogene H-Ras bzw. v-Src exprimierten. Anschließend folgte eine Selektion mit G418 für zwei Wochen. In Abbildung 30A ist der Expressionstest der FGFR4-Varianten und des Onkogens v-Src in einer Immunpräzipitation, die Expression des Onkogens H-Ras im Totallysat gezeigt.

Im folgenden Fokusbildungstest konnte beobachtet werden, dass neben den Onkogenen H-Ras und v-Src lediglich der dominant aktive FGFR4 K645E zu einem niedrigeren Grad onkogenes Potential besitzt, was an der schwachen Foci-Bildung erkennbar ist (Abb. 30B). FGFR4 G388 und R388 sind vergleichbar mit der Negativkontrolle (Mock), die mit Überstand von pLXSN-transfizierten Phönix E-Zellen infiziert wurde.

**B****Abb. 30: FGFR4 R388 wirkt nicht als Onkogen im Fokusbildungstest**

2×10^5 NIH3T3-Mausfibroblasten auf 6 cm-Schalen wurden mit viralen Überständen von Phoenix E-Zellen, die FGFR4 G388/R388 oder dominant aktiven K645E bzw. die Onkogene v-Src und H-Ras (Positivkontrollen) exprimierten, infiziert. Der Überstand von mit Leervektor transfizierten Phoenix E-Zellen diente als Negativkontrolle (Mock). In den folgenden 14 Tagen wurden die NIH3T3-Zellen in DMEM/4% FBS mit 1 mg/ml G418 selektioniert. **A** 800 μ g Gesamtprotein bzw. 30 μ g Totallysat bei H-Ras wurden für eine Immunpräzipitation mit monoklonalem α FGFR4- bzw. polyklonalem α Src-Antikörper eingesetzt. Nach der Auftrennung über 7,5-12%ige SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern konnte die Expression der Proteine bestätigt werden. Molekulargewichtstandards sind jeweils an der linken Seite angezeigt. **B** 1×10^4 stabil exprimierende NIH3T3-Zellen wurden mit 1×10^5 parentalen Zellen gemischt und für weitere 14 Tage bis zur Ausbildung von Foci in DMEM/10% FBS kultiviert. Anschließend wurden die Foci mit Kristallviolettlösung fixiert und angefärbt.

3.7 FGFR4 Gly388 zeigt Eigenschaften eines Tumorsuppressors in MDA-MB-231 Zellen

MDA-MB-231 gehören zu den hormonunabhängigen, hochinvasiven Mammakarzinomzelllinien (Thompson *et al.*, 1992). Aufgrund einer Mutation im *K-ras* Gen (Kozma *et al.*, 1987) sind die MAP-Kinasen p42/p44 (ERK1 und 2) konstitutiv aktiviert. Da diese Zelllinie FGFR4 nicht exprimiert, wurde sie von J. Bange (d. AG) als Ausgangslinie für ein stabil-exprimierendes FGFR4-System ausgesucht (s. auch Bange *et al.*, 2002).

3.7.1 FGFR4-Expression in stabilen MDA-MB-231/FGFR4-Zelllinien

Zu den monoklonalen stabilen MDA-MB-231 Zelllinien, die in dieser Arbeit am häufigsten verwendet wurden, ist vorab in Abbildung 31 ein FGFR4 Proteinexpressionsblot gezeigt. Hierzu wurden die Lysate der Zelllinien MDA-MB-231/FGFR G388 Klon 2, 3 und 4 und ~/FGFR4 R388 Klon 6, 11, 14 und 18 für FGFR4-Immunpräzipitationen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation der mit Leervektor infizierten Zelllinie MDA-MB-231/pLXSN beigelegt, welche aus einem Pool von drei monoklonalen Zellen stammt. Nach Auftrennung der Proben in einer SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit FGFR4-Antikörperlösung wurden die Expressionsstärken des Rezeptors in den Zellklonen sichtbar.

In den folgenden Experimenten wurde vornehmlich mit den Klonen FGFR4 G388 2, 3, 4 und FGFR4 R388 6, 14, 18 gearbeitet, da diese vergleichbare Mengen FGFR4 exprimieren.

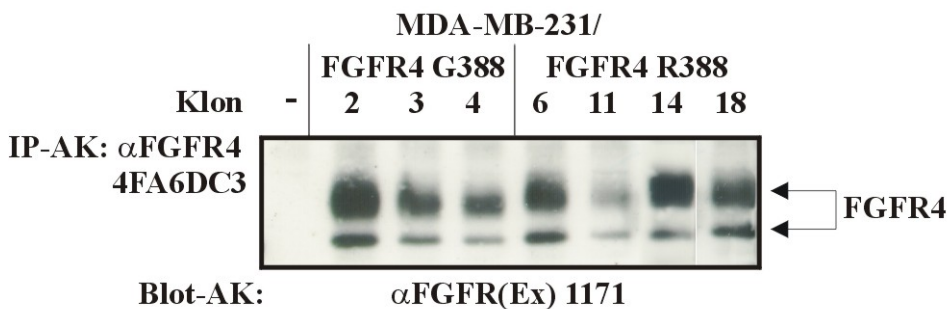


Abb. 31: FGFR4-Expression in MDA-MB-231/FGFR4 Klonen

Je 800 μ g Gesamtprotein wurden für eine Immunpräzipitation mit monoklonalem α FGFR4 4FA6DC3 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente Lysat von Zellen, die mit Leervektor infiziert worden waren. Im Western-Blot ließ sich die unterschiedlich starke Expression der Klone mittels polyklonalen α FGFR4(Ex) 1171-Antikörpers zeigen.

3.7.2 FGFR4 G388 hat einen suppressiven Effekt auf die Edg 2 Expression in MDA-MB-231 Zellen

Bei einer cDNA Array Hybridisierung (P. Knyazev, unveröffentlichte Daten) der stabil FGFR4 exprimierenden Zellklone MDA-MB-231/FGFR4 G388 2 und 3 und FGFR4 R388 6 und 11 (Expression s. Abb. 31) konnte eine nahezu vollständige Reduktion der *edg 2*-mRNA in den G388-Klonen beobachtet werden. In den R388-Klonen blieb der *edg 2* mRNA-Level dagegen unverändert im Vergleich zu Zellen, die mit pLXSN-Leervektor infiziert worden waren. In Folge dieser Entdeckung wurden mehrere Klone auf dieses Phänomen hin mittels RT-PCR-Analyse untersucht.

Dieser Effekt sollte in mehreren stabil mit FGFR4 infizierten, monoklonalen Brustkrebszelllinien, die von J. Bange (U3 Pharma) generiert und zur Verfügung gestellt wurden, geprüft werden. Durch RT-PCR-Analyse - siehe Abbildung 32 - der mRNA der Gene *edg 2*, *fgfr4* und des Haushaltsgens *gapdh*, das als Ladungskontrolle benutzt wurde, konnte gezeigt werden, dass lediglich die Klone der Zelllinie MDA-MB-231/FGFR4 G388 eine *edg 2*-Reduktion zeigen (durch Pfeile gekennzeichnet). In den Zelllinien MDA-MB-435S und BT549-Zellen hat FGFR4 G388 keinerlei Einfluss auf den Edg 2-mRNA-Level. In MCF-7-Zellen, die endogen einen niedrigen FGFR4-Level exprimieren, wird keine Edg 2-mRNA transkribiert.

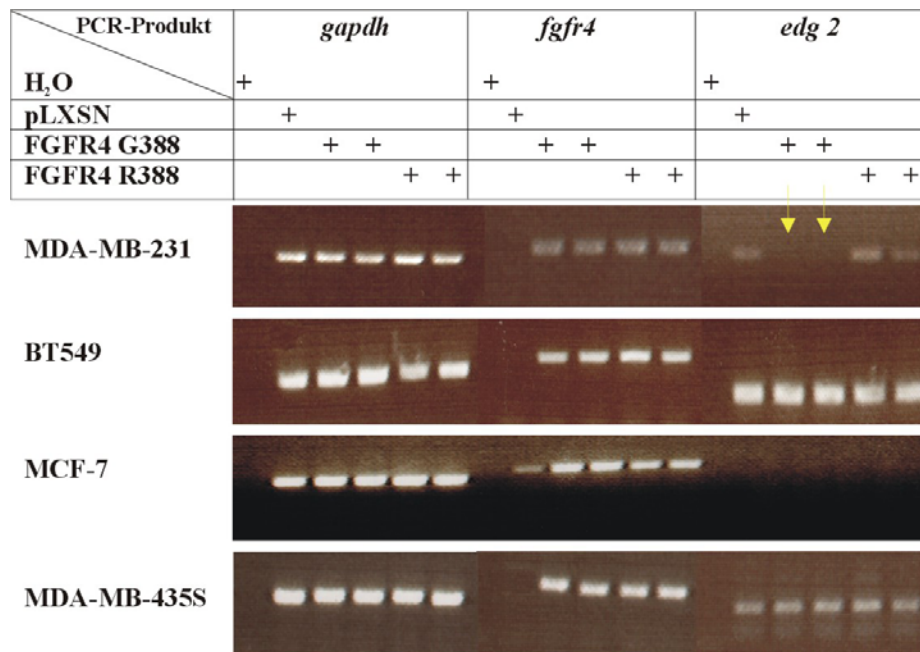


Abb. 32: FGFR4- und Edg 2-mRNA-Level in stabilen FGFR4 G388 und R388 Klonen verschiedener Zelllinien
 Aus verschiedenen Zelllinien, die durch retroviralen Gentransfer stabil FGFR4 exprimieren, wurde durch RT-PCR-Analyse der mRNA-Gehalt an *gapdh* als Ladungskontrolle, *fgfr4* und *edg 2* bestimmt. Hierbei konnte eine eindeutige Reduzierung des *edg 2*-mRNA-Gehalts ausschließlich in den FGFR4 G388 Klonen 2 und 3 der Zelllinie MDA-MB-231 gezeigt werden (gekennzeichnet durch Pfeile). In MCF-7 Zellen wird kein Edg 2 exprimiert.

Durch RT-PCR-Analyse (Abb. 33) der gleichen Gene wie oben aus allen verfügbaren FGFR4-Klonen und den pLXSN-Kontrollzellen konnte gezeigt werden, dass der Level an *edg 2*-mRNA in allen FGFR4 G388-Klonen (siehe Pfeilmarkierung in Abb. 33) ausser bei Klon 6 signifikant reduziert wird, während sich in den FGFR4 R388-Klonen im Vergleich zu den pLXSN-Zellen kein Unterschied erkennen lässt. Bei FGFR4 G388-Klon 6 ist zu beachten, dass der Gehalt an *fgfr4*-mRNA niedriger ist als in den anderen Klonen. Möglicherweise reicht die FGFR4-Expression für den Effekt der *edg 2*-Reduktion hier also nicht aus. Gleichzeitig konnte in diesem Versuch kontrolliert und nachgewiesen werden, dass die pLXSN-Zellen keine *fgfr4*-mRNA bilden, dafür aber alle monoklonalen FGFR4-Linien.

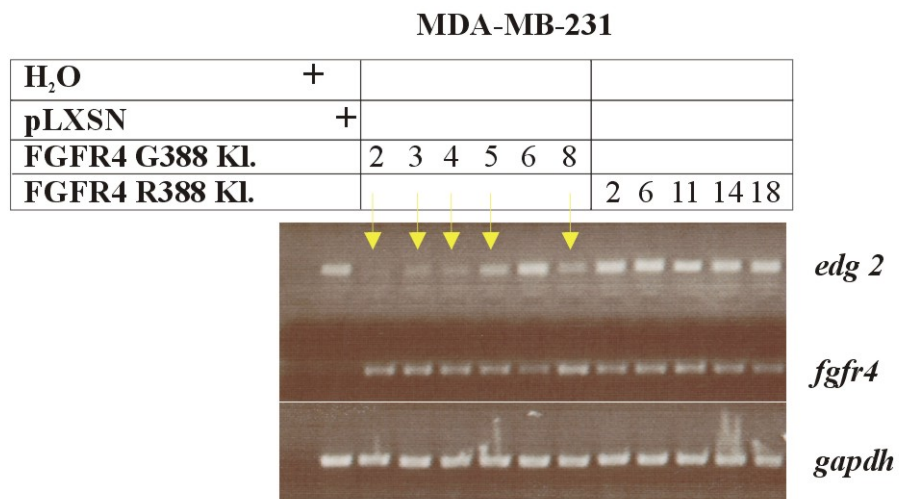


Abb. 33: Reduzierter Edg 2-mRNA-Level in MDA-MB-231/FGFR4 G388 Klonen

Durch RT-PCR-Analyse wurde der mRNA-Gehalt an *edg 2*, *fgfr4* und *gapdh* als Ladungskontrolle in verschiedenen Klonen der stabil mit FGFR4 bzw. pLXSN infizierten Zelllinie MDA-MB-231 bestimmt.

Da der beobachtete Effekt auf die Zelllinie MDA-MB-231 beschränkt zu sein schien, wurde diese Linie als Modellsystem für weitere Versuche benutzt.

3.7.3 Durch FGFR4 G388 wird die Akt-Kinase über einen alternativen Signalweg aktiviert

Bei der Untersuchung der Auswirkung des Effekts der *edg 2*-Reduktion in FGFR4 G388-Zellen konnte ein Wechsel bezüglich der Akt-Aktivierung durch diverse Stimuli gezeigt werden. Üblicherweise erfolgt in MDA-MB-231 Zellen eine Phosphorylierung der Akt/PKB-Kinase nach Stimulation mit den Liganden EGF, LPA, oder - in schwächerem Ausmaß - mit Sphingosin-1-

Phosphat. Bei den FGFR4 G388-Klonen 2 und 4 dagegen ist eine Akt/PKB-Aktivierung durch LPA aufgrund des fehlenden LPA Rezeptors Edg 2 nicht mehr möglich und scheint deshalb alternativ ausschließlich nach EGF-Stimulation einzutreten. In den FGFR4 R388-Klonen 6 und 18 sowie den Tyrosin-Austauschmutanten des FGFR4 G388 Y642/643F, Y719F, Y754F und Y754/764F dagegen ruft lediglich LPA eine Akt-Phosphorylierung hervor.

Zur Durchführung des Versuchs wurden die genannten Zelllinien vor der Stimulation für 48 h gehungert. Die Stimulation erfolgte für 3 min mit den Liganden EGF, LPA, Sphingosin-1-Phosphat und Thrombin. Als Kontrolle, dass die Zellen ausreichend gehungert waren, wurde jeweils ein Satz unstimulierter Zellen in den Versuchsablauf mitaufgenommen (-). Nach Zelllyse, Aufbereitung und Auftrennung der Totallysate, konnte die Akt/PKB-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse durch Phospho-Akt-Antikörperlösung bestimmt werden.

Abbildung 34 zeigt die Phospho-Akt Immunoblots mit den dazugehörigen Akt-Immunoblots, die nach Entfernen des Phospho-Akt-Antikörpers erstellt wurden und eine gleichmäßige Akt/PKB Expression wiedergeben.

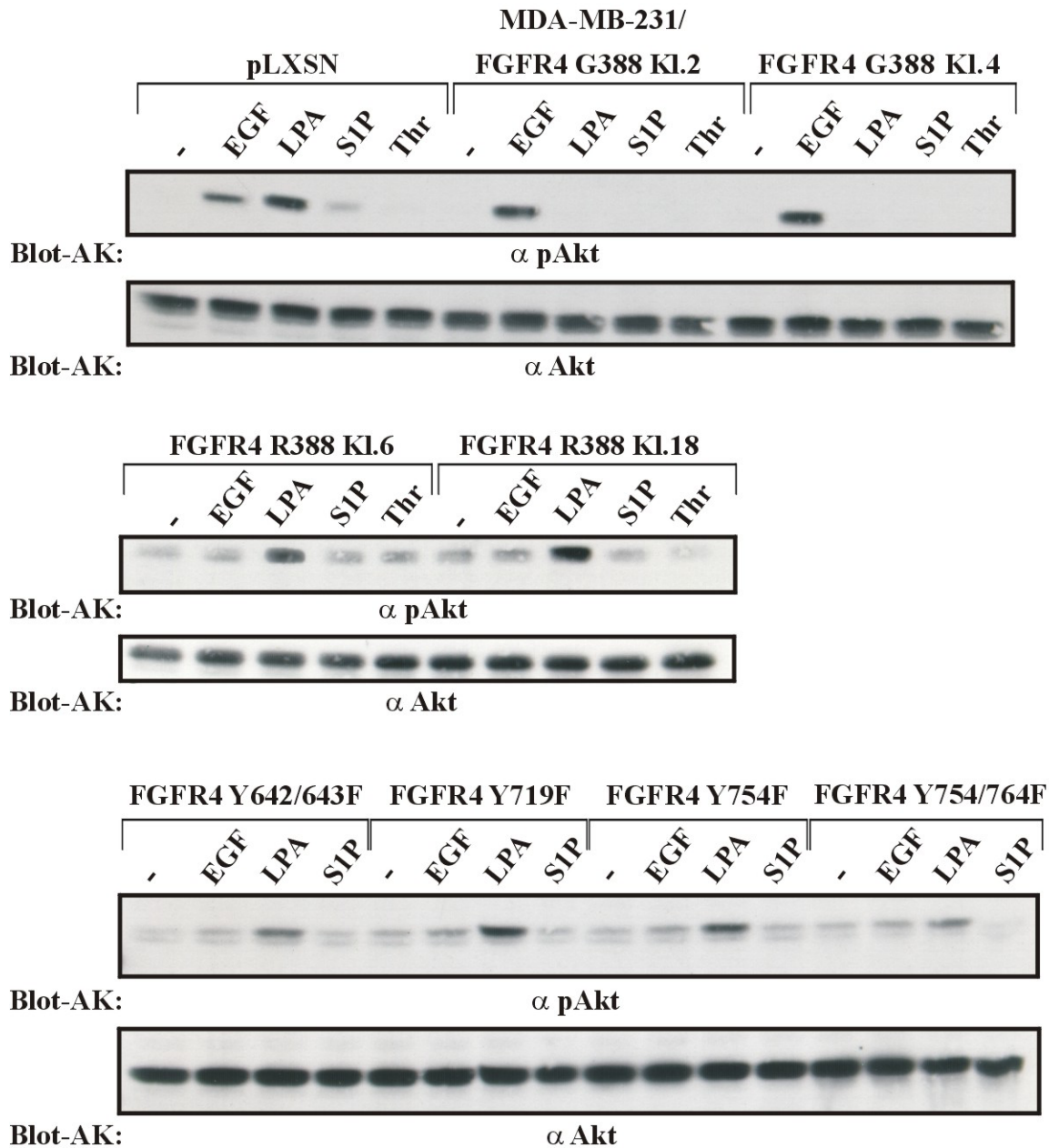


Abb. 34: In MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen wird Akt ausschließlich über EGF-Stimulation aktiviert
 600000 Zellen der stabilen Klone MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 und 4, R388 Klon 6 und 18 und der polyklonalen Tyrosin-Austauschmutanten Y642/643F, Y719F, Y754F und Y754/764F wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und für 48 h in RPMI/0% FBS gehungert. Stimulation erfolgte für 3 min mit 3 ng/ml EGF, 10 μ M Lyso-phosphatidylsäure (LPA), 1 μ M Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder 2 U/ml Thrombin (Thr). Unstimulierte (-) Zellen wurden nicht behandelt. Auf die Lyse folgte die Auftrennung der Proteine im Totallysat in einer 10%igen SDS-PAGE. In der anschließenden Western-Blot-Analyse, wurde die Akt-Phosphorylierung durch polyklonalen α Phospho-Akt-Antikörper gezeigt. Gleiche Mengen Akt konnten im Kontrollblot mittels polyklonalen α Akt-Antikörpers nachgewiesen werden.

Bei Mutation zweier konservierter Tyrosinreste im FGFR4 G388 gleichzeitig - Y642/643F, Y754/764F - verringert sich die Stärke der Akt-Phosphorylierung nach LPA-Stimulation.

3.7.3.1 Wortmannin verhindert die EGF und LPA-induzierte Akt-Phosphorylierung

Durch Inhibierung der PI3-Kinase mit dem Inhibitor Wortmannin konnte gezeigt werden, dass die Akt-Aktivierung mittels EGF und LPA in pLXSN-, FGFR4 G388 (nur EGF) und FGFR4 R388-Zellen über den Signalweg der PI3-Kinase läuft, zumal eine Aktivierung der Akt-Kinase mittels EGF/LPA bei gleichzeitiger PI3-Kinase Blockierung nicht mehr möglich ist.

Für diesen Versuch wurden stabile MDA-MB-231/pLXSN-Zellen, Klon 2 der FGFR4 G388 und Klon 6 der FGFR4 R388 exprimierenden MDA-MB-231 Zelllinien für 48 h gehungert. Nach einer Vorinkubation von 30 min mit 1 μ M des PI3-Kinase Inhibitors Wortmannin bei 37°C bzw. mit dem entsprechenden Volumen an DMSO für die Kontrollen (-) folgte eine 3-minütige Stimulation mit 3 ng/ml EGF bzw. 10 μ M LPA. Zur Kontrolle (-) wurden nicht-stimulierte Zellen miteinbezogen. Im Anschluß an die Zellyse folgte die Aufbereitung und Auftrennung der Totallysate in der SDS-PAGE. In Abbildung 35 sind die Phospho-Akt- mit den dazugehörigen Akt-Immunoblots als Expressions- und Ladungskontrolle zu sehen. MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen wurden der Vollständigkeit halber in den LPA-Versuch mitaufgenommen, obwohl eine Akt/PKB-Aktivierung durch LPA erwiesenermaßen nicht möglich ist (s. Abschnitt 3.7.3).

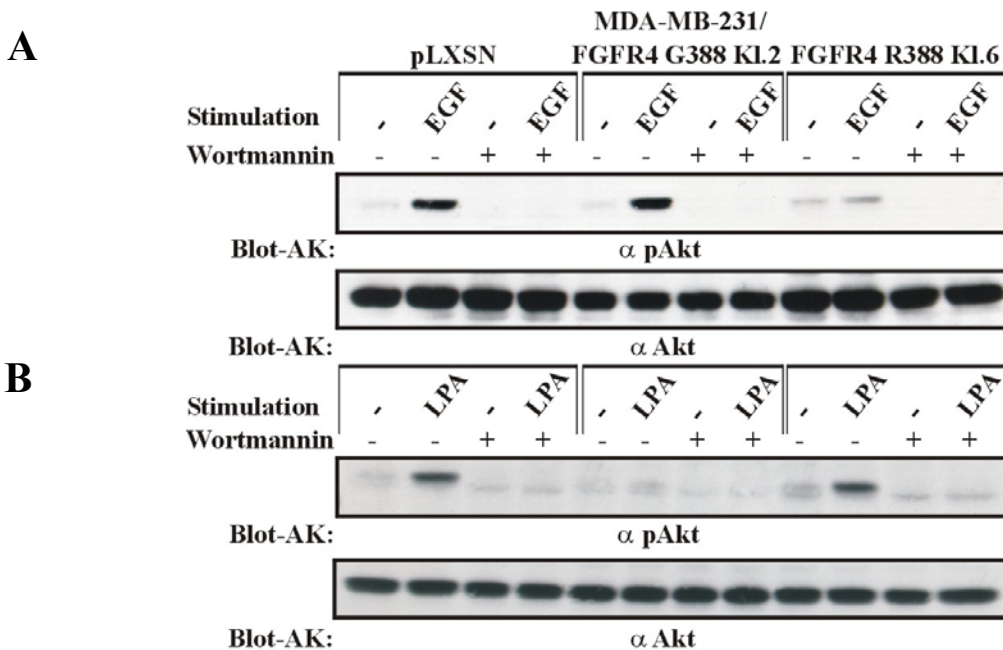


Abb. 35: Akt-Aktivierung durch LPA in MDA-MB-231/pLXSN und FGFR4 R388-Zellen lässt sich durch Wortmannin inhibieren

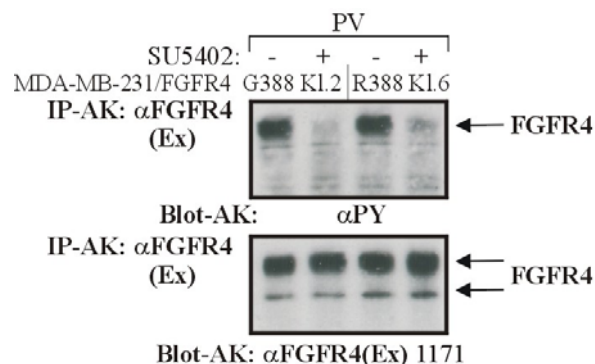
600000 Zellen der stabilen Klone MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 bzw. R388 Klon 6 wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und für 48 h in RPMI/0% FBS gehungert. Inhibierung der PI3-Kinase erfolgte für 30 min mit 1 μ M Wortmannin bei 37°C. Zellen, die nicht inhibiert werden sollten, wurden mit 1 μ l/ml DMSO (-) inkubiert. Nach Vorinkubation mit Wortmannin bzw. DMSO für 27 min folgte die Stimulation mit 3 ng/ml EGF (A) bzw. 10 μ M Lysophosphatidylsäure (LPA, B) für 3 min oder die Zellen blieben unstimuliert (-). Auf die Lyse folgte die Auftrennung der Proteine im Totallysate in einer 10%igen SDS-PAGE. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde der polyklonale α Phospho-Akt-Antikörper verwendet. Gleiche Mengen Akt konnten im Kontrollblot mittels polyklonalen α Akt-Antikörpers nachgewiesen werden.

3.7.3.2 FGFR4 R388-Inaktivierung verringert die LPA-induzierte Akt-Phosphorylierung

In diesem Experiment wurden stabile MDA-MB-231/pLXSN-, FGFR4 G388- und FGFR4 R388-Zellen für einen jeweils dreifachen Stimulationsversuch mit den transaktivierend wirkenden Liganden EGF, LPA, Sphingosin-1-Phosphat und Thrombin ausgesät. Nach einem Hungerzeitraum von 24 h wurden zu je einem Satz jeder Zelllinie 20 μ M des FGFR-Inhibitors SU5402 für eine 1h Inkubation gegeben („SU5402 1h“ in Abb. 36B). Die anderen beiden Sätze wurden mit einem entsprechenden Volumen DMSO ebenfalls 1h inkubiert. Nach insgesamt 48 h Hungerzeitraum wurden die 1h mit SU5402 inkubierten Zelllinien nochmals mit 20 μ M des Inhibitors für 30 min behandelt, um einen Aktivitätsverlust des Inhibitors auszugleichen. Ein Satz der DMSO-behandelten Zellen wurde ebenfalls mit 20 μ M SU5402 für 30 min inkubiert („SU5402 30“ in Abb. 36B), während der übriggebliebene Satz DMSO-behandelter Zellen direkt für die folgende Stimulation verwendet wurde. Transaktivierung mit den oben genannten Liganden erfolgte für 3 min. Zellen, die nicht stimuliert wurden, dienten als Negativkontrolle (-). Nach der direkt anschließenden Zelllyse wurden die fertigen Totallysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Akt/PKB-Phosphorylierung nach der Western-Blot-Analyse durch Phospho-Akt-Antikörper analysiert. Eine gleichmäßige Akt/PKB-Expression wurde durch eine zweite Inkubation der Membran mit Akt-Antikörperlösung nach Entfernung des Phospho-Akt-Antikörpers gezeigt.

Dabei ergab sich, dass die Inhibierung der Aktivität des FGFR4 R388 mit Tyrphostin SU5402 - Abbildung 36A zeigt die Inaktivierung des FGFR4 durch SU5402 bei Pervanadat Stimulation - die Akt/PKB-Phosphorylierung verstärkt, bzw. dass durch die Inaktivierung der Arginin-Rezeptorvariante das Phosphotyrosinsignal der Akt-Kinase abgeschwächt wird. Eine Inaktivierung des FGFR4 G388 hat dagegen keinen Einfluss auf die Stärke des Phospho-Akt Signals, welches hier ebenfalls nur nach EGF-Stimulation auftritt. Auch in den MDA-MB-231/pLXSN-Zellen, die aufgrund des Fehlens von endogenem FGFR4 als Negativkontrolle dienten, ist nur eine minimale Schwankung bei der Akt/PKB-Phosphorylierung durch S1P detektierbar.

A



B

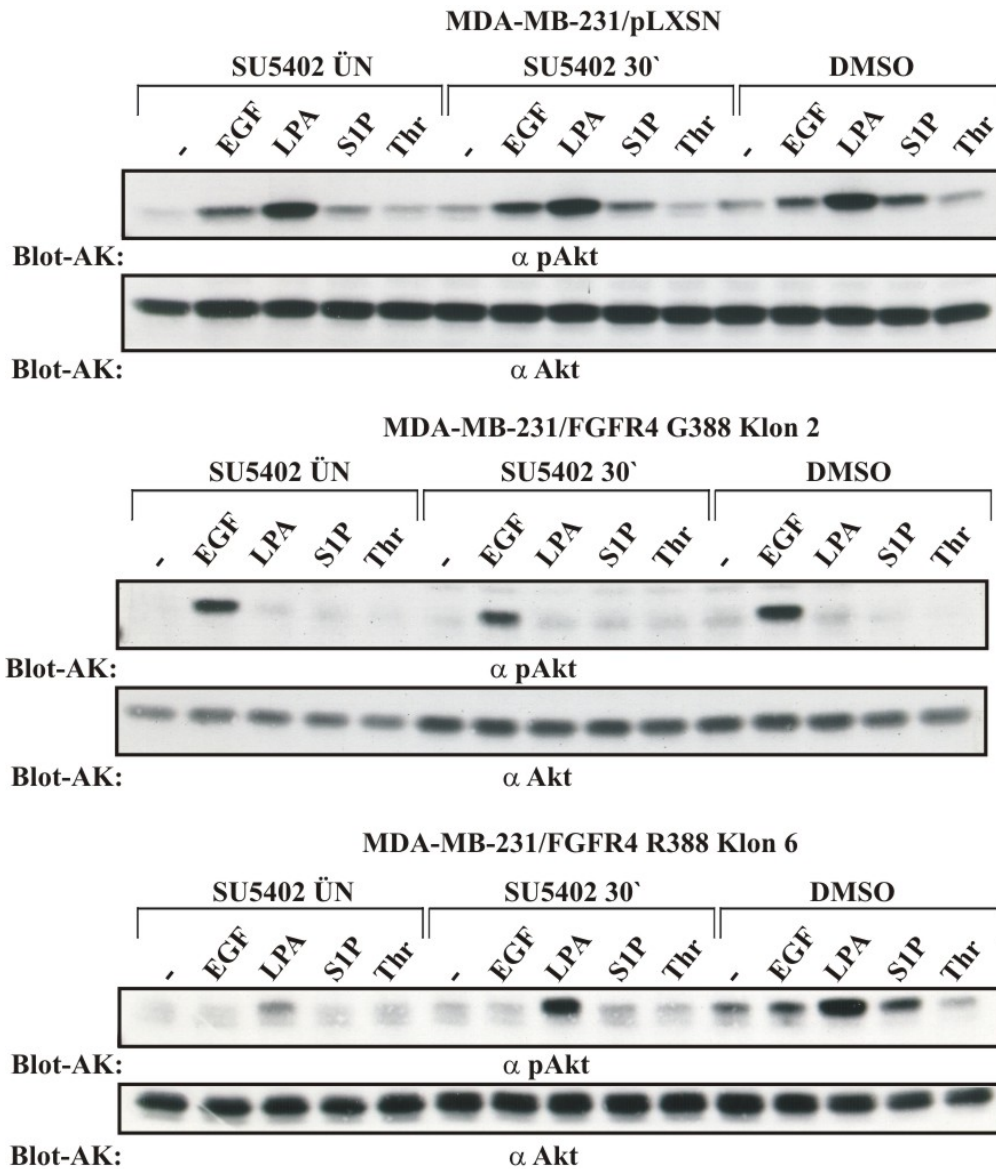


Abb. 36: Durch Inhibierung von FGFR4 R388 wird die Akt-Aktivierung gehemmt.

A MDA-MB-231/FGFR4 G388 Klon 2 und R388 Klon 6 Zellen wurden 24 h gehungert, 15 min mit 20 μ M SU5402 vorinkubiert (+) oder unbehandelt gelassen (-) und anschließend für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. Nach der Zelllyse, einer Immunpräzipitation mit monoklonalem FGFR4-Antikörper und Auftrennung der Proben über eine 7,5%ige SDS-PAGE konnte in der Western-Blot-Analyse mittels eines monoklonalen PY-Antikörpers die Phosphorylierung bzw. Inaktivierung des FGFR4 detektiert werden. Nach Entfernen des PY-Antikörpers und Inkubation der Membran mit polyklonalem FGFR4-Antikörper wurde eine gleichmäßige FGFR4-Präzipitation bestätigt.

B 600000 Zellen der stabilen Klone MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 bzw. R388 Klon 6 wurden auf 6-Lochplatten ausgesät, für 30 h in RPMI/0% FBS gehungert und dann ÜN mit 20 μ M des FGFR-Inhibitors SU5402 oder DMSO inkubiert. Nach weiteren 18 h erfolgte eine erneute Inkubation mit 20 μ M SU5402 für 30 min bei den ÜN bereits inhibierten Zellen (= SU5402 ÜN) und einem Satz DMSO-behandelter Zellen (= SU5402 30'). Jeweils ein Satz Zellen, der nur mit DMSO behandelt worden war, wurde nicht mit SU5402 inkubiert (= DMSO). Daraufhin wurden die Klone für 3 min mit 3 ng/ml EGF, 10 μ M Lysophosphatidylsäure (LPA), 1 μ M Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder 2 U/ml Thrombin (Thr) stimuliert bzw. unstimuliert (-) belassen. Nach Lyse und Western-Blot-Analyse konnte die Phosphorylierung von Akt mittels eines polyklonalen α Phospho-Akt-Antikörpers bestimmt werden. Gleiche Mengen der Akt-Kinase wurden im Kontrollblot durch polyklonalen α Akt-Antikörper nachgewiesen.

3.7.4 Verstärkte EGFR-Aktivierung in MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen

Wie auch bei der Akt-Aktivierung ergeben sich im Hinblick auf die Aktivierung des EGF Rezeptors in den MDA-MB-231-Klonen Unterschiede. So lässt sich der EGFR in FGFR4 G388-Zellen generell stärker aktivieren als in pLXSN- und R388-Zellen, was vor allem bei der EGF-Stimulation und auch der Aktivierung durch Thrombin ersichtlich wird.

Bei der Durchführung dieses Versuchs wurden die stabilen Zelllinien MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 und FGFR4 R388 Klon 6 für 48 h gehungert. Transaktivierung des EGFR erfolgte für 5 min mit den Liganden EGF, LPA, Sphingosin-1-Phosphat und Thrombin. In nicht-stimulierten (-) Zellen konnte ein erfolgreiches Hungern und die geringe Basalphosphorylierung des EGFR gezeigt werden. Nach der Zelllyse wurden die Totallysate für eine EGFR-Immunpräzipitation eingesetzt und die fertigen Proben über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phosphorylierung des EGFRs konnte - wie in Abbildung 37 zu sehen ist - im Immunoblot durch Phosphotyrosin-Antikörperlösung gezeigt werden. Nach Entfernung des Phosphotyrosin-Antikörpers wurde die Nitrocellulosemembran mit EGFR-Antikörperlösung zum Nachweis gleicher EGFR-Mengen geblottet.

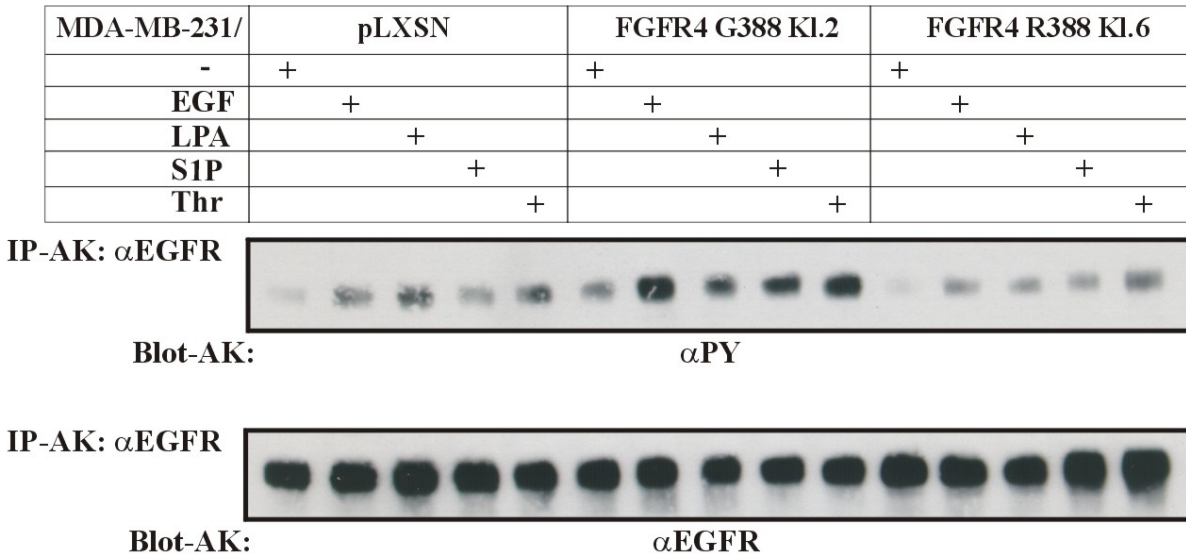


Abb. 37: In FGFR4 G388-Zellen wird EGFR stärker phosphoryliert.

600000 Zellen der stabilen Klone MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 bzw. R388 Klon 6 wurden auf 6-Lochplatten ausgesät, für 48 h in RPMI/0% FBS gehungert und dann für 5 min mit 3 ng/ml EGF, 10 μ M Lyso-phosphatidylsäure (LPA), 1 μ M Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder 2 U/ml Thrombin (Thr) stimuliert bzw. unstimuliert (-) belassen. Nach Lyse und EGFR-Immunpräzipitation konnte der Phosphotyrosingehalt des EGFRs im Western-Blot mittels monoklonalen α PY-Antikörpers bestimmt werden. Die EGFR-Expression wurde im Kontrollblot durch einen polyklonalen α EGFR-Antikörper gezeigt.

Auch bei der EGFR-Aktivierung ist die Phosphorylierung nach LPA Stimulation in FGFR4 G388-Zellen am schwächsten. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (-) liegt sie nur wenig über dem Level der Basalphosphorylierung.

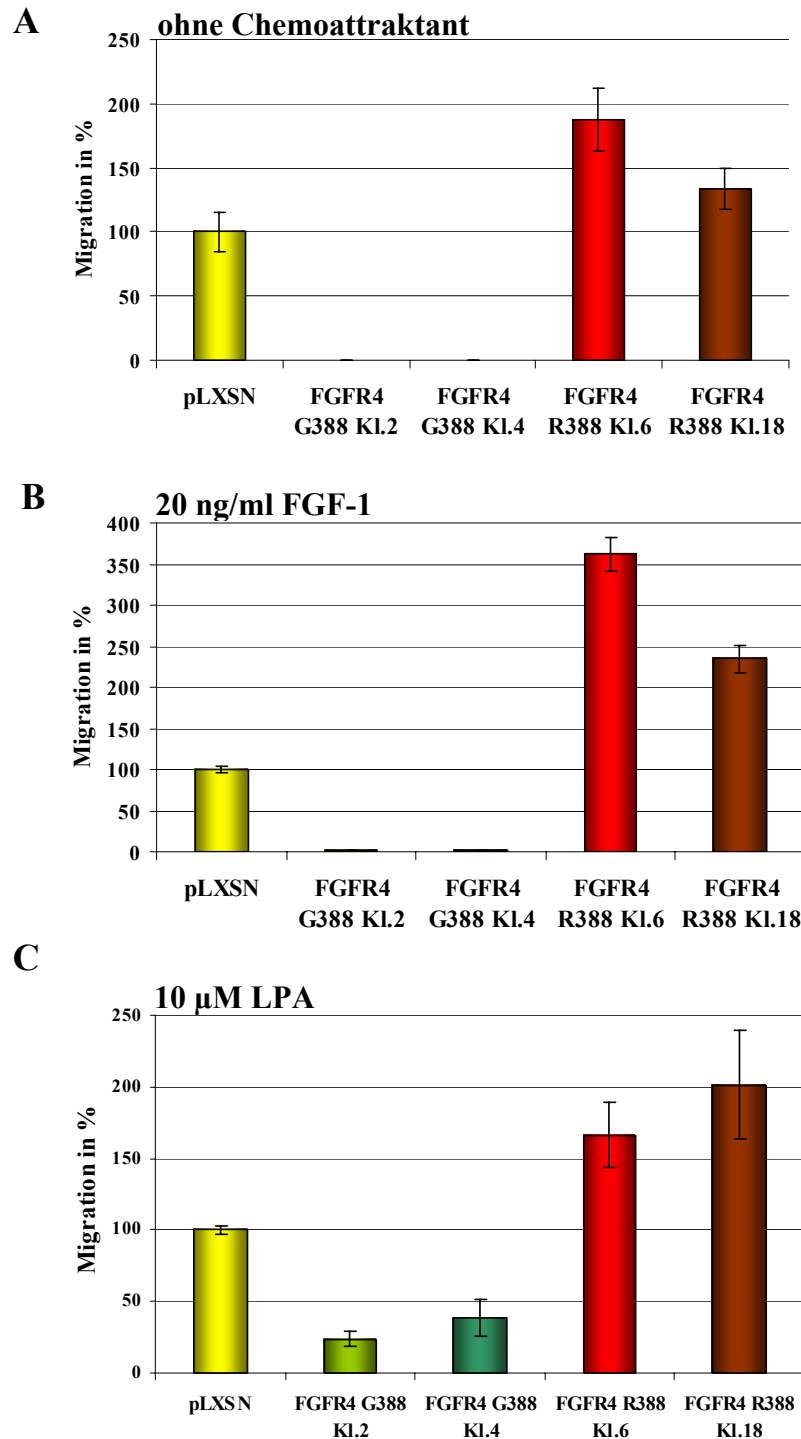
3.7.5 FGFR4 G388 zeigt einen inhibierenden Effekt in Zell-physiologischen Untersuchungen

Physiologische Untersuchungen wie Migrations- und Invasionstests geben einen guten Einblick in die Funktionsweise von Proteinen innerhalb einer Zelle und lassen Rückschlüsse auf den Einfluss des Proteins im Tumorgewebe zu. Besonders zur Gegenüberstellung zweier Proteine, die sich nur durch eine Mutation voneinander unterscheiden, eignet sich diese Art der Untersuchung. Wie schon bei Bange *et al.* (2002) beschrieben, hat die Glycin-Variante des FGFR4 eine hemmende Wirkung auf die Wundheilung bei MDA-MB-231 Zellen in 0,5% FBS. Auf dieser Erkenntnis aufbauend war es im Rahmen dieser Arbeit Ziel, diesen Effekt v.a. im Hinblick auf die Edg 2-Reduktion in den FGFR4 G388-Zellen genauer zu untersuchen. Dazu wurden die im Folgenden dargestellten Migrations-, Invasions-, Wundheilungs- und Matrigelauswuchsexperimente durchgeführt.

3.7.5.1 FGFR4 G388 blockiert die Migration

In vierfachen Ansätzen wurde das Migrationspotential der Zellen MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 Klon 2 und 4 und R388 Klon 6 und 18 in einer dreimaligen Versuchsreihe mit Hilfe eines Transwell-Assays (Falcon) wie in Material und Methoden 2.6.4.1 beschrieben untersucht. Als Migrationsstimulanz wurden zum einen 20 ng/ml FGF-1 zum anderen 1 μ M LPA in die untere Kammer gegeben. Mit FGF-1 sollte der direkte Einfluss des FGFR4 begutachtet werden, mit LPA die Bedeutung der Edg 2-Reduktion in den FGFR4 G388-Zellen. Als Negativkontrolle erfolgte eine 18-stündige Migration gegen Medium ohne FBS und ohne Chemoattraktant (Abb. 38A). Die Wanderung in Richtung FGF-1 fand ebenfalls innerhalb von 18 h statt (Abb. 38B), in Richtung LPA in nur 6 h (Abb. 38C). Nach der Kristallviolett färbung wurden die Zellen auf der Membranunterseite ausgezählt und die jeweils dreimal durchgeführten Versuche ausgewertet. Hierbei wurde der Mittelwert der Anzahl an migrierten MDA-MB-231/pLXSN-Zellen in Abbildung 38A, B und C auf 100 % gesetzt, um das unterschiedliche Wanderungsverhalten der Zelllinien in den einzelnen Experimenten zu veranschaulichen. In Abbildung 38C ist zur Ver-

deutlichung ein Diagramm bezüglich der Anzahl migrierter Zellen dargestellt. Hier wird die hohe Wanderungsbereitschaft der MDA-MB-231/pLXSN und FGFR4 R388-Zellen zu LPA hin eindeutig erkennbar. In Abbildung 38D sind Photographien der Membranen aus den FGF-1- und LPA-Experimenten zu sehen. Die Versuchsreihe ohne Chemoattraktant wurde wegen der geringen Anzahl migrierter Zellen nicht dokumentiert.



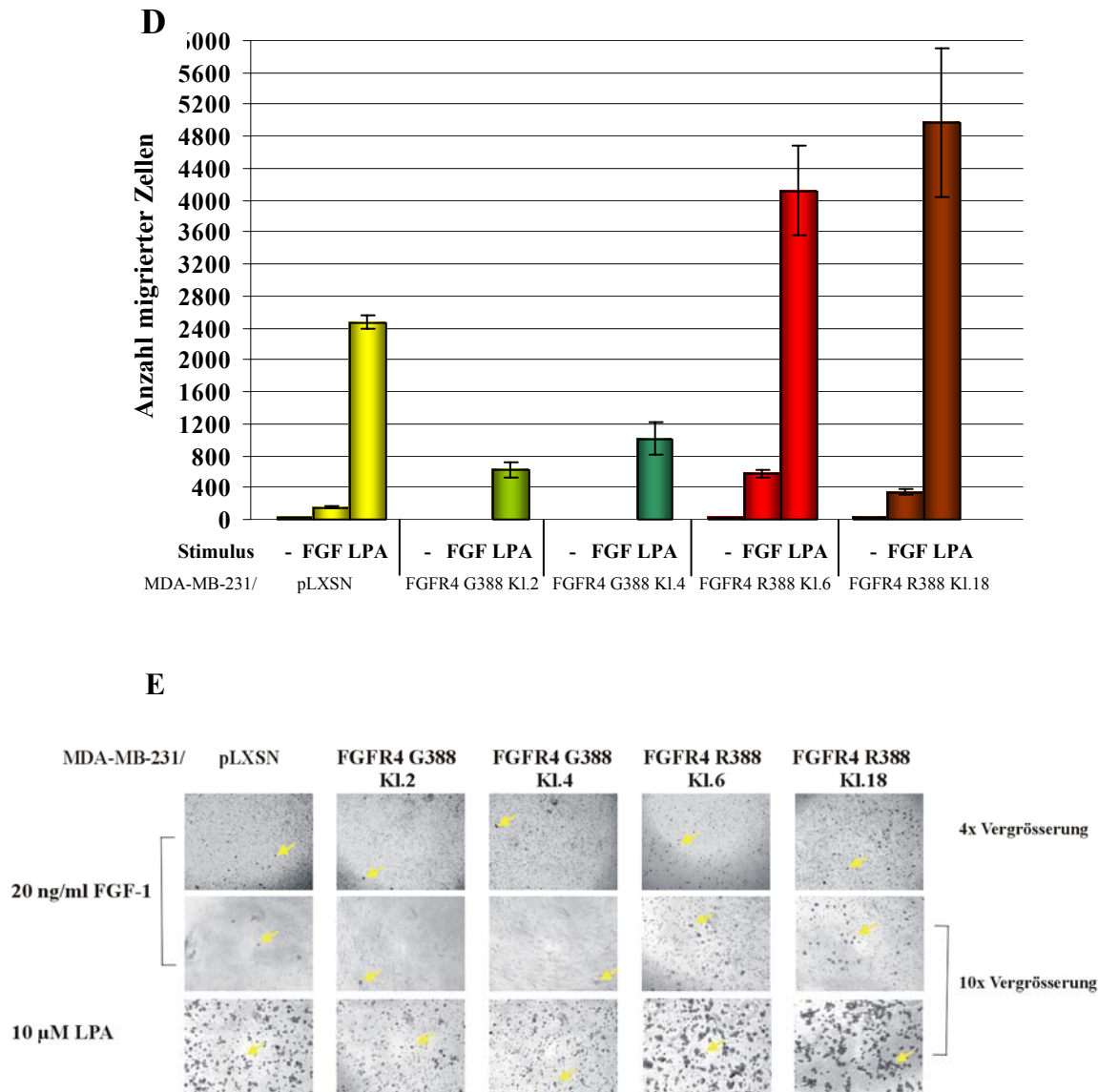


Abb. 38: FGFR4 G388 inhibiert die Migration von stabilen MDA-MB-231 Zellen

Je 50000 Zellen, die stabil FGFR4 G388 oder R388 exprimieren bzw. mit Leervektor infiziert worden waren, wurden auf Polykarbonatmembranen in Zellkultureinsätzen (Falcon Cell Culture Inserts, Falcon, U.K.) ausgesät. Die Migration erfolgte innerhalb der folgenden 6-18 h in Richtung eines Chemoattraktanten in RPMI/0% FBS, das sich in der unteren Kammer befand. Migrierte Zellen auf der Unterseite der Membran wurden mit Kristallviolett angefärbt und im Mikroskop ausgezählt. Die Diagramme A, B und C zeigen die Zellwanderung in Prozent, wobei die Wanderung der mit Leervektor infizierten Zellen auf 100% gesetzt wurde. **A** ohne Chemoattraktant (18 h) **B** 20 ng/ml FGF-1 (18 h) **C** 10 μM Lysophosphatidylsäure (LPA, 6 h) **D** Darstellung von A, B, C in einem Diagramm anhand der Anzahl migrierter Zellen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. **E** Mit Kristallviolett angefärbte, migrierte Zellen nach FGF-1- bzw. LPA-Stimulation auf der Membranunterseite bei 4x-10x Vergrößerung.

In dieser Versuchsreihe wird die Funktion der FGFR4 G388-Variante als suppressive Komponente in tumorigenen Zellen deutlich.

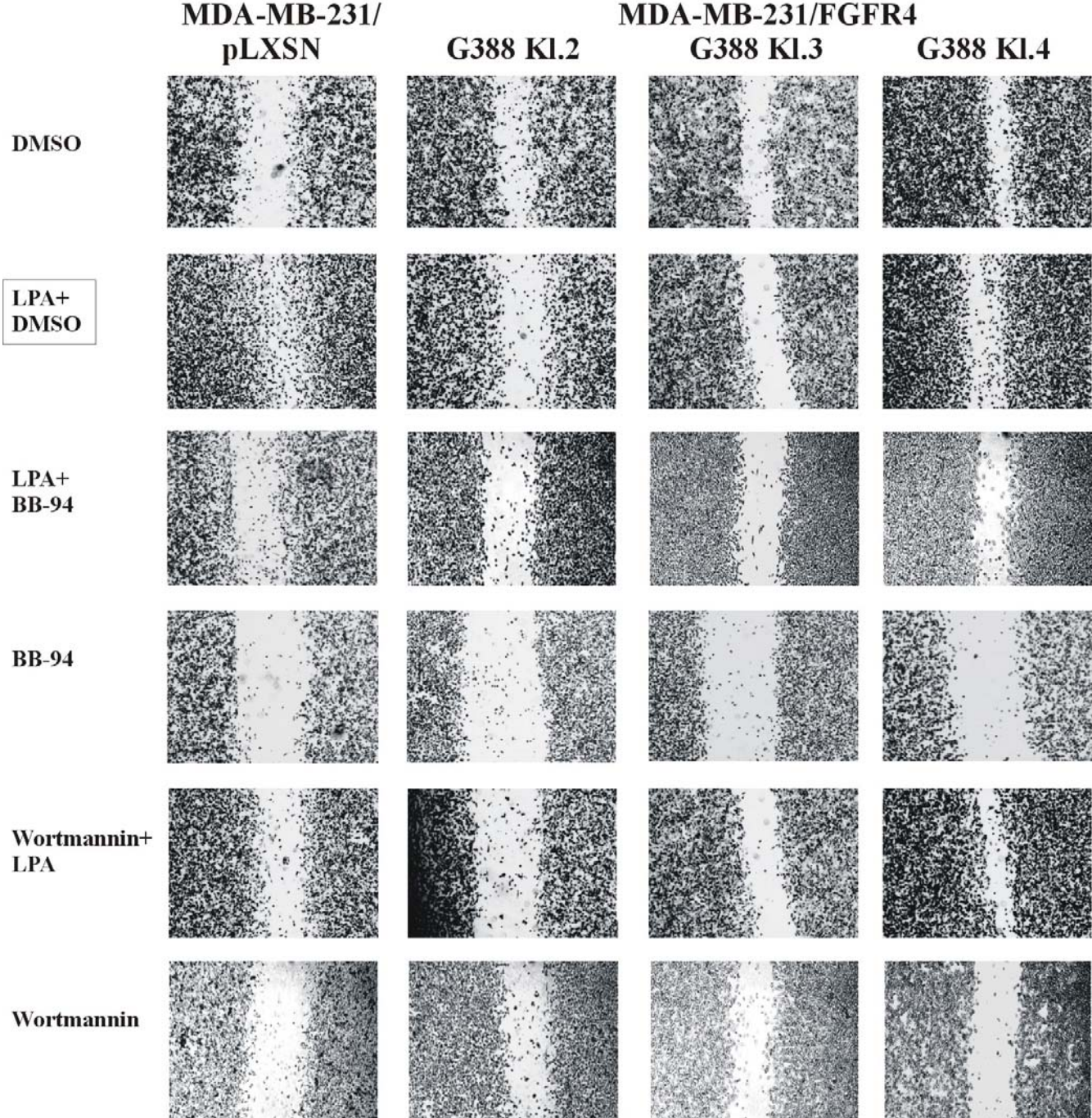
3.7.5.2 FGFR4 G388 inhibiert den LPA-induzierten Wundheilungsprozess

MDA-MB-231 Zellen sind dazu fähig, zugefügte Spalten im konfluenten Zellrasen innerhalb weniger Stunden nach LPA-Stimulation zu schliessen. Ob dieser Effekt auch bei FGFR4 G388-Expression, welcher die Expression des LPA Rezeptors Edg 2 verhindert, auftritt, sollte hier nachgeprüft werden.

Dazu wurden je drei konfluent-gewachsenen, monoklonalen FGFR4 G388- und R388-exprimierenden Zelllinien und pLXSN-Kontrollzellen nach einem Hungerzeitraum von 24 h wie in Material und Methoden 2.6.2 eine Wunde zugefügt. Nach intensivem Waschen wurden die Zellen mit verschiedenen Kombinationen aus Stimulus und Inhibitoren inkubiert. Da der Metalloproteasehemmer Batimastat (BB-94) und der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin in DMSO gelöst sind, musste jeweils ein entsprechendes Volumen an DMSO zu den Ansätzen ohne Inhibitor gegeben werden, um durch DMSO ausgelöste Effekte ausschließen zu können. So wurden die Zellen mit 1 µl/ml DMSO als Negativkontrolle, 10 µM LPA und 1 µl/ml DMSO, 10 µM LPA und 5 mM BB-94, 10 µM LPA und 1 µM Wortmannin, oder den Inhibitoren separat für 10 h inkubiert.

In Abbildung 39 zeigt sich zum einen, dass FGFR4 G388 die Wundheilung durch LPA-Induktion verhindert (Abb. 39A), während sich die FGFR4 R388 exprimierenden Zellen wie die pLXSN-Zellen verhalten (Abb. 39B). Zum anderen wird v.a. bei FGFR4 R388 Klon 18 ersichtlich, dass die Wundheilung besser durch Wortmannin als durch Batimastat geblockt werden kann. Somit inhibiert FGFR4 G388 die durch LPA über den Edg 2-Rezeptor und anschließend über die PI3-Kinase vermittelte Zellmigration.

A



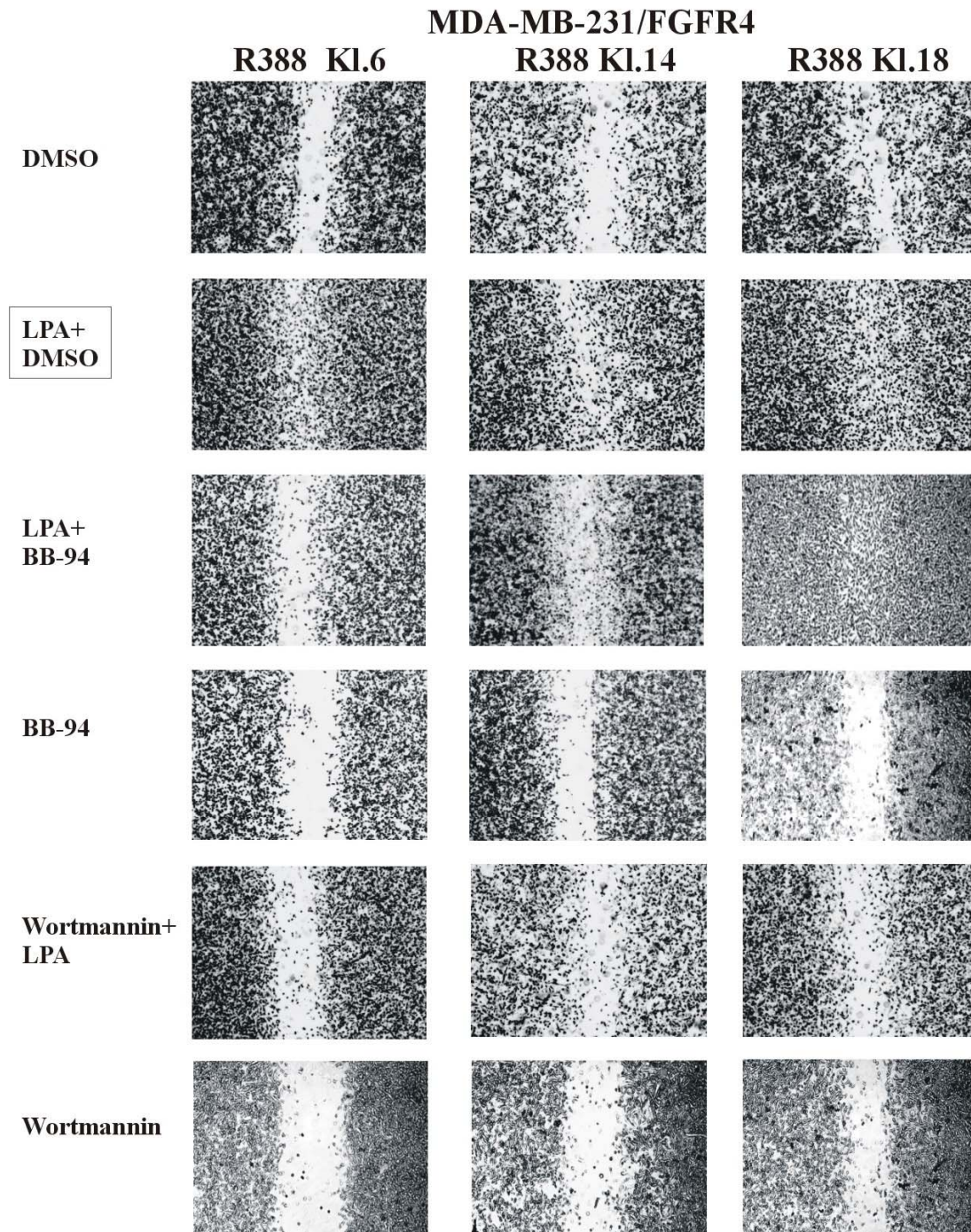
B

Abb. 39: FGFR4 G388 blockiert die LPA-stimulierte Migration von MDA-MB-231 Zellen im Wundheilungsexperiment

In eine Schicht konfluenter MDA-MB-231 Zellen auf 6-Lochplatten, die stabil FGFR4 G388, FGFR4 R388 oder Leervektor exprimieren, wurde nach einem Hungerzeitraum von 24 h mit einer Pipettenspitze ein Spalt geritzt. Abgelöste Zellen wurden gewaschen und auf die verbleibenden Zellen wurde frisches RPMI/0% FBS-Medium gegeben. Um die Zellwanderung anzuregen, wurden die Zellen mit 10 μ M Lysophosphatidylsäure (LPA) und 1 μ l/ml DMSO stimuliert. Um den Mechanismus einer möglichen Zellwanderung mittels Blockierung zu untersuchen, wurden die Inhibitoren Batimastat (BB-94, 5 μ M) oder Wortmannin (1 μ M) zusammen mit LPA verwendet. Als Negativkontrollen dienten 1 μ l/ml DMSO, 5 μ M BB-94 oder 1 μ M Wortmannin allein. Die Zellwanderung konnte nach einer Inkubationszeit von 10 h unter einem Axiovert S100 Mikroskop mit der Software OpenLab 2.1 dokumentiert werden. Die Experimente erfolgten dreimalig mit je drei verschiedenen Zellklonen. **A** pLXSN und FGFR4 G388 Klone **B** FGFR4 R388 Klone

3.7.5.3 FGFR4 G388 blockiert die Invasion

In dem folgenden Versuch war es Ziel, das invasive Potential der stabilen MDA-MB-231/FGFR4 zu testen. Hierbei durften die Zellen in Invasionskammern durch eine Matrigel-Schicht (BD Biosciences) zu NIH3T3 konditioniertem Medium ohne FBS in der unteren Kammer hin innerhalb von 24 h wandern. Äquivalent zum vorherigen Migrationsversuch wird hier die Fähigkeit der Zellen zur Invasion durch FGFR4 G388 stark herabgesetzt. Abbildung 40 zeigt im Diagramm (40A) die Anzahl der Zellen, die durch die Matrigel-Schicht hindurch gewandert sind. In 40B sind Photographien der Zellen auf der Membranunterseite nach Kristallviolett-Färbung zu sehen.

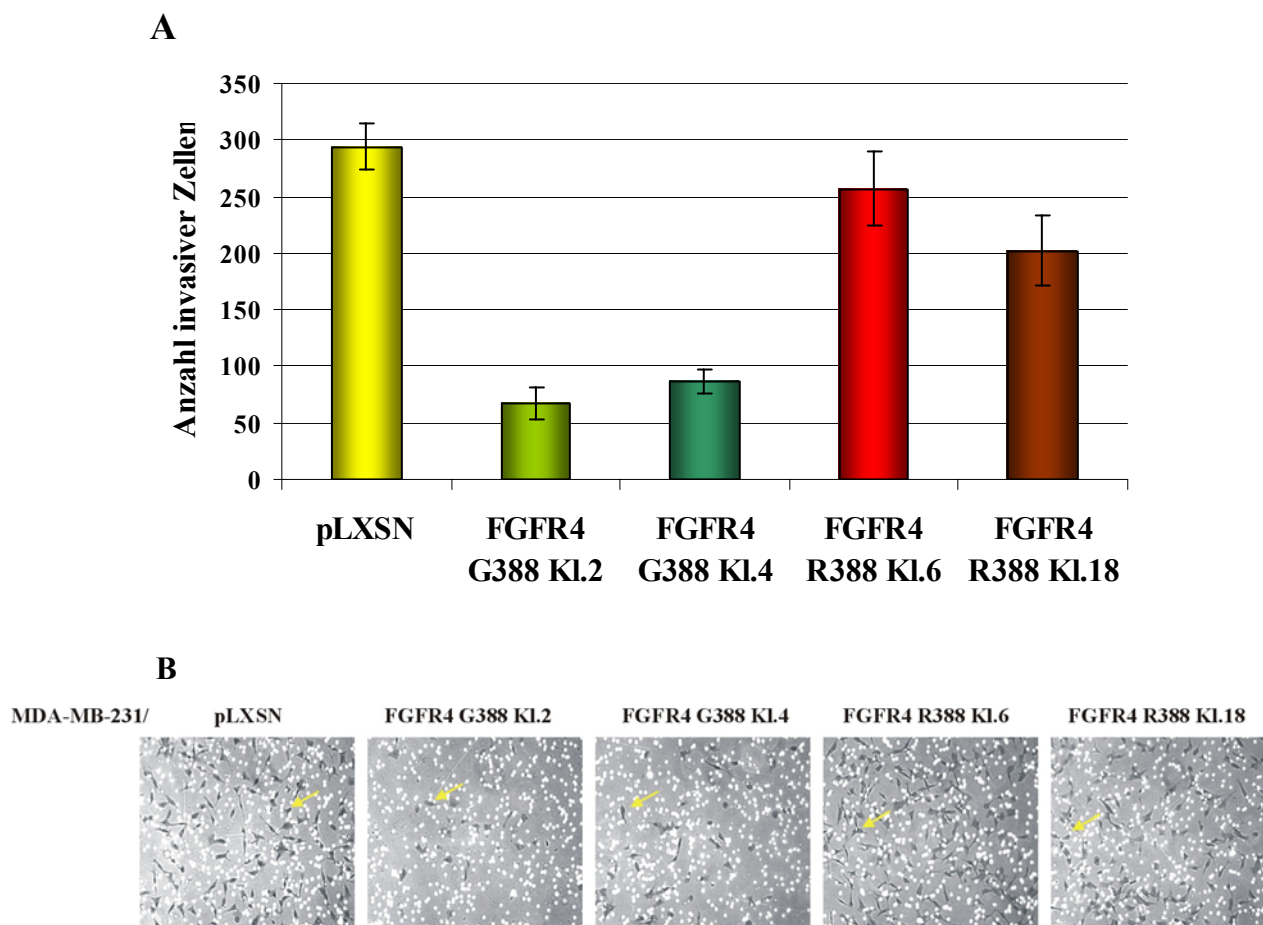


Abb. 40:FGFR4 G388 vermindert die Invasivität von stabilen MDA-MB-231 Zellen

Je 50000 Zellen, die stabil FGFR4 G388 oder R388 exprimieren bzw. mit Leervektor infiziert worden waren, wurden auf Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel auf einer Polykarbonatmembran in Zellkultureinsätzen (BD BioCoat GFR MATRIGEL Invasion Chamber, BD Biosciences, Pharmingen) ausgesät. Die Invasion erfolgte innerhalb der folgenden 24 h zu konditioniertem NIH3T3/0% FBS Medium als Chemoattraktanten in der unteren Kammer. Invasive Zellen, die fähig waren, durch das Matrigel auf die Unterseite der Membran zu wandern, wurden mit Kristallviolett angefärbt und im Mikroskop ausgezählt. **A** Anzahl der invasiven Zellen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. **B** Invasive Zellen auf der Membranunterseite angefärbt mit Kristallviolett.

3.7.5.4 FGFR4 G388 verhindert die Ausbildung von Ausläufern in der Matrigel-Matrix

Einen Hinweis auf das invasive Potential von Zellen und auch die Fähigkeit zur Metastasierung gibt ein Test auf die Ausbildung von Ausläufern in Matrigel-Matrix. Hierfür werden Zellen auf einer Matrigel-Matrix ausgesät und in den folgenden Tagen hinsichtlich ihrer morphologischen Veränderungen beobachtet. Invasive Zellen sind im Stande die Matrigelschicht, welche der extrazellulären Matrix in ihrer Zusammensetzung stark ähnelt, zu durchbrechen und lange Filopodien auszubilden. Weit voneinander entfernte Zellen können über ein Netz aus Zellausläufern miteinander Kontakt aufnehmen.

MDA-MB-231 Zellen sind zur Ausbildung dieser Zellausläufer durch eine Matrigelschicht mit einer Konzentration von 4-5 mg/ml befähigt. So schien es von besonderem Interesse, ob die Glycin-Variante des FGF Rezeptors 4, die sich in den bisherigen Versuchen als Suppressor tumorigener Eigenschaften erwiesen hat, einen Einfluss auf dieses Phänomen ausüben kann. Erstaunlicher Weise konnte bei diesem Versuch eine 100%ige Blockierung der Filopodien-Bildung in allen drei getesteten FGFR4 G388-Zellklonen beobachtet werden (Abb. 41). In Zellklonen, die die Arginin-Variante des Rezeptors exprimieren, zeigten sich bereits nach 24 h genauso starke bis stärkere (FGFR4 R388 Klon 14) Vernetzungen wie bei den MDA-MB-231/pLXSN-Kontrollzellen. FGFR4 G388 tritt also auch hier als eine Art Tumorsuppressor auf.

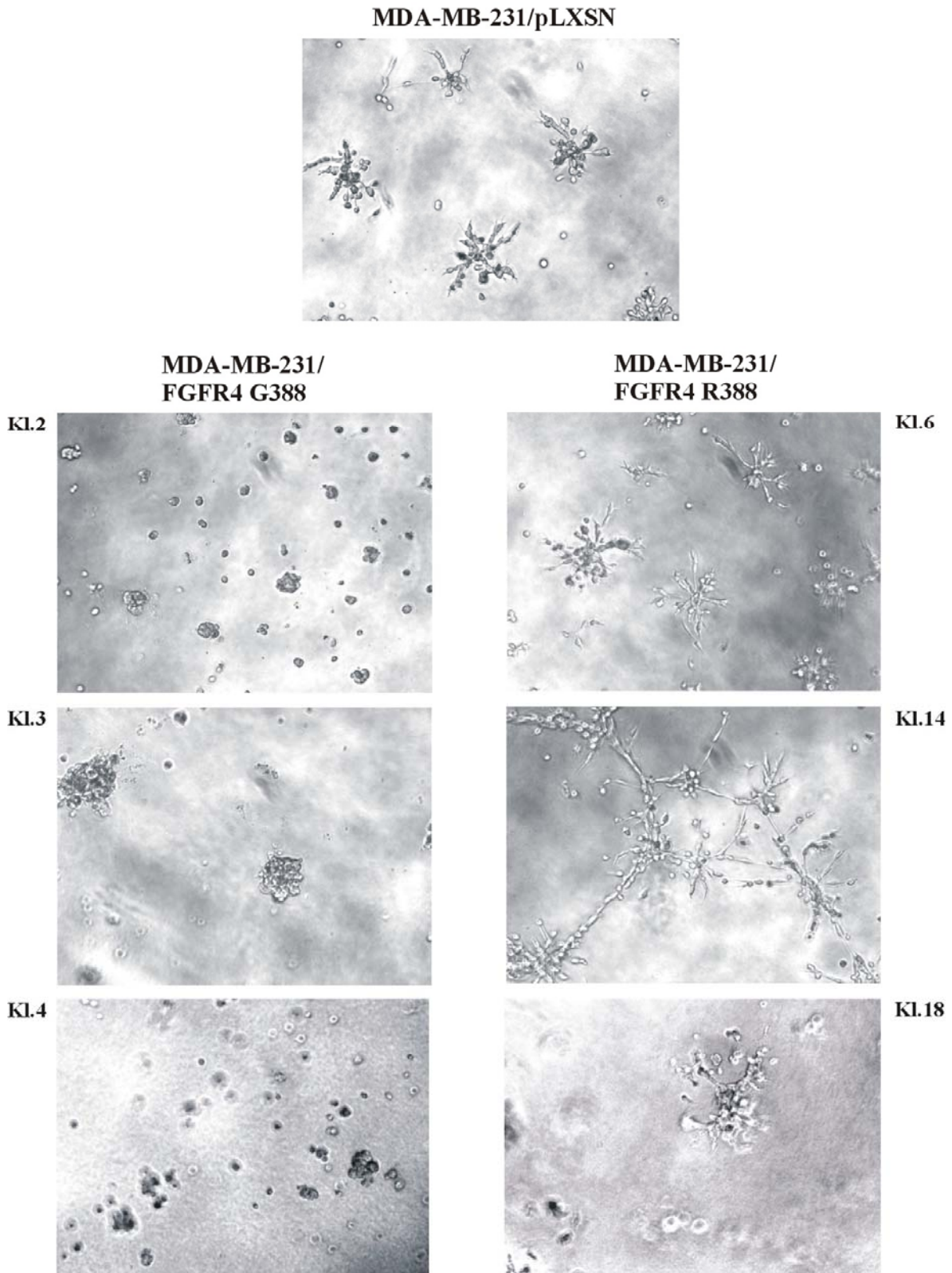


Abb. 41: FGFR4 G388 blockiert den Auswuchs von MDA-MB-231 Zellen auf einer Matrigel-Matrix

Auf einer 4 mg/ml konzentrierten Matrigel-Matrix in 96-Lochplatten wurden je 5000 stabil mit FGFR4 G388, FGFR4 R388 oder Leervektor infizierte MDA-MB-231 Zellen in RPMI/0% FBS ausgesät. Bereits nach 24-48 h zeigten die mit Leervektor und FGFR R388 infizierten Zellen im Gegensatz zu den mit G388 infizierten Zellen starken Auswuchs.

4 Diskussion

Die Entwicklung einer Zelle vom normalen zum neoplastischen Zustand ist ein mehrstufiger Prozess, an dem Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind. Eine Deregulation von Signaltransduktionsprozessen kann durch Mechanismen wie Amplifikation, Überexpression oder Mutation von Signalmolekülen verursacht werden.

Ein in dieser Arbeitsgruppe (J. Bange) entdeckter "*single nucleotide polymorphism*" (SNP) in der für die Transmembrandomäne des FGFR4 codierenden Sequenz, der zu einem Austausch der Aminosäure Glycin zu Arginin an Position 388 führt, konnte mit der Progression verschiedener Tumortypen in Verbindung gebracht werden. So ist der Gly388Arg Polymorphismus involviert in eine deutlich beschleunigte Tumorprogression sowie eine schlechte Prognose bei Patienten mit Brust-, Darmkrebs, Plattenepithelkarzinomen, Melanomen, Weichteil-Sarkomen und Prostatakrebs (Bange *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2003; Streit *et al.*, 2004, z.T. unveröffentlichte Daten; Wang *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden die Signalkaskade des FGFR4 und die biologische Funktion der Glycin- und Arginin-Varianten in Brustkrebszellen untersucht. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, welche Rolle FGFR4 Arg388 bei Prozessen der Tumorprogression spielt.

4.1 Bindungspartner des FGFR4

Außer einer schwachen Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) durch Tyrosinphosphorylierten FGFR4 und einer sehr geringen Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und 2 (pp42 kD und pp44 kD) (Raffioni *et al.*, 1999; Vainikka *et al.*, 1994) wurden bis vor kurzem keine weiteren Substrate des FGFR4 identifiziert. Neuere Untersuchungen durch Cavallaro (Cavallaro *et al.*, 2001) dagegen beschreiben eine durch N-CAM (*neurale cell-adhesion molecule*) eingeleitete Bildung eines FGFR4-Signalkomplexes aus N-Cadherin, FGFR-4, PLC γ , FRS2 (FGF Rezeptor Substrat 2), pp60^{c-src}, Cortaktin und GAP-43 (*growth associated protein-43*). In Untersuchungen von Hart *et al.* (2000) mit dominant aktiven Mutanten der FGF Rezeptoren 1, 3 und 4 wurde neben der bekannten Aktivierung von PLC γ auch eine Aktivierung der Proteine SHP-2, MAPK, Stat 1 und 3 beobachtet.

Im Zuge dieser Arbeit konnten etliche Substrate des FGFR4 durch VSV-*pull down* Experimente mit radioaktiv markierten Zellen (3.4.2) sowie durch nicht-radioaktiven VSV-*pull down* und anschließende Phosphotyrosin-Immunoblot Analyse (3.4.3) nachgewiesen werden. Bei den in beiden Experimenten mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 108, 93, 83, 76, 68, 66, 60, 50, 44 und 40 kD identifizierten Proteinen, muss es sich um konstitutiv an den Rezeptor gebundene Interaktionspartner handeln, da diese ebenso mit der dominant negativen Mutante des FGFR4 (FGFR4 K503M) wie mit den FGFR4-Varianten G388 und R388 assoziierten (Abb. 22).

Durch Proteinsequenzierung mit Hilfe der MALDI TOF Technologie konnten die Proteine HSPC173 (= PheRS), ZNF198 und SHP-2 als endogene Interaktionspartner des FGFR4 R388 in MDA-MB-453 Brustkrebszellen identifiziert werden (3.4.4).

Der HSPC173 oder humanen Phenylalanin-tRNA Synthetase β -Untereinheit (PheRS) wird aufgrund einer erhöhten Expression in Krebszelllinien eine Rolle bei tumorigenen Prozessen zugesprochen. In gesundem Gewebe wird die PheRS v.a. in Herz, Hirn, Plazenta, Skelettmuskel, Pankreas und in niedrigerem Maße in Leber, Lunge und Niere gefunden. Die PheRS setzt sich aus Modulen zusammen, die katalytischen-, DNA-Binde-, EMAP II- (*Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide-II*) und SH3-Domänen ähneln. Über die SH3-ähnliche Domäne, die vermutlich Kinaseaktivität besitzt, wird die PheRS an die Signaltransduktion verschiedener Proteine gekoppelt. Durch ihre Kinaseaktivität könnte die β -Untereinheit der PheRS eine Kaskade zellregulatorischer Ereignisse initiieren, die wiederum zur Überexpression der PheRS in Krebszelllinien führen würde und gleichzeitig den autoregulatorischen Transkriptionsmechanismus unterdrücken würde (Moor *et al.*, 2002; Rodova *et al.*, 1999).

Aufgrund der gemeinsamen Expression des FGFR4 und der PheRS in Herz, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Skelettmuskel liegt eine Assoziation der beiden Proteine nahe. Eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor würde vermutlich über die SH3-ähnliche Domäne der PheRS, über welche die Synthetase an Signaltransduktionsprozesse gekoppelt wird (Moor *et al.*, 2002; Rodova *et al.*, 1999), an Prolinreste des FGFR4 erfolgen. Eine Assoziation zwischen FGFR4 und der β -Untereinheit der PheRS könnte in tumorigenen Prozessen involviert sein, vorausgesetzt dass PheRS eine stärkere Affinität für FGFR4 R388 als FGFR4 G388 hat. Im Zuge dieser Arbeit wurde die PheRS im Komplex mit FGFR4 aus MDA-MB-453 Brustkrebszellen, die homozygote Träger des FGFR4 Arg388 Allels sind, präzipitiert. In weiterführenden Untersuchungen wäre von besonderem Interesse, ob PheRS an FGFR4 G388 binden und einen Einfluss auf die Rezeptorak-

tivität und Effekte auf mitogene Prozesse durch FGFR4 ausüben kann. Vor allem eine potentielle Rolle der Assoziation zwischen FGFR4 R388 und PheRS in Krebszellen sollte analysiert werden. Das Zinkfingerprotein 198 ist ein nukleäres Protein von 155 kD, das v.a. aufgrund einer Chromosomenlokalisierung als zytoplasmatisches Fusionsprotein von etwa 87 kD aus dem N-terminalen Teil des ZNF198 mit der Tyrosinkinasedomäne des FGFR1 bekannt ist. Durch das onkogene Potential des FGFR1 und die Zinkfinger-vermittelte Homodimerisierung und damit konstitutive Aktivierung der FGFR1 Kinaseaktivität wirkt ZNF198-FGFR1 transformierend auf Zellen und ist verantwortlich für das Auftreten des myeloproliferativen Syndroms (Baumann *et al.*, 2003; Heath and Cross, 2004; Xiao *et al.*, 1998).

Da die hier sequenzierte Proteinbande ein scheinbares Molekulargewicht von 155 kD aufwies, könnte es sich um das nukleäre Protein ZNF198 handeln. Eine mögliche Interaktion mit FGFR4 wurde nicht weiter verfolgt.

Die bereits im Rahmen der Diplomarbeit (C. Stadler, 2001) in einem VSV-*pull down* mit der zytoplasmatischen Domäne des FGFR4 detektierte Assoziation des FGFR4 mit der Phosphatase SHP-2 konnte hier durch Sequenzierung (3.4.4), Kopräzipitation aus MDA-MB-453 Zelllysaten (3.4.4.1, Abb. 25) und Koexpression in HEK293 Zellen (3.4.5, Abb. 26) bestätigt und näher untersucht werden. So konnte durch Inaktivierung des in MDA-MB-453 Zellen konstitutiv aktiven FGFR4 mittels des FGFR/VEGFR Inhibitors SU5402 gezeigt werden, dass SHP-2 nur mit aktivem FGFR4 präzipitiert werden konnte. Ob SHP-2 direkt oder wie bei den anderen FGFRn über FRS2 assoziiert ist, konnte nicht geklärt werden. Eine Aktivierung von FRS2 durch FGFR4 konnte von Raffioni und Mitarbeitern nur nach PDGF Stimulation von Rezeptorchimären bestehend aus der extrazellulären Domäne des humanen PDGFR β und der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne von Ratten FGFR4 gezeigt werden (Raffioni *et al.*, 1999). Gemäß Studien von Ong und Kollegen (Ong *et al.*, 2000) bindet die PTB Domäne des FRS2 Proteins an die Sequenz KSIPLRRQVTVS (AS 419-430) in der Juxtamembrandomäne des FGFR1. Durch Deletionsmutagenese konnten die Aminosäurereste 419, 422, 423, and 425 als essentielle und 421, 427 und 429 als äußerst wichtige Aminosäuren für eine effektive Bindung an den Rezeptor identifiziert werden. Durch Vergleich der FGFR4 Sequenz in diesem Bereich fällt auf, dass nur drei der essentiellen und keine der wichtigen Aminosäurereste vorhanden sind (-RF**PL**ARGFSL- statt **KSIPLRRQVTVS**). Somit ist eine direkte Bindung der Phosphatase SHP-2 an den FGFR4 eher anzunehmen als deren Bindung über FRS2.

Durch Koexpression von FGFR4 in der Glycin- und Arginin-Variante mit Wildtyp oder dominant negativem (C/S) SHP-2 (3.4.5, Abb. 26) konnte eine Dephosphorylierung des FGFR4 durch Wildtyp SHP-2 dokumentiert werden. Dabei schien die Phosphorylierung der R388-Variante des Rezeptors bei gleichzeitiger Expression mit Wildtyp SHP-2 noch schwächer zu sein als die der G388-Variante. Möglicherweise wird also die Signaltransduktion des FGFR4 R388 durch SHP-2 stärker negativregulatorisch beeinflusst als die des FGFR4 G388. Somit wäre die Funktion des FGFR4 durch den Austausch des Glycins gegen Arginin in der Transmembrandomäne gemindert, was in einer veränderten oder verhinderten Genexpression resultieren würde.

Eine weitere Wechselwirkung die im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die direkte Assoziation von FGFR4 mit PLC γ (3.4.6). Die entsprechende Bande im Phosphotyrosin-Immunoblot des VSV-*pull down* Versuchs (3.4.3, Abb. 23) wäre bei etwa 150 kD zu erwarten gewesen, wurde aber vermutlich von dem starken Signal des überexprimierten FGFR4 überlagert und konnte deshalb nicht detektiert werden.

Durch Mutation der konservierten und autophosphorylierbaren Tyrosinreste 642, 643, 719, 754 und 764 (Y764 existiert hier nur in Doppelmutation mit Y754) zu Phenylalanin konnte der Tyrosinrest 754 als essentielle Aminosäure für die PLC γ -Bindung identifiziert werden (3.4.6.1, Abb. 27). Y754 stellt den letzten Tyrosinrest in der zweiten Tyrosinkinasedomäne dar und entspricht Y766 in FGFR1, welches ebenfalls für die PLC γ -Bindung verantwortlich ist (Mohammadi *et al.*, 1991). Wie bei SHP-2 (3.4.4.1) konnte durch Inhibition des FGFR4 in MDA-MB-453 Zellen mittels SU5402 die Bedeutung der Rezeptoraktivität gezeigt werden. So konnte auch PLC γ (3.4.6.2, Abb. 28) nur mit aktivem, Tyrosin-phosphoryliertem FGFR4 präzipitiert werden.

Vermutlich konnte umgekehrt eine Präzipitation von FGFR4 durch PLC γ nicht detektiert werden, weil PLC γ in einer Vielzahl anderer Signalwege eine Rolle spielt und nur ein Bruchteil des Proteins in der Zelle mit FGFR4 assoziiert, während beinahe jedes aktivierte FGFR4 Molekül im Komplex mit PLC γ auftritt.

Weitere Studien zur Identifikation von FGFR4 Interaktionspartnern sollten unternommen werden, um die Funktionsweise dieses Rezeptors zu durchleuchten. Mögliche Kandidaten für Assoziationen, die in etwa dem Molekulargewicht der präzipitieren Banden im VSV-*pull down* entsprechen und auch im FGFR1 Signalweg eine Rolle spielen, wären u.a. Signalproteine wie PI3-Kinase, Gab1, Gab2, Akt/PKB, p70 S6 Kinase, Src und Shc. Über eine Assoziation dieser Protei-

ne mit FGFR4 konnten aus in dieser Arbeit durchgeführten Koimmunpräzipitationsstudien keine Aussagen getroffen werden, da zum einen unspezifische Signale zum anderen geringe Proteinmengen die Interpretation der Ergebnisse erschwerten (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2 FGFR Heterodimere

Heterodimerbildung von RTKs ist ein bekanntes Phänomen, das bei der Familie der PDGF-Rezeptoren (Heldin *et al.*, 1989; Kanakaraj *et al.*, 1991; Seifert *et al.*, 1989; Sliwkowski *et al.*, 1994) und der EGF-Rezeptoren (Peles *et al.*, 1993; Plowman *et al.*, 1993; Sliwkowski *et al.*, 1994) zuerst entdeckt wurde. Am Beispiel des PDGFR $\alpha\beta$ Heterodimers konnte gezeigt werden, dass das mitogene Potential der Heterodimeren im Vergleich zu den beiden Homodimeren zunimmt. Vermutlich liegt dies in neuen Autophosphorylierungsstellen begründet, die ausschließlich in den Heterodimeren gebildet werden und Wechselwirkungen mit zusätzlichen Signaltransduktionsmolekülen vermitteln können (Rupp *et al.*, 1994).

Über Heterodimerisierung innerhalb der Familie der FGF Rezeptoren wurde bislang noch nichts berichtet. In dieser Arbeitsgruppe konnte jedoch durch cDNA Array Analysen Doxorubicin resistenter Brustkrebsszellen (A. Roidl, unveröffentlichte Daten) eine Hochregulierung der Gene für FGFR3 und FGFR4 beobachtet werden. Auffallend dabei war das in hohem Maße korrelierende Expressionsmuster der beiden Gene in etwa 40 untersuchten klonalen Zelllinien. In früheren cDNA Array Analysen (P. Knyazev, unveröffentlichte Daten) verschiedener Brustkrebszelllinien konnte dagegen eine vergleichbare Expressionsstärke der Gene für FGFR2 und FGFR4 bestimmt werden. Aufgrund dessen war es Ziel, die Fähigkeit des FGFR4 zur Ausbildung von Heterodimeren zu untersuchen.

Durch Koexpression des FGFR4 mit FGFR1/2/3 und Western-Blot-Analyse (3.5, Abb. 29A, B, C) konnte nachgewiesen werden, dass FGFR4 mit jedem der drei FGFRn 1, 2 und 3 Dimere bildete. Mit Hilfe von FGFR4 Deletionsmutanten, denen unterschiedliche Domänen des Rezeptors fehlten, konnte der Ort der Bindung auf die extrazelluläre Domäne des FGFR4 eingegrenzt werden (Abb. 29D, E).

Zwischen der Arginin- und der Glycin-Variante des FGFR4 ergaben sich keine Unterschiede im Heterodimerisierungspotential. Der Polymorphismus scheint somit für die Interaktion zwischen den FGFRn nicht von Bedeutung zu sein, vermutlich da die Bindung in erster Linie über die extrazellulären Domänen der Rezeptoren erfolgt. Eine drastische Konformationsänderung durch die

Einführung der stark hydrophoben Aminosäure Arginin am N-terminalen Ende der Transmembrandomäne des FGFR4, welche die Position der extrazellulären Domäne in der Plasmamembran modifiziert, liegt demnach nicht vor.

Eine endogene Dimerisierung der vier Mitglieder der FGF Rezeptorfamilie miteinander konnte Mangels spezifischer Antikörper gegen die FGFRn 1, 2 und 3 nicht nachgeprüft werden. Für weitere Studien wäre die Untersuchung gemeinsamer Signalwege der FGFR-Heterodimere und die Aktivierung dieser Signalwege durch spezifische Liganden für FGFR1, 2, 3 oder 4 von Interesse. Möglicherweise wird die relativ schwache Kinaseaktivität des FGFR4 in manchen Zellsystemen durch Heterodimerisierung mit einem der aktivierten FGFRn kompensiert, was mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer verstärkten Genexpression führen würde. Auch könnten wie bei den PDGFR $\alpha\beta$ Heterodimeren neue Autophosphorylierungsstellen und damit Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle kreiert werden (Rupp *et al.*, 1994).

4.3 FGFR4 R388 wirkt nicht als Onkogen im Fokusbildungstest

Um einen möglichen Einfluss von FGFR4 R388 auf die Zelltransformation zu untersuchen (3.6), wurde die Wirkung der Überexpression des FGFR4 R388 sowie des FGFR4 G388 und der dominant aktiven FGFR4 K645E Mutante auf die Transformation von NIH3T3-Fibroblasten analysiert. Als Kriterium für die Transformation diente dabei der Verlust der Kontaktinhibition, also ein fortwährendes Zellwachstum trotz dichter Einbettung in eine Schicht von Nachbarzellen, was sich in der Bildung sogenannter Foci äußert, wie sie durch die Onkogene H-Ras und v-Src entstehen.

Wie aus Abbildung 30B ersichtlich wird, wurde die Kontaktinhibition durch FGFR4 R388 nicht aufgehoben, d.h. FGFR4 R388 fungierte hier nicht als Onkogen. Auch FGFR4 G388-Zellen zeigten keine Fokusbildung, während der konstitutiv aktive FGFR4 K645E zu einer schwachen Akkumulation von Zellen führte. Bei transienter Expression der drei FGFR4-Varianten in HEK293-Zellen konnte eine Erhöhung der Erk1/2-Phosphorylierung durch FGFR4 K645E im Vergleich zu FGFR4 G388 oder R388 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte die Fähigkeit des FGFR4 K645E zu der schwachen Fokusbildung erklären.

Weitere Studien sollten den Einfluss des FGFR4 G388 und R388 bei Infektion mit diversen Onkogenen wie den Ras-Varianten, v-Src, ErbB-2 etc. auf die Fokusbildung einschließen. Mögli-

cherweise ließe sich dadurch eine verstärkende oder hemmende Wirkung der beiden FGFR4-Varianten ausmachen, die zur Charakterisierung des Polymorphismus beitragen könnten.

4.4 FGFR4 G388 vermindert die Edg 2 Genexpression in MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien

Entscheidenden Einblick in die Ursachen der Krebsentstehung kann die Untersuchung der Genexpression in Tumorgewebe oder Krebszellen geben. Eine Möglichkeit der simultanen Expressionsanalyse einer großen Anzahl von Genen ist die spezifische Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA mit einer Vielzahl von Gensonden, die auf einer Matrix immobilisiert sind (cDNA Array Technologie) (Duggan *et al.*, 1999). Dabei kann z.B. auch der Effekt eines Polymorphismus, der wie bei FGFR4 eine Rolle bei der Tumorprogression spielt, durch ektopische Expression in Zellen auf die allgemeine Genexpression untersucht werden. Im Fall des FGFR4 SNP's wurde dazu die hochinvasive Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 gewählt, deren Tumorigenität vermutlich in erster Linie durch eine konstitutive Aktivierung der GTPase K-Ras (Kozma *et al.*, 1987) begründet ist. Diese Zelllinie exprimiert endogen nur sehr geringe Mengen an FGFR1 und 3 und kein FGFR2 und 4. Durch retroviralen Gentransfer wurden stabil exprimierende MDA-MB-231/pLXSN, ~/FGFR4 G388 und R388 Zellen hergestellt (J. Bange, d. AG).

Mit cDNA dieser Zelllinien wurden Nylon-Membranen mit immobilisierten cDNA Fragmenten von Kinasen, Phosphatasen und Proteasen als Gensonden hybridisiert (P. Knyazev, d. AG), da viele Mitglieder dieser drei funktionellen Proteinfamilien in der Vergangenheit als Faktoren identifiziert worden sind, die sowohl in der Tumorentstehung als auch in der Tumorprogression von Bedeutung sind.

Als Resultat dieser cDNA Array Analysen ergab sich u.a. eine drastische Reduktion im mRNA Level des LPA-Rezeptors Edg 2 bei gleichzeitiger FGFR4 G388 Expression. Dieser Effekt konnte im Zuge dieser Arbeit mittels semiquantitativer RT-PCR (*Reverse Transcript-PCR*) in fünf von sechs FGFR4 G388 exprimierenden MDA-MB-231 Zelllinien bestätigt werden (3.7.2, Abb. 32, 33). Lediglich in einer Zelllinie, die vergleichsweise wenig *fgfr4* mRNA produziert (FGFR4 G388 Klon 6, Abb. 33), zeigte sich eine ebenso starke *edg 2* Bande wie in den pLXSN oder FGFR4 R388 exprimierenden Zellen. Somit scheint die Suppression des *edg 2* Gens auch von der Menge an FGFR4 G388 abzuhängen.

Besonders interessant ist der Effekt auf den Edg 2 Rezeptor wegen dessen Aktivierbarkeit durch LPA, eines der potentesten Mitogene, welches sowohl in die Zellproliferation, das Überleben der

Zellen, die Motilität, Invasion und die Wundheilung normaler Zellen involviert ist als auch eine Schlüsselrolle bei der Krebsentstehung, Tumorprogression und diversen anderen Krankheiten spielt (Brindley, 2004; Fang *et al.*, 2000). LPA aktiviert neben Edg 2 auch Edg 4 und Edg 7, in parentalen MDA-MB-231 Zellen werden lediglich Edg 2 und 7 exprimiert.

Bei Untersuchung weiterer Brustkrebszelllinien, die stabil FGFR4 G388 oder R388 exprimieren, konnte keine Reduktion des *edg 2* Levels durch FGFR4 G388 nachgewiesen werden. Somit ist der in MDA-MB-231 beobachtete Effekt stark von dem allgemeinen genetischen Hintergrund dieser Zelllinie abhängig.

4.5 Die Akt/PKB-Aktivierung in FGFR4 G388 und R388 exprimierenden MDA-MB-231 Zelllinien ist von unterschiedlichen Stimuli abhängig

Die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB wird über Wachstumsfaktorrezeptoren durch diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Peptide oder Hormone aktiviert. Die durch Lysophosphatidylsäure (LPA) oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P) induzierte Akt/PKB-Aktivierung beginnt bei G Protein gekoppelten Rezeptoren wie Edg 1-7 und läuft dann über Gi/o Proteine, das kleine G Protein Rho, die PI3-Kinase und PDK1, welches in der Plasmamembran lokalisiert ist und Akt/PKB an Threonin 308 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 erfolgt über einen zweiten durch PI3K geleiteten Signalweg über MEK, Erk, p38 und PDK2 (Baudhuin *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) initiiert die Akt/PKB-Aktivierung über den EGFR, welcher die Src-Kinase aktiviert, die wiederum Gab2 phosphoryliert, was zur Aktivierung der PI3-Kinase, der PDK1 und zur Phosphorylierung von Akt/PKB führt (Kong *et al.*, 2003).

Für die nähere Untersuchung der Auswirkung der in 4.4 beschriebenen Reduktion des *edg 2* mRNA Levels in MDA-MB-231/FGFR4 G388-Zellen wurden die verschiedenen Zelllinien - pLXSN, FGFR4 G388, ~R388 - auf Abweichungen in der Akt/PKB-Aktivierung geprüft (3.7.3).

Nach Stimulation der Zelllinien mit EGF, LPA, S1P oder Thrombin ließ sich im Phospho-Akt Immunoblot eine drastische Änderung in der Aktivierbarkeit der Serin/Threonin Kinase Akt/PKB in den unterschiedlichen Zelllinien (3.7.3, Abb. 34) beobachten: Während Akt/PKB in der pLXSN-Zelllinie nach Stimulation mit EGF, LPA und in schwachem Maße auch S1P phosphoryliert wurde, konnte eine Akt/PKB-Aktivierung in FGFR4 G388-Zelllinien nur nach EGF Stimulation und in FGFR4 R388-Zelllinien lediglich nach LPA Stimulation detektiert werden. Somit

wird in FGFR4 G388-Zelllinien der Verlust an Edg 2-Rezeptor und damit das Fehlen eines wichtigen Signalwegs für die Akt/PKB-Aktivierung durch einen Wechsel zu einem alternativen Signalweg kompensiert, der zur Akt/PKB-Aktivierung führt, nämlich über EGF und den EGF-Rezeptor. Überraschender Weise hatte EGF in FGFR4 R388-Zelllinien keinerlei Wirkung auf die Akt/PKB-Aktivierung. Auch S1P fungierte nicht als Akt/PKB-Aktivator in FGFR G388- sowie R388-Linien.

Um die Bedeutung der Kinaseaktivität des FGFR4 für die Aktivierung der Akt/PKB-Kinase zu überprüfen, wurden Zelllinien mit Tyrosin-defizienten FGFR4-Mutanten getestet. Bei Stimulation der polyklonalen Zelllinien MDA-MB-231/FGFR4 Y642/643F, Y719F, Y754F und Y754/764F (3.7.3, Abb. 34), die Tyrosin-Mutanten der Glycin-Variante exprimieren, wurde der gleiche Effekt wie bei den FGFR4 R388-Zelllinien erreicht. So erschien ein Phospho-Akt-Signal ausschließlich nach LPA-Stimulation. Die Stärke des Signals war zudem von dem jeweils ausgeschalteten Tyrosin abhängig. Bei gleichzeitiger Mutation zweier Tyrosinreste wie Y642/643 und Y754/764 ließ sich eine Minderung in der Signalstärke feststellen. Diese Tyrosinreste sind demnach essentiell für die Signalweiterleitung. Bei RT-PCR-Analyse der FGFR4 G388 Y/F-Zelllinien konnte keine Veränderung im *edg 2* mRNA Level nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Offenbar ist also die volle Aktivität des FGFR4 G388 notwendig, um die Edg 2 Expression zu unterdrücken und die Akt/PKB-Aktivierung anstatt durch LPA und Edg 2 durch EGF über den EGFR zu gewährleisten.

In dem folgenden unter 3.7.3.1 beschriebenen Experiment wurde der Signalweg der Akt/PKB-Aktivierung untersucht. Üblicherweise wird das Signal über die PI3-Kinase an PDK1 vermittelt, welche schließlich Akt/PKB aktiviert. Wie im Phospho-Akt Immunoblot nach Stimulation mit EGF (Abb. 35A) oder LPA (Abb. 35B) und Wortmannin Inkubation zu sehen ist, läuft die Akt/PKB-Aktivierung auch hier in allen Zelllinien über die PI3-Kinase, unabhängig davon, ob EGF oder LPA als Stimulus fungierte. Demnach erfährt die Akt/PKB-Aktivierung lediglich oberhalb der PI3-Kinase auf Ebene der membranständigen Rezeptoren eine Änderung im Signalweg in FGFR4 G388 und R388 exprimierenden Zelllinien. Das schwache Phospho-Akt-Signal in der FGFR4 R388-Zelllinie nach EGF-Stimulation ohne Inhibierung der PI3K durch Wortmannin ist wohl auf eine erhöhte Basalphosphorylierung der Akt/PKB zurückzuführen, die auch in unstimulierten (-) Zellen sichtbar war.

Weiterhin war der Einfluss der Kinaseaktivität des FGFR4 in der Glycin- sowie der Arginin-Variation auf die Akt/PKB-Aktivierung von Interesse. Dazu wurden wie unter 3.7.3.2 erläutert

pLXSN-Kontrollzellen, FGFR4 G388- und R388-Zelllinien über Nacht oder für 30 min mit dem Inhibitor SU5402 (gelöst in DMSO) behandelt, welcher FGF Rezeptoren und auch den VEGF-Rezeptor durch Anlagerung an deren ATP-Bindetasche inaktiviert (Mohammadi *et al.*, 1997). Als Kontrolle dienten Zellen, die über Nacht mit DMSO inkubiert worden waren. Abbildung 36A demonstriert die Effizienz des Inhibitors. Bei Inkubation mit SU5402 konnten FGFR4 G388 und R388 nicht einmal durch eine Stimulation mit Pervanadat aktiviert werden. Die Phospho-Akt-Immunoblots in Abbildung 36B zeigen, dass der Inhibitor keinen Effekt auf die Akt/PKB-Aktivierung in MDA-MB-231/pLXSN und FGFR4 G388 Zellen hatte. Jedoch spielt die Kinasaktivität des FGFR4 R388 wohl eine Rolle bei der Stärke der Akt/PKB-Aktivierung. Durch langzeitige Inaktivierung des FGFR4 R388 wurde die Phosphorylierung der Akt-Kinase durch LPA gehemmt, während eine Inkubation der Zellen für kurze Zeit diese Wirkung nicht zeigte. Eventuell beruht dieser Effekt auf einer Genexpressionsänderung eines regulatorischen Proteins durch die langzeitige Inhibierung des FGFR4 R388. Die *edg 2*-Genexpression wurde von einer Langzeit-Inkubation der FGFR4 G388 sowie R388 Zellen mit Inhibitor nicht beeinflusst, wie durch RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine Inaktivierung des FGFR4 R388 über mehrere Stunden resultierte hier also in einer abgeschwächten Akt/PKB-Aktivierung durch LPA, ein Effekt, der schon in Abschnitt 3.7.3 bei simultaner Mutation zweier Tyrosinreste in FGFR4 G388 beobachtet werden konnte (Abb. 34). Welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt, muss noch geklärt werden. Möglicherweise könnten cDNA Array Analysen bei der Klärung behilflich sein, um eine eventuelle Veränderung auf Ebene der Genexpression durch Inaktivierung des exogen exprimierten FGFR4 aufzudecken.

In einem weiteren Versuch wurde die Aktivierbarkeit des EGFRs in MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 und R388 Zellen untersucht (3.7.4). Dazu wurden die gleichen Stimuli wie zuvor - EGF, LPA, S1P und Thrombin - verwendet und anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad des EGFRs im Immunoblot bestimmt (Abb. 37). Bei Betrachtung des Phospho-EGFR-Immunoblots in Abbildung 37 fällt auf, dass der EGFR in FGFR4 G388 exprimierenden Zellen generell stärker phosphoryliert wurde als in pLXSN- und FGFR4 R388-Zellen. Zwar ließ sich einerseits bei unstimulierten FGFR4 G388-Zellen (-) eine erhöhte Basalphosphorylierung des EGFR detektieren, andererseits aber wird aus dem EGFR-Kontrollblot eine insgesamt geringere Expression des EGFR in FGFR4 G388 im Vergleich zu pLXSN und FGFR4 R388 exprimierenden Zellen deutlich. Das Signal des phosphorylierten EGFRs ist somit tatsächlich auf einen höheren Phosphorylierungsgrad in FGFR4 G388 Zellen zurückzuführen. Die LPA-induzierte EGFR-

Phosphorylierung war ebenfalls etwas stärker als das Signal bei unstimulierten Zellen, so dass LPA in FGFR4 G388-Zellen zwar keine Aktivierung der Akt/PKB aber des EGFR zu vermitteln scheint. Nach Inkubation der drei Zelllinien mit dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 war eine Aktivierung des EGFR mit den üblichen Stimuli nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Weshalb der EGFR in FGFR4 G388 exprimierenden Zellen stärker phosphoryliert wurde, bedarf noch seiner Aufklärung. Hier könnte eine Transaktivierung über Edg 7 eine Rolle spielen. Bei dem Vergleich der Genexpressionsstärke diverser Phosphatasen in den untersuchten Zelllinien durch cDNA Array Analyse konnte keine drastische Reduktion in FGFR4 G388 Zelllinien gefunden werden. Eventuell beruht der Effekt aber auch auf einer Suppression eines EGFR Negativregulators wie beispielsweise LRIG1 (Haglund *et al.*, 2003), Mig 6 (Hackel *et al.*, 2001), c-Cbl (Gur *et al.*, 2004) oder Syk (Ruschel and Ullrich, 2004). Ausgedehnte cDNA Array Analysen könnten auch hier von Nutzen sein.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass die FGFR4 G388 Expression aufgrund der Reduktion des LPA-Rezeptors Edg-2 zu einer Umleitung der über die PI3-Kinase laufenden Akt/PKB-Aktivierung führt, nämlich über den EGFR mittels EGF statt den Edg 2-Rezeptor mittels LPA. Dieser Effekt tritt nur bei voller Aktivität des FGFR4 G388 ein. Auf die EGFR-Phosphorylierung hat die FGFR4 G388 Expression eine verstärkende Wirkung.

4.6 FGFR4 G388 wirkt *in vitro* als Suppressor in Tumor-physiologischen Untersuchungen

Durch das Studium zellulärer Prozesse wie der Zellproliferation, -migration oder -invasion kann ein Einblick in die Funktionsweise eines einzelnen Proteins und über dessen tumorprogressives oder auch tumorsuppressives Potential gewonnen werden. Dabei kann beispielsweise in den komplexen Mechanismus der Zellmigration an verschiedenen Stellen mittels spezifischer Inhibitoren eingegriffen werden, um der Aufklärung des zu Grunde liegenden Signalwegs näher zu kommen.

Invasive Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, die Basalmembran, welche Gewebe gegeneinander abgrenzt, zu durchbrechen und durch die entstandene Lücke in das benachbarte Gewebe einzuwandern. Dabei können sie auch durch Wände von Adern oder Lymphgefäßen in die Blut- oder Lymphbahnen gelangen (Friedl and Wolf, 2003b). Invasives Wachstum zerstört das betroffene

Gewebe und leitet über zur Metastasierung. Dabei wandern Tumorzellen in entferntere Körperregionen ab, setzen sich dort fest und bilden die sog. Metastasen.

Die Zellmigration/-invasion setzt sich im Wesentlichen aus folgenden Schritten zusammen: Durch die Assoziation wachsender Aktinfilamente an membrannaher Adapterproteine wie ARP2/3 (*actin-related protein 2 and 3*) und WASP (*Wiscott-Aldrich syndrome protein*) wird die Zellmembran nach außen gedrückt. Durch ein Zusammenspiel von PIPs (**Phosphatidylinositol Phosphate**), kleinen GTPasen und WASP wird die Verlängerung von Filopodien eingeleitet (Rohatgi *et al.*, 1999). Integrine treten mit Liganden der extrazellulären Matrix in Kontakt und interagieren direkt mit diversen Adhäsionsmolekülen. Schließlich werden weitere Adapterproteine (z.B. PI3-Kinase) zu "*focal contacts*" mit der extrazellulären Matrix rekrutiert (Degani *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 1995; Zamir and Geiger, 2001), wodurch Oberflächenproteasen zu diesen Kontakten transportiert werden und eine zielgerichtete Proteolyse eingeleitet wird (Friedl and Wolf, 2003a; Ohuchi *et al.*, 1997; Sameni *et al.*, 2000). Aktin-Myosin Komplexe induzieren im Anschluß daran die Zellkontraktion, die durch RHO und ROCK reguliert wird (Cramer, 1999; Katoh *et al.*, 2001; Verkhovskiy *et al.*, 1995). Im letzten Schritt löst sich die Zelle von der extrazellulären Matrix, indem Aktinfilamente brechen und die "*focal contacts*" aufgelöst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der stabilen Zelllinien MDA-MB-231/pLXSN, FGFR4 G388 und R388 der Einfluss des Polymorphismus in der Transmembrandomäne des FGFR4 auf die Migration, Invasion und die Wundheilung betrachtet werden. Aufgrund der drastischen Reduktion des LPA-Rezeptors Edg 2 in FGFR4 G388 exprimierenden Zelllinien wurden die verschiedenen Zellen vor allem im Hinblick auf ihr Verhalten bei einer Induktion durch LPA beobachtet. Bei der Analyse der Migration (3.7.5.1, Abb. 38) im Transwell ergab sich, dass FGFR4 G388 die Zellwanderung durch die Membranporen zu LPA als Chemoattraktant hin um 60-80% im Vergleich zu den pLXSN-Zellen minderte (Abb. 38C und D). FGFR4 R388 exprimierende Zelllinien migrierten dagegen sogar um einen Faktor von 1,7 bis 2,0 stärker als die pLXSN-Kontrollzellen. Ein ähnliches Verhaltensmuster war auch bei der Migration ohne Chemoattraktant (Abb. 38A) zu verzeichnen, wobei hier die Migration insgesamt um den Faktor 2000 niedriger war als bei LPA und die FGFR4 G388 exprimierenden Zellen beinahe vollständig an ihrer Wanderung gehindert wurden. Auch hier migrierten 1,4 bis 1,9-mal so viele FGFR4 R388 exprimierende Zellen durch die Membran als Kontrollzellen. Am deutlichsten wurde der Unterschied zwischen Kontrollzellen und FGFR4 R388 Zellen im Migrationsversuch mit FGF-1

als Chemoattraktant (Abb. 38). Während FGFR4 G388 die Zellmotilität auch hier zu fast 100% inhibierten, bewegten sich 2,4 bis 3,6-mal mehr FGFR4 R388 Zellen in Richtung FGF-1 als Kontrollzellen. Verglichen zur LPA-induzierten Migration handelte es sich hier um eine etwa 10-mal schwächere Motilität.

Insgesamt verleiht FGFR4 R388 MDA-MB-231 Zellen eine 1,4 bis 3,6fache Fähigkeit zur Zellwanderung - abhängig vom Chemoattraktant - gegenüber Kontrollzellen, während FGFR4 G388 die Motilität zu 60 bis 100% verringert.

Diese Ergebnisse deuten vor allem auf einen tumorsuppressiven Effekt der Glycin-Variante des Rezeptors hin. Der Austausch von Glycin zu Arginin in der Transmembrandomäne des Rezeptors dagegen verstärkt das migrasive Potential der Zellen. Dieser Effekt fällt zwar nicht so drastisch aus wie die Inhibierung durch FGFR4 G388, könnte aber dennoch auf eine tumorigene Funktion des FGFR4 R388 hinweisen.

Diese Aussage konnte durch das Wundheilungsexperiment (3.7.5.2) bestärkt werden. Das Schließen von Spalten im konfluenten Zellrasen kann durch Zellwanderung und/oder Zellteilung erfolgen. Deshalb müssen Zellen vor der Durchführung des Experiments zunächst auf ihr proliferatives Verhalten hin geprüft werden. Durch wiederholtes Auszählen der für das Wundheilungsexperiment verwendeten Zelllinien alle 48 h konnte kein Unterschied in der Proliferation bei pLXSN, FGFR4 G388 oder R388 Zellen festgestellt werden. Somit konnten die Effekte, die sich im Experiment zeigten, der Zellwanderung zugeschrieben werden.

Wie in Abbildung 39A ersichtlich hemmte FGFR4 G388 in allen drei untersuchten Zelllinien (FGFR4 G388 Klon 2, 4 und 8) die durch LPA induzierte Wundheilung (LPA + DMSO), während der Spalt in den pLXSN-Kontrollzellen und in den FGFR4 R388 Zelllinien (Klon 6, 14 und 18, Abb. 41B) nach 10-stündiger Inkubation mit LPA und DMSO beinahe geschlossen war. Die stärkste Zellwanderung zeigte hierbei die Zelllinie FGFR4 R388 Klon 18. Wie aus der Negativkontrolle nur mit DMSO zu sehen war, hatte DMSO allein keinen Einfluss auf diesen Effekt. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit LPA und dem Metalloproteasehemmer Batimastat (LPA + BB-94, Abb. 39A, B) konnte die Wundheilung bei den FGFR4 R388 exprimierenden Zellen nur teilweise unterbunden werden (Abb. 39B). Demnach wird die LPA-induzierte Zellwanderung nicht ausschließlich über Metalloproteasen wie z.B. die ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*) und den EGF-Rezeptor vermittelt. Aus diesem Grund wurde die PI3-Kinase als ein weiterer Mediator des mitogenen Signals durch Wortmannin ausgeschaltet. Bei gleichzeitiger Stimulation mit LPA und Inhibierung mit Wortmannin schloß sich der Spalt im Zellrasen der

pLXSN und FGFR4 R388 exprimierenden Zellen nur minimal (Abb. 39B, LPA + Wortmannin), wodurch die wichtige Rolle der PI3-Kinase bei der Vermittlung der Zellwanderung in diesem System erwiesen werden konnte. Die PI3-Kinase fungiert allgemein als eines der Schlüsselenzyme bei der Generierung der PIPs, welche Guanin-Austausch Faktoren (GEFs) aktivieren, die wiederum die Aktivität der Rho GTPasen Rac und Cdc42 regulieren (Kaibuchi *et al.*, 1999; Toliyas *et al.*, 1995). Über die Rho-GTPasen werden die Bildung der Filopodien und "focal contacts" gesteuert (Rohatgi *et al.*, 1999).

Für die Untersuchung der tumorsuppressiven Wirkung des FGFR4 G388 auf das invasive Verhalten der Zellen *in vitro* wurden Experimente mit Matrigel Matrix durchgeführt. Bei der Analyse (3.7.5.3) der verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien gegen NIH3T3-konditioniertes Medium ohne FBS ließ sich der tumorsuppressive Effekt des FGFR4 G388 aus dem Migrationsversuch (3.7.5.1) ebenfalls beobachten. So minderte FGFR4 G388 die Fähigkeit der MDA-MB-231 Zellen sich durch Matrigel zu bewegen um einen Faktor von 3,5 bis 5 (Abb. 42A). In diesem Fall wurde das invasive Potential der Zellen nicht durch den FGFR4 R388 erhöht, sondern lag um 20 bis 30% unter dem der pLXSN-Kontrollzellen. Da die Zusammensetzung von NIH3T3 konditioniertem Medium nicht bekannt ist und dem Medium auch kein FBS beigefügt wurde, kann über den die Invasion induzierenden Stimulus keine Spekulation angestellt werden. MDA-MB-231 Zellen scheinen keinen hochkonzentrierten Stimulus als Chemoattraktant zu benötigen, um sich durch Matrigel Matrix zu bewegen. Durch FGFR4 G388 wurde diese Fähigkeit aber stark eingeschränkt und damit das Potential der Zellen zur Metastasierung verringert.

Dieses durch FGFR4 G388 verursachte Phänomen konnte noch in einem weiteren Matrigel Matrix Versuch, der über morphologische Veränderungen von Zellen in einer Matrix Auskunft über die Invasivität und Fähigkeit zur Metastasierung gibt (3.7.5.4), bestätigt werden. Für die Zelllinie MDA-MB-231 war bereits bekannt, dass sie aufgrund ihrer Invasivität Ausläufer in Matrigel Matrix bildet (Zajchowski *et al.*, 2001).

Für den Versuch wurden wieder jeweils drei FGFR4 G388 oder R388 exprimierende Zelllinien auf Matrigel Matrix ausgesät und im Hinblick auf die Ausbildung von Zellausläufern beobachtet. Bereits nach einem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden hatten MDA-MB-231/pLXSN und ~/FGFR4 R388 Zellen Filopodien ausgebildet (Abb. 41). Bei allen drei FGFR4 G388 exprimierenden Zelllinien dagegen wurde die Bildung dieser Ausläufer vollständig blockiert.

Weitere Untersuchungen sollten der Aufklärung dienen, an welcher Stelle des Migrationsmechanismus FGFR4 G388 seine tumorsuppressive Funktion ausübt. Mögliche Ansatzpunkte für diese Studien wären die Fortbewegung der Zellen in der Matrix über Aktinfilamente, die Kontaktaufnahme der Zelle zur extrazellulären Matrix über Intergrine, die Aktivierung von Proteasen zum Verdau der extrazellulären Netzwerke und die verschiedenen Proteinkomplexe, die diese Prozesse regulieren. Die Aufklärung des Mechanismus des FGFR4 G388 würde Einblick in die Wirkungsweise potentieller Tumorsuppressoren schaffen und gleichzeitig Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Inhibitoren gegen Proteine, die in den tumorigenen Prozess involviert sind, liefern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung der Signaltransduktion und der Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 (*fibroblast growth factor receptor 4*) in Krebszellen im Fokus des Interesses. Dabei wurde der Austausch eines Glycin gegen Arginin an Position 388 des Rezeptors, welcher mit einer beschleunigten Tumorprogression korreliert, genauer untersucht.

Bei Signaltransduktionsstudien konnte anhand von *pull down*-Experimenten, Proteinsequenzierung mittels MALDI TOF und Kopräzipitationen im endogenen Zellsystem die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 als Substrat des FGFR4 identifiziert werden. In Koexpressionsstudien war es möglich, einen negativregulatorischen Einfluss der Phosphatase auf die FGFR4-Aktivierung nachzuweisen. Dabei wurde die Arg388 Variante des FGFR4 stärker dephosphoryliert als die Gly388 Variante. Ferner konnte erstmalig eine direkte Bindung von PLC γ an den Tyrosinrest 754 des FGFR4 bestimmt werden. Auch die Fähigkeit zur Heterodimerenbildung des FGFR4 mit den FGFRn 1, 2 und 3 wurde demonstriert.

Desweiteren wurden basierend auf der Erkenntnis, dass die Genexpression des LPA (*lysophosphatidic acid*) Rezeptors Edg 2 in bestimmten Brustkrebszellen durch die Gly388 Variante des FGFR4 supprimiert wird, biochemische und zellphysiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei konnte eine Verschiebung in der Aktivierung der Kinase Akt/PKB durch LPA und EGF (*epidermal growth factor*) demonstriert werden. So erfolgte eine Akt/PKB-Aktivierung in Leervektor exprimierenden Zellen sowohl nach EGF als auch nach LPA Stimulation, während Akt/PKB-Aktivierung in FGFR4 Arg388 exprimierenden Zellen nur durch LPA und in FGFR4 Gly388 exprimierenden Zellen ausschließlich durch EGF eintrat.

Durch Analyse der physiologischen Relevanz des Polymorphismus in Krebszellen konnten der FGFR4 Gly388 Variante Eigenschaften eines Tumorsuppressors zugeschrieben werden. Während sich FGFR4 Arg388 exprimierende Zellen ähnlich den Leervektor exprimierenden Zellen verhielten, blockierte FGFR4 Gly388 besonders die LPA-induzierte Migration, die LPA-induzierte Wundheilung, die Invasion und die Ausbildung von Ausläufern in der Matrigel-Matrix.

Die hier erarbeiteten Daten bestätigen die von Bange *et al.* (2002) vorgeschlagene Funktion des FGFR4 Gly388 als Tumorsuppressor und erlauben damit die Diskussion der Hypothese, des Arginin Polymorphismus als "loss-of-function"-Mutation.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C. (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J*, **5**, 2523-2528.
- Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C.A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D. and Theillet, C. (1991) BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene*, **6**, 659-663.
- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M. and McEwan, R.N. (1987) A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, **47**, 3239-3245.
- Alroy, I. and Yarden, Y. (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, **410**, 83-86.
- An, S., Bleu, T., Hallmark, O.G. and Goetzl, E.J. (1998) Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **273**, 7906-7910.
- An, S., Dickens, M.A., Bleu, T., Hallmark, O.G. and Goetzl, E.J. (1997) Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 619-622.
- Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **274**, 27776-27785.
- Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Haring, H.U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Hofler, H. and Ullrich, A. (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res*, **62**, 840-847.
- Bargmann, C.I. and Weinberg, R.A. (1988) Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *Embo J*, **7**, 2043-2052.
- Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D. and Marshall, M. (1998) Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene*, **17**, 1539-1547.
- Baudhuin, L.M., Cristina, K.L., Lu, J. and Xu, Y. (2002) Akt activation induced by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate requires both mitogen-activated protein kinase kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and is cell-line specific. *Mol Pharmacol*, **62**, 660-671.

- Baumann, H., Kunapuli, P., Tracy, E. and Cowell, J.K. (2003) The oncogenic fusion protein-tyrosine kinase ZNF198/fibroblast growth factor receptor-1 has signaling function comparable with interleukin-6 cytokine receptors. *J Biol Chem*, **278**, 16198-16208.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. and Rifkin, D.B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, **18**, 26-45.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-365.
- Boyden, S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, **115**, 453-466.
- Brindley, D.N. (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem*, **92**, 900-912.
- Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, **234**, 177-186.
- Bugler, B., Amalric, F. and Prats, H. (1991) Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol*, **11**, 573-577.
- Burgess, W.H., Dionne, C.A., Kaplow, J., Mudd, R., Friesel, R., Zilberstein, A., Schlessinger, J. and Jaye, M. (1990) Characterization and cDNA cloning of phospholipase C-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, **10**, 4770-4777.
- Burgess, W.H. and Maciag, T. (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*, **58**, 575-606.
- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. and Radvanyi, F. (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet*, **23**, 18-20.
- Champion-Arnaud, P., Ronsin, C., Gilbert, E., Gesnel, M.C., Houssaint, E. and Breathnach, R. (1991) Multiple mRNAs code for proteins related to the BEK fibroblast growth factor receptor. *Oncogene*, **6**, 979-987.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S., Diltz, C.D., Harrylock, M., Cool, D.E., Krebs, E.G., Fischer, E.H. and Walsh, K.A. (1989) Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5252-5256.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. and Fischer, E.H. (1988) The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7182-7186.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.

- Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. and Bergsagel, P.L. (1997) Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*, **16**, 260-264.
- Contos, J.J. and Chun, J. (2000) Genomic characterization of the lysophosphatidic acid receptor gene, lp(A2)/Edg4, and identification of a frameshift mutation in a previously characterized cDNA. *Genomics*, **64**, 155-169.
- Contos, J.J., Ishii, I. and Chun, J. (2000) Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, **58**, 1188-1196.
- Cramer, L.P. (1999) Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp*, **65**, 173-205.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557-560.
- Degani, S., Balzac, F., Brancaccio, M., Guazzone, S., Retta, S.F., Silengo, L., Eva, A. and Tarone, G. (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol*, **156**, 377-387.
- Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M. and Leder, P. (1994) Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev*, **8**, 3045-3057.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.
- DiGabriele, A.D., Lax, I., Chen, D.I., Svahn, C.M., Jaye, M., Schlessinger, J. and Hendrickson, W.A. (1998) Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature*, **393**, 812-817.
- Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1990) Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *Embo J*, **9**, 2685-2692.
- Downward, J. (1997) Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol*, **7**, R258-260.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21**, 10-14.
- Ederly, P., Eng, C., Munnich, A. and Lyonnet, S. (1997) RET in human development and oncogenesis. *Bioessays*, **19**, 389-395.

- Evans, W.E. and Relling, M.V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, **286**, 487-491.
- Fang, K.S., Barker, K., Sudol, M. and Hanafusa, H. (1994) A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J Biol Chem*, **269**, 14056-14063.
- Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L.Z., Stokoe, D., Erickson, J.R., Bast, R.C., Jr. and Mills, G.B. (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, **352 Pt 1**, 135-143.
- Fernig, D.G. and Gallagher, J.T. (1994) Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res*, **5**, 353-377.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S.A. (1989) Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, **245**, 752-755.
- Fishman, D.A., Liu, Y., Ellerbroek, S.M. and Stack, M.S. (2001) Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 3194-3199.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987) Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*, **329**, 671-672.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003a) Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp*, 277-285.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003b) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, **3**, 362-374.
- Fukunaga, K., Noguchi, T., Takeda, H., Matozaki, T., Hayashi, Y., Itoh, H. and Kasuga, M. (2000) Requirement for protein-tyrosine phosphatase SHP-2 in insulin-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Biol Chem*, **275**, 5208-5213.
- Gao, G. and Goldfarb, M. (1995) Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. *Embo J*, **14**, 2183-2190.
- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1-15.
- Givol, D. and Yayon, A. (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *Faseb J*, **6**, 3362-3369.

- Gohla, A., Harhammer, R. and Schultz, G. (1998) The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem*, **273**, 4653-4659.
- Goldfarb, M., Deed, R., MacAllan, D., Walther, W., Dickson, C. and Peters, G. (1991) Cell transformation by Int-2--a member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene*, **6**, 65-71.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
- Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G., Hedman, H., Wides, R. and Yarden, Y. (2004) LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *Embo J*, **23**, 3270-3281.
- Hackel, P.O., Gishizky, M. and Ullrich, A. (2001) Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem*, **382**, 1649-1662.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*, **5**, 461-466.
- Halushka, M.K., Fan, J.B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R. and Chakravarti, A. (1999) Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet*, **22**, 239-247.
- Harmer, N.J., Pellegrini, L., Chirgadze, D., Fernandez-Recio, J. and Blundell, T.L. (2004) The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry*, **43**, 629-640.
- Hart, K.C., Robertson, S.C., Kanemitsu, M.Y., Meyer, A.N., Tynan, J.A. and Donoghue, D.J. (2000) Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene*, **19**, 3309-3320.
- Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E.J. (1980) Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Methods*, **37**, 39-45.
- Heath, C. and Cross, N.C. (2004) Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem*, **279**, 6666-6673.
- Heldin, C.H., Ertlund, A., Rorsman, C. and Ronnstrand, L. (1989) Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem*, **264**, 8905-8912.
- Holgado-Madruga, M., Emler, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K. and Wong, A.J. (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*, **379**, 560-564.

- Hou, J.Z., Kan, M.K., McKeehan, K., McBride, G., Adams, P. and McKeehan, W.L. (1991) Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. *Science*, **251**, 665-668.
- Hughes, S.E. (1996) Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res*, **32**, 557-569.
- Hughes, S.E. (1997) Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem*, **45**, 1005-1019.
- Hunter, T. (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, **64**, 249-270.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hunter, T. and Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1311-1315.
- Imamura, F., Horai, T., Mukai, M., Shinkai, K., Sawada, M. and Akedo, H. (1993) Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun*, **193**, 497-503.
- Imamura, T., Engleka, K., Zhan, X., Tokita, Y., Forough, R., Roeder, D., Jackson, A., Maier, J.A., Hla, T. and Maciag, T. (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, **249**, 1567-1570.
- Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P. and Nevanlinna, H. (1993) Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer*, **54**, 378-382.
- Jallal, B., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992) Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu-overexpressing human tumor cells. *J Biol Chem*, **267**, 4357-4363.
- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. and Drohan, W.N. (1986) Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science*, **233**, 541-545.
- Johnston, C.L., Cox, H.C., Gomm, J.J. and Coombes, R.C. (1995) bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. *Biochem J*, **306 (Pt 2)**, 609-616.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S. and Amano, M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **68**, 459-486.

- Kanakaraj, P., Raj, S., Khan, S.A. and Bishayee, S. (1991) Ligand-induced interaction between alpha- and beta-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation. *Biochemistry*, **30**, 1761-1767.
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K. and Fujiwara, K. (2001) Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*, **153**, 569-584.
- Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. and Williams, L.T. (1995) PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science*, **268**, 1177-1179.
- Keegan, K., Johnson, D.E., Williams, L.T. and Hayman, M.J. (1991) Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1095-1099.
- Keyse, S.M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 143-152.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. and Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.
- Kong, M., Mounier, C., Dumas, V. and Posner, B.I. (2003) Epidermal growth factor-induced DNA synthesis. Key role for Src phosphorylation of the docking protein Gab2. *J Biol Chem*, **278**, 5837-5844.
- Kostrzewa, M. and Muller, U. (1998) Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome*, **9**, 131-135.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. and Schlessinger, J. (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, **89**, 693-702.
- Kozma, S.C., Bogaard, M.E., Buser, K., Saurer, S.M., Bos, J.L., Groner, B. and Hynes, N.E. (1987) The human c-Kirsten ras gene is activated by a novel mutation in codon 13 in the breast carcinoma cell line MDA-MB231. *Nucleic Acids Res*, **15**, 5963-5971.
- Kranenburg, O. and Moolenaar, W.H. (2001) Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, **20**, 1540-1546.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laird, A.D. and Shalloway, D. (1997) Oncoprotein signalling and mitosis. *Cell Signal*, **9**, 249-255.
- Lee, H., Goetzl, E.J. and An, S. (2000) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C612-618.

- Lemmon, M.A. and Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **19**, 459-463.
- Leung, H.Y., Gullick, W.J. and Lemoine, N.R. (1994) Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **59**, 667-675.
- Li, Y., Basilico, C. and Mansukhani, A. (1994) Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors. *Mol Cell Biol*, **14**, 7660-7669.
- Linder, M.W., Prough, R.A. and Valdes, R., Jr. (1997) Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*, **43**, 254-266.
- Linseman, D.A., Benjamin, C.W. and Jones, D.A. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **270**, 12563-12568.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431-442.
- MacArthur, C.A., Lawshe, A., Shankar, D.B., Heikinheimo, M. and Shackelford, G.M. (1995a) FGF-8 isoforms differ in NIH3T3 cell transforming potential. *Cell Growth Differ*, **6**, 817-825.
- MacArthur, C.A., Lawshe, A., Xu, J., Santos-Ocampo, S., Heikinheimo, M., Chellaiah, A.T. and Ornitz, D.M. (1995b) FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development*, **121**, 3603-3613.
- Malarkey, K., Belham, C.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H. and Plevin, R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, **309 (Pt 2)**, 361-375.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, **268**, 1336-1338.
- Marsh, S.K., Bansal, G.S., Zammit, C., Barnard, R., Coope, R., Roberts-Clarke, D., Gomm, J.J., Coombes, R.C. and Johnston, C.L. (1999) Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer. *Oncogene*, **18**, 1053-1060.
- Marte, B.M. and Downward, J. (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*, **22**, 355-358.
- Mayer, B.J. and Baltimore, D. (1993) Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol*, **3**, 8-13.

- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M. and Aaronson, S.A. (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 246-250.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*, **131**, 791-805.
- Mohammadi, M., Honegger, A.M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C.A., Jaye, M., Rubinstein, M. and Schlessinger, J. (1991) A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol*, **11**, 5068-5078.
- Moolenaar, W.H. (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*, **253**, 230-238.
- Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R. and Zondag, G.C. (1997) Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 168-173.
- Moor, N., Linshiz, G. and Safro, M. (2002) Cloning and expression of human phenylalanyl-tRNA synthetase in Escherichia coli: comparative study of purified recombinant enzymes. *Protein Expr Purif*, **24**, 260-267.
- Morimoto, Y., Ozaki, T., Ouchida, M., Umehara, N., Ohata, N., Yoshida, A., Shimizu, K. and Inoue, H. (2003) Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer*, **98**, 2245-2250.
- Morrison, D.K. and Cutler, R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 174-179.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y. and Kasuga, M. (1994) Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol*, **14**, 6674-6682.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. and Okada, Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, **272**, 2446-2451.
- Olson, D.C., Deng, C. and Hanahan, D. (1998) Fibroblast growth factor receptor 4, implicated in progression of islet cell carcinogenesis by its expression profile, does not contribute functionally. *Cell Growth Differ*, **9**, 557-564.
- Ong, S.H., Guy, G.R., Hadari, Y.R., Laks, S., Gotoh, N., Schlessinger, J. and Lax, I. (2000) FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol*, **20**, 979-989.

- Ornitz, D.M. and Leder, P. (1992) Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem*, **267**, 16305-16311.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, **271**, 15292-15297.
- Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. and Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *Embo J*, **10**, 1347-1354.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.
- Peles, E., Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D. and Yarden, Y. (1993) Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hereregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *Embo J*, **12**, 961-971.
- Pellegrini, L. 2001. Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 629-34.
- Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adelaide, J., Parc, P., Coulier, F., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and deLapeyriere, O. (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer*, **61**, 170-176.
- Peters, G., Lee, A.E. and Dickson, C. (1986) Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature*, **320**, 628-631.
- Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J. and Mohammadi, M. (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, **101**, 413-424.
- Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M. and Buckley, S. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, **366**, 473-475.
- Pyne, S. and Pyne, N.J. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, **349**, 385-402.
- Raffioni, S., Thomas, D., Foehr, E.D., Thompson, L.M. and Bradshaw, R.A. (1999) Comparison of the intracellular signaling responses by three chimeric fibroblast growth factor receptors in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7178-7183.
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 180-186.

- Rodova, M., Ankilova, V. and Safro, M.G. (1999) Human phenylalanyl-tRNA synthetase: cloning, characterization of the deduced amino acid sequences in terms of the structural domains and coordinately regulated expression of the alpha and beta subunits in chronic myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**, 765-773.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**, 221-231.
- Rupp, E., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C.H. (1994) A unique autophosphorylation site in the platelet-derived growth factor alpha receptor from a heterodimeric receptor complex. *Eur J Biochem*, **225**, 29-41.
- Ruschel, A. and Ullrich, A. (2004) Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells. *Cell Signal*, **16**, 1249-1261.
- Sameni, M., Moin, K. and Sloane, B.F. (2000) Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia*, **2**, 496-504.
- Scangos, G. and Ruddle, F.H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene*, **14**, 1-10.
- Scheid, M.P. and Woodgett, J.R. (2001) PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 760-768.
- Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360.
- Seifert, R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J. and Bowen-Pope, D.F. (1989) Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem*, **264**, 8771-8778.
- Shaoul, E., Reich-Slotky, R., Berman, B. and Ron, D. (1995) Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways. *Oncogene*, **10**, 1553-1561.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Sliwkowski, M.X., Schaefer, G., Akita, R.W., Lofgren, J.A., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerione, R.A., Vandlen, R.L. and Carraway, K.L., 3rd. (1994) Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*, **269**, 14661-14665.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. and et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, **72**, 767-778.

- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. and Lax, I. (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*, **79**, 1015-1024.
- Stamp, G., Fantl, V., Poulson, R., Jamieson, S., Smith, R., Peters, G. and Dickson, C. (1992) Nonuniform expression of a mouse mammary tumor virus-driven int-2/Fgf-3 transgene in pregnancy-responsive breast tumors. *Cell Growth Differ*, **3**, 929-938.
- Stark, K.L., McMahon, J.A. and McMahon, A.P. (1991) FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development*, **113**, 641-651.
- Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W. and Ullrich, A. (2004) Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, **111**, 213-217.
- Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 182-188.
- Sun, H. and Tonks, N.K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, **19**, 480-485.
- Swanson, J.A. and McNeil, P.L. (1987) Nuclear reassembly excludes large macromolecules. *Science*, **238**, 548-550.
- Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M. and Sugimura, T. (1987) cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2980-2984.
- Takada, T., Matozaki, T., Takeda, H., Fukunaga, K., Noguchi, T., Fujioka, Y., Okazaki, I., Tsuda, M., Yamao, T., Ochi, F. and Kasuga, M. (1998) Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **273**, 9234-9242.
- Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Kakizoe, T., Miyao, N., Sugimura, T., Terada, M. and Tsukamoto, T. (1999) Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization technique. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 855-859.
- Takeda, H., Matozaki, T., Fujioka, Y., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Narumiya, S., Yamamoto, T. and Kasuga, M. (1998) Lysophosphatidic acid-induced association of SHP-2 with SHPS-1: roles of RHO, FAK, and a SRC family kinase. *Oncogene*, **16**, 3019-3027.
- Thompson, E.W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M.E. and et al. (1992) Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*, **150**, 534-544.

- Tolias, K.F., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem*, **270**, 17656-17659.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988a) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, **263**, 6731-6737.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988b) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, **263**, 6722-6730.
- Tsuda, M., Matozaki, T., Fukunaga, K., Fujioka, Y., Imamoto, A., Noguchi, T., Takada, T., Yamao, T., Takeda, H., Ochi, F., Yamamoto, T. and Kasuga, M. (1998) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases. *J Biol Chem*, **273**, 13223-13229.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Vainikka, S., Joukov, V., Wennstrom, S., Bergman, M., Pelicci, P.G. and Alitalo, K. (1994) Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR-1. *J Biol Chem*, **269**, 18320-18326.
- van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W.H. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, **59**, 45-54.
- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- van der Geer, P. and Pawson, T. (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci*, **20**, 277-280.
- Verkhovsky, A.B., Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1995) Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol*, **131**, 989-1002.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, **9**, 138-141.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., 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**, 4267-4275.
- Wang, J., Stockton, D.W. and Ittmann, M. (2004) The fibroblast growth factor receptor-4 arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res*, **10**, 6169-6178.

- Wang, J.K., Gao, G. and Goldfarb, M. (1994) Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials. *Mol Cell Biol*, **14**, 181-188.
- Wang, J.K., Xu, H., Li, H.C. and Goldfarb, M. (1996) Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. *Oncogene*, **13**, 721-729.
- Webster, M.K. and Donoghue, D.J. (1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J*, **15**, 520-527.
- Webster, M.K. and Donoghue, D.J. (1997) FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet*, **13**, 178-182.
- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K. and Deng, C.X. (1998) FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*, **125**, 3615-3623.
- Wilkie, A.O., Morriss-Kay, G.M., Jones, E.Y. and Heath, J.K. (1995) Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol*, **5**, 500-507.
- Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J. and Fletcher, J.A. (1998) FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet*, **18**, 84-87.
- Xie, M.H., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillan, K., Goddard, A. and Gurney, A.L. (1999) FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine*, **11**, 729-735.
- Yamaguchi, T.P., Harpal, K., Henkemeyer, M. and Rossant, J. (1994) fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*, **8**, 3032-3044.
- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X. and McKeehan, W.L. (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem*, **275**, 15482-15489.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. and Schreiber, S.L. (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, **76**, 933-945.
- Zajchowski, D.A., Bartholdi, M.F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H.L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S.P. and Johnson, P.H. (2001) Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 5168-5178.
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, **114**, 3583-3590.
- Zhan, X., Bates, B., Hu, X.G. and Goldfarb, M. (1988) The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol*, **8**, 3487-3495.

Zhang, Z.Y. and Dixon, J.E. (1994) Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **68**, 1-36.

7 Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
"	Sekunde
α	anti
A	Ampère
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	<i>concentration</i> (Konzentration)
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cds	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton (relative Molmasse)
DAB	Diaminobenzidin
d. AG	diese Arbeitsgruppe
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds DNA	<i>double-stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemical Luminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
Edg	<i>endothelium differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorben Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FBS	<i>foetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>

FRS2	FGF Rezeptor Substrat 2
g	Gramm
Gab1	<i>Grb2-associated binder-1</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>
Grb7	<i>Growth factor receptor binding protein 7</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
intFGFR4	intrazelluläre Domäne des FGFR4
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
k	kilo~
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kl.	Klon
l	Liter
LB (-Medium)	„Luria Bertani“ (Medium)
LPA	<i>lysophosphatidyl acid</i> (Lysophosphatidylsäure)
Lsg.	Lösung
m	milli~
M	molar (Mol pro Liter)
<i>m</i>	<i>mouse~</i> (Maus~)
μ	micro~
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MAP-Kinase	von Mitogenen aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPW	Millipore-Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n	nano~
OD	optische Dichte
p	pico~
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salz (-Lösung))

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C-γ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTB	<i>phosphotyrosine binding</i> (Phosphotyrosin-bindend)
PTP(n)	Proteintyrosinphosphatase(n)
PY	Phosphotyrosin
PV	Pervanadat
<i>r</i>	<i>rabbit</i> ~ (Kaninchen~)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK(n)	Rezeptortyrosinkinase(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
S.C.	Santa Cruz
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	<i>second</i> (Sekunde)
s.	siehe
SH2, 3-Domäne	Src Homologie 2, 3 Domäne
SHC	<i>SH2-domain containing</i>
SHP-2	SH2-Domäne tragende Phosphatase 2
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SNT-1	<i>sncl-associated neurotrophic factor target 1</i>
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
T _A	<i>annealing temperature</i> (Hybridisierungstemperatur)
T _M	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Thrombin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	4-(2', 2', 4', 4'-Tetramethylbutyl)- phenyldecaethylenglycoether
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u.	und
U	Enzymaktivitätseinheit (Unit)
u.a.	unter anderem

ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu (Gesamt-)Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	Verhältnis Masse (<i>weight</i>) zu (Gesamt-)Volumen
w/w	Verhältnis Masse (<i>weight</i>) zu (Gesamt-)Masse
z.B.	zum Beispiel

Englische Bezeichnungen und Ausdrücke, die aus dem Englischen ins Deutsche übernommen sind, wurden *kursiv* gedruckt.

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Aspartat	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutamat	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Christiane Regina Stadler
Geburtsdatum: 26. April 1976
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Engadiner Str. 30
D-81475 München

Ausbildung

09/2001-05/2005 **Doktorarbeit**

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung Molekularbiologie
Labor Prof. Dr. A. Ullrich
Titel: „*Charakterisierung der Signaltransduktion und Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der Krebsprogression*“

11/2000-7/2001 **Diplomarbeit**

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung Molekularbiologie
Labor Prof. Dr. A. Ullrich
Titel: „*Untersuchungen zur Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4*“

11/1996-09/2000 **Technische Universität München**
Diplomstudiengang Biologie
Abschluss: Diplom-Biologin (Univ.)

01/1996-09/1996 **USA-Aufenthalt**
EF Internationale Sprachschulen in Northridge, Los Angeles/
Californien

09/1982-07/1995 **Schulbildung**
09/1982-07/1986 Canisius Grundschule, München
09/1986-07/1995 Gymnasium Fürstenried-West, München
Allgemeine Hochschulreife 1995

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Axel Ullrich für sein großes Interesse, seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die außergewöhnlichen Freiräume, die zu einem hervorragenden Arbeitsklima in der Abteilung geführt haben.

Sehr herzlich möchte ich auch Prof. Dr. Alfons Gierl für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu betreuen.

Anke, Beatrix und Beatrice danke ich herzlich für ihr immer offenes Ohr für fachliche wie persönliche Angelegenheiten und die gute Freundschaft, die aus der Zusammenarbeit entstanden ist. Anke gebührt zudem besonderer Dank für das kritische Lesen der Arbeit.

Unserer „Freitags-Seminarrunde“ mit Sepp, Ha-Jü, Indie, Markus, Nesy, Oliver, Sushil und Yixiang gebührt grosser Dank für die offenen Diskussionen, guten Vor- und Ratschläge und hemmungslose, aber fruchtbare Kritik.

Meiner Laborrunde Bea, Sebastian und „Horsti“ (Christian) danke ich für das gute Teamwork.

Marcus "Buschi" Buschbeck danke ich für die vielen gemeinsamen Erlebnisse im Labor wie in den Bergen und die wissenschaftliche Unterstützung von Barcelona bis München.

Auch allen anderen Mitgliedern der Abteilung insbesondere Pjotr Knyazev danke ich vielmals für jegliche Hilfestellung, die interessanten Diskussionen, die gute Stimmung und die ausgelassenen, unvergesslichen Feste.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Markus, der immer für mich da war, mich motiviert und unterstützt hat.

Ganz herzlich danke ich natürlich meinen Eltern, die mich all die Jahre in jedem Bereich unterstützt haben und mir viel Arbeit im alltäglichen Leben abgenommen haben.