

Institut für Genetik der Technischen Universität München

Untersuchungen zur Apoptoseresistenz in Krebszellen

Reimar Abraham

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. E. Grill

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Hon.-Prof. Dr. A. Ullrich, Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

Die Dissertation wurde am 15.11.2001 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.01.2002
angenommen

Abkürzungen

| | |
|------------------|---------------------------------|
| α | anti- |
| Abb. | Abbildung |
| Amp ^r | Ampicillinresistenz |
| cDNA | DNA-Kopie der RNA |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FCS | fötale Kälberserum |
| h | Stunden |
| kD | Kilodalton |
| M | Molar |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MW | Molekulargewicht |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphatgepufferte Saline |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SCF | Stem cell factor |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Vol | Volumen |

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 4 |
| 1.1. APOPTOSE | 4 |
| 1.2. DER APOPTOSE-MECHANISMUS..... | 5 |
| 1.2.1. CASPASEN | 7 |
| 1.2.2. BCL-2 HOMOLOGE | 8 |
| 1.2.3. WEITERE REGULATIONSMECHANISMEN | 10 |
| 1.2.4. CASPASE-UNABHÄNGIGE APOPTOSE | 11 |
| 1.3. REGULATION VON APOPTOSE | 12 |
| 1.3.1. APOPTOSEAUSLÖSER..... | 12 |
| 1.3.2. PRO-UND ANTIAPOPTOTISCHE SIGNALWEGE | 14 |
| 1.3.2.1. Antiapoptotische Signale..... | 14 |
| 1.3.2.2. Proapoptotische Signale | 17 |
| 1.4. DEREGLATION VON APOPTOSE IN KRANKHEITEN | 19 |
| 1.4.1. VERMEHRTE APOPTOSE..... | 19 |
| 1.4.1.1. Neurodegenerative Erkrankungen..... | 19 |
| 1.4.1.2. AIDS..... | 19 |
| 1.4.2. VERMINDERTE APOPTOSE | 20 |
| 1.4.2.1. Krebs | 20 |
| 1.4.2.2. Virale Infektionen | 25 |
| 1.5. ZIELSTELLUNG..... | 27 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| | |
| 2.1. BEZUGSQUELENNACHWEIS..... | 29 |
| 2.1.1. CHEMIKALIEN | 29 |
| 2.1.2. RADIOCHEMIKALIEN | 30 |
| 2.1.3. „KITS“ UND SONSTIGES..... | 30 |
| 2.1.4. WACHSTUMSFAKTOREN UND LIGANDEN..... | 31 |
| 2.1.5. MEDIEN UND PUFFER | 31 |
| 2.1.5.1. Medium für <i>E.coli</i> Bakterien..... | 31 |
| 2.1.5.2. Zellkulturmedien | 31 |
| 2.1.5.3. Stammlösungen und häufig verwendete Puffer | 32 |
| 2.1.6. BAKTERIENSTÄMME, ZELLINIEN UND ANTIKÖRPER..... | 33 |
| 2.1.6.1. Bakterienstämme..... | 33 |
| 2.1.6.2. Zelllinien | 34 |
| 2.1.6.3. Antikörper | 35 |
| 2.1.7. PLASMIDE..... | 36 |
| 2.1.8. cDNA's | 37 |
| 2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN..... | 38 |
| 2.2.1. PLASMIDPRÄPARATION FÜR ANALYTISCHE ZWECKE | 38 |
| 2.2.2. PLASMIDPRÄPARATION FÜR PRÄPARATIVE ZWECKE | 38 |
| 2.2.3. GELELEKTROPHORESE VON DNA..... | 38 |
| 2.2.4. ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN | 38 |
| 2.2.5. DNA-TRANSFER IN <i>E.COLI</i> BAKTERIEN | 38 |
| 2.2.5.1. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien | 38 |
| 2.2.5.2. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien | 38 |
| 2.2.5.3. Dauerkulturen von <i>E.coli</i> Bakterien..... | 39 |

| | |
|--|------------------|
| 2.2.6. ARBEITEN MIT RNA | 39 |
| 2.2.6.1. Präparation von Gesamt-RNA | 39 |
| 2.2.6.2. Präparation von poly-A ⁺ RNA | 40 |
| 2.2.6.3. Elektrophoretische Auftrennung von RNA | 40 |
| 2.2.7. PRÄPARATION VON CDNA | 40 |
| 2.2.8. ARBEITEN MIT CDNA-ARRAYS | 41 |
| 2.2.8.1. Konstruktion der cDNA-Arrays | 41 |
| 2.2.8.2. Prähybridisation der cDNA-Arrays | 41 |
| 2.2.8.3. Radioaktive Markierung der cDNA | 41 |
| 2.2.8.4. Hybridisation | 42 |
| 2.2.8.5. Waschen der cDNA-Arrays | 42 |
| 2.3. AUSWERTUNG DER CDNA-ARRAYS | 43 |
| 2.3.1. ERMITTLUNG DER STÄRKER UND SCHWÄCHER EXPRIMIERTEN GENE | 43 |
| 2.3.2. GRUPPIEREN DER GENE | 43 |
| 2.4. METHODEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYONTISCHEN ZELLEN | 45 |
| 2.4.1. ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN | 45 |
| 2.4.2. MYKOPLASMENTEST | 45 |
| 2.4.3. MTT-ASSAY | 45 |
| 2.4.4. KALZIUMPHOSPHAT-TRANSFEKTION | 46 |
| 2.4.5. BESTIMMUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ | 46 |
| 2.4.6. RETROVIRALER GENTRANSFER IN MELANOMZELLEN | 46 |
| 2.4.7. HERSTELLEN VON WACHSTUMSHEMMEDEM ZELLKULTURÜBERSTAND | 47 |
| 2.5. PROTEINCHEMISCHE METHODEN | 48 |
| 2.5.1. TRITON X100-LYSE VON ZELLEN | 48 |
| 2.5.2. PROTEINBESTIMMUNG | 48 |
| 2.5.3. IMMUNPRÄZIPITATION VON PROTEINEN | 48 |
| 2.5.4. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE | 49 |
| 2.5.5. FÄRBUNG UND FIXIERUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN | 49 |
| 2.5.6. TRANSFER VON PROTEINEN AUF EINE NITROZELLULOSEMEMBRAN | 49 |
| 2.5.7. IMMUNDETEKTION (IMMUNOBLOT-ANALYSE) | 50 |
| 2.5.8. LYOPHILISATION VON ZELLKULTURÜBERSTAND | 50 |
| 2.5.9. GELFILTRATION DES EINGEENGTE ZELLKULTURÜBERSTANDES | 50 |
| 2.5.9.1. Gelfiltration mittels SMART-Anlage | 51 |
| 2.5.9.2. Gelfiltration mittels FPLC-Anlage | 51 |
| 2.5.10. ULTRAFILTRATION DES ZELLKULTURÜBERSTANDES | 51 |
| 2.5.11. „REVERSED PHASE“ CHROMATOGRAPHIE | 52 |
| 2.5.12. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE | 52 |
| 2.6. ZELLBIOCHEMISCHE UND -BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN | 53 |
| 2.6.1. UNTERSUCHUNG DER TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VERSCHIEDENER PROTEINE | 53 |
| 2.6.2. TUNEL-ASSAY | 53 |
| 2.6.3. DNA-FÄRBUNG IN HYPOTONISCHEM PUFFER | 53 |
| <u>3. ERGEBNISSE</u> | <u>55</u> |
| 3.1. DIE ROLLE VON C-KIT IN DER MELANOMENTSTEHUNG | 55 |
| 3.1.1. REEXPRESSION VON C-KIT IN MELANOMZELLINIEN | 56 |
| 3.1.2. EINFLUSS DER C-KIT STIMULATION AUF DAS WACHSTUM DER MELANOMZELLEN | 59 |
| 3.1.3. SCF LÖST IN DEN C-KIT INFIZIERTEN MELANOMZELLEN APOPTOSE AUS | 63 |
| 3.1.4. EIN EXTRAZELLULÄRER FAKTOR VERURSACHT DIE APOPTOSE | 66 |

| | |
|---|----------------|
| 3.1.4.1. Mediumwechsel hemmt den Effekt von SCF | 66 |
| 3.1.4.2. SCF-konditionierter Überstand der Melanomzellen ist wachstumshemmend | 67 |
| 3.1.3. DER ZYTOTOXISCHE FAKTOR IST KEINER DER BEKANNTEN GETESTETEN LIGANDEN | 68 |
| 3.1.4. TEILWEISE REINIGUNG DES ZYTOTOXISCHEN FAKTORS | 71 |
| 3.1.4.1. Gelfiltration des konditionierten Überstandes..... | 71 |
| 3.1.4.2. Die zytotoxische Fraktion wirkt apoptotisch | 75 |
| 3.1.4.3. Die apoptotische Fraktion wirkt kaum bei Melanozyten | 75 |
| 3.1.4.4. Die zytotoxische Fraktion ist gereinigt aktiver als ungereinigt..... | 77 |
| 3.1.4.5. SDS-Polyacrylamidgelanalyse der apoptotischen Fraktion | 78 |
| 3.1.4.6. Weitere Reinigungsschritte | 80 |
| 3.2. IDENTIFIZIERUNG ANTIAPOPTOTISCHER SIGNALWEGE IN KREBSZELLEN DURCH FUNKTIONELLE EXPRESSIONSANALYSE | 83 |
| 3.2.1. APOPTOSEEMPfindlichkeit der Zellen | 85 |
| 3.2.2. VERGLEICH DER EXPRESSIONSPROFILE ALLER ZELLINIEN | 88 |
| 3.2.2.1. Analyse der cDNA-Array Daten | 89 |
| 3.2.2.2. Ergebnisse der cDNA-Array Analyse | 91 |
| 3.2.1. GRUPPIEREN DER GENE..... | 102 |
| 3.2.2. VALIDIERUNG DER ANTIAPOPTOTISCHEN GENE | 108 |
| 3.2.2.1. Verwendung niedermolekularer Inhibitoren | 108 |
| 4. DISKUSSION | 111 |
| 4.1. DER MECHANISMUS DER C-KIT VERMITTELTEN APOPTOSE | 111 |
| 4.2. FUNKTIONELLE EXPRESSIONSANALYSE APOPTOSERESISTENTER ZELLEN | 116 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 139 |
| 6. LITERATUR..... | 143 |

1. Einleitung

1.1. Apoptose

Für multizelluläre Lebewesen ist die Fähigkeit, störende Zellen zu beseitigen, essentiell. Diese Zellen bilden z. B. Strukturen, die während der Embryonalentwicklung überproduziert werden, wie der Müller'sche Kanal, aus dem sich die Gebärmutter in weiblichen Lebewesen entwickelt und der in männlichen Lebewesen entfernt wird. Oder sie sind überschüssige Zellen die entfernt werden müssen, um das Gleichgewicht mit den entstehenden Zellen zu gewährleisten. Außerdem müssen kranke, z.B. Virus-infizierte, oder entartete Zellen vernichtet werden, um den Gesamtorganismus zu schützen.

All diese Zellen werden durch einen spezifischen Mechanismus eliminiert, den jede Zelle in sich trägt und der durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst werden kann. Diesen regulierten Zelltod nennt man Apoptose.

Apoptose besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird von der Zelle ein Apoptose-auslösendes Signal verarbeitet, das im zweiten Schritt zur Einleitung und Ausführung der Apoptose führt. Im dritten Schritt werden die Zellüberreste unschädlich für den Körper durch phagozytotische Zellen aufgenommen.

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose, die diese Form des physiologischen Zelltods von der nicht physiologischen Nekrose unterscheiden, wurden zuerst von Kerr, Wyllie und Currie (Wyllie et al., 1972) beschrieben. Apoptose ist zuerst gekennzeichnet durch Zellverkleinerung, Ausbildung von Zellmembranbläschen und schließlich Abschnürung von so genannten "apoptotic bodies", von Plasmamembran umhüllten Zellteilen. Die Zelle wird abgebaut. Durch die Umhüllung der Zellteile gelangt der potentiell toxische Zellinhalt nicht in den Körper. Anschließend werden die Zellteile durch phagozytotische Zellen aufgenommen. Die Ausführung der Apoptose und die Phagozytose der Zellteile erfolgt sehr schnell (oft in weniger als einer Stunde), so daß selbst bei hoher Apoptoserate im Körper nur wenige apoptotische Zellen detektiert werden können.

Dagegen erfolgt die Nekrose, durch eine nicht mehr tolerierbare Verwundung der Zelle, bei der die Zelle anschwillt und schließlich platzt, was zu einer Überreaktion

des Immunsystems durch Einwanderung von Immunzellen zu der Stelle im Organismus (Inflammation) führen kann (Thompson, 1995).

1.2. Der Apoptose-Mechanismus

Die ersten Beweise für ein evolutionär konserviertes Apoptoseprogramm kamen durch Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Während der Entwicklung des Wurms sterben 131 der 1090 Zellen, so daß der Wurm im erwachsenen Zustand noch aus 959 Zellen besteht. Durch Analyse von Apoptose-defizienten Mutanten des Wurms durch Ellis und Horvitz wurden Gene identifiziert, die für die Initiation und Ausführung der Apoptose und die anschließende Phagozytose verantwortlich sind (Ellis and Horvitz, 1986). Vier der gefundenen Gene sind für den regulierten Zelltod essentiell: *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* wirken proapoptotisch während *ced-9* Apoptose hemmen kann. Das Apoptose-Programm ist hochkonserviert, da Homologe der *C. elegans* Gene unter anderem auch in der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster*, der Maus *Mus Musculus* und im Menschen gefunden wurden. Das unterstreicht die lebenswichtige Bedeutung der Apoptose. Im Vergleich zu *C. elegans* aber ist Mechanismus des programmierten Zelltodes in evolutionär höheren Organismen wesentlich komplizierter und verzweigter aufgebaut (Aravind et al., 2001), die Grundmechanismen scheinen jedoch die gleichen zu sein. Im folgenden werden die Prozesse im humanen Organismus beschrieben, so wie sie bis jetzt verstanden sind. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Grundzüge des Apoptosemechanismus.

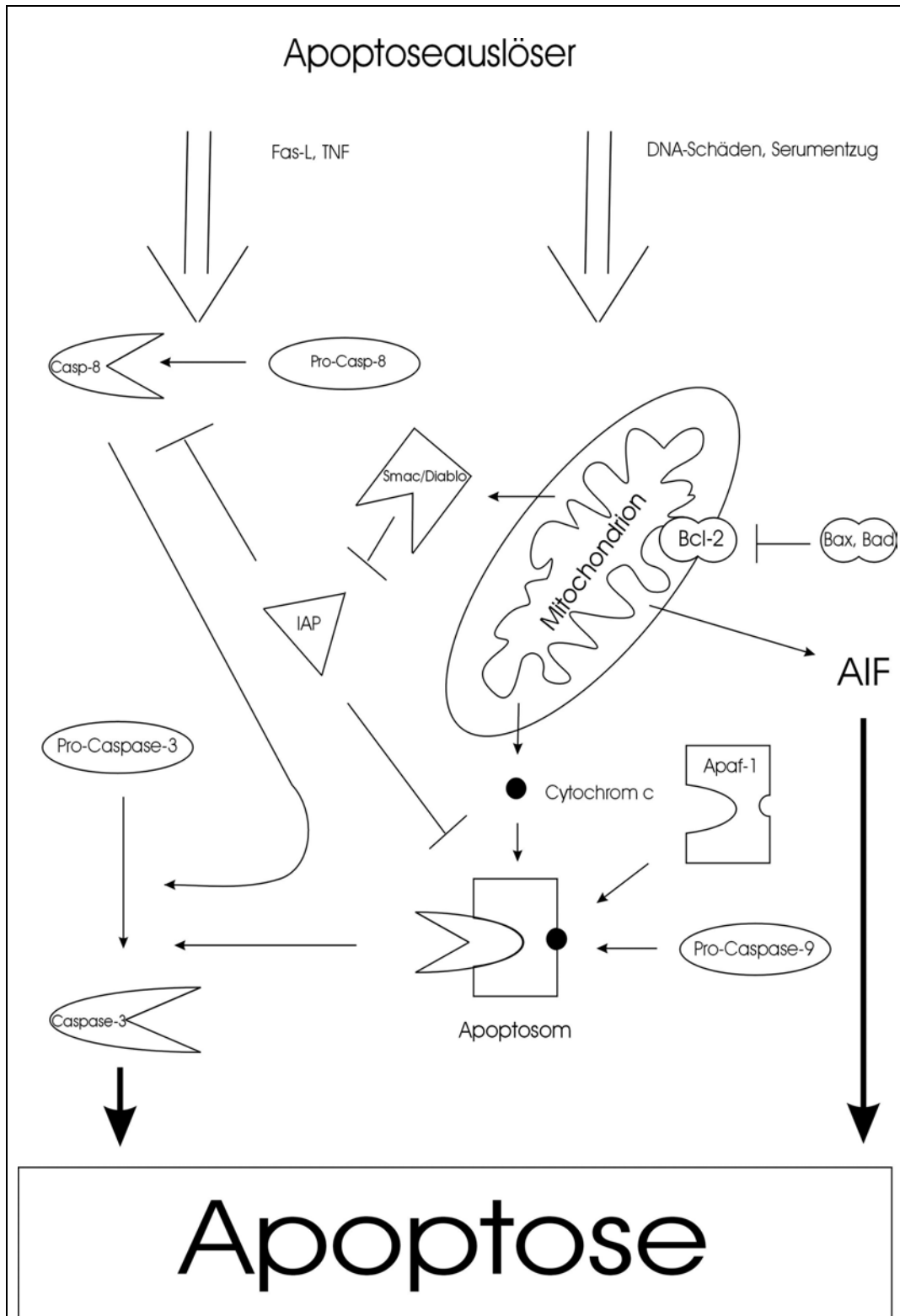


Abb. 1 Der Apoptose-Mechanismus in Säugetierzellen

Pfeile: Aktivierung oder Freisetzung aus Mitochondrien

Linie mit Querbalken: Hemmung

weitere Erklärungen siehe Text

1.2.1. Caspasen

Als zentral in der Ausführung der Apoptose haben sich die Homologe von *ced-3*, die Caspasen, erwiesen, welche die meisten der morphologischen Veränderungen in der Apoptose herbeiführen. Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die ihre Substrate an ein oder wenigen Stellen nach Aspartat-Resten schneiden. Im Menschen gibt es 14 Caspasen. Die meisten von ihnen sind an der Apoptose beteiligt (Aravind et al., 2001).

Zu den Substraten der Caspasen gehören zytoskeletale Proteine wie Fodrin und Gelsolin, deren Verdau wahrscheinlich zum allgemeinen Abbau der Zelle beiträgt und Proteine im Zellkern wie Laminin, dessen Verdau wichtig ist für das Schrumpfen des Zellkerns. So läßt sich auch eines der herausragenden Kennzeichen von Apoptose mit der Aktivierung von Caspasen verbinden, die internukleosomale Spaltung der genomischen DNA. Da die Nukleosomen etwa 200 bp voneinander entfernt sind, führt die Spaltung der DNA zu Fragmenten mit Längen, die jeweils einem Vielfachen der 200 bp entsprechen. In einem Agarose-Gel zur Untersuchung von DNA aus apoptotischen Zellen sieht man deshalb die charakteristische DNA-Leiter. Normalerweise liegt die dafür verantwortliche Nuklease CAD (Caspase Activated DNase) in einem Komplex mit einer inhibitorischen Untereinheit ICAD (Inhibitor of Caspase Activated Nuclease) vor. Spaltung dieser Untereinheit durch Caspase-3 aktiviert CAD. Auch einige Enzyme, die in der Signaltransduktion der Zelle eine Rolle spielen, werden von Caspasen gespalten. Diese Spaltung kann sowohl eine Deaktivierung (Song et al., 1996; Wen et al., 1997) als auch eine Aktivierung (Deak et al., 1998a; Denning et al., 1998) der betreffenden Enzyme zur Folge haben. Fast 100 Substrate von Caspasen wurden bisher gefunden, was die Komplexität des Apoptose-Programms verdeutlicht. Bisher konnte allerdings nur von einigen wenigen dieser Substrate ein Einfluß auf den Verlauf der Apoptose nachgewiesen werden. Möglicherweise werden neben Apoptose-relevanten auch Proteine verdaut, deren Spaltung keinen Einfluß auf Apoptose hat, die aber auch nicht mehr benötigt werden, da die Zelle stirbt.

Die meisten Caspasen werden wie viele Proteasen durch Spaltung ihrer inaktiven Vorläufer, der Zymogene, aktiviert. Die Spaltung erfolgt in der Regel durch andere Caspasen, so daß eine Caspase-Kaskade entsteht, die zur Amplifikation des Signals

führt. Caspasen, die die Kaskade starten, werden Initiator-Caspasen und ihre Substrate Effektor-Caspasen genannt. Die Effektor-Caspasen spalten anschließend die oben erwähnten zellulären Substrate und führen so die Apoptose aus. Als Startpunkt der Kaskade können Initiator-Caspasen nicht durch andere Caspasen aktiviert werden. Es muß daher andere Mechanismen zur Aktivierung geben. Eine Möglichkeit ist der Aktivierungsmechanismus von Caspase-8. Durch Bindung ihrer Liganden aggregieren Rezeptoren der TNF (Tumor Necrosis Factor)-Familie wie z. Bsp. der Fas-Rezeptor und bilden einen Membran-gebundenen Signalkomplex. Diese Komplexe binden dann über Adapterproteine weitere Moleküle zur Signalweiterleitung, unter anderem Caspase-8. Die hohe lokale Konzentration an Caspase-8 würde es erlauben, daß die sehr schwach aktiven Zymogen-Moleküle einander spalten und aktivieren. Eine ähnliche Aktivierung wurde für Caspase-2 und die *C. elegans*-Caspase ced-3 vorgeschlagen. Ein weiterer Mechanismus wurde für Caspase-9 untersucht. Im Gegensatz zu anderen bekannten Caspasen bewirkt die Spaltung von Caspase-9 nur eine sehr geringe Aktivitätssteigerung. Vielmehr ist zur vollen Aktivierung die Bindung an Apaf-1 (Apoptosis associated factor-1), ein ced-4 Homolog, notwendig. Zusammen mit Cytochrom-c, das aus den Mitochondrien freigesetzt wird, bilden die drei Moleküle ein Holoenzym. Dieses so genannte Apoptosom ist ein sehr großer Komplex, der wahrscheinlich noch andere Proteine enthält. (Hengartner, 2000)

1.2.2. Bcl-2 Homologe

Eine weitere humane Genfamilie, die Apoptose beeinflußt, wurde durch Suche nach Homologen von *ced-9* gefunden. Das menschliche Homolog ist *bcl-2* (B-cell lymphoma-2), ein Gen, das in B-Zell-Lymphomen verstärkt exprimiert wird (Tsujimoto et al., 1985a; Tsujimoto et al., 1984; Tsujimoto et al., 1985b; Tsujimoto et al., 1985c). Die Bcl-2 Familie kann in drei Gruppen unterteilt werden. Die Mitglieder von Gruppe I inhibieren Apoptose während Mitglieder von Gruppe II und III Apoptose auslösen können. Die meisten Bcl-2 Homologe besitzen einen hydrophoben Bereich, mit dem sie in intrazellulären Membranen, vorzugsweise in Mitochondrienmembranen verankert sind. Die Homologe können sowohl homo-als auch heterodimerisieren. Heterodimerisierung von pro-und antiapoptotischen Bcl-2 Homologen führt zu einer Hemmung der Funktion der antiapoptotischen Homologe.

Daher kann die Sensitivität einer Zelle gegenüber Apoptose durch den relativen Gehalt von pro-und antiapoptotischen Bcl-2 Homologen bestimmt werden. Bei Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 Homologen wird die Zelle resistenter gegen Apoptose und Überexpression von proapoptotischen Homologen kann Apoptose induzieren. Außer über das Mengenverhältnis in der Zelle wird die Dimerisierung der Bcl-2 Homologe auch durch Phosphorylierung gesteuert (Hengartner, 2000).

Die Hauptfunktion der Bcl-2 Familie scheint die Regulation der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, besonders von Cytochrom c, aus den Mitochondrien zu sein. Wie genau Cytochrom c die Mitochondrien-Membran durchquert, ist unbekannt, doch Bcl-2 Homologe spielen dabei eine Rolle. Zugabe von proapoptotischen Bcl-2 Homologen zu isolierten Mitochondrien bewirkt die Freisetzung von Cytochrom c, die bei Anwesenheit von antiapoptotischen Bcl-Homologen gehemmt wird. Darüberhinaus gibt es noch zahlreiche andere Proteine, die durch Mitochondrien bei Apoptose freigesetzt werden. Beispiele dafür sind AIF (Apoptosis Initiating Factor, ein Flavoprotein), Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pH - siehe unten) und verschiedene Pro-Caspasen wie Pro-Caspase-2,-3 und -9. Über den Mechanismus der Freisetzung von mitochondrialen Proteinen durch Bcl-2 Proteine gibt es zur Zeit drei verschiedene Theorien.

1.)

Die erste Theorie gründet sich auf die strukturelle Ähnlichkeit von Bcl-2 Homologen der Untereinheit von Diphtherie-Toxin, die Membranporen bildet. Wie das bakterielle Toxin können auch Bcl-2-Familienmitglieder Kanäle in künstlichen Lipidmembranen mit spezifischen Leiteigenschaften formen (Minn et al., 1997). Es ist aber unklar, ob die Kanäle groß genug sind, um Proteine durchzulassen.

2.)

Nach der zweiten Theorie binden Bcl-2 Homologe andere integrale Proteine der äußeren Mitochondrienmembran und bilden mit ihnen einen großen Kanal, den auch Proteine passieren könnten. Beispielsweise binden verschiedene Bcl-2 Homologe an VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) und regulieren seine Aktivität (Shimizu et al., 1999). Da auch der VDAC-Kanal zu klein ist für Proteine, müßte er nach Bindung von Bcl-2 Homologen eine bedeutende Konformationsänderung ausführen .

3.)

Eine dritte Möglichkeit ist schließlich, daß Bcl-2 Proteine das elektrochemische Gleichgewicht der Mitochondrien beeinflussen. Demnach könnten Bcl-2 Familienmitglieder alleine (z. Bsp. durch ihre Kanalaktivität) oder im Zusammenspiel mit anderen mitochondrialen Proteinen (z. B. VDAC oder ANT: Adenosine Nucleotide Transporter) die Physiologie der Mitochondrien (Ionenaustausch oder oxidative Phosphorylierung) so beeinflussen, daß die Mitochondrien anschwellen und schließlich platzen. So könnte VDAC als Teil der mitochondrialen PTP (Permeability Transition Pore) zur Öffnung dieses großen unspezifischen Kanals beitragen, was den Verlust des Membranpotentials und Anschwellen des Mitochondriums zur Folge hat. Öffnung der PTP führt schnell zu Cytochrom c Freisetzung und Apoptose (Vander Heiden and Thompson, 1999). Da Cytochrom c auch ohne Verlust des mitochondrialen Membranpotentials freigesetzt wird, kann die PTP nicht der einzige Angriffspunkt der Bcl-2 Homologe zur Cytochrom c Freisetzung sein.

1.2.3. Weitere Regulationsmechanismen

Auch auf der untersten Stufe des Apoptose-Mechanismus kommt es zu weiterer Regulation der Apoptose. So gibt es beim Menschen und anderen Spezies (*Drosophila Melanogaster*, einige Viren) eine Familie von Caspase-Inhibitoren, die IAP's (Inhibitor of Apoptosis) (Birnbaum et al., 1994; Crook et al., 1993; Liston et al., 1996; Rothe et al., 1995; Vucic et al., 1998; Wang et al., 1999). Sie binden und hemmen dadurch die Caspasen und könnten als Puffer wirken, der eine versehentliche Auslösung des Mechanismus verhindert oder ein immer latent vorhandenes Apoptosesignal kontrolliert. Interessanterweise gibt es auch IAP bindende Proteine, die die antiapoptotische Wirkung der IAP's aufheben. Neben den *Drosophila* Proteinen Reaper, Hid und Grim (Goyal et al., 2000; Wang et al., 1999) wurde kürzlich das humane Protein Smac/DIABLO identifiziert, welches selber IAP's bindet und somit verhindert, daß diese Caspasen hemmen. Smac/DIABLO befindet sich in Mitochondrien und wird während der Apoptose freigesetzt (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Durch die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen werden Caspasen demnach sowohl aktiviert (Cytochrom c) als auch ihre Inhibition aufgehoben (Smac/DIABLO).

Ähnlich wie die IAP's können deshalb auch Bcl-2 Homologe als Pufferzone angesehen werden, die die versehentliche Auslösung von Apoptose verhindert, in diesem Fall durch die Kontrolle der mitochondrialen Homöostase.

1.2.4. Caspase-unabhängige Apoptose

Neben dem oben beschriebenen Caspase-abhängigen Apoptosemechanismus scheint es auch noch Caspase-unabhängige Apoptose zu geben. So können pharmakologische Inhibitoren von Caspasen die Zellen nicht immer vor Apoptose schützen. Außerdem zeigen knock-out Mäuse von Caspase-3 und -9 sehr spezifische Defekte in der Apoptose (reduzierte neuronale Apoptose während der Entwicklung und bei bestimmten Apoptoseauslösern) und nicht eine allgemeine Apoptosedefizienz (Kuida et al., 1998; Kuida et al., 1996). D. h. es muß noch Apoptose geben, die unabhängig ist von den zentralen Caspasen-3 und -9. Außerdem wurde gezeigt, daß das mitochondriale Flavoprotein AIF (Apoptosis Inducing Factor) Caspase-unabhängig Apoptose auslöst. Während der Embryonalentwicklung von Mäusen ist AIF beispielsweise essentiell für die ersten Einschnürungen der Embryos, die durch Apoptose an diesen Stellen entstehen. Darüberhinaus sind embryonale Mausfibroblasten ohne AIF resistent gegen Apoptose durch Serumentzug (Joza et al., 2001). Wie genau diese Form der Apoptose funktioniert ist zur Zeit noch vollkommen ungeklärt.

1.3. Regulation von Apoptose

1.3.1. Apoptoseauslöser

Ein Apoptosesignal kann *in vivo* durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. So sterben während der Embryonalentwicklung die Nervenzellen ab, die keine neurotrophen Wachstumsfaktoren mehr erhalten. Das Ausbleiben eines Überlebenssignales kann also zum Zelltod führen und trägt damit z. B. zur Strukturbiologie im Gehirn bei (Raff, 1992). Auch irreparable Schäden in der DNA lösen Apoptose aus. Damit schützt sich der Organismus vor Mutationen, die entartete Zellen hervorbringen könnten. Der Verlust von Zell-Zell wie auch Zell-Extrazelluläre Matrix –Kontakten führt in normalen nicht entarteten Zellen zum Zelltod so daß das Überleben von Zellen, die aus ihrem Zellverband ausbrechen, verhindert wird (Thompson, 1995).

Einige Rezeptoren der Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) Familie membranständiger Rezeptoren können nach Stimulation durch ihre Liganden Apoptose auslösen. Diese Rezeptoren besitzen keine katalytische Funktion in ihrer zytoplasmatischen Domäne, sondern binden über Adapterproteine an Enzyme, die das Signal weiterleiten. Bei den apoptoseauslösenden Rezeptoren der TNFR-Familie zählt zu diesen Enzymen Caspase-8, die nach Bindung des entsprechenden Liganden an den Rezeptor aktiviert wird und als Initiatorcaspase die Apoptose einleitet. Neben Caspase-8 binden auch Proteinkinasen- und Phosphatasen, die Einfluß auf den Zelltod nehmen können, an die Rezeptoren. Das Auslösen von Apoptose ist jedoch nicht die einzige Funktion der TNFR-Familie. Inflammatorische und sogar proliferative Signale können von allen Mitgliedern dieser Familie übertragen werden. Rezeptoren der TNFR-Familie und ihre Liganden spielen bei der Immunmodulation und Immunantwort eine wichtige Rolle. So werden durch das System Fas (ein Rezeptor) und Fas-Ligand (FasL) die T-Zellen, die bei der Immunantwort stark gewachsen waren, bei der Beendigung der Immunantwort eliminiert. Die T-Zellen beginnen dabei FasL zu exprimieren. Der Ligand bindet an Fas auf anderen oder den gleichen T-Zellen und leitet dadurch die Apoptose ein. Zytotoxische T-Zellen töten Virus befallene und entartete Zellen ebenfalls durch Expression von FasL auf ihrer Zelloberfläche. Die T-Zellen binden durch den FasL, der Fas auf der Oberfläche von

infizierten oder entarteten Zellen erkennt, an diese Zellen und leiten wiederum deren Apoptose ein. (Nagata, 1999).

Ob eine Zelle in Apoptose übergeht, entscheidet sich aus dem Zusammenspiel von apoptotischen und antiapoptotischen Signalen. In den letzten Jahren wurden neben dem Apoptosemechanismus auch die Signale untersucht, die Apoptose beeinflussen.

1.3.2. Pro-und antiapoptotische Signalwege

1.3.2.1. Antiapoptotische Signale

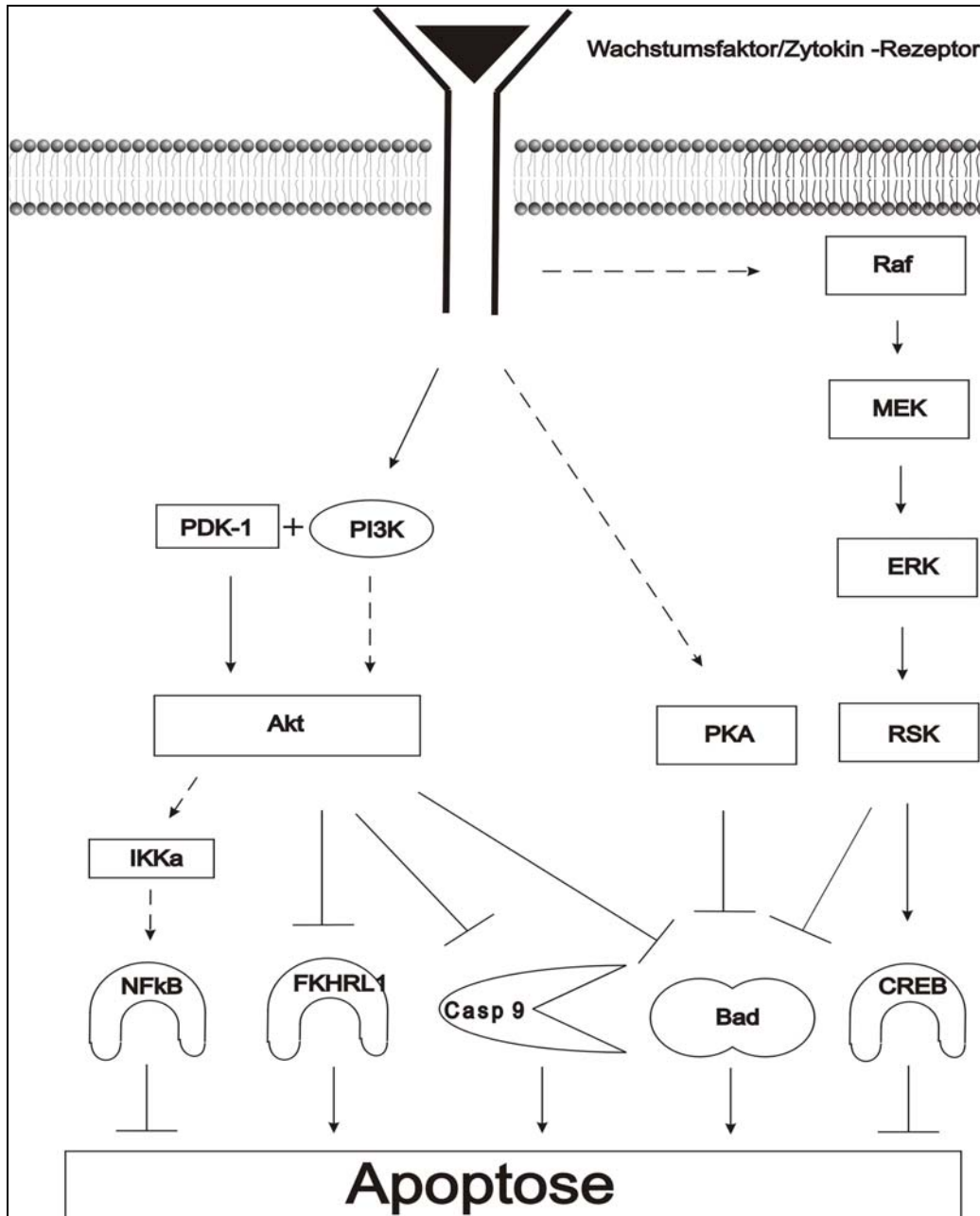


Abb. 2 Antiapoptotische Signale in der Zelle

Pfeil: direkte Aktivierung, gestrichelter Pfeil: indirekte Aktivierung, Linie mit Querbalken: direkte Hemmung; weitere Erklärungen siehe Text

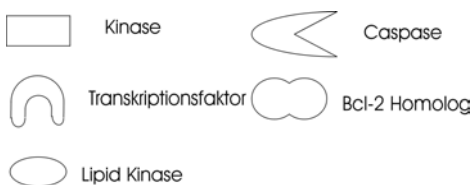


Abb. 2 zeigt die zur Zeit am besten untersuchten antiapoptotischen Signalwege. Wachstumsfaktorezeptoren wie der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) oder Nerve Growth Factor Receptor (NGFR) und Zytokinrezeptoren wie Interleukin-3 Receptor (IL-3R) dimerisieren nach Bindung der entsprechenden Liganden. Im Fall der Wachstumsfaktorrezeptoren führt dies zur Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors. Die aktivierte Tyrosinkinase phosphoryliert anschließend noch andere Tyrosinreste außerhalb der Tyrosinkinasedomäne, die als Bindungsstellen für weitere Moleküle dienen können (Weiss et al., 1997). Da die Zytokinrezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen, wird deren Funktion von zytoplasmatisch assoziierten Tyrosinkinasen, den JAK-kinasen übernommen. An die so entstehenden phosphorylierten Tyrosinreste kann die regulatorische p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit ihren Src-Homology-2 (SH2)-Domänen binden. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung, die die katalytische p110 Untereinheit von PI3K aktiviert. PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-phosphat in der Zellmembran an 3'-Stelle (Schlessinger, 2000). Das so entstehende Phosphatidylinositol-3,4-phosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat wird von der Pleckstrin Homology (PH)-Domäne der Serin/Threonin Kinase Akt/PKB gebunden. Dadurch wandert die Kinase an die Membran, wo sie durch die Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1 (PDK-1), die auf dem gleichen Weg an die Membran gebunden wird, phosphoryliert und teilweise aktiviert. Eine weitere noch unbekannte Kinase phosphoryliert Akt an einem zweiten Serinrest und führt zur vollen Aktivierung von Akt. Aktivierte Akt-Kinase kann eine Reihe von Substraten phosphorylieren und so Apoptose hemmen (Dudek et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt in den unterschiedlichsten zellulären Prozessen eine Rolle. Eine seiner Funktionen ist die antiapoptotische Wirkung durch Transkription von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-X_L und IAP (Barkett and Gilmore, 1999). NF- κ B liegt unstimuliert in einem Komplex mit „Inhibitor of NF- κ B“ (I κ B) vor, welches den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurückhält. Aktivierte Akt kann I κ B-Kinase α (IKK α) phosphorylieren und damit aktivieren. IKK α phosphoryliert wiederum I κ B. Das führt letztendlich zur Degradation von

I κ B. NF κ B wandert in den Zellkern und induziert oben genannte antiapoptotische Gene (Madrid et al., 2000; Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999).

Ein weiteres Substrat von Akt sind so genannte Forkhead Transkriptionsfaktoren wie FKHL1 und AFX. Diese Transkriptionsfaktoren können, wenn aktiviert, Apoptose auslösen, beispielsweise durch Transkription von FasL. Phosphorylierung durch Akt hält diese Proteine im Zytoplasma zurück und hemmt dadurch deren proapoptotische Funktion (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999).

Akt phosphoryliert auch die Initiatorcaspase Caspase-9. Phosphorylierung führt zur Hemmung dieser Protease und damit des Apoptosemechanismus (Cardone et al., 1998).

Zusätzlich kann Akt Bad phosphorylieren, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Akt phosphoryliert Bad an Serin-136, was zur Bindung von 14-3-3 Proteinen führt (Datta et al., 1997; Peso et al., 1997). 14-3-3 Proteine gehören zu einer ubiquitären Proteinfamilie, die Proteine mit phosphorylierten Serinen oder Threoninen binden und als Chaperone wirken. Durch die Bindung der 14-3-3 Proteine wird ein weiterer Serinrest von Bad zugänglich für Phosphorylierung durch die cAMP aktivierte Proteinkinase (PKA). Eine weitere Kinase, die Ribosomale Protein S6 Kinase (RSK), kann BAD ebenfalls phosphorylieren. RSK ist eine MAP-Kinase aktivierte Kinase (MAPKAPK) die von MAP-Kinasen aktiviert wird. Neben BAD phosphoryliert RSK auch den Transkriptionsfaktor cAMP response element binding protein (CREB) und hemmt dadurch Apoptose (Bonni et al., 1999). Die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade führt so zur transkriptionsunabhängigen (BAD) und abhängigen (CREB) Hemmung von Apoptose, einer gut bekannten Funktion von MAP-Kinasen (Chang and Karin, 2001).

Die Aktivierung von PKC nach Stimulation von z. B. Rezeptortyrosinkinasen und G-protein-gekoppelten Rezeptoren durch ihre Liganden kann antiapoptotisch wirken. Es gibt drei verschiedene Klassen von PKC. Die konventionellen PKC's α , β und γ sind Ca^{2+} und Diazylglyzerol abhängig, die neuen PKC's δ , ϵ , η , ϕ und μ sind nur Diazylglyzerol abhängig und die atypischen Isoformen ζ , ι und λ werden weder von Ca^{2+} noch von Diazylglyzerol aktiviert. Isoformen aller Klassen wurden mit antiapoptotischen Signalen (Berra et al., 1997; Diaz-Meco et al., 1996; Murray and Fields, 1997), in einigen Zellen auch mit proapoptotischen Signalen (Fuji et al., 2000) in

Verbindung gebracht. Antiapoptotische Signale können auch hier von PKC ausgehend durch RSK-abhängige Phosphorylierung von BAD vermittelt werden (Bertolotto et al., 2000; Tan et al., 1999).

1.3.2.2. Proapoptotische Signale

Zu den proapoptotischen Signalen zählen die Signale, die von Rezeptoren der TNFR-Familie ausgehen (s. 1.3.2.), die hier aber aus Platzgründen nicht genauer beschrieben werden sollen. Dazu zählen aber auch Signale die durch die c-jun-N-terminale Kinase (JNK) vermittelt werden, die Transkriptionsfaktoren p53 und c-myc sowie das Lipid Ceramid.

JNK wird von einer vergleichbaren Signalkaskade aktiviert wie Erk1/2. Die Auslöser der Aktivierung können Streßsignale wie osmotischer Schock, UV-Licht sowie inflammatorische Zytokine sein. Aktivierung von JNK kann zu Apoptose beitragen. Embryonale Mäusefibroblasten bei denen alle 3 Isoformen von JNK deletiert wurden, zeigen keine UV-induzierte Apoptose und keine Cytochrom c Freisetzung mehr (Tournier et al., 2000). Ein Möglicher Mechanismus könnte die Phosphorylierung und Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl-X_L sein (Kharbanda et al., 2000; Yamamoto et al., 1999).

Der Transkriptionsfaktor p53 ist in mehr als 50% der humanen Krebsarten genetisch verändert. Er dient als Kontrollpunkt, der DNA-Schäden überwacht. Bei Beschädigung der DNA während der normalen Replikation oder durch Mutagene wird entweder der Zellzyklus durch p53 angehalten, so daß die Zelle die entstandenen Schäden reparieren kann, oder bei irreparablen Schäden wird Apoptose eingeleitet (Agarwal et al., 1998). Wahrscheinlich induziert p53 Apoptose durch ein ganzes Netzwerk von Signalen. Zum Einen gehört dazu die verstärkte Expression Apoptose-induzierender Gene wie z. B. die Bcl-2 Homologe Bax, Noxa und PUMA (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Yu et al., 2001) und p53AIP1, ein p53-induziertes mitochondriales Protein, das auf noch nicht ganz geklärte Weise Apoptose auslöst. Zum Anderen kann p53 aber auch transkriptionsunabhängig Apoptose auslösen (Vousden, 2000).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist ein starkes Onkogen. Er kann zusammen mit anderen Onkogenen primäre embryonale Rattenfibroblasten transformieren. Viele chromosomale Veränderungen, die den Locus von c-myc umfassen, sind bekannt, und c-myc wird in Tumoren, deren c-myc Locus unverändert ist, überexprimiert (Steiner et al., 1996). Wird c-myc aber in Zellen unter Serumentzug exprimiert, so werden die Zellen apoptotisch. Serum oder einzelene Wachstumsfaktoren wie Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) oder Platelet Derived Growth Factor (PDGF) verhindern die Apoptose (Evan et al., 1992). Der Mechanismus dieser Apoptoseauslösung ist auch hier ungeklärt. Was man weiß ist, daß funktionelles p53 dafür notwendig ist. Diese Ergebnisse führten zu der Theorie, daß die Transformation einer Zelle durch ein Onkogen ein apoptotischer Stimulus ist, der durch antiapoptotische Signale von Überlebensfaktoren unterdrückt wird (Evan and Littlewood, 1998).

Das Lipid Ceramid ist ein Botenmolekül in der Zelle, dessen Konzentration durch verschiedene Stimuli erhöht wird. So bewirken TNF- α , FasL, ionisierende- und UV-Strahlung die Neusynthese von Ceramid oder die Hydrolyse von Sphingomyelin in Cholinphosphat und Ceramid (Hannun and Luberto, 2000). Ceramid kann Apoptose auslösen, da Zugabe von membranpermeablen Ceramid-Analogen zu bestimmten Zellen, vor allem Krebszellen, Apoptose auslöst (Obeid et al., 1993). Menschliche Zellen, die das Enzym, das Sphingomyelin hydrolysiert, die saure Sphingomyelinase, nicht besitzen, und knock-out Mäuse von saurer Sphingomyelinase zeigen verminderte Apoptose durch ionisierende Strahlung (Santana et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Ceramid kann durch die Aktivierung des JNK-Signalweges apoptotisch wirken (Verheij et al., 1996). Außerdem aktiviert Ceramid bestimmte Phosphatasen wie Protein Phosphatase 2A (PP2A), welche Bcl-2 an Ser-70 dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung dieses Serin-Restes führt zur Inaktivierung des antiapoptotischen Bcl-2 Homologs (Ruvolo et al., 1999).

1.4. Deregulation von Apoptose in Krankheiten

Die Deregulation von Apoptose spielt in vielen pathogenen Prozessen eine Rolle. Vermehrte Apoptose führt zur Zerstörung von Zellen, die lebensnotwendig sind, während eine verminderte Apoptose zur Anhäufung erkrankter oder transformierter Zellen führt.

1.4.1. Vermehrte Apoptose

1.4.1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch ein Absterben von Nervenzellen gekennzeichnet. Auch hier spielt Apoptose eine Rolle. So werden apoptotische neuronale Zellen in ischämischen Gehirnen, bei Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen und Huntington gefunden. Neben den apoptotischen Zellen findet man aber auch nekrotische Zellen. Wegen des chronischen Verlaufs dieser Krankheiten sind zu einem bestimmten Zeitpunkt immer nur wenige Zellen apoptotisch, die auf Grund schneller Phagozytose schwer nachzuweisen sind. Daher ist noch strittig, welche Bedeutung Apoptose im Vergleich zu Nekrose für die Entstehung dieser Krankheiten hat.

Bis auf die Ischämie ist allen oben genannten Erkrankungen die Entstehung von toxischen Proteinaggregaten gemein. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Proteinaggregate ist trotz einiger Hinweise ungeklärt. Wahrscheinlich lösen sie Apoptose durch verschiedene Mechanismen aus (Yuan and Yankner, 2000).

1.4.1.2. AIDS

Das Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) ist gekennzeichnet durch ein apoptotisches Absterben von CD4 positiven T-Helfer-Zellen. Ein kleiner Teil (weniger als 1 in 1000) CD4⁺ Zellen werden vom HI-Virus befallen. Es sterben aber sowohl infizierte CD4⁺ Zellen als auch nicht infizierte. Eine Erklärung für das Absterben auch der nicht infizierten Zellen könnte die Produktion von viralen Genprodukten (z.B. HIV-1 Tat) sein, die auch in nicht befallene CD4⁺ Zellen eindringen und sie empfindlicher gegen Fas-induzierte Apoptose (Krammer, 2000).

1.4.2. Verminderte Apoptose

1.4.2.1. Krebs

In den letzten Jahren sind viele Beweise dafür gefunden worden, daß Apoptoseresistenz eine Eigenschaft ist, die Tumorzellen während des Transformationsprozesses erwerben. Diese Apoptoseresistenz ist für die Krebszellen erforderlich, weil Zellen, die entarten normalerweise apoptotisch werden. Der Zelltod ist hier ein Schutzmechanismus des Organismus. Die Tumorzellen müssen beispielsweise resistent gegen Apoptose werden, die durch Immunzellen und durch das Ablösen von der extrazellulären Matrix während der Metastasierung in ihnen ausgelöst wird. Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um diesen apoptotischen Stimuli zu entgehen (Thompson, 1995). Im Folgenden werden Beispiele beschrieben, in denen ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von antiapoptotischen oder der Inaktivierung von proapoptotischen Signalen in menschlichen Tumoren nachgewiesen werden konnte.

p53 Status

Wenn der Transkriptionsfaktor p53 genetisch verändert und dadurch inaktiviert ist, können die Zellen resistent gegen bestimmte apoptotische Stimuli werden. So sind in einem Mausmodell die Zellen, die ein funktionelles p53 enthalten, sensitiver gegen Apoptose durch Röntgenstrahlung oder das Chemotherapeutikum Adriamycin als in Mäusen ohne funktionelles p53 (Lowe et al., 1994). Spezifische Mutationen in p53 von Brustkrebspatienten konnten außerdem mit einer Resistenz gegen Chemotherapie mit Doxorubicin korreliert werden. Alle so gefundenen Mutationen befanden sich im Zink-bindenden Teil von p53, der für die DNA-Bindung essentiell ist (Aas et al., 1996). Das beweist die physiologische Relevanz inaktivierender p53 Mutationen für eine Apoptoseresistenz auch im Menschen und unterstreicht, warum p53 in so vielen Tumoren inaktiviert ist.

Bax

Die über p53 ausgelöste Apoptose ist abhängig von dem proapoptotischen Bcl-2 Homolog Bax (McCurrach et al., 1997). p53 bindet an den Promoter des Bax-Genes und stimuliert so die Transkription von Bax (Miyashita and Reed, 1995).

Gehirntumore, die ein funktionelles p53 besitzen, wachsen wesentlich besser in Bax-knock-out Mäusen, weil hier die normalerweise auftretende p53 vermittelte Apoptose um über 50% reduziert wird (Yin et al., 1997). Desweiteren hemmt die Inaktivierung des Bax-Gens in primären Mäusefibroblasten die p53 vermittelte Chemotherapie-induzierte Apoptose (McCurrach et al., 1997). Schließlich wurden in humanen Colon Karzinomen Mutationen im Bax-Gen gefunden, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führen (Rampino et al., 1997). Diese Untersuchungen zeigen, daß Bax Krebswachstum durch vermehrte Apoptose in den Tumorzellen hemmen kann.

Bcl-2

Bcl-2 ist der Prototyp eines Gens, das Krebs durch Blockieren von Apoptose fördern kann. Bcl-2 wurde als ein Gen kloniert, das in humanen folliculären B-Zell Lymphomen mit einer t(14;18) Translokation vom Chromosom 14 auf das Chromosom 18 übertragen wird. Die Translokation ist kennzeichnend für diese Krebsart und führt zur vermehrten Produktion eines Immunoglobulin-Fusionsproteins von Bcl-2, was wiederum Apoptose der B-Zellen hemmt und dadurch das Krebswachstum fördert (Cleary et al., 1986; Reed et al., 1988; Tsujimoto et al., 1985a; Tsujimoto et al., 1984; Tsujimoto et al., 1985c; Vaux et al., 1988). Transgene Mäuse, die dieses Fusionsprotein exprimieren, entwickeln ebenfalls B-Zell Lymphome. Die lange Latenzzeit, die es dauert bis die Mäuse diesen Krebs entwickeln, läßt auf zusätzlich notwendige sekundäre Veränderungen schließen. Wahrscheinlich kommt es zu einer Kooperation mit weiteren Onkogenen wie z. B. c-myc (McDonnell et al., 1989; McDonnell and Korsmeyer, 1991).

Akt/PI3K-Signalweg

Mehrere Komponenten dieses Signalweges (s. 1.3.2.) sind in Tumoren so verändert, daß dessen antiapoptotische Wirkung verstärkt wird.

Das Gen für PTEN ist ein Tumorsuppressor, der in verschiedenen Tumorarten wie Glioblastoma, Melanoma und Brusttumoren inaktiviert ist. PTEN ist eine Phosphatase, die Phosphatidylinositolphosphat an der 3' Position dephosphoryliert. Damit ist sie ein Gegenspieler der antiapoptotisch wirkenden PI3-Kinase (siehe 1.3.2.). Der Verlust von PTEN in Tumoren führt daher zu einer Verstärkung der antiapoptotischen Signale durch eine verringerte negative Regulation des Akt-Signalweges (Myers et al., 1998; Wu et al., 1998).

Weiterhin ist in etwa 40% von untersuchten Gebärmutterkrebszelllinien das Gen für die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase selber amplifiziert (Shayesteh et al., 1999). Zusätzlich sind auch die Gene der Isoformen Akt1 und Akt2 in Gebärmutterkrebs amplifiziert (Cheng et al., 1992; Yuan et al., 2000). Diese Veränderungen bewirken eine Aktivierung des antiaoptotischen Signalweges.

DCC

Die Entwicklung von Darmkrebs ist mit dem Verlust von spezifischen Genen verbunden, die aus diesem Grund Tumorsuppressoren sein könnten. Eines dieser Gene ist deleted in colorectal cancer (DCC), ein Zelloberflächenrezeptor, der auch in anderen Krebsarten deletiert ist (Fearon et al., 1990). DCC kann Apoptose auslösen wenn es nicht an seinen Liganden Netrin gebunden ist. Für den proapoptotischen Effekt ist die Caspase-abhängige Spaltung von DCC selber notwendig (Mehlen et al., 1998). Dabei wird Caspase-9 in einen Komplex mit DCC und Caspase-3 rekrutiert. Caspase-9 aktiviert hier Caspase-3 ohne daß Apaf-1 oder Caspase-8 nötig sind (Forcet et al., 2001). Der Mechanismus der Apoptoseauslösung unterscheidet sich daher von den bisher bekannten, die über Bildung des Apoptosomes oder Caspase-8 laufen (siehe 1.2.). Knock-out Mäuse von DCC zeigen zwar keine erhöhte Tumorraten (Fazeli et al., 1997). Diese Beobachtung läßt sich aber mit dem oben beschriebenen Mechanismus erklären. Eine höhere Zahl von Tumoren wie z. B. Adenome wäre nicht zu erwarten. Vielmehr wären eventuell auftretende Tumore aggressiver, weil der Verlust von DCC eine Metastasierung außerhalb des Bereiches, in denen der Ligand gebildet wird, begünstigt.

DAP-Kinase

DAP-Kinase ist eine Serin/Threonin Kinase, die Apoptose auslöst, wenn sie überexprimiert wird und auch an der Weiterleitung des apoptotischen Signals des Fas-Rezeptors beteiligt ist (Cohen et al., 1999). DAP-Kinase kann in verschiedenen humanen Krebszelllinien aus Blasentumoren, Nierentumoren und Brusttumoren nicht mehr nachgewiesen werden (Kissil et al., 1997). Außerdem wird DAP-Kinase in stark metastasierenden Maus-Lungenkrebszelllinien sehr viel geringer exprimiert als in nicht metastasierenden Lungenkrebszelllinien. Ektopische Expression von DAP-Kinase in den metastasierenden Zelllinien führt zu einer verminderten Metastasierung, da die Zellen in Nacktmäusen vermehrt apoptotisch werden (Inbal et al., 1997). DAP-Kinase

ist daher ähnlich wie DCC ein Tumorsuppressor, der die Metastasierung hemmt. Die Auslösung von Apoptose geschieht wahrscheinlich durch Aktivierung von p53 (Raveh et al., 2001). DAP-Kinase kann daher gemeinsam mit p53 als Tumorsuppressor wirken.

Defekte im Apoptose-Mechanismus

Defekte im eigentlichen Apoptose-Mechanismus wurden in mehreren Krebsarten gefunden. So wird in etwa 50% der untersuchten primären Lungen- und Darmkrebs-Proben ein Rezeptor der TNFR-Familien für den Fas-Liganden überamplifiziert, der die Apoptose durch den Fas-Liganden hemmt. Dieser Rezeptor (DcR3 – Decoy Receptor 3) wird von den Tumorzellen sezerniert, bindet an den Fas-Liganden und neutralisiert dadurch dessen Wirkung (Pitti et al., 1998).

Survivin ist ein IAP, das in verschiedenen Krebsarten, aber nicht in normalem adultem Gewebe exprimiert wird. Inhibition der Wirkung von survivin in Krebszellen führt zu Apoptose von mitotischen Zellen. Das deutet auf eine weitere Verbindung von Apoptose mit dem Zellzyklus hin (Ambrosini et al., 1997; Li et al., 1999a; Li et al., 1998).

In Melanomen wird der Apoptosom-Bestandteil Apaf-1 oft nicht mehr exprimiert. Ein Allel von Apaf-1 ist in den meisten Melanomen nicht mehr vorhanden während die Expression von dem verbliebenen Allel durch Methylierung eines Apaf-1 Enhancers unterdrückt wird. Diese Unterdrückung der Apaf-1 Expression führt zu einer verringerten Apoptoserate durch Chemotherapeutika und Bax-Expression. Der Verlust von Apaf-1 in Melanomen könnte daher zu der Resistenz von malignen Melanomen gegenüber allen bisher verwendeten Therapien beitragen (Soengas et al., 2001).

Proliferation und Apoptose sind eng miteinander verbunden. So können Signale, die zum Wachstum der Zelle führen auch antiapoptotische Wirkung haben. Deshalb können neben den oben beschriebenen Genen viele Onkogene, die mitogen wirken und dadurch das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen auslösen, auch antiapoptotisch wirken. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß z. B. Rezeptortyrosinkinasen wie der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), der Humane Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2) oder der PDGF-Rezeptor in verschiedenen Tumoren überexprimiert werden (Bange et al., 2001). Diese

Rezeptoren können nach Bindung an ihre Liganden gleichzeitig oben beschriebene Wachstumssignale und antiapoptotische Signalwege aktivieren (siehe 1.3.2.).

Der EGF-Rezeptor ist in bestimmten Glioblastomen überexprimiert und wirkt deshalb wahrscheinlich in der Tumorentstehung (Liebermann et al., 1985b). Aber auch bei normaler EGFR-Expression kann der EGFR zur Entstehung von Tumoren beitragen. In Zellen, die durch andere Onkogene transformiert werden, kann der EGF-Rezeptor für das Überleben der Zellen verantwortlich sein. Basale Keratinozyten können nur bei Expression des EGFR durch einen dominant aktiven Guaninnukleotidaustauschfaktor Son of Sevenless (SOS) transformiert werden. Während die Expression einer dominanten aktiven Form von SOS in basalen Keratinozyten von Wildtyp-Mäusen zur Entwicklung von Hautpapillomen führt, wird die Bildung dieser Krebsart in EGFR-defizienten *wa2*-Mäusen durch verstärkt auftretende Apoptose in den Keratinozyten inhibiert (Sibilia et al., 2000). Dabei zeigt sich auch ein augenscheinliches Paradox in der Krebsforschung – die Induktion von Apoptose durch ein Onkogen (hier durch dominant aktives SOS).

Onkogene als Apoptoseauslöser

Gene, die als Onkogene in der Tumorentstehung wirken, können unter bestimmten experimentellen Bedingungen zur Apoptoseauslösung führen. Wenn der onkogene Transkriptionsfaktor *c-myc* in Fibroblasten ektopisch konstitutiv exprimiert wird, so sterben die Zellen ab, wenn sie unter Bedingungen gehalten werden, die einen Zellzyklusarrest induzieren können, z. B. unter Serumentzug. In *c-myc* exprimierenden Zellen tritt der Zellzyklusstop zwar nicht ein. Wegen einer vermehrten Apoptoserate nimmt die Zellzahl aber auch nicht zu. Da *c-myc* nur bei Serumentzug Apoptose auslöst, muß die Apoptose von Faktoren im Serum unterdrückt werden (Evan et al., 1992). Auch bei der Expression von onkogenem Ras in Adipozyten und Schilddrüsenzellen sterben diese bei Serumentzug (di Jeso et al., 1995; Navarro et al., 1999).

D. h. ob *c-myc* oder Ras transformierend wirken können, hängt von anderen Genprodukten ab, die mit den beiden Onkogenen zusammenwirken müssen, um unkontrolliertes Wachstum zu erzeugen. Eines dieser Genprodukte kann auch Bcl-2 sein, da die *c-myc* induzierte Apoptose durch eine erhöhte Expression von Bcl-2 gehemmt wird, während die Ras-induzierte Apoptose durch PKC inhibiert wird (Liou

et al., 2000; Nalca et al., 1999). Die Faktoren im Serum wiederum stimulieren Rezeptoren, die antiapoptotische Signalwege aktivieren könnten (siehe 1.3.2.).

Das Auslösen der Apoptose durch Onkogene kann sowohl durch Expression proapoptotischer Gene als auch durch Inaktivierung noch nicht identifizierter Inhibitoren von Apoptose erfolgen (Duelli and Lazebnik, 2000).

Durch die eben beschriebenen Daten kann man die Empfindlichkeit von primären nicht invasiven Tumoren gegenüber Chemotherapeutika erklären, die wesentlich höher ist als die der nicht transformierten Zellen, aus denen sich diese Tumoren entwickelt haben. Die Expression eines Onkogens in nicht transformierten Zellen aktiviert einen Mechanismus, der die entartete Zellen empfindlicher gegen Apoptose macht. Zum Überleben brauchen die Zellen sekundäre Veränderungen, die die Apoptose hemmen. Im Primärtumor können Chemotherapeutika die Hemmung überwinden – die Zellen sterben. Während der Entwicklung zum metastatischen Tumor erhalten die Zellen aber weitere Mutationen, die sie durch zusätzliche Defekte im Apoptosemechanismus resistent gegen Chemotherapeutika machen (Evan and Littlewood, 1998).

1.4.2.2. Virale Infektionen

Virus infizierte Zellen werden im Körper in der Regel eliminiert. Entweder führt die Deregulation der normalen Zellphysiologie zu Apoptose oder die infizierten Zellen werden vom Immunsystem erkannt und durch Apoptoseauslösung beseitigt. Viren haben Mechanismen entwickelt, um ihre Wirtszelle am Leben zu erhalten.

So exprimieren Adenoviren das E1B Protein, welches Apoptose wahrscheinlich ähnlich wie Bcl-2 inhibiert (White et al., 1992). Außerdem vermittelt das adenovirale Protein RID die Internalisation und Degradation von Fas (Tollefson et al., 1998). Die Inhibition des Fas-Signalweges wird auch von γ -Herpesviren benutzt. Diese Viren exprimieren v-Flip (v-Flip Inhibitory Protein), ein Protein, das an das Adapterprotein FADD bindet und dadurch die Bindung und Aktivierung von Caspase-8 inhibiert (Thome et al., 1997). Das virale Flip besitzt ein zelluläres Homolog c-Flip (Irmeler et al., 1997).

Andere Viren hemmen direkt die Caspasen. So inhibieren Baculoviren Caspasen direkt durch die Expression der Caspase-Inhibitoren p35 und iap (Clem et al., 1991; Crook et al., 1993) und Poxviren durch die Expression von crmA (Miura et al., 1993).

1.5. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen Mechanismen untersucht werden, mit denen Krebszellen apoptotischen Signalen entgehen, die normalerweise auf sie einwirken, um den Organismus zu schützen. Dazu sollen Unterschiede in der Genexpression untersucht werden. Eine veränderte Genexpression während der Transformation von normalen zu Krebszellen kennzeichnet diese Krankheit. Die Untersuchung von Signalwegen, deren antiapoptotische Wirkung durch eine veränderte Genexpression verstärkt wurde, könnte deshalb Angriffspunkte für eine mögliche Krebstherapie aufzeigen.

Insbesondere soll die verstärkte Resistenz gegen zwei apoptotische Signale untersucht werden. Im ersten Fall des c-Kit Rezeptors in Melanomzellen wurde die Resistenz durch unterschiedliche Genexpression *in vivo* erworben. Im zweiten Fall des Fas-Rezeptors im Plattenepithelkarzinom soll die Resistenz zusätzlich *in vitro* verstärkt werden.

1.) Der c-Kit Rezeptor in Melanomzellen

Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit ist in vielen Melanomzellen nicht nachweisbar, obwohl sie in den nicht transformierten Ausgangszellen, den Melanozyten, stark exprimiert wird und dort mitogen wirkt. Reexpression von c-Kit und anschließende Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden Stem Cell Factor (SCF) kann zu Apoptose führen.

Es soll geklärt werden, ob der beobachtete Effekt auch eine physiologische Relevanz hat oder ob er nur auf der ektopischen Überexpression des c-Kit Rezeptors beruht. Bei einer physiologischen Relevanz des Effektes soll der Mechanismus der Apoptoseauslösung untersucht werden, um zu erfahren, wie c-Kit in diesen Zellen den Zelltod herbeiführt.

2.) Der Fas Rezeptor im Plattenepithelkarzinom

In einem weiteren Ansatz sollen antiapoptotische Signalwege durch eine funktionelle Genexpressionsanalyse identifiziert werden. Dazu sollen Krebszellen *in vitro* so auf Apoptoseresistenz selektioniert werden wie *in vivo*.

Es sollen klonale Zelllinien der Plattenepithelkarzinomzelllinie Hela S3 etabliert werden, die resistenter gegen den apoptotischen Effekt des Fas-Liganden sind. Ein anschließender Vergleich der Genexpression mittels cDNA-Arrays soll die Gene identifizieren, die in den resistenten Klonen und der Ausgangszelllinie Hela S3 unterschiedlich exprimiert werden und daher Apoptose in dieser Krebsart beeinflussen könnten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bezugsquellennachweis

2.1.1. Chemikalien

| | |
|---|-------------------------|
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| AG1295 | Calbiochem, Bad Soden |
| AG1478 | Calbiochem, Bad Soden |
| Agar | Difco, U.S.A. |
| Agarose | BRL, Eggenstein |
| Ampicillin | Boehringer, Mannheim |
| Aprotinin | Sigma, Taufkirchen |
| APS (Ammoniumperoxodisulfat) | Bio-Rad, München |
| Batimastat (BB94) | British Biotech, Oxford |
| Bisacrylamid | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma, Taufkirchen |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Sigma, Taufkirchen |
| Coomassie G250 | Serva, Heidelberg |
| Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP) | Boehringer, Mannheim |
| Dimethyldichlorsilan | Sigma, Taufkirchen |
| Digitonin | Calbiochem, Bad Soden |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma, Taufkirchen |
| Ethidiumbromid | Sigma, Taufkirchen |
| Geneticin (G418) | Gibco, Eggenstein |
| HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure) | Serva, Heidelberg |
| Heringsperma-DNA | Sigma, Taufkirchen |
| L-Glutamin | Gibco, Eggenstein |
| Lysozym | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumazid | Serva, Heidelberg |
| Natriumfluorid | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumorthovanadat | Aldrich, Steinheim |
| PD 98059 | Calbiochem, Bad Soden |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Sigma, Taufkirchen |
| Polybren (Hexadimethrinbromid) | Sigma, Taufkirchen |
| Polyethylenglycol 4000 | Serva, Heidelberg |
| Ponceau S | Sigma, Taufkirchen |
| Propidiumiodid | Sigma, Taufkirchen |
| Protein A-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| SB 202190 | Calbiochem, Bad Soden |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Roth, Karlsruhe |
| SU 5402 | Sugen, U.S.A. |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethylen-diamin) | Serva, Heidelberg |
| TPA (tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) | Sigma, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| tRNA „bakers yeast“ | Boehringer, Mannheim |
| Wortmannin | Sigma, Taufkirchen |

Xylencyanol

Merck, Darmstadt

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

2.1.2. Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dATP}$ >5000 Ci/mmol

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

2.1.3 „Kits“ und Sonstiges

| | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| cDNA-Arrays | Axxima, Martinsried |
| ECL Kit | NEN, Brüssel |
| Filterpapier 3MM | Whatman, USA |
| HiTrap™ HIC Test Kit | Pharmacia, Freiburg |
| HiTrap™ IEX Test Kit | Pharmacia, Freiburg |
| Hyperfilm MB | Amersham, Braunschweig |
| Kulturgefäße, Plastik | Greiner, Solingen |
| | Nunclon, Dänemark |
| | Falcon, U.K. |
| Mega Prime DNA Labelling Kit | Amersham-Pharmacia, Freiburg |
| | Pierce, USA |
| Micro BCA Protein Assay Kit | Dynatech, Denkendorf |
| Parafilm | Pharmacia, Freiburg |
| Protein A-Sepharose | Qiagen, Hilden |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | Boehringer, Mannheim |
| Random Primed DNA Labeling Kit | Pharmacia, Freiburg |
| Sephadex G-50 (DNA Qualität) | Nalgene Company, USA |
| Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat | Nalgene Company, USA |
| Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat | Pharmacia, Freiburg |
| Superdex 75 | Boehringer, Mannheim |
| TUNEL-Assay-Kit | Sigma, Taufkirchen |
| „Wheat Germ“ Sepharose | Sigma, Taufkirchen |
| „Lentil“ Sepharose | Sigma, Taufkirchen |

2.1.4. Wachstumsfaktoren und Liganden

| | |
|----------------------|----------------------|
| IL-1 α | TEBU, Frankfurt/Main |
| Interferon- α | TEBU, Frankfurt/Main |
| Interferon- γ | TEBU, Frankfurt/Main |
| Oncostatin M | Boehringer, Mannheim |
| SCF | TEBU, Frankfurt/Main |
| TNF- α | Biomol, Haub |
| TGF- β | Biomol, Haub |

2.1.5. Medien und Puffer

2.1.5.1. 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 folgende Antibiotika zugesetzt:

| | | |
|------------|-----|------------------|
| Ampicillin | 100 | $\mu\text{g/ml}$ |
| Kanamycin | 100 | $\mu\text{g/ml}$ |

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2.1.5.2. Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum wurde von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose
5% oder 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat.

Ham's F12, 10% FCS, 2mM Glutamin

MEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat

RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin.

Einfriermedium
90% FCS, 10% DMSO.

2.1.5.3. Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

| | | | |
|---|-------|----|--|
| BBS (2x) | 50 | mM | BES |
| | 280 | mM | NaCl |
| | 1,5 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | | | pH 6,96 (NaOH) |
| Denhardt (100x) | 2,0 | % | Polyvinylpyrrolidon |
| | 2,0 | % | Ficoll |
| | 2,0 | % | BSA |
| DNA-Auftragspuffer (6 x) | 0,25 | % | Bromphenolblau |
| | 0,25 | % | Xylencyanol |
| | 30,0 | % | Glyzerin |
| | 100,0 | mM | EDTA pH 8,0 |
| Hybridisierungspuffer | 5 | x | SSC |
| | 0,1 | % | SDS |
| Hypotonischer Puffer für DNA-Färbung | 0,1 | % | Na-citrat |
| | 0,1 | % | Triton X-100 |
| Laemmli-Puffer (2x) | 187,5 | mM | Tris/HCl pH 6,8 |
| | 6,0 | % | SDS |
| | 30,0 | % | Glyzerin |
| | 0,01 | % | Bromphenolblau |
| | 5,0 | % | β-Mercaptoethanol |
| NET (1x) | 150,0 | mM | NaCl |
| | 5 | mM | EDTA |
| | 50 | mM | Tris |
| | 0,05 | % | Triton X-100 pH 7,4 (HCl) |
| PBS | 13,7 | mM | NaCl |
| | 2,7 | mM | KCl |
| | 80,9 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 1,5 | mM | KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl) |
| Prähybridisierungspuffer (2x) | 10 | x | Denhardt |
| | 2 | x | SSC |
| | 100 | mM | Na ₃ PO ₄ , pH 6,8 |
| | 2 | mM | Na ₄ P ₂ O ₇ |
| RNA-Auftragspuffer (2x) | 48,0 | % | Formamid |
| | 17,0 | % | Formaldehyd |
| | 11,0 | % | Glyzerin |
| | 0,1 | % | Bromphenolblau |

| | | |
|-----------------------|-----------|-------------------|
| SD-Transblot | 50,0 mM | Tris/HCl pH 7,5 |
| | 40,0 mM | Glycin |
| | 20,0 % | Methanol |
| | 0,004 % | SDS |
| SSC (20x) | 3,0 M | NaCl |
| | 0,3 M | Natriumcitrat |
| TAE (10x) | 400 mM | Tris/Acetat |
| | 10 mM | EDTA |
| | | pH 8,0 (Eisessig) |
| TE | 10,0 mM | Tris/HCl pH 8,0 |
| | 1,0 mM | EDTA pH 8,0 |
| Tris-Glycin-SDS (10x) | 248,0 mM | Tris/HCl pH 7,5 |
| | 1918,0 mM | Glycin |
| | 1,0 % | SDS |
| W1 (Waschpuffer 1) | 300 mM | Nacl |
| | 30 mM | Natriumcitrat |
| | 0,1 % | SDS |
| W2 (Waschpuffer 2) | 30 mM | NaCl |
| | 3 mM | Natriumcitrat |
| | 0,1 % | SDS |

2.1.6. Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und von Referenzen tabellarisch aufgeführt.

2.1.6.1. Bakterienstämme

| Stamm | Eigenschaften | Referenz |
|----------------------------|---|-----------------------------|
| <i>E.coli</i> 298 F' | F+, Kanr, Lambdar, recA-, tonA-lacI- | Genentech, San Francisco |
| <i>E.coli</i> DH5 α | F'F'/endA1, hsd17, (r _k ⁻ m _k ⁻), Kanr, Ampr, | Stratagene |

2.1.6.2. Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung | Referenz |
|-------------------|---|-------------------------------------|
| Phoenix A | modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, amphotropen Retroviren | Garry P. Nolan, Stanford University |
| Hela S3 | klonale Zelllinie, die von der Hela Zelllinie gewonnen wurde, sehr tumorigen in Nacktmäusen | ATCC, Manassas, U.S.A: |
| HS 294T pLEN-cKit | menschliche Melanomzelllinie, ektopisch c-kit exprimierend | (Winkler, 1994) |
| WM 983A | menschliche Melanomzelllinie von primärem Melanom von Patient A | (Herlyn, 1990) |
| WM 983B | menschliche Melanomzelllinie von metastatischem Melanom von Patient A | (Herlyn, 1990) |
| WM 115 | menschliche Melanomzelllinie von primärem Melanom von Patient B | (Herlyn, 1990) |
| WM 239A | menschliche Melanomzelllinie von metastatischem Melanom von Patient B | (Herlyn, 1990) |
| WM 278 | menschliche Melanomzelllinie von primärem Melanom von Patient C | (Herlyn, 1990) |
| WM 1617 | menschliche Melanomzelllinie von metastatischem Melanom von Patient C | (Herlyn, 1990) |
| WM 983A pLEN | WM 983A mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |
| WM 983B pLEN | WM 983B mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |
| WM 115 pLEN | WM 115 mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |
| WM 239A pLEN | WM 239A mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |
| WM 278 pLEN | WM 278A mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |

| | | |
|-------------------|--|-------------------------|
| WM 1617 pLEN | WM 1617 mit stabil im Genom integriertem Leervektor pLEN | d. A. |
| WM 983A pLEN-cKit | WM 983A, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| WM 983B pLEN-cKit | WM 983B, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| WM 115 pLEN-cKit | WM 115, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| WM 239A pLEN-cKit | WM 239A, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| WM 278 pLEN-cKit | WM 278, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| WM 1617 pLEN-cKit | WM 1617, ektopisch c-Kit exprimierend | d. A. |
| Melanozyten | NHEM – „Normal Human Epidermal Melanocytes“ | Clonetics, Walkersville |

2.1.6.3. Antikörper

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

| Antikörper | Eigenschaften | Referenz |
|------------|--|----------------------|
| 4G10 | Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste | UBI, Lake Placid |
| 3d6 | Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne von c-Kit | Boehringer, Mannheim |
| LJ-11 | Kaninchen, polyklonal, gegen die intrazelluläre Domäne von c-Kit | Ronald Herbst, d. A. |
| LJ-17 | Kaninchen, polyklonal, gegen die intrazelluläre Domäne von c-Kit | Ronald Herbst, d. A. |
| CH-11 | Maus, monoklonal, gegen Fas aktivierend | BD Biosciences |

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerretichperoxidase (HRP) konjugiert

| Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-----------------------|------------|---------------------|
| Ziege gegen Maus | 1 : 20000 | BioRad (München) |
| Ziege gegen Maus | 1 : 10000 | Sigma /Taufkirchen) |
| Ziege gegen Kaninchen | 1 : 20000 | BioRad (München) |

2.1.7. Plasmide

Ausgangsvektoren

| Vektor | Eigenschaften | Referenz |
|---------------|---|----------------------------------|
| pRK5 | Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl | Genentech, San Francisco |
| pcDNA3 | Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl | Invitrogen, USA |
| pLEN | retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori aus pBR322, 5'-, 3'-LTR aus MoMuLV, Ribosomenbindungsstelle IMP aus ECMV, niedrige Kopienzahl | E.F. Wagner & T. von Rüden, Wien |
| pBluescript | ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (+) IG, KS (MCS), hohe Kopienzahl | Stratagene, U.S.A. |

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

| Vektoren | Eigenschaften | Referenz |
|-----------------|---|-----------------|
| pLEN-cKit | Expression von c-Kit nach retroviraler Infektion in Säugetierzellen | (Winkler, 1994) |
| pQE –SCF | Expression eines Fusionsproteins von SCF mit einem 6xHis-tag in Bakterien | (Winkler, 1994) |

2.1.8. cDNA's

cDNA's folgender Zelllinien wurden von Tatjana Knyazewa (diese Arbeitsgruppe) isoliert und bereitgestellt:

| Zelllinie | Ursprung | Referenz |
|------------------|--|-------------------------------|
| HlaC78 | Plattenepithelkarzinom, Primärtumor Patient A | Larynx, (Carey et al., 1989) |
| HlaC79 | Plattenepithelkarzinom, Metastase Patient A | Larynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-10A | Plattenepithelkarzinom, Primärtumor Patient B | Pharynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-10B | Plattenepithelkarzinom, Metastase Patient B | Pharynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-17A | Plattenepithelkarzinom, Primärtumor Patient C | Larynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-17B | Plattenepithelkarzinom, Metastase Patient C | Larynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-22A | Plattenepithelkarzinom, Primärtumor Patient D | Pharynx, (Carey et al., 1989) |
| UMSCC-22B | Plattenepithelkarzinom, Metastase Patient D | Pharynx, (Carey et al., 1989) |
| SCaBER | Plattenepithelkarzinom, Metastase | Pharynx, ATCC |
| FaDu | Plattenepithelkarzinom, Pharynx | ATCC |

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) nach der Methode von Lee und Rasheed (Lee and Rasheed, 1990) präpariert.

2.2.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion der Phoenix A Zellen, von Hela S3 und den Apoptose resistenten Klonen wurden größere und kleinere DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.2.3. Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

2.2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des Ququick Kits für Gelextraktion der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.5. DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

2.2.5.1. Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (Chung and Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.2.5.2. Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert

und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 400 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/ Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.2.5.3. Dauerkulturen von E.coli Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.6. Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM-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.

2.2.6.1. Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation der RNA erfolgte nach Puissant und Houdebine (Puissant and Houdebine, 1990) durch Extraktion der RNA mittels saurem Phenol.

Die Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen bis zu 80%iger Konfluenz wachsen gelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 2 ml Puffer GTC (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M Mercaptoethanol, 10 mM EDTA) pro Platte. Nach einigen Minuten wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Schabers abgelöst und mehrmals mit Hilfe einer Spritze durch eine Kanüle (0.9 x 95 mm) gepresst, um die DNA zu scheren. Es wurde 1 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0, 10 ml Wasser gesättigtes Phenol und 2 ml Chloroform hinzugegeben, wobei nach Zugabe jeder einzelnen Lösung stark gemischt wurde (Vortex). Das Gemisch wurde für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 10 ml Isopropanol versetzt. Anschließend wurde wieder für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde durch sehr starkes Vortexen in 2 ml 4 M LiCl resuspendiert, wobei nicht das gesamte Pellet wieder aufgelöst werden konnte. Es wurde erneut wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS aufgenommen. 2 ml Chloroform wurden zugesetzt, und es wurde wiederum zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 3 Volumen Ethanol und 0.3 M Natriumacetat, pH 6.0 versetzt und für 30 min auf Ethanol/Trockeneis inkubiert. Abschließend wurde die RNA in H₂O aufgenommen.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.2.6.2. Präparation von poly-A⁺ RNA

Die Isolation von polyA⁺-RNA erfolgte mit Hilfe von Oligo-dT-Cellulose über eine Säule. Hierbei kommt es zur Abtrennung und Anreicherung der mit einem polyA⁺-Signal versehenen mRNA von anderen RNA-Spezies.

Oligo-dT-Cellulose wurde ü. N. bei 4 °C in Puffer A (10 mM Tris/Cl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) bei einer Konzentration von 1g/40ml quellen gelassen. 1 ml dieser Suspension wurde in eine silikonisierte mit silikonisierter Glaswolle verschlossene Pastuerpipette gegeben und die Säule mit 20 Volumen Puffer A gewaschen. 1 mg Gesamt-RNA wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt. Die RNA wurde auf 1 x Puffer A eingestellt und das Volumen auf 1 ml erhöht. Die RNA wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluß gesammelt. Der Durchfluß wurde nochmal auf die Säule gegeben. Das wurde insgesamt viermal wiederholt. Die Säule wurde mit 5 x 1 ml Puffer A gewaschen und der Durchfluß gesammelt. Von dem Durchfluß wurde der OD bei 260 nm bestimmt. Wenn er weniger als 0.05 betrug, wurde die polyA⁺-RNA mit 2 x 0.8 ml Puffer B (10 mM Tris/Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% SDS) eluiert. Der OD bei 260 nm beider Fraktionen wurde bestimmt und die Fraktionen gegebenenfalls vereinigt. Die RNA wurde mit 3 Volumen Ethanol und 300 mM Natriumazetat pH 6.0 in einem silanisierten Corex-Zentrifugenröhrchen versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Ethanol/Trockeneis wurde die RNA 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in H₂O mit einer Konzentration von 1 µg/µl aufgenommen.

2.2.6.3. Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegelkammern. 1.2 g Agarose wurden in 77 ml H₂O in der Mikrowelle aufgeköcht und 10 min bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 10 ml 10x MOPS und 13 ml Formaldehyd (37% (v/v)) aufgefüllt und das Gel gegossen.

Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 10 µg Gesamt-RNA wurde mit 5 µl 10x MOPS, 8.75 µl Formaldehyd (37%(v/v)) und 25 µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H₂O auf 50 µl gebracht. Die Proben wurden 10 min bei 65°C erhitzt, anschließend mit 10 µl RNA-Probenpuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm₂ Gelfläche wurden 0,8 Volt Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 200 ml Laufpuffer mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 30 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (λ=302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters photographiert.

2.2.7. Präparation von cDNA

Für die Präparation von cDNA wurden ein Oligo-dT-Primer, der das 3' Ende von mRNA erkennt (K1, Clontech Inc., U.S.A.), und ein „SMART“-Primer (Clontech Inc., U.S.A.) verwendet, der die 5' terminale CAP-Struktur von mRNA erkennt (K2). Es erfolgte nur die Synthese des zu der RNA komplementären DNA-Stranges. Ein

Verdau der RNA nach der Strangsynthese und eine Synthese von doppelsträngiger cDNA erfolgte nicht.

3 µg polyA⁺-RNA wurden in einem Volumen von 5 µl mit 10 µM K1 und 10 µM K2 für 2 min bei 70 °C erhitzt, anschließend für 5 min bei RT inkubiert und auf Eis gelagert. Zu diesem Mix wurden folgende Volumina gegeben:

| | | |
|---|-----|----|
| RNAse Inhibitor (MBI, 20 u/µl) | 0.5 | µl |
| 5 x RT Puffer (Boehringer, Mannheim) | 4 | µl |
| dNTP (10 mM) | 2 | µl |
| DTT (100 mM) | 2 | µl |
| H2O (steril, Bidest) | 4.5 | µl |
| AMV-Reverse Transkriptase (25 u/µl, Boehringer, Mannheim) | 2 | µl |

Der Ansatz wurde für 1 – 2 h bei 42 °C in einem Wärmeschrank inkubiert, um Verdunstungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 80 µl TE-Puffer und Erhitzen der Ansätze auf 72 °C für 7 min abgestoppt. Die cDNA wurde daraufhin mit Hilfe des „QuiQuick PCR purification kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit 50 µl Tris/Cl pH 8.0 von der Säule des Kits eluiert.

2.2.8. Arbeiten mit cDNA-Arrays

2.2.8.1. Konstruktion der cDNA-Arrays

Die cDNA-Arrays wurden von der Firma Axxima (Martinsried) bezogen. Die Arrays waren Nylonmembranen von 12 x 8 cm Größe, auf denen Plasmide in Punktform aufgetragen waren. Außer einiger Punkte mit Leervektor, die der Kontrolle dienen, enthielten alle Plasmide cDNA-Sequenzen, die einer kodierenden Region eines bestimmten Gens entsprachen. Die Größe dieser Sequenzen variierte zwischen 200 bp und 4000 bp. Die Mehrheit der Sequenzen kodierte für Proteinkinasen- und phosphatasen. Aber auch die Sequenzen von Proteasen und anderen Molekülen, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, befanden sich auf den Filtern. Für viele der Gene befanden sich mehr als eine Sonde auf den Filtern. Diese Sonden kodierten zwar für das selbe Gen, die verwendeten Sequenzen waren aber aus unterschiedlichen Bereichen des Gens, und sie waren unterschiedlicher Länge. Jede Sonde war zweimal auf einem Filter aufgetragen. Die Gen- und Sondennamen können der beiliegenden CD entnommen werden.

2.2.8.2. Prähybridisation der cDNA-Arrays

Jede Membran wurde zuerst mit Puffer W1 benetzt, so daß die gesamte Membranfläche feucht war. Die Membran wurde mit 15 ml Prähybridisierungspuffer mit 100 µg/ml tRNA in einem Hybridisierungsröhrchen verschlossen. Die Prähybridisation erfolgte unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersbach) bei 68 °C für wenigstens 4h.

2.2.8.3. Radioaktive Markierung der cDNA

Die cDNA's wurden mit P³³ markiert. Dieses Radiosotop hat den Vorteil, daß es nicht so stark überstrahlt wie P³². Zur Markierung wurde der „Megaprime DNA Labelling Kit“ von Amersham-Pharmacia verwendet und leicht modifiziert.

Folgender Ansatz wurde 5-10 min bei 95 °C inkubiert:

| | | |
|---|-----|------------------|
| cDNA | 5 | µl (oder 300 ng) |
| Primer (aus dem Kit, Hexanukleotide, „random“ primer) | 2.5 | µl |
| H ₂ O | 2.5 | µl |

Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und herunterzentrifugiert. Zu diesem Mix wurden folgende Reagenzien gegeben:

| | | |
|------------------------|-----|-------------|
| dGTP | 2 | µl |
| dCTP | 2 | µl |
| dTTP | 2 | µl |
| Reaktionspuffer | 2.5 | µl |
| Klenow-Enzym | 1.5 | µl |
| α-P ³³ -ATP | 5 | µl (50 µCi) |

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert, um Verdunstungen zu vermeiden. Anschließend wurde die markierte cDNA mittels des „PCR purification kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit 150 µl des Elutionspuffers von der Säule des Kits eluiert.

2.2.8.4. Hybridisation

Die gereinigte P³³-markierte cDNA wurde mit COT-DNA (Gibco, U.S.A.) inkubiert. Diese DNA bindet besonders stark an repetitive Sequenzen und blockiert somit die repetitiven Sequenzen der cDNA, die bei Hybridisation mit den Arrays unspezifische Signale verursachen könnten.

Dazu wurde die 150 µl markierte cDNA mit 40 µl 20 x SSC, 2 µl 10% SDS und 10 µl COT-DNA (1 mg/ml) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 68 °C inkubiert. Danach wurde dieser Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, der vorher auf 70 °C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA versetzt wurde. Für den Beginn der Hybridisierung wurde der Prähybridisationspuffer auf den cDNA-Arrays ohne Temperaturverlust gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C und Rotation der Hybridisierungsröhrchen für mindestens 16 h.

2.2.8.5. Waschen der cDNA-Arrays

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Arrays folgendermaßen gewaschen:

- 1) W1, 20 min, 42 °C
- 2) W1, 20 min, 42 °C
- 3) W2, 20 min, 42 °C
- 4) W2, 60 min, 65 °C

Danach wurden die Arrays mit H₂O abgespült, getrocknet und in Haushaltsfolie eingewickelt. Die Exposition erfolgte auf Phosphoimagerplatten (Fuji, Japan) für 48 h.

2.3. Auswertung der cDNA-Arrays

2.3.1. Ermittlung der stärker und schwächer exprimierten Gene

Die exponierten Phosphoimagerplatten wurden mittels eines Phosphoimagers (Fuji Bas2500, Fuji, Japan) eingelesen. Die so erhaltenen Computerdateien wurden weiter verarbeitet.

Die Schwärzung der einzelnen Punkte wurde mit Hilfe des Computerprogramms ArrayVision (RayTest, Kanada) ermittelt. Von den Schwärzungen der Punkte wurde der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden in das Computerprogramm Excel (Microsoft, U.S.A.) exportiert, wo sie weiter bearbeitet wurden. Dazu wurde eine selber geschriebene Auswertungsroutine (in VisualBasic) verwendet, die die Werte automatisch normalisierte und die in den Klonen stärker oder schwächer exprimierten Gene identifizierte (siehe auch 3.2.2.1.).

Zur Normalisierung wurde zuerst der Durchschnitt der Werte für den Leervektor pBluescript eines cDNA-Arrays von allen Werten des selben Arrays abgezogen. Auf diese Art wurde der Hintergrund, den jeder Punkt wegen unspezifischer Bindungen an den Plasmidvektor enthielt, in weiteren Berechnungen nicht mehr berücksichtigt. Anschließend wurde für jeden cDNA-Array die Summe aller Werte gebildet und jeder Punkt durch diese Summe geteilt. Dadurch konnten Schwankungen in der Gesamtintensität aller Punkte der cDNA-Arrays untereinander ausgeglichen werden. Jeder Wert wurde dann mit 10000 multipliziert, um handlichere Werte für die spätere Auswertung zu erhalten. Diese Rechenoperation änderte nicht das Verhältnis der Werte untereinander.

Mit den normalisierten Werten wurden die in den Klonen im Vergleich zur Ausgangszelllinie anders exprimierten Gene ermittelt. Als stärker exprimiert wurde ein Gen in einem Klon angesehen, wenn dessen Wert über dem Durchschnittswert der 4 cDNA-Arrays der Ausgangszelllinie plus 2 x Standardabweichung lag. Als schwächer exprimiert wurde ein Gen in einem Klon angesehen, wenn dessen Wert unter dem Durchschnittswert der 4 cDNA-Arrays der Ausgangszelllinie minus 2 x Standardabweichung lag. Die so ermittelten unterschiedlich exprimierten Gene wurden in zwei Tabellen für stärker und schwächer exprimierte Gene eingetragen und nach der Anzahl der Klone, in denen eine veränderte Expression festgestellt wurde, sortiert.

Der Programmcode der Auswertungsroutine befindet sich auf der beigelegten CD.

2.3.2. Gruppieren der Gene

Durch Vergleich der Expressionsdaten können die einzelnen Gene entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile eingeteilt werden. Die Expressionsprofile zweier Gene ähneln sich, wenn die Gene in den selben Klonen stärker oder schwächer exprimiert werden. Diese gemeinsame Expression könnte bedeuten, daß die entsprechenden Gene auch funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen. Wenn mehrere Gene, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, ähnliche Expressionsprofile haben, so könnten sie z. B. in einem gemeinsamen Signalweg wirken. Auf diese Weise können also nicht nur einzelne Gene identifiziert werden, die antiapoptisch wirken, sondern ganze Signalwege.

Für das Gruppieren der Gene wurden die normalisierten Expressionsdaten mit dem Computerprogramm „Cluster“ (Eisen et al., 1998) analysiert. Es wurden nur die Gene verwendet, die in wenigstens 80 % der cDNA-Arrays einen Wert von 1.0 oder größer aufwiesen. Dadurch wurden die Gene ausgeschlossen, deren Werte so klein waren, daß sie zu dicht am unspezifischen Hintergrund der Filter lagen. Dafür wurde die Filterfunktion des Programms verwendet. Anschließend wurden die Daten im Programm logarithmiert und nochmals normalisiert. Das Gruppieren der Gene erfolgte durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus. Es wurde der „Average Linkage“ Modus mit der zentrierten Korrelation benutzt. Bei dieser Art des Gruppierens werden zuerst kleinere Gengruppen gefunden und die Ähnlichkeit der Gengruppen untereinander bestimmt, indem ein durchschnittliches Expressionsprofil aus den Genen in einer Gengruppe gebildet wird und dieses dann mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil der anderen Gengruppen verglichen wird. Die Ergebnisse des Gruppierens wurden in einem Ergebnisdatenfile abgelegt und mit dem Programm „TreeView“ (Eisen et al., 1998) angesehen. Wie gut die Expressionsprofile der Gene und Gengruppen miteinander korrelieren wurde durch den Korrelationsfaktor ausgedrückt, der von 1.0 für identische Profile bis -1.0 für genau entgegengesetzte Profile reichte. Für weitere Untersuchungen wurden nur Gengruppen verwendet, die einen Korrelationsfaktor von 0.7 oder größer besaßen. Die Ergebnisse des Gruppierens befinden sich ebenfalls auf der beiliegenden CD.

2.4. Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.4.1. 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. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

2.4.2. Mykoplasmentest

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 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.

2.4.3. MTT-Assay

Zur Ermittlung der Wachstumsrate wurden lebende Zellen mittels eines kalorimetrischen Assays angefärbt. Das Substrat MTT (Thiazolblau; 3-[Dimethylthiazolyl-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazoliumringes von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein alkohollösliches Formazanprodukt umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch mit einem ELISA-Lesegerät gemessen werden kann.

Die Zellen wurden wenigstens in Triplikaten auf 96 Loch Platten zu 1000-5000 Zellen pro Loch in 100 µl Zellkulturmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 50 µl Medium mit gegebenenfalls weniger FCS oder anderen Zusätzen ausgetauscht. Alle 2 bis drei Tage wurde die Zellkonzentration bestimmt. Dazu wurde zu jedem Loch 25 µl einer MTT-Lösung (2.5 mg/ml in PBS) gegeben und für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Präzipitate durch Hinzugabe von 150 µl 0,02 N HCl/Isopropanol aufgelöst. Die Färbung wurde in einem ELISA Reader (BioRad) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert.

2.4.4. Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Phoenix A-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalzium-phosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit CaCl_2 und einer BES gepuffereten 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 der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale (8 ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 μg DNA mit H_2O zu einem Volumen von 260 μl verdünnt, mit 40 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 400 μl BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

2.4.5. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der β -Galaktosidase oder des Green Fluorescent Protein (GFP) wie unter 2.2.3 bzw. 2.3.4 beschrieben transfiziert.

Bei Transfektion mit β -Galaktosidase wurden die Zellen 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, und 10 min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blau-färbung transfizierter Zellen 60 min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert.

Bei Transfektion mit GFP wurden die grün fluoreszierenden Zellen 48h nach Transfektionsbeginn mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Axiovert S 100, Zeiss) oder eines Durchflußzytometers (FacsCalibur, BD Biosciences) detektiert.

2.4.6. Retroviraler Gentransfer in Melanomzellen

Zu Herstellung von Melanomzellen, die den c-Kit Rezeptor stabil exprimieren, wurden Phoenix A Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit der zu exprimierenden Rezeptor-cDNA in einem retroviralen Expressionsvektor pLEN nach der unter 2.3.4 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen zum Sammeln von Virusüberstand ü.N. mit 5 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde dann durch einen 0,45 μm Filter sterilfiltriert. Zur Infektion der Melanomzellen wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und auf 6 cm Kulturschalen ausgesät. 3 ml des gesammelten Virusüberstands der transfizierten Bosc23 Zellen wurde auf die Rat-1

Zellen gebracht und in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei 37°C für 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 4 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 Rat-1 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.

2.4.7. Herstellen von wachstumshemmendem Zellkulturüberstand

Zellen von WM 983B pLEN-cKit Kl. 10 oder HS 294T pLEN-cKit wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/15 cm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Medium mit 0.5% FCS oder ohne FCS und mit 3 µg/ml SCF (selbst hergestellt) oder 100 ng/ml SCF (Fa. TEBU) hinzugefügt. Nach 2 bis 4 Tagen wurde der Überstand abgenommen und durch einen 0.45 µm Filter filtriert. Dieser Überstand wurde zu mit Leervektor infizierten Zellen gegeben, die am Vortag mit 5000 Zellen/Loch in einer 96 Loch Platte ausgesät worden waren. Nach 2 bis 4 Tagen wurde ein MTT-Assay ausgeführt und die Werte des konditionierten Überstandes mit denen des unkonditionierten Überstandes verglichen.

2.5. Proteinchemische Methoden

2.5.1. Triton X100-Lyse von Zellen

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 frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

2.5.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1000 µg Protein/ml) eingesetzt.

2.5.3. Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zellysate dienen spezifische, an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

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-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder 3-10 µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zellysaten gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-

PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodaß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einen kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

| Protein: | MG (in kD): | Protein: | MG (in kD): |
|-----------------|-------------|-------------------|-------------|
| Myosin | 205,0 | Ovalbumin | 42,7 |
| β-Galaktosidase | 116,25 | Carboanhydrase | 29,0 |
| Phosphorylase b | 97,4 | Trypsin-Inhibitor | 21,5 |
| BSA | 66,2 | Lysozym | 14,4 |

2.5.5. Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5 min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einen Röntgenfilm aufgelegt und abhängig von der Signalstärke 12 h bis 1 Woche bei -80°C exponiert.

2.5.6. 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 2 h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

2.5.7. Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 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, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach zweimal 5 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten 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.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

2.5.8. Lyophilisation von Zellkulturüberstand

Um die Salzkonzentration im Zellkulturüberstand, die während der Lyophilisation und bei weiteren Reinigungsschritten stören könnte, zu senken, wurde der Überstand zuerst gegen leicht flüchtiges Ammoniumbicarbonat dialysiert. Dazu wurden jeweils 100 ml Überstand in einer Dialysemembran mit einer Ausschlußgrenze von 2 kDa (SpectrPor 7, Spectrum, U.S.A.) in 5 l 50 mM Ammoniumbicarbonat für 24 h dialysiert. Das Ammoniumbicarbonat wurde dabei 2 Mal gewechselt. Anschließend wurden je 50 ml in einem 50 ml Glaskolben mit weitem Hals unter Drehen des Kolbens in Ethanol/Trockeneis eingefroren. und gefrietrocknet.

2.5.9. Gelfiltration des eingegangenen Zellkulturüberstandes

Das Lyophilisat wurde so in H₂O aufgenommen, daß eine 100 fache Konzentration gegenüber dem nicht lyophilisierten Überstand erfolgte, und die Proteinkonzentration wurde mittels des BCA Protein Assays gemessen (Pierce, U.S.A.).

2.5.9.1. Gelfiltration mittels SMART-Anlage

Um kleine Mengen des Lyophilisates zu fraktionieren, wurde eine SMART-Anlage (Amersham-Pharmacia) verwendet, die es erlaubt geringe Substanzmengen aufzutrennen. Es wurden 40 µg des Lyophilisates in 50 µl auf eine Superdex 75 SMART Säule (Volumen 1.2 ml) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flußrate von 40 µl/min in PBS mit 3 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol. Die Retention von Proteinen wurde durch Messen des OD 280 nm verfolgt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine, wurde 40 µg eines Molekulargewichtsstandards in 50 µl PBS aufgetrennt. Der Molekulargewichtsstandard bestand aus folgenden Proteinen: Phosphorylase B (98 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Trypsin Inhibitor (21 kDa) und Lysozym (14 kDa).

Es wurden 50 µl Fraktionen gesammelt und auf ihre Aktivität getestet. Dazu wurde zu jeder Fraktion 200 µl Zellkulturmedium (RPMI, 0.5% FCS, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B) gegeben und jeweils 4 Löcher einer 96 Loch Platte, auf die am Tag zuvor 5000 Zellen/Loch WM 983B pLEN ausgesät worden waren, mit diesem Gemisch über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein MTT-Assay ausgeführt, um wachstumshemmende Fraktionen zu identifizieren.

2.5.9.2. Gelfiltration mittels FPLC-Anlage

Um größere Mengen der apoptotischen Fraktion zu erlangen, die weiter analysiert werden konnten, wurde mehr Lyophilisat an einer FPLC-Anlage (Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Es wurden 20 mg Lyophilisat in 250 µl auf eine selbst gepackte Superdex 75 Säule (110 ml, 11000 Böden/m) geladen. Die Auftrennung erfolgte wiederum mit PBS, 3 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol bei einer Flußrate von 0.5 ml/min. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt. 50 µl jeder Fraktion wurde wie nach Auftrennung mittels SMART Säule auf Aktivität getestet. Die Abschätzung der Größe der Fraktionen erfolgte ebenfalls durch Auftrennung des oben genannten Molekulargewichtsstandards, von dem 10 mg in 250 µl aufgetrennt wurden.

2.5.10. Ultrafiltration des Zellkulturüberstandes

Eine andere Art der Konzentration des Zellkulturüberstandes wurde durch Ultrafiltration erreicht. Dabei wird der Zellkulturüberstand durch eine Membran mit sehr kleinen Poren filtriert. In diesem Fall betrug die Ausschlußgrenze der Membran 3 kDa (YM3-Membran, Millipore, U.S.A.), d. h. Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 3 kDa werden von der Membran zurückgehalten. 200 ml Zellkulturüberstand wurden bei RT in einer Rührzelle (200 ml-Rührzelle, Amersham-Pharmacia) mittels Anlegen von Stickstoff langsam durch die Membran gepreßt. Der Zellkulturüberstand wurde dabei gerührt, um ungleichmäßige Konzentrationsverteilung in der Lösung und damit ein Ausfallen von Proteinen zu verhindern, bis der Überstand auf 10 ml eingeeengt war. Der eingeeengte Überstand wurde sterilfiltriert und auf seine Aktivität auf das Wachstum von WM 983B pLEN überprüft.

2.5.11. „Reversed Phase“ Chromatographie

Zur weiteren Aufreinigung der apoptotischen Fraktion wurde diese durch eine „Reversed Phase“ Chromatographie aufgetrennt. Dabei werden die denaturierten Proteine durch Wechselwirkung mit den hydrophoben Kohlenwasserstoffen der Säule gebunden. Eine Auftrennung erfolgt dann durch Elution mit einem Gradienten eines hydrophoben Lösungsmittels. Bei kleinen Proteinen wie dem wahrscheinlich gesuchten 14 kDa Protein ist es sehr wahrscheinlich, daß das Protein dann wieder renaturiert werden kann.

Die Chromatographie erfolgte an einer SMART-Anlage (Amersham-Pharmacia) 500 µl der apoptotischen Fraktion wurden mit 0.08% TFA angesäuert und denaturiert und auf eine µRP C₂-C₁₈ Säule (Amersham-Pharmacia) geladen. Der Laufpuffer zum Binden der Proteine war Puffer A (H₂O, 0.08% TFA). Die Proteine wurden durch einen Gradienten von 0-60% Puffer B (Acetonitril, 0.08% TFA) eluiert. Die Flußrate betrug 100 µl/min. Es wurden 50 µl Fraktionen gesammelt. Jeweils 10 µl einer Fraktion wurden mit 200 µl RPMI, 0.5% FCS verdünnt und die Aktivität auf das Wachstum von 983B pLEN getestet.

2.5.12. Ionenaustauschchromatographie

Der Zellkulturüberstand wurde sowohl durch Anionen-als auch Kationenaustauscher fraktioniert mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Pharmacia, Schweden). Es wurde der IEX Test Kit von Amersham-Pharmacia mit 1 ml vorgepackten Säulen der entsprechenden Ionenaustauscher verwendet. Die verwendeten Ionenaustauscher waren die Anionenaustauscher MonoQ, DEAE und der Kationenaustauscher SP. Der Überstand wurde durch Verdünnung mit einem 14 fachen Überschuß des jeweiligen Puffer A (20mM Tris/Cl pH 8.0 für Anionenaustauscher, 50 mM Acetatpuffer pH 5.0 für Kationenaustauscher) auf den notwendigen pH eingestellt und die Salzkonzentration gesenkt für das Binden an die Säule. Die Adsorption an die Säule erfolgte mit einer Flußrate von 4 ml/min. Anschließend wurden die Proteine durch einen linearen Gradienten von 0-50% Puffer B (Puffer A mit 1M NaCl oder 0.5 M (NH₄)₃SO₄) bei einer Flußrate von 0.3 ml/min eluiert. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und auf ihre Aktivität auf das Wachstum von WM 983B pLEN getestet.

2.6. Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

2.6.1. Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation sollte 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 18 bis 24 h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.1) wurden die Zellen für 2 bis 10 min mit verschiedenen Wachstums-faktoren, 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 (2.4.3) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.4) aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin (α PY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.4.7) analysiert.

2.6.2. TUNEL-Assay

Der TUNEL (Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labelling)-Assay ermöglicht das Markieren von freien DNA 3'-Enden durch das Anhängen eines markierten Nukleotides mittels der terminalen Transferase. In diesem Fall ist das Nukleotid Fluorescein markiertes dUTP. Auf diese Art werden die während der Apoptose durch die DNA-Spaltung entstehenden freien 3'-Enden gekennzeichnet. Apoptotische Zellen können unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Durchflußzytometer über ihre grüne Fluoreszenz detektiert werden. Der TUNEL-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers (Roche-Boehringer) ausgeführt.

2.6.3. DNA-Färbung in hypotonischem Puffer

Um den Anteil apoptotischer Zellen quantitativ zu bestimmen, wurde die DNA in einem hypotonischen Puffer mit Propidiumiodid angefärbt, dessen rote Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen wurde (Nicoletti et al., 1991). Der hypotonische Puffer führt zum Platzen der Zellen, so daß nur der Zellkern übrig bleibt, dessen DNA durch das Propidiumiodid gefärbt wird. Ist eine Zelle apoptotisch, so werden die dabei entstehenden DNA-Fragmente aus dem Zellkern extrahiert, so daß dieser Zellkern weniger DNA enthält. Apoptotische Zellkerne konnten deshalb im Durchflußzytometer als hypodiploider Peak detektiert werden.

50000 Zellen in 2 ml Ham's F12 mit 10% FCS der Apoptose resistenten Klone oder von Hela S3 wurden pro Loch in eine 12 Loch-Platte gesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 1 ml Ham's F12 mit 10% FCS ausgetauscht. 3 Tage später wurden

die inzwischen 60-70% konfluenten Zellen gehungert indem jedes Loch zweimal mit 1 ml Ham's F12 ohne FCS gewaschen wurde und anschließend 1 ml Ham's F12 ohne FCS hinzugegeben wurde. 24 h später wurden der aktivierende anti-Fas Antikörper CH-11 und Inhibitoren hinzugegeben und 16 h über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Jedes Loch wurde mit 200 µl PBS gewaschen und das PBS in das Eppendorfgefäß überführt. Die verbleibenden Zellen wurden mit 100 µl PBS mit Trypsin/EDTA abgelöst und ebenfalls in das Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 300 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 500 µl hypotonischem Puffer mit Propidiumiodid aufgenommen. Nach 2 stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Propidiumiodid Fluoreszenz der Zellkerne in einem FacsCalibur (BD Biosciences) Durchflußzytometer mit einem Bandpassfilter 585 nm gemessen und der Anteil der hypodiploiden Kerne ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle von c-Kit in der Melanomentstehung

Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit ist ein Protoonkogen, das während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle in der Pigmentierung der Haut, der Gametogenese und der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen spielt (Alexander et al., 1991; Tan et al., 1990). Im Zusammenspiel mit seinem Liganden Stammzellfaktor (Stem Cell Factor – SCF) reguliert die Kinase die Migration der Melanozyten und das Überleben von Gameten und Blut-Stammzellen (Copeland et al., 1990; Flanagan et al., 1991; Flanagan and Leder, 1990; Huang et al., 1990; Williams et al., 1990; Zsebo et al., 1990).

Der Rezeptor c-Kit ist strukturell verwandt mit dem PDGF-Rezeptor und dem Rezeptor für Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor (Macrophage Colony Stimulating Factor – MCSF) (Besmer et al., 1986; Yarden et al., 1987). Er besitzt im extrazellulären Teil 5 Immunglobulin – ähnliche Domänen. Die intrazelluläre Kinsedomäne wird von einem langen hydrophilen Teilstück unterbrochen. Wie alle Rezeptortyrosinkinasen wird c-Kit durch Dimerisierung nach Binden seines Liganden SCF aktiviert (Lev et al., 1992).

c-Kit kann bei einer aktivierenden Mutation transformierend wirken und solche Mutationen wurden auch bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren gefunden (Herbst et al., 1995; Hirota et al., 1998; Nishida et al., 1998; Taniguchi et al., 1999). Darüberhinaus kann die Aktivierung des c-Kit Rezeptors Apoptose in hämatopoietischen und Keimbahnzellen (Caceres-Cortes et al., 1994; Lee, 1998; Yan et al., 2000) hemmen.

Trotz der offensichtlichen Fähigkeit von c-Kit transformierend zu wirken, wurden in Melanomen Beobachtungen gemacht, die in diesen Zellen eine gegensätzliche Funktion von c-kit vermuten lassen. In diesem Labor und in anderen wurde gefunden, daß der c-Kit Rezeptor nur noch in wenigen Melanomzelllinien und Melanom-Tumorproben exprimiert wird während er in Melanozyten, den Ausgangszellen der Melanome, stark exprimiert wird (Gutman et al., 1994; Lassam and Bickford, 1992; Natali et al., 1995; Winkler, 1994). Die verminderte Expression des c-Kit Rezeptors in dieser Krebsart könnte also nötig sein für die Progression dieser Krebsart und c-Kit

würde sich in Melanomen wie ein Tumorsuppressor und nicht wie ein Tumorpromoter verhalten. Tatsächlich kann die ektopische Reexpression des c-Kit Rezeptors in Melanomzellen und die anschließende Stimulation mit SCF apoptotisch wirken (Huang et al., 1996; Winkler, 1994). Diese Zellen bilden wegen einer höheren Apoptoserate auch wesentlich schlechter Tumore in Nacktmäusen (Huang et al., 1998; Huang et al., 1996). c-Kit scheint also in diesem Zellsystem die Entartung zu verhindern indem das in Melanozyten ursprünglich wachstumsfördernde Signal umgewandelt wird in ein wachstumshemmendes in Melanomen. Aus den sich entwickelnden Melanomzellen würden daher nur die Zellen selektiert, die diesem Signal durch eine verminderte Expression des c-Kit Rezeptors entgehen. Die Signale, die von dem Rezeptor ausgehen wirken aus diesem Grund wie ein Schutzmechanismus gegen die Transformation der Zellen.

Allerdings sind die erwähnten Untersuchungen zur Auslösung von Apoptose durch c-Kit nur in 2 Zelllinien unternommen worden. In der einen Zelllinie wurde die Expression in den Melanomzellen nicht mit der in Melanozyten verglichen (Huang et al., 1998; Huang et al., 1996) und in der anderen Zelllinie weisen die Melanomzellen eine beträchtlich höhere Expression als in Melanozyten auf. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß die beobachteten Effekte auf einen Artefakt durch eine Überexpression des Rezeptors zurückzuführen sind und keine physiologische Relevanz besitzen. Sollte das Apoptosesignal durch den c-Kit Rezeptor jedoch auf einem physiologischen Effekt beruhen, so könnte eine genauere Kenntnis der Art und Weise der c-Kit vermittelten Apoptose sowohl Einblicke in einen neuen Apoptosemechanismus als auch Angriffspunkte für eine mögliche Therapie liefern. Zuerst sollte deshalb die physiologische Relevanz der Beobachtungen festgestellt werden und anschließend die Signale untersucht werden, die die Apoptose auslösen.

3.1.1. Reexpression von c-Kit in Melanomzelllinien

Zur Untersuchung der c-Kit vermittelten Apoptose in Melanomzellen mußten zuerst Melanomzelllinien konstruiert werden, die den Rezeptor wieder mit einer ähnlichen Stärke wie Melanozyten exprimieren. Dazu wurden 6 Melanomzelllinien ausgewählt, die jeweils aus dem primären Melanom und einer Metastase von 3 Patienten

gewonnen wurden (Herlyn, 1990). Somit konnten auch mögliche Unterschiede zwischen primärem Tumor und Metastase untersucht werden.

Die ektopische Expression von c-Kit erfolgte durch retroviralen Gentransfer. Klone oder stabile polyklonale Zelllinien wurden auf G 418 Resistenz selektioniert. Die Zellen der polyklonalen Zelllinien, die c-Kit stärker exprimierten, wurden mit Hilfe eines Durchflußzytometers aussortiert und weiter verwendet. Dazu wurden die c-Kit Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Binden des monoklonalen c-Kit Antikörpers 3d6 (Roche-Boehringer) und eines sekundären fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörpers markiert. Abhängig von der Expressionsstärke des c-Kit Rezeptors zeigten die Zellen im Durchflußzytometer eine unterschiedliche Fluoreszenz. Zellen mit hoher c-Kit Expression und daher starkem Fluoreszenzsignal konnten durch den Sortiermechanismus des Zytometers aussortiert und wieder kultiviert werden. Die Zelllinien, die eine ähnliche Expression auf Proteinebene aufwiesen wie Melanozyten wurden weiter verwendet. Abbildung 3 zeigt die Expressionskontrolle der Zelllinien im Vergleich zu der hoch exprimierenden Zelllinie HS 294T pLEN-cKit (hergestellt in dieser Arbeitsgruppe durch A. Winkler, s. 2.1.) und Melanozyten, deren Expressionsniveau in einem separaten Gel mit WM 983B pLEN-cKit Kl. 10 verglichen wurde. Alle c-Kit-infizierten Zellen weisen ein ähnliches Expressionsniveau auf wie WM 983B pLEN-cKit Kl. 10, und da diese Zelllinie etwa soviel c-kit exprimiert wie Melanozyten, ist das c-Kit Expressionsniveau der infizierten Melanomzellen auch ähnlich dem in Melanozyten. Die vorher generierte Zelllinie HS 294T pLEN-cKit zeigte dagegen eine sehr starke Überexpression von c-Kit.

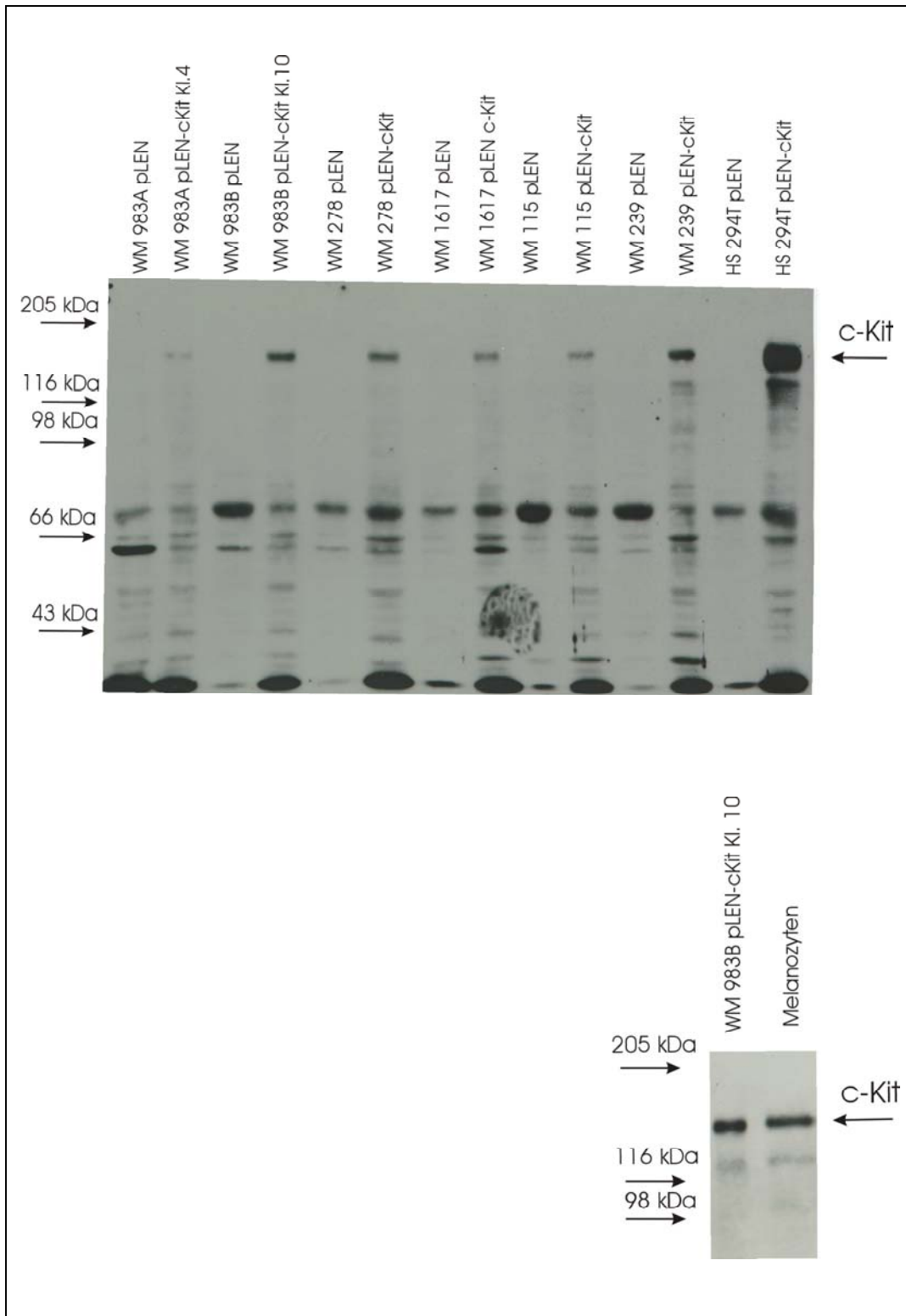
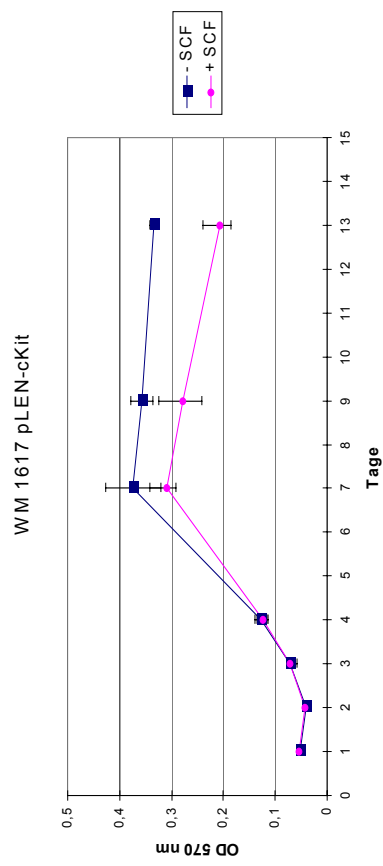
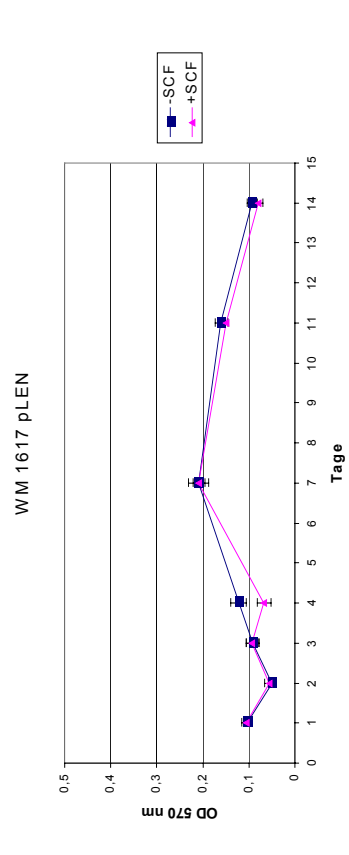
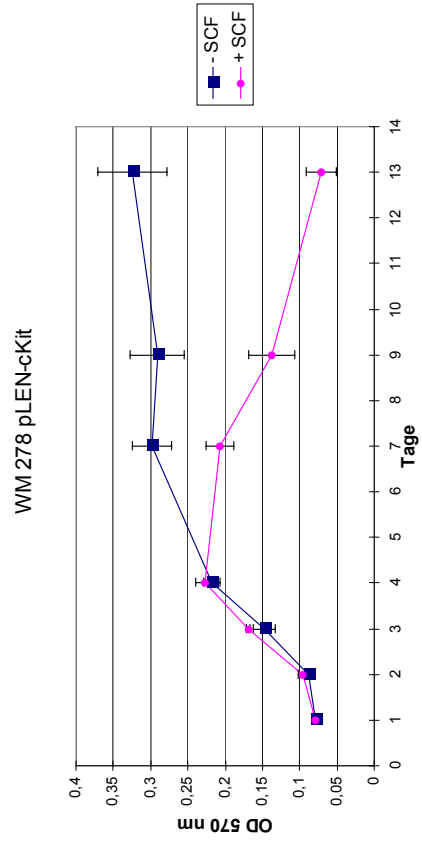
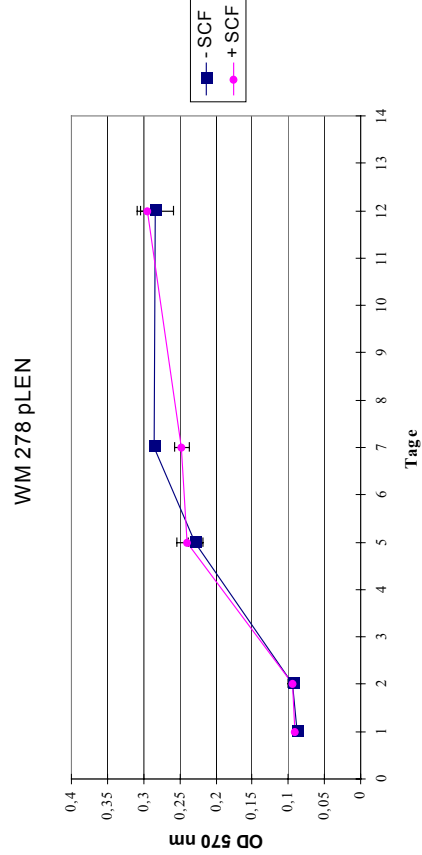


Abb. 3 Expression von c-Kit in Melanomen und Melanozyten

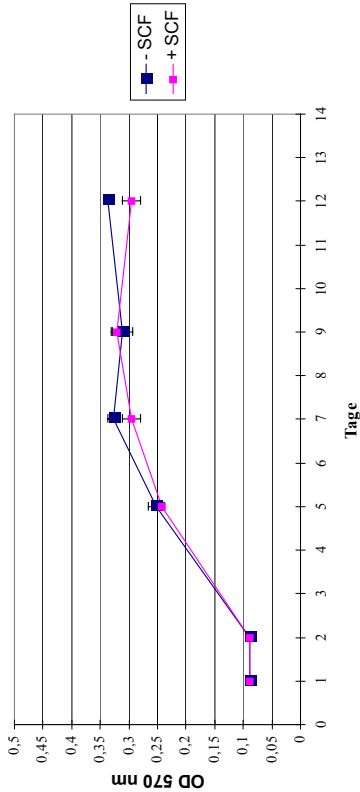
Jeweils 60 µg Lysat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion von c-Kit erfolgte mittels α -cKit 3d6 (Roche-Boehringer).

3.1.2. Einfluß der c-kit Stimulation auf das Wachstum der Melanomzellen

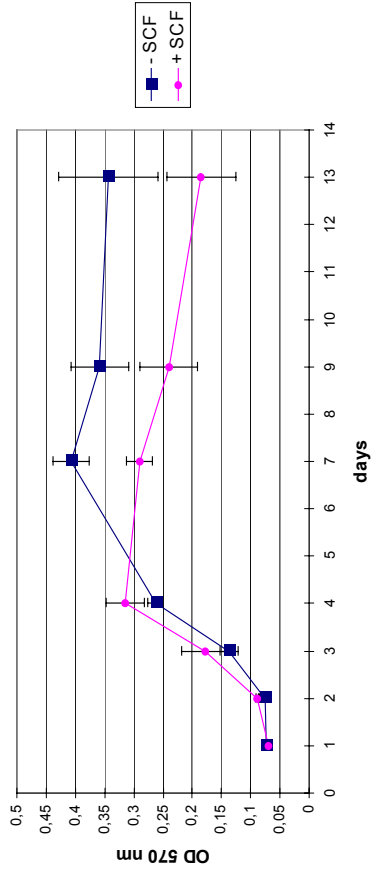
Um den Einfluß der Stimulation des c-Kit Rezeptors auf das Wachstum der infizierten Melanomzelllinien zu untersuchen, wurden Wachstumsassays mit und ohne den Liganden SCF ausgeführt. Alle c-Kit infizierten Zelllinien zeigten eine Wachstumsreduktion oder Zellzahlreduktion bei Stimulation mit c-Kit während die Kontrollzelllinien, die nur mit dem Leervektor infiziert wurden, keinen oder einen wesentlich geringeren Effekt zeigen. Es konnte kein Unterschied zwischen primären und metastatischen Melanomen beobachtet werden (Abb. 4). Bei Melanozyten dagegen wirkt SCF stark wachstumsfördernd. (Abb. 5)



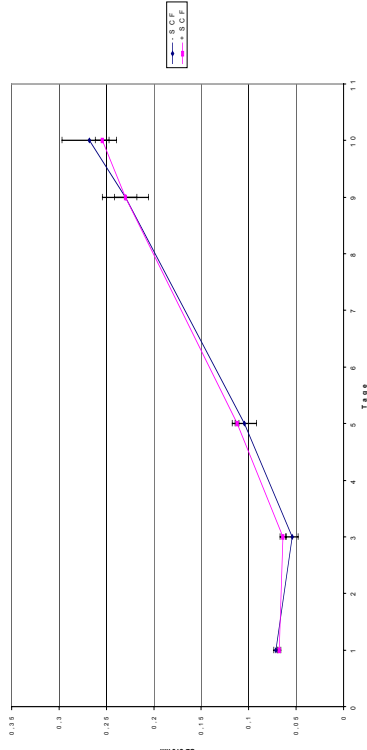
WM 983A pLEN



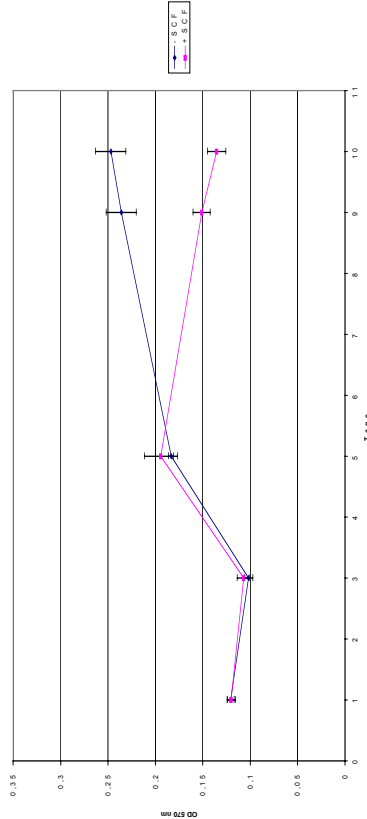
WM 983A pLEN-cKit Klon 4



WM 983B pLEN



WM 983B pLEN-cKit Klon 10



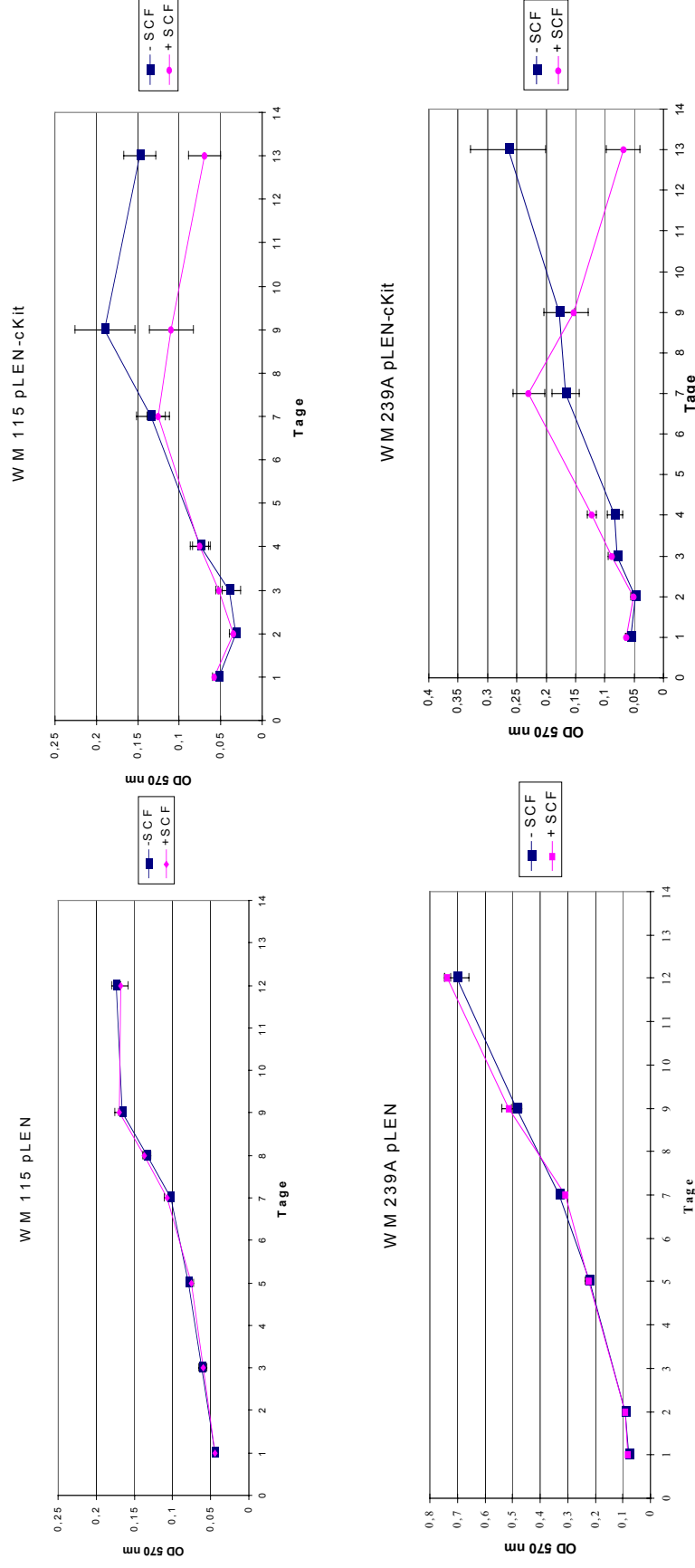


Abb. 4 MTT-Wachstumsassays der Vektor-infizierten und c-Kit infizierten Melanomzelllinien

Es wurden 2000 Zellen pro Loch (außer WM115 – 1000 Zellen) in einer 96 Loch-Platte ausgesät. Das Wachstum erfolgte in Medium mit 2% FCS (WM115) oder 0.5% FCS (alle anderen Zellen). An den Messfagen wurde 1 µg/ml SCF (selbst hergestellt) in PBS oder nur PBS ins Medium gegeben.

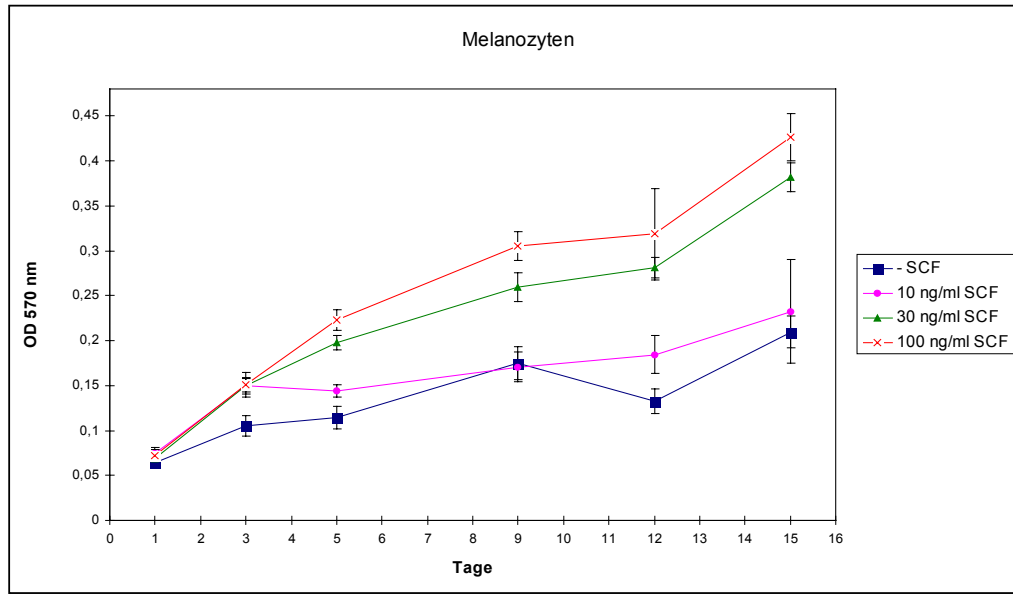


Abb. 5 MTT-Wachstumsassay der Melanozyten bei verschiedenen SCF-Konzentrationen

Es wurden 5000 Zellen pro Loch in einer 96 Loch Platte ausgesät. SCF (Fa. Tebu) wurde an den Meßtagen mit den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt.

3.1.3. SCF löst in den c-Kit infizierten Melanomzellen Apoptose aus

Um nachzuweisen, daß das Absterben der Zellen auf vermehrte Apoptose zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die SCF-Stimulation zur Fragmentierung der DNA führt, ein typisches Merkmal der Apoptose. Dazu wurde die TUNEL- (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP mediated Nick End Labelling) Reaktion verwendet. Bei diesem Prozeß überträgt die Terminale Deoxynucleotidyl Transferase dUTP auf die bei der Apoptose durch die DNA-Fragmentierung entstehenden freien 3'-DNA-Enden. Das dUTP ist durch Fluoreszin markiert, so daß apoptotische Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren. Der apoptotische Anteil ist in den c-Kit infizierten Zellen nach Stimulation mit SCF deutlich größer als bei den unstimulierten Zellen (Abb. 6, 7).

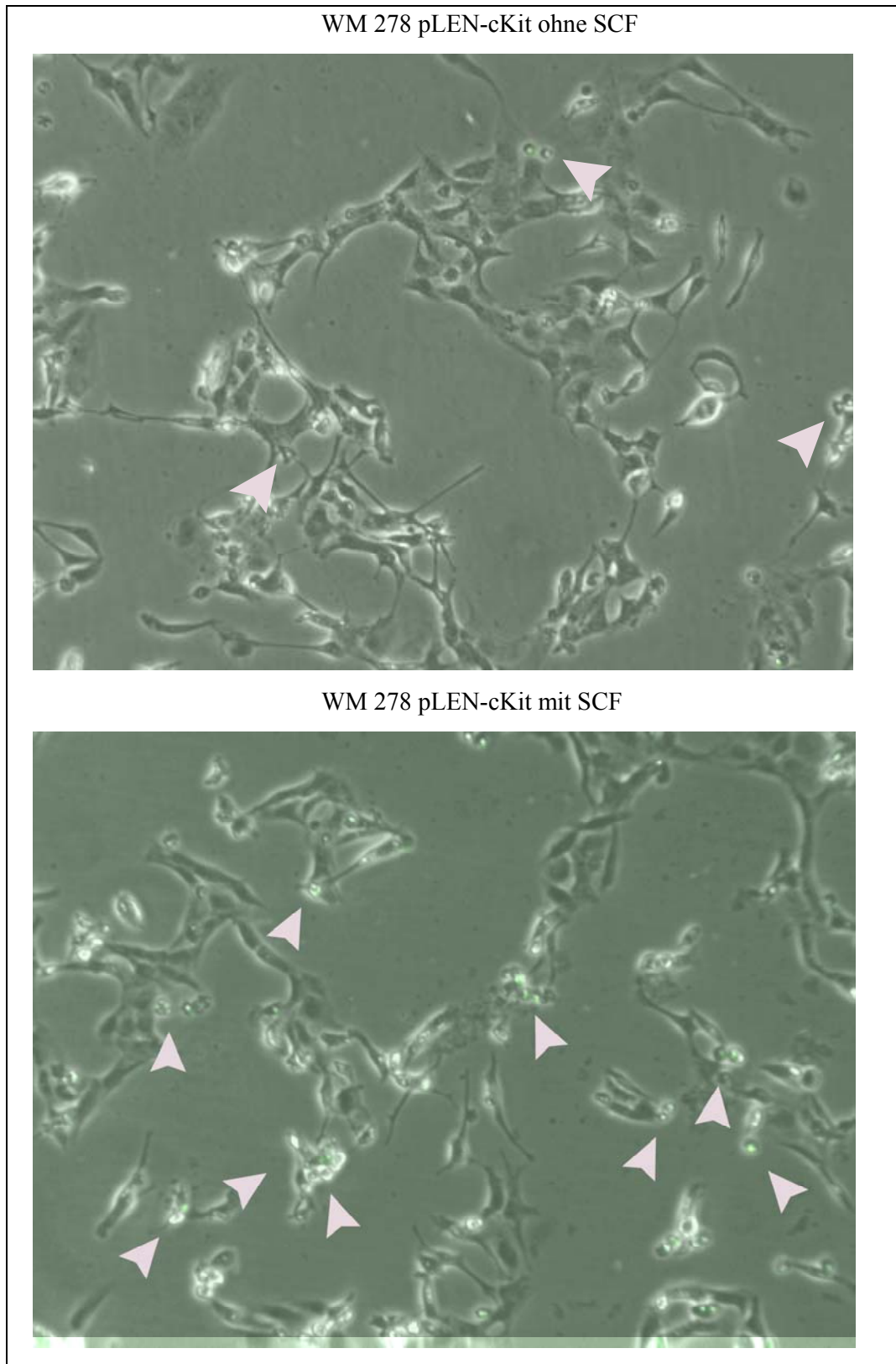


Abb. 6 TUNEL-Assay von WM 278 pLEN-cKit bei Wachstum mit SCF

Die Zellen wurden in einer 12 Loch Platte mit oder ohne SCF inkubiert. Der TUNEL-Assay wurde nach 10 Tagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers ausgeführt.

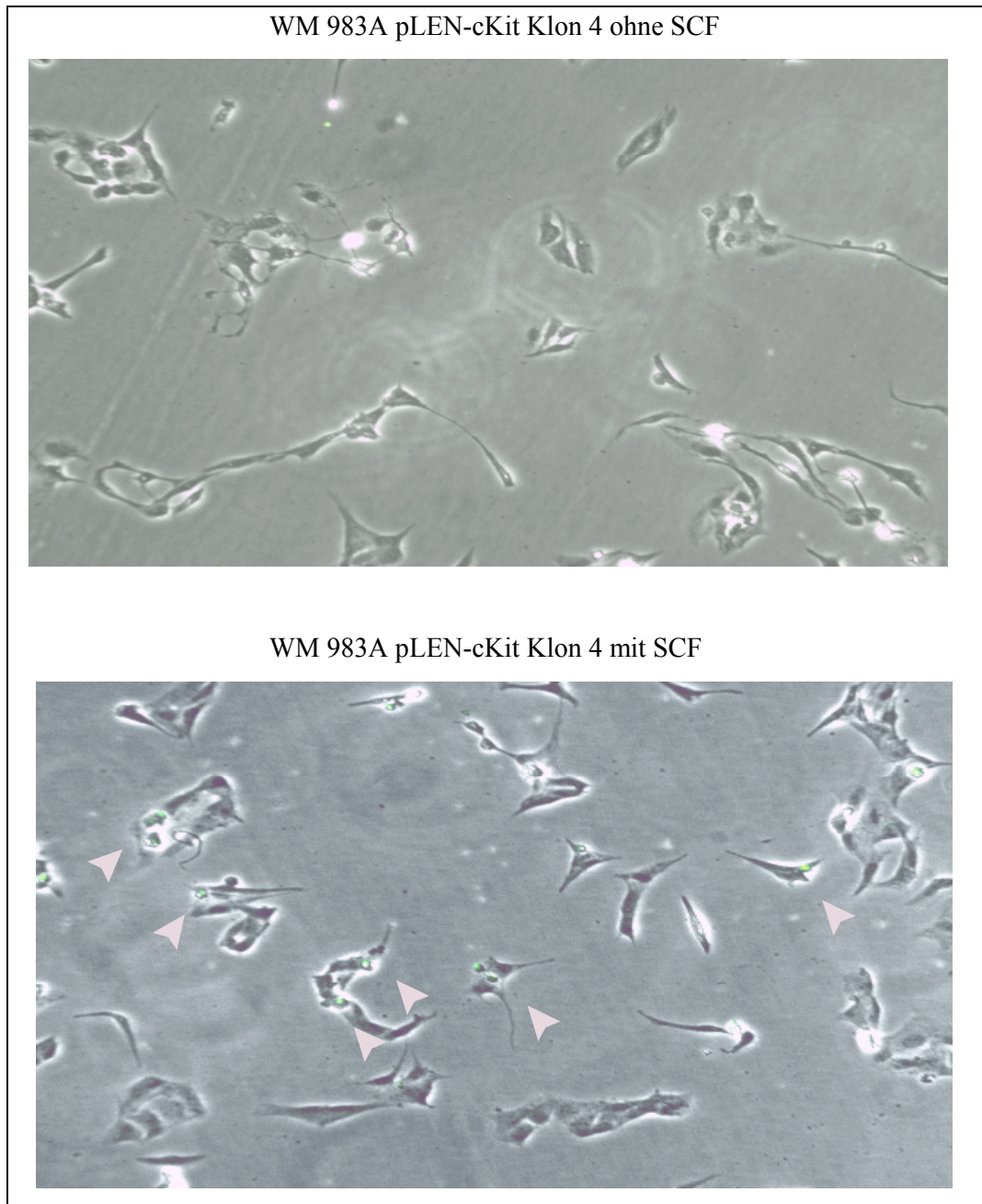


Abb. 7 TUNEL-Assay von WM 983A pLEN-cKit Klon 4 bei Wachstum mit SCF
Die Zellen wurden in einer 12 Loch Platte mit oder ohne SCF inkubiert. Der TUNEL-Assay wurde nach 10 Tagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers ausgeführt.

3.1.4. Ein extrazellulärer Faktor verursacht die Apoptose

3.1.4.1. Mediumwechsel hemmt den Effekt von SCF

Die Wachstumsinhibition von c-Kit exprimierenden Melanomzellen konnte nur beobachtet werden, wenn das Kulturmedium während des MTT-Assays nicht durch frisches Medium ersetzt wurde. Es gibt zwei Erklärungsmöglichkeiten dafür. Entweder führt das Wachstum ohne Mediumwechsel dazu, daß die Zellen empfindlicher gegenüber dem apoptotischen Signal durch SCF werden, weil das verbrauchte Medium weniger Nährstoffe und Wachstumsfaktoren enthält, die antiapoptotisch wirken könnten. Oder die Zellen sezernieren durch die SCF-Stimulation einen Faktor in das Zellkulturmedium, der zum Absterben führt. Bei einem Mediumwechsel würde der Faktor entfernt werden. Zur Unterscheidung dieser Möglichkeiten wurden MTT-Assays durchgeführt mit Mediumwechsel gegen verbrauchtes Medium von gleichzeitig wachsenden nicht stimulierten Zellen. Eine mögliche Sensibilisierung der Zellen gegenüber apoptotischen Signalen durch verringerte Nährstoff- und Wachstumsfaktorkonzentration ist dadurch immer noch gegeben. Dagegen würde die Akkumulation eines toxischen Faktors im Zellkulturüberstand gehemmt.

Auch der Mediumwechsel gegen verbrauchtes Medium führt zu einer starken Hemmung des apoptotischen Effektes von SCF (Abb. 8), was zeigt, daß der apoptotische Effekt von SCF in c-Kit exprimierenden Melanomzellen tatsächlich auf die Akkumulation eines Faktors nach SCF-Stimulation zurückzuführen sein kann.

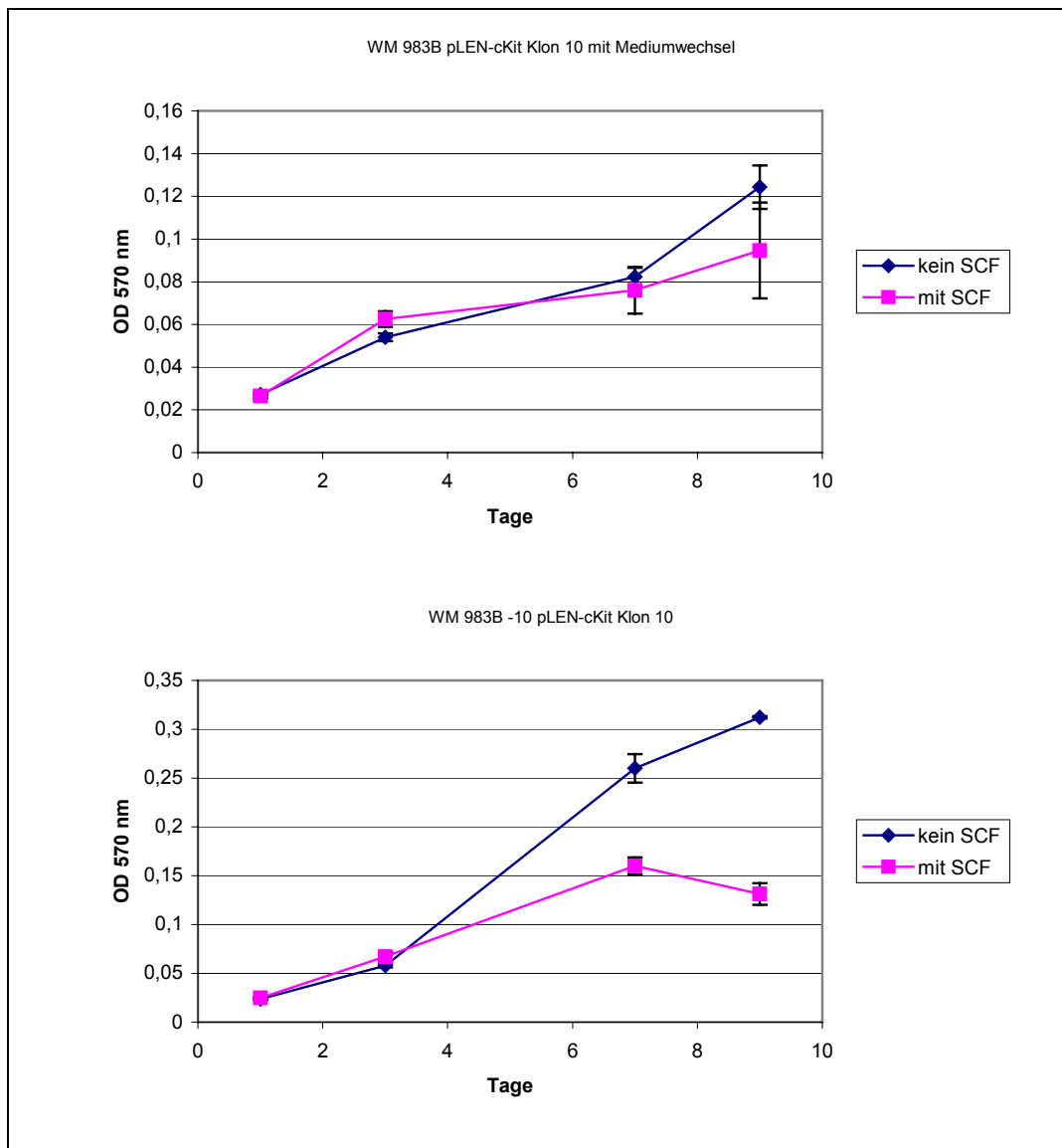


Abb. 8 MTT-Assay mit und ohne Mediumwechsel

An jedem zweiten Tag erfolgte entweder Mediumwechsel gegen verbrauchtes Medium (siehe Text) oder nicht. SCF (1 µg/ml) wurde an den Meßtagen hinzugegeben.

3.1.4.2. SCF-konditionierter Überstand der Melanomzellen ist wachstumshemmend

Wenn nach SCF-Stimulation tatsächlich ein toxischer Faktor von den Zellen sezerniert wird, dann sollte SCF-konditionierter Zellkulturüberstand wachstumshemmend wirken. Um das zu untersuchen wurden Zellen, die nur mit dem Leervektor infiziert wurden, in diesem Überstand wachsen gelassen. Weil diese Zellen keinen c-Kit Rezeptor exprimieren, kann ein möglicher wachstumshemmender

Effekt nur auf einen anderen Faktor als SCF zurückzuführen sein. Als Kontrolle wurde nicht konditionierter Überstand mit SCF versetzt bevor der Überstand auf die Leervektor-infizierten Zellen übertragen wurde.

Nach 4 tägigem Wachstum in dem konditioniertem Überstand wurde eine etwa 25% ige Hemmung des Wachstums festgestellt (Abb. 9).

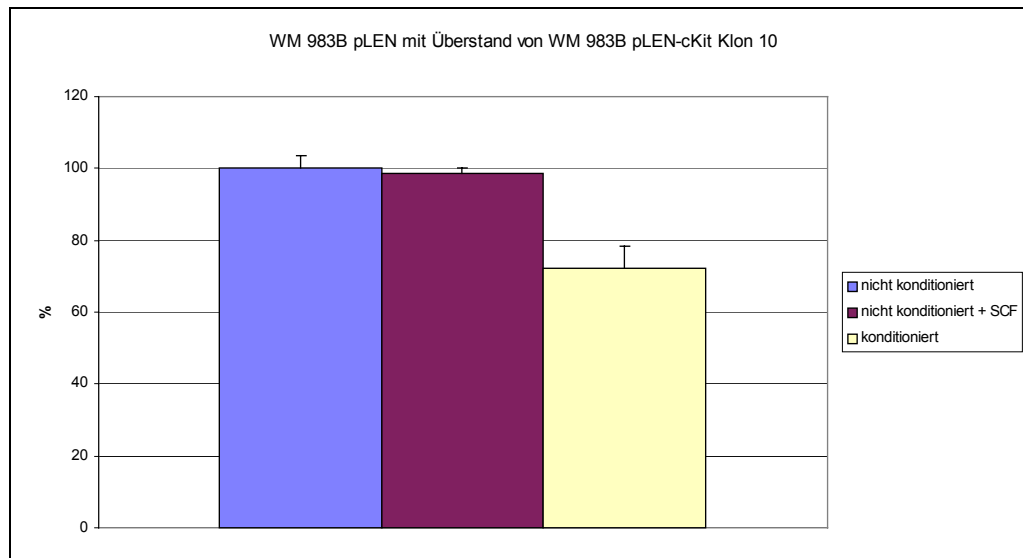


Abb. 9 MTT-Assay von WM 983BpLEN mit SCF-konditioniertem Zellkulturüberstand von WM 983B pLEN-cKit Klon 10

WM 983B pLEN wurde 4 Tage mit SCF-konditioniertem oder nicht konditioniertem Überstand von WM 983B pLEN-cKit Klon 10 inkubiert. Als Kontrolle wurde nicht konditionierter Überstand nach Zugabe zu WM 983B pLEN mit SCF versetzt.

Dies ist der zweite Beweis für die Sekretion eines wachstumshemmenden Faktors nach SCF-Stimulation.

3.1.3. Der zytotoxische Faktor ist keiner der bekannten getesteten Liganden

Als nächstes wurde versucht, die Aktivität im Überstand zu identifizieren. Als Erstes wurde dazu die Empfindlichkeit der Melanomzellen für bekannte zytotoxische Liganden untersucht. Dabei wurden die Melanomzellen unter den selben Bedingungen gehalten wie zur Apoptoseauslösung durch SCF und die entsprechenden Liganden hinzugefügt. Die Liganden gehören zur TNF-Familie wie TNF- α oder Fas-

Ligand oder sind Zytokine, die in Melanomzellen oder anderen Krebszellen apoptotische Wirkung gezeigt haben. Tabelle 1 zeigt die getesteten Zytokine.

| Zytokin | Referenz |
|---|-------------------------|
| | |
| TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) | (Dollbaum et al., 1988) |
| CH-11 aktivierender Antikörper gegen Fas | (Trauth et al., 1989) |
| TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) | (Wiley et al., 1995) |
| INF- α (Interferon- α) | (Rubin and Gupta, 1980) |
| INF- γ (Interferon- γ) | (Rubin and Gupta, 1980) |
| Oncostatin M | (Zarling et al., 1986) |
| TGF- β (Transforming Growth Factor- β) | (Manning et al., 1991) |
| IL-1 (Interleukin-1) | (Hayashi et al., 1997) |

Tabelle 1 Auf Zytotoxizität gegen WM 983B pLEN-cKit Kl. 10 getestete Zytokine

Wie aus den Abbildungen 10 und 11 ersichtlich, wirken alle getesteten Liganden wachstumshemmend, aber keiner der Liganden verursacht trotz sehr hoher Konzentration im Medium ein Absterben der Zellen wie bei der SCF-Stimulation von WM 983B pLEN-cKit Klon 10 (siehe Abb. 4, 8).

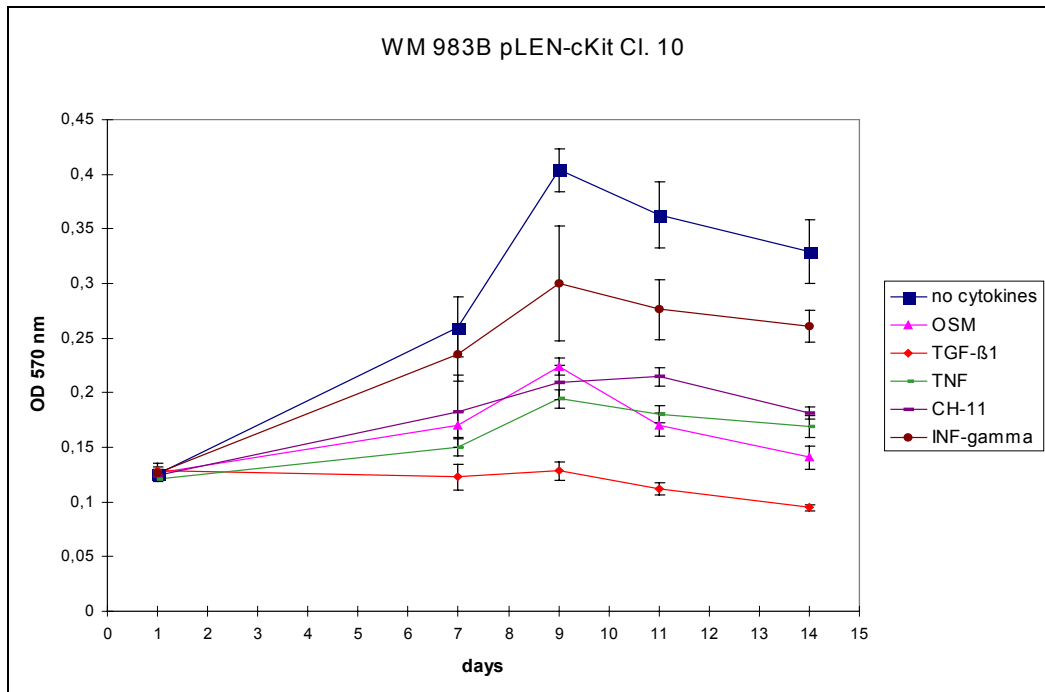


Abb. 10 MTT-Assay von WM 983B pLEN-cKit Klon 10 mit verschiedenen Zytokinen

Die Zellen wurden wie beim Wachstum mit SCF inkubiert, außer daß die Zytokine/Antikörper (100 ng/ml) in PBS oder nur PBS jeden zweiten Tag hinzugegeben wurde

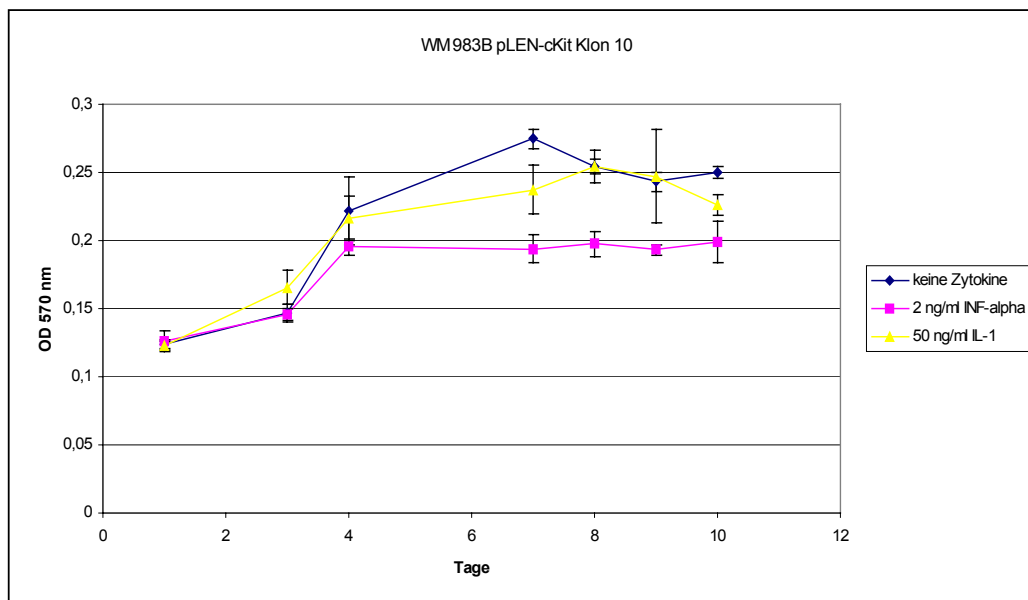


Abb. 11 Effekt von Interferon-α und Interleukin-1 auf das Wachstum von WM 983B pLEN-cKit Klon 10

Die Zellen wurden wie beim Wachstum mit SCF inkubiert, außer daß die Zytokine (100 ng/ml) in PBS oder nur PBS jeden zweiten Tag hinzugegeben wurde

Zur weiteren Kontrolle wurde der SCF-konditionierte Überstand von WM 983B pLEN-cKit Klon 10 auf seine Wirkung gegenüber Jurkat-Zellen getestet. Diese Zelllinie ist empfindlich gegen Fas-Ligand und Trail (Trauth et al., 1989; Wiley et al., 1995). Inkubation mit dem konditionierten Überstand hat dagegen keine Wirkung (Abb. 12).

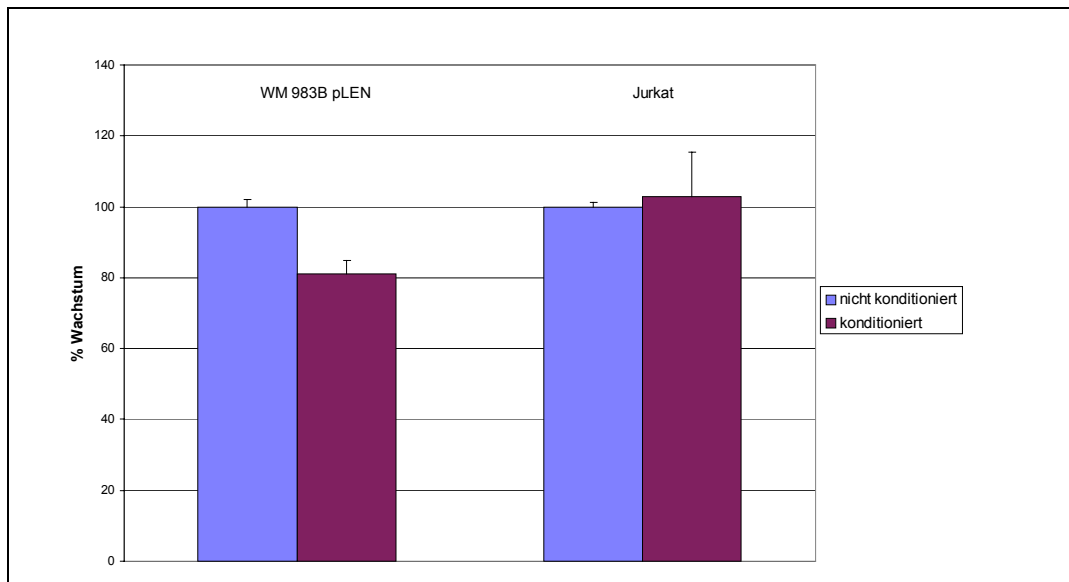


Abb. 12 Inkubation von Jurkat-Zellen mit konditioniertem Überstand von WM 983B pLEN-cKit Klon 10

WM 983B pLEN und Jurkat wurden 4 Tage mit SCF-konditioniertem oder nicht konditioniertem Überstand von WM 983B pLEN-cKit Klon 10 inkubiert. Die Werte wurden als prozentualer Anteil des OD 570 nm bei nicht konditioniertem Überstand ausgedrückt.

Demzufolge ist die sezernierte toxische Aktivität auf keinen der getesteten bekannten Liganden zurückzuführen und es eröffnet sich die Möglichkeit, daß die Stimulation mit SCF einen noch unbekanntem toxischen Liganden freisetzt.

3.1.4. Teilweise Reinigung des zytotoxischen Faktors

3.1.4.1. Gelfiltration des konditionierten Überstandes

Um die Identität des zytotoxischen Faktors zu bestimmen, wurde der Versuch einer Aufreinigung des Faktors unternommen. Zunächst sollte eine grobe Fraktionierung des konditionierten Überstandes so erfolgen, daß zumindestens eine teilweise Reinigung und Konzentration des Faktors erfolgte.

Hierzu wurde der konditionierte Überstand durch Gelfiltration fraktioniert. Da in der Gelfiltration die Substanzen auf Grund ihrer Größe aufgetrennt werden, erhält man schon wichtige Informationen über das Molekulargewicht der gesuchten Aktivität. Außerdem können für eine Gelfiltration die unterschiedlichsten Puffersysteme verwendet werden solange eine Mindest-Salzkonzentration eingehalten wird, die elektrostatische Wechselwirkungen mit der Matrix vermeiden. Aufwendige Umpufferungen, bei denen Protein verloren geht entfallen daher. Wegen der Verdünnung der Probe während einer Gelfiltration mußte der Überstand konzentriert werden. Durch Lyophilisation konnte eine 100 fache Konzentration erreicht werden. Die anschließende Auftrennung von 400 µg Lyophilisat über eine Superdex-75 Säule an einer SMART Anlage (Pharmacia) ergab 50 µl Fraktionen, die weiter getestet wurden. Die Fraktionen wurden mit Zellkulturmedium verdünnt und mit WM 983B pLEN inkubiert. Bereits nach 16 stündiger Inkubation konnten Fraktionen identifiziert werden, die die Zellen vollständig absterben ließen. Damit waren die Fraktionen wesentlich aktiver als der nicht konzentrierte Überstand, der nach 3 Tagen lediglich eine Wachstumsreduktion von 20-30 % verursachte. Die Fraktionen hatten etwa die Retentionszeit eines 14 kDa Proteins (Abb. 13, 14).

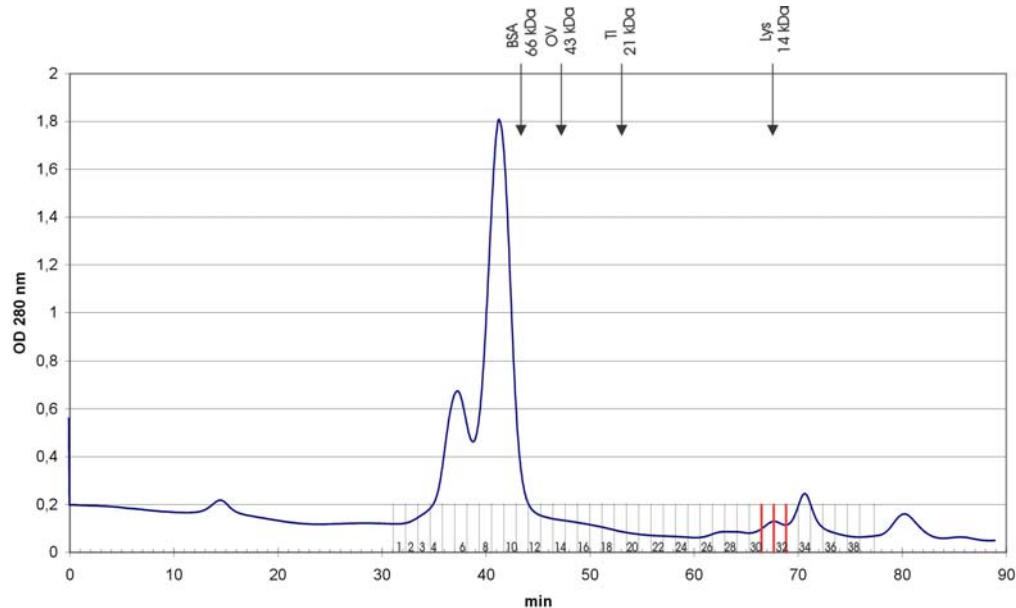


Abb. 13 Gelfiltration des Lyophilisates des konditionierten Überstandes

40 µg Protein in 50 µl (Lyophilisat aufgenommen in ddH₂O) wurden mit einer Flußrate von 40 µl/min über eine Superdex 75 pc3.2, 30 Säule (Amersham-Pharmacia) an einer SMART-Anlage (Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Laufpuffer: PBS, 2mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol; 50 µl Fraktionen. Die Pfeile kennzeichnen die Retentionsvolumen der Markerproteine

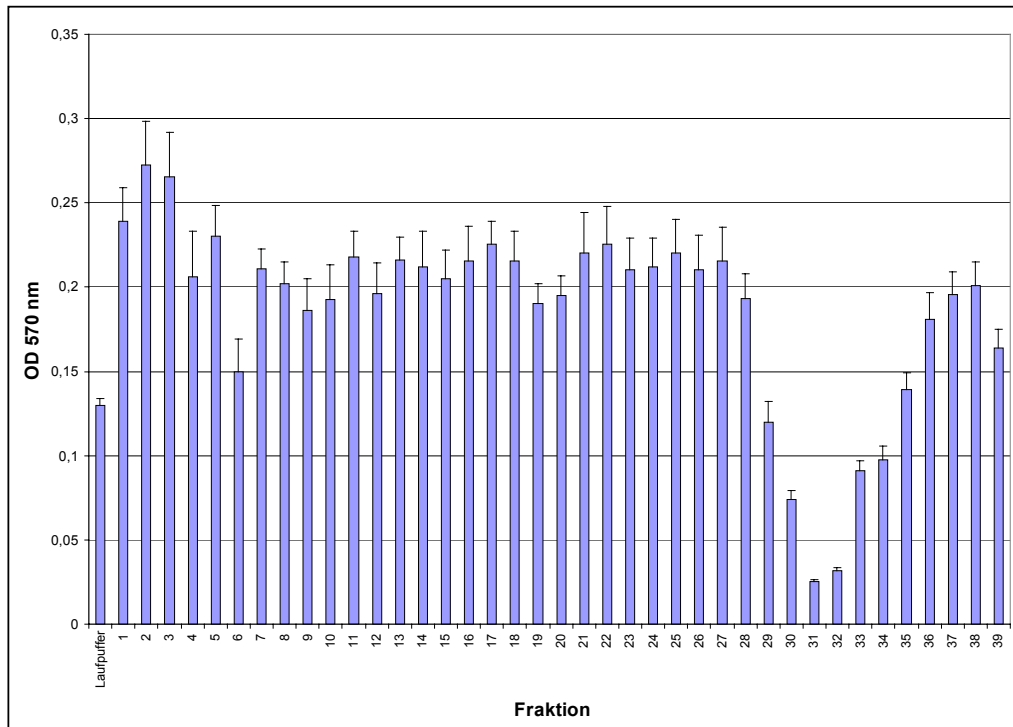


Abb. 14 Test der Fraktionen der Gelfiltration auf zytotoxische Effekte

50 μ l der entsprechenden Fraktionen der Gelfiltration wurden mit 200 μ l RPMI mit 0.5% FCS verdünnt. Jeweils 50 μ l wurden zu 4 Löchern einer 96 Loch Platte mit WM 983B pLEN gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein MTT-Assay ausgeführt.

Um eine größere Menge des Faktors aufzureinigen als es durch die 2.4 ml SMART-Säule möglich ist, wurde konditionierter Überstand über eine 120 ml Superdex-75 Säule an einer FPLC-Anlage (Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Das Ergebnis war das Gleiche wie bei der kleineren SMART-Säule. Fraktionen bei einem Molekulargewicht von 14 kDa wirkten zytotoxisch (Abb. 15, 16). Gleichzeitig mit dem konditionierten Überstand wurde nicht konditionierter Überstand aufbereitet. Hier konnte keine zytotoxische Aktivität festgestellt werden, was zeigt, daß die Aktivität durch die SCF-Stimulation induziert wurde (Daten nicht gezeigt).

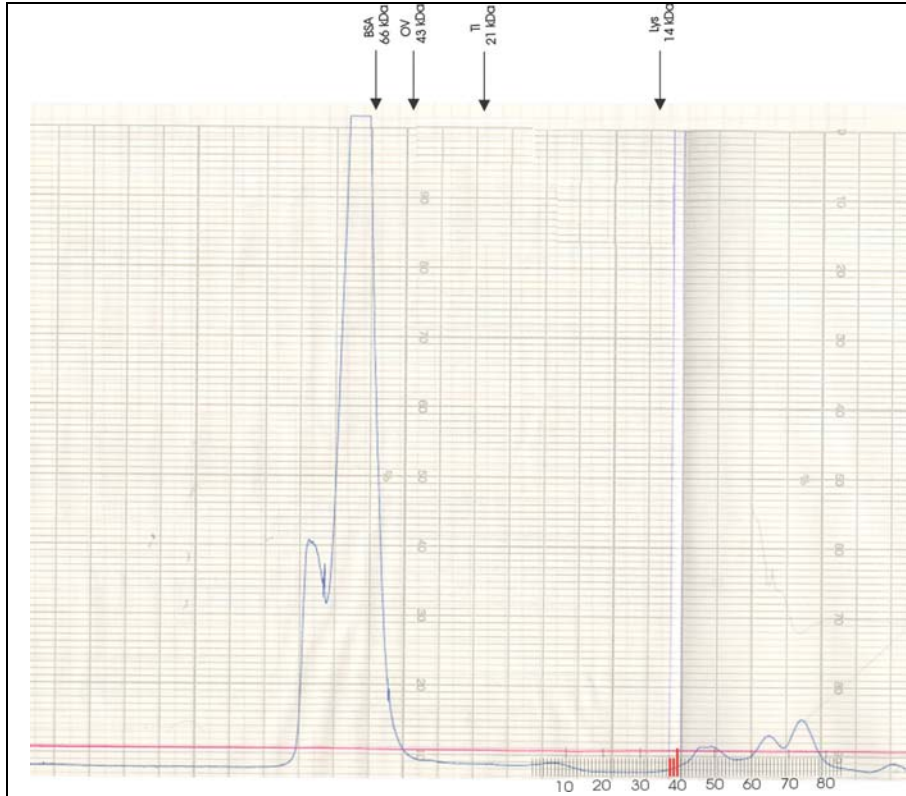


Abb. 15 Fraktionierung des konditionierten Überstandes über eine 115 ml Gelfiltrationssäule

20 mg Protein in 300 μ l (Lyophilisat aufgenommen in ddH₂O) wurden mit einer Flußrate von 0.5 ml/min über eine Superdex 75 Säule (selbst gepackt) an einer FPLC-Anlage (Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Laufpuffer: PBS, 2mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol; 500 μ l Fraktionen. Die Pfeile kennzeichnen die Retentionsvolumen der Markerproteine.

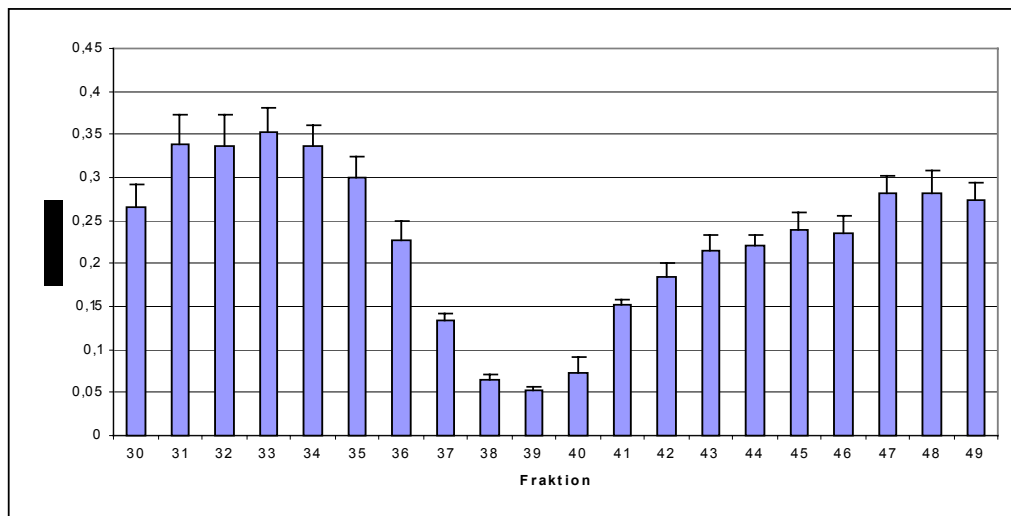


Abb. 16 Aktivitätstest der Fraktionen der Gelfiltration

50 μ l der entsprechenden Fraktionen der Gelfiltration wurden mit 200 μ l RPMI mit 0.5% FCS verdünnt. Jeweils 50 μ l wurden zu 4 Löchern einer 96 Loch Platte mit WM 983B pLEN gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein MTT-Assay ausgeführt.

3.1.4.2. Die zytotoxische Fraktion wirkt apoptotisch

Zum Nachweis, daß die zytotoxische Fraktion wie erwartet apoptotisch wirkt, wurde wiederum ein TUNEL-Assay ausgeführt. Dieser Assay war positiv. Die zytotoxische Fraktion löst Apoptose aus (Abb. 17).

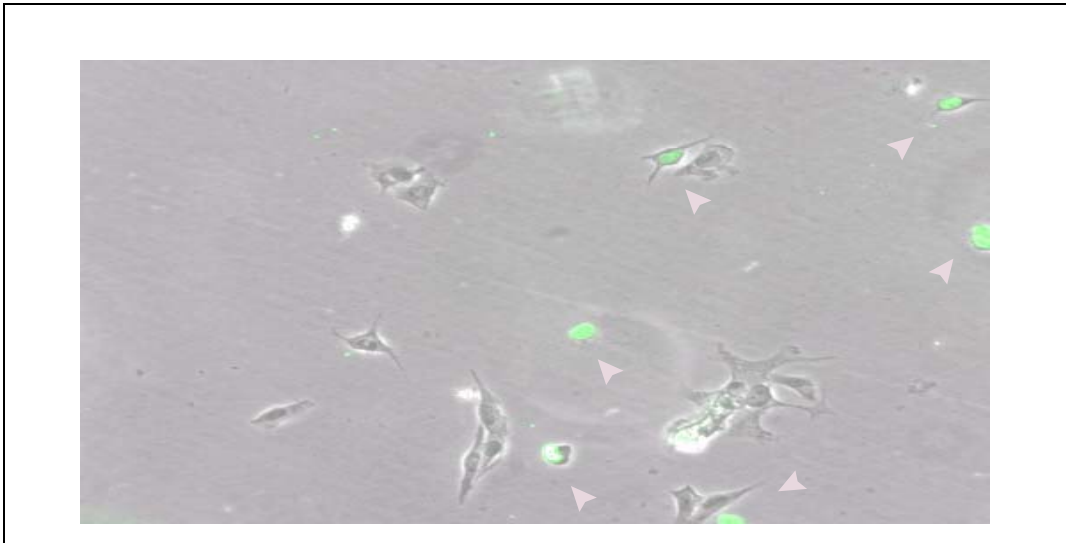


Abb. 17 TUNEL-Assay nach Zugabe der zytotoxischen Fraktion

WM 983B pLEN wurden über Nacht mit einer 1:10 Verdünnung der apoptotischen Fraktion in 0.5% RPMI inkubiert. Am nächsten Tag wurde der TUNEL-Assay entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche-Boehringer) ausgeführt.

3.1.4.3. Die apoptotische Fraktion wirkt kaum bei Melanozyten

Bei einem Schutzmechanismus gegen die Transformation von Melanozyten durch Sekretion eines apoptotischen Faktors in der Haut sind zwei Möglichkeiten denkbar. Entweder würden entartete Melanozyten in der Haut den Faktor nach SCF-Stimulation sekretieren und sich damit selber töten. Oder Melanozyten bilden den Faktor nach SCF-Stimulation in der Haut konstitutiv und entartete Melanozyten werden dadurch abgetötet. Die Reexpression von c-Kit in Melanomzellen würde dann die normalen Signalwege von c-Kit, wie sie in Melanozyten vorkommen, wiederherstellen. Um selektiv nur die transformierten Zellen abzutöten, müßten bei beiden Möglichkeiten normale Melanozyten resistent gegenüber dem Faktor sein.

Die Empfindlichkeit von Melanozyten gegen die apoptotische Fraktion wurde überprüft. Wie aus Abbildung 18 zu ersehen ist, sind Melanozyten kaum empfindlich gegen die Fraktion während die Melanomzellen fast vollständig gestorben sind.

Damit eröffnet sich tatsächlich die Möglichkeit, daß der gesuchte Faktor ein neuer Ligand ist. Denn nur einer der laut Literatur getesteten Liganden besitzt eine annähernd so starke Aktivität wie die hier gereinigte Fraktion und tötet selektiv nur die transformierten Zellen und nicht die normalen untransformierten. Der einzige bisher bekannte Faktor mit diesen Eigenschaften ist der Ligand der TNF-Familie TRAIL. Dieser Ligand wurde aber als Ursache für die Wachstumshemmung durch den konditionierten Überstand ausgeschlossen (s. Abb. 12).

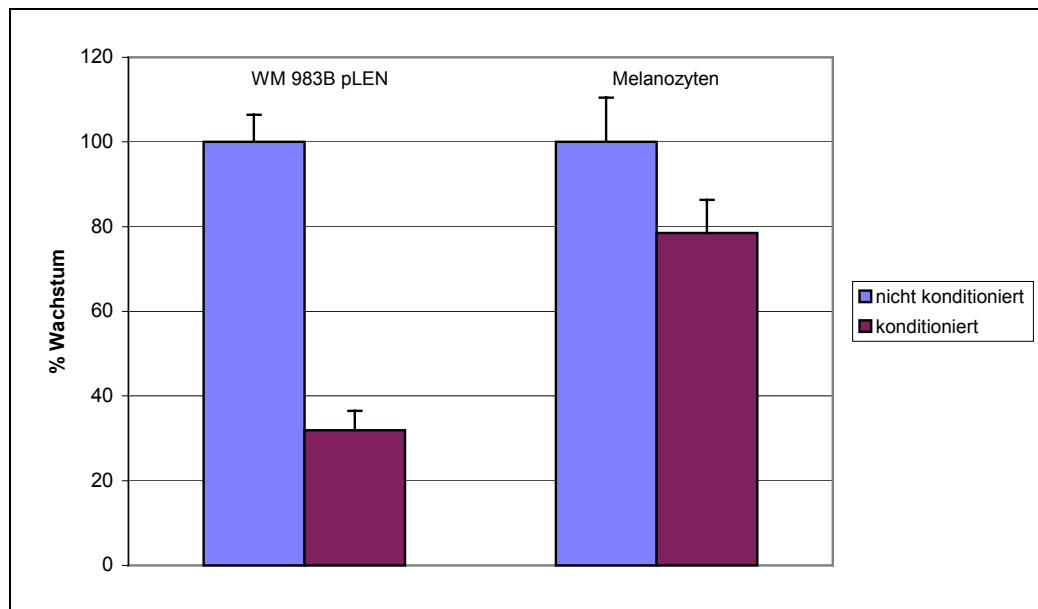


Abb. 18 Empfindlichkeit von Melanozyten gegenüber der apoptotischen Fraktion

Melanozyten oder WM 983B pLEN wurden mit einer 1:4 Verdünnung der apoptotischen Fraktion in Medium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein MTT-Assay ausgeführt. Die Werte wurden als prozentualer Anteil des OD 570 nm bei nicht konditioniertem Überstand ausgedrückt.

3.1.4.4. Die zytotoxische Fraktion ist gereinigt aktiver als ungereinigt

Es stellt sich die Frage, warum die apoptotische Fraktion nach der Reinigung durch die Gelfiltration so viel aktiver ist als der konditionierte Überstand. Zwei Möglichkeiten sind denkbar. Entweder die erhöhte Konzentration des apoptotischen Proteins bewirkt die verstärkte Aktivität oder die Aufreinigung entfernt hemmende Aktivitäten. Zur Klärung dieser Frage wurde die apoptotische Fraktion so verdünnt, daß die Konzentration in der höchsten Verdünnungsstufe geringer war als im unbehandelten konditionierten Überstand.

Die Lyophilisation und anschließende Aufnahme in Puffer bewirkte eine 100fache Konzentration des konditionierten Überstandes. Diese Konzentration sank in der apoptotischen Fraktion durch die Verdünnung während der Gelfiltration auf das 18fache (260 µl aufgelöstes Lyophilisat ergaben 2 ml apoptotische Fraktion). Durch weitere Verdünnung mit Zellkulturmedium wurde die Konzentration bis etwa auf ein Viertel der ursprünglichen Konzentration im Überstand erniedrigt. Die auf die Konzentration im Ausgangsüberstand zurückverdünnte Fraktion zeigte mit einer 60%igen Reduktion des Wachstums nach einer Inkubation über Nacht eine wesentlich stärkere Aktivität als der konditionierte Überstand, der eine Wachstumsreduktion von 20-30% nach einer 4 tägigen Inkubation aufwies. Wie aus Abbildung 20 zu ersehen ist, bewirkt die Fraktion selbst bei einem Viertel der Konzentration, die im konditionierten Überstand vorkam, diese Wachstumsreduktion von 30%. Damit ist die Fraktion bei dieser Verdünnung immer noch aktiver als der nicht gereinigte Überstand, da der Effekt schon bei einer über Nacht Inkubation eintritt.

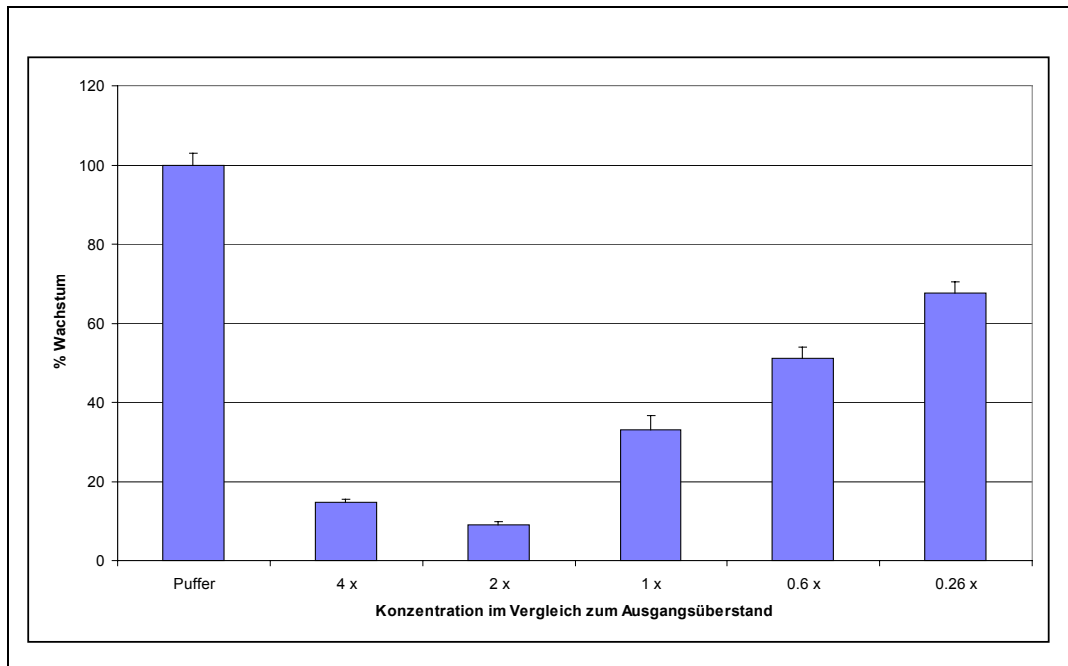


Abb. 20 Verdünnung der apoptotischen Fraktion

Die vereinigten apoptotischen Fraktionen wurden mit RPMI mit 0.5% FCS verdünnt, so daß sich die entsprechenden Konzentrationsfaktoren im Vergleich mit konditioniertem Ausgangsüberstand ergaben. WM 983B pLEN wurde mit den Verdünnungen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein MTT-Assay ausgeführt. Alle Werte sind als prozentuale Anteile der Kontrolle (Verdünnung mit Laufpuffer) angegeben.

Die verstärkte Aktivität der apoptotischen Fraktion ist demzufolge ein Ergebnis der Aufreinigung und nicht der Konzentrationssteigerung. Deshalb könnte die Aktivitätssteigerung wirklich auf den erhöhten Reinheitsgrad zurückzuführen sein.

3.1.4.5. SDS-Polyacrylamidgelanalyse der apoptotischen Fraktion

Um Proteine in der apoptotischen Fraktion zu detektieren wurde die Fraktion durch ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch eine Silberfärbung angefärbt. Da keine Banden zu sehen waren, wurde die apoptotische Fraktion konzentriert. Weil die Aufkonzentration der Salze im PBS-Laufpuffer der apoptotischen Fraktion die SDS-PAGE gestört hätte, mußte die Fraktion zuerst entsalzt werden. Das geschah durch Adsorption an eine Reversed Phase SMART-Säule. Anschließende Elution des Protein Peaks mit Azetonitril ermöglichte ein Eindampfen der Probe ohne daß Salze mitkonzentriert wurden. Die gleichen nicht-apoptotischen Fraktionen der Gelfiltration des nicht-konditionierten Überstandes wurden ebenso behandelt, um sie mit der apoptotischen Fraktion zu vergleichen.

Proteine, die nur in der apoptotischen Fraktion zu finden waren, könnten durch die SCF-Stimulation induziert worden sein und wären somit Kandidaten für den gesuchten Liganden.

Abbildung 21 zeigt die Auftrennung der Fraktionen durch ein SDS-Polyacrylamidgel. Zur Abschätzung der Proteinmenge wurden bekannte Mengen von Lysozym aufgetragen, die mit den Proteinmengen in den Fraktionen verglichen werden können. Während in der nicht-apoptotischen Fraktion kein Protein detektiert werden konnte, befinden sich in der apoptotischen Fraktion drei Banden bei etwa 50 kDa, 14 kDa und eine noch kleinere Bande auf Höhe der Lauffront. Neben einem Protein von 14 kDa gibt es also noch zwei weitere Kandidaten für den gesuchten Liganden. Für das Trennverhalten von Proteinen in einer Gelfiltration ist deren Umfang entscheidend. Kleine kompakte Moleküle diffundieren besser in die Poren der Gelfiltrationsmatrix als große. Der Umfang eines Proteins korreliert oft mit seinem Molekulargewicht, es gibt aber auch Abweichungen von dieser Regel. So ist zu erklären, daß in dieser Fraktion, die nur etwa 14 kDa große Proteine enthalten sollte, auch ein Protein von rund 50 kDa gefunden wird. Das Verhalten dieses Proteins in der Gelfiltration korreliert nicht mit seinem Molekulargewicht.

Zur Identifizierung durch Ansequenzieren benötigt man wenigstens 80 ng des Proteins. Da keine der Banden mehr als 10 ng Protein enthält, war eine Identifikation durch Sequenzierung aber nicht möglich.

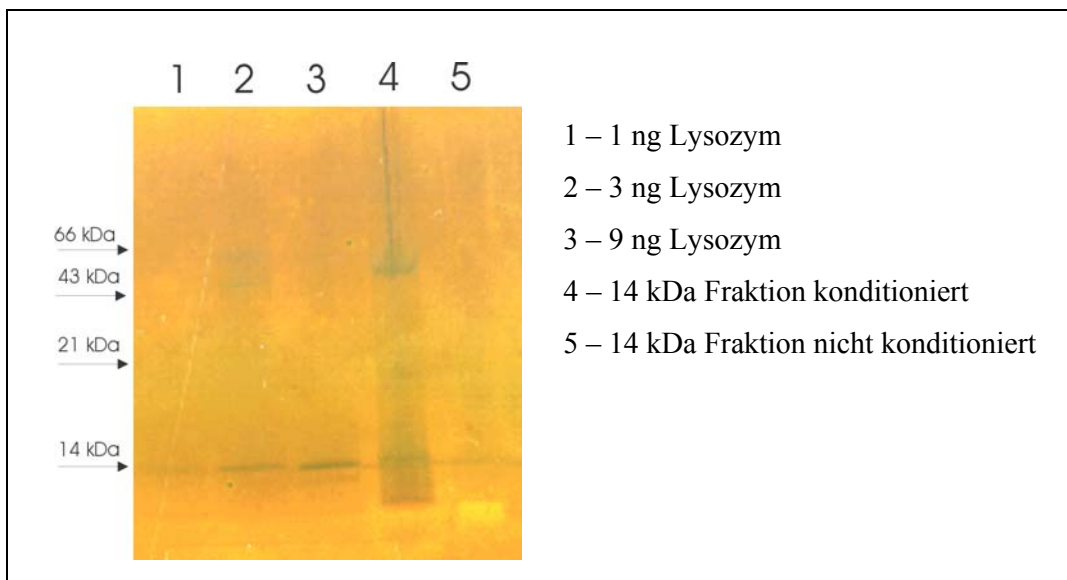


Abb. 21 SDS-Polyacrylamidgel der 14 kDa Fraktionen aus konditioniertem und nicht konditioniertem Überstand

Die Auftrennung und Färbung erfolgte in einem PHAST-Gel-System (Amersham-Pharmacia).

3.1.4.6. Weitere Reinigungsschritte

Die Fraktionierung des konditionierten Überstandes war nur schlecht reproduzierbar, weil meistens nach der Gelfiltration keine Aktivität mehr in den Fraktionen feststellbar war. Eine Reproduktion der Ergebnisse gelang zwar einige Male, doch nur etwa einer von 8 Versuchen war erfolgreich. Höchstwahrscheinlich ist die unter 2.1.4.4. genannte Aktivitätssteigerung durch die Lyophilisation eine Bedingung, die nur schlecht zu kontrollieren war. Aus diesem Grund wurden noch andere Arten der Aufkonzentration des Überstandes getestet.

Beispielsweise wurde der Überstand durch Ultrafiltration eingengt. In diesem Fall wurde Serum-freies Zellkulturmedium verwendet, um auch auszuschließen, daß der Effekt der apoptotischen Fraktion auf einem Protein aus dem FCS beruhte. Durch eine siebzehnfache Konzentration mit einer Filtrationsgrenze von 3 kDa konnte die Aktivität des Überstandes beträchtlich gesteigert werden. Die Wachstumshemmung betrug jetzt 60 % gegenüber etwa 20% des nicht konzentrierten Überstandes. Um sicherzustellen, daß der Effekt nicht auf der verstärkten Konzentration des SCF im konditionierten Überstand beruht, wurde zu dem nicht konditionierten Überstand vor der Konzentration SCF hinzugegeben (Abb. 22).

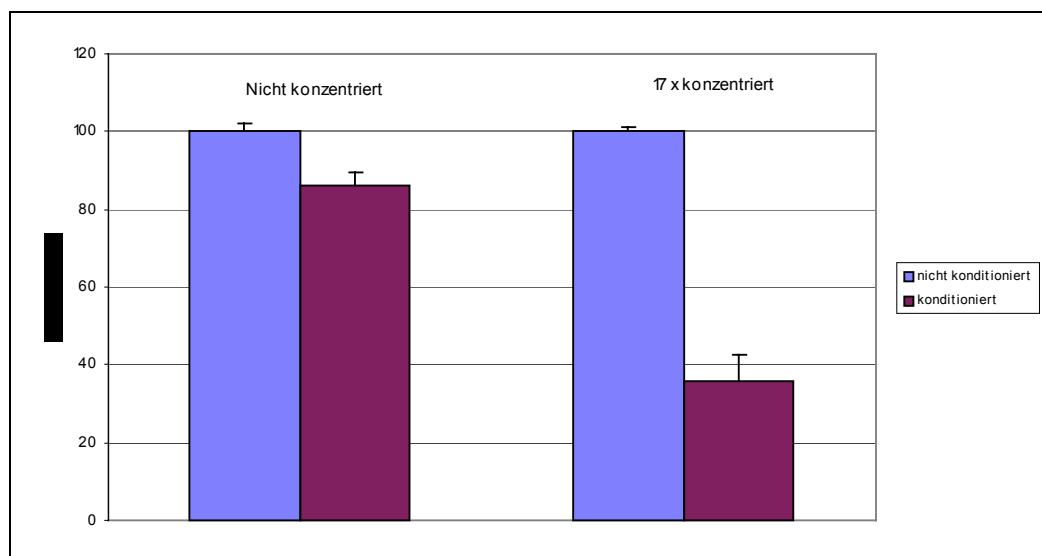


Abb. 22 Effekt des konzentrierten Überstandes

Jeweils 200 ml konditionierter und nicht konditionierter Überstand von serumfreiem Zellkulturmedium wurde in einer Rührzelle (Amersham-Pharmacia) mit einer Membran mit 3 kDa Ausschlußgrenze auf 12 ml eingengt. Der eingengte Überstand wurde mit WM 983B pLEN für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurde ein MTT-Assay ausgeführt.

Dieser Versuch zeigt noch stärker als die 20-30%ige Wachstumshemmung des nicht konditionierten Überstandes das Vorhandensein eines zytotoxischen Faktors in dem SCF-konditionierten Überstand und daß dieser Faktor größer als 3 kDa sein muß. Die teilweise Reinigung des so konzentrierten Überstandes durch eine anschließende Gelfiltration ergab aber keine Aktivität in den gesammelten Fraktionen.

Weiterhin wurde durch Ionenaustauschchromatographie versucht, die Proteine im Überstand zuerst an den Ionenaustauscher (sowohl Anionen-als auch Kationenaustauscher) zu binden und dann durch einen steilen Salzgradienten so zu eluieren, daß eine etwa 10fache Konzentration der Proteine erfolgte. Der so erhaltenene Protein-Peak wirkte aber ebenso wenig wachstumshemmend wie die Fraktionen, die durch eine weitere Auftrennung dieses Proteingemisches durch Gelfiltration gewonnen wurden.

Auch durch Reversed Phase Chromatographie wurden die Proteine aufkonzentriert und vor und nach weiterer Auftrennung durch Gelfiltration erfolglos auf wachstumshemmende Aktivität getestet. Bei Reversed Phase Chromatographie verändert sich allerdings durch die hydrophobe Wechselwirkung mit der Säule die Sekundärstruktur von Proteinen. Bei kleinen Proteinen wie einem 14 kDa Protein besteht aber die Möglichkeit, daß das Protein durch Renaturierung wieder seine aktive Form annimmt.

Desweiteren wurde versucht, Glykoproteine durch Adsorption an Lektin aufzukonzentrieren. Viele bekannte Liganden sind glykosyliert, und es ist deshalb wahrscheinlich, daß auch der gesuchte Ligand ein Glykoprotein ist. Es war aber in diesem Fall nicht möglich die gebundenen Proteine in nativer Form mittels N-Acetylglukosamin, das auch an das Lektin binden sollte und somit um Bindungsplätze kompetiert, von der Säule zu eluieren.

Oben genannte Methoden wurden auch als weitere Reinigungsschritte verwendet, um die apoptotische Fraktion weiter zu reinigen wenn die Lyophilisation und anschließende Gelfiltration erfolgreich war. Nach keinem weiteren Reinigungsschritt konnte aber die Aktivität erhalten bleiben.

Auch Anwendung der eben genannten Reinigungsmethoden als ersten Schritt in einem Reinigungsprotokoll schlug fehl. Die Aktivität des Überstandes konnte nicht in den Fraktionen wiedergefunden werden.

Da jeder Reinigungsschritt in jedem Fall ein Verlust an Aktitiät des zu reinigenden Proteins mit sich bringt, muß die Anfangskonzentration des Proteins relativ hoch sein.

Im vorliegenden Fall wurden aber jeweils nur maximal 200 ml konditionierter Überstand eingesetzt weil bei Einsatz von nur 50 ml und Konzentration durch Lyophilisation die gewünschte apoptotische Fraktion erhalten wurde. Angesichts der Tatsache, daß Liganden in physiologischen Konzentrationen von nur 1-20 ng pro ml vorliegen, erwies sich die eingesetzte Menge im Nachhinein als zu gering, um nach den Reinigungsschritten noch eine Aktivität vorzufinden. Wegen dieser Schwierigkeiten konnte der vermutete neue apoptotische Ligand deshalb nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit identifiziert werden.

3.2. Identifizierung antiapoptotischer Signalwege in Krebszellen durch funktionelle Expressionsanalyse

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen in Krebszellen ist die Untersuchung der Expression von Genen in Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Apoptose unterscheiden. Die veränderte Expression einzelner Gene oder Gengruppen kann zur Apoptoseresistenz beitragen und damit auch bei der Tumorigenese eine wichtige Rolle spielen.

Durch den Einsatz von cDNA-arrays ist es möglich die Expression vieler hunderter oder tausender Gene gleichzeitig zu untersuchen. Durch die Analyse von Krebszellen, die hinsichtlich ihrer Apoptoseresistenz selektioniert wurden, sollten so Gene identifiziert werden, die Apoptose regulieren. Abbildung 23 zeigt die Strategie zur Identifizierung dieser Gene. Krebszellen wurden einer Selektion auf Apoptoseresistenz unterworfen. Auch im Organismus sind Krebszellen einer solchen Selektion unterworfen (siehe 1.4.2.1.), so daß man hier von einer *in vitro* Evolution eines Tumors sprechen kann. Die selektionierten Zellen sollten resistenter gegen Apoptose sein. Anschließend können die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Apoptose resistenten Zellen und der Ausgangszelle mittels cDNA-Array Analyse ermittelt werden.

Als Modell wurde die Cervix Karzinom Zelllinie Hela S3 verwendet. Diese Zelllinie ist ein Klon der bekannten Hela Zelllinie, der besonders gut Tumore in Nacktmäusen bildet. Trotzdem die Zellen eines Klons identisch sein sollten, kann man annehmen, daß sich während der langen Kultur die genetisch instabilen Tumorzellen verändert haben. Aus diesem Grund kann es innerhalb der Hela S3 Zellpopulation einzelne Zellen geben, die resistenter gegen Apoptose sind als die überwiegende Mehrheit der Zellen.

Die Hela S3 Zellen wurden auf Apoptose-Resistenz selektioniert, in dem sie mit dem Antikörper CH-11, der den Fas-Rezeptor erkennt und aktiviert, inkubiert wurden. Dies geschah ohne Serum im Zellkulturmedium, weil Serum die CH-11 induzierte Apoptose in Hela S3 Zellen hemmt. Einige wenige Zellen überlebten und waren deshalb resistenter gegen Fas-vermittelte Apoptose. Zu diesem Zeitpunkt wurde CH-11 entfernt und die Zellen in normalem Medium mit Serum wachsen gelassen. Die

vereinzelt Zellen wuchsen zu Klonen aus, die anschließend weiter untersucht wurden.

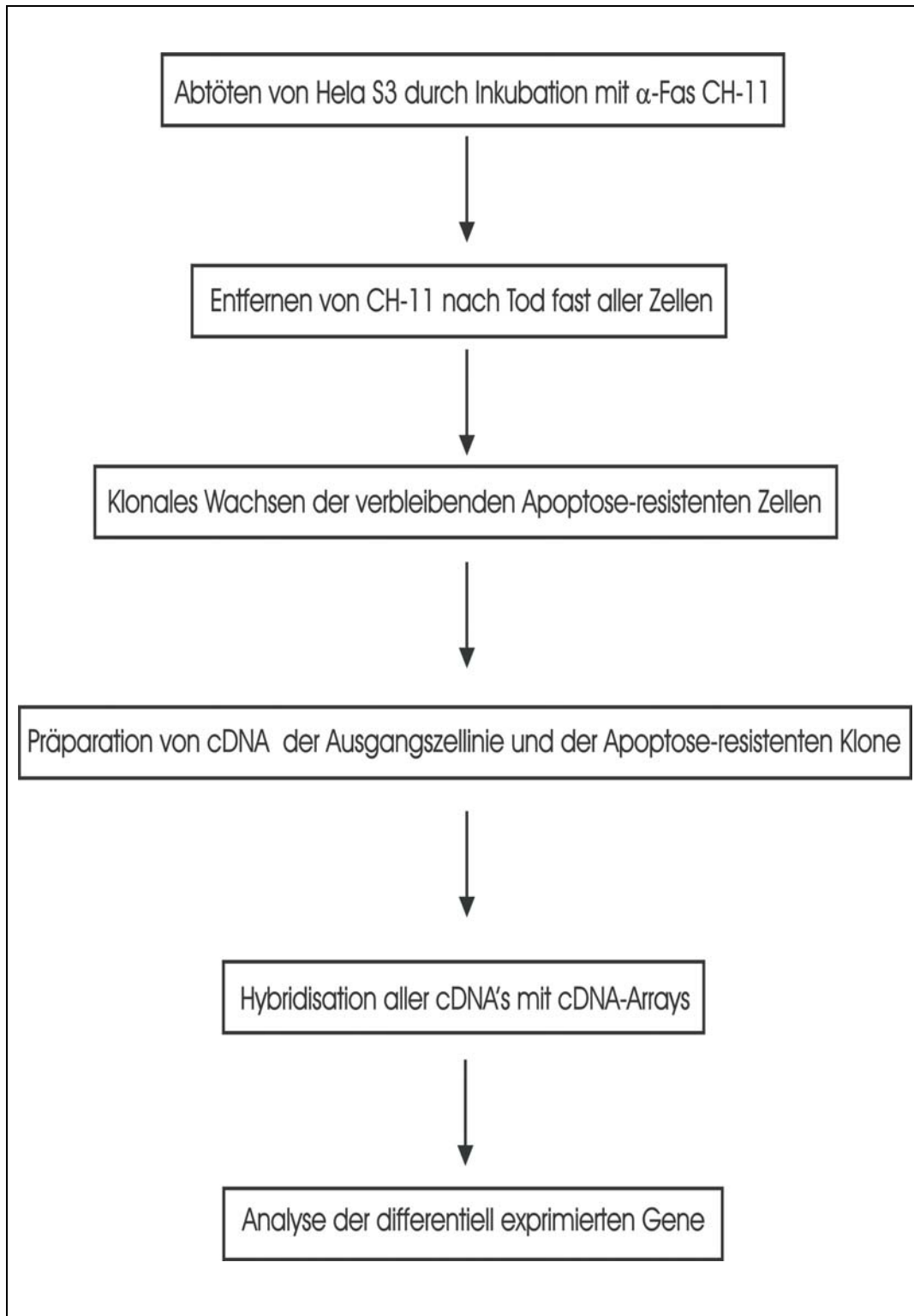


Abb. 23 Strategie zur Erkennung antiapoptotischer Signalwege in Krebszellen

3.2.1. Apoptoseempfindlichkeit der Zellen

Die Klone unterschieden sich morphologisch kaum von der Ausgangszelllinie HeLa S3 (Daten nicht gezeigt). Nach der Selektion mußte zuerst festgestellt werden, ob die Klone wirklich unempfindlicher gegen Apoptose sind als die Ausgangszelllinie. Als quantitativer Apoptoseassay wurde die DNA-Fragmentierung mit Hilfe von Durchflußzytometrie gemessen. Dabei wird der DNA-Gehalt der Zellkerne untersucht. Die fragmentierte DNA wird während der Aufarbeitung aus dem Kern extrahiert, so daß apoptotische Zellkerne einen geringeren DNA-Gehalt haben als die Kerne in der G1/G0 Phase des Zellzyklus. Der Anteil der apoptotischen Kerne kann als Anteil der Gesamtpopulation mit dem Zytometer deshalb leicht bestimmt werden, wobei mit Hilfe des Computerprogramms zur Steuerung des Zytometers (CellQuest, BD Biosciences) die Anzahl der Zellkerne einer bestimmten Fluoreszenz in einem definierten Bereich des Histogramms (M1 - der Sub G1/G0 Peak) bestimmt wurde (Abb. 24).

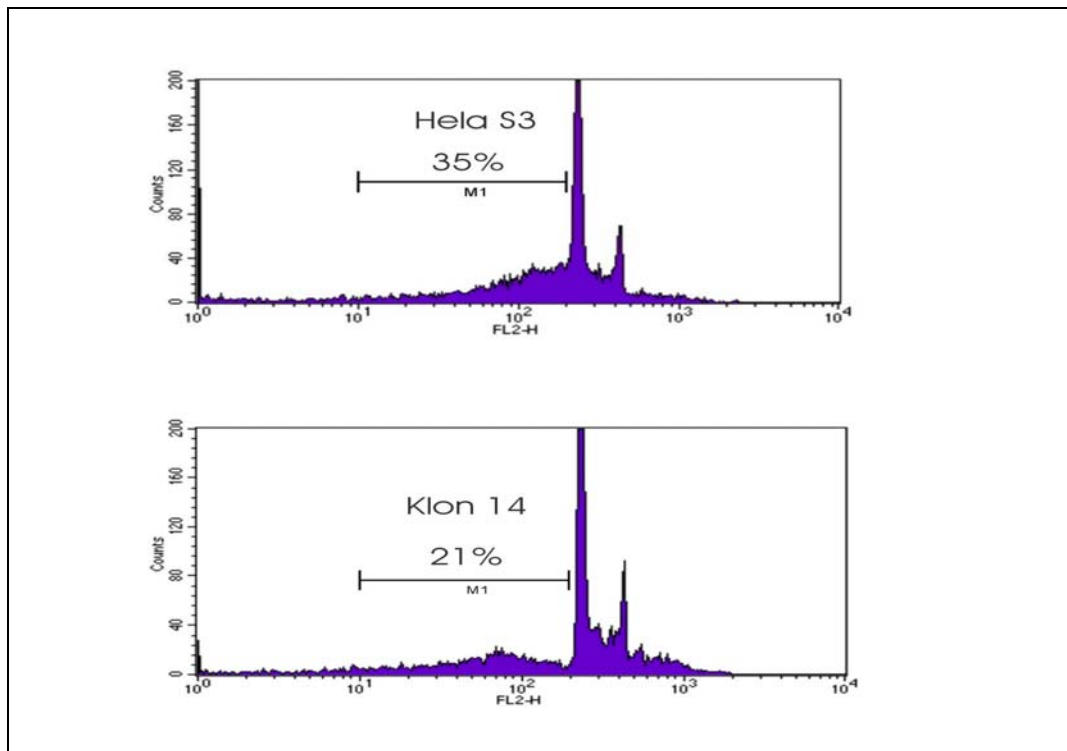


Abb. 24 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Die Zellkerne wurden in einem hypotonischen Puffer mit Propidiumiodid gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels eines FacsCalibur (BD Biosciences) Durchflußzytometers. Anregung durch 488 nM Argon Laser, Detektion über einen 585 nm Bandpassfilter

Wie aus Abbildung 25 zu ersehen, sind alle Klone resistenter gegen CH-11 induzierte Apoptose als die Ausgangszelllinie, wobei das Ausmaß der Resistenz der Klone unterschiedlich ist.

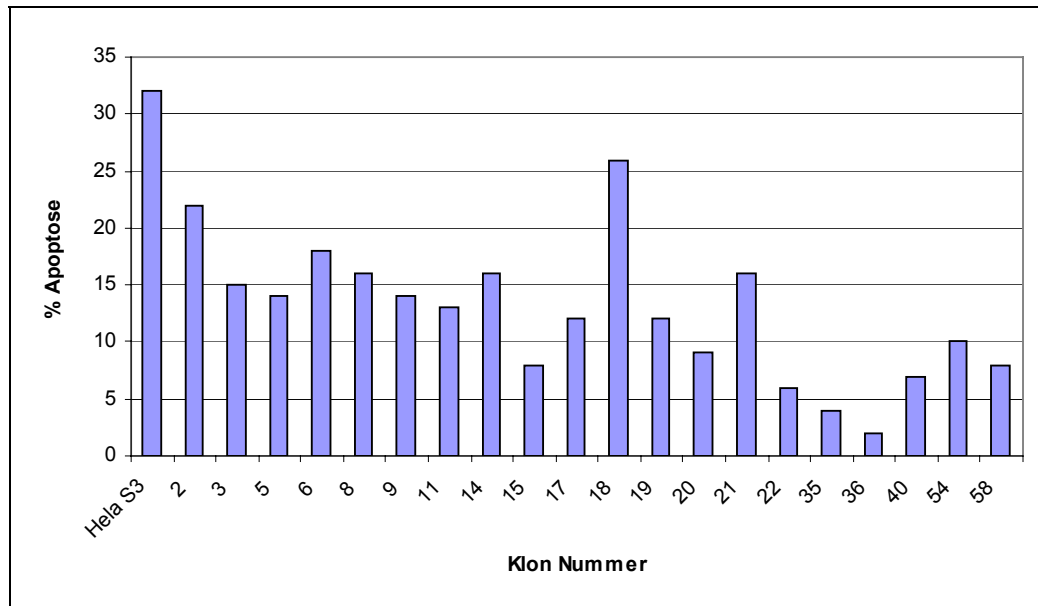


Abb. 25 Apoptoseempfindlichkeit der Klone im Vergleich mit HeLa S3

70 Prozent konfluente Zellen wurden für 24h in Medium ohne FCS gehungert. Anschließend wurde 100 ng/ml CH-11 zu den Zellen gegeben. Nach 16 h wurden die Zellkerne in hypotonischem Puffer mit Propidiumiodid angefärbt und über FACS analysiert. Der prozentuale Anteil des Sub-G1-Peaks wurde ermittelt. Die Apoptoserate ohne CH-11 wurde von der mit CH-11 subtrahiert.

Die Mechanismen, die zur Apoptoseresistenz der Klone führen, könnten spezifisch die durch Fas induzierte Apoptose oder die Apoptose allgemein. In diesem Fall sollten die Klone auch resistenter gegen andere Apoptoseauslöser sein. Zum Test dieser Möglichkeiten wurde die Zellen mit TNF- α , Cisplatin und Taxol stimuliert. TNF- α löst Apoptose auf ähnliche Weise wie CH-11 durch Fas durch den TNF-Rezeptor aus (Strasser et al., 2000). Der Wirkungsmechanismus von Cisplatin ist nicht vollständig geklärt, aber wahrscheinlich führt dessen Komplexierung mit DNA zum Absterben der Zellen (Yang et al., 1995). Taxol verhindert die Depolymerisation von Mikrotubuli und hemmt daher den Zellzyklus, was letztendlich zum Zelltod führt (Bhalla et al., 1993; Schiff et al., 1979; Schiff and Horwitz, 1980).

Die hierzu getesteten 3 Klone waren auch gegen diese anderen Apoptoseauslöser resistenter als Hela S3. Das Ausmaß der Resistenz war abhängig vom verwendeten Auslöser - gegenüber Taxol zeigten die Klone die geringste Resistenz (Abb. 26).

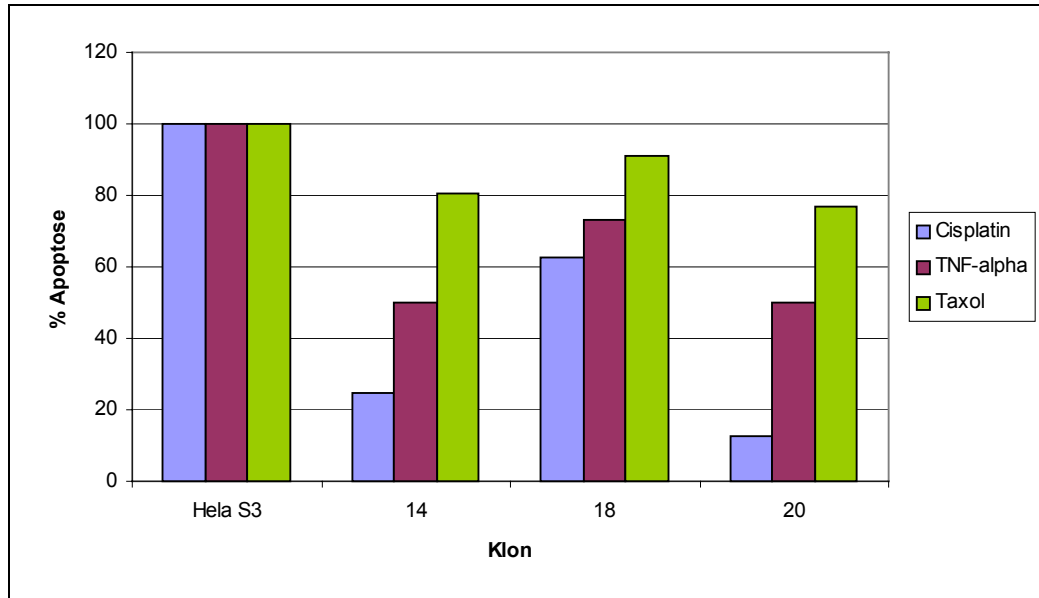


Abb. 26 Apoptoseempfindlichkeit mit anderen Apoptoseauslösern

70 Prozent konfluente Zellen wurden für 24h in Medium ohne FCS gehungert. Anschließend wurden 10 µg/ml Cisplatin oder 15 ng/ml TNF-α plus 0,1 µg/ml Cycloheximid zu den Zellen gegeben. Nach 16 h wurden die Zellkerne in hypotonischem Puffer mit Propidiumiodid angefärbt und über FACS analysiert. Taxol wurde für 3 h zu 50 nM mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium mit 10% FCS hinzugegeben. 2 Tage später wurde der prozentuale Anteil des Sub-G1-Peaks ermittelt. Die Apoptoserate ohne Apoptoseauslöser wurde von der mit Apoptoseauslöser subtrahiert.

3.2.2. Vergleich der Expressionsprofile aller Zelllinien

Aus der Gesamt-RNA der Klone und Hela S3 wurde die mRNA isoliert und die komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Die cDNA wurde mit ^{33}P radioaktiv markiert und mit den cDNA-Arrays (Axxima Pharmaceuticals) hybridisiert. Die Arrays waren Nylonmembranen die Sonden mit Sequenzen von etwa 700 Genen, hauptsächlich Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, enthielten. Jede Sonde wurde doppelt aufgetragen und für die meisten Gene befanden sich zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen des selben Gens auf dem Filter. Durch das zweimalige Auftragen und das Verwenden mehrerer Sonden werden Mehrfachbestimmungen für die Expression eines Gens durchgeführt und so die Zuverlässigkeit der Daten gesteigert. Die Sonden waren pBluescript Plasmide, die Sequenzen der entsprechenden Gene mit einer Länge von 200 bp bis 4000 bp enthielten. Insgesamt enthielten die Arrays so 2400 Sonden. Die Filter wurden auf Phosphoimager-Platten exponiert und durch einen Phosphoimager eingelesen und die Daten digitalisiert. Ein Beispiel für einen hybridisierten Filter zeigt Abbildung 27.

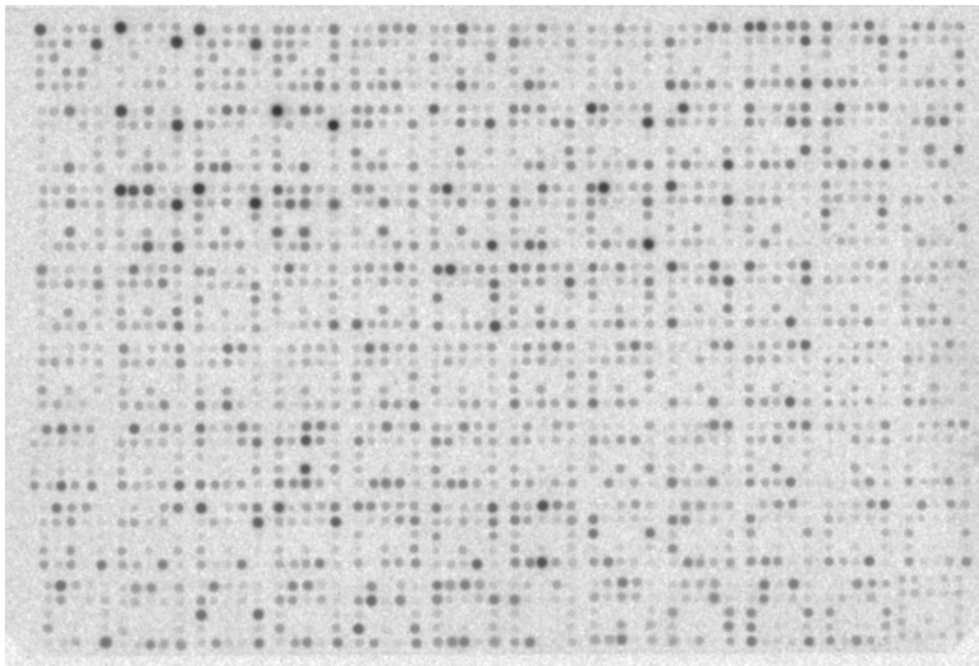


Abb. 27 Beispiel eines hybridisierten Filters (hybridisiert mit cDNA von Klon 14)

3.2.2.1. Analyse der cDNA-Array Daten

Die Schwärzung der Punkte auf den cDNA Arrays wurden mit Hilfe des Programms ArrayVision (Raytest, Kanada) ermittelt und die Daten in Microsoft Excel exportiert. In Excel wurden die Daten durch ein selbst geschriebenes Programm ausgewertet. Abbildung 28 zeigt die Auswertungsroutine.

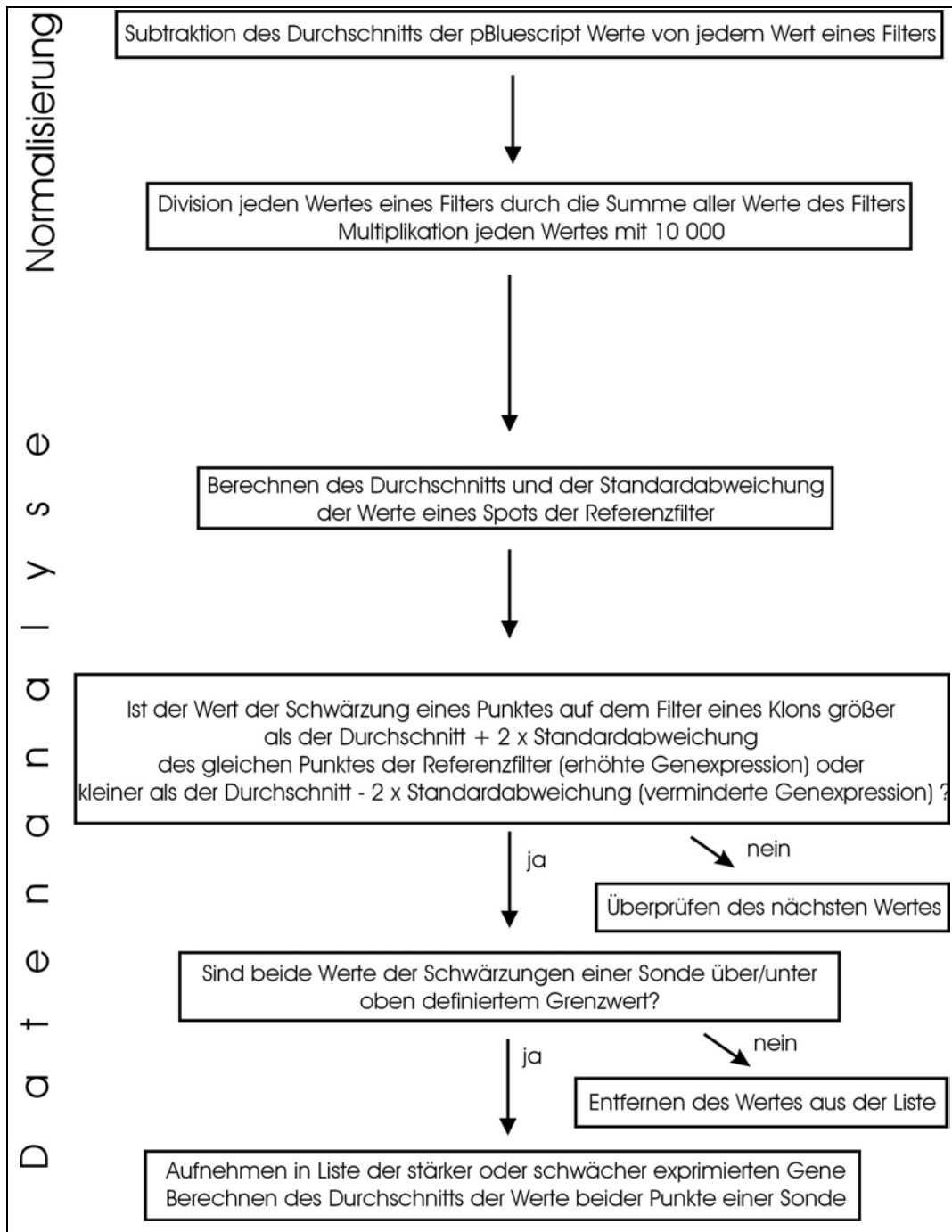


Abb. 28 Routine zur Auswertung der Filter

Zuerst wurde der Durchschnitt der Hybridisierungssignale von pBluescript gebildet, dem Plasmid, in das alle Konstrukte kloniert wurden. Dieser Wert wurde wiederum von den Werten aller anderen Hybridisierungssignale abgezogen. Ergaben sich dabei Werte kleiner als Null, so wurde der Wert Null gesetzt. Anschließend wurden die Gesamtsignalstärken der einzelnen Filter abgeglichen in dem jeder Wert eines Punktes auf dem Filter durch die Summe der Werte aller Punkte desselben Filters geteilt wurde. Zur besseren Handhabung der Werte wurden alle Werte darauffolgend mit 10000 multipliziert. Diese Operation veränderte das Verhältnis der Expressionsdaten nicht. Auf diese Art wurden die normalisierten Werte gewonnen, die für die weitere Analyse verwendet wurden.

Je kleiner das Volumen eines Punktes auf einem Filter ist, desto größer sind die Abweichungen verglichen mit dem gleichen Punkt eines anderen Filters, der mit der selben cDNA hybridisiert wurde. Beim Auftragen der Werte für die Hybridisierungssignale zweier Filter im sogenannten „Scatter Plot“ erhält man daher eine typische Glockenform (Abb. 29). Je kleiner die Werte sind, desto eher liegen sie abseits der 45 ° Ideallinie, die sich bei Übereinstimmung der Werte beider Filter ergeben würde.

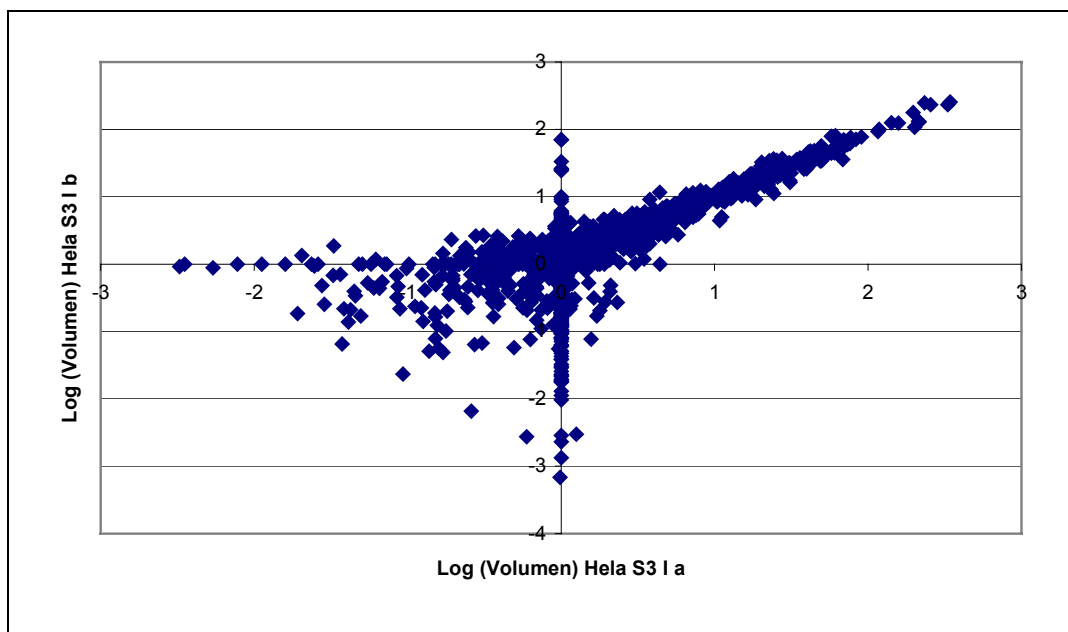


Abb. 29 Scatter Plot zweier Filter der selben cDNA (HeLa S3)

Die normalisierten Werte der beiden Filter wurden mit einer logarithmischen Skalierung aufgetragen, um kleine Werte durch die Axenspreizung besser sichtbar zu machen.

Die höhere Fehlerrate bei geringen Werten führt zu einer geringeren Zuverlässigkeit dieser Werte, weil der Fehler wegen der geringen Anzahl der Werte (2 Werte für eine Sonde) nicht genau bestimmbar ist. Um zu erkennen, ob Unterschiede zwischen der Ausgangszelllinie Hela S3 und den resistenten Klonen nur auf Schwankungen innerhalb des Fehlerbereiches zurückzuführen sind, wurde die Ausgangszelllinie Hela S3 mehrfach hybridisiert. Hela S3 diente also als Referenz mit der die Klone verglichen wurden. Darum wurde cDNA aus zwei unabhängigen Gesamt-RNA-Präparationen hergestellt und jede cDNA in zwei unterschiedlichen Hybridisierungen verwendet. Für jeden Punkt auf dem Filter gab es demnach vier Werte, von denen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurde. Wegen des doppelten Auftragens jeder Sonde ergibt das pro Gen mindestens 8 Werte (meist mehr, weil mehrere Sonden verwendet wurden), die reichen, um für jede Sonde eine Fehlerabweichung zu berechnen. Lag der Wert eines Punktes eines Klones über dem des gleichen Punktes der Referenzfilter plus der Standardabweichung, dann sollte das entsprechende Gen im Klon tatsächlich stärker exprimiert werden. Zur Sicherheit wurde als Grenzwert der Mittelwert aus den vier Werten für einen Punkt der Referenzfilter plus (für eine erhöhte Expression) bzw. minus (für eine verminderte Expression) 2 mal der Standardabweichung verwendet.

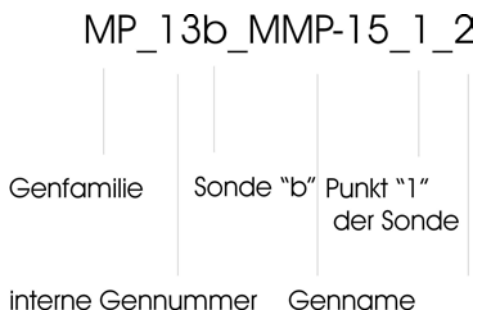
3.2.2.2. Ergebnisse der cDNA-Array Analyse

Überschritt eine Sonde den Grenzwert für erhöhte oder verminderte Expression, so wurde sie in eine vorläufige Liste aufgenommen. Wenn beide Punkte einer Sonde in der vorläufigen Liste erschienen, wurde der Durchschnitt aus den Werten für das prozentuale Über-oder Unterschreiten der jeweiligen Grenzwerte und aus den Werten für die Anzahl der Klone, in denen der Grenzwert überschritten wurde, gebildet. Diese Werte wurden in eine endgültige Tabelle übertragen, die unten abgebildet ist (Tabelle 2, 3).

Die Sonden der Gene sind nach der Anzahl der Klone, in denen sie höher oder niedriger exprimiert sind, sortiert. Die Möglichkeit, daß Abweichungen, die bei der RNA- und cDNA Präparation entstehen, das Ergebnis beeinflussen, sollte umso kleiner sein, desto mehr Klone ein bestimmtes Gen stärker oder schwächer exprimieren. Denn die statistische Wahrscheinlichkeit, daß ein höherer oder

niedrigerer Wert für eine Sonde in den Klonen auf einen zufälligen Fehler bei der RNA-Isolation und der Hybridisation zurückgeht, ist je geringer desto mehr Klone diesen Wert aufzeigen. Beide Listen für erhöht und vermindert exprimierte Gene enthalten jeweils etwa 200 Sonden, was durch das Vorhandensein mehrerer Sonden für ein Gen rund 150 Genen entspricht. Eine genauere Beschreibung der Gene befindet sich in der Diskussion (Abschnitt 3)

Folgende Bezeichnungen wurden gewählt:



Genfamilien:

CO: "House Keeping"

GP: G-Protein

MP: Metalloprotease

LIG: Ligand

OT: andere

PP: Phosphatase

STK: Serin/Threonin Kinase

UK: unbekannte Kinase

UP: unbekannte Phosphatase

YK: Tyrosin Kinase

| Gen/Sonde | Anzahl der Klone mit erhöhter Expression | % über Grenzwert für erhöhte Expression | Durchschnittlicher Wert für Schwärzung der Punkte in diesen Klonen |
|------------------------|--|---|--|
| MP_13b_MMP-15_1_2 | 19,5 | 82 | 8,3 |
| MP_1a_TIMP-1_1_1 | 18 | 180 | 2,1 |
| STK_94a_MAPKK3_1_5 | 16,5 | 34 | 5,9 |
| PP_44a_PPX_1_3 | 16,5 | 18 | 23,5 |
| STK_69a_GRK6_1_4 | 15,5 | 71 | 10,5 |
| CO_19a_MHC-1_1_1 | 15,5 | 44 | 141,8 |
| STK_167a_Rac-alpha_1_6 | 15,5 | 33 | 10,8 |
| STK_79a_IRAK-2_1_5 | 15 | 79 | 3,8 |
| CO_1a_90k_1_1 | 15 | 43 | 63,4 |
| MP_1c_TIMP-1_1_1 | 14,5 | 45 | 88,1 |
| OT_32a_EF-2_1_2 | 14,5 | 30 | 32,5 |
| OT_13a_pBTUB_1_2 | 14,5 | 16 | 8,9 |
| CO_30a_Vimentin_1_1 | 14,5 | 14 | 57,4 |
| MP_1b_TIMP-1_1_1 | 14 | 43 | 115,6 |
| GP_3a_alpha2S48C_1_1 | 14 | 42 | 21,3 |
| STK_157a_PKN-H4_1_6 | 14 | 34 | 21,5 |
| MP_3a_TIMP-3_1_1 | 14 | 26 | 6,9 |
| OT_39a_IL1-beta_1_2 | 13 | 573 | 1,0 |
| MP_6a_MMP-3_1_1 | 13 | 62 | 2,5 |
| GP_5a_alpha2_1_1 | 13 | 35 | 15,0 |
| STK_17a_Bcr_1_4 | 13 | 32 | 3,2 |
| PP_94a_CDC25B_1_3 | 13 | 30 | 3,6 |
| PP_42a_PP5_1_3 | 13 | 22 | 3,1 |
| STK_98b_MAST205_1_5 | 13 | 20 | 5,9 |
| YK_62b_RON_1_11 | 13 | 18 | 4,3 |
| OT_47a_ADAM8_1_2 | 12,5 | 18 | 23,7 |
| STK_167b_Rac-alpha_1_6 | 12,5 | 14 | 11,5 |
| LIG_6a_TGFalpha_1_1 | 12 | 78 | 0,5 |
| MP_2a_TIMP-2_1_1 | 12 | 37 | 12,2 |
| MP_2b_TIMP-2_1_1 | 12 | 37 | 13,0 |
| OT_49a_ADAM15_1_2 | 12 | 32 | 6,6 |
| OT_55a_Bcl-x_1_2 | 12 | 26 | 10,3 |
| STK_162a_PLK-1_1_6 | 12 | 21 | 26,5 |
| YK_17b_EphA2_1_9 | 12 | 16 | 9,9 |
| STK_52a_DAPK_1_4 | 11,5 | 35 | 8,8 |
| STK_254a_MAPKKK6_1_7 | 11,5 | 33 | 2,7 |
| STK_93b_MAPKK2_1_5 | 11,5 | 21 | 14,9 |
| ST_8a_SHB_1_3 | 11,5 | 15 | 6,3 |
| OT_19a_Furin_1_2 | 11 | 60 | 1,6 |
| STK_17b_Bcr_1_4 | 11 | 29 | 3,9 |
| YK_43b_Hyl_1_11 | 11 | 18 | 8,4 |
| STK_4b_AKT2_1_4 | 11 | 12 | 6,9 |
| STK_308c_PKNbeta_1_8 | 10,5 | 49 | 1,6 |

| | | | |
|---------------------------|------|-----|-------|
| PP_53a_PTP-Meg2_1_3 | 10,5 | 42 | 2,2 |
| CO_29a_VHL_1_1 | 10,5 | 40 | 1,5 |
| STK_91a_MAPKAPK2_1_5 | 10,5 | 10 | 6,5 |
| OT_36a_neurolektin_1_2 | 10,5 | 10 | 83,7 |
| STK_103a_MSTH1_1_5 | 10 | 255 | 0,4 |
| STK_171a_*RSKHU2_1_6 | 10 | 43 | 9,4 |
| PP_21c_PCP-2_1_2 | 10 | 30 | 3,6 |
| CO_25a_rS9_1_1 | 10 | 16 | 274,8 |
| STK_104a_MLK3_1_5 | 9,5 | 35 | 5,1 |
| YK_82b_Tyk-2_1_11 | 9 | 20 | 4,5 |
| PP_78a_VH3_1_3 | 9 | 19 | 30,3 |
| YK_66b_Rse_1_11 | 9 | 14 | 5,6 |
| STK_224a_JNKK2alpha_1_7 | 9 | 9 | 6,4 |
| PP_66b_PTPsigma_1_3 | 8,5 | 109 | 0,4 |
| STK_266a_KIAA0135_1_7 | 8,5 | 33 | 0,6 |
| STK_57c_ERK1_1_4 | 8,5 | 31 | 5,3 |
| STK_14a_beta-ARK-1_1_4 | 8,5 | 25 | 3,3 |
| STK_78a_IRAK_1_5 | 8,5 | 20 | 26,1 |
| PP_87a_PTP-J_1_3 | 8,5 | 19 | 5,0 |
| OT_37a_IL-4Stat_1_2 | 8,5 | 18 | 8,8 |
| STK_96a_MAPKK5_1_5 | 8,5 | 7 | 2,6 |
| YK_15b_Lyk_1_9 | 8 | 46 | 0,5 |
| STK_57b_ERK1_1_4 | 8 | 35 | 7,1 |
| PP_21a_PCP-2_1_2 | 8 | 30 | 1,0 |
| STK_222a_MSK2_1_7 | 8 | 30 | 4,8 |
| YK_31a_FGFR_1_9 | 8 | 29 | 2,0 |
| YK_13b_Csk_1_9 | 8 | 15 | 9,3 |
| STK_237a_IKKgamma_1_7 | 8 | 13 | 4,7 |
| CO_3a_beta-Aktin_1_1 | 8 | 8 | 114,1 |
| MP_13c_MMP-15_1_2 | 7,5 | 48 | 0,5 |
| LIG_2a_VEGF_1_1 | 7,5 | 34 | 1,3 |
| STK_133a_PIM-2h_1_5 | 7,5 | 18 | 4,0 |
| YK_60a_Pyk-2xxx_1_11 | 7,5 | 18 | 3,1 |
| STK_45a_CKII-alphaxxx_1_4 | 7,5 | 17 | 7,6 |
| STK_211c_CAMKK_1_6 | 7,5 | 16 | 2,2 |
| STK_100b_MKK7_1_5 | 7,5 | 15 | 4,7 |
| STK_226a_AMPK-beta1_1_7 | 7,5 | 11 | 4,6 |
| STK_267b_KIAA0151_1_7 | 7,5 | 11 | 5,5 |
| OT_48a_ADAM12_1_2 | 7 | 57 | 0,7 |
| YK_79a_TrkC_1_11 | 7 | 52 | 1,8 |
| YK_1a_Abl_1_9 | 7 | 36 | 1,7 |
| STK_276a_KIAA0561_1_7 | 7 | 29 | 1,0 |
| YK_17a_EphA2_1_9 | 7 | 27 | 0,9 |
| OT_46a_PLM110_1_2 | 7 | 27 | 1,8 |
| STK_57d_ERK1_1_4 | 7 | 23 | 5,1 |
| STK_4a_AKT2_1_4 | 7 | 18 | 13,9 |
| ST_3a_Grb-2_1_3 | 7 | 18 | 14,1 |
| STK_98a_MAST205_1_5 | 7 | 14 | 1,8 |
| YK_32b_FGFR-2_1_9 | 7 | 9 | 6,2 |

| | | | |
|--------------------------|-----|-----|-------|
| LIG_17a_p91/ISGF-3_1_1 | 6,5 | 122 | 18,4 |
| CO_2a_alpha-tubulin_1_1 | 6,5 | 40 | 274,8 |
| STK_285a_HsGAK_1_7 | 6,5 | 23 | 2,7 |
| STK_110a_MST-3_1_5 | 6,5 | 21 | 29,9 |
| STK_133b_PIM-2h_1_5 | 6,5 | 17 | 4,2 |
| OT_34a_KIF-1c_1_2 | 6,5 | 16 | 27,5 |
| STK_200a_MAPKAPK3_1_6 | 6,5 | 12 | 9,4 |
| STK_46a_CKII-beta_1_4 | 6,5 | 10 | 31,6 |
| OT_38a_IL1-alpha_1_2 | 6 | 90 | 2,0 |
| PP_1a_B23_1_2 | 6 | 20 | 40,2 |
| ST_6a_PLCGamma_1_3 | 6 | 19 | 3,8 |
| STK_122a_PCTAIRE1_1_5 | 6 | 13 | 32,6 |
| YK_9b_Brk_1_9 | 6 | 11 | 3,9 |
| STK_77a_ILK_1_5 | 6 | 10 | 26,5 |
| STK_38a_CKI-delta_1_4 | 6 | 9 | 17,6 |
| YK_1b_Abl_1_9 | 6 | 9 | 5,5 |
| STK_131a_PHK-gammaT_1_5 | 6 | 8 | 3,5 |
| YK_42a_HER4_1_11 | 5,5 | 38 | 3,5 |
| PP_33b_PP2A-Rb55_1_3 | 5,5 | 23 | 2,0 |
| STK_92a_MAPKK1_1_5 | 5,5 | 22 | 1,3 |
| STK_75a_IKK1_1_5 | 5,5 | 17 | 4,5 |
| ST_5a_SHC_1_3 | 5,5 | 12 | 26,9 |
| YK_14b_EGFR_1_9 | 5,5 | 10 | 15,6 |
| STK_252a_PAK1- | 5,5 | 2 | 43,7 |
| PP_86b_PYST1_1_3 | 5 | 59 | 0,5 |
| YK_39a_Hck_1_9 | 5 | 35 | 4,7 |
| CO_15a_HPB_1_1 | 5 | 16 | 422,6 |
| PP_24a_PP1-Calpha_1_2 | 5 | 8 | 13,3 |
| UK_11a_UK11_1_8 | 5 | 8 | 1,6 |
| UP_2d_PB-27_1_8 | 4,5 | 48 | 1,0 |
| STK_267a_KIAA0151_1_7 | 4,5 | 31 | 1,9 |
| PP_64a_PTPkappa_1_3 | 4,5 | 29 | 1,4 |
| YK_7b_Blk_1_9 | 4,5 | 28 | 1,6 |
| UP_3b_PB-28_1_8 | 4,5 | 20 | 1,3 |
| STK_124a_PCTAIRE3_1_5 | 4,5 | 13 | 0,7 |
| PP_57b_PTP-SL_1_3 | 4,5 | 11 | 24,2 |
| STK_135a_PITALRE_1_5 | 4,5 | 8 | 13,7 |
| STK_272b_Dyrk4_1_7 | 4 | 136 | 2,1 |
| YK_40a_HER2_1_9 | 4 | 49 | 2,3 |
| ST_10a_Rafxxx_1_4 | 4 | 45 | 1,6 |
| STK_85a_LIMK-1_1_5 | 4 | 36 | 6,0 |
| YK_45b_IR_1_11 | 4 | 28 | 1,2 |
| UK_10a_UK10_1_8 | 4 | 19 | 5,2 |
| VP_11a_UL112-113_1_8 | 4 | 17 | 4,4 |
| YK_57b_PDGFRalpha_1_11 | 4 | 13 | 49,6 |
| YK_79b_TrkC_1_11 | 4 | 13 | 4,3 |
| STK_210a_ARK2_1_6 | 4 | 11 | 20,3 |
| STK_41a_CKI-gamma2_1_4 | 4 | 8 | 7,6 |
| STK_24a_CaM-Kilgamma_1_4 | 4 | 8 | 3,0 |

| | | | |
|-------------------------|-----|----|-------|
| CO_14a_GPDH_1_1 | 4 | 7 | 272,4 |
| GP_9a_GPIR-3_1_1 | 4 | 6 | 41,9 |
| STK_274a_KIAA0537_1_7 | 4 | 6 | 6,2 |
| STK_168b_Raf_1_6 | 4 | 3 | 10,8 |
| STK_194b_p38beta1_1_6 | 3,5 | 91 | 0,2 |
| UP_1c_PB-26_1_8 | 3,5 | 41 | 1,2 |
| STK_251a_lok_1_7 | 3,5 | 40 | 2,6 |
| UP_2b_PB-27_1_8 | 3,5 | 27 | 2,1 |
| STK_175a_SGK_1_6 | 3,5 | 19 | 38,1 |
| STK_93a_MAPKK2_1_5 | 3,5 | 16 | 22,4 |
| CO_26a_Thymosinbeta_1_1 | 3,5 | 12 | 309,7 |
| OT_24a_CK-8_1_2 | 3,5 | 11 | 139,6 |
| PP_67b_PTPzeta_1_3 | 3,5 | 9 | 2,8 |
| YK_27b_EphB4_1_9 | 3,5 | 8 | 3,3 |
| STK_110b_MST-3_1_5 | 3,5 | 8 | 10,3 |
| LIG_20a_rAR_1_1 | 3,5 | 5 | 4,3 |
| GP_7a_GPIR-1_1_1 | 3,5 | 4 | 2,6 |
| STK_239b_KIAA0687Nck- | 3,5 | 3 | 9,6 |
| STK_228a_PRKC-L_1_7 | 3 | 98 | 0,4 |
| STK_191a_ZPK_1_6 | 3 | 71 | 0,3 |
| UP_1d_PB-26_1_8 | 3 | 29 | 5,3 |
| UP_1a_PB-26_1_8 | 3 | 24 | 2,9 |
| STK_11a_AMPK-alpha1_1_4 | 3 | 20 | 0,7 |
| UP_2c_PB-27_1_8 | 3 | 19 | 2,4 |
| YK_24a_EphB1_1_9 | 3 | 18 | 1,0 |
| PP_36a_PP2B-Cbeta_1_3 | 3 | 14 | 3,0 |
| UP_1b_PB-26_1_8 | 3 | 12 | 3,2 |
| STK_250a_MSSK1_1_7 | 3 | 9 | 3,5 |
| YK_93a_FGFR-3xxx_1_12 | 3 | 8 | 1,6 |
| UK_21a_UK21_1_8 | 3 | 8 | 2,5 |
| CO_10a_myc_1_1 | 3 | 7 | 83,5 |
| PP_65c_PTPmu_1_3 | 3 | 6 | 9,9 |
| STK_132b_PIM-1_1_5 | 3 | 5 | 18,7 |

Tab. 2 Liste der Gene mit erhöhter Expression in den resistenten Klonen

Nur Gene, von denen beide Punkte einer Sonde über dem Grenzwert für erhöhte Expression lagen, wurden in die Liste aufgenommen. Für die Anzahl der Klone mit erhöhter Expression wurde der Durchschnitt aus beiden Punkten einer Sonde gebildet. Verschiedene Sonden für ein Gen wurden in der Tabelle belassen. Die prozentuale Steigerung über dem Grenzwert bezeichnet den Median der Steigerungen in den Klonen mit erhöhter Expression.

| Gen/Sonde | Anzahl der Klone mit verminderter Expression | % unter Grenzwert für verminderte Expression | Durchschnittlicher Wert für Schwärzung der Punkte in der Referenzzelllinie (Hela S3) |
|---|--|--|--|
| STK_112a_Ndr_1_5 | 19,5 | 59 | 5,7 |
| YK_90c_hPTK_1_11 | 19 | 161 | 8,5 |
| STK_59b_ERK3_1_4 | 19 | 159 | 5,6 |
| CO_27a_Topoisoeromase2_1_1 | 19 | 143 | 43,7 |
| PP_81c_AZP- I Sredacidphosphatase_1_3 | 19 | 92 | 15,7 |
| PP_25a_PP1-Cbeta_1_2 | 19 | 45 | 31,5 |
| CO_21a_PCNA_1_1 | 19 | 27 | 23,7 |
| STK_118b_p160ROCK_1_5 | 18,5 | 333 | 3,0 |
| PP_25b_PP1-Cbeta_1_2 | 18,5 | 161 | 9,4 |
| PP_72b_TC-PTP_1_3 | 18,5 | 155 | 3,9 |
| PP_81b_AZP- I Sredacidphosphatase_1_3 | 18 | 121 | 20,2 |
| STK_217a_CHK1_1_6 | 18 | 104 | 3,9 |
| STK_294a_AMP- activatedproteinkinaseal- pha1subunit_1_7 | 18 | 81 | 7,1 |
| PP_108a_YVH1_1_3 | 18 | 72 | 11,5 |
| STK_164a_PRK-2_1_6 | 18 | 57 | 6,2 |
| STK_257b_hSLK_1_7 | 17,5 | 177 | 2,3 |
| STK_189b_WEE1_1_6 | 17,5 | 73 | 3,9 |
| STK_36a_CKI-alpha_1_4 | 17,5 | 49 | 21,3 |
| STK_136a_PK38_1_5 | 17,5 | 30 | 12,4 |
| STK_118a_p160ROCK_1_5 | 17 | 208 | 3,1 |
| CO_4a_BRCA1_1_1 | 17 | 99 | 6,3 |
| STK_170a_RICK_1_6 | 17 | 90 | 3,1 |
| STK_153a_PKC-iota_1_6 | 17 | 74 | 7,7 |
| STK_136b_PK38_1_5 | 17 | 56 | 6,9 |
| STK_176a_SLK_1_6 | 17 | 41 | 8,8 |
| STK_115a_NEK3_1_5 | 16,5 | 234 | 1,2 |
| STK_215a_MAD-3likePK_1_6 | 16,5 | 104 | 3,9 |
| STK_201b_Nik_1_6 | 16,5 | 82 | 1,8 |
| STK_199b_TAK1_1_6 | 16,5 | 53 | 9,8 |
| UP_7b_PB-32_1_8 | 16 | 178 | 7,0 |
| STK_153b_PKC-iota_1_6 | 16 | 156 | 5,0 |
| STK_198a_HsCdc7_1_6 | 16 | 138 | 5,1 |
| STK_215b_MAD-3likePK_1_6 | 16 | 90 | 5,3 |
| STK_180a_SRPK-2_1_6 | 16 | 70 | 2,8 |
| PP_81a_AZP- I Sredacidphosphatase_1_3 | 16 | 55 | 26,0 |
| STK_97a_MAPKK6_1_5 | 16 | 54 | 4,2 |
| STK_81c_JNK2_1_5 | 16 | 52 | 10,5 |

| | | | |
|-----------------------|------|-----|------|
| STK_199c_TAK1_1_6 | 16 | 37 | 11,4 |
| STK_63a_GCK_1_4 | 15,5 | 324 | 3,4 |
| STK_59a_ERK3_1_4 | 15,5 | 285 | 9,0 |
| STK_277a_KIAA0619_1_7 | 15,5 | 239 | 4,4 |
| PP_46a_Pten_1_3 | 15,5 | 70 | 5,6 |
| STK_321a_TIP30_1_8 | 15,5 | 53 | 12,6 |
| YK_90b_hPTK_1_11 | 15 | 301 | 5,3 |
| STK_129a_PHK-beta_1_5 | 15 | 246 | 3,7 |
| OT_33a_Enx-1_1_2 | 15 | 187 | 2,9 |
| STK_165b_PRP4m_1_6 | 15 | 156 | 6,4 |
| STK_214a_Bub1_1_6 | 15 | 121 | 6,5 |
| PP_72a_TC-PTP_1_3 | 15 | 59 | 1,9 |
| STK_114a_NEK2_1_5 | 15 | 37 | 8,5 |
| STK_258b_PK428_1_7 | 14,5 | 237 | 1,3 |
| STK_83a_KHS_1_5 | 14,5 | 121 | 3,1 |
| PP_98b_PIR1_1_3 | 14,5 | 51 | 7,8 |
| PP_43a_PP6_1_3 | 14,5 | 30 | 8,4 |
| OT_6a_HSP86_1_2 | 14 | 943 | 9,1 |
| STK_105a_MNB_1_5 | 14 | 90 | 3,9 |
| YK_47b_Jak-1_1_11 | 14 | 78 | 6,4 |
| GP_8a_GPIR-2_1_1 | 14 | 15 | 20,2 |
| STK_187a_VRK1_1_6 | 13,5 | 286 | 1,9 |
| STK_34a_CHED_1_4 | 13,5 | 75 | 2,6 |
| STK_175a_SGK_1_6 | 13,5 | 70 | 30,5 |
| PP_98a_PIR1_1_3 | 13,5 | 42 | 5,3 |
| CO_18a_HPRT_1_1 | 13,5 | 29 | 10,3 |
| STK_71a_GSK-3beta_1_4 | 13,5 | 22 | 3,8 |
| STK_186a_TTKxxx_1_6 | 13 | 465 | 1,7 |
| UK_6c_PB-11_1_8 | 13 | 168 | 2,9 |
| PP_73a_Tep-1_1_3 | 13 | 124 | 5,9 |
| STK_189a_WEE1_1_6 | 13 | 67 | 3,2 |
| PP_28b_PP2A-Cbeta_1_2 | 13 | 33 | 9,0 |
| YK_55c_MET_1_11 | 12,5 | 727 | 4,9 |
| UK_20a_UK20_1_8 | 12,5 | 282 | 1,3 |
| STK_255a_GLK_1_7 | 12,5 | 140 | 1,6 |
| STK_180b_SRPK-2_1_6 | 12,5 | 127 | 2,5 |
| STK_258a_PK428_1_7 | 12 | 254 | 1,8 |
| STK_216b_SIK_1_6 | 12 | 154 | 17,6 |
| UK_6d_PB-11_1_8 | 12 | 63 | 3,3 |
| STK_168b_Raf_1_6 | 12 | 19 | 8,8 |
| STK_32b_CDK7_1_4 | 11,5 | 195 | 9,5 |
| STK_26b_CDC2_1_4 | 11,5 | 168 | 8,5 |
| STK_31a_CDK6_1_4 | 11,5 | 137 | 1,3 |
| PP_45c_Prl-1_1_3 | 11,5 | 74 | 22,1 |
| PP_45b_Prl-1_1_3 | 11,5 | 69 | 24,8 |
| YK_8b_Bmx_1_9 | 11,5 | 44 | 12,1 |

| | | | |
|--------------------------|------|------|------|
| STK_243a_DRAK1_1_7 | 11,5 | 38 | 4,2 |
| STK_238a_cyclinK_1_7 | 11,5 | 31 | 3,9 |
| STK_127a_PHK-alphaL_1_5 | 11,5 | 24 | 2,3 |
| STK_172a_p70S6K_1_6 | 11 | 824 | 2,4 |
| YK_83b_Yes_1_11 | 11 | 661 | 1,7 |
| STK_179a_SRPK-1_1_6 | 11 | 504 | 2,3 |
| STK_255b_GLK_1_7 | 11 | 278 | 1,9 |
| STK_23a_CaM-KlIdelta_1_4 | 11 | 216 | 3,0 |
| YK_67b_Ryk_1_11 | 11 | 166 | 5,1 |
| PP_97a_PRL-3_1_3 | 11 | 74 | 65,7 |
| STK_81b_JNK2_1_5 | 11 | 65 | 8,4 |
| PP_26a_PP1-Cgamma_1_2 | 11 | 59 | 23,8 |
| STK_270a_Dyrk2_1_7 | 11 | 37 | 1,5 |
| PP_28a_PP2A-Cbeta_1_2 | 11 | 8 | 14,4 |
| STK_272a_Dyrk4_1_7 | 10,5 | 135 | 2,5 |
| YK_67c_Ryk_1_11 | 10,5 | 125 | 5,8 |
| OT_11a_G-25_1_2 | 10,5 | 45 | 8,6 |
| GP_7a_GPIR-1_1_1 | 10,5 | 32 | 2,1 |
| STK_203a_KIAA0834_1_6 | 10 | 589 | 2,7 |
| STK_54a_DNA-PKcN4_1_4 | 10 | 321 | 4,3 |
| STK_108a_MST-1_1_5 | 10 | 275 | 2,4 |
| STK_76a_IKK2_1_5 | 10 | 16 | 4,0 |
| YK_90d_hPTK_1_11 | 9,5 | 736 | 3,1 |
| STK_169b_RCK_1_6 | 9,5 | 433 | 1,2 |
| PP_71b_Shp-2_1_3 | 9,5 | 219 | 7,9 |
| ST_13a_nck_1_4 | 9,5 | 201 | 5,9 |
| CO_7a_CD24_1_1 | 9,5 | 71 | 3,4 |
| STK_270b_Dyrk2_1_7 | 9,5 | 62 | 2,5 |
| STK_70a_GSK-3alpha_1_4 | 9,5 | 19 | 4,8 |
| CO_28a_Transferrin_1_1 | 9 | 1005 | 4,5 |
| STK_54b_DNA-PKcN4_1_4 | 9 | 664 | 2,5 |
| STK_269a_MTK1_1_7 | 9 | 305 | 1,1 |
| LIG_3a_ACTH_1_1 | 9 | 188 | 6,1 |
| PP_40a_PP2C-alpha_1_3 | 9 | 167 | 3,6 |
| STK_216a_SIK_1_6 | 9 | 157 | 12,3 |
| STK_199a_TAK1_1_6 | 9 | 100 | 3,8 |
| PP_34a_PP2A-Rb65_1_3 | 9 | 60 | 2,6 |
| STK_264a_Myt1_1_7 | 9 | 18 | 3,6 |
| PP_64c_PTPkappa_1_3 | 8,5 | 649 | 1,8 |
| CO_28b_Transferrin_1_1 | 8,5 | 522 | 4,9 |
| STK_246a_S6K-2_1_7 | 8,5 | 76 | 1,3 |
| STK_128a_PHK-alphaM_1_5 | 8,5 | 50 | 2,7 |
| STK_117a_NRK2_1_5 | 8 | 856 | 2,9 |
| STK_196b_PRAK_1_6 | 8 | 827 | 3,5 |
| PP_51b_PTP-H1_1_3 | 8 | 805 | 1,4 |
| STK_309b_SID6-1512_1_8 | 8 | 715 | 2,2 |

| | | | |
|--|-----|------|-------|
| STK_7a_ALK-3_1_4 | 8 | 487 | 1,5 |
| STK_260a_p150AdaptorProtein_1_7 | 8 | 306 | 3,4 |
| PP_6b_Dep-1_1_2 | 8 | 274 | 2,5 |
| PP_54b_PTP-Pest_1_3 | 8 | 188 | 10,3 |
| STK_108b_MST-1_1_5 | 8 | 171 | 4,0 |
| STK_239b_KIAA0687Nck-interactingkinase_1_7 | 8 | 97 | 7,4 |
| PP_45a_Prl-1_1_3 | 8 | 80 | 13,1 |
| STK_250a_MSSK1_1_7 | 8 | 27 | 2,1 |
| OT_15a_RNP-K_1_2 | 8 | 26 | 42,2 |
| PP_78a_VH3_1_3 | 8 | 17 | 17,9 |
| OT_23a_TAP-2_1_2 | 8 | 8 | 14,5 |
| OT_46a_PLM110_1_2 | 7,5 | 408 | 0,9 |
| STK_280a_CASK_1_7 | 7,5 | 285 | 1,4 |
| ST_9a_GAP_1_4 | 7,5 | 226 | 2,9 |
| PP_31a_PP2A-Ra55_1_2 | 7,5 | 223 | 1,3 |
| STK_126a_PDK1xxx_1_5 | 7,5 | 74 | 3,3 |
| PP_80a_VHR_1_3 | 7,5 | 55 | 1,5 |
| STK_72a_hPAK1_1_4 | 7,5 | 51 | 2,7 |
| STK_132a_PIM-1_1_5 | 7,5 | 22 | 11,8 |
| STK_104a_MLK3_1_5 | 7,5 | 20 | 3,1 |
| OT_26a_annexin_1_2 | 7,5 | 11 | 120,6 |
| STK_119a_p38_1_5 | 7 | 1023 | 2,6 |
| PP_50b_PTP-D1_1_3 | 7 | 710 | 1,3 |
| STK_74a_HPK1_1_5 | 7 | 223 | 1,0 |
| LIG_17a_p91/ISGF-3_1_1 | 7 | 188 | 6,6 |
| PP_38a_PP2B-R_1_3 | 7 | 180 | 4,1 |
| CO_10a_myc_1_1 | 7 | 28 | 64,6 |
| STK_275b_KIAA0551_1_7 | 7 | 15 | 3,3 |
| PP_1a_B23_1_2 | 7 | 15 | 25,4 |
| UK_1a_PB-2_1_8 | 7 | 15 | 20,5 |
| STK_73b_hPAK2_1_4 | 7 | 11 | 6,2 |
| STK_283b_EPK2_1_7 | 6,5 | 403 | 2,1 |
| STK_199d_TAK1_1_6 | 6,5 | 77 | 3,4 |
| YK_53b_Lyn_1_11 | 6,5 | 75 | 4,1 |
| STK_43a_CKIGX5_1_4 | 6,5 | 36 | 4,2 |
| STK_45a_CKII-alpha xxx_1_4 | 6,5 | 31 | 5,5 |
| STK_143b_PKA-RIIalpha_1_5 | 6,5 | 15 | 3,2 |
| OT_17a_Ezrin_1_2 | 6,5 | 9 | 31,8 |
| STK_159a_PKU-alpha_1_6 | 6 | 910 | 2,8 |
| STK_248c_Chk2_1_7 | 6 | 296 | 2,4 |
| STK_141a_PKA-RIalpha_1_5 | 6 | 205 | 8,0 |
| STK_27a_CDK2_1_4 | 6 | 105 | 5,7 |
| PP_37a_PP2B-Cgamma_1_3 | 6 | 60 | 1,9 |
| STK_206a_Mnk1_1_6 | 6 | 42 | 2,3 |
| STK_26a_CDC2_1_4 | 6 | 25 | 29,7 |
| STK_267b_KIAA0151_1_7 | 6 | 16 | 4,5 |

| | | | |
|---------------------------------------|-----|------|------|
| STK_301a_PSK_1_7 | 6 | 13 | 12,0 |
| STK_16a_B-Raf_1_4 | 6 | 11 | 5,0 |
| PP_65b_PTPmu_1_3 | 5,5 | 509 | 5,4 |
| CO_29a_VHL_1_1 | 5,5 | 299 | 0,8 |
| PP_65c_PTPmu_1_3 | 5,5 | 263 | 5,6 |
| STK_248a_Chk2_1_7 | 5,5 | 174 | 3,4 |
| STK_44a_CKII-alpha_1_4 | 5,5 | 66 | 6,7 |
| STK_272c_Dyrk4_1_7 | 5,5 | 44 | 2,3 |
| GP_12a_GPIR-6_1_1 | 5,5 | 28 | 28,9 |
| PP_24a_PP1-Calpha_1_2 | 5,5 | 22 | 9,9 |
| GP_10a_GPIR-4_1_1 | 5,5 | 18 | 25,2 |
| GP_11a_GPIR-5_1_1 | 5,5 | 16 | 42,8 |
| STK_30a_CDK5_1_4 | 5,5 | 7 | 3,8 |
| STK_300a_KIAA0630_1_7 | 5 | 1007 | 3,0 |
| STK_242a_S6K-II_1_7 | 5 | 776 | 3,3 |
| YK_94b_KIAA0641_1_12 | 5 | 586 | 2,4 |
| PP_67b_PTPzeta_1_3 | 5 | 374 | 1,5 |
| STK_99a_MDPK_1_5 | 5 | 279 | 1,3 |
| CO_17a_Histon3.3_1_1 | 5 | 17 | 27,2 |
| STK_1b_A-Raf-1_1_4 | 5 | 17 | 20,3 |
| OT_4a_ARa_1_2 | 5 | 10 | 28,2 |
| STK_210a_ARK2_1_6 | 5 | 8 | 14,3 |
| OT_14a_pHE-A1_1_2 | 4,5 | 547 | 2,3 |
| STK_9a_ALK-5_1_4 | 4,5 | 380 | 2,1 |
| STK_202b_ULK1_1_6 | 4,5 | 141 | 0,8 |
| STK_77a_ILK_1_5 | 4,5 | 50 | 18,8 |
| PP_47b_PTP-1B_1_3 | 4,5 | 20 | 6,6 |
| STK_130a_PHK-gammaM_1_5 | 4,5 | 11 | 13,7 |
| STK_48a_CLK2_1_4 | 4 | 623 | 1,8 |
| LIG_20a_rAR_1_1 | 4 | 407 | 1,9 |
| PP_42a_PP5_1_3 | 3,5 | 612 | 1,8 |
| STK_24a_CaM-KIlgamma_1_4 | 3,5 | 172 | 1,9 |
| STK_110b_MST-3_1_5 | 3,5 | 57 | 7,1 |
| STK_132b_PIM-1_1_5 | 3,5 | 7 | 14,6 |
| YK_1b_Abl_1_9 | 3 | 715 | 2,8 |
| STK_138b_PKA-Calpha2_1_5 | 3 | 560 | 2,4 |
| STK_137a_PKA-Calpha_1_5 | 3 | 530 | 1,9 |
| STK_285a_HsGAK_1_7 | 3 | 292 | 1,3 |
| STK_290a_Ste-20likeproteinkinase3_1_7 | 3 | 31 | 8,5 |

Tab.3 Liste der Gene mit verminderter Expression in den resistenten Klonen

Nur Gene, von denen beide Punkte einer Sonde unter dem Grenzwert für erniedrigte Expression lagen, wurden in die Liste aufgenommen. Für die Anzahl der Klone mit niedrigerer Expression wurde der Durchschnitt aus beiden Punkten einer Sonde gebildet. Verschiedene Sonden für ein Gen wurden in der Tabelle belassen. Die prozentuale Steigerung unter dem Grenzwert bezeichnet den Median der niedrigeren Werte in den Klonen mit niedrigerer Expression. Bezeichnungen wie bei Liste der induzierten Gene.

3.2.1. Gruppieren der Gene

Zur weiteren Analyse der Expressionsdaten wäre eine Gruppierung in Gene, die zusammen reguliert werden, sehr nützlich. Eine gemeinsame Regulation ließe auch auf eine gemeinsame Funktion schließen. Wenn mehrere Gene z. B. in Klon 1 zusammen stärker exprimiert werden, in Klon 2 unverändert in der Expression sind und in Klon 3 wieder gemeinsam stärker exprimiert werden, dann kann man vermuten, daß die verstärkte gemeinsame Expression der Gene für den antiapoptotischen Phänotyp von Klon 1 und 3 verantwortlich ist. In je mehr Klonen diese gemeinsame Regulation der beiden Gene auftritt, desto wahrscheinlicher ist auch eine gemeinsame Funktion in der Zelle. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe des Programms Cluster die Expressionsprofile der Sonden durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus verglichen (Eisen et al., 1998). Dabei wurden die Sonden mit ähnlichen Expressionsprofilen in einem Dendrogramm auf benachbarten Zweigen dargestellt (Abb. 30).

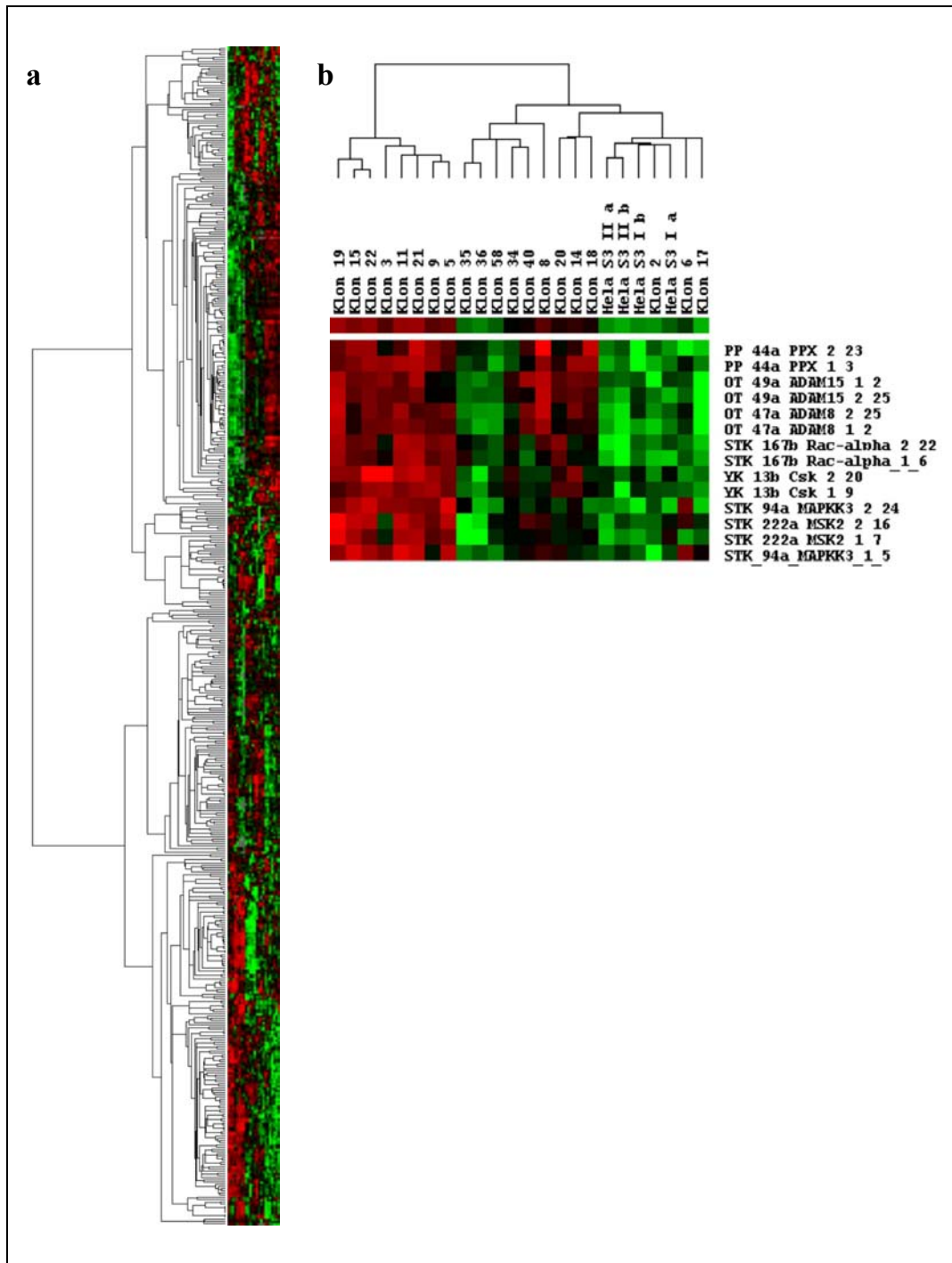


Abb. 30 Gruppieren der Gene nach ihren Expressionsprofilen

a) Dendrogramm aller gruppierten Gene. b) Ausschnitt aus a) – die Gene, die auf benachbarten Zweige gruppiert wurden sind dargestellt
grün: niedrige Expression schwarz: mittlere Expression rot: hohe Expression
Hela S3 I a :RNA Präparation I von Hela S3, Filter a

Auch die Zelllinien wurden auf Grund der Ähnlichkeit ihrer Expressionsdaten gruppiert. Ähnlichkeit der Expressionsdaten heißt in diesem Fall, daß die Klone, die ähnliche Gengruppen exprimieren, auch als ähnlich eingestuft werden. Dadurch können also unterschiedliche Gruppen von Klonen erkannt werden, die auf Grund unterschiedlicher antiapoptotischer Mechanismen resistent gegen Apoptose sind. Wie erwartet werden die 4 Filter der zwei unabhängigen cDNA-Präparationen von Hela S3 auf diese Art dicht zusammen gruppiert. Nur Klon 2 ist nicht von der cDNA Präparation I zu unterscheiden. Die Apoptose resistenten Klone und die Ausgangszelllinie Hela S3 sind in 3 Hauptgruppen zu finden. Zusammen gruppiert sind folgende Zelllinien:

Gruppe 1:

Klon 19, 15, 22, 3, 11, 21, 9, 5

Gruppe 2:

Klon 35, 36, 58, 34, 40, 8

Gruppe 3:

Klon 20, 14, 18, 2, 6, 17, Hela S3 II a, Hela S3 II b, Hela S3 Ia, 2, Hela S3 Ib

Somit wurden Gruppen von Genen gefunden, die stärker in den resistenten Klonen exprimiert werden und ein ähnliches Expressionsprofil in den untersuchten Zelllinien aufweisen

Das Computerprogramm Cluster kann die Gene und Zelllinien mit unterschiedlichen Benutzer-definierten Einstellungen gruppieren. Diese unterschiedlichen Einstellungen waren z. B. die Filtermöglichkeiten, mit denen die Gene herausgefiltert wurden, die überhaupt zuverlässig gruppiert werden können. Oder sie betrafen die genauere Spezifikation des mathematischen Algorithmus zum Gruppieren. Ein Ändern der Einstellungen bewirkte auch teilweise unterschiedliche Gruppierungen der Gene. Es gab aber auch Gene, die unabhängig von den Einstellungen immer zusammen gruppiert wurden.. Diese Gengruppen wurden als stabile Gruppen angesehen, deren Zusammensetzung nicht durch willkürliche Einstellungen in dem Computerprogramm beeinflußt werden konnte und deren Gruppierung daher objektiver war als die anderer Gengruppen. Als weiteres Maß für die Zuverlässigkeit einer Gruppe wurde der Korrelationskoeffizient verwendet. Dieser beziffert die Ähnlichkeit der Expressionsprofile einer Gruppe. Der Koeffizient liegt zwischen -1 (genau entgegengesetzte Profile) bis 1 (identische Profile). Für weitere Betrachtungen

wurden nur die stabilen Gengruppen verwendet, die sich durch einen Korrelationskoeffizienten von 0,7 oder höher auszeichneten.

In Abbildung 31 sind die so identifizierten Gengruppen aufgeführt. Die Gruppen beinhalten zum Großteil die Gene, die in den Klonen stärker exprimiert werden und deshalb zur Apoptoseresistenz beitragen könnten.

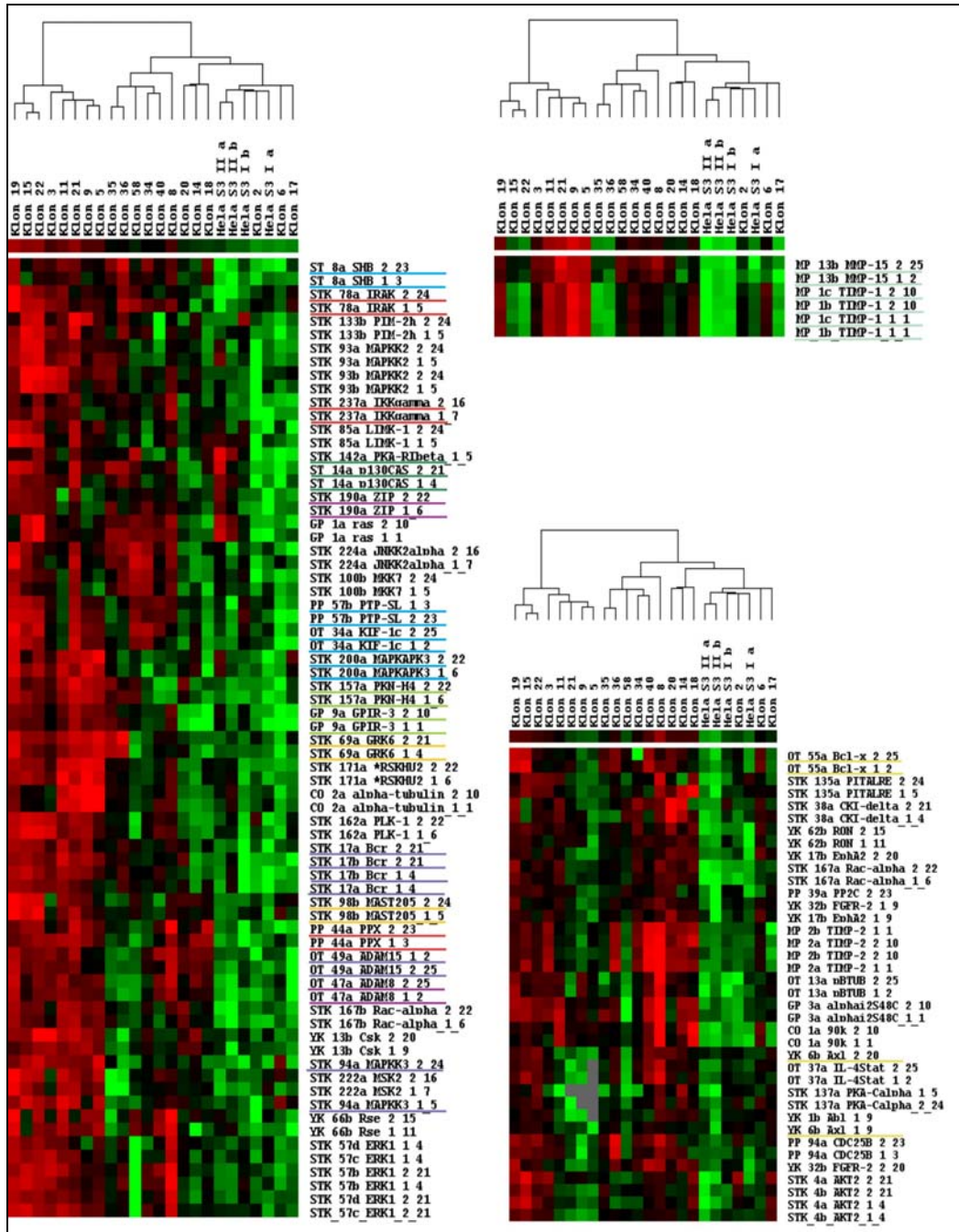


Abb. 31 Gengruppen der Apoptose resistenten Klone

Gene, die mit der gleichen Farbe unterstrichen wurden, konnten auch in einer Gruppe in Plattenepithelkarzinomzelllinien gefunden werden

Wenn Krebszellen im Körper eine ähnliche Selektion auf Apoptoseresistenz erfahren wie in diesem experimentellen Ansatz die Hela S3 Zellen, so könnten die „Apoptoseresistenz-Gengruppen“ auch in anderen Krebszellen auftreten. Um das zu untersuchen wurden cDNA Arrays mit den cDNA's von 10 Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen hybridisiert. Plattenepithelkarzinome wurden gewählt, weil auch Hela S3 aus einem Plattenepithelkarzinom der Cervix etabliert wurde. Die ausgewählten Plattenepithelkarzinomzelllinien waren die Larynx-Karzinome HLaC78, HLaC79, UMSSC-17A, UMSSC-17B, die Pharynx-Karzinome UMSSC-10A, UMSSC-10B, UMSSC-22A, UMSSC-22B, FaDu und das Harnblasenkarzinom SCaBER. In Abbildung 31 sind die Gene, die sowohl in den hier dargestellten Apoptose resistenten Klonen als auch in den Plattenepithelkarzinomzelllinien zusammen gruppieren, durch farbige Unterstreichung hervorgehoben. Wie aus der Abbildung zu ersehen gibt es wirklich Gengruppen, die sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch in den anderen Plattenepithelkarzinomzelllinien vorkommen. Die so gefundenen Gengruppen sind in Tabelle 4 nochmals aufgeführt.

| Gen | Beschreibung | Referenz | Anzahl der antiapoptischen Klone mit verstärkter Expression |
|-----------------|--|--|---|
| Gruppe 1 | | | |
| YP_PTP-SL | Tyrosinphosphatase, kann Erk und dephosphorylieren inaktivieren | (Pulido et al., 1998) | 5 |
| OT_Kif-1c | Motorprotein der Kinesin-Familie | (Dorner et al., 1998; Dorner et al., 1999) | 7 |
| STK_MAPKAPK-3 | MAP-Kinase aktivierte Kinase, aktiviert von p38 MAP-Kinase | (Tanoue et al., 2001) | 7 |
| AD_SHB | Adapterprotein, enthält SH2-Domänen und bindet an aktivierten PDGF-Rezeptor | (Welsh et al., 1994) | 12 |
| Gruppe 2 | | | |
| STK_IRAK | bindet und wird aktiviert durch Interleukin-Rezeptoren, die NFκB aktivieren können | (Cao et al., 1996; Li et al., 2001b) | 15 |
| STP_PPX | dephosphoryliert und aktiviert NFκB | (Hu et al., 1998) | 17 |
| STK_IKKgamma | Teil des Kinase-Komplexes, der NFκB aktiviert | (Rothwarf et al., 1998) | 8 |

| Gruppe 3 | | | |
|-----------------|---|---|-------|
| STK_Bcr | besitzt Serin/Threonin-Kinase – Aktivität und GAP-Aktivität für p21rac | (Diekmann et al., 1991; Maru and Witte, 1991) | 13 |
| MP_Adam 15 | Metalloprotease, die auch an Integrine bindet | (Kratzschmar et al., 1996; Nath et al., 1999) | 12 |
| STK_MAPKK3 | aktiviert p38 MAP-Kinase | (Derijard et al., 1995; Ichijo et al., 1997; Moriguchi et al., 1996; Rane et al., 2001) | 17 |
| Gruppe 4 | | | |
| MP_MMP-15 | Transmembran-Metalloprotease, prozessiert wahrscheinlich pro-Gelatinase A (MMP-2) | (Butler et al., 1997; Will and Hinzmann, 1995) | 20 |
| MP_Timp-1 | hemmt verschiedene Metalloproteasen, wirkt mitogen und/oder antiapoptotisch in verschiedenen Zellen | (Alexander et al., 1996; Li et al., 1999b) | 18 |
| Gruppe 5 | | | |
| STK_GRK-6 | phosphoryliert und desensitiviert Agonist-gebundene G-Protein gekoppelte Rezeptoren | (Dale et al., 2000) | 16 |
| STK_MAST205 | bindet an Mikrotubuli und β 2-Syntrophin | (Lumeng et al., 1999; Walden and Cowan, 1993) | 13 |
| Gruppe 6 | | | |
| MP_Adam-8 | Transmembranmetalprotease, die durch TNF- α induziert wird | (Schlomann et al., 2000; Yoshiyama et al., 1997) | 13 |
| STK_ZIP | Homolog von DAP-Kinase, kann Apoptose auslösen | (Kawai et al., 1998) | keine |
| Gruppe 7 | | | |
| OT_Bcl-X | beeinflusst Apoptose durch Hemmung der Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren | siehe Abb.1 und Abschnitt 1.2. | 12 |
| YK_Axl | Rezeptortyrosinkinase | (O'Bryan et al., 1991) | keine |

Tabelle 4 Gengruppen, die sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch den Plattenepithelkarzinomzelllinien vorkommen

3.2.2. Validierung der antiapoptotischen Gene

Ob die in den Klonen stärker exprimierten Gene auch tatsächlich für den antiapoptotischen Phänotyp verantwortlich sind, konnte überprüft werden, indem diese Enzyme gehemmt wurden. Die Hemmung sollte eine verstärkte Apoptose verursachen, da die antiapoptotische Wirkung vermindert wurde, und der Anstieg der Apoptose sollte in den Klonen größer sein als in Hela S3, weil die gehemmten Gene wegen ihrer stärkeren Expression einen größeren Einfluß auf die Resistenz gegen Apoptose haben sollten.

3.2.2.1. Verwendung niedermolekularer Inhibitoren

Dazu wurden niedermolekulare spezifische Inhibitoren verwendet. Es wurden Inhibitoren gegen die MAP-Kinase Kinase 1/2 (MAPKK1/2) verwendet (PD 98059), gegen die p38 MAP-Kinase (SB 202190), gegen den PDGF-Rezeptor (AG 1295), gegen FGF-Rezeptoren (SU 5402) und die PI3-Kinase (Wortmannin).

MAPKK2 wird in 12 Klonen durchschnittlich 20% stärker exprimiert als in der Ausgangszelllinie Hela S3.

Der p38 Inhibitor wurde verwendet, weil in 17 Klonen die MAP-Kinase Kinase 3 etwa 30% stärker exprimiert wird und diese die p38 MAP-Kinase aktiviert (Derijard et al., 1995).

Der Inhibitor AG 1295 wirkt sowohl gegen die α als auch die β -Untereinheit des PDGF-Rezeptors. Die α -Untereinheit wird in 4 Klonen mit 13% über dem Grenzwert für verstärkte Expression exprimiert.

Der Inhibitor SU 5402 wirkt gegen alle FGF-Rezeptoren und wurde verwendet, weil die Expression des FGF-Rezeptor-1 in 8 Klonen 30% und die des FGF-Rezeptors-2 in 7 Klonen 9% über dem Grenzwert für erhöhte Expression liegt.

Als weiterer Inhibitor wurde AG 1478 verwendet, das spezifisch den EGF-Rezeptor hemmt. Der EGF-Rezeptor wird in 6 Klonen 10% über dem Grenzwert exprimiert.

Wortmannin hemmt durch die Inhibition der PI3-Kinase den AKT-Signalweg. AKT1 ist in 16 Klonen 33% stärker exprimiert und AKT2 in 11 Klonen 11%.

Für die Experimente wurden die Klone 14, 19 und 36 verwendet, weil sie die drei Hauptgruppen der Zelllinien repräsentieren, die durch die Gruppierung der Gene und Klone ermittelt wurden (s. Abb. 31).

Abbildung 32 zeigt, daß der EGF-Rezeptor-Inhibitor kaum Einfluß auf die Apoptose der Klone hat. Lediglich in Klon 14 konnte eine leichte Erhöhung der Apoptoserate von etwa 50% festgestellt werden.

Die Hemmung von MAPKK1/2 führt in HeLa S3 und Klon 19 zu einer ähnlichen Steigerung der Apoptoserate von ungefähr 100%. In den Klonen 14 und 36 dagegen bewirkt die Hemmung eine Verdreifachung des Anteils der apoptotischen Zellen. Das heißt, in diesen Klonen trägt die MAPKK1/2 tatsächlich verstärkt zum antiapoptotischen Phänotyp bei.

Der p38 MAP-Kinase Inhibitor SB 202190 bewirkt bei HeLa S3 wie der MAPKK-Inhibitor PD 98059 eine Verdopplung des Anteils apoptotischer Zellen. In Klon 19 bewirkt SB 202190 eine ähnliche Zunahme an apoptotischen Zellen. In den Klonen 14 und 36 bewirkt der Inhibitor dagegen eine Vervierfachung der Apoptoserate.

Hemmung des PDGF-Rezeptors beeinflusst die Apoptoserate in HeLa S3 und Klon 19 wiederum ähnlich (30%ige Steigerung in HeLa S3, 50%ige Steigerung in Klon 19). In Klon 14 konnte eine Vervierfachung des Anteils apoptotischer Zellen beobachtet werden und in Klon 36 eine Verdopplung.

Der FGF-Rezeptor-Inhibitor SU 5402 verursacht eine Verdopplung des Anteils apoptotischer Zellen in HeLa S3, eine Verdreifachung in Klon 19, eine Vervierfachung in Klon 14 und mehr als eine Verdopplung in Klon 36.

Wortmannin führt zu Verdopplungen der Apoptoseraten in HeLa S3 und Klon 19, zu einer Vervierfachung in Klon 14 und nicht ganz zu einer Verdopplung in Klon 36.

Die Klone zeigten damit die erwartete stärkere Induktion der Apoptose bei Hemmung der Signalmoleküle als HeLa S3. Inwieweit sich die Induktion zwischen den Klonen und HeLa unterschied, korrelierte mit der allgemeinen Apoptosesensitivität. Die Klone mit der ausgeprägteren Apoptoseresistenz, Klon 14 und Klon 36, zeigten auch eine stärkere Veränderung der Apoptoserate bei Inkubation mit den Inhibitoren als HeLa S3 und der Klon mit der geringsten Apoptoseresistenz, Klon 19.

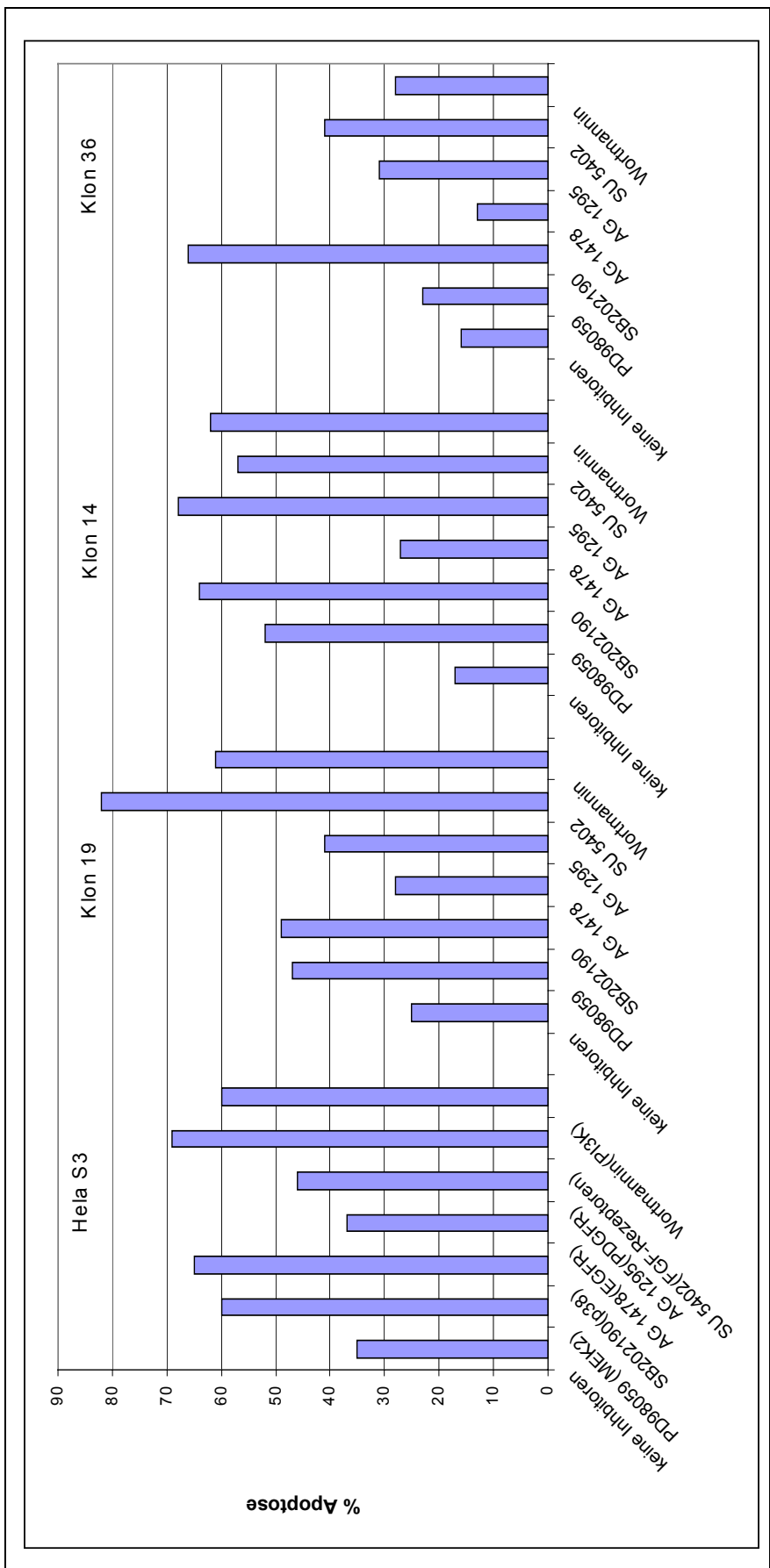


Abb. 32 Hemmung antiapoptotischer Signalwege

70 Prozent konfluente Zellen wurden für 24h in Medium ohne FCS gehungert. Anschließend wurden Inhibitoren und CH-11 (100 ng/ml) hinzugegeben. PD 98059: 50 µM SB202190: 10 µM AG 1478: 250 nM AG 1295: 10 µM SU 5402: 20 µM Wortmannin: 1 µM

4. Diskussion

4.1. Der Mechanismus der c-Kit vermittelten Apoptose

Das Melanom ist eine Hautkrebsart, die durch Entartung von Melanozyten in der Haut entsteht. In den letzten Jahren stieg die Anzahl der diagnostizierten malignen Hautkrebsfälle unter hellhäutigen Menschen stärker an als andere Krebsarten. Bei einer frühen Erkennung, d.h. bevor der Tumor metastatisch und damit maligne wird, sind die Heilungschancen sehr hoch. Wird aber schon metastatischer Tumor diagnostiziert, so besteht kaum Aussicht auf Heilung, weil maligne Melanome nicht gegen bisher verwendete Chemotherapeutika oder Bestrahlung empfindlich sind (Herlyn, 1990). Da Chemotherapeutika und Bestrahlung in Krebszellen durch Auslösen von Apoptose wirken können, scheint die Resistenz der Melanomzellen gegen Apoptose eine Ursache für den geringen Behandlungserfolg zu sein. Eine Wiederherstellung der Apoptoseempfindlichkeit in den Melanomzellen könnte deshalb die Therapie wesentlich verbessern. Die Regulation von Apoptose in Melanomzellen durch die Rezeptortyrosinkinase c-Kit wurde aus diesem Grund näher untersucht.

In diesem Labor und in anderen wurde eine verringerte oder keine nachweisbare Expression von c-Kit in Melanomzellen festgestellt, obwohl dieser Rezeptor in den nicht transformierten parentalen Zellen, den Melanozyten, stark exprimiert wird (Gutman et al., 1994; Lassam and Bickford, 1992; Ohashi et al., 1996; Winkler, 1994). Eine ektopische Reexpression von c-Kit in Melanomzellen und anschließende Stimulation mit SCF führte zu Apoptose (Winkler, 1994). Auch *in vivo* bei Wachstum von c-Kit exprimierenden Zellen in Nacktmäusen konnte vermehrte Apoptose und damit verringertes Wachstum des Tumors beobachtet werden (Huang et al., 1998; Huang et al., 1996). Auf Grund dieser Untersuchungen könnte man c-Kit in Melanozyten als Tumorsuppressor ansehen, der eine Transformation der Zellen verhindert, indem er Apoptose auslöst, wenn die Zellen transformiert werden. Die verminderte Expression von c-Kit wäre demzufolge notwendig, um die Transformation der Melanozyten zu ermöglichen. Eine genauere Kenntnis des Mechanismus der Apoptoseauslösung durch c-Kit könnte weitere Einblicke in die Regulation von Apoptose ermöglichen und Ansatzpunkte für eine Therapie von Melanomen liefern.

Da zuvor die Effekte nur in zwei Zelllinien bei einer hohen ektopischen c-kit Konzentration beobachtet wurden, mußte die physiologische Relevanz der Apoptoseauslösung durch c-Kit zuerst untersucht werden (Winkler, 1994; Huang et al., 1996). Dazu wurden 6 weitere Melanomzelllinien verwendet, die c-Kit ektopisch stabil auf einem Niveau exprimieren, das vergleichbar ist mit dem in Melanozyten. Die Zelllinien waren Paare von jeweils einem primären Melanom und einer Metastase aus 3 Patienten, so daß auch Unterschiede zwischen den Tumorstadien erforscht werden konnten. Bei Stimulation des c-Kit Rezeptors in diesen Zelllinien mit seinem Liganden SCF starben die Zellen oder zeigten eine deutliche Wachstumshemmung. Ein Unterschied zwischen primären und metastatischen Melanomen konnte nicht beobachtet werden. Im Unterschied zu den c-Kit sehr stark exprimierenden Zellen HS 294T pLEN-c-Kit aus der früheren Arbeit (Winkler, 1994), dauerte es mit zwei Wochen doppelt so lange, bis man einen deutlichen Effekt sah. Das zeigt, daß der c-Kit Rezeptor auch bei einer geringeren, physiologischen Konzentration in Melanomzellen apoptotisch wirken konnte und unterstreicht die angenommene Tumorsuppressorfunktion in diesem System.

Drei Bedingungen mußten beachtet werden, damit die Zellen nach SCF-Stimulation starben. Die Zellen mußten bei einer niedrigen FCS-Konzentration gehalten werden, und sie durften nicht zu konfluent werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl FCS als auch Zell-Zell-Kontakte lösen antiapoptotische Signale aus. Die Unterdrückung antiapoptotischer Signale war deshalb eine Voraussetzung für die Auslösung von Apoptose durch SCF. Außerdem durfte das Zellkulturmedium während des Assays nicht gewechselt werden unabhängig davon ob es gegen frisches Medium oder verbrauchtes ausgewechselt wurde. Das heißt, nach SCF-Stimulation akkumuliert ein Faktor im Zellkulturüberstand, der zur Apoptose der Zellen führt. Das würde auch erklären, warum die Zellen so lange mit SCF stimuliert werden müssen (1 Woche, siehe oben), bis sie beginnen zu sterben. Erst nach einer bestimmten Zeit ist die nötige effektive Konzentration des Faktors im Überstand erreicht, die zur Apoptose führt. Ein weiterer Beweis für die Anreicherung eines apoptotischen Faktors im Überstand konnte erbracht werden durch die Wachstumshemmung von c-Kit nicht exprimierenden Melanomzellen durch Inkubation mit SCF-konditioniertem Überstand von c-Kit exprimierenden Melanomzellen. Es wurde Überstand verwendet, der unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurde, unter denen der apoptotische Effekt von SCF detektiert wurde. Der Überstand wurde 4 Tage konditioniert, also gewonnen bevor die ersten Zellen abstarben. Dadurch wurde verhindert, daß eine mögliche

Wachstumshemmung durch den zytotoxischen Zellinhalt der sterbenden Zellen verursacht wurde. Das Wachstum mit dem konditionierten Überstand wurde reproduzierbar um 20-30% verringert.

Es sind einige Liganden bekannt, die Apoptose oder Wachstumshemmung auslösen können und deshalb in den Melanomzellen nach Stimulation mit SCF sezerniert werden könnten. Dazu zählen Liganden der TNF-Familie, die Apoptose auslösen können wie TNF- α , Fas-L und TRAIL (Dollbaum et al., 1988; Suda et al., 1993; Wiley et al., 1995) und die Zytokine TGF- β , OSM, IL-1, INF- α und INF- γ , die das Wachstum von Zellen hemmen und ebenfalls apoptotisch wirken können (Hayashi et al., 1997; Manning et al., 1991; Zarling et al., 1986). Die genannten Zytokine wurden auf ihren Einfluß gegenüber dem Wachstum der Melanomzellen getestet. Der Effekt mit SCF konnte aber trotz Einsatz sehr hoher Zytokinkonzentrationen nicht nachgeahmt werden. Da keiner der getesteten bekannten Liganden für das Absterben bei SCF-Stimulation verantwortlich sein kann, besteht die Möglichkeit, daß ein noch unbekannter Ligand in diesem System apoptotisch wirkt.

Der Ligand wurde proteinchemisch teilweise aufgereinigt. Dazu wurde der konditionierte Zellkulturüberstand nach Konzentration mittels Lyophilisation durch Gelfiltration fraktioniert. Der Test der Fraktionen ergab eine sehr aktive Fraktion bei einer Größe von rund 14 kDa. Diese Fraktion führte zum Tod aller Zellen innerhalb von 8 Stunden. Damit war sie wesentlich aktiver als der unkonzentrierte Überstand. Die Aufreinigung und nicht die stärkere Konzentration bewirkte die erhöhte Aktivität der Fraktion gegenüber dem konditionierten Überstand, da eine Zurückverdünnung der Fraktion auf ein Viertel der Konzentration im Überstand die Aktivität nicht vollständig hemmte. Daß die Zellen wirklich apoptotisch wurden, bewies ein TUNEL-Assay.

Interessanterweise war die apoptotische Fraktion kaum aktiv gegenüber Melanozyten. Darum könnte der gesuchte Ligand die Tumorsuppressorfunktion ausüben. Wenn eine einzelne Melanozytenzelle entartet wie es zum Anfang der Krebsentstehung der Fall ist, könnte das bei anhaltender Expression von c-Kit zur Sekretion des Liganden führen. Dieser würde nur die sich entwickelnde Melanomzelle abtöten und den umliegenden gesunden Melanozyten nicht schaden.

In einem SDS-Polyacrylamidgel der apoptotischen Fraktion von konditioniertem Medium und der gleichen nicht-apoptotischen Fraktion aus nicht konditioniertem Medium konnten 2 Banden bei 14 und 55 kDa in der Bahn der apoptotischen

Fraktion detektiert werden. Die Proteinmenge in der apoptotischen Fraktion war jedoch nicht ausreichend für eine Sequenzierung und Identifizierung.

Die teilweise Reinigung durch Gelfiltration war nur schlecht reproduzierbar (etwa einer von 8 Versuchen gelang), weil in den aufgetrennten Fraktionen oft keine Aktivität mehr feststellbar war. Möglicherweise war der nicht kontrollierbare Schritt das Einfrieren des Überstandes vor der Lyophilisation oder die Lyophilisation selber. Einfrieren von Proteinen kann ihre Sekundärstruktur ändern, so daß die Proteine ihre Aktivität verlieren. Wegen dieser Schwierigkeiten wurden andere Möglichkeiten zur Konzentration des Überstandes und auch als alternative erste Reinigungsschritte probiert. Dazu gehörten Ultrafiltration, Ionenaustausch, Hydrophobe Interaktionschromatographie und Lektin-Affinitätschromatographie. Lediglich die Ultrafiltration des konditionierten Überstandes erhöhte dessen zytotoxische Aktivität beträchtlich. Keine der anschließenden Reinigungsschritte war aber erfolgreich. Allerdings wurden jeweils höchstens 200 ml Überstand eingesetzt, weil für die Lyophilisation und Gelfiltration nur 50 ml ausreichten, um die apoptotische Fraktion zu erhalten. Im Nachhinein läßt sich sagen, daß möglicherweise diese Menge nicht ausreichte, weil die Reinheit der apoptotischen Fraktion nach der Gelfiltration, die zu der Aktivitätssteigerung führte (siehe oben), durch die anderen Methoden nicht erreicht wurde.

Die Identität des gesuchten neuen apoptotischen Liganden kann erst durch eine Ansequenzierung des Proteins geklärt werden. Durch anschließende Klonierung und Expression kann der Ligand dann näher untersucht werden. Eine Methode zur Identifizierung des Liganden wäre die 2D-Gelelektrophorese. Durch Auftrennung der Proteine im Überstand von SCF-konditioniertem und nicht konditioniertem Zellkulturüberstand sollten Spots erkennbar sein, die in konditioniertem aber nicht in unkonditioniertem Überstand vorkommen. Diese Proteine wären Kandidaten für den Liganden und damit einer Ansequenzierung. Ein neuer apoptotischer Ligand, der Tumorzellen, aber nicht normalen Zellen angreift, wäre auch von beträchtlichem therapeutischen Potential. Zur Zeit ist nur ein solcher Ligand bekannt und in präklinischer Entwicklung: TRAIL. TRAIL wurde aber in diesem System ausgeschlossen.

c-Kit gehört durch seine potentielle Tumorsuppressorfunktion in Melanomzellen zu einer Reihe von Genen, die sowohl Krebs fördern als auch unterdrücken können. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren c-myc und E2F-1 und der EGF-Rezeptor. Die verstärkte Expression oder Mutation des EGF-Rezeptor ist mit mehreren

Krebsarten wie z. B. Glioblastoma und Plattenepithelkarzinomen assoziiert (Liebermann et al., 1985a; Liebermann et al., 1985b; Ullrich et al., 1984). Außerdem kann die Aktivierung des Rezeptors in einigen Zellen antiapoptotisch wirken (Baker and Yu, 2001; Leu et al., 2000; Miyoshi et al., 1997; Sibia et al., 2000). In bestimmten Krebszelllinien, die den Rezeptor sehr stark überexprimieren, kann der EGFR aber auch Apoptose auslösen. Die Expression von c-myc und E2F-1 verursacht ebenfalls nur unter bestimmten Bedingungen Apoptose. c-myc verursacht Apoptose bei Serumentzug während E2F-1 in einem pRb negativen genetischen Hintergrund Zelltod induziert (Almasan et al., 1995). Alle diese Untersuchungen und die vorliegende Arbeit unterstreichen, daß die Definition eines Signals von der zellulären Umgebung bestimmt wird. Die verstärkte Aktivität wachstumsfördernder Enzyme kann ein apoptotisches Signal auslösen, wenn die Gefahr der Entartung der Zelle besteht. Damit Krebs fortschreiten kann, müssen dieses und andere apoptotische Signale, verursacht durch das Immunsystem oder das Wachstum in einer fremden Umgebung im Körper, unterdrückt werden. Für eine Therapie könnte es somit möglicherweise ausreichen, die Unterdrückung der apoptotischen Signale aufzuheben, um die Krebszelle abzutöten (Evan and Vousden, 2001). Im vorliegenden Fall von c-Kit scheint die Stimulation des Rezeptors, die zur Sezernierung eines apoptotischen Faktors führt, das apoptotische Signal zu sein, das in Krebszellen durch Erniedrigung der Expression des Rezeptors unterdrückt werden muß.

4.2. Funktionelle Expressionsanalyse apoptoseresistenter Zellen

In zusätzlichen Untersuchungen wurden weitere Mechanismen der Apoptoseresistenz in Krebszellen gefunden. Es wurden Gene gesucht, die wie c-Kit in Melanomzellen durch eine veränderte Expression die Empfindlichkeit von Krebszellen gegenüber Apoptose vermindern. Dazu wurde eine Strategie verwandt, die Krebszellen *in vitro* einer ähnlichen Selektion auf Apoptoseresistenz unterwirft wie im Körper. Die so selektionierten Zellen sollten daher auch den Krebszellen ähneln, die im menschlichen Organismus die *in vivo* Selektion auf Apoptoseresistenz überstanden und daher die größte Gefahr darstellen.

Nach der Selektion wurden klonale Zelllinien gewonnen, die resistenter gegen Apoptose sind als die Ausgangszelllinie. Daß in den Klonen, wenn auch schwerer, immer noch Apoptose induziert werden konnte, bewies, daß der Apoptosemechanismus selber funktionierte. Die Steuerung der Apoptose mußte sich deshalb im Vergleich mit der Ausgangszelllinie unterscheiden. Apoptose wurde durch die Stimulation des Fas-Rezeptors in den Plattenepithelkarzinomzellen Hela S3 ausgelöst. Somit waren die Klone resistenter gegen Fas-vermittelte Apoptose. Die Apoptoseauslöser TNF- α und Cisplatin waren ebenfalls wirksamer in der Ausgangszelllinie Hela S3 als in den Klonen, ein anderer Apoptoseauslöser – Taxol – dagegen nicht. Der TNF-Rezeptor gehört zur gleichen Rezeptorfamilie wie Fas und bewirkt Apoptose durch ähnliche Signalwege (Nagata, 1999). Cisplatin ist ein Chemotherapeutikum, das zur Behandlung von Gebärmutterkrebs wie dem Tumor, aus dem HelaS3 isoliert wurde, verwendet wird (Morris et al., 1999). Es bewirkt Schäden in der DNA während der Zellteilung, die zur Apoptose der Zellen führen (Gong et al., 1999). Die Crossresistenz der Klone gegen die Apoptoseauslöser offenbart, daß in den Fas-resistenten Klonen Signalwege verstärkt sind, die Apoptose durch verschiedene (TNF- α , Cisplatin und Taxol) Auslöser hemmen können.

Die mRNA-Expressionsprofile von 700 Genen der Klone und der Ausgangszelllinie HelaS3 wurden mit Hilfe von cDNA-arrays verglichen. Eine unterschiedliche Expression von bestimmten Genen in den Klonen verglichen mit Hela S3 könnte die Ursache für den antiapoptotischen Phänotyp der Klone sein. Die untersuchten Gene waren hauptsächlich Proteinkinasen- und phosphatasen. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle in allen signalverarbeitenden Prozessen in der Zelle so auch bei

Apoptose (s. 1.3.2.). Darüberhinaus weiß man, wie Mutanten herzustellen sind (durch Austausch des Lysins/Cysteins im reaktiven Zentrum der Kinasen/Phosphatasen), die bei Expression den Wildtyp hemmen und einen pro-oder antiapoptotischen Einfluß des Enzyms bestätigen können.

Es wurden etwa 300 Gene mit einer unterschiedlichen Expression in den Klonen verglichen mit HeLa S3 gefunden. Übereinstimmend mit der nicht vollständigen Apoptoseresistenz der Klone und der morphologischen Ähnlichkeit mit HeLa S3 waren die ermittelten Expressionsunterschiede nicht sehr hoch. Allgemein wurden mehr Gene gefunden, die eine niedrigere Expression in den Klonen aufzeigten als eine höhere, und die Expression dieser Gene unterschied sich stärker von der in HeLa S3 als bei den hochregulierten Genen. Dieser Unterschied läßt sich nur dadurch erklären, daß während der RNA – und cDNA Präparation etwas RNA oder cDNA unspezifisch abgebaut wurde, was zu tendentiell geringeren Signalen führte. Wenn ein Gen daher in den HeLa S3 cDNA's weniger abgebaut wurde, war die Wahrscheinlichkeit größer, daß es in den Klonen ein schwächeres Signal ergab als ein stärkeres. Es muß an dieser Stelle aber betont werden, daß die Kontrolle der Gesamt-RNA, Poly-A⁺-RNA und cDNA durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung keinen Hinweis auf eine verstärkte Degradation lieferte. Der Abbau muß daher ein geringes Ausmaß haben.

In Tabelle 5 und 6 sind die Gene, die in den Klonen anders exprimiert werden als in der Ausgangszelllinie HeLa S3, aufgeführt. Die Gene sind nach der Anzahl der Klone, in denen eine veränderte Expression festgestellt wurde, angeordnet. Wegen der (wenn auch geringen) Fehler bei den RNA-Präparationen sind die Daten für unterschiedlich regulierte Gene je besser in desto mehr Klonen das jeweilige Gen verstärkt oder vermindert exprimiert wird, weil die Wahrscheinlichkeit, daß der Wert von einem zufälligen Fehler (wie z.B. geringe RNA-Degradation) verursacht wurde, mit steigender Anzahl der RNA-Präparationen sinkt. Aus diesem Grund wurden für weitere Betrachtungen nicht alle 300 gefundenen unterschiedlich exprimierten Gene verwendet, sondern nur die 65 Gene, die in den meisten Klonen jeweils verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Zur weiteren Kontrolle der Güte der Daten wurde in der vorhandenen Literatur gesucht, ob diese Gene schon mit der Regulation von Apoptose in Verbindung gebracht wurden, ob sie pro-oder antiapoptotisch oder abhängig von den experimentellen Bedingungen sowohl pro-als auch antiapoptotisch wirken können. In der Liste der stärker exprimierten Gene sollten die antiapoptotischen Gene überwiegen und in der Liste der schwächer exprimierten Gene die proapoptotischen. Die verwendeten Artikel wurden nicht hinsichtlich ihrer

Qualität beurteilt, um eine subjektive Verfälschung zu verhindern. Es wurden jedoch nur Zeitschriften mit einem hohen „impact-Faktor“ verwendet (siehe Erklärung zu den Tabellen). Folgende Verteilungen wurden gefunden:

Induzierte Gene

| | |
|----------------------|---------|
| proapoptotisch: | 4 Gene |
| pro/antiapoptotisch: | 6 Gene |
| antiapoptotisch: | 18 Gene |

Reduzierte Gene

| | |
|----------------------|--------|
| proapoptotisch: | 9 Gene |
| pro/antiapoptotisch: | 3 Gene |
| antiapoptotisch: | 3 Gene |

Es zeigt sich, daß die erwarteten Verteilungen zutreffen. Die Liste der induzierten Gene enthält wesentlich mehr bekannte antiapoptotische Gene als proapoptotische. Bei der Liste der reduzierten Gene ist es umgekehrt. Die Liste der induzierten Gene enthält anscheinend die zuverlässigeren Daten weil hier mehr als viermal so viele antiapoptotische Gene gefunden wurden wie proapoptotische. Die Liste der reduzierten Gene enthält lediglich 3 mal so viele proapoptotische Gene wie antiapoptotische. Diese Beobachtung deckt sich mit den obigen Ausführungen zur Gesamtzahl der gefundenen reduzierten Gene und der Qualität der RNA-Präparation. Außerdem wurden mehr induzierte Gene gefunden, die bekanntermaßen einen Einfluß auf Apoptose haben, als reduzierte Gene. Vielleicht ist aber auch allgemein mehr über Gene bekannt, die eine antiapoptotische Wirkung haben, weil diese Gene experimentell zugänglicher sind. Übereinstimmend mit der Annahme, daß die Daten je zuverlässiger sind in desto mehr Klonen ein Gen unterschiedlich exprimiert wird, ist die Dichte der anti-bzw. proapoptotischen Gene an der Spitze der Tabellen für induzierte und reduzierte Gene am größten. Dort besteht demzufolge auch die hohe Wahrscheinlichkeit, daß die Gene, die noch nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht wurden, tatsächlich eine anti-bzw. proapoptotische Rolle spielen. Warum auch Gene, die proapoptotisch wirken wie z. B. Dap-Kinase, in den Klonen verstärkt exprimiert werden, ist noch ungeklärt. Möglicherweise werden pro- und antiapoptotische Gene immer zusammen reguliert, in den resistenten Klonen überwiegen aber die antiapoptotischen Gene. Beispielsweise könnte die apoptotische Wirkung des Tumorsuppressors Dap-Kinase durch die Expression antiapoptotischer Gene gehemmt werden. Vielleicht ist DAP-Kinase in den Klonen auch mutiert, so daß

die Kinase dominant negativ auf ihren Signalweg wirkt. Folgende Bezeichnungen wurden verwendet:

LIG: Ligand
MP: Metalloprotease oder Metalloprotease assoziiert
OT: andere
STK: Serin/Threonin Kinase
STYK: dualspezifische Kinase
YK: Tyrosin Kinase
STP: Serin/Threonin Phosphatase
YP: Tyrosin Phosphatase
STYP: dualspezifische Phosphatase

| Gen | Genbank Nr. | pro-oder antiapoptotisch nach Literatur | Erklärung | Referenz | Anzahl der Klone mit erhöhter Expression | % über Grenzwert für erhöhte Expression | Normalisiertes Volumen in diesen Klone |
|--------------------|-------------|---|---|--|--|---|--|
| MP_MMP-15 | Z48482 | | Transmembran-Metalloprotease, prozessiert wahrscheinlich pro-Gelatinase A (MMP-2) | (Butler et al., 1997; Will and Hinzmann, 1995) | 20 | 82 | 8,3 |
| MP_TIMP-1 | X03124 | anti | hemmt verschiedene Metalloproteasen, wirkt mitogen und/oder antiapoptotisch in verschiedenen Zellen | (Alexander et al., 1996; Li et al., 1999b) | 18 | 180 | 2,1 |
| STK_MAPKK3 | 4506098 | pro/anti | aktiviert p38 MAP-Kinase | (Derjard et al., 1995; Ichijo et al., 1997; Moriguchi et al., 1996; Rane et al., 2001) | 17 | 34 | 5,9 |
| STP_PPX | X70218 | anti | nukleär, lokalisiert an Centrosomen, aktiviert NFκB durch Dephosphorylierung von NFκB | (Hu et al., 1998) | 17 | 18 | 23,5 |
| STK_GRK6 | L16862 | anti | phosphoryliert und desensitiviert Agonist-gebundene G-Protein gekoppelte Rezeptoren | (Dale et al., 2000) | 16 | 71 | 10,5 |
| OT_MHC-1 | M11886 | | präsentiert Antigene auf der Zelloberfläche | | 16 | 44 | 141,8 |
| STK_Rac-alpha/Akt1 | M63167 | anti | phosphoryliert Bad, Caspase-9, FKHRL-1, IKK-α | siehe Abb.2 und Abschnitt 1.3.2. | 16 | 33 | 10,8 |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|----------|---|---|----|-----|------|
| STK_IRAK-2 | AF026273 | anti | assoziiert mit Interleukin-Rezeptoren, deren Aktivierung zur NF- κ B-Aktivierung führen kann | (Li et al., 2001b; Muzio et al., 1997) | 15 | 79 | 3,8 |
| OT_EF-2 | XM031904 | | Translations-Elongationsfaktor-2 | (Kohno et al., 1986) | 15 | 30 | 32,5 |
| OT_Vimentin | X56134 | | Intermediäres Filament | | 15 | 14 | 57,4 |
| GP_alphaI2 | NM002070 | | alpha-Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen, kann Adenylatzyklase inhibieren und MAP-Kinase aktivieren | (Bokoch and Gilman, 1984; Didsbury et al., 1987; Sullivan et al., 1986; Williams et al., 1998) | 14 | 42 | 21,3 |
| STK_PKNalpha | D26181 | | Kinase-Domäne verwandt mit PKC, Rho und Fettsäure aktiviert, Spaltung durch Caspasen führt zur Aktivierung | (Mukai et al., 1994; Mukai and Ono, 1994; Takahashi et al., 1998; Watanabe et al., 1996; Wick et al., 2000) | 14 | 34 | 21,5 |
| MP_TIMP-3 | U67195 | pro | Überexpression kann Apoptose auslösen | (Ahonen et al., 1998) | 14 | 26 | 6,9 |
| LIG_IL1-beta | XM031214 | anti | aktiviert Interleukin-1 Rezeptor | (Kofhny-Wilkes et al., 1999; Li et al., 2001b; McConkey et al., 1990) | 13 | 573 | 1,0 |
| MP_MMP-3 | X05232 | pro/anti | Degradation der extrazellulären Matrix durch MMP-3 kann antiapoptotischen Effekt der ECM hemmen, in vivo Expression von MMP-3 in Tumorzellen umgebenden Fibroblasten reduziert Apoptose | (Boudreau et al., 1995; Boulay et al., 2001; Sternlicht et al., 1999; Witty et al., 1995) | 13 | 62 | 2,5 |
| STYP_CDC25B | M81934 | | dualspezifisch, aktiviert Zellzyklusübergang von G2 nach M durch Dephosphorylierung von cdc-2, Überexpression bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen führt zu vermehrter Apoptose | (Galaktionov and Beach, 1991; Honda et al., 1993; Miyata et al., 2001; Sebastian et al., 1993) | 13 | 30 | 3,6 |

| | | | | | | | | |
|--------------|----------|----------|--|--|--|----|----|------|
| STP_PP5_1_3 | X89416 | | | nuklär, bindet and den Glucocorticoid-Rezeptor und verhindert Wachstumshemmung durch den Rezeptor | (Chen et al., 1994; Silverstein et al., 1997; Zuo et al., 1999) | 13 | 22 | 3,1 |
| STK_MAST205 | 6678957 | | | bindet an Mikrotubuli und $\beta 2$ -Syntrophin | (Lumeng et al., 1999; Walden and Cowan, 1993) | 13 | 20 | 5,9 |
| YK_RON | X70040 | pro/anti | | verwandt mit c-met, Rezeptor für macrophage stimulating protein, abhängig vom Zelltyp führt Überexpression und Stimulation zu Wachstum oder Apoptose | (Gaudino et al., 1994; Iwama et al., 1996; Ronsin et al., 1993; Wang et al., 1994) | 13 | 18 | 4,3 |
| MP_ADAM8 | NM001109 | | | induziert durch TNF- α | (Schlommann et al., 2000; Yoshiyama et al., 1997) | 13 | 18 | 23,7 |
| LIG_TGFalpha | AH003012 | anti | | aktiviert den EGF-Rezeptor und Her2-Heterodimere | (Davis et al., 2001; Dent et al., 1999; Leu et al., 2000) | 12 | 78 | 0,5 |
| MP_TIMP-2 | S48568 | | | trägt zur Aktivierung von pro-Gelatinase A in Komplex mit MMP-14 bei, kann mitogen wirken | (Hayakawa et al., 1994; Wang et al., 2000c; Zucker et al., 1998) | 12 | 37 | 12,2 |
| STK_DAPK | X76104 | pro | | vermittelt Apoptose durch Fas und IFN- γ , mit Mikrotubuli assoziiert, kann als Tumorsuppressor wirken | (Cohen et al., 1999; Inbal et al., 1997; Raveh et al., 2001) | 12 | 35 | 8,8 |
| STK_MAPKK6 | U39657 | | | bindet MAPKK5/ASK1 | (Wang et al., 1998b) | 12 | 33 | 2,7 |
| MP_ADAM15 | NM003815 | | | bindet an Integrine | (Kratzschmar et al., 1996; Nath et al., 1999) | 12 | 32 | 6,6 |
| OT_Bcl-x | Z23115 | anti | | beeinflusst Apoptose durch Hemmung der Freisetzung von proapoptischen mitochondrialen Faktoren | siehe Abb.1 und Abschnitt 1.2. | 12 | 26 | 10,3 |

| | | | | | | | | |
|--------------|-----------|----------|--|--|--|----|----|------|
| STK_PLK-1 | L19559 | | | Expression ist prognostischer Marker für Plattenepithelkarzinome, essentiell für Pro-Phase der Mitose, wird nach DNA-Schäden aktiviert | (Knecht et al., 1999; Smits et al., 2000; Toyoshima-Morimoto et al., 2001) | 12 | 21 | 26,5 |
| STYK_MAPKK2 | L11285 | pro/anti | | dualspezifisch, aktiviert Erk1/2 | (Wang et al., 2000b; Yujiri et al., 1998) | 12 | 21 | 14,9 |
| YK_EphA2 | M59371 | | | spielt eine Rolle bei der gegenseitigen Abstoßung von Nervenzellen während der Embryonalentwicklung, hemmt MAPK-Aktivierung durch PDGF und EGF | (Miao et al., 2000; Miao et al., 2001; Schmucker and Zipursky, 2001) | 12 | 16 | 9,9 |
| AD_SHB | NM003028 | | | SH2-Domän enthaltendes Adapterprotein | (Welsh et al., 1994) | 12 | 15 | 6,3 |
| OT_Furin | NM000439 | anti | | Protease, die Profaktoren von Hormonen, Wachstumsfaktoren und anderen Proteasen im Golgi-Apparat prozessiert | (Khatib et al., 2001) | 11 | 60 | 1,6 |
| STK_PKNbeta | AB019692 | | | homolog zu PKNalpha, aber anderes Expressionsmuster – nicht exprimiert in adultem gesundem Gewebe, sondern in Krebszellen | (Oishi et al., 1999) | 11 | 49 | 1,6 |
| YP_PTP-Meg2 | M83738 | | | zytosolische Tyrosin-Phosphatase | (Gu et al., 1992) | 11 | 42 | 2,2 |
| OT_VHL | NM_000551 | | | Tumorsuppressor, der in einem Komplex mit Ubiquitin-Ligase vorliegt | (Kibel et al., 1995; Maxwell et al., 1999; Stebbins et al., 1999) | 11 | 40 | 1,5 |
| STK_Bcr | X02596 | | | besitzt Serin/Threonin-Kinase –Aktivität und GAP-Aktivität für p21rac | (Diekmann et al., 1991; Maru and Witte, 1991) | 13 | 32 | 3,2 |
| YK_Hy1 | X77278 | | | zytoplasmatische Tyrosin-Kinase mit Homologie zu CSK, einer Kinase, die src-Kinasen phosphoryliert und deaktiviert | (Sakano et al., 1994) | 11 | 18 | 8,4 |
| STK_AKT2 | M95936 | anti | | Homolog von Akt1 | (Staal, 1987; Xiao et al., 2001) | 11 | 12 | 6,9 |
| STK_MAPKAPK2 | NM032960 | | | aktiviert von p38 MAP-Kinase, kann als PDK2 für Akt wirken | (Rane et al., 2001; Rouse et al., 1994) | 11 | 10 | 6,5 |

| | | | | | | | | |
|----------------|---------|----------|--|--|--|----|-----|-------|
| OT_neuroleukin | K03515 | | | neurotropher Ligand, Gesamt mRNA kodiert auch für Phosphohexose-Isomerase | (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988; Gurney et al., 1986a, Gurney et al., 1986b) | 11 | 10 | 83,7 |
| STK_MSTH1 | Z48615 | pro | | aktiviert durch Caspase-Spaltung, kann JNK aktivieren als MAPKKK über SEK1 | (Lee et al., 2001; Watabe et al., 2000) | 10 | 255 | 0,4 |
| STK_RSK | L07597 | anti | | MAPKAP-Kinase aktiviert von ERK1/2, phosphoryliert und inaktiviert BAD | siehe Abb. 2 und Abschnitt 1.3.2. | 10 | 43 | 9,4 |
| STK_MLK3 | U07747 | pro/anti | | MAPKKK, aktiviert JNK, wird selber über rac/cdc42 aktiviert, aktiviert NF κ B durch Phosphorylierung und Aktivierung von IKK α | (Hehner et al., 2000; Tibbles et al., 1996; Xu et al., 2001) | 10 | 35 | 5,1 |
| YP_PCP-2 | X97198 | | | Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase mit MAM-Domäne | (Wang et al., 1996b) | 10 | 30 | 3,6 |
| OT_rS9 | 4506744 | | | ribosomales Protein 9 | (Frigerio et al., 1995) | 10 | 16 | 274,8 |
| YP_PTPsigma | U35234 | | | Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase der LAR-Familie, wichtig während der embryonalen Gehirnentwicklung | (Elchebly et al., 1999; Yan et al., 1993) | 9 | 109 | 0,4 |
| STK_KIAA0135 | D50925 | | | wahrscheinlich Serin/Threonin-Kinase | (Nagase et al., 1995) | 9 | 33 | 0,6 |
| STK_ERK1 | X60188 | anti | | MAP-Kinase, wirkt antiapoptotisch über transkriptionsabhängige und unabhängige Wege | siehe Abb 2 und Abschnitt 1.3.2. | 9 | 31 | 5,3 |
| STK_beta-ARK-1 | X61157 | | | phosphoryliert und desensitiviert den Adrenalin-gebundenen β -adrenergen-Rezeptor | (Benovic et al., 1989; Benovic et al., 1987) | 9 | 25 | 3,3 |
| YK_Tyk-2 | X54637 | | | zytoplasmatische Tyrosin-Kinase, homolog mit JAK-Kinasen | (Bernards, 1991; Colamonici et al., 1994; Stahl et al., 1994) | 9 | 20 | 4,5 |
| STK_IRAK | L76191 | anti | | Interleukin-Rezeptor-assoziierte Kinase, vermittelt NF κ B-Aktivierung | (Cao et al., 1996; Li et al., 2001b; Muzio et al., 1997) | 9 | 20 | 26,1 |
| YP_PTP-J | U73727 | | | Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase mit MAM-Domäne | (Wang et al., 1997) | 9 | 19 | 5,0 |

| | | | | | | | | |
|------------------|----------|----------|--|--|---|---|----|-----|
| OT_IL-4Stat | U16031 | | | vermittelt Signale durch IL-4, kann Apoptose durch Fas in IL-15 stimulierten Maus-Mastzellen hemmen | (Masuda et al., 2001; Takeda et al., 1996) | 9 | 18 | 8,8 |
| YK_Rse/sky/tyro3 | U05682 | anti | | Rezeptortyrosinkinase mit Funktion während der Spermatogenese und Knochenresorption, hoch exprimiert in Brusttumoren | (Lu et al., 1999; Mark et al., 1994; Stitt et al., 1995; Taylor et al., 1995) | 9 | 14 | 5,6 |
| STK_JNKK2alpha | AF022805 | pro/anti | | MAPKK, aktiviert JNK, wichtig für Überleben von T-Zellen während der Embryonalentwicklung | (Nishina et al., 1997; Wu et al., 1997; Yang et al., 1998) | 9 | 9 | 6,4 |
| STK_MAPKK5 | U25265 | | | aktiviert Erk5/Bmk | (Kato et al., 1997; Kato et al., 1998; Zhou et al., 1995) | 9 | 7 | 2,6 |
| YK_ITK | D13720 | | | zytoplasmatische Tyrosin-Kinase, spezifisch für T-Zellen, gehört zur Familie der Tec-kinasen | (Siliciano et al., 1992; Tanaka et al., 1993) | 8 | 46 | 0,5 |
| LIG_VEGF | NM003376 | anti | | Ligand, bindet an FLK-1 | (Alon et al., 1995; Gerber et al., 1998; Millauer et al., 1993) | 8 | 34 | 1,3 |
| STK_MSK2 | AF074393 | | | aktiviert von p38 und Erk1/2 Map-Kinasen | (Deak et al., 1998b) | 8 | 30 | 4,8 |
| YK_FGFR | X52833 | anti | | Rezeptortyrosinkinase | (Chow et al., 1995; Fox and Shanley, 1996; Fuks et al., 1994) | 8 | 29 | 2,0 |
| STK_PIM-2h | U77735 | | | hochreguliert von NFκB | (Baytel et al., 1998; Li et al., 2001a) | 8 | 18 | 4,0 |
| YK_Pyk-2 | U33284 | pro | | zytoplasmatische Tyrosinkinase, Überexpression kann zu Apoptose führen | (Pandey et al., 1999; Xiong and Parsons, 1997) | 8 | 18 | 3,1 |
| STK_CKII-alpha | J02853 | | | aktiviert NFκB durch Phosphorylierung von rel/p65 | (Wang et al., 2000a) | 8 | 17 | 7,6 |
| STK_CAMKK | AF287630 | anti | | phosphoryliert und aktiviert Akt1 | (Yano et al., 1998) | 8 | 16 | 2,2 |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|------|--|--|---|----|-----|
| YK_Csk | X59932 | | phosphoryliert und hemmt src-Kinasen | (Imamoto and Soriano, 1993; Nada et al., 1993) | 8 | 15 | 9,3 |
| STK_IKKgamma | AF074382 | anti | ist Teil des IkappaB-Kinase Komplexes bestehend aus IKKalpha, IKKbeta und IKKgamma | (Rothwarf et al., 1998) | 8 | 13 | 4,7 |

Tabelle 5 Stärker exprimierte Gene

Nur Gene, von denen beide Punkte einer Sonde über dem Grenzwert für erhöhte Expression lagen, wurden in die Liste aufgenommen. Für die Anzahl der Klone mit erhöhter Expression wurde der Durchschnitt aus beiden Punkten einer Sonde gebildet und gegebenenfalls aufgerundet (Bsp.: 16,5 Klone wurde zu 17 Klonen). Nur die in der Tabelle am weitesten oben stehende Sonde eines Gens wurde in der Tabelle belassen. Die prozentuale Steigerung über dem Grenzwert bezeichnet den Median der Steigerungen in den Klonen mit erhöhter Expression.

Zur Literaturrecherche wurden folgende Zeitschriften verwendet:

| | |
|------------------------|---|
| Nature | EMBO Journal |
| Nature Medicine | Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. |
| Nature Genetics | Journal of Cell Biology |
| Nature Cell Biology | Molecular and Cellular Biology |
| Cell | Journal of Biological Chemistry |
| Molecular Cell Science | Biochemistry |
| | Cancer Research |
| | Developme |

| Gen | Genbank Nr. | pro-oder antiapoptisch nach Literatur | Erklärung | Referenz | Anzahl der Klone mit verminderter Expression | % unter Grenzwert für verminderte Expression | Normalisiertes Volumen in der Referenzlinie (Hela S3) |
|-------------------------------------|-------------|---------------------------------------|--|---|--|--|---|
| STK_Ndr | Z35102 | | nukleäre Phosphatase, aktiviert durch Anstieg der Kalziumkonzentration | (Millward et al., 1995; Millward et al., 1998) | 20 | 59 | 5,7 |
| STK_ERK3 | X80692 | | konstitutiv nukleäre MAP-Kinase | (Boulton et al., 1991; Cheng et al., 1996) | 19 | 159 | 5,6 |
| OT_Topoisomerase2 | NM001068 | | Topoisomerase2-Inhibitoren werden als Chemotherapeutika gegen Krebs verwendet (Doxorubicin, Etoposide) | (Hande, 1998) | 19 | 143 | 43,7 |
| YP_AZP- ISredacidphosphatas e | M83653 | | zytoplasmatische Phosphotyrosyl Protein-Phosphatase | (Wo et al., 1992) | 19 | 92 | 15,7 |
| STP_PP1-Cbeta | X80910 | | katalytische Untereinheit von PP1, wird von Ceramid aktiviert | (Haystead et al., 1989; Kishikawa et al., 1999) | 19 | 45 | 31,5 |
| OT_PCNA | 4505640 | | Proliferating Cellular Nuclear Antigen | (Warbrick, 2000) | 19 | 27 | 23,7 |
| STK_p160ROCK | U43195 | pro | Caspase-Spaltung führt zur Aktivierung, die für Membranausstülpungen während der Apoptose verantwortlich ist | (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001) | 19 | 333 | 3,0 |
| YP_TC-PTP | M25393 | | lokalisiert an ER und im Zellkern, hemmt PI3K-Signalwege nach EGF-Stimulation | (Tiganis et al., 1998; Tiganis et al., 1999) | 19 | 155 | 3,9 |

| | | | | | | | |
|--|----------|------|--|---|----|-----|------|
| STK_CHK1 | AF016582 | | nach DNA-Schäden benötigt für Halt im Zellzyklus bei G2/M, phosphoryliert wee1 und cdc25 | (Fumari et al., 1997; Mai-land et al., 2000; Sanchez et al., 1997) | 18 | 104 | 3,9 |
| STK_AMP-activatedpro-teinkinasealpha1subunit | AF100763 | | phosphoryliert und deaktiviert Acetyl-CoA Carboxylase | (Kudo et al., 1995) | 18 | 81 | 7,1 |
| PP_YVH1 | AF119226 | | Dual-spezifische Phosphatase | (Muda et al., 1999) | 18 | 72 | 11,5 |
| STK_PRK-2 | U33052 | pro | Protein-Kinase-C-verwandt, Caspase-Spaltung führt zur Aktivierung, phosphoryliert und deaktiviert anschließend Akt | (Cryns et al., 1997; Koh et al., 2000) | 18 | 57 | 6,2 |
| STK_hSLK | AB002804 | pro | verwandt mit S. cerevisiae Ste20, Caspase-Spaltung führt zu cytoskeletalen Veränderungen | (Sabourin et al., 2000) | 18 | 177 | 2,3 |
| STK_WEE1 | X62048 | | inhibiert G2/M Übergang, phosphoryliert und inaktiviert cdc2 | (Igarashi et al., 1991; Lundgren et al., 1991; Russell and Nurse, 1987) | 18 | 73 | 3,9 |
| STK_CKI-alpha | X80693 | | an Wnt-Signalweg beteiligt, phosphoryliert und hemmt nukleären Transport von NF-AT4 | (Peters et al., 1999; Zhu et al., 1998) | 18 | 49 | 21,3 |
| OT_BRCA1 | 4502448 | pro | Tumorsuppressor, aktiviert JNK | (Harkin et al., 1999) | 17 | 99 | 6,3 |
| STK_RICK | AF027706 | pro | bindet CLARP, das an FADD bindet und Apoptose durch Fas auslöst | (Inohara et al., 1998) | 17 | 90 | 3,1 |
| STK_PKC-iota | L18964 | anti | Überexpression kann Apoptose hemmen | (Jamieson et al., 1999; Murray and Fields, 1997) | 17 | 74 | 7,7 |
| STK_NEK3 | Z29067 | | Homolog zu NIMA Kinase von <i>Aspergillus nidulans</i> , die für G2/M Übergang verantwortlich ist | (Schultz and Nigg, 1993) | 17 | 234 | 1,2 |
| STK_MAD-3likePK | AF068760 | | | | 17 | 104 | 3,9 |
| STK_TAK1 | U64205 | | cdc25 associated kinase, phosphoryliert Cdc25c | (Peng et al., 1998a) | 17 | 53 | 9,8 |

| | | | | | | | | |
|---------------|----------|----------|---|--|---|----|-----|------|
| UP_PB-32 | W30715 | | unbekannte Phosphatase | | | 16 | 178 | 7,0 |
| STK_HsCdc7 | AF015592 | | wichtig für G1/S Übergang | | (Jiang and Hunter, 1997) | 16 | 138 | 5,1 |
| STK_SRPK-2 | U88666 | | phosphoryliert SR-Splice-Faktoren | | (Kuroyanagi et al., 1998; Wang et al., 1998a) | 16 | 70 | 2,8 |
| STK_MAPKK6 | U39657 | | aktiviert p38 MAP-Kinase, wird von Ask-1 aktiviert, einer MAPKKK, die Apoptose induziert | | (Ichijo et al., 1997; Moriguchi et al., 1996) | 16 | 54 | 4,2 |
| STK_JNK2 | L31951 | pro/anti | kann abhängig vom Zelltyp Apoptose auslösen oder hemmen | | (Potapova et al., 2000; Sabapathy et al., 1999) | 16 | 52 | 10,5 |
| STK_GCK | U07349 | | homolog zu <i>S. cerevisiae</i> Ste20, aktiviert JNK | | (Diener et al., 1997) | 16 | 324 | 3,4 |
| STK_KIAA0619 | AB014519 | | unbekannte Kinase | | | 16 | 239 | 4,4 |
| P_Pten | U93051 | pro | Tumorsuppressor, dephosphoryliert Phosphatidylinositol-3'-Phosphat und hemmt dadurch Akt -Signalweg | | (Myers et al., 1998; Wu et al., 1998) | 16 | 70 | 5,6 |
| STK_TIP30/CC3 | AF039103 | pro | Metastase-Suppressor durch Sensitivierung gegen Apoptose, aktiviert Transkription von Bad | | (Shivelman, 1997; Xiao et al., 2000) | 16 | 53 | 12,6 |
| STK_PHK-beta | X84908 | | phosphoryliert Glycogen-Phosphorylase | | (Wullich-Schmoll and Kilimann, 1996) | 15 | 246 | 3,7 |
| OT_33a_Enx-1 | AF070418 | | reguliert Expression von Homeobox-Genen | | (Hobert et al., 1996a; Hobert et al., 1996b) | 15 | 187 | 2,9 |
| STK_Bub1 | AF046078 | | kontrolliert Segregation von Chromatiden, Mutation in Krebs verursacht erhöhte Mutationsrate | | (Alexandru et al., 1999; Cahill et al., 1998) | 15 | 121 | 6,5 |
| STK_NEK2 | U11050 | | assoziiert mit Zentrosomen | | (Fry et al., 1998; Schultz et al., 1994) | 15 | 37 | 8,5 |
| STK_PK428 | U59305 | | verwandt mit Familie der myotonischen Dystrophie-Kinasen | | (Zhao et al., 1997) | 15 | 237 | 1,3 |
| STK_KHS | U77129 | | homolog zu <i>S. cerevisiae</i> Ste20, aktiviert JNK | | (Tung and Blenis, 1997) | 15 | 121 | 3,1 |
| PP_PIR1 | AF023917 | | dualspezifisch, nukleär, dephosphoryliert RNA besser als Protein assoziiert mit speckles | | (Deshpande et al., 1999; Yuan et al., 1998) | 15 | 51 | 7,8 |

| | | | | | | | |
|----------------|-----------|----------|---|--|----|-----|------|
| STP_PP6 | X92972 | | homolog zu <i>S. cerevisiae</i> Sit4p und <i>S. pombe</i> ppe1, die Zellzyklus regulieren | (Bastians and Pongstingl, 1996) | 15 | 30 | 8,4 |
| STK_MNB | U52373 | | dualspezifisch, homolog zu DYRK Kinase, nukleär, befindet sich in Region auf Chromosom 21, die im Down-Syndrom amplifiziert ist | (Becker et al., 1998; Guimera et al., 1996) | 14 | 90 | 3,9 |
| YK_Jak-1 | M64174 | pro/anti | antiapoptotisch nach Aktivierung von IL-9 Rezeptor, proapoptotisch nach Aktivierung von IFN-Rezeptor | (Bauer et al., 1998; Chin et al., 1997) | 14 | 78 | 6,4 |
| GP_GPIR-2 | | | | | 14 | 15 | 20,2 |
| STK_VRK1 | AB000449 | | homolog zu Vaccinia Virus Kinase, nukleär | (Lopez-Borges and Lazo, 2000; Nezu et al., 1997) | 14 | 286 | 1,9 |
| STK_CHED | M80629 | | Homolog von cdc-2 | (Lapidot-Lifson et al., 1992) | 14 | 75 | 2,6 |
| STK_SGK | Y10032 | anti | wird über PI3-Kinase-Weg aktiviert, phosphoryliert und hemmt Raf und FKHRL-1 | (Brunet et al., 2001; Minkosz et al., 2001; Park et al., 1999; Zhang et al., 2001) | 14 | 70 | 30,5 |
| STK_GSK-3beta | L33801 | pro/anti | Überexpression induziert Apoptose, in knock-out Mäusen lethal, da hypersensitiv gegenüber TNF | (Crowder and Freeman, 2000; Hoeflich et al., 2000; Pap and Cooper, 1998) | 14 | 22 | 3,8 |
| STK_TTK | M86699 | | dualspezifisch, Expression korreliert mit Zellzyklus | (Mills et al., 1992; Schmandt et al., 1994) | 13 | 465 | 1,7 |
| UK_PB-11 | AF061944 | | unbekannte Kinase | | 13 | 168 | 2,9 |
| STP_PP2A-Cbeta | X12656 | | nukleär, dephosphoryliert viele Proteine unter anderem Bcl-2 | (Ruvoilo et al., 1999; Wadzinski et al., 1993) | 13 | 33 | 9,0 |
| YK_MET | J02958 | anti | antiapoptotisch durch Aktivierung des Akt-Signalweges | (Hudziak et al., 1990; Xiao et al., 2001) | 13 | 727 | 4,9 |
| UK_UK20 | NM_016507 | | unbekannte Kinase | | 13 | 282 | 1,3 |
| STK_GLK | AF000145 | | homolog zu <i>S. cerevisiae</i> Ste20, aktiviert JNK | (Diener et al., 1997) | 13 | 140 | 1,6 |

| | | | | | | | |
|------------------|----------|-----|---|---|----|-----|------|
| STK_26b_CDC2_1_4 | X05360 | | essenziell für G2/M Übergang | (Lee and Nurse, 1987; Lundgren et al., 1991; Riabowol et al., 1989) | 12 | 168 | 8,5 |
| STK_31a_CDK6_1_4 | X66365 | | phosphoryliert und inaktiviert Bcl-2 in Komplex mit Karposi Sarcoma Virus v-cyclin und löst Apoptose aus | (Ojala et al., 2000) | 12 | 137 | 1,3 |
| YP_Prl-1 | U48297 | | kann Zellwachstum beeinflussen, farnesyliert, vornehmlich nukleär, aber auch mit Plasmamembranen und Endosomen assoziiert | (Diamond et al., 1994; Peng et al., 1998b; Zeng et al., 2000) | 12 | 74 | 22,1 |
| YK_Bmx | X83107 | pro | Caspase-Spaltung erhöht Kinaseaktivität und sensitiviert Zellen gegen Apoptose | (Wu et al., 2001) | 12 | 44 | 12,1 |
| STK_DRAK1 | AB011420 | pro | homolog zu DAP-Kinase | (Imbal et al., 2000; Sanjo et al., 1998) | 12 | 38 | 4,2 |
| STK_cyclinK | AF060515 | | kann cdk-Aktivität und Transkription durch RNA-Polymerase II regulieren | (Edwards et al., 1998) | 12 | 31 | 3,9 |
| STK_PHK-alphaL | X80497 | | Untereinheit der Phosphorylase Kinase | (van den Berg et al., 1995) | 12 | 24 | 2,3 |
| STK_p70S6K | M60724 | | aktiviert über PI3-Kinase | (Banerjee et al., 1990; Grove et al., 1991; Weng et al., 1995) | 11 | 824 | 2,4 |
| YK_Yes | 4885660 | | gehört zur Familie der src-Kinasen | (Kitamura et al., 1982; Kombluth et al., 1987) | 11 | 661 | 1,7 |
| STK_CaM-KIIdelta | U73504 | | besonders stark im Gehirn exprimiert | (Tobimatsu and Fujisawa, 1989) | 11 | 216 | 3,0 |
| YK_Ryk | X69970 | | Rezeptortyrosinkinase, gehört zu keiner der anderen Familien von Rezeptortyrosinkinasen, wahrscheinlich involviert in Eph-Signalwegen | (Halford et al., 2000; Hovens et al., 1992) | 11 | 166 | 5,1 |
| YP_PRL-3 | AF041434 | | homolog zu PRL-1 | (Zeng et al., 2000) | 11 | 74 | 65,7 |
| STP_PP1-Cgamma | X74008 | | katalytische Untereinheit von PP1 | (Barker et al., 1993) | 11 | 59 | 23,8 |

Tabelle 6 Schwächer exprimierte Gene

Nur Gene, von denen beide Punkte einer Sonde unter dem Grenzwert für niedrigere Expression lagen, wurden in die Liste aufgenommen.

In einem weiteren Auswertungsschritt wurden die Expressionsprofile der Gene in den Klonen gruppiert, so daß Gruppen von Genen gefunden wurden, deren Expression gemeinsam reguliert wird. Die gemeinsame Regulation der Gene könnte auch auf eine gemeinsame Funktion schließen lassen. Gengruppen mit induzierten Genen könnten also zusammen in einem Signalweg den antiapoptotischen Phänotyp der Klone bestimmen. Auf diese Art kann es möglich sein, nicht nur einzelne Gene zu finden, die Apoptose beeinflussen, sondern ganze anti-oder proapoptotische Gengruppen.

Wenn die vorgenommene *in vitro* Selektion der Tumorzellen auf einen apoptoseresistenten Phänotyp wirklich einer *in vivo* Selektion ähnelt, so müßten die antiapoptotischen Gengruppen auch in anderen Krebszelllinien zu finden sein. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment cDNA's von 10 Plattenepithelkarzinomzelllinien mit cDNA Arrays hybridisiert und gruppiert. Die Gengruppen der Plattenepithelkarzinomzelllinien und der Apoptose resistenten Klone wurden dann auf gemeinsame Genen untersucht. Tatsächlich wurden Teile der antiapoptotischen Gengruppen der Klone in den Plattenepithelkarzinomzelllinien wiedergefunden.

Daß die veränderte Expression der in Tabelle 4 und 5 aufgeführten Gene wirklich für den antiapoptotischen Phänotyp der Klone verantwortlich ist, wurde durch selektive Hemmung einzelner hochregulierter Gene/Signalwege bewiesen. Die Hemmung erfolgte durch spezifische Inhibitoren und führte zu einer verstärkten Apoptose wie es bei Unterbrechung von antiapoptotischen Signalwegen zu erwarten war.

Aus den beschriebenen Untersuchungen lassen sich 5 Signalwege ableiten, die zum antiapoptotischen Phänotyp der Klone beitragen und im Folgenden beschrieben werden.

1. Timp-1, MMP-15

Der Metalloprotease-Inhibitor Timp-1 und die Transmembranmetallopeptase MMP-15 sind die beiden ersten Gene in der Liste der induzierten Gene. Darüberhinaus befinden sich beide Gene sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch in den Plattenepithelkarzinomzelllinien in einer Gengruppe, die gemeinsam reguliert wird. Während für Timp-1 antiapoptotische Wirkungen beschrieben wurden (Alexander et al., 1996; Li et al., 1999b), ist MMP-15 noch nicht mit Apoptose in Zusammenhang gebracht worden. In Anlehnung an MMP-14, die in einem Komplex mit Timp-1 Pro-

Gelatinase A prozessiert, könnte MMP-15 zusammen mit Timp-1 die Prozessierung einer anderen Protease beeinflussen (Butler et al., 1997).

2. MAP-Kinasen

In den Apoptose resistenten Klonen sind Komponenten von drei MAP-Kinase Signalwegen stärker exprimiert. Diese Gene sind Teile der p38, JNK und Erk1-Signalwege.

Der p38-Signalweg

Dem p38 Signalweg wurden abhängig vom Zellsystem sowohl apoptotische als auch antiapoptotische Wirkung zugeschrieben (Nemoto et al., 1998; Xia et al., 1995).

Vier Komponenten dieses Signalweges werden in den Apoptose resistenten Klonen verstärkt exprimiert, MAP-Kinas-Kinase-3 (MAPKK3), BCR, MAP-Kinase aktivierte Protein Kinase –2-und 3 (MAPKAPK2, MAPKAPK3).

MAPKK3 ist eine dualspezifische Kinase, die p38 durch Phosphorylierung direkt aktivieren kann (Derijard et al., 1995). BCR ist ein Protein mit noch unerforschter Kinase-Aktivität und mit GAP-Aktivität für p21rac (Diekmann et al., 1991; Maru and Witte, 1991). Dieses G-Protein aktiviert im GTP-gebundenen Zustand die p38 MAP-Kinase Signalkaskade (Minden et al., 1995). BCR könnte daher durch sein GAP-Aktivität die Hydrolyse von GTP durch rac stimulieren und die Aktivierung von p38 hemmen. MAPKK3 und BCR werden sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch in den Plattenepithelkarzinomzelllinien gemeinsam in einer Gengruppe gefunden. Es werde hier also zwei Gene, die einen gegensätzlichen Einfluß auf die Aktivierung von p38 haben können, zusammen reguliert.

MAPKAPK2 und MAPKAPK3 sind beides Substrate von p38, deren Phosphorylierung durch p38 zu ihrer Aktivierung führt (Freshney et al., 1994; Tanoue et al., 2001). MAPKAPK-3 zählt zwar nicht zu den 65 am häufigsten stärker exprimierten Genen in den Apoptose resistenten Klonen, doch diese Kinase wird zusammen mit 3 anderen Genen (SHB, PTP-SL und Kif-1c) sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch in den Plattenepithelkarzinomzelllinien gemeinsam reguliert. Diese Gengruppe ist damit die größte, die in den beiden untersuchten Gruppen von Zelllinien gefunden wurde. Trotz der weniger verbreiteten verstärkten Expression in den Apoptose resistenten Klonen, könnten diese Gene deshalb wichtig für den antiapoptotischen Phänotyp sein.

Daß die Hemmung von p38 durch den spezifischen Inhibitor SB202190 zu einer verstärkten Apoptose führt, zeigt, daß der p38 Signalweg in diesem Zellsystem tatsächlich antiapoptotisch wirkt.

Der Erk Signalweg

Eine Reihe von Untersuchungen zeigt die antiapoptotische Wirkung des Erk Signalweges. Die antiapoptotischen Signale wirken sowohl transkriptionsabhängig-als auch unabhängig (Bonni et al., 1999; Xia et al., 1995).

Der Erk-Signalweg könnte durch die vermehrte Expression von MAPKK2, einer Erk-aktivierenden dualspezifischen Kinase (Derijard et al., 1995) und die verstärkte Expression von Erk1 selber aktiviert werden. Die Hemmung von MAPKK2 durch den spezifischen Inhibitor PD98059 führt zu vermehrter Apoptose und beweist daher die antiapoptotische Wirkung von Erk1 auch in diesem System.

Der JNK Signalweg

Der JNK Signalweg kann sowohl pro-als auch antiapoptotisch wirken (Davis, 2000). Für eine mögliche Aktivierung des JNK-Signalweges gibt es nur den Hinweis, daß die JNK-aktivierende Kinase JNKK2-alpha (Wu et al., 1997) in den Apoptose resistenten Klonen verstärkt exprimiert wird.

3. NFκB-Aktivierung

Es ist bekannt, daß die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch Relokalisation in den Zellkern antiapoptotisch wirken kann (s. Kapitel 1.3.2.).

Eine Reihe von NFκB-aktivierenden Genen sind in den Klonen verstärkt exprimiert. Dazu zählen die Phosphatase PPX (in 17 Klonen), die Kinase IRAK-1/2 (in 15/9 Klonen), der Ligand Interleukin-1β (in 13 Klonen) und die Kinase IKKγ (in 8 Klonen). Interleukin-1 kann den Interleukin-1-Rezeptor aktivieren, der mit der Kinase IRAK assoziiert und die Aktivierung des Interleukin-Rezeptors kann NFκB über IRAK aktivieren (Kothny-Wilkes et al., 1999; Li et al., 2001b; McConkey et al., 1990) (Li et al., 2001b; Muzio et al., 1997) (Hu et al., 1998). Die Kinase IKKγ ist Teil des Multienzymkomplexes, der IκB phosphoryliert, ein Protein, das NFκB durch Assoziation im Zytoplasma zurückhält. Die Phosphorylierung von IκB signalisiert seine Degradation, wodurch NFκB in den Zellkern wandern kann und unter anderem

antiapoptotische Gene reguliert (Mayo et al., 1997; Wang et al., 1996a). Im Zellkern kann NF κ B zusätzlich durch Dephosphorylierung durch PPX aktiviert werden (Hu et al., 1998). Drei dieser Gene, PPX, Irak und IKK γ , wurden auch zusammen in einer Gengruppe sowohl in den Apoptose resistenten Klonen als auch in den Plattenepithelkarzinomzellen gefunden.

4. Akt

Die antiapoptotischen Signale durch die Aktivierung von Akt sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden (s. Kapitel 1.3.2. (Franke et al., 1997)). In den Klonen sind sowohl Akt1 als auch AKT2 stärker exprimiert. Gleichzeitig ist der Tumorsuppressor, die Lipidphosphatase PTEN schwächer exprimiert. PTEN dephosphoryliert Phosphatidylinositol-3'-phosphat, das zur Aktivierung von AKT beiträgt (Di Cristofano and Pandolfi, 2000). Phosphatidylinositol-3'-phosphat entsteht durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol katalysiert von der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K). Die Hemmung des AKT-Signalweges durch die Inhibition der PI3K durch den spezifischen Inhibitor Wortmannin führte folglich auch zu vermehrtem Zelltod in den Apoptose resistenten Klonen.

5. Zellzyklus

Auch wenn der Zellzyklus nicht systematisch untersucht wurde, sprechen einige in den Klonen verstärkt oder vermindert exprimierte Gene für eine Beschleunigung des Zellzyklus. Die Phosphatase CDC25 wird verstärkt exprimiert. Sie dephosphoryliert cdc-2 und ermöglicht so den G2/M-Übergang (Galaktionov and Beach, 1991). Auch die Kinase PLK-1 wird während des Zellzyklus aktiviert (Toyoshima-Morimoto et al., 2001) und ist in 12 Klonen stärker exprimiert. Die Kinase CHK1 wird für den Halt im Zellzyklus bei G2/M nach DNA-Schäden benötigt und wird schwächer exprimiert (Furnari et al., 1997). Ebenso vermindert exprimiert wird die Kinase wee1, die ebenfalls den G2/M-Übergang hemmen kann (Heald et al., 1993). Andererseits werden die Kinasen cdc-7 und oben erwähnte cdc-2 auch weniger exprimiert. Beide Kinasen werden für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt (Jiang and Hunter, 1997; Riabowol et al., 1989). Daher kann eine definitive Aussage über eine Änderung des Zellzyklusprofils erst durch weiterführende Untersuchungen gemacht werden.

Die oben genannten Ergebnisse zeigen deutlich die Komplexität von Signaltransduktionswegen. Die Apoptoseresistenz der Klone wird nicht von einem dominanten Signalweg verursacht, sondern die Aktivierung mehrerer Signalwege führt zu einer verringerten Apoptoserate. Von solchen einzelnen Signalwegen ist allerdings bekannt, daß sie auch Verbindungen untereinander besitzen können. Ein Beispiel im Fall von Apoptoseresistenz ist etwa die Aktivierung von NF κ B auch über den Akt-Signalweg (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). Wahrscheinlich ist sogar eine noch intensivere Kommunikation zwischen den Signalwegen als sie bis jetzt bekannt ist, weil solche Querverbindungen ein Signalnetzwerk bilden, das weniger anfällig gegen Störungen ist. Beim Vorhandensein mehrerer paralleler antiapoptotischer Signalwege kann der Ausfall eines Signalweges z. B. durch eine inaktivierende Mutation in einer Komponente dieses Signalweges durch die verbleibenden Signalwege kompensiert werden. Außerdem kann der Ausfall eines Teil des Signalweges auch dadurch aufgefangen werden, indem die verbleibenden Signalwege über oben genannte Querverbindungen den ausgefallenen Signalweg aktivieren.

Die gefundenen Veränderungen der Expressionsstärke besonders der stärker exprimierten Gene sind nicht sehr hoch. Die stärksten zu beobachtenden Veränderungen sind höchstens eine Verdopplung der Expressionsstärke. Oft liegen die Expressionsstärken in den Klonen bei 20-30% über dem Grenzwert für verstärkte Expression (s. Tab. 4 und 5). Das zeigt nochmals die feine Abstimmung der Signalwege auch auf Expressionsebene. Auch geringe Veränderungen in der Expression können somit einen Einfluß auf die entstehenden Signale haben. Darüberhinaus können kleine Veränderungen mehrerer Komponenten eines Signalweges (beispielsweise die stärkere Expression von Akt und die geringere Expression von PTEN, s. oben) den gesamten Signalweg ebenso beeinflussen wie eine sehr starke Änderung nur einer Komponente. Bei einem Signalweg wie z. B. der MAP-Kinase Kaskade kann ein Molekül aktivierter MAP-Kinase-Kinase-Kinase mehrere MAP-Kinase-Kinase Moleküle aktivieren und bewirkt damit eine Potenzierung des Signals. Die geringe Expressionssteigerung zweier Komponenten dieses Signalweges könnte deshalb sogar zu einem stärkeren Signal führen als die starke Expressionssteigerung nur einer Komponente.

Innerhalb einer Population von Zellen, selbst von klonalen Zelllinien, gehorcht die Genexpression einer Gauß'schen Verteilung. Es gibt daher immer Zellen, die sich

hinsichtlich der Genexpression etwas unterscheiden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß durch die Selektion vermehrt die Zellen gefunden wurden, die auf Grund dieser geringen Expressionsunterschiede resistenter gegen Apoptose sind als die übrige Mehrzahl der Zellen. Folgende Gründe sprechen dafür. Die Apoptose resistenten Klone unterscheiden sich nicht sehr hinsichtlich ihrer Morphologie oder Genexpression von den Ausgangszellen Hela S3. Sie sind zwar deutlich resistenter gegenüber Apoptose als Hela S3, doch immer noch empfindlich gegen alle getesteten Apoptoseauslöser. Das heißt, mit dieser Methode kann jede Zelllinie auf Apoptoseresistenz selektioniert werden. Die so ermittelten Gene müßten dann die überwiegende Mehrheit der Apoptose relevanten Signalwege dieser Zelllinie repräsentieren, weil die Unterschiede zwischen den Ausgangszellen und den Klonen auf unterschiedlicher Expression beruhen und es statistisch sehr wahrscheinlich ist, daß die Expression wenigstens einer Komponente eines Signalweges verändert ist. Mutationen in bestimmten wichtigen Genen, die zu der verstärkten Apoptoseresistenz beitragen, können nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß die unterschiedliche Apoptoseresistenz auf einer veränderten Genexpression beruht, ist aber ungleich größer.

Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms ist ein bedeutender Schritt zu einem wesentlich verbesserten Verständnis der zellulären Vorgänge gegeben. Der nächste Schritt besteht nun darin, die Funktion der durch die Sequenzierung ermittelten neuen Gene zu bestimmen. Dazu müssen Methoden gefunden werden, mit denen die Funktion möglichst vieler Gene effizient untersucht werden kann. Eine sehr gute Möglichkeit dazu bietet die hier angewandte Strategie, mit der die Mechanismen jedes zellulären Vorgangs untersucht werden können, für den sich ein Assay entwickeln läßt, mit dem die Zellen selektioniert werden. So ist vorstellbar, die Zellen auf weitere Eigenschaften von Krebszellen zu selektionieren, wie z.B. Metastasierungsfähigkeit oder Adhäsion an Endothelzellen. Aber auch die zellulären Vorgänge normaler Zellen könnten so besser untersucht werden. Beispielsweise wäre eine Selektion auf Zellen die nach bestimmten Stimuli besser Kalzium mobilisieren denkbar. Dazu könnten fluoreszierende, zellpermeable Kalziumindikatoren eingesetzt werden und die Zellen durch ein Durchflußzytometer heraussortiert werden, die einen stärkeren Anstieg der innerzellulären Kalziumkonzentration aufweisen. Es könnte auch möglich sein, durch ein Durchflußzytometer die Zellen zu selektionieren, die innerhalb einer Zellpopulation schneller differenzieren. Differenzierte Zellen

unterscheiden sich in ihrem Aussehen von nicht differenzierten Zellen und können deshalb mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht im Zytometer unterschieden und aussortiert werden. Bei einer genügend großen Anzahl von selektionierten Klonen können so viele Gene identifiziert werden, die für den entsprechenden Phänotyp verantwortlich sind. Durch ein Gruppieren der Expressionsdaten könnten anschließend Gene, die gemeinsam an der Regulation des Phänotyps beteiligt sind, identifiziert werden. Die genaue Analyse, auf welche Art die entsprechenden Gene zusammenwirken und wie die Gene, die nicht gruppiert werden konnten, den Phänotyp beeinflussen, kann in weiteren Experimenten durchgeführt werden. Damit stellt die angewandte Methode eine sehr gute Möglichkeit dar, die physiologische Funktion von Genen zu ergründen und sollte in der Zukunft auch bei der Bekämpfung bisher unzureichend therapierbarer Krankheiten wie Krebs ein wichtiges Forschungsmittel darstellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden antiapoptotische Mechanismen in Krebszellen untersucht. Diese Mechanismen tragen zur Widerstandsfähigkeit von Krebszellen gegen die Therapie und die körpereigene Abwehr bei. Ein besseres Verständnis der Resistenz gegen Apoptose kann daher neue Ansatzpunkte für eine Behandlung der Krankheit aufzeigen.

Viele Unterschiede von Krebszellen gegenüber ihren nicht transformierten parentalen Zellen lassen sich auf unterschiedliche Genexpression zurückführen. Aus diesem Grund wurden solche Unterschiede in der Genexpression näher untersucht, die zu dem antiapoptotischen Phänotyp von Krebszellen beitragen. Es wurden zwei Krebsarten untersucht, Melanome und Plattenepithelkarzinome.

In Melanomen ist die Expression der Rezeptortyrosinkinase c-Kit stark vermindert oder nicht mehr detektierbar während c-Kit in den Ausgangszellen von Melanomen, den Melanozyten, stark exprimiert wird. Dort wirkt der Rezeptor mitogen. Die ektopische Überexpression von c-Kit in zwei Melanomzelllinien und die anschließende Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden SCF in früheren Arbeiten führte zur Apoptose der Zellen *in vitro* und *in vivo*.

Zur Untersuchung des Mechanismus dieser Apoptoseauslösung wurden sechs weitere Melanomzelllinien konstruiert, die den c-Kit Rezeptor auf einer ähnlichen Stufe exprimieren wie Melanozyten. Die sechs Melanomzelllinien waren Paare von metastatischen und primären Melanomen aus drei Patienten. Alle so konstruierten Melanomzelllinien zeigten bei Stimulation mit SCF ein Absterben oder eine Wachstumshemmung. Der proapoptotische Effekt des Rezeptors in Melanomzellen konnte also auch bei physiologischen Konzentrationen des Rezeptors beobachtet werden und war unabhängig vom Stadium der Krebszellen.

Ein Wechsel des Zellkulturmediums während der SCF-Stimulation hemmte den beobachteten Effekt. Das beweist, daß die Stimulation des c-Kit Rezeptors in Melanomzellen zur Ausschüttung eines apoptotischen Faktors führt, der nach Anreicherung im Zellkulturüberstand die Zellen tötet. Folgerichtig wirkt der SCF-konditionierte Überstand von c-Kit exprimierenden Melanomzellen wachstumshemmend bei den Melanomzellen, die keinen c-Kit Rezeptor exprimieren.

Zur Identifikation des apoptotischen Faktors wurden mehrere bekannte apoptotische Liganden auf ihre Wirkung gegen die Melanomzellen getestet. Keiner der getesteten Liganden (TNF- α , Fas-Ligand, TRAIL, INF- α , INF- γ , IL-1, OSM, TGF- β) bewirkte ein Absterben der Zellen. Daher besteht die große Wahrscheinlichkeit, daß ein neuer apoptotischer Ligand für das Absterben der Melanomzellen verantwortlich ist. Die Fraktionierung des konzentrierten SCF-konditionierten Zellkulturüberstandes mittels Gelfiltration ergab eine stark apoptotische Fraktion mit einem wahrscheinlichen Molekulargewicht von 14 kDa. Diese Fraktion löste in Melanomzellen innerhalb von Stunden vollständige Apoptose aus, während sie kaum einen Effekt auf Melanozyten hatte. Kein bekannter Ligand (außer TRAIL, der ausgeschlossen wurde - s. oben) besitzt dieser Eigenschaften. Die Auftrennung der Fraktion mittels SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung ergab zwei Banden bei 14 kDa und 60 kDa. Die Proteinmenge war jedoch so gering, daß der Ligand im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden konnte.

Aus den oben genannten Ergebnissen läßt sich folgende Theorie ableiten. Obwohl c-Kit wie viele Rezeptortyrosinkinasen onkogen wirken kann, erfüllt der Rezeptor in Melanozyten die Funktion eines Tumorsuppressors. Wenn Melanozyten transformiert werden, führt die Stimulation von c-Kit zur Ausschüttung eines bisher unbekanntes Liganden, der den Zelltod der transformierten Melanozyten einleitet ohne den nicht transformierten Zellen zu schaden. Nur die transformierten Melanozyten, die der c-Kit Stimulation durch verminderte Expression des c-Kit Rezeptors entgehen, können sich weiter zu bösartigen Melanomen entwickeln. Die Identifikation des sezernierten apoptotischen Liganden könnte daher zu einer Heilung dieser therapieresistenten Krebsart beitragen.

Um weitere Gene festzustellen, die wie der c-Kit Rezeptor Apoptose beeinflussen, wurden Krebszellen einer vergleichbaren Selektion auf Apoptoseresistenz unterworfen wie im Organismus. Die Gene, die in den selektierten, Apoptose resistenten Zellen unterschiedlich exprimiert werden, sollten zu deren Apoptoseresistenz beitragen.

Dazu wurden Zellen der Ausgangszelllinie Hela S3 so selektiert, daß 20 klonale Zelllinien erhalten wurden, die resistenter gegen Apoptose durch den Fas-Rezeptor waren. Diese Zellen zeigten 10-50% der Apoptoserate von Hela S3. Auch gegen die

Apoptoseauslöser TNF- α , Taxol und Cisplatin waren die Klone resistenter als die Ausgangszelllinie. Zum Expressionsvergleich wurde die cDNA der Apoptose resistenten Klone und Hela S3 mit cDNA-Arrays hybridisiert, so daß die Expression von 700 Genen (hauptsächlich Proteinkinasen-, phosphatasen und Proteasen) gleichzeitig verglichen werden konnte. Jeweils 100 Gene mit verstärkter oder verminderter Expression wurden identifiziert. Daß die stärker exprimierten Gene tatsächlich zur Apoptoseresistenz der Klone beitragen, wurde durch Hemmung mittels niedermolekularer Inhibitoren bewiesen, welche zu einer vermehrten Apoptose führte. Die Expressionsdaten der Apoptose resistenten Klone und Hela S3 wurden außerdem durch einen hierarchischen Algorithmus so gruppiert, daß die Gene ermittelt werden konnten, deren Expression gekoppelt ist. Befinden sich Gene in einer Expressionsgruppe, so besteht die Wahrscheinlichkeit, daß sie beispielsweise in einem Signalweg liegen. Einige der Gengruppen enthalten Gene, die in den Klonen stärker exprimiert werden, und diese Gengruppen können auch in den Expressionsdaten von 10 weiteren untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien gefunden werden. Daher können diese Gruppen als antiapoptotische Signalwege gesehen werden, die den Krebszellen die gesteigerte Resistenz gegenüber Apoptose verleihen. Folgende Signalwege wurden so identifiziert:

1.) *Timp-1, MMP-15*

Der Metalloprotease-Inhibitor Timp-1 und die membranständige Metalloprotease MMP-15 werden in fast allen Klonen verstärkt exprimiert, und beide Gene werden mit hohem Korrelationsfaktor zusammen gruppiert.

2.) *MAP-Kinasen*

Sowohl Signalmoleküle des p38-Signalweges als auch des Erk1/2 Signalweges werden verstärkt exprimiert. Die Hemmung dieser Signalwege führt zu verstärkter Apoptose.

3.) *PI3K, Akt*

Dieser gut untersuchte antiapoptotische Signalweg wird sowohl durch die verstärkte Expression von aktivierenden Elementen (Akt1/2) als auch die verminderte Expression von hemmenden Elementen (PTEN) verstärkt. Hemmung führt zu verstärkter Apoptose.

4.) *NFκB*

Drei Elemente (IRAK, PPX, IKK γ) dieses bekannt antiapoptotischen Signalweges werden in den Apoptose resistenten Klonen verstärkt exprimiert und zusammen gruppiert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mehrere Signalwege den antiapoptotischen Phänotyp der Klone bedingen. Das zeigt die hohe Komplexität der Signalregulation in der Zelle. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit die einzelnen Signalwege untereinander vernetzt sind. Eine Hemmung obiger antiapoptotischer Signalwege könnte zu einer verbesserten Therapie von Plattenepithelkarzinomen beitragen.

6. Literatur

- Aas, T., Borresen, A.L., Geisler, S., Smith-Sorensen, B., Johnsen, H., Varhaug, J.E., Akslen, L.A. and Lonning, P.E. (1996) Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med*, **2**, 811-4.
- Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. and Stark, G.R. (1998) The p53 network. *J Biol Chem*, **273**, 1-4.
- Ahonen, M., Baker, A.H. and Kahari, V.M. (1998) Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*, **58**, 2310-5.
- Alexander, C.M., Howard, E.W., Bissell, M.J. and Werb, Z. (1996) Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol*, **135**, 1669-77.
- Alexander, W.S., Lyman, S.D. and Wagner, E.F. (1991) Expression of functional c-kit receptors rescues the genetic defect of W mutant mast cells. *Embo J*, **10**, 3683-91.
- Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A. and Nasmyth, K. (1999) Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J*, **18**, 2707-21.
- Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R.E., Lee, E.Y., Bradley, A., Li, W., Bertino, J.R. and Wahl, G.M. (1995) Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5436-40.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J. and Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, **1**, 1024-8.
- Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D.C. (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **3**, 917-21.
- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (2001) Apoptotic Molecular Machinery: Vastly Increased Complexity in Vertebrates Revealed by Genome Comparisons. *Science*, **291**, 1279-1284.
- Baker, N.E. and Yu, S.Y. (2001) The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, **104**, 699-708.
- Banerjee, P., Ahmad, M.F., Grove, J.R., Kozlosky, C., Price, D.J. and Avruch, J. (1990) Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8550-4.
- Bange, J., Zwick, E. and Ullrich, A. (2001) Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med*, **7**, 548-52.
- Barker, H.M., Craig, S.P., Spurr, N.K. and Cohen, P.T. (1993) Sequence of human protein serine/threonine phosphatase 1 gamma and localization of the gene (PPP1CC) encoding it to chromosome bands 12q24.1-q24.2. *Biochim Biophys Acta*, **1178**, 228-33.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-24.

- Bastians, H. and Ponstingl, H. (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci*, **109**, 2865-74.
- Bauer, J.H., Liu, K.D., You, Y., Lai, S.Y. and Goldsmith, M.A. (1998) Heteromerization of the gammac chain with the interleukin-9 receptor alpha subunit leads to STAT activation and prevention of apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 9255-60.
- Baytel, D., Shalom, S., Madgar, I., Weissenberg, R. and Don, J. (1998) The human Pim-2 proto-oncogene and its testicular expression. *Biochim Biophys Acta*, **1442**, 274-85.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirnbter, K., Tejedor, F.J. and Joost, H.G. (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem*, **273**, 25893-902.
- Benovic, J.L., DeBlasi, A., Stone, W.C., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1989) Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, **246**, 235-40.
- Benovic, J.L., Mayor, F., Jr., Staniszewski, C., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1987) Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem*, **262**, 9026-32.
- Bernards, A. (1991) Predicted tyk2 protein contains two tandem protein kinase domains. *Oncogene*, **6**, 1185-7.
- Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (1997) Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol*, **17**, 4346-54.
- Bertolotto, C., Maulon, L., Filippa, N., Baier, G. and Auberger, P. (2000) Protein Kinase C θ and ϵ Promote T-cell Survival by a Rsk-dependent Phosphorylation and Inactivation of BAD. *J. Biol. Chem*, **275**, 37246-37250.
- Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F.H., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, H.W., Brodeur, D., Zuckerman, E.E. and Hardy, W.D. (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, **320**, 415-21.
- Bhalla, K., Ibrado, A.M., Tourkina, E., Tang, C., Mahoney, M.E. and Huang, Y. (1993) Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia*, **7**, 563-8.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J. and Miller, L.K. (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*, **68**, 2521-8.
- Bokoch, G.M. and Gilman, A.G. (1984) Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell*, **39**, 301-8.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A. and Greenberg, M.E. (1999) Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science*, **286**, 1358-1362.
- Boudreau, N., Sympton, C.J., Werb, Z. and Bissell, M.J. (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, **267**, 891-3.
- Boulay, A., Masson, R., Chenard, M.P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J.P., Sautes-Fridman, C., Basset, P. and Rio, M.C. (2001) High cancer cell death in

- syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, **61**, 2189-93.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. and Yancopoulos, G.D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65**, 663-75.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-68.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A. and Greenberg, M.E. (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, **21**, 952-65.
- Butler, G.S., Will, H., Atkinson, S.J. and Murphy, G. (1997) Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem*, **244**, 653-7.
- Caceres-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P. and Hoang, T. (1994) Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, **269**, 12084-91.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, **392**, 300-3.
- Cao, Z., Henzel, W.J. and Gao, X. (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, **271**, 1128-31.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318-21.
- Carey, T.E., Van Dyke, D.L., Worsham, M.J., Bradford, C.R., Babu, V.R., Schwartz, D.R., Hsu, S. and Baker, S.R. (1989) Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC-17B. *Cancer Res*, **49**, 6098-107.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. and Tartar, A. (1988) The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature*, **332**, 454-5.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-52.
- Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M. and Cohen, P.T. (1994) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *Embo J*, **13**, 4278-90.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. and Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sepharose as substrate. *J Immunol Methods*, **18**, 183-92.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N. and Testa, J.R. (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a

- member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9267-71.
- Cheng, M., Boulton, T.G. and Cobb, M.H. (1996) ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem*, **271**, 8951-8.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A. and Fu, X.Y. (1997) Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol*, **17**, 5328-37.
- Chow, R.L., Roux, G.D., Roghani, M., Palmer, M.A., Rifkin, D.B., Moscatelli, D.A. and Lang, R.A. (1995) FGF suppresses apoptosis and induces differentiation of fibre cells in the mouse lens. *Development*, **121**, 4383-93.
- Chung, C.T. and Miller, R.H. (1993) Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol*, **218**, 621-7.
- Cleary, M.L., Smith, S.D. and Sklar, J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, **47**, 19-28.
- Clem, R.J., Fechheimer, M. and Miller, L.K. (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, **254**, 1388-90.
- Cohen, O., Inbal, B., Kissil, J.L., Raveh, T., Berissi, H., Spivak-Kroizaman, T., Feinstein, E. and Kimchi, A. (1999) DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol*, **146**, 141-8.
- Colamonici, O.R., Uyttendaele, H., Domanski, P., Yan, H. and Krolewski, J.J. (1994) p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J Biol Chem*, **269**, 3518-22.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M.F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, **3**, 339-45.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D. and Williams, D.E. (1990) Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell*, **63**, 175-83.
- Crook, N.E., Clem, R.J. and Miller, L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, **67**, 2168-74.
- Crowder, R.J. and Freeman, R.S. (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem*, **275**, 34266-71.
- Cryns, V.L., Byun, Y., Rana, A., Mellor, H., Lustig, K.D., Ghanem, L., Parker, P.J., Kirschner, M.W. and Yuan, J. (1997) Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy. *J Biol Chem*, **272**, 29449-53.
- Dale, L.B., Bhattacharya, M., Anborgh, P.H., Murdoch, B., Bhatia, M., Nakanishi, S. and Ferguson, S.S. (2000) G protein-coupled receptor kinase-mediated desensitization of metabotropic glutamate receptor 1A protects against cell death. *J Biol Chem*, **275**, 38213-20.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- Davis, J.W., 2nd, Lauer, F.T., Burdick, A.D., Hudson, L.G. and Burchiel, S.W. (2001) Prevention of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the

- MCF-10A cell line: correlation with increased transforming growth factor alpha production. *Cancer Res*, **61**, 3314-20.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-52.
- Deak, J.C., Cross, J.V., Lewis, M., Qian, Y., Parrott, L.A., Distelhorst, C.W. and Templeton, D.J. (1998a) Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5595-600.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M. and Alessi, D.R. (1998b) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, **17**, 4426-41.
- Denning, M.F., Wang, Y., Nickoloff, B.J. and Wrone-Smith, T. (1998) Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem*, **273**, 29995-30002.
- Dent, P., Reardon, D.B., Park, J.S., Bowers, G., Logsdon, C., Valerie, K. and Schmidt-Ullrich, R. (1999) Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell*, **10**, 2493-506.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J. (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, 682-5.
- Deshpande, T., Takagi, T., Hao, L., Buratowski, S. and Charbonneau, H. (1999) Human PIR1 of the protein-tyrosine phosphatase superfamily has RNA 5'-triphosphatase and diphosphatase activities. *J Biol Chem*, **274**, 16590-4.
- Di Cristofano, A. and Pandolfi, P.P. (2000) The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, **100**, 387-90.
- di Jeso, B., Ulianich, L., Racioppi, L., D'Armiento, F., Felicciello, A., Pacifico, F., Consiglio, E. and Formisano, S. (1995) Serum withdrawal induces apoptotic cell death in Ki-ras transformed but not in normal differentiated thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **214**, 819-24.
- Diamond, R.H., Cressman, D.E., Laz, T.M., Abrams, C.S. and Taub, R. (1994) PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol*, **14**, 3752-62.
- Diaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. and Moscat, J. (1996) The Product of *par-4*, a Gene Induced during Apoptosis, Interacts Selectively with the Atypical Isoforms of Protein Kinase C. *Cell*, **86**, 777-786.
- Didsbury, J.R., Ho, Y.S. and Snyderman, R. (1987) Human Gi protein alpha-subunit: deduction of amino acid structure from a cloned cDNA. *FEBS Lett*, **211**, 160-4.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. and Hall, A. (1991) Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, **351**, 400-2.
- Diener, K., Wang, X.S., Chen, C., Meyer, C.F., Keesler, G., Zukowski, M., Tan, T.H. and Yao, Z. (1997) Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9687-92.

- Dollbaum, C., Creasey, A.A., Dairkee, S.H., Hiller, A.J., Rudolph, A.R., Lin, L., Vitt, C. and Smith, H.S. (1988) Specificity of tumor necrosis factor toxicity for human mammary carcinomas relative to normal mammary epithelium and correlation with response to doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4740-4.
- Dorner, C., Ciossek, T., Muller, S., Moller, P.H., Ullrich, A. and Lammers, R. (1998) Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **273**, 20267-75.
- Dorner, C., Ullrich, A., Haring, H.U. and Lammers, R. (1999) The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family. *J Biol Chem*, **274**, 33654-60.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, **275**, 661-5.
- Duelli, D.M. and Lazebnik, Y.A. (2000) Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, **2**, 859-62.
- Edwards, M.C., Wong, C. and Elledge, S.J. (1998) Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. *Mol Cell Biol*, **18**, 4291-300.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-8.
- Elchebly, M., Wagner, J., Kennedy, T.E., Lancot, C., Michaliszyn, E., Itie, A., Drouin, J. and Tremblay, M.L. (1999) Neuroendocrine dysplasia in mice lacking protein tyrosine phosphatase sigma. *Nat Genet*, **21**, 330-3.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **44**, 817-29.
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-22.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-8.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. and Hancock, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69**, 119-28.
- Faik, P., Walker, J.I., Redmill, A.A. and Morgan, M.J. (1988) Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature*, **332**, 455-7.
- Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R.T., Gordon, J.I., Tessier-Lavigne, M. and Weinberg, R.A. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, **386**, 796-804.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W. and et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56.

- Flanagan, J.G., Chan, D.C. and Leder, P. (1991) Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell*, **64**, 1025-35.
- Flanagan, J.G. and Leder, P. (1990) The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell*, **63**, 185-94.
- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E. and Mehlen, P. (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3416-3421.
- Fox, J.C. and Shanley, J.R. (1996) Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 12578-84.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, **88**, 435-7.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. and Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-49.
- Frigerio, J.M., Dagorn, J.C. and Iovanna, J.L. (1995) Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta*, **1262**, 64-8.
- Fry, A.M., Meraldi, P. and Nigg, E.A. (1998) A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J*, **17**, 470-81.
- Fuji, T., Garcia-Bermejo, M.L., Bernabo, J.L., Caamano, J., Ohba, M., Kuroki, T., Li, L., Yuspa, S.H. and Kazanietz, M.G. (2000) Involvement of Protein Kinase C δ (PKC δ) in Phorbol Ester-induced Apoptosis in LNCaP Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem*, **275**, 7574-7582.
- Fuks, Z., Persaud, R.S., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J.L., Seddon, A.P., Cordon-Cardo, C. and Haimovitz-Friedman, A. (1994) Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **54**, 2582-90.
- Furnari, B., Rhind, N. and Russell, P. (1997) Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science*, **277**, 1495-7.
- Galaktionov, K. and Beach, D. (1991) Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell*, **67**, 1181-94.
- Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K.A., Godowski, P.J. and Comoglio, P.M. (1994) RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *Embo J*, **13**, 3524-32.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, **273**, 30336-43.
- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1-15.
- Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W.G., Levrero, M. and Wang, J.Y. (1999) The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, **399**, 806-9.

- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartweg, E. and Steller, H. (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J*, **19**, 589-97.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**, 536-9.
- Grove, J.R., Banerjee, P., Balasubramanyam, A., Coffey, P.J., Price, D.J., Avruch, J. and Woodgett, J.R. (1991) Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol Cell Biol*, **11**, 5541-50.
- Gu, M., Warshawsky, I. and Majerus, P.W. (1992) Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC14p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2980-4.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X. and Pritchard, M.A. (1996) A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet*, **5**, 1305-10.
- Gurney, M.E., Apatoff, B.R., Spear, G.T., Baumel, M.J., Antel, J.P., Bania, M.B. and Reder, A.T. (1986a) Neuroleukin: a lymphokine product of lectin-stimulated T cells. *Science*, **234**, 574-81.
- Gurney, M.E., Heinrich, S.P., Lee, M.R. and Yin, H.S. (1986b) Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science*, **234**, 566-74.
- Gutman, M., Singh, R.K., Radinsky, R. and Bar-Eli, M. (1994) Intertumoral heterogeneity of receptor-tyrosine kinases expression in human melanoma cell lines with different metastatic capabilities. *Anticancer Res*, **14**, 1759-65.
- Halford, M.M., Armes, J., Buchert, M., Meskenaite, V., Grail, D., Hibbs, M.L., Wilks, A.F., Farlie, P.G., Newgreen, D.F., Hovens, C.M. and Stacker, S.A. (2000) Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet*, **25**, 414-8.
- Hande, K.R. (1998) Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 173-84.
- Hannun, Y.A. and Luberto, C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*, **10**, 73-80.
- Harkin, D.P., Bean, J.M., Miklos, D., Song, Y.H., Truong, V.B., Englert, C., Christians, F.C., Ellisen, L.W., Maheswaran, S., Oliner, J.D. and Haber, D.A. (1999) Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, **97**, 575-86.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. and Shinagawa, A. (1994) Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, **107**, 2373-9.
- Hayashi, H., Shimizu, R., Fujii, K., Itoh, S., Yang, D. and Onozaki, K. (1997) Resistance to IL-1 anti-proliferative effect, accompanied by characteristics of advanced melanoma, permits invasion of human melanoma cells in vitro, but not metastasis in the nude mouse. *Int J Cancer*, **71**, 416-21.
- Haystead, T.A., Sim, A.T., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P. and Hardie, D.G. (1989) Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, **337**, 78-81.

- Heald, R., McLoughlin, M. and McKeon, F. (1993) Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell*, **74**, 463-74.
- Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Ushmorov, A., Dienz, O., Wing-Lan Leung, I., Lassam, N., Scheidereit, C., Droge, W. and Schmitz, M.L. (2000) Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol*, **20**, 2556-68.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-6.
- Herbst, R., Munemitsu, S. and Ullrich, A. (1995) Oncogenic activation of v-kit involves deletion of a putative tyrosine-substrate interaction site. *Oncogene*, **10**, 369-79.
- Herlyn, M. (1990) Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 101-12.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y. and Kitamura, Y. (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, **279**, 577-80.
- Hobert, O., Jallal, B. and Ullrich, A. (1996a) Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol*, **16**, 3066-73.
- Hobert, O., Sures, I., Ciossek, T., Fuchs, M. and Ullrich, A. (1996b) Isolation and developmental expression analysis of Enx-1, a novel mouse Polycomb group gene. *Mech Dev*, **55**, 171-84.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. and Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature*, **406**, 86-90.
- Honda, R., Ohba, Y., Nagata, A., Okayama, H. and Yasuda, H. (1993) Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *FEBS Lett*, **318**, 331-4.
- Hovens, C.M., Stacker, S.A., Andres, A.C., Harpur, A.G., Ziemiecki, A. and Wilks, A.F. (1992) RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11818-22.
- Hu, M.C., Tang-Oxley, Q., Qiu, W.R., Wang, Y.P., Mihindikulasuriya, K.A., Afshar, R. and Tan, T.H. (1998) Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor κ B activity. *J Biol Chem*, **273**, 33561-5.
- Huang, E., Nocka, K., Beier, D.R., Chu, T.Y., Buck, J., Lahm, H.W., Wellner, D., Leder, P. and Besmer, P. (1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*, **63**, 225-33.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M.A. and Bar-Eli, M. (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *Embo J*, **17**, 4358-69.
- Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D.J., Langley, K.E., Lyman, S.D. and Bar-Eli, M. (1996) Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene*, **13**, 2339-47.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Holmes, W.E., Ullrich, A. and Shepard, H.M. (1990) Selection for transformation and met protooncogene amplification in NIH 3T3 fibroblasts using tumor necrosis factor alpha. *Cell Growth Differ*, **1**, 129-34.

- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-4.
- Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K. and Okayama, H. (1991) Wee1(+)-like gene in human cells. *Nature*, **353**, 80-3.
- Imamoto, A. and Soriano, P. (1993) Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell*, **73**, 1117-24.
- Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charcon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L. and Kimchi, A. (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*, **390**, 180-4.
- Inbal, B., Shani, G., Cohen, O., Kissil, J.L. and Kimchi, A. (2000) Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 1044-54.
- Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S. and Nunez, G. (1998) RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 12296-300.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190-5.
- Iwama, A., Yamaguchi, N. and Suda, T. (1996) STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *Embo J*, **15**, 5866-75.
- Jamieson, L., Carpenter, L., Biden, T.J. and Fields, A.P. (1999) Protein kinase Ciota activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 3927-30.
- Jiang, W. and Hunter, T. (1997) Identification and characterization of a human protein kinase related to budding yeast Cdc7p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14320-5.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. and Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-54.
- Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J. and Lee, J.D. (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J*, **16**, 7054-66.
- Kato, Y., Tapping, R.I., Huang, S., Watson, M.H., Ulevitch, R.J. and Lee, J.D. (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*, **395**, 713-6.
- Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H. and Akira, S. (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol*, **18**, 1642-51.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.-N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z.-M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C. and Kufe, D. (2000) Translocation of SAPK/JNK to Mitochondria and Interaction with Bcl-XL in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem*, **275**, 322-327.

- Khatib, A.M., Siegfried, G., Prat, A., Luis, J., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2001) Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of IGF-1R processing in IGF1-mediated functions. *J Biol Chem*, **11**, 11.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A. and Kaelin, W.G., Jr. (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*, **269**, 1444-6.
- Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D.K., Bielawska, A. and Hannun, Y.A. (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J Biol Chem*, **274**, 21335-41.
- Kissil, J.L., Feinstein, E., Cohen, O., Jones, P.A., Tsai, Y.C., Knowles, M.A., Eydmann, M.E. and Kimchi, A. (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene*, **15**, 403-7.
- Kitamura, N., Kitamura, A., Toyoshima, K., Hirayama, Y. and Yoshida, M. (1982) Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of Rous sarcoma virus. *Nature*, **297**, 205-8.
- Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C. and Strebhardt, K. (1999) Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*, **59**, 2794-7.
- Koh, H., Lee, K.H., Kim, D., Kim, S., Kim, J.W. and Chung, J. (2000) Inhibition of Akt and its anti-apoptotic activities by tumor necrosis factor-induced protein kinase C-related kinase 2 (PRK2) cleavage. *J Biol Chem*, **275**, 34451-8.
- Kohno, K., Uchida, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Nakanishi, T., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Okada, Y. (1986) Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4978-82.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. and Burgering, B.M. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, **398**, 630-4.
- Kornbluth, S., Sudol, M. and Hanafusa, H. (1987) Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes protein. *Nature*, **325**, 171-3.
- Kothny-Wilkes, G., Kulms, D., Luger, T.A., Kubin, M. and Schwarz, T. (1999) Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand- and CD95-induced apoptosis but not from ultraviolet radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 28916-21.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-95.
- Kratzschmar, J., Lum, L. and Blobel, C.P. (1996) Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem*, **271**, 4593-6.
- Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S. and Lopaschuk, G.D. (1995) High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, **270**, 17513-20.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, **94**, 325-37.

- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, **384**, 368-72.
- Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T. and Hagiwara, M. (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun*, **242**, 357-64.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lapidot-Lifson, Y., Patinkin, D., Prody, C.A., Ehrlich, G., Seidman, S., Ben-Aziz, R., Benseler, F., Eckstein, F., Zakut, H. and Soreq, H. (1992) Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of *cdc2* required in hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 579-83.
- Lassam, N. and Bickford, S. (1992) Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*, **7**, 51-6.
- Lee, J.M. (1998) Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene*, **17**, 1653-62.
- Lee, K.K., Ohyama, T., Yajima, N., Tsubuki, S. and Yonehara, S. (2001) Mst, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation. *J Biol Chem*, **276**, 19276-85.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**, 31-5.
- Lee, S.Y. and Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques*, **9**, 676-9.
- Leu, C.M., Chang, C. and Hu, C. (2000) Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing *mcl-1* via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*, **19**, 1665-75.
- Lev, S., Yarden, Y. and Givol, D. (1992) Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J Biol Chem*, **267**, 15970-7.
- Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. (1999a) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol*, **1**, 461-6.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-4.
- Li, G., Fridman, R. and Kim, H.R. (1999b) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res*, **59**, 6267-75.
- Li, J., Peet, G.W., Balzarano, D., Li, X., Massa, P., Barton, R.W. and Marcu, K.B. (2001a) Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem*, **276**, 18579-90.
- Li, X., Commane, M., Jiang, Z. and Stark, G.R. (2001b) IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4461-5.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1985a) Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl*, **3**, 161-72.

- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1985b) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*, **313**, 144-7.
- Liou, J.S., Chen, C.Y., Chen, J.S. and Faller, D.V. (2000) Oncogenic ras mediates apoptosis in response to protein kinase C inhibition through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **275**, 39001-11.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A. and Korneluk, R.G. (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, **379**, 349-53.
- Lopez-Borges, S. and Lazo, P.A. (2000) The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*, **19**, 3656-64.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E. and Jacks, T. (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, **266**, 807-10.
- Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, M.K., Klein, R., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Goff, S.P. and Lemke, G. (1999) Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*, **398**, 723-8.
- Lumeng, C., Phelps, S., Crawford, G.E., Walden, P.D., Barald, K. and Chamberlain, J.S. (1999) Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci*, **2**, 611-7.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, **64**, 1111-22.
- Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S. and Mayo, M.W. (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, **20**, 1626-38.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-9.
- Manning, A.M., Williams, A.C., Game, S.M. and Paraskeva, C. (1991) Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor beta (TGF-beta): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF-beta. *Oncogene*, **6**, 1471-6.
- Mark, M.R., Scadden, D.T., Wang, Z., Gu, Q., Goddard, A. and Godowski, P.J. (1994) rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem*, **269**, 10720-8.
- Maru, Y. and Witte, O.N. (1991) The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, **67**, 459-68.
- Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T. and Yoshikai, Y. (2001) Interleukin-15 Prevents Mouse Mast Cell Apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL Expression. *J Biol Chem*, **276**, 26107-13.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The

- tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-5.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J. and Baldwin, A.S. (1997) Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*, **278**, 1812-5.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Chow, S.C., Orrenius, S. and Jondal, M. (1990) Interleukin 1 inhibits T cell receptor-mediated apoptosis in immature thymocytes. *J Biol Chem*, **265**, 3009-11.
- McCurrach, M.E., Connor, T.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. and Lowe, S.W. (1997) bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2345-9.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, S.J. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, 79-88.
- McDonnell, T.J. and Korsmeyer, S.J. (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*, **349**, 254-6.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S. and Bredesen, D.E. (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, **395**, 801-4.
- Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E. and Wang, B. (2000) Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol*, **2**, 62-9.
- Miao, H., Wei, B.R., Peehl, D.M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J.R., Rhim, J.S., Sedor, J.R., Burnett, E. and Wang, B. (2001) Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, **3**, 527-30.
- Mikosz, C.A., Brickley, D.R., Sharkey, M.S., Moran, T.W. and Conzen, S.D. (2001) Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem*, **276**, 16649-54.
- Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W. and Ullrich, A. (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, **72**, 835-46.
- Mills, G.B., Schmandt, R., McGill, M., Amendola, A., Hill, M., Jacobs, K., May, C., Rodricks, A.M., Campbell, S. and Hogg, D. (1992) Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem*, **267**, 16000-6.
- Millward, T., Cron, P. and Hemmings, B.A. (1995) Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5022-6.
- Millward, T.A., Heizmann, C.W., Schafer, B.W. and Hemmings, B.A. (1998) Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *Embo J*, **17**, 5913-22.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-57.

- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-7.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A. and Yuan, J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, **75**, 653-60.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell*, **80**, 293-9.
- Miyata, H., Doki, Y., Yamamoto, H., Kishi, K., Takemoto, H., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., Inoue, M., Shiozaki, H., Weinstein, I.B. and Monden, M. (2001) Overexpression of CDC25B overrides radiation-induced G2-M arrest and results in increased apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 3188-93.
- Miyoshi, E., Higashiyama, S., Nakagawa, T., Hayashi, N. and Taniguchi, N. (1997) Membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor acts as a tumor survival factor in a hepatoma cell line. *J Biol Chem*, **272**, 14349-55.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E. and Hagiwara, M. (1996) A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem*, **271**, 13675-9.
- Morris, M., Eifel, P.J., Lu, J., Grigsby, P.W., Levenback, C., Stevens, R.E., Rotman, M., Gershenson, D.M. and Mutch, D.G. (1999) Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*, **340**, 1137-43.
- Muda, M., Manning, E.R., Orth, K. and Dixon, J.E. (1999) Identification of the human YVH1 protein-tyrosine phosphatase orthologue reveals a novel zinc binding domain essential for in vivo function. *J Biol Chem*, **274**, 23991-5.
- Mukai, H., Kitagawa, M., Shibata, H., Takanaga, H., Mori, K., Shimakawa, M., Miyahara, M., Hirao, K. and Ono, Y. (1994) Activation of PKN, a novel 120-kDa protein kinase with leucine zipper-like sequences, by unsaturated fatty acids and by limited proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **204**, 348-56.
- Mukai, H. and Ono, Y. (1994) A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**, 897-904.
- Murray, N.R. and Fields, A.P. (1997) Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 27521-4.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. and Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, **278**, 1612-5.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P. and Tonks, N.K. (1998) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13513-8.
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M. and Aizawa, S. (1993) Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, **73**, 1125-35.
- Nagase, T., Seki, N., Tanaka, A., Ishikawa, K. and Nomura, N. (1995) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences

- of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res*, **2**, 167-74, 199-210.
- Nagata, S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, **33**, 29-55.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. (2001) PUMA, a Novel Proapoptotic Gene Is Induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Nalca, A., Qiu, S.G., El-Guendy, N., Krishnan, S. and Rangnekar, V.M. (1999) Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J Biol Chem*, **274**, 29976-83.
- Natali, P.G., Berlingieri, M.T., Nicotra, M.R., Fusco, A., Santoro, E., Bigotti, A. and Vecchio, G. (1995) Transformation of thyroid epithelium is associated with loss of c-kit receptor. *Cancer Res*, **55**, 1787-91.
- Nath, D., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Warn, A., Hutchinson, G.R., Yamada, K.M., Docherty, A.J. and Murphy, G. (1999) Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci*, **112**, 579-87.
- Navarro, P., Valverde, A.M., Benito, M. and Lorenzo, M. (1999) Activated Ha-ras induces apoptosis by association with phosphorylated Bcl-2 in a mitogen-activated protein kinase-independent manner. *J Biol Chem*, **274**, 18857-63.
- Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S. and Lin, A. (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **273**, 16415-20.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M.H. and Shimane, M. (1997) Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, **45**, 327-31.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-9.
- Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., Hashimoto, K., Isozaki, K., Nakamura, H., Kanakura, Y., Tanaka, T., Takabayashi, A., Matsuda, H. and Kitamura, Y. (1998) Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet*, **19**, 323-4.
- Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R. and Penninger, J.M. (1997) Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature*, **385**, 350-3.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, **259**, 1769-71.
- O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M.M., Earp, H.S. and Liu, E.T. (1991) axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, **11**, 5016-31.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-8.
- Ohashi, A., Funasaka, Y., Ueda, M. and Ichihashi, M. (1996) c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res*, **6**, 25-30.
- Oishi, K., Mukai, H., Shibata, H., Takahashi, M. and Ona, Y. (1999) Identification and characterization of PKNbeta, a novel isoform of protein kinase PKN: ex-

- pression and arachidonic acid dependency are different from those of PKN α . *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 808-14.
- Ojala, P.M., Yamamoto, K., Castanos-Velez, E., Biberfeld, P., Korsmeyer, S.J. and Makela, T.P. (2000) The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2. *Nat Cell Biol*, **2**, 819-25.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. and Donner, D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, **401**, 82-5.
- Pandey, P., Avraham, S., Place, A., Kumar, V., Majumder, P.K., Cheng, K., Nakazawa, A., Saxena, S. and Kharbanda, S. (1999) Bcl-xL blocks activation of related adhesion focal tyrosine kinase/proline-rich tyrosine kinase 2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase in the cellular response to methylmethane sulfonate. *J Biol Chem*, **274**, 8618-23.
- Pap, M. and Cooper, G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, **273**, 19929-32.
- Park, J., Leong, M.L., Buse, P., Maiyar, A.C., Firestone, G.L. and Hemmings, B.A. (1999) Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *Embo J*, **18**, 3024-33.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Ogg, S., Thoma, R.S., Byrnes, M.J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M.T. and Piwnica-Worms, H. (1998a) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ*, **9**, 197-208.
- Peng, Y., Genin, A., Spinner, N.B., Diamond, R.H. and Taub, R. (1998b) The gene encoding human nuclear protein tyrosine phosphatase, PRL-1. Cloning, chromosomal localization, and identification of an intron enhancer. *J Biol Chem*, **273**, 17286-95.
- Peso, L.d., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997) Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.
- Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P. and Graff, J.M. (1999) Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature*, **401**, 345-50.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D. and Ashkenazi, A. (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, **396**, 699-703.
- Potapova, O., Gorospe, M., Dougherty, R.H., Dean, N.M., Gaarde, W.A. and Holbrook, N.J. (2000) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol*, **20**, 1713-22.
- Puissant, C. and Houdebine, L.M. (1990) An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques*, **8**, 148-9.
- Pulido, R., Zuniga, A. and Ullrich, A. (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *Embo J*, **17**, 7337-50.
- Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356**, 397-400.

- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, **275**, 967-9.
- Rane, M.J., Coxon, P.Y., Powell, D.W., Webster, R., Klein, J.B., Pierce, W., Ping, P. and McLeish, K.R. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem*, **276**, 3517-23.
- Raveh, T., Droguett, G., Horwitz, M.S., DePinho, R.A. and Kimchi, A. (2001) DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol*, **3**, 1-7.
- Reed, J.C., Cuddy, M., Slabiak, T., Croce, C.M. and Nowell, P.C. (1988) Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature*, **336**, 259-61.
- Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D. and Beach, D. (1989) The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell*, **57**, 393-401.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M.G. and Breathnach, R. (1993) A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*, **8**, 1195-202.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. and Goeddel, D.V. (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, **83**, 1243-52.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. and Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-37.
- Rubin, B.Y. and Gupta, S.L. (1980) Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5928-32.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-67.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K. and May, W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem*, **274**, 20296-300.
- Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J.P., Jochum, W., Wagner, E.F. and Karin, M. (1999) JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol*, **9**, 116-25.
- Sabourin, L.A., Tamai, K., Seale, P., Wagner, J. and Rudnicki, M.A. (2000) Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. *Mol Cell Biol*, **20**, 684-96.
- Sakano, S., Iwama, A., Inazawa, J., Ariyama, T., Ohno, M. and Suda, T. (1994) Molecular cloning of a novel non-receptor tyrosine kinase, HYL (hematopoietic consensus tyrosine-lacking kinase). *Oncogene*, **9**, 1155-61.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H. and Elledge, S.J. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497-501.

- Sanjo, H., Kawai, T. and Akira, S. (1998) DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 29066-71.
- Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z. and Kolesnick, R. (1996) Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, **86**, 189-99.
- Scangos, G. and Ruddle, F.H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene*, **14**, 1-10.
- Schiff, P.B., Fant, J. and Horwitz, S.B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, **277**, 665-7.
- Schiff, P.B. and Horwitz, S.B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1561-5.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-25.
- Schlomann, U., Rathke-Hartlieb, S., Yamamoto, S., Jockusch, H. and Bartsch, J.W. (2000) Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *J Neurosci*, **20**, 7964-71.
- Schmandt, R., Hill, M., Amendola, A., Mills, G.B. and Hogg, D. (1994) IL-2-induced expression of TTK, a serine, threonine, tyrosine kinase, correlates with cell cycle progression. *J Immunol*, **152**, 96-105.
- Schmucker, D. and Zipursky, S.L. (2001) Signaling downstream of eph receptors and ephrin ligands. *Cell*, **105**, 701-4.
- Schultz, S.J., Fry, A.M., Sutterlin, C., Ried, T. and Nigg, E.A. (1994) Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ*, **5**, 625-35.
- Schultz, S.J. and Nigg, E.A. (1993) Identification of 21 novel human protein kinases, including 3 members of a family related to the cell cycle regulator nimA of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ*, **4**, 821-30.
- Sebastian, B., Kakizuka, A. and Hunter, T. (1993) Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3521-4.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. and Breard, J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, **3**, 346-52.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B. and Gray, J.W. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*, **21**, 99-102.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-7.
- Shtivelman, E. (1997) A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **14**, 2167-73.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J. and Wagner, E.F. (2000) The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell*, **102**, 211-20.
- Siliciano, J.D., Morrow, T.A. and Desiderio, S.V. (1992) *itk*, a T-cell-specific tyrosine kinase gene inducible by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11194-8.

- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M. and Pratt, W.B. (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem*, **272**, 16224-30.
- Smits, V.A., Klompmaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E.A. and Medema, R.H. (2000) Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol*, **2**, 672-6.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C. and Lowe, S.W. (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, **409**, 207-11.
- Song, Q., Lees-Miller, S.P., Kumar, S., Zhang, Z., Chan, D.W., Smith, G.C., Jackson, S.P., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K. and Lavin, M.F. (1996) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *Embo J*, **15**, 3238-46.
- Staal, S.P. (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5034-7.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. and et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, **263**, 92-5.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr. and Pavletich, N.P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, **284**, 455-61.
- Steiner, P., Rudolph, B., Müller, D. and Eilers, M. (1996) The functions of myc in cell cycle progression and apoptosis. *Progress in Cell Cycle Research*, **2**, 73-82.
- Sternlicht, M.D., Lochter, A., Sympon, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J. and Werb, Z. (1999) The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, **98**, 137-46.
- Stitt, T.N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D.R., Jones, P.F. and et al. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, **80**, 661-70.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-45.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-78.
- Sullivan, K.A., Liao, Y.C., Alborzi, A., Beiderman, B., Chang, F.H., Masters, S.B., Levinson, A.D. and Bourne, H.R. (1986) Inhibitory and stimulatory G proteins of adenylate cyclase: cDNA and amino acid sequences of the alpha chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6687-91.
- Takahashi, M., Mukai, H., Toshimori, M., Miyamoto, M. and Ono, Y. (1998) Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11566-71.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, **380**, 627-30.

- Tan, J.C., Nocka, K., Ray, P., Traktman, P. and Besmer, P. (1990) The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. *Science*, **247**, 209-12.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R. and Comb, M.J. (1999) p90RSK Blocks Bad-mediated Cell Death via a Protein Kinase C-dependent Pathway. *J. Biol. Chem*, **274**, 34859-34867.
- Tanaka, N., Asao, H., Ohtani, K., Nakamura, M. and Sugamura, K. (1993) A novel human tyrosine kinase gene inducible in T cells by interleukin 2. *FEBS Lett*, **324**, 1-5.
- Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H. and Kitamura, Y. (1999) Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, **59**, 4297-300.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M. and Nishida, E. (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J*, **20**, 466-79.
- Taylor, I.C., Roy, S., Yaswen, P., Stampfer, M.R. and Varmus, H.E. (1995) Mouse mammary tumors express elevated levels of RNA encoding the murine homology of SKY, a putative receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **270**, 6872-80.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Tschopp, J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **386**, 517-21.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-62.
- Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R. and Lassam, N.J. (1996) MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J*, **15**, 7026-35.
- Tiganis, T., Bennett, A.M., Ravichandran, K.S. and Tonks, N.K. (1998) Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, **18**, 1622-34.
- Tiganis, T., Kemp, B.E. and Tonks, N.K. (1999) The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, **274**, 27768-75.
- Tobimatsu, T. and Fujisawa, H. (1989) Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem*, **264**, 17907-12.
- Tollefson, A.E., Hermiston, T.W., Lichtenstein, D.L., Colle, C.F., Tripp, R.A., Dimitrov, T., Toth, K., Wells, C.E., Doherty, P.C. and Wold, W.S. (1998) Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature*, **392**, 726-30.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, **288**, 870-4.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A. and Nishida, E. (2001) Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature*, **410**, 215-20.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-5.

- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985a) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-3.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, **226**, 1097-9.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985b) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, **229**, 1390-3.
- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1985c) Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature*, **315**, 340-3.
- Tung, R.M. and Blenis, J. (1997) A novel human SPS1/STE20 homologue, KHS, activates Jun N-terminal kinase. *Oncogene*, **14**, 653-9.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. and et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-25.
- van den Berg, I.E., van Beurden, E.A., Malingre, H.E., van Amstel, H.K., Poll-The, B.T., Smeitink, J.A., Lamers, W.H. and Berger, R. (1995) X-linked liver phosphorylase kinase deficiency is associated with mutations in the human liver phosphorylase kinase alpha subunit. *Am J Hum Genet*, **56**, 381-7.
- Vander Heiden, M.G. and Thompson, C.B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, **1**, E209-16.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-2.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, **380**, 75-9.
- Vousden, K.H. (2000) p53: death star. *Cell*, **103**, 691-4.
- Vucic, D., Kaiser, W.J. and Miller, L.K. (1998) Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol*, **18**, 3300-9.
- Wadzinski, B.E., Wheat, W.H., Jaspers, S., Peruski, L.F., Jr., Lickteig, R.L., Johnson, G.L. and Klemm, D.J. (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol*, **13**, 2822-34.
- Walden, P.D. and Cowan, N.J. (1993) A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette. *Mol Cell Biol*, **13**, 7625-35.
- Wang, B., Kishihara, K., Zhang, D., Hara, H. and Nomoto, K. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel human receptor protein tyrosine phosphatase gene, hPTP-J: down-regulation of gene expression by PMA and calcium ionophore in Jurkat T lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 77-81.

- Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S. (1996a) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, **274**, 784-7.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L. and Baldwin, A.S., Jr. (2000a) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*, **275**, 32592-7.
- Wang, H., Lian, Z., Lerch, M.M., Chen, Z., Xie, W. and Ullrich, A. (1996b) Characterization of PCP-2, a novel receptor protein tyrosine phosphatase of the MAM domain family. *Oncogene*, **12**, 2555-62.
- Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X.D. (1998a) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol*, **140**, 737-50.
- Wang, M.H., Ronsin, C., Gesnel, M.C., Coupey, L., Skeel, A., Leonard, E.J. and Breathnach, R. (1994) Identification of the ron gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein. *Science*, **266**, 117-9.
- Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Muller, H.A. and Hay, B.A. (1999) The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell*, **98**, 453-63.
- Wang, X., Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2000b) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 39435-43.
- Wang, X.S., Diener, K., Tan, T.H. and Yao, Z. (1998b) MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun*, **253**, 33-7.
- Wang, Z., Juttermann, R. and Soloway, P.D. (2000c) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem*, **275**, 26411-5.
- Warbrick, E. (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays*, **22**, 997-1006.
- Watabe, M., Kakeya, H., Onose, R. and Osada, H. (2000) Activation of MST/Krs and c-Jun N-terminal kinases by different signaling pathways during cytotrienin A-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 8766-71.
- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. and Narumiya, S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho. *Science*, **271**, 645-8.
- Weiss, F.U., Daub, H. and Ullrich, A. (1997) Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 80-6.
- Welsh, M., Mares, J., Karlsson, T., Lavergne, C., Breant, B. and Claesson-Welsh, L. (1994) Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. *Oncogene*, **9**, 19-27.
- Wen, L.P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.L., Orth, K. and Rosen, G.D. (1997) Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 26056-61.
- Weng, Q.P., Andrabi, K., Klippel, A., Kozlowski, M.T., Williams, L.T. and Avruch, J. (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activation of p70 S6 kinase in situ through site-specific p70 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5744-8.
- White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S., Kusher, D.I. and Gooding, L.R. (1992) The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, **12**, 2570-80.

- Wick, M.J., Dong, L.Q., Riojas, R.A., Ramos, F.J. and Liu, F. (2000) Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem*, **275**, 40400-6.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. and et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, **3**, 673-82.
- Will, H. and Hinzmann, B. (1995) cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem*, **231**, 602-8.
- Williams, D.E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C.J., Park, L.S., Martin, U., Mochizuki, D.Y., Boswell, H.S. and et al. (1990) Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*, **63**, 167-74.
- Williams, N.G., Zhong, H. and Minneman, K.P. (1998) Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells. *J Biol Chem*, **273**, 24624-32.
- Winkler, A.B. (1994) Bedeutung von Rezeptortyrosinkinasen für die Entstehung und Progression von Melanomen. *Dissertation*.
- Witty, J.P., Lempka, T., Coffey, R.J., Jr. and Matrisian, L.M. (1995) Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis. *Cancer Res*, **55**, 1401-6.
- Wo, Y.Y., McCormack, A.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Davis, J.P., Mitchell, G.L. and Van Etten, R.L. (1992) Sequencing, cloning, and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J Biol Chem*, **267**, 10856-65.
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E. and Sawyers, C.L. (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15587-91.
- Wu, Y.M., Huang, C.L., Kung, H.J. and Huang, C.Y. (2001) Proteolytic activation of ETK/Bmx tyrosine kinase by caspases. *J Biol Chem*, **276**, 17672-8.
- Wu, Z., Wu, J., Jacinto, E. and Karin, M. (1997) Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 7407-16.
- Wullrich-Schmoll, A. and Kilimann, M.W. (1996) Structure of the human gene encoding the phosphorylase kinase beta subunit (PHKB). *Eur J Biochem*, **238**, 374-80.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1972) Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J Pathol*, **106**, ix.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-31.
- Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G.F. and Testa, J.R. (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 247-52.

- Xiao, H., Palhan, V., Yang, Y. and Roeder, R.G. (2000) TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *Embo J*, **19**, 956-63.
- Xiong, W. and Parsons, J.T. (1997) Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, **139**, 529-39.
- Xu, Z., Maroney, A.C., Dobrzanski, P., Kukekov, N.V. and Greene, L.A. (2001) The MLK Family Mediates c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Neuronal Apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 4713-24.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 Is Phosphorylated and Inactivated by an ASK1/Jun N-Terminal Protein Kinase Pathway Normally Activated at G2/M. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 8469-8478.
- Yan, H., Grossman, A., Wang, H., D'Eustachio, P., Mossie, K., Musacchio, J.M., Silvennoinen, O. and Schlessinger, J. (1993) A novel receptor tyrosine phosphatase-sigma that is highly expressed in the nervous system. *J Biol Chem*, **268**, 24880-6.
- Yan, W., Suominen, J. and Toppari, J. (2000) Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci*, **113**, 161-8.
- Yang, D., van Boom, S.S., Reedijk, J., van Boom, J.H., Farrell, N. and Wang, A.H. (1995) A novel DNA structure induced by the anticancer bisplatinum compound crosslinked to a GpC site in DNA. *Nat Struct Biol*, **2**, 577-8.
- Yang, J., New, L., Jiang, Y., Han, J. and Su, B. (1998) Molecular cloning and characterization of a human protein kinase that specifically activates c-Jun N-terminal kinase. *Gene*, **212**, 95-102.
- Yano, S., Tokumitsu, H. and Soderling, T.R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, **396**, 584-7.
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. and Ullrich, A. (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*, **6**, 3341-51.
- Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. and Van Dyke, T. (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, **385**, 637-40.
- Yoshiyama, K., Higuchi, Y., Kataoka, M., Matsuura, K. and Yamamoto, S. (1997) CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics*, **41**, 56-62.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Mol Cell*, **7**, 673-682.
- Yuan, J. and Yankner, B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature*, **407**, 802-9.
- Yuan, Y., Li, D.M. and Sun, H. (1998) PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*, **273**, 20347-53.
- Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V. and Cheng, J.Q. (2000) Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*, **19**, 2324-30.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G.F. and Johnson, G.L. (1998) Role of MEKK1 in Cell Survival and Activation of JNK and ERK Pathways Defined by Targeted Gene Disruption. *Science*, **282**, 1911-1914.

- Zarling, J.M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M.B., Lioubin, M.N. and Todaro, G.J. (1986) Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9739-43.
- Zeng, Q., Si, X., Horstmann, H., Xu, Y., Hong, W. and Pallen, C.J. (2000) Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem*, **275**, 21444-52.
- Zhang, B.H., Tang, E., Zhu, T., Greenberg, M., Vojtek, A. and Guan, K.L. (2001) Serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem*, **15**, 15.
- Zhang, P., Liu, B., Jenkins, G.M., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (1997) Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 9609-12.
- Zhao, Y., Loyer, P., Li, H., Valentine, V., Kidd, V. and Kraft, A.S. (1997) Cloning and chromosomal location of a novel member of the myotonic dystrophy family of protein kinases. *J Biol Chem*, **272**, 10013-20.
- Zhou, G., Bao, Z.Q. and Dixon, J.E. (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **270**, 12665-9.
- Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. and McKeon, F. (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, **93**, 851-61.
- Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., Murdock, D.C. and et al. (1990) Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, **63**, 213-24.
- Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H.D., DeClerck, Y.A., Langley, K.E., Bahou, W.F., Docherty, A.J. and Cao, J. (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem*, **273**, 1216-22.
- Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J.G., Dean, N.M., McLean, T.K., Aragon, I. and Honkanen, R.E. (1999) Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry*, **38**, 8849-57.

Veröffentlichungen

Literatur

Abraham R. and Ullrich A (2001) Identification of MEK-3 as a major antiapoptotic factor in squamous cell carcinoma by a functional genomics approach. In Vorbereitung.

Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C. und Ullrich A. (1999) EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**: 884-888

Stec B., Abraham R., Giroux E. und Kantrowitz ER (1996) Crystal Structure of the active site mutant (Arg243-->Ala) in the T and R allosteric states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase expressed in Escherichia coli. *Protein Sci.* **8**: 1541-1553

Poster

Abraham R., Schubart D. and Ullrich A. Identification of antiapoptotic kinases and phosphatases by a functional genomics approach. (2001) Miami Winter Symposium: Cell Death and Ageing. Miami, U.S.A.

Stec B., Guqiang L., Abraham R., Giroux E., Williams M. K. und Kantrowitz E.R. (1996) Toward the allosteric mechanism of fructose-1,6-bisphosphatase: X-ray structures and kinetics of mutant enzymes. The XVII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. Seattle, U.S.A.

Patente

Patentanmeldung beim Patentamt der U.S.A., 2.2.2001

Axel Ullrich, Reimar Abraham

„Identification of Targets by a Functional Genomics Approach“

GI-Nr. 0204-2841 ZJE

Lebenslauf

Name: Reimar Abraham
Geburtsdatum: 24.8.1970
Geburtsort: Hennigsdorf

1977-1985 Polytechnische Oberschule „Heinz Bartsch“ Oranienburg
1985-1989 Erweiterte Oberschule „F. F. Runge“ Oranienburg
1989 Abitur

1989-1990 Armeedienst in der NVA

1990-1991 Aufenthalt in Australien

1991-1994 Studium der Biochemie an der Humboldt Universität zu Berlin
1994-1995 Fulbright-Stipendiat am Boston College, Boston, U.S.A.
1995-1996 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Charité, Berlin
1996 Diplom

1997-2001 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. A. Ullrich

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. A. Ullrich, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand, danke ich herzlich für seine Unterstützung, die Themenstellung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Gierl, der die Betreuung dieser Arbeit übernahm.

Herrn Dr. Stefan Ehlert (Abt. Huber) danke ich für Ratschläge zur Proteinaufreinigung.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Dr. Uli Weiss, Charles Cant, Andreas Lankenau, Dr. Jürgen Schnekenburger, Johannes Bange, Norbert Prenzel, und Dr. Irmis Sures danke ich für die gute Zusammenarbeit und vielfältigen Diskussionen.

Schließlich möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken für Ihre Geduld, Ihr Verständnis und die unzähligen Hilfen während des Studiums.