

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Untersuchungen zur Ursache der
Anreicherung des AXL-Proteins durch
den AXL-Inhibitor BMS-777607**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Markus Lauter

geboren am 14.07.1992 in Friedrichshafen

Betreuer: Prof. Dr. Guido Posern

Betreuerin: Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann

Gutachter:

Prof. Dr. R. Horstkorte

PD Dr. G. Kirfel, Bonn

04.05.2021

13.12.2021

Referat

In vorangegangenen Untersuchungen *in vitro* ist aufgefallen, dass in Zellen nach Behandlung mit dem AXL-Inhibitor BMS-777607 eine Zunahme der AXL-Proteinmenge im Western-Blot zu beobachten ist. Es sollte nun herausgefunden werden, wie es zu dieser Anreicherung des Proteins kommt.

Die Expression der AXL-Rezeptortyrosinkinase kann auf mehreren Ebenen beeinflusst werden. Die Untersuchungen wurden begonnen mit der Analyse eines möglichen Einflusses von BMS-777607 auf die Transkription und Stabilität der AXL-mRNA durch Reverse Transkriptase PCR mit quantitativer PCR (RT-qPCR). Es konnte dabei keine Veränderung durch die Behandlung mit dem Inhibitor festgestellt werden. Ebenfalls wurde der untersuchte Effekt auf AXL nach Transfektion eines AXL exprimierenden Plasmides, welches weder 3' noch 5' UTR des AXL-Genes beinhaltet, beobachtet. Ein Einfluss von miRNAs auf die Translationsgeschwindigkeit wird somit, zumindest für solche, die in den untranslatierten Regionen binden, unwahrscheinlich.

Analysen bezüglich der Translation wurden mittels der Ribopuromylierungsmethode (RPM) und der Polysomenfraktionierung durchgeführt. Keine der beiden Methoden konnte einen Einfluss von BMS auf die Translation der *AXL-messenger RNA* (mRNA) nachweisen. Ein Ausschluss eines Einflusses war aber ebenfalls nicht möglich.

Die Faltung und Reifung von AXL wurde nicht näher untersucht. Es handelte sich bei dem angereicherten AXL allerdings um das 140 kDa schwere, vollständig glykosylierte AXL, sodass ein Einfluss von BMS auf die Reifung unwahrscheinlich ist.

Der Abbau eines Proteins stellt die letzte Möglichkeit der Beeinflussung der Expression dar. Für AXL gibt es dabei mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann AXL durch Sekretasen gespalten werden, wobei mehrere Fragmente entstehen. Zum anderen kann der Rezeptor nach Aktivierung ubiquitiniert, internalisiert und lysosomal abgebaut werden. Durch BMS haben sich den Abbau betreffend die deutlichsten Effekte gezeigt. So wurde nach Behandlung AXL vermehrt gespalten und weniger lysosomal abgebaut. Zur Analyse dessen wurden Durchflusszytometrie, Western-Blot, Immunpräzipitation und Transfektion verwendet. BMS verhinderte dabei die Internalisierung und Ubiquitinierung des Rezeptors. Der Effekt konnte durch inaktivierende Mutation der Kinase aufgehoben werden, wobei die Proteinmenge des mutierten AXLs der entsprach, die nach 24 stündiger BMS-Inkubation auftrat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BMS die Anreicherung von AXL am ehesten durch Inhibition der Kinase und eine daraus resultierende Beeinflussung des Abbaus verursacht. Einflüsse auf die Translation im endogenen System konnten dabei nicht ausgeschlossen werden.

Lauter, Markus: Untersuchungen zur Ursache der Anreicherung des AXL-Proteins durch den AXL-Inhibitor BMS-777607, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 62 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Rezeptortyrosinkinase AXL	1
1.1.1	Struktureller Aufbau	2
1.1.2	Regulation der AXL-Expression	3
1.1.3	Signaltransduktion	4
1.2	BMS-777607	6
2	Zielstellung	6
3	Material und Methoden	7
3.1	Material	7
3.1.1	Geräte	7
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	9
3.1.3	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	12
3.1.4	Primer	14
3.2	Methoden	15
3.2.1	Zellkultur	15
3.2.2	Western-Blot	15
3.2.3	Immunpräzipitation	16
3.2.4	Durchflusszytometrie	16
3.2.5	<i>Ribosome bound nascent chain puromycylation</i> (RPM)	17
3.2.6	Polysomenfraktionierung	17
3.2.7	Reverse Transkriptase PCR mit quantitativer PCR (RT-qPCR)	18
3.2.8	<i>Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach</i> (SOMA)	18
3.2.9	Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (SLIC)	19
3.2.10	Bakterielle Transformation	19
3.2.11	Transfektion	20
3.2.12	Statistische Analyse	20
4	Ergebnisse	21
4.1	BMS erhöht in niedriger μM -Konzentration die AXL-Proteinmenge innerhalb von 24 Stunden	21
4.2	BMS hat keinen Einfluss auf die AXL-mRNA-Menge	21
4.3	Ein Einfluss von BMS auf die Translation kann nicht ausgeschlossen werden	22
4.3.1	Einfluss von BMS auf die Gesamttranslationsleistung	22
4.3.2	Einfluss von BMS auf die spezifische Translation der AXL-mRNA	23
4.4	BMS beeinflusst die Degradation von AXL	25
4.4.1	In Hs578T-Zellen wird AXL durch BMS im Cycloheximid-Chase stabilisiert .	25
4.4.2	Serum im Medium hat einen Einfluss auf die Anreicherung von AXL-Protein durch BMS	26
4.4.3	Abbau durch α -Sekretasen	28

4.4.4	Gas6 induzierter Abbau	29
4.4.5	BMS verhindert die Internalisierung von AXL	31
4.4.6	Die Ubiquitinierung von AXL wird durch BMS-777607 (BMS) verhindert . . .	33
4.4.7	BMS benötigt eine intakte AXL-Kinase-Domäne für die AXL-Anreicherung .	34
4.4.8	Mutation des Lysins an Position 540 verhindert nicht den Abbau von AXL . .	36
4.5	HEK293-Zellen verändern ihre Form durch AXL-Überexpression	37
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	43
7	Literaturverzeichnis	44
8	Thesen	52
9	Selbständigkeitserklärung	VI
10	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII
11	Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	Tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ALAS	Aminolävulinatsynthase
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
Ark	<i>Adhesion-related kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AXL	AXL-Rezeptortyrosinkinase
BMS	BMS-777607 (N-(4-(2-Amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamid)
BSA	Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CQ	Chloroquin
CST	Cell Signalling Technology
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl-L-alanyl)]-(S)-phenylglycin t-butyl ester
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FLT3	<i>fms like tyrosine kinase 3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gas6	<i>growth arrest specific gene 6</i>
GRB2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2
ddH₂O	zweifach destilliertes Wasser
HIF	Hypoxieinduzierter Faktor

HSP70	Hitzeschockprotein 70
HSP90	Hitzeschockprotein 90
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MZF1	myeloides Zinkfingerprotein 1
NAD⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NEB	New England Biolabs
NSCLC	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PtdSer	Phosphatidylserin
PTPRG	Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ G
RPM	<i>Ribosome bound nascent chain puromycylation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT-qPCR	Reverse Transkriptase PCR mit quantitativer PCR
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sAXL	lösliches extrazelluläres AXL-Fragment
SCBT	Santa Cruz Biotechnology
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLIC	<i>Sequence and Ligation Independent Cloning</i>
SOMA	<i>Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach</i>
Sp1 und Sp3	<i>specificity protein 1 und 3</i>

TAM	Tyro3-, AXL- und c-Mer-Tyrosinkinase
TAZ	<i>transcriptional activator with PDZ-binding domain</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
TEAD	<i>transcriptional enhancer associated domain</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
UTR	untranslatierte Region
YAP	<i>yes-associated protein</i>

1 Einleitung

Tumorerkrankungen spielen in einer alternden Gesellschaft mit guter medizinischer Versorgung eine große Rolle hinsichtlich der Todesursachen. So sind 2016 laut Todesursachenstatistik etwa 25 % der in Deutschland Verstorbenen an einer bösartigen Neubildung verschieden (Statistisches Bundesamt, 2019). Entsprechend hat sich in den letzten Jahren die Behandlung von Krebserkrankungen weiterentwickelt. Insbesondere werden zunehmend einzelne Proteine in den Tumorzellen gezielt durch neu entwickelte Medikamente gehemmt. Eine Dysregulation oder Mutation dieser Zielproteine kann dabei einen treibenden Faktor in der Genese des Tumors darstellen. Hier spielen Tyrosinkinase eine bedeutende Rolle und werden entsprechend zu den Onkogenen gezählt. Erst vor kurzem wurde eine neue Familie von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) beschrieben, die TAM-Familie, welche Tyro 3, AXL und c-Mer beinhaltet. Die in dieser Studie untersuchte AXL-Rezeptortyrosinkinase spielt dabei insbesondere in der Entstehung von Resistenzen gerade gegen diese neuen, selektiven Medikamente eine Rolle.

1.1 Die Rezeptortyrosinkinase AXL

Das erste Mal wurde die AXL-Rezeptortyrosinkinase (AXL) 1991 mit Namen *Adhesion-related kinase* (Ark) erwähnt (Rescigno et al., 1991). Im selben Jahr wurde der Rezeptor auch als AXL, abgeleitet vom griechischen „änexelekto“ für unkontrolliert, und als UFO, im Sinne von „unknown funktion“, benannt (O’Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991). Drei Jahre später wurden die weiteren Angehörigen der TAM-Familie beschrieben. Diese besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit. Um die Funktion der Rezeptoren zu entschlüsseln wurden Knockout-Mäuse generiert, welche keine der TAMs exprimieren. Dabei konnte eine vermehrte Autoimmunität festgestellt werden. Es wurden geschwollene Gelenke, Hautläsionen, Hämorrhagien und Glomerulonephritiden beobachtet. Eine Hyperaktivierung von antigenpräsentierenden Zellen wurde als ursächlich deklariert (Lu und Lemke, 2001). Außerdem sind die Triple-Knockout-Mäuse erblindet. Es ist postnatal zu einer Degeneration von Zäpfchen und Stäbchen in der Retina gekommen (Lu et al., 1999).

Wie bereits erwähnt wurde AXL auch in Zusammenhang mit bösartigen Neoplasien gebracht. Initial in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) nachgewiesen, wurde eine Relevanz auch bei weiteren Tumorentitäten nachgewiesen (O’Bryan et al., 1991). Für das Adenokarzinom der Lunge, dabei handelt es sich um ein nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), konnte eine negative Korrelation von AXL-mRNA und Proteinmenge mit den 5-Jahres-Überlebensraten gezeigt werden (Ishikawa et al., 2013). In vitro ließ sich eine gesteigerte Invasivität von Lungenkarzinomzellen mit hoher AXL-Expression nachweisen und durch AXL-Überexpression erzeugen bzw. durch *Small interfering RNA* (siRNA)-Knockdown reduzieren (Shieh et al., 2005). Auch ein Zusammenhang mit Resistenzen gegen Chemotherapeutika und spezifische Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) wurde beobachtet (Zhang et al., 2012; Taniguchi et al., 2019; Kurokawa et al., 2013; Wu et al., 2014; Linger et al., 2013). Für Brustkrebs haben sich ähnliche Ergebnisse gezeigt. AXL ist dabei in invasiven Brustkrebszellen ex-

primiert, wohingegen AXL in den weniger invasiven Zellen kaum nachweisbar ist. Ebenfalls ließ sich durch Transfektion einer AXL-siRNA die Invasivität von Brustkrebszellen steigern und durch AXL-Knockdown reduzieren (Zhang et al., 2008).

1.1.1 Struktureller Aufbau

Extrazellulär besitzt AXL N-terminal liegend zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen. Hier findet die Bindung des Liganden statt (Sasaki et al., 2006). Nach C-terminal folgen zwei Fibronektin III-ähnliche Domänen. Die Funktion dieser Domänen ist noch nicht abschließend geklärt. Auf Grund der durch diese Domänen existierenden Ähnlichkeit zum neuronalen Zelladhäsionsmolekül 1 wurde ein Einfluss auf die Adhäsion angenommen (Salian-Mehta et al., 2014; Wimmel et al., 2001). Gefolgt von der Transmembrandomäne findet sich intrazellulär eine Kinase-Domäne. Diese beinhaltet eine Adenosintriphosphat (ATP)-Bindetasche, welche durch die K567R-Gatekeepermutation inaktiviert werden kann (Zhang et al., 2012; Melaragno et al., 2004; O'Bryan et al., 1991).

Für AXL ist nur das *growth arrest specific gene 6* (Gas6) als aktivierender Ligand mehrfach nachgewiesen (Hafizi und Dahlback, 2006; Sasaki et al., 2006). Die Familienmitglieder Tyro3 und c-Mer können neben Gas6 auch Protein S als Liganden binden (Hafizi und Dahlback, 2006). 2010 wurden die Tubby-ähnlichen Proteine 1 und 2 (Tulp 1 und 2) als weitere Liganden von AXL identifiziert. Ob diese in der Lage sind den AXL-Rezeptor zu aktivieren, ist noch nicht beantwortet. Tubby und Tulp1 können zumindest eine Phosphorylierung der c-Mer-Tyrosinkinase auszulösen (Caberoy et al., 2010). In einer 2018 durchgeführten Studie konnte in Glioblastomzellen außerdem eine AXL-Phosphorylierung durch Protein S ausgelöst werden (Sadahiro et al., 2018).

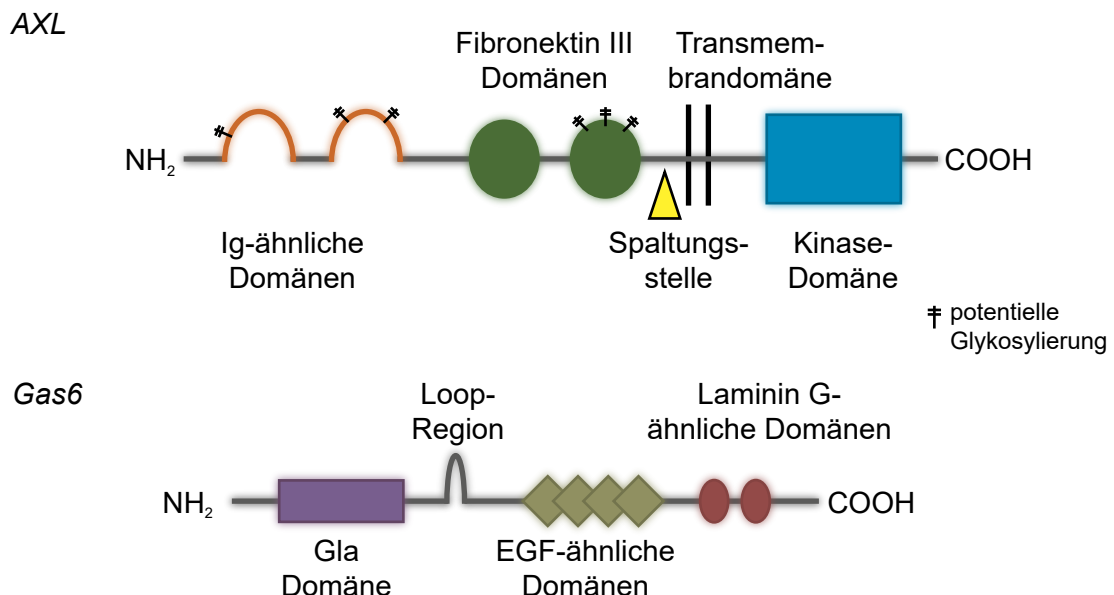


Abbildung 1: Schematischer struktureller Aufbau der AXL-Rezeptortyrosinkinase und seines Liganden Gas6. Modifiziert nach Axelrod und Pienta (2014).

Wie die anderen TAM-Familienmitglieder auch, kann AXL mehrfach glykosyliert werden. Es liegt in seiner unglykosylierten Form als 104 kDa Protein im Western Blot vor.

Eine partiell-glykosylierte Form ist bei 120 kDa erkennbar. Das vollständig glykosylierte AXL-Protein erreicht ein Molekulargewicht bzw. eine Laufhöhe im Western Blot von 140 kDa (O'Bryan et al., 1991, 1995). Unter Mangel an Glucose wurde zudem 114 kDa AXL beschrieben (Cavet et al., 2008).

1.1.2 Regulation der AXL-Expression

Die Menge einer Rezeptortyrosinkinase kann auf Grund vieler Mechanismen verändert sein. Abbildung 2 soll einen Überblick über die beeinflussbaren Schritte geben. Das AXL-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert. Durch Veränderung der Transkription kann die mRNA-Menge angepasst werden. Ebenfalls Einfluss auf die Menge an mRNA können microRNAs (miRNAs) nehmen. Die Proteinmenge kann dann im nächsten Schritt durch Anpassung der Translation verändert werden. Eine fehlerhafte Faltung würde früher zum Abbau des Proteins und daher zur Verminderung der Proteinmenge führen. Schließlich wird durch den Abbau des Rezeptors ebenfalls Einfluss auf die AXL-Expression genommen. Die einzelnen Teilschritte werden nachfolgend jeweils näher beleuchtet.

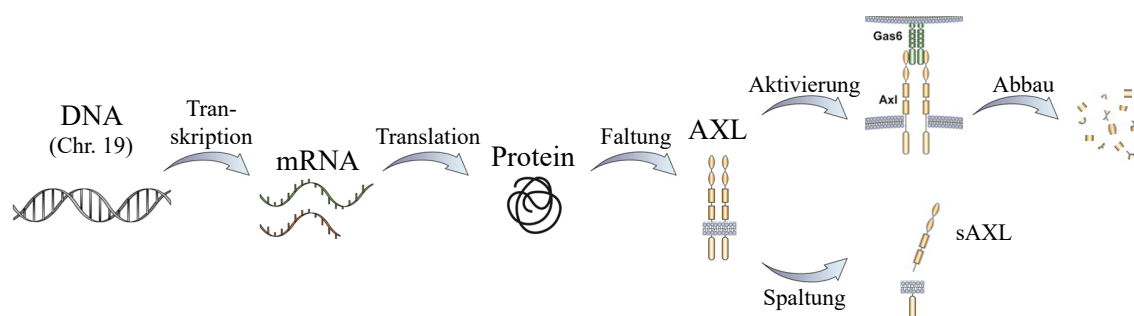


Abbildung 2: Für die Homöostase der AXL-Proteinmenge können an mehreren Stellen die Synthese und der Abbau des Rezeptors moduliert werden. Ist einer dieser Prozesse gestört, kann es zur Veränderung der Proteinmenge kommen. Modifizierte Abbildung aus (Levin et al., 2016).

Es wurden bereits mehrere Faktoren identifiziert, welche die Transkription des AXL-Gens regulieren. Die Hypoxie-induzierten Faktoren 1 und 2 (HIF-1 und HIF-2) binden dabei in der proximalen Promotorregion des AXL-Gens und führen zu einer Erhöhung der Expression (Rankin et al., 2014). Auch finden sich drei Bindemotive für das myeloide Zinkfingerprotein 1 (MZF1) im AXL-Promotor. Es konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression von MZF1 auch die Expression von AXL steigt (Mudduluru et al., 2010). Durch Mutation der *Activator Protein 1* (AP-1)-Bindestelle konnte die Überexpression von AXL in CML-Zelllinien mit Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) deutlich reduziert werden (Dufies et al., 2011). Des Weiteren spielen die Transkriptionsfaktoren *specificity protein 1 und 3* (Sp1 und Sp3), Faktoren der TEAD-Familie mit ihren Koaktivatoren *yes-associated protein* (YAP) und *transcriptional activator with PDZ-binding domain* (TAZ) sowie der Methylierungszustand des AXL-Promotors und die Histon-Acetylierung bzw. -Methylierung eine Rolle in der Regulation (Mudduluru und Allgayer, 2008; Gibault et al., 2018; Ott et al., 2012).

Auf Ebene der Translation ist weit weniger über die Regulation des AXLs bekannt. Die miRNAs 34a und 199a/b können in der 3' untranslatierten Region (UTR) der AXL-mRNA binden und durch Abbau der mRNA die Expression von AXL unterdrücken (Mudduluru et al., 2011).

Durch Hemmung der Proteinfaltung und Reifung kann ebenfalls die Menge an AXL modifiziert werden. So konnte durch Geldanamycin und seinem in klinischen Tests befindlichen Derivat Tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG), beides Inhibitoren des Hitzeschockproteins 90 (HSP90), die AXL-Menge reduziert werden. Durch Blockierung des HSP90 ist es in vitro zur Bindung von Hitzeschockprotein 70 (HSP70) an das unreife AXL gekommen mit nachfolgender Polyubiquitinierung und Degradation (Krishnamoorthy et al., 2013).

Ein weiterer Mechanismus, der zum Abbau von 140 kDa AXL führt, ist die proteolytische Spaltung des Rezeptors durch α - und γ -Sekretasen. Dabei entsteht zunächst durch den Verdau mittels α -Sekretasen wie *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM) 10 oder 17 ein 55 kDa C-terminales Fragment, welches in der Membran verbleibt. Dieses wird weiter von den γ -Sekretasen abgebaut zu einem 52 kDa Fragment. Im Proteasom erfolgt dessen weiterer Abbau. (Bae et al., 2015; Lu et al., 2017). Das Loslösen von der Membran durch die γ -Sekretasen führt auch dazu, dass ein Kernlokalisierungssignal freigelegt wird. Dadurch kann das 52 kDa Fragment in den Zellkern translozieren (Lu et al., 2017). Bei der Spaltung von AXL durch α -Sekretasen kommt es zudem zur Freisetzung des extrazellulären N-terminalen Anteils mit einer Größe von etwa 80-85 kDa (Ott et al., 2012; Miller et al., 2016). Der lösliche AXL-Teil (sAXL) ist auch im Serum nachweisbar und bindet dort Gas6, sodass kaum freies Gas6 im Plasma für eine Aktivierung der Rezeptoren der TAM-Familie zur Verfügung steht (Ekman et al., 2010).

Andererseits kann der Abbau von AXL wie bei anderen Rezeptoren auch nach Aktivierung durch Ubiquitinierung und einen nachgeschalteten lysosomalen Verdau stattfinden. Durch die Bindung von Gas6 und die anschließende Autophosphorylierung kommt es zur Interaktion von AXL mit den Ubiquitin-Ligasen c-Cbl und Cbl-b. Die dadurch ausgelöste Ubiquitinierung ist für den lysosomalen Abbau des Rezeptors notwendig (Valverde, 2005; Paolino et al., 2014). Für den EGFR wurde gezeigt, dass nicht nur die Ubiquitinierung für die Degradation benötigt wird, sondern auch dessen anschließende De-Ubiquitinierung (Alwan et al., 2003; Kirisits et al., 2007).

1.1.3 Signaltransduktion

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei AXL um eine Rezeptortyrosinkinase. Die Aktivierung von AXL kann dabei auf mehreren Wegen passieren. Zum einen kann durch die Bindung des Liganden Gas6 eine Homodimerisierung des Rezeptors in 2:2 Stöchiometrie ausgelöst werden, wonach es zur intrazellulären Autophosphorylierung des Rezeptors kommt. Die Bindung von Gas6 erfolgt dabei durch die N-terminale Laminin G-ähnliche Domäne (siehe Abbildung 1) an jeweils eine Immunglobulin-ähnliche Domäne der dadurch verbundenen AXL-Rezeptortyrosinkinasen (Sasaki et al., 2006). Um diese Homodimerisierung auszulösen, muss das Gas6 zusätzlich an Phosphatidylserin (PtdSer) bin-

den. Dieses wird von apoptotischen Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Bindung des Gas6 an PtdSer benötigt außerdem Calcium. An AXL kann Gas6 auch in Abwesenheit von Calcium binden. Dadurch kann der Rezeptor aber nicht aktiviert werden. Durch Mutation der PtdSer-Bindestelle des Gas6, der γ -Carboxyglutamat (Gla)-Domäne, konnte gezeigt werden, dass dieses veränderte Gas6 zwar an AXL bindet, diesen jedoch nicht aktiviert (Lew et al., 2014). Die Bindung des Gas6 an PtdSer bedarf der Vitamin K-abhängigen γ -Carboxylierung der entsprechenden Gla-Domäne. Warfarin wurde daher als möglicher Inhibitor der Gas6-abhängigen AXL-Aktivierung identifiziert (Kirane et al., 2015). Zudem ist eine Aktivierung durch Bildung von Heterodimeren möglich. Für unterschiedliche Zelltypen wurden dabei jeweils andere Interaktionspartner identifiziert. Zum einen kann AXL Heterodimere mit Mitgliedern der TAM-Familie, also Tyro3 und Mer, ausbilden. Dies bedarf zur Aktivierung allerdings weiterhin der Anwesenheit von Gas6 (Brown et al., 2012). Zum anderen wurde eine Interaktion mit EGFR beschrieben, welche Gas6-unabhängig AXL aktivieren kann (Vouri et al., 2016). Als weitere Partner von AXL für die Heterodimerisierung wurden noch *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), Integrin β -3, Typ 1 Interferon-Rezeptor und *fms like tyrosine kinase 3* (FLT3) beschrieben (Axelrod und Pienta, 2014). Einen weiteren Aktivierungsmechanismus stellt die Liganden-unabhängige AXL-Homodimerisierung bei AXL-Überexpression dar. Diese kann sowohl auf der Oberfläche der Zelle selbst stattfinden als auch eine Adhäsion zwischen benachbarten AXL-exprimierenden Zellen auslösen (Burchert et al., 1998; Bellosta et al., 1995). Auch eine vermehrte AXL-Phosphorylierung nach Behandlung von menschlichen Linsenepithelzellen (HLEC) mit Wasserstoffperoxid wurde beschrieben. Besonders interessant war dabei, dass es nachfolgend nicht zu einer Bindung von c-Cbl an den Rezeptor gekommen ist. Es konnte also AXL aktiviert werden ohne ihn, wie es durch Gas6 zu beobachten ist, dadurch dem Abbau zuzuführen (Valverde, 2005).

Intrazellulär finden sich multiple Tyrosine, welche nach AXL-Aktivierung phosphoryliert vorliegen. Dabei liegen mehrere Phosphorylierungsstellen innerhalb der Kinase-Domäne, darunter auch Tyrosin 702 und 703. Eine direkte Autophosphorylierung dieser konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Es ist aber bekannt, dass an Position 702 und 703 eine Phosphorylierung nach Gas6-Stimulation stattfindet (Pao-Chun et al., 2009). Weitere nach Aktivierung phosphorylierte Tyrosine finden sich an den Positionen 779, 821 und 866. Für diese sind Bindungspartner bekannt. So binden an Y821 die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C γ (PLC γ), das Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundene Protein 2 (GRB2) sowie die Src-Kinasen c-Src und Ick. Y779 ist relevant für die Bindung der PI3K und Y866 für PLC γ (Braunger et al., 1997). Durch die Vielzahl an Bindeproteinen kann AXL auf unterschiedliche Signalwege Einfluss nehmen. Je nach Zelllinie unterscheidet sich auch der Effekt, der durch die AXL-Stimulation ausgelöst wird. Über den PI3K/AKT/NF- κ B- und den MAPK-Signalweg werden beispielsweise im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom eine Resistenz gegen Chemotherapeutika und die Epithelial-mesenchymale Transition ausgelöst sowie eine proliferative und antiapoptotische Wirkung erzielt (Axelrod und Pienta, 2014). In dendritischen Zellen hingegen

wird durch den JAK/STAT1-Signalweg via SOCS1 und SOCS3 die Immunantwort nach Stimulation des Typ 1 Interferon-Rezeptors reguliert (Rothlin et al., 2007).

Durch Phosphatasen wie den Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ G (PTPRG) kann AXL wieder dephosphoryliert und die Signalweiterleitung damit beendet werden (Antony et al., 2018). Außerdem kann AXL wie andere Rezeptortyrosinkinasen auch zur Termination des Signals internalisiert und lysosomal abgebaut werden (Miaczynska, 2013).

1.2 BMS-777607

Bei BMS handelt es sich um N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamid (Abbildung 3). Dieser von Bristol-Myers Squibb Research and Development 2008 entwickelte Inhibitor blockiert die ATP-Bindung der Kinasedomänen von c-Met, AXL, Tyro3 und Ron mit einem IC₅₀ von jeweils 3,9, 1,1, 4,3 und 1,8 nM (Schroeder et al., 2009). BMS wurde für die vorliegende Untersuchung verwendet, weil sich dieser Inhibitor zum Zeitpunkt der Studie in klinischer Phase 2 befunden hatte.

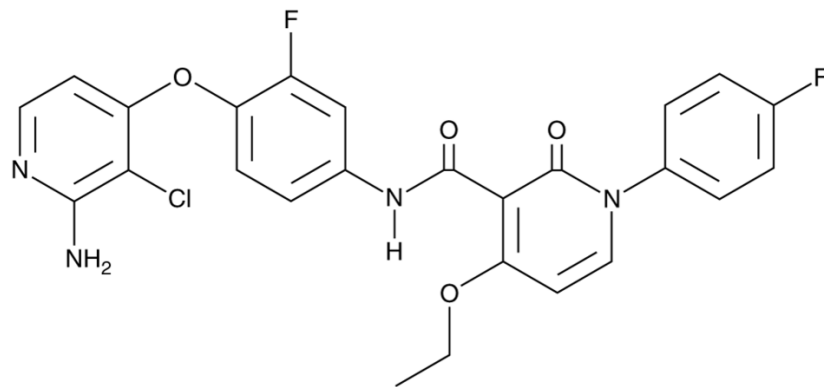


Abbildung 3: Strukturformel des BMS-777607.

(<https://www.caymanchem.com/images/catalog/screen/18517.png>, Stand: 16.01.2020 16:37)

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wie es zur Anreicherung des AXL-Proteins in den mit BMS-777607 behandelten Zellen kommt. Dabei sollten alle Schritte, die die Expression eines solchen Proteins verändern können, untersucht werden, um eine Beeinflussung auf mehreren Ebenen festzustellen bzw. auszuschließen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Verwendungszweck	Gerät	Hersteller
Agarose-Gel-Elektrophorese	Horizontal Elpho	Eigenanfertigung des MPI (Martinsried)
Durchflusszytometer	Accuri C6	BD Biosciences
Eismaschine	Eismaschine CB640	Brema
FPLC-Anlage	P-920 Pumpe	GE Healthcare Life Sciences
	UPC-900 Monitor	GE Healthcare Life Sciences
Fraktionierer	Frac-950 Fraction Collector	GE Healthcare Life Sciences
Inkubation	Duomax 1030	Heidolph
	RM 5	CAT
	Rotamax 120	Heidolph
	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Mixing Block MB-102	BIOER
	Incubator	Memmert
	I26 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
	Wippschüttler	Assistent
	Drehrad für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eigenbau des MPI (Martinsried)
	WB 120 K	mytron
Mikroplatten-Reader	Clariostar	BMG Labtech
	Labsystem Multiskan RC	Thermo Scientific
Mikroskope	Evos core	AMG
	Evos FL	AMG
Mischer	Lab dancer	IKA
	Magnetic Stirrer Model L - 71	Labinco
	Magnetic Stirrer R 1000	Carl Roth GmbH
	MR Hei-Standard	Heidolph
	Vortex-Genius 3	IKA
PAGE Equipment	Mini-PROTEAN Tetra System	BIO-RAD

Verwendungszweck	Gerät	Hersteller
PCR Equipment	LigthCycler 480 II real-time PCR System	Roche
	T 3000 Thermocycler	Biometra
pH-Meter	LE409	Mettler Toledo
Spannungsquellen	Consort EV261	Peqlab
	peqPOWER	Peqlab
Sonifizierer	UTR200	Hielscher
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Vakuumpumpen	Mini-Vac eco 90-6030	Peqlab
Waagen	Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
	Kern 572	Kern & Sohn GmbH
Western-Blot-Detektion	ODYSSEY CLx	LI-COR
Zellkultur	HERAcell 150	Thermo Scientific
	HERAsafe	Thermo Scientific
	Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Optima TK Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
	Allegra 6KR Centrifuge	Beckman Coulter
	Allegra X-15-R Centrifuge	Beckman Coulter
	Centrifuge 5417C	Beckman Coulter
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	PerfectSpin 24R Refrigerated Microcentrifuge	Peqlab
	Sprout Mini-Centrifuge	Biozym
	Universal 320	Hettich

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Grundlegende Basischemikalien

2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth GmbH
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH
Agarose Standard	Carl Roth GmbH
Albumin-Fraktion vom Rinderserum (BSA)	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Bromophenolblau	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	SERVA Elektrophoresis GmbH
Ethidiumbromid, 1 %	Promega
Ethanol, rein	Sigma-Aldrich
Glycerol, 87 %	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonische Säure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Methanol, rein	Sigma-Aldrich
Milchpulver, fettfrei	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Natriumdiphosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Merck Millipore
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl), 37 %	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	SERVA Elektrophoresis GmbH

Trypton	Carl Roth GmbH
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Antibiotika	
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Zellkultur-Reagenzien	
Antibiotic-Antimycotic (Penicillin/Streptomycin)	Life Technologies
Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco DMEM), high glucose	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
L-Glutamin	Life Technologies
Opti-MEM reduced serum medium (Gibco)	Life Technologies
Trypsin	Life Technologies
Vorgefertigte Reagenzien and Kits	
Immobilon-FL PVDF Membran	Merck Millipore
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAGEN RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific
DyNAmo Color Flash SYBR green qPCR Kist	Thermo Scientific
Detergentien	
Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 %	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH
Enzyme und Reagenzien für die Klonierung	
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
CutSmart Buffer	New England Biolabs
Deoxy nucleotides, Solution Mix	New England Biolabs
DNase I	Molecular Probes

λ -Phosphatase	New England Biolabs
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺)	Sigma-Aldrich
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Q5 High-Fidelity Reaction Buffer (10x)	New England Biolabs
Q5 High GC Enhancer (10x)	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Fermentas
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 DNA Ligase buffer	New England Biolabs
T4 Polynucleotide Kinase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Thermo Pol Reaction Buffer (10x)	New England Biolabs
Inhibitoren und Aktivatoren	
BMS-777607	ShangHai Biochempartner Co.
DAPT	Selleckchem
Chloroquin	Selleckchem
BB94	R&D Systems GmbH
GAS6	R&D Systems GmbH
Emetin	Merck Millipore
Cycloheximid	Sigma Aldrich
Puromycin	Thermo Scientific
4E1RCat	Sigma Aldrich
Standards	
GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific
Precision Plus Protein Standards	BIO-RAD
Transfektionsreagenzien	
Polyethylenimin (PEI)	Geschenk von Anurag Kumar Singh (IPC MLU)

3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Verwendungszweck	
Name	Zusammensetzung
Zellkultur	
PBS (pH 7,4)	2,7 mM KCl 137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EGTA 1 Vol% Triton-X-100 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100 mM NaF 0,5 Vol% Aprotinin 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄
Western Blot	
Lämmli-Puffer	375 mM Tris-HCl (pH 6,8) 6 Vol.-% SDS 4,8 Vol.-% Glycerol 9 % β-Mercaptoethanol 0,03 % Bromphenolblau
Sammelgel	5 % Acrylamid/Bisacrylamid 127 mM Tris-HCl 4,5 Vol.-% Glycerol 0,1 Vol.-% SDS 0,1 Vol.-% APS 0,1 Vol.-% TEMED
Trenngel	9 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris-HCl 0,1 Vol.-% SDS 0,1 Vol.-% APS 0,1 Vol.-% TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 Vol.-% SDS

Verwendungszweck	
Name	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,05 Vol.-% SDS 20 Vol.-% Methanol
TBS (pH 7,5)	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
TBST	0,1 Vol.-% Tween 20 in TBS
Blockierungslösung	5 % fettfreies Milchpulver in TBST
Durchflusszytometrie	
HNTG-Puffer (pH 7,5)	20 mM HEPES 150 mM NaCl 0,1 Vol.-% Triton-X-100 10 Vol.-% Glycerol
Polysomenfraktionierung	
10x Salz-Lösung	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂
Chase-Lösung	60 % Saccharose 1x Salz-Lösung Spatelspitze Bromphenolblau
Polysomen-Extraktions-Puffer (PEB)	20 mM Tris-HCl 100 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 0,5 Vol.-% Triton-X-100
TRIzol-Reagenz	38 Vol.-% gesättigtes Phenol 0,8 M Guanidinthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 0,1 M Natriumacetat 5 Vol.-% Glycerol
Bakterienkultivierung	
LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton/Pepton 10 g/l NaCl ggf. 30 µg/ml Kanamycin

3.1.4 Primer

Verwendungszweck	
Primername	Nukleotidsequenz (5' - 3')
Austausch des HA-Tags gegen einen EGFP-Tag	
pCMV3AXLHAtoEGFP-Frag.FOR	GGGGGTGGAGGCTCTATGGTGAGCAAGGGCGAG
pCMV3AXLHAtoEGFP-Frag.REV	GCTCTAGACTCGAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pCMV3AXLHAtoEGFP-Vect.FOR	ACTCGAGTCTAGAGCGGCC
pCMV3AXLHAtoEGFP-Vect.REV	AGAGCCTCCACCCCGGC
Gatekeeper-Mutation der AXL-Kinase (ATP-Bindetasche) - K567R	
SilenceAXLKinase	TCCTCAAGGTGGCTGTGAGGACGATGAAGATTGCCAT
Austausch des Lysins an Position 540 gegen Arginin - K540R	
AXL_K540R	GTGGCCCTGGGGAGGACTCTGGGAGAG
qPCR Primer	
4AXL_qPCR_Primer3.FOR	GAGGGAGAGTTTGGAGCTGT
4AXL_qPCR_Primer3.REV	TCATGACGTTGGGATGGTCA
4AXL_qPCR_PrimerBank.FOR	ATCAGCTTCGGCTAGGCAG
4AXL_qPCR_PrimerBank.REV	TCCGCGTAGCACTAATGTTCT
Robert_Gas6-Fw-2	TGGAAGTGGCTGAACGGAGAAGAC
Robert_Gas6-Rev-2	GCGGCTGGGCGGATGTG
GAPDH.FOR	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH.REV	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT
ALAS1.FOR	CTGCAAAGATCTGACCCCTC
ALAS1.REV	CCTCATCCACGAAGGTGATT

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Hs578T (Triple-negative Brustkrebszellen), H1792 und H292 (NSCLC-Zellen) und HEK293 (humane embryonale Nierenzellen). Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien: H1792, Hs578T und H292 (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI) mit 10 % fetalem Kälberserum FCS, 1 % L-Glutamin und 1X Antibiotic-Antimycotic), HEK293 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % FCS, 1 % Na-Pyruvat und 1X Antibiotic-Antimycotic).

Arbeiten an den Zellen wurden unter einer Sicherheitswerkbank mit einer laminaren Luftströmung durchgeführt. Die Wuchsdichte der Zellen wurde regelmäßig optisch kontrolliert. Bei Bedarf wurden die Zellen in den 10 cm Petrischalen mit 5 ml 37 °C warmem PBS gewaschen und im Anschluss mit 1X Trypsin (PBS) von der Plastikoberfläche der Zellkulturschalen abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Medium versetzt und die Zellen anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem FCS-haltigem Medium um den Faktor 10 bis 50 verdünnt wieder ausgesät. In einer 10 cm Schale wurde ein Volumen an Medium von 7 ml verwendet. Für die Experimente wurden jeweils Zellen in 12-Well verteilt, wobei diese mit je 2 ml Medium befüllt wurden. Für Immunpräzipitationsversuche wurden 15 cm Schalen verwendet mit 20 ml Nährlösung. Bei den Behandlungen der Zellen wurden den Kontrollzellen entsprechende Mengen des jeweiligen Lösungsmittels der Medikamente beigelegt.

4 °C kalte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde verwendet, um die Zellen vor der Lyse jeweils zweimal zu waschen. Für eine 12-Well-Mikrotiterplatte wurden anschließend je Nüpfchen 60 µl und für eine 15 cm-Schale je 1 ml Lysepuffer verwendet. Die Zellen wurden außerdem mechanisch von den Zellkulturmaterialien geschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysat wurde für Proteinanalysen 10 s bei 4 °C im Ultraschallbad sonifiziert.

3.2.2 Western-Blot

50 µl des 12-Well-Lysates wurden mit Lämmli-Puffer versetzt, bei 95 °C für 5 min aufgekocht und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Die Proben wurden vor dem Laden in das Polyacrylamidgel für 5 min bei 17000 g zentrifugiert. Nur der Überstand wurde verwendet. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mit den unter Unterunterabschnitt 3.1.3 angegebenen Mischungen selbst hergestellt. Die Vorbereiteten Gele wurden mindestens für eine Nacht gelagert vor Verwendung. In die Taschen wurden von den Proben jeweils 18 µl geladen. Bei 130 V wurden die Proteine der Proben im Gel für 1 h 20 min aufgetrennt beziehungsweise bis die gewünschte optisch kontrollierte Laufleistung erbracht wurde. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h 30 min in Transferpuffer auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran. Diese wurde anschließend mit TBST gewaschen und geschnitten. Es folgte das Blockieren mit Blockierungslösung. Nach erneutem dreimaligem

Waschen der Membran folgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Anti-AXL #8661 von Cell Signalling Technology (CST) (C89E7), AXL H-3 von Santa Cruz Biotechnology (SCBT) (sc-166269), Puromycin (Klon 12D10) von Merck Millipore (MABE343), Ubiquitin (P4D1) von Santa Cruz (sc-8017), β -Actin (A5441) von Sigma-Aldrich, HA-Tag (#3724) von CST). Die Antikörperlösungen wurden mehrmals verwendet, bis ein Nachlassen der Signalintensität zu beobachten war. Die primären Antikörper wurden nach Herstellerangaben in 5 % Rinderalbumin (BSA) oder fettfreier Milch, jeweils gelöst in *Tris Buffered Saline with Tween 20* (TBST), verdünnt. Es folgte das dreimalige Waschen der Membran mit TBST und die Inkubation mit sekundärem fluoreszenzgelabeltem Antikörper (1:15k verdünnt) von LI-COR für 1 h in 5 % fettfreier Milch oder BSA (jeweils gelöst in TBST). Zuletzt geschah ein dreimaliges Waschen der Membranen mit TBST und Detektion des Fluoreszenzsignals mittels Odyssey CLX-Systems von LI-COR. Die Quantifizierung der Intensitäten erfolgte mit Image Studio von LI-COR.

3.2.3 Immunpräzipitation

Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach den Herstellerangaben mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits bestimmt. 750 μ g Protein der jeweiligen Lysate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit frisch gemischtem Lysepuffer auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 1 μ g FK2-Antikörper (BML-PW8810-0100) von Enzo Life Sciences GmbH hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C unter ständiger Durchmischung gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden je Probe 20 μ l G-Sepharose in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit HNTG-Puffer aufgefüllt. Es wurde insgesamt drei mal mit HNTG-Puffer gewaschen, zwischen jedem Waschschrift bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mittels kleinlumiger Glaskanüle abgesaugt. Anschließend wurden die gewaschenen Sepharose-Kügelchen den 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit der Lysat-Antikörpermischung beigefügt. Es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 4 °C unter weiterhin laufender Durchmischung. Anschließend wurden die Proben bei 3000 g jeweils 5 min zentrifugiert und mit HNTG-Puffer insgesamt vier mal gewaschen. Nach jeder Zentrifugation wurde jeweils bis auf ca. 50 μ l HNTG-Puffer der Überstand abgesaugt, um möglichst keine Sepharose-Kügelchen zu verlieren. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sepharose-Pellet vorsichtig mit einer 22 G Kanüle vom HNTG-Puffer befreit und mit 30 μ l Lämmli-puffer resuspendiert. Weiteres Vorgehen wie in Unterunterabschnitt 3.2.2 beschrieben.

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden im 6-Well kultiviert. Zwischen den Behandlungsschritten wurde jeweils zweimal gewaschen und für jeden Wechsel die Zellen bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Als Waschlösung diente 0,5 % BSA gelöst in PBS. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit vorgewärmtem PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit Accutase abgelöst. Diese wurden bei 300 g für 3 min abzentrifugiert, zweifach gewaschen und für 10 min bei

37 °C mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Zellen wurden erneut zweifach gewaschen und aufgeteilt. Eine Hälfte der Zellen wurde mit -20 °C kaltem Methanol für 5 min permeabilisiert und anschließend nochmals zweimalig gewaschen. Im 1:100 verdünnten primären Antikörper (Anti-AXL #154 (MAB154) von R&D Systems GmbH, AXL 259/2 (homemade, IgG1)) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als sekundärer Antikörper (Alexa Fluor 488-konjugierter sekundärer Antikörper von Jackson Immuno Research Europe Ltd.) wurde 1:200 verdünnt für 30 min bei 37 °C verwendet. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und am BD Accuri Durchflusszytometer analysiert.

3.2.5 Ribosome bound nascent chain puromycylation (RPM)

15 min vor der Lyse wurden den jeweiligen Proben Emetin zugegeben in einer Endkonzentration von 208 µM. Die Behandlung mit Puromycin erfolgte in einer Konzentration von 91 µM 5 min vor der Lyse. Diese wurde wie in Unterunterabschnitt 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Detektion von Puromycin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erfolgte durch Western-Blot auf einer Membran mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (siehe Unterunterabschnitt 3.2.2). Protokoll nach David et al. (2012).

3.2.6 Polysomenfraktionierung

Am Tag vor der Lyse wurden die Saccharose-Gradienten vorbereitet. Dazu wurden Saccharose-Lösungen in Konzentrationen von 10, 20, 30,40 und 50 % vorbereitet, jeweils mit 10 % der 10x Salz-Lösung. Begonnen wurde mit dem Befüllen der Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen mit 2 ml der 50 % Saccharose-Lösung. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff gekühlt. Diese Schritte wurden mit den weiteren Lösungen in absteigender Konzentration fortgeführt. Zuletzt wurde mit 10 % Saccharose-Lösung überschichtet und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Eindringen von flüssigem Stickstoff ins Röhrchen wurde dabei stets verhindert. Die vorbereiteten Gradienten wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Dies sollte ein schonendes Auftauen und Homogenisieren des Gradienten gewährleisten.

Vor der Lyse wurde den Zellen 100 µg/ml Cycloheximid zugeführt und für 10 min bei 37 °C belassen. Das Waschen der Zellen erfolgte mit 100 µg/ml Cycloheximid in PBS. Die Zellen wurden in 500 µl Polysomen-Extraktions-Puffer (PEB) supplementiert, mit 1 µl RiboLock (40 U) und Proteaseinhibitoren (10 mM Na₄P₂O₇, 0,5 Vol.-% Aprotinin, 1 mM PMSF) lysiert und nach 10-minütiger Inkubation bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesichert, die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop 2000c gemessen und 300 µg RNA je Probe vorsichtig auf je einen Gradienten geschichtet. Diese wurden bei 4 °C für 2 h bei 220000 g ultrazentrifugiert. Oben auf das Ultrazentrifugenröhrchen wurde ein 10 ml-Spritzenkolben gesetzt und abgedichtet. Mit einer 21 G Nadel wurde in den Boden des Röhrchens eingestochen, mit der Chase-Lösung (60 % Saccharose) der Gradient mit 1 ml/min Fluss nach oben durch den Spritzenkolben gedrückt und mit dem Frac-950 zu je 1 ml Proben fraktioniert. 500 µl jeder Probe wurden mit je 500 µl TRIzol und 200 µl

Chloroform versetzt. Von der wässrigen Phase nach Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 17000 g wurden 500 µl mit 1 ml Isopropanol und 2 µl Glykogen (200 mg/ml) gemischt und über Nacht bei -20 °C zur Präzipitation gelagert.

Am dritten Tag des Protokolls erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 17000 g für 15 min bei 4 °C, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde mit 75 Vol.-% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Die gesamte Probe wurde zur cDNA-Synthese nach Herstellerangaben mit dem Verso cDNA Synthese Kit weiterverarbeitet. Es wurden jeweils 4,75 % der Proben für die Auswertung mittels quantitativer PCR unter Verwendung des DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kits und des LightCyclers 480 II benutzt. Modifiziertes Protokoll nach Panda et al. (2017).

3.2.7 Reverse Transkriptase PCR mit quantitativer PCR (RT-qPCR)

Die RNA der behandelten Zellen wurde mit dem RNeasy Minikit nach dem Herstellerprotokoll extrahiert und die Konzentration mittels Nanodrop 2000c bestimmt. Die cDNA Synthese erfolgte unter Verwendung von 500 ng der gewonnenen RNA und dem Verso cDNA Synthese-Kit, ebenfalls nach den Herstellerangaben. Für die anschließende quantitative PCR wurde das DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit mit dem darin enthaltenen Protokoll verwendet. Die qPCR-Reaktion fand im LightCycler 480 II statt. Als konstitutiv exprimierte Gene zur Normalisierung wurden GAPDH und ALAS mitbestimmt. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mittels folgender Formel:

$$1,9^{-\Delta((CT[ALAS]+CT[GAPDH])/2-CT[untersuchtesGen])}$$

3.2.8 Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach (SOMA)

Bei SOMA handelt es sich um eine Variante zur Mutation kleiner Bereiche eines Plasmids mittels nur eines Oligonukleotids. Als Ausgangsplasmid wurde ein pCMV3-AXL-HA Vektor (HG10279-CY) von Sino Biological verwendet. Zunächst wurden die Primer am 5'-Ende phosphoryliert, um die später erfolgende Ligation zu ermöglichen. Die Phosphorylierung erfolgte bei 37 °C innerhalb von 30 min mit anschließender Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C.

Primer-Phosphorylierung	SOMA-PCR
5 µl T4 Polynucleotide Kinase buffer	10 µl Q5-Puffer
2 µl 100 µM Primer	10 µl Q5-High-QC-Enhancer
0,25 µl 200 mM ATP	1 µl 10 mM dNTPs
1 µl T4 Polynucleotide Kinase	10 µl 5 mM NAD ⁺
41,75 µl zweifach destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	1 µl Plasmid (100 ng/µl)
	2,5 µl des phosphorylierten Primers
	13,5 µl ddH ₂ O
	1 µl Q5-Polymerase
	1 µl Taq DNA Ligase

Es wurden für die Primerphosphorylierung und die SOMA-PCR die in der Tabelle angegebenen Mischungen verwendet. Die Elongationszeit der PCR wurde mit 1 min je kb gewählt, wie für die Q5-Polymerase bei großen Amplifikaten empfohlen. Nach 30 Zyklen wurde ein letztes mal zusätzlich 10 min elongiert und abschließend auf 4 °C herabgekühlt. Zu den 50 µl Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Ansatz wurden 5 µl New England Biolabs (NEB) Puffer 4 und 2 µl Dpn1 gegeben und bei 37 °C mindestens 4 h inkubiert. Dadurch wurde die verbliebene unmutierte bakterielle DNA verdaut. Anschließend wurde die DNA mit dem Quiagen PCR purification-Kit aufgereinigt durch Hinzufügen von 285 µl PB-Puffer, Mischen und Zentrifugieren bei 17000 g 1 min durch die beiliegenden Säulen. Die Säulen wurden einmal mit PE-Puffer gewaschen, ein zweites Mal leer zentrifugiert und anschließend mit 10 µl ddH₂O eluiert. Die Transformation fand wie in Unterunterabschnitt 3.2.10 beschrieben statt. Es handelt sich dabei um ein modifiziertes Protokoll nach Pfirrmann et al. (2013).

3.2.9 Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (SLIC)

Die Primer wurden mit der in SnapGene implementierten In-Fusion Klonierungssimulation generiert. Dabei wurden als Vorgaben eine Annealing-Temperatur von 60 °C und ein komplementärer Überhang von 15 Basenpaaren gewählt. Der Vektor wurde mittels inverser PCR und das Insert mit einer normalen PCR linearisiert, jeweils unter Verwendung der Q5-DNA-Polymerase nach Herstellerangabe. Linearisierter Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 gemischt, sodass die Endkonzentration im Ansatz des Vektors bei 10 ng/µl lag und mit 1 µl 10X BSA, 1 µl 10X NEB Puffer 2 versetzt sowie mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 0,2 µl T4 DNA Polymerase (3 U/µl, NEB) hinzugeben. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 2,5 min und sofortiges Stoppen der Reaktion auf Eis für 10 min. Der gesamte Ansatz wurde zur Transformation, wie in Unterunterabschnitt 3.2.10 beschrieben, genutzt. Es handelt sich dabei um ein modifiziertes Protokoll nach Jeong et al. (Jeong et al., 2012).

3.2.10 Bakterielle Transformation

Für eine Retransformation wurde 1 µl Plasmidlösung (ca. 400 ng/µl) zu 50-100 µl chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Nachfolgend wurden 500 µl 4 °C kaltes LB-Medium hinzugefügt und das Gemisch für 5 min auf Eis sowie anschließend 1 h bei 37 °C gelagert. Nach einer SOMA wurden die Bakterien bei 300 g 5 min zentrifugiert, in 200 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert. Bei einer Retransformation wurden 10 µl der Bakterienlösung mit 200 µl frischem LB-Medium versetzt und ausplattiert. Das Ausplattieren fand auf kanamycinhaltigem Agar mit Hilfe eines zuvor in 99,8 % Ethanol gereinigtem und abgeflemmten Drigalskispatel statt. Die Agarschalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es folgten das Picken der Kolonien und die Inkubation der dafür verwendeten Holz-Zahnstocher in 4,5 ml LB-Medium mit Kanamycin bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht. Die Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Prep-Kit entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

3.2.11 Transfektion

Für jedes Nöpfchen mit zu transfizierenden Zellen einer 12-Well-Platte bzw. einer vergleichbar großen Wachstumsfläche wurden 50 µl Opti-MEM mit 500 ng Plasmid versetzt. In einem separaten 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Mischung von 50 µl Opti-MEM mit 3 µl PEI (1 µg/ml). Beide Lösungen wurden zusammengeführt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während der Inkubationszeit wurde das Medium auf den Zellen gegen antibiotikafreies Medium ausgetauscht. Nach den 20 min wurden die vorbereiteten 100 µl Plasmid-PEI-Mischungen gleichmäßig in die jeweiligen Nöpfchen verteilt.

3.2.12 Statistische Analyse

Die Auswertung und statistische Analyse erfolgte mit den Programmen Excel und Graph Pad Prism 7. Auf statistische Signifikanz wurde mittels zweifacher Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) und Bonferroni-Korrektur getestet. Ab einem $p < 0,05$ wurde der Effekt als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 BMS erhöht in niedriger μM -Konzentration die AXL-Proteinmenge innerhalb von 24 Stunden

In Vorexperimenten ist aufgefallen, dass es bei einer Hemmung der AXL-Kinase mit dem Inhibitor BMS-777607 zu einer Erhöhung der AXL-Proteinmenge kommt. Um dies nachzuvollziehen wurden Hs578T und H292 mit unterschiedlichen Konzentrationen des selektiven AXL-Inhibitors BMS für 24 h behandelt. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der AXL-Proteinmenge in der nachfolgenden Analyse mittels Western Blot insbesondere im Bereich zwischen 10 und 2000 nM nachgewiesen werden (Abbildung 4). Bei Hs578T lag das Maximum dieser Anreicherung zwischen 9 und 740 nM und bei H292 zwischen 247 nM und 6,7 μM . Für weitere Experimente wurde die Konzentration an BMS auf 500 nM festgelegt, um eine ausreichende Hemmung von AXL bei gleichzeitig geringer Toxizität für die Zellen zu gewährleisten.

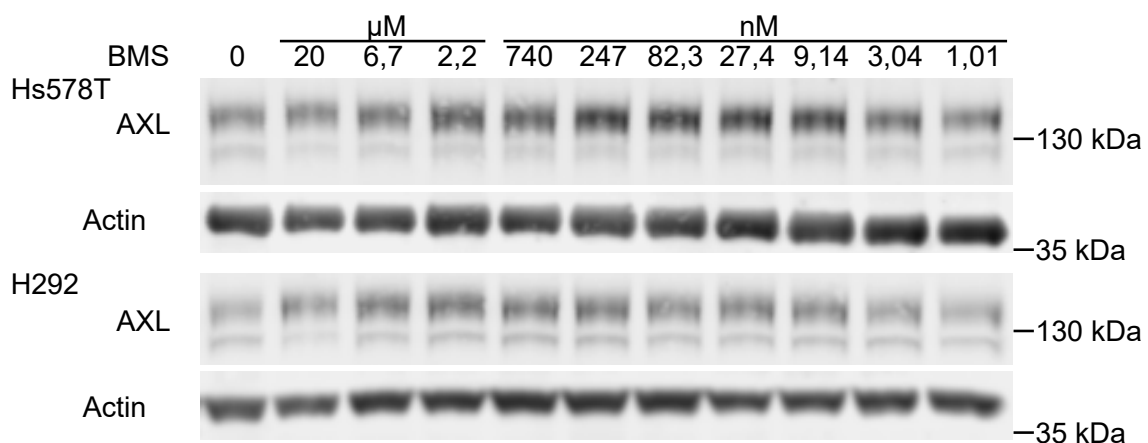


Abbildung 4: Durch BMS-777607 kann die AXL-Proteinmenge in vitro erhöht werden. Zellen der AXL-exprimierenden Zelllinien Hs578T und H292 wurden für 24 h mit BMS in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Repräsentative Western-Blots sind dargestellt.

4.2 BMS hat keinen Einfluss auf die AXL-mRNA-Menge

Um einen Einfluss von BMS auf die Transkription und die mRNA-Stabilität zu untersuchen, wurde die AXL-mRNA-Menge mittels RT-qPCR nach Inkubation mit 0,5 μM BMS über die Dauer von 15 min bis 4 h bestimmt. Im Vergleich zur Dimethylsulfoxid (DMSO)-behandelten Kontrolle zeigte sich innerhalb von 4 Stunden weder in Hs578T noch in H292 oder H1792 eine relevante Erhöhung der Menge an AXL-mRNA (Abbildung 5). Daraus lässt sich ableiten, dass BMS nicht über eine Modulation der mRNA-Menge zu einer vermehrten AXL-Abundanz führt. Ein Einfluss von BMS auf die Transkription und die daran beteiligten Faktoren sowie die mRNA-Stabilität wird damit sehr unwahrscheinlich.

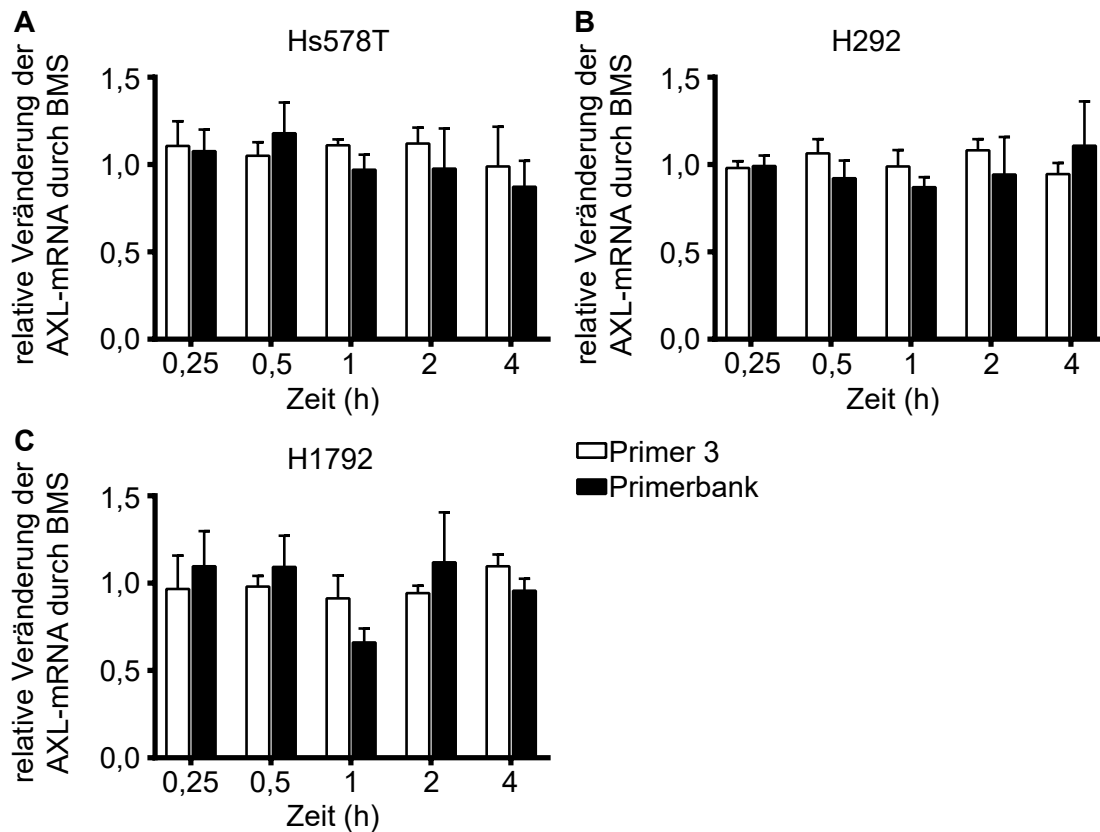


Abbildung 5: BMS ändert innerhalb von 4 h nicht die Menge an AXL-mRNA. **A** Hs578T, **B** H292 und **C** H1792 wurden für Zeiträume zwischen 15 min und 4 h entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 0,5 μ M BMS gelöst in DMSO behandelt. Zwei unterschiedliche Primer wurden für die Quantifizierung der AXL-mRNA mittels RT-qPCR verwendet. ALAS und GAPDH wurden zur Normalisierung verwendet. Mittelwerte und SEM dreier biologischer Replikate sind dargestellt.

4.3 Ein Einfluss von BMS auf die Translation kann nicht ausgeschlossen werden

4.3.1 Einfluss von BMS auf die Gesamttranslationsleistung

Bei der *Ribosome bound nascent chain puromycylation* handelt es sich um eine 2012 beschriebene Methode, welche in der Erstbeschreibung zur Darstellung der veränderten Translation nach Virusinfektion in der Zellkultur verwendet wurde. Damit sollte auch ein eventueller Effekt von BMS auf die Translation sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Zellen 15 min vor der Lyse mit 208 μ M Emetin behandelt. Emetin bindet an die 60S Untereinheit der 80S Ribosomen und hemmt die Verlängerung der gebundenen Aminosäurekette des wachsenden Proteins. Puromycin wird anstelle einer Acyl-Aminosäure in die Aminosäurekette integriert und beendet dabei den Translationsvorgang. Das so markierte, unfertige Aminosäurekette wird vom Polyribosom abgetrennt (Entner, 1979). Mittels Anti-Puromycin-Antikörper können diese Aminosäureketten im Western Blot sichtbar gemacht und quantifiziert werden (David et al., 2012).

Zunächst wurden H292-Zellen für 20 h mit BMS in Konzentrationen von 1 nM bis 20 μ M behandelt. Dabei zeigte sich eine anscheinend konzentrationsabhängige Erhöhung des Puromycin-Signals im Western Blot, normalisiert zu GAPDH (Abbildung 6A, E). Die Anreicherung des AXLs war in diesem Experiment bei 2,22 μ M mit einer Signalanhebung auf das 1,42-fache geringer als und nicht signifikant wie in nachfolgenden Experimenten (Abbildung 6B, E). Da AXL bereits wenige Stunden nach BMS-Behandlung vermehrt in den Zellen nachweisbar ist, wurde der Zeitraum variiert und kürzer gewählt. H292 wurden dabei für 1, 3 oder 6 Stunden mit 0,05, 0,5 oder 5 μ M BMS behandelt und entsprechend analysiert. Innerhalb dieser kurzen Zeiträume konnte keine signifikante Erhöhung des Puromycin-Signals beobachtet werden (Abbildung 6C, F). Nach 6 h scheint dieses Signal im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sogar durch BMS vermindert zu werden. Die Anreicherung des AXLs war erneut kaum signifikant (Abbildung 6D, F). Ein Einfluss von BMS auf die Translationsleistung der Zellen lässt sich insgesamt nicht ausschließen, erscheint als Ursache für die Anreicherung des AXLs aber als unwahrscheinlich.

4.3.2 Einfluss von BMS auf die spezifische Translation der AXL-mRNA

Eine Anreicherung des AXL-Proteins ließe sich hypothetisch auch durch eine spezifische Steigerung der Translation der AXL-mRNA erreichen. Um dies zu beurteilen wurden H292-Zellen für 24 h mit 0,5 μ M BMS inkubiert und anschließend mittels Polysomenfraktionierung analysiert. Erkennbar waren der 80S-Peak (Fraktionen 4-5) und die Polysomenfraktion (Fraktionen 8-11/12) in der Absorptionskurve der Gradienten (Abbildung 7A). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit BMS behandelten und den Kontrollzellen. Aus den gesammelten Fraktionen wurde anschließend RNA extrahiert und die mRNA von AXL, GAPDH und ALAS mittels RT-qPCR quantifiziert. Erwartet wurde eine Veränderung der Verteilung der Anteile der mRNA zwischen den Fraktionen durch die Behandlung mit BMS von AXL, nicht jedoch von GAPDH und ALAS, welche als Kontrollgene dienten. Allerdings zeigten sich bei allen Genen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle Veränderungen (Abbildung 7B). Die Ergebnisse ließen sich zudem nicht hinreichend reproduzieren, sodass keine Aussage durch die Polysomenfraktionierung gewonnen werden konnte. Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass BMS-777607 auch einen Einfluss auf die Translation der AXL-mRNA hat.

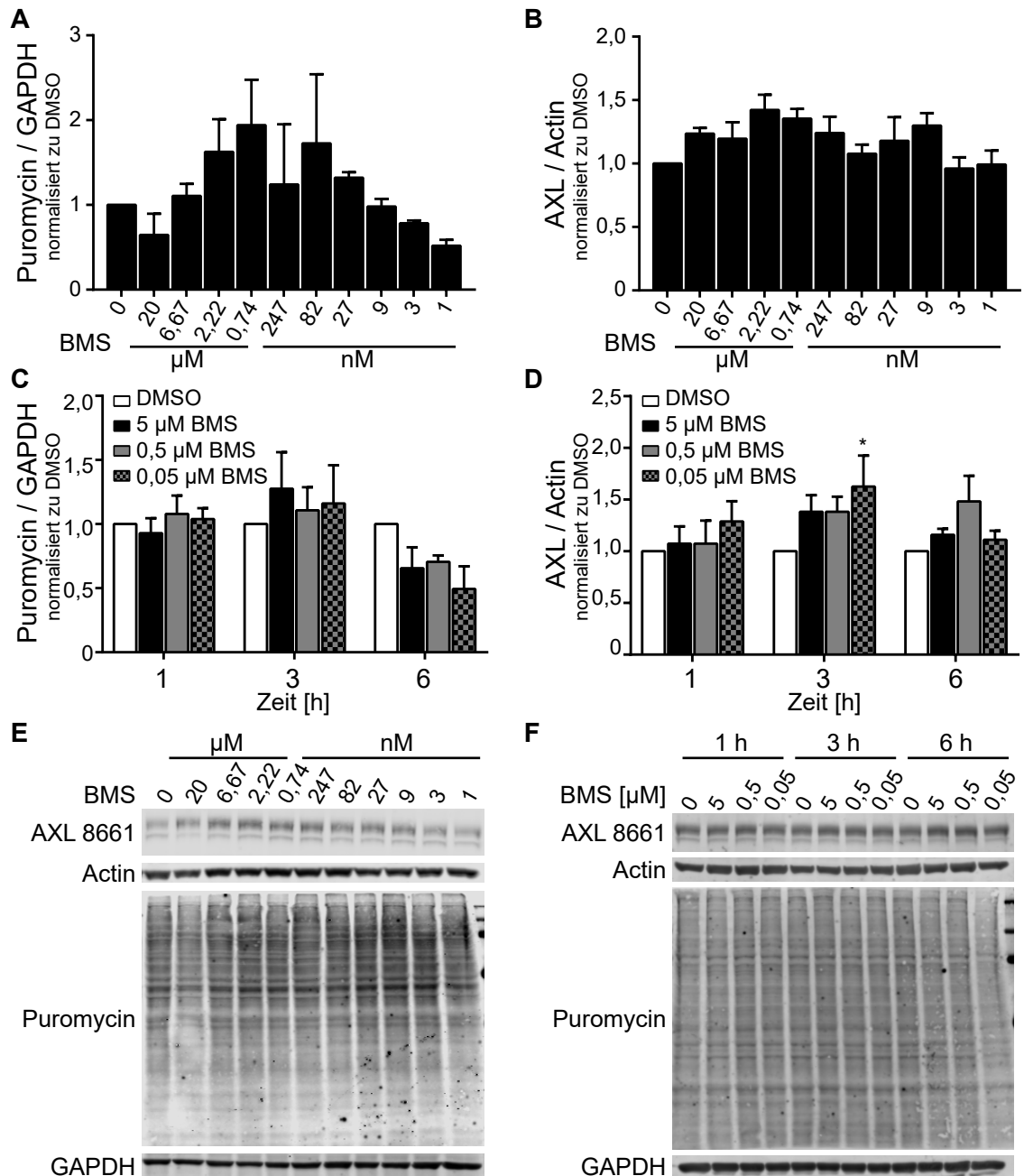


Abbildung 6: Ein Einfluss von BMS auf die Gesamttranslationsleistung lässt sich nicht sicher ausschließen. **A** H292-Zellen wurden für 20 h mit Konzentrationen zwischen 20 μ M und 1 nM des BMS inkubiert. Durch sequentielle Zugabe von Emetin und Puromycin sowie nachgeschalteten Western Blot wurde die Translationsleistung der Zellen ermittelt. Normalisiert wurde mit GAPDH ($n = 2$). **B** Identisches Vorgehen wie bei A ebenfalls mit H292-Zellen. Die AXL-Menge der Zellen wurde durch Western Blot ermittelt und normalisiert zu Actin ($n = 4$). **C** und **D**: Äquivalentes Vorgehen wie bei A und B mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von BMS für 1, 3 oder 6 h. ($n = 3$) * $p < 0,05$ (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **E** und **F** stellen repräsentative Western Blots zu A und B, bzw. C und D dar.

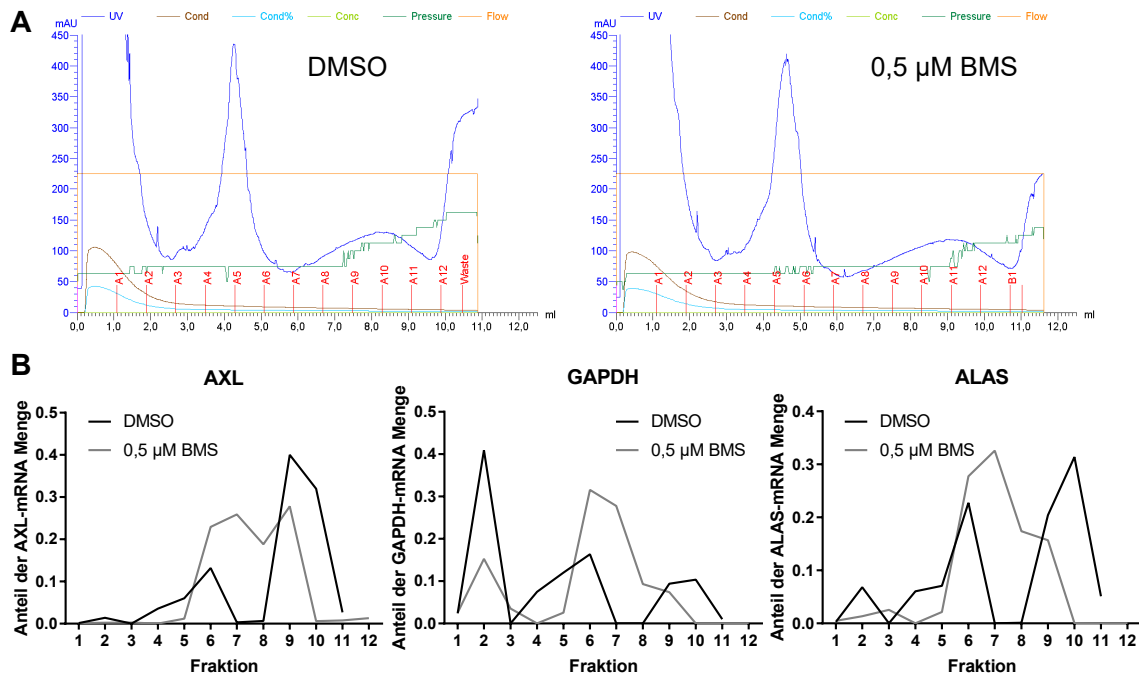


Abbildung 7: Polysomenfraktionierung nach BMS-Behandlung in H292. Für 24 h wurden H292-Zellen mit 0,5 µM BMS behandelt. **A** In blau sind die Absorptionskurven (254 nm) der Gradienten bestückt mit dem Lysat der Kontrollzellen (links) bzw. der mit BMS-behandelten Zellen (rechts) dargestellt. A1-A12 kennzeichnen die Fraktionen, welche für die RT-qPCR weiterverwendet wurden. **B** Graphische Darstellung der Verteilung der AXL-, GAPDH- und ALAS-mRNA innerhalb der gesammelten Fraktionen nach RNA-Isolation und RT-qPCR. In der DMSO Kontrolle wurden 11 und bei Behandlung mit BMS 12 Fraktionen gesammelt. Darstellung eines exemplarischen Experimentes bei unzureichender Reproduzierbarkeit.

4.4 BMS beeinflusst die Degradation von AXL

4.4.1 In Hs578T-Zellen wird AXL durch BMS im Cycloheximid-Chase stabilisiert

Um einen generellen Einfluss von BMS auf den Abbau von AXL darzustellen, wurde die Translation der Zellen durch Cycloheximid blockiert. Dabei wurden zunächst kurze Zeiträume verwendet (Abbildung 8). Es ist zu erkennen, dass in beiden Zelllinien ein Abbau von AXL trotz BMS stattfindet. Allerdings scheint der Abbau durch BMS etwas abgeschwächt zu werden. Zudem lässt sich bereits nach 30 min eine Erhöhung der AXL-Abundanz feststellen. Signifikante Ergebnisse konnten aufgrund großer Streuung in dem kurzen Zeitraum nicht erreicht werden.

Es wurde, um den Effekt näher beobachten zu können, der Zeitraum auf bis zu 24 h erweitert. Dies ist in Abbildung 9 zu erkennen. Hier zeigt sich ebenfalls eine deutliche Induktion des AXLs relativ zu Actin innerhalb von 24 h. Die AXL-Proteinmenge ist dabei von 8 zu 24 h weiter ansteigend. Durch die Zugabe von Cycloheximid und die daraus resultierende Hemmung der Translation kommt es in Hs578T ab 16 h zu einer signifikanten Veränderung der AXL-Menge durch BMS. Der Abbau von AXL lässt sich in diesem Experiment ebenfalls beobachten. Man hat insgesamt den Eindruck, dass BMS einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Abbaus hat. Unter Verwendung von Cycloheximid ergaben sich signifikante Unterschiede durch BMS nur bei der Zelllinie Hs578T.

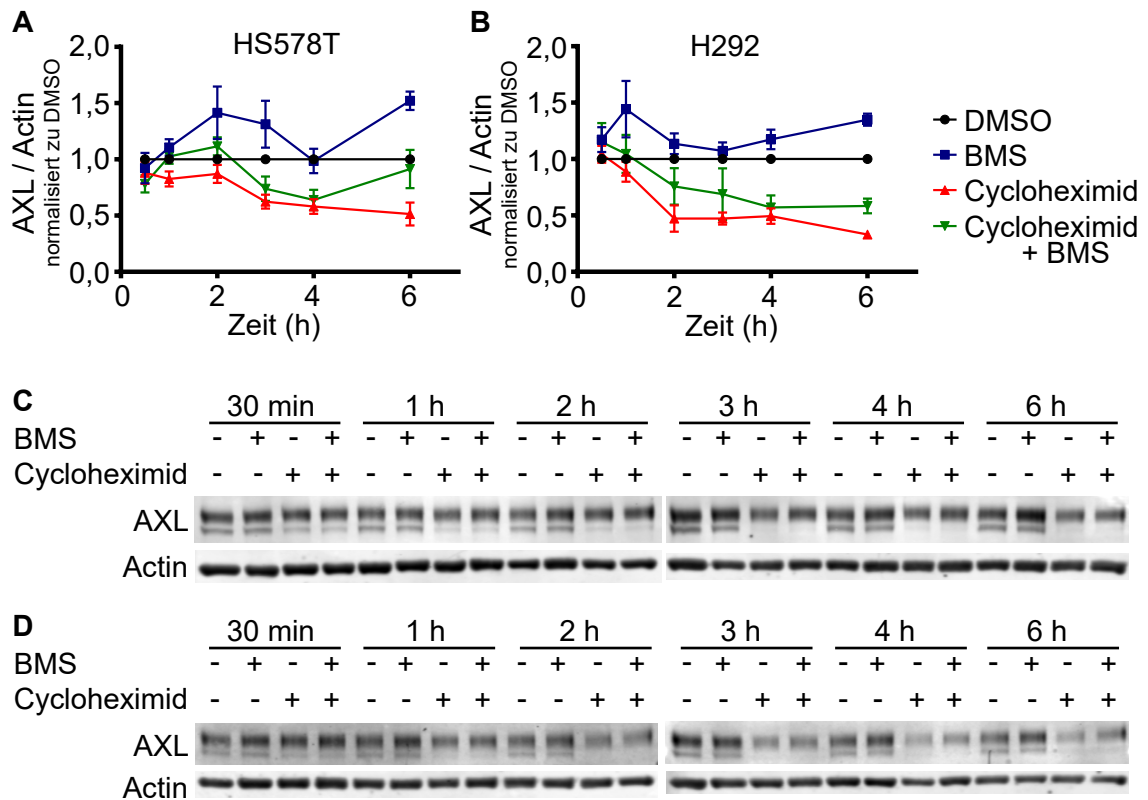


Abbildung 8: BMS erhöht schon nach 30 min die AXL-Proteinmenge. Auch unter Verwendung von Cycloheximid findet die AXL-Abundanzsteigerung statt. **A** Hs578T wurden für Zeiträume zwischen 30 min und 6 h mit 0,5 μ M BMS und/oder 10 μ g/ml Cycloheximid behandelt. Das Medium wurde jeweils 6 h vor der Lyse ersetzt durch Medium ohne FCS. Die DMSO-Konzentration betrug bei jeder Behandlung 0,2 %. (n = 4) **B** Identisches Vorgehen wie bei A mit H292. (n = 4) Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **C** Repräsentativer Western-Blot zu A. **D** Repräsentativer Western-Blot zu B.

4.4.2 Serum im Medium hat einen Einfluss auf die Anreicherung von AXL-Protein durch BMS

Um einen Einfluss des Serums zu beurteilen, wurden die Zellen in unterschiedlichen Medien kultiviert. Nach initialer 16-stündiger Inkubation der Zellen in FCS-haltigem Medium wurde entweder das Medium belassen oder ausgetauscht gegen frisches FCS-haltiges Medium bzw. gegen frisches Medium ohne FCS (Hungermedium). Unmittelbar nach dem Austausch des Mediums wurde mit BMS und/oder Cycloheximid behandelt. Dies ist in Abbildung 10 zu erkennen. Dabei zeigt sich in den H292 eine deutliche Induktion unabhängig vom verwendeten Medium. Durch Hinzufügen von Cycloheximid wird die Anreicherung außer in Hs578T-Zellen in Hungermedium auf ein nicht signifikantes Niveau gesenkt. Bei den Hs578T ist bei ausbleibendem Mediumwechsel und in frischem Medium ohne FCS eine signifikante Induktion erkennbar. Wird das Medium unmittelbar vor Hinzugeben von BMS gegen FCS-haltiges Medium ausgewechselt, bleibt die Induktion aus. Unter Verwendung von Cycloheximid ist nur im Hungermedium eine signifikante Induktion erkennbar. Betrachtet man hingegen die Zelllinie H1792 in diesem Experiment, so

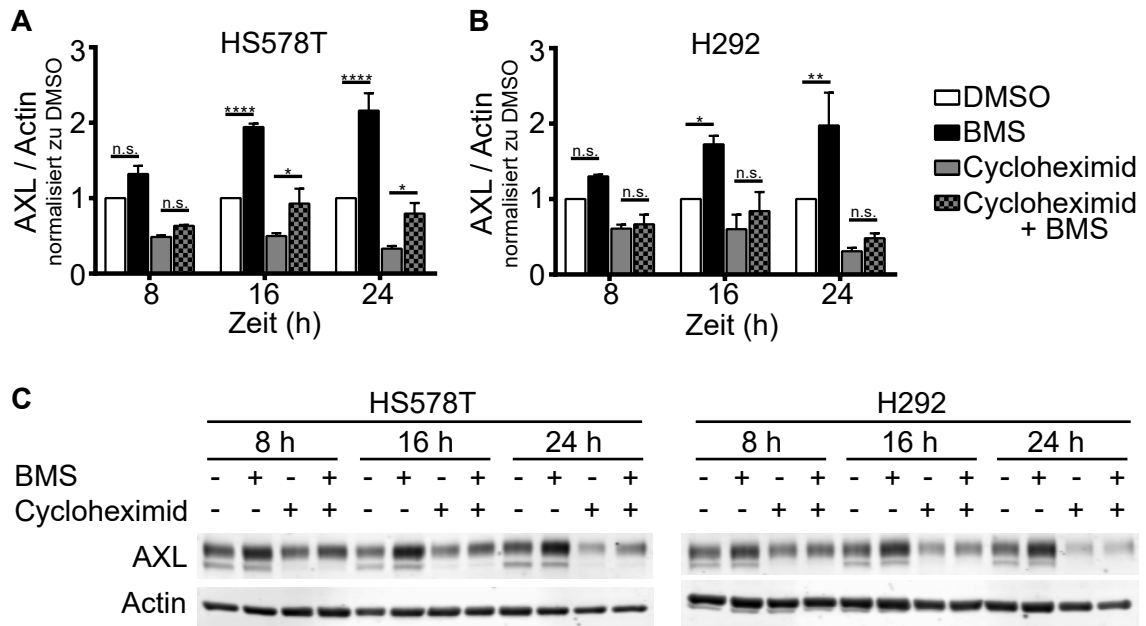


Abbildung 9: BMS erhöht die AXL-Proteinmenge innerhalb von 24 h auf das Doppelte und vermindert in Hs578T den Abbau von AXL. **A** Hs578T wurden für 8, 16 oder 24 h mit BMS (500 nmol/l) und/oder Cycloheximid (10 µg/ml) behandelt. Das Medium wurde jeweils 24 h vor der Lyse ausgetauscht zu Medium ohne FCS. Die DMSO-Konzentration betrug bei jeder Behandlung 0,2 %. (n = 3) **B** Identisches Vorgehen wie bei A mit H292. (n = 3) *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **C** Repräsentativer Western-Blot jeweils zu A und B.

ist ein deutlicher Unterschied zu den Hs578T und H292 erkennbar. In den H1792 findet, sofern FCS im Medium befindlich ist, keine signifikante AXL-Induktion durch BMS statt. Setzt man diesen Zellen allerdings im Hungermedium BMS bei, so erfolgt eine deutliche Induktion von AXL. Dabei lässt sich, wenn die Translation mit Cycloheximid blockiert ist, in keinem der Medien eine Induktion feststellen. Folglich scheint ein Protein von den H1792-Zellen im Hungermedium translatiert zu werden, welches die Induktion von AXL durch BMS ermöglicht.

Es wird zudem erkennbar, dass es sich wahrscheinlich nur um eine Aufhebung oder Verminderung des Abbaus handelt. Das Hungermedium scheint im Vergleich zu den anderen Medien in H1792 die AXL-Menge zu reduzieren (Abbildung 10 E H1792). Diesen Effekt kann BMS aufheben. Gibt man Cycloheximid dazu, so kann man zwischen den Medien wieder keinen Unterschied in der Induzierbarkeit von AXL durch BMS feststellen.

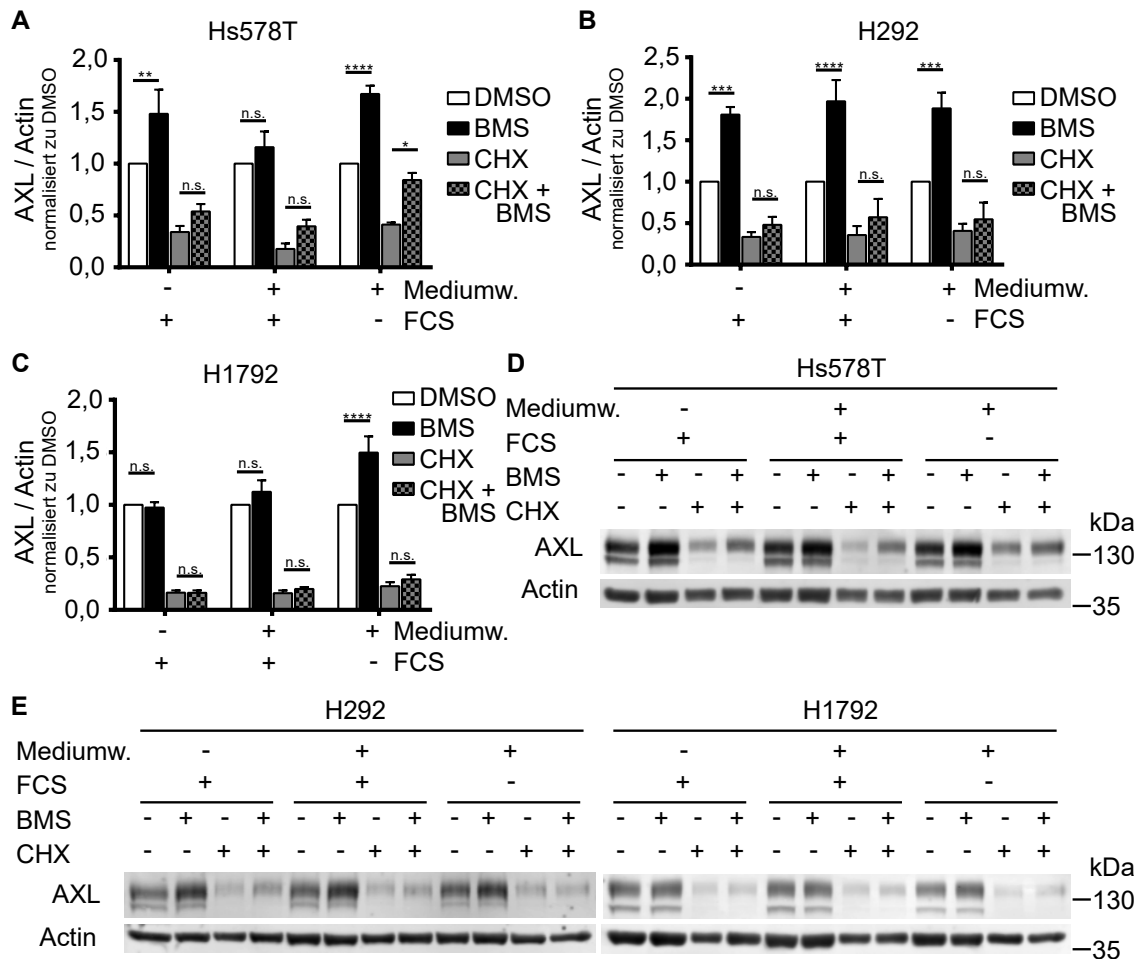


Abbildung 10: Die Konzentration an Serum und die Verweildauer des Mediums hat einen Einfluss auf die AXL-Proteinanreicherung durch BMS-777607. **A** Hs578T-, **B** H292- und **C** H1792-Zellen wurden für 24 h mit 0,5 μ M BMS und/oder 10 μ g/ml Cycloheximid behandelt. Das Medium wurde direkt vor dem Hinzufügen von BMS und/oder Cycloheximid bzw. DMSO entweder nicht gewechselt (Mediumw. -) oder gewechselt (Mediumw. +). Beim Wechsel wurde entweder Serumhaltiges (FCS +) oder Medium ohne Serum (FCS -) verwendet. Das nicht gewechselte Medium enthielt FCS. (Hs578T n = 5; H292 n = 4; H1792 n = 5) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **D-E** Repräsentative Western-Blots jeweils zu A-C.

4.4.3 Abbau durch α -Sekretasen

Um zu überprüfen ob BMS Einfluss auf das Schneiden von AXL durch α -Sekretasen hat, wurden Hs578T-Zellen im Vergleich entweder mit 0,5 μ M BMS oder dem α -Sekretase-Inhibitor BB94 in 2 μ M-Konzentration behandelt. Zusätzlich wurden Inhibitoren der γ -Sekretasen, nämlich 1 μ M DAPT (Lanz et al., 2003), oder der lysosomalen Azidifizierung, 10/1 μ M Chloroquin (CQ), verwendet. DAPT soll dabei verhindern, dass das durch den α -Sekretasen-Verdau entstehende 55 kDa AXL-Fragment durch γ -Sekretasen weiter abgebaut wird. Chloroquin soll eine Erkennbarkeit von Fragmenten im lysosomalen Abbau sicherstellen. Hierbei zeigten sich zwischen BMS und BB94 deutliche Unterschiede in der Veränderung der Abundanz der Fragmente. Durch BMS wird vermehrt das durch DAPT

stabilisierte 55 kDa C-terminale Fragment des AXLs nachweisbar, während das durch 10 μM CQ stabilisierte 54 kDa Fragment vermindert zur Darstellung kommt. Bei BB94 verhält es sich invers. Die Bande im Western Blot des 55 kDa Fragments ist schwächer und die des 54 kDa Fragmentes nahezu unverändert darstellbar (Abbildung 11). Dies lässt darauf schließen, dass BMS keinen hemmenden Einfluss auf den Abbau durch α -Sekretasen hat, jedoch den Rezeptor dem lysosomalen Abbau entzieht.

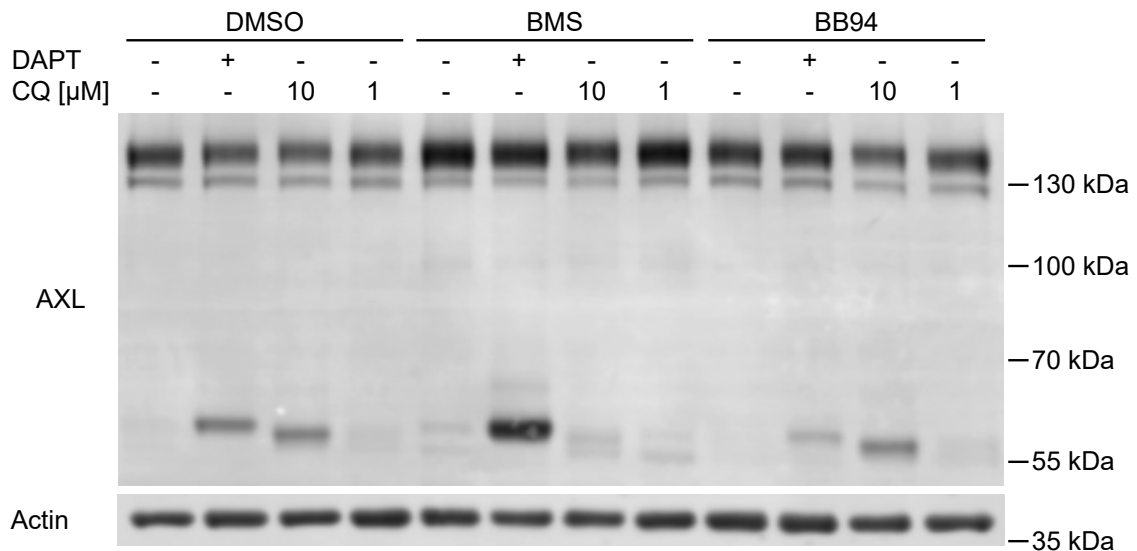


Abbildung 11: BMS hemmt den lysosomalen Abbau von AXL, nicht aber auf den Verdau durch α -Sekretasen. Hs578T-Zellen wurden für 24 h mit 0,5 μM BMS oder 2 μM BB94, einem Inhibitor von α -Sekretasen, behandelt. Zusätzlich wurde 1 μM DAPT, 10 oder 1 μM Chloroquin (CQ) zur Stabilisierung der beim Abbau entstehenden Fragmente zugefügt. Dargestellt ist ein exemplarischer Western-Blot.

4.4.4 Gas6 induzierter Abbau

Nimmt man an, dass es ein von den Zellen produziertes Protein ist, welches den Effekt von BMS ermöglicht, so ist es naheliegend an den AXL-Liganden Gas6 zu denken. Daher erfolgte die Überprüfung, ob die besser AXL-induzierbaren Zellen Hs578T und H292 auch tatsächlich mehr Gas6 produzieren können als H1792. Dies wurde mittels RT-qPCR analysiert (Abbildung 12a). Es bestätigte sich hier die Annahme, dass die H1792 im Vergleich am wenigsten Gas6 produzieren können. In den hier verwendeten frühen Zeitpunkten (2 und 6 h) konnte jedoch keine Erhöhung der Gas6-mRNA-Menge durch das Hungern der Zellen beobachtet werden.

Ob es durch das Hungermedium zur vermehrten Expression von Gas6 kommt wurde weiter in den H1792 untersucht (Abbildung 12b). Es ist erkennbar, dass sich tatsächlich durch den Entzug des Serums die Menge von Gas6-mRNA signifikant erhöhen lässt. Allerdings nur auf den Faktor 1,36 nach 12 h und 1,40 nach 24 h. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien ist die aus dem Serumentzug resultierende AXL-mRNA-Menge immer noch gering.

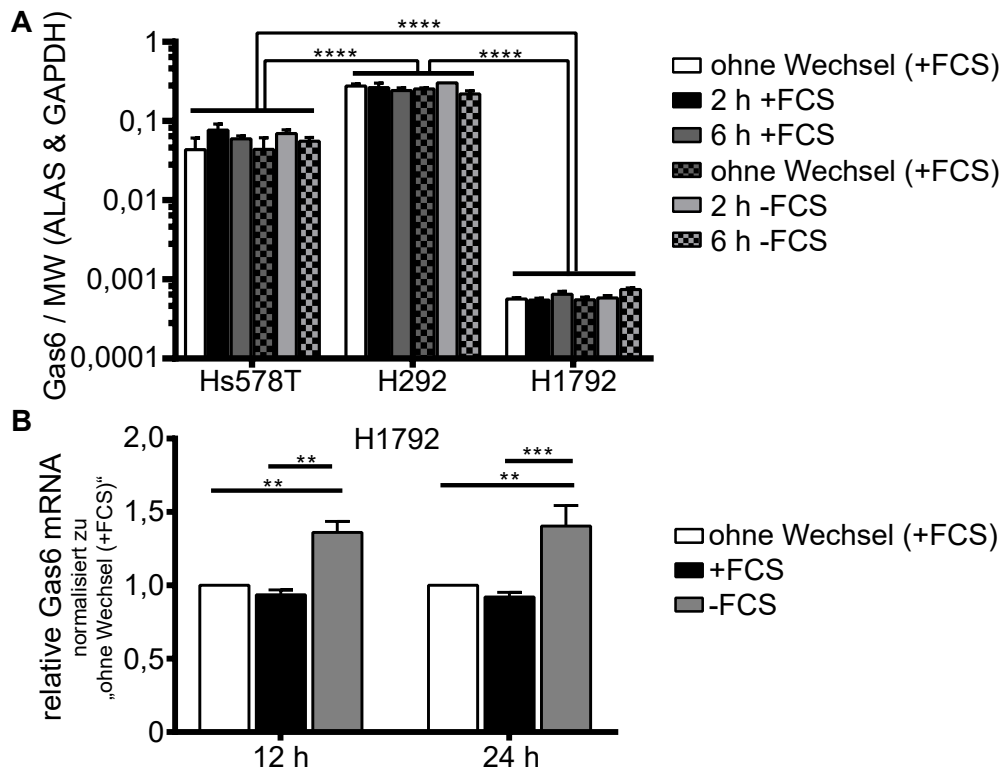


Abbildung 12: A H292 besitzen am meisten Gas6-mRNA und H1792 am wenigsten. Der Gas6-mRNA-Gehalt der Zelllinien Hs578T, H292 und H1792 wurde bis zu 6 Stunden nach Wechsel des Mediums mittels RT-qPCR gemessen. Als Referenz wurde der Mittelwert der mRNA-Menge von ALAS und GAPDH verwendet. (n = 2) **B** Induktion der Expression von Gas6 durch Hungermedium in H1792. Das Medium wurde 12 oder 24 h vor Lyse getauscht gegen frisches Medium mit (+FCS) oder ohne (-FCS) FCS. Als Kontrolle wurde das FCS-haltige Medium belassen. (n = 3) **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt.

Es wurde bereits gezeigt, dass Gas6 in der Lage ist den Abbau des AXL-Rezeptors auszulösen (Valverde, 2005). Hier wurden humane lymphatische Endothelzellen (HLEC) für 4 bzw. 6 h mit Gas6 behandelt. Das führte zu einem Verschwinden des AXL-Signals im Western-Blot. Es stellte sich folglich die Frage, ob BMS in der Lage ist diesen Abbau zu unterbinden. Dazu wurden die Zellen zunächst für eine Stunde mit 0,5 μM BMS oder 10 μM Chloroquin inkubiert (Abbildung 13). Anschließend erfolgte die Stimulation mit rekombinatem humanen Gas6 in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Im Western Blot zeigt sich in den H1792 und den Hs578T, welche nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt wurden, eine signifikante Reduktion der AXL-Menge in diesen zwei Stunden auf 50 % bzw. 65 % durch die Gas6-Stimulation. BMS hebt diese Reduktion auf. Chloroquin, welches die Azidifizierung der Lysosomen verhindert, vermindert die Gas6-vermittelte Degradation ebenfalls (Abbildung 13a, e). In den H292 zeigt sich in keinem Fall eine signifikante Reduktion der AXL-Menge durch Behandlung der Zellen mit Gas6, unabhängig von einer etwaigen Hemmung (Abbildung 13c).

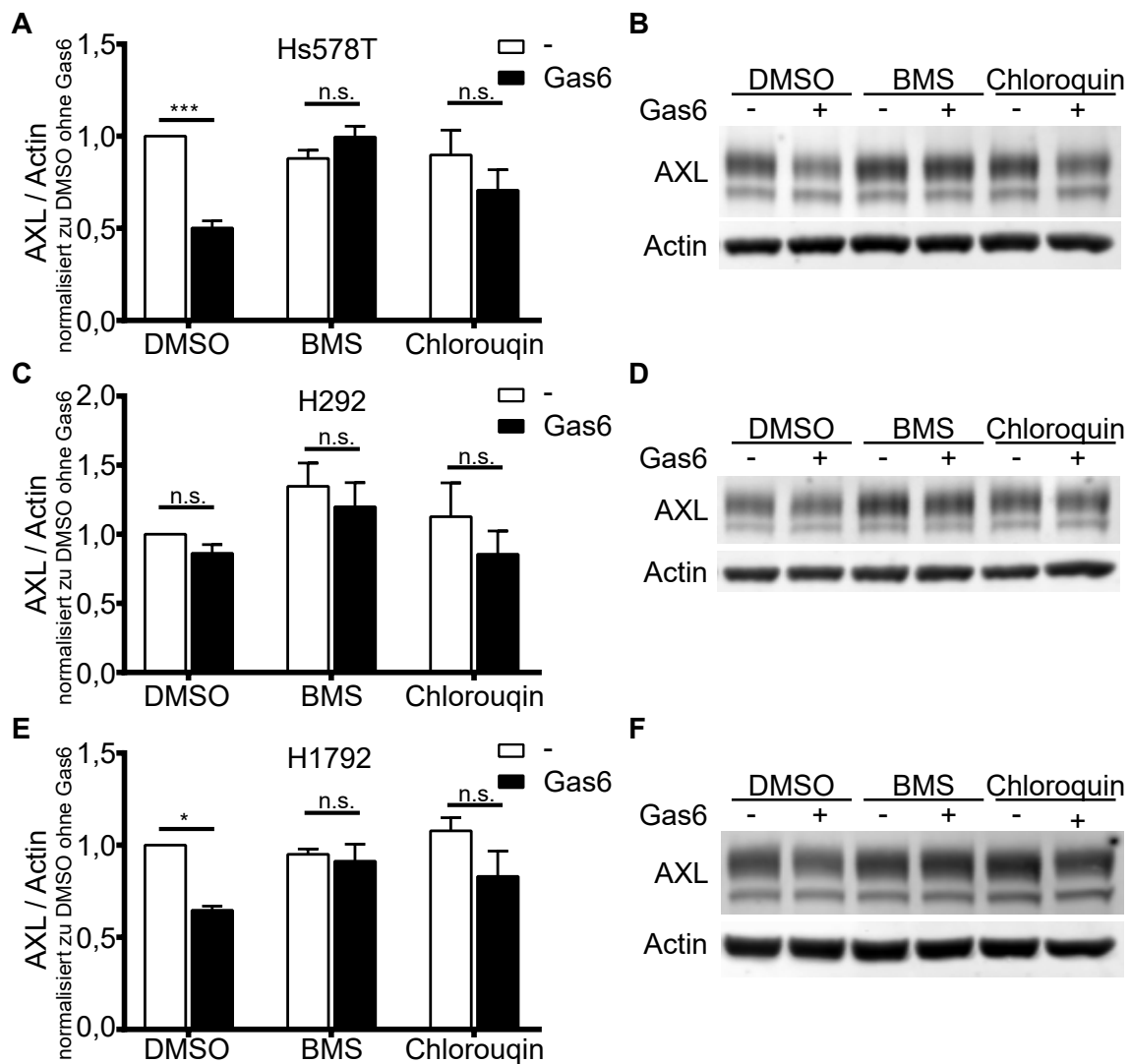


Abbildung 13: BMS verhindert den durch Gas6 induzierten AXL-Abbau. **A** Hs578T-, **C** H292- und **E** H1792-Zellen wurden für 1 h mit BMS oder Chloroquin vorinkubiert. Anschließend wurde für 2 h mit 250 ng/ml Gas6 stimuliert. Die Proteinmenge des ALXs wurde mittels Western-Blots bestimmt. Das AXL-Actin-Verhältnis wurde zur DMSO-Kontrolle ohne Gas6-Behandlung normalisiert. (Hs578T n = 5; H292 n = 4; H1792 n = 3) *p < 0,05; ***p < 0,001 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **B**, **D** und **F** zeigen repräsentative Western-Blots jeweils zu A, C und E.

4.4.5 BMS verhindert die Internalisierung von AXL

Für eine weitere Analyse des Einflusses von BMS auf den lysosomalen Abbau wurden Hs578T-Zellen mit Gas6 für 30 min oder 2 h stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 14). Es wurden dabei zwei AXL Antikörper (#154 und 259/2) verwendet, welche N-terminal und somit extrazellulär binden. Zum Vergleich wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert, um neben dem auf der Zelloberfläche befindliche AXL auch das Gesamt-AXL der Zellen bestimmen zu können. Durch die Stimulation mit Gas6 wurde sowohl das AXL auf der Oberfläche, als auch das Gesamt-AXL innerhalb von 2 h auf 50-60 % reduziert. 0,5 μ M BMS im Medium, welches 3 h vor Ana-

lyse zu den Zellen gegeben wurde, verhinderte dabei nicht nur, wie bereits mittels Western Blot gezeigt (Abbildung 13a), die Reduktion des Gesamt-AXL, sondern auch die des AXLs auf der Zelloberfläche. BMS hemmt folglich eher nicht direkt den lysosomalen Abbau, sondern bereits vorher die Internalisierung des Rezeptors. Bei Betrachtung der unter Verwendung des Antikörpers 259/2 generierten Daten, gewinnt man zudem den Eindruck, dass AXL nach 30 min zwar internalisiert, jedoch noch nicht abgebaut ist, nach 2 h der Abbau aber stattgefunden hat (Abbildung 14b und c-f). Mit dem Antikörper #154 war dieser Eindruck nicht zu gewinnen.

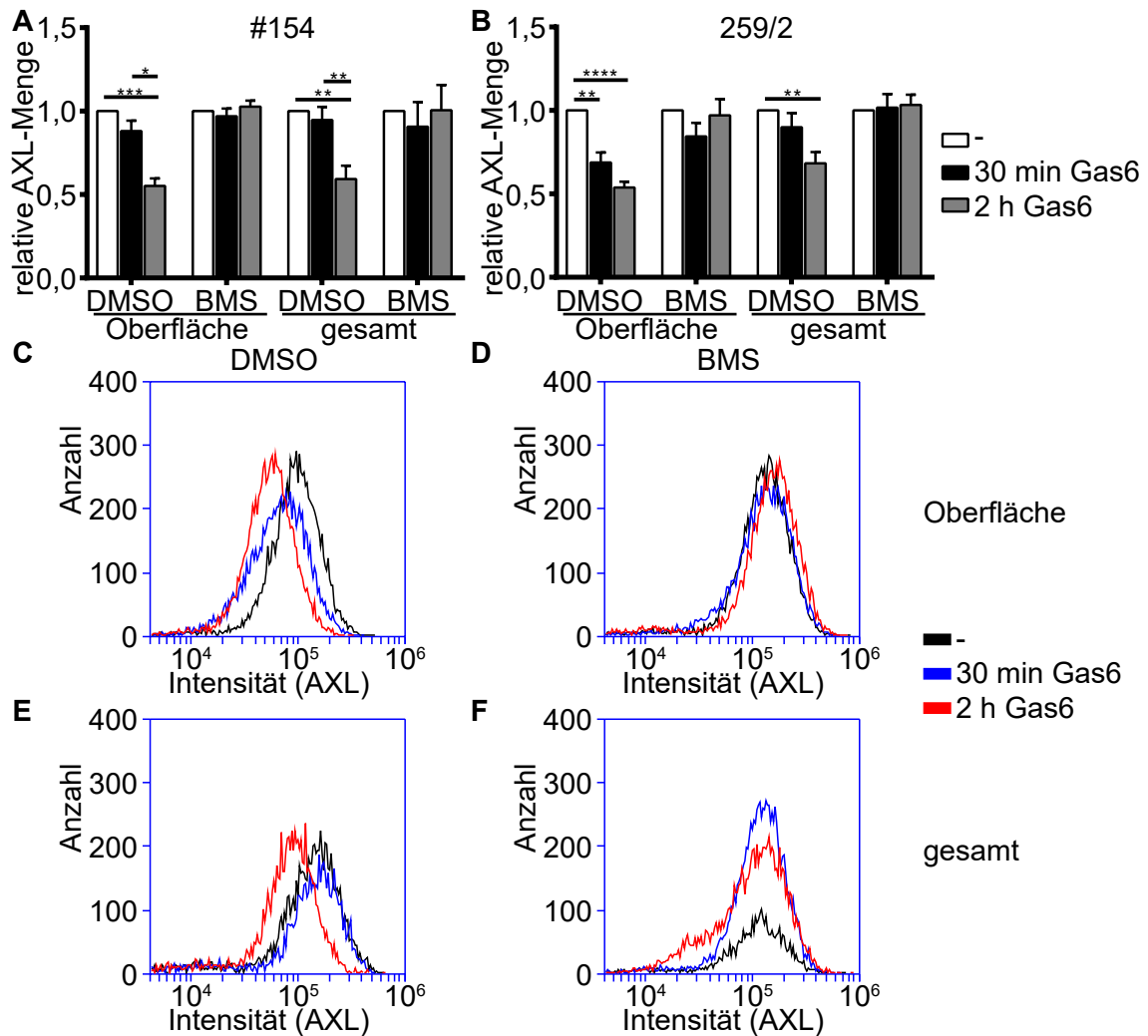


Abbildung 14: Durch BMS wird die Internalisierung des AXL-Rezeptors nach Gas6-Stimulation verhindert. Hs578T-Zellen wurden nicht, für 30 min oder 2 h mit 250 ng/ml Gas6 stimuliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Zellen wurden außerdem 3 h vor Analyse mit 0,5 μ M BMS oder DMSO als Kontrolle behandelt. Es wurden zwei N-terminal bindende AXL-Antikörper (#154 (**A**) und 259/2 (**B**)) verwendet. (n = 3) *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM sind dargestellt. **C-F** Histogramme einer exemplarischen Analyse mit dem Antikörper 259/2.

4.4.6 Die Ubiquitinierung von AXL wird durch BMS verhindert

Wie im Abschnitt Unterunterabschnitt 1.1.2 beschrieben, ist Ubiquitin für den lysosomalen Abbau von AXL notwendig (Valverde, 2005). Daher wurden Hs578T-Zellen erneut mit 250 ng/ml Gas6 stimuliert. Der Zeitpunkt der Lyse wurde mit 15 min nach Stimulation entsprechend früh gewählt, um das ubiquitinierte AXL nachweisen zu können. Mit dem Ubiquitin-Antikörper FK2 wurde eine IP durchgeführt und das ubiquitinierte AXL im Western Blot dargestellt (Abbildung 15b). Durch Gas6 lässt sich eine Verdopplung der relativen Intensität des über 180 kDa schweren, ubiquitinierten AXLS, gegenüber des 120 und 140 kDa AXLS nachweisen (Abbildung 15a). Dieses Verhältnis wurde zur Darstellung gewählt, um die durch BMS auftretenden Schwankungen der AXL-Proteinmenge zu berücksichtigen. Durch Zugabe von 0,5 μ M BMS 1 h vor dem Lysezeitpunkt konnte der Anteil des ubiquitinierten AXLS auf 25 % des basalen Wertes gedrückt werden und ließ sich durch Gas6 nicht steigern. BMS verhindert folglich suffizient die durch Gas6 ausgelöste Ubiquitinierung von AXL.

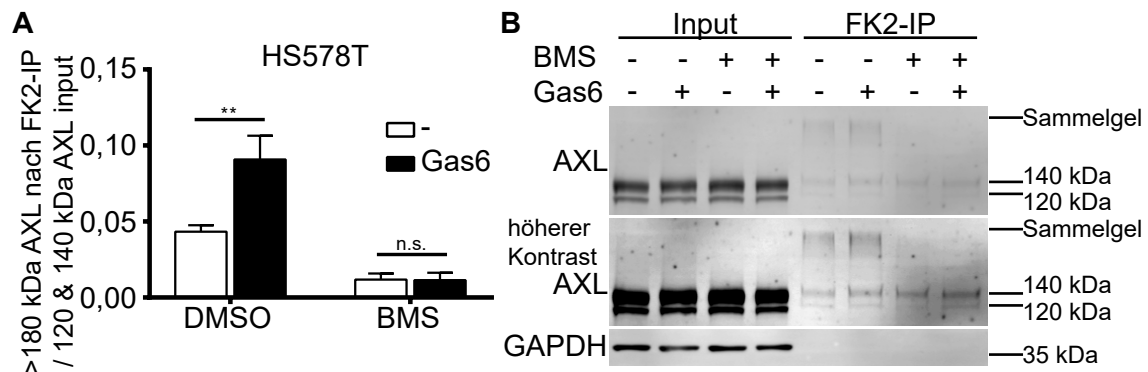


Abbildung 15: Gas6 verursacht eine vermehrte Ubiquitinierung der AXL-Rezeptortyrosinkinase. BMS unterdrückt diesen Vorgang. **A** Hs578T-Zellen wurden 1 h mit 0,5 μ M BMS bzw. DMSO behandelt sowie für 15 min mit 250 ng/ml Gas6 stimuliert. Anschließend wurde eine IP mit dem Ubiquitin-Antikörper FK2 durchgeführt. Es wurde graphisch der Anteil des >180 kDa zur Darstellung kommenden AXLS nach FK2-IP im Verhältnis zur Summe der Intensität der 120 und 140 kDa Bande des AXLS im Input durch Western-Blot-Analyse dargestellt. (n=3) **p < 0,01 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **B** Exemplarischer Western Blot zu A. AXL wurde in zwei Intensitäten dargestellt, um jeweils die 120, 140 und >180 kDa-Banden mit ausreichender Helligkeit darstellen zu können. Das Gesamtlysate vor IP wurde als Input geblottet.

4.4.7 BMS benötigt eine intakte AXL-Kinase-Domäne für die AXL-Anreicherung

Die Abhängigkeit der AXL-Induzierbarkeit durch BMS wurde im nächsten Experiment deutlich. Hs578T- und H292-Zellen wurden mit einem HA-markiertem AXL-tragendem Plasmid transient transfiziert. Durch Austausch des Lysins gegen ein Arginin in der Kinase-Domäne des AXLs an Position 567 (K567R-Mutation), kann die ATP-Bindung in der Kinase verhindert und die Phosphorylierung von AXL unterdrückt werden (Zhang et al., 2012; Melaragno et al., 2004). Das Plasmid wurde dahingehend mutiert und ebenfalls transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Behandlung mit 0,5 μ M BMS analog zu vorausgegangenen Experimenten für 24 h. Da AXL hauptsächlich vollständig glykosyliert auf der Zelloberfläche präsentiert wird, ist folglich 140 kDa AXL für Gas6 zugänglich und kann durch BMS in der Quantität verändert werden (Krishnamoorthy et al., 2013, Abbildung 5a, b). Daher wurde die Intensität der 140 kDa AXL-Bande im Western Blot normalisiert zur 120 kDa AXL-Bande. Hierdurch sollten Schwankungen in der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden. Untersucht wurde folglich das Verhältnis von 140 kDa zu 120 kDa AXL (Abbildung 16). In Hs578T lässt sich das Verhältnis durch BMS deutlich zugunsten des 140 kDa AXLs verschieben. Bei fehlender Signifikanz zeigte sich im Mittel eine Steigerung auf das 4,6-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Durch die Ausschaltung der Kinasefunktion wurde das Verhältnis im Mittel auf das 6-fache, beziehungsweise auf das 7,7-fache unter zusätzlicher Verwendung von BMS gesteigert. Signifikant waren diese Ergebnisse auf Grund großer Schwankungen nicht. Die Hs578T-Zellen sind durch die Transfektion auch deutlich in Mitleidenschaft geraten. Dies ist am reduzierten Actin-Signal erkennbar. Die H292-Zellen zeigten ein stabileres Verhalten nach Transfektion. Hier konnte durch die BMS-Behandlung eine signifikante Erhöhung des 140 kDa zu 120 kDa AXL-Verhältnisses auf das Doppelte festgestellt werden. Dies deckt sich auch in etwa mit den zuvor beobachteten Erhöhungen der AXL-Menge in dieser Zelllinie (Abbildung 9b, Abbildung 10b). Durch die K567R-Mutation konnte dieses Verhältnis ebenfalls, wie durch BMS allein, auf das Doppelte gesteigert werden. Eine weitere Steigerung durch zusätzliche Behandlung mit BMS war nicht möglich.

Zudem konnte in diesem Experiment ein Einfluss von BMS auf miRNAs, welche in der 3' oder 5' UTR der AXL-mRNA binden würden, ausgeschlossen werden, da diese Regionen auf dem Plasmid nicht vorhanden waren. Da es dennoch zur Anreicherung des AXLs gekommen ist, muss ein anderer Mechanismus dafür verantwortlich sein.

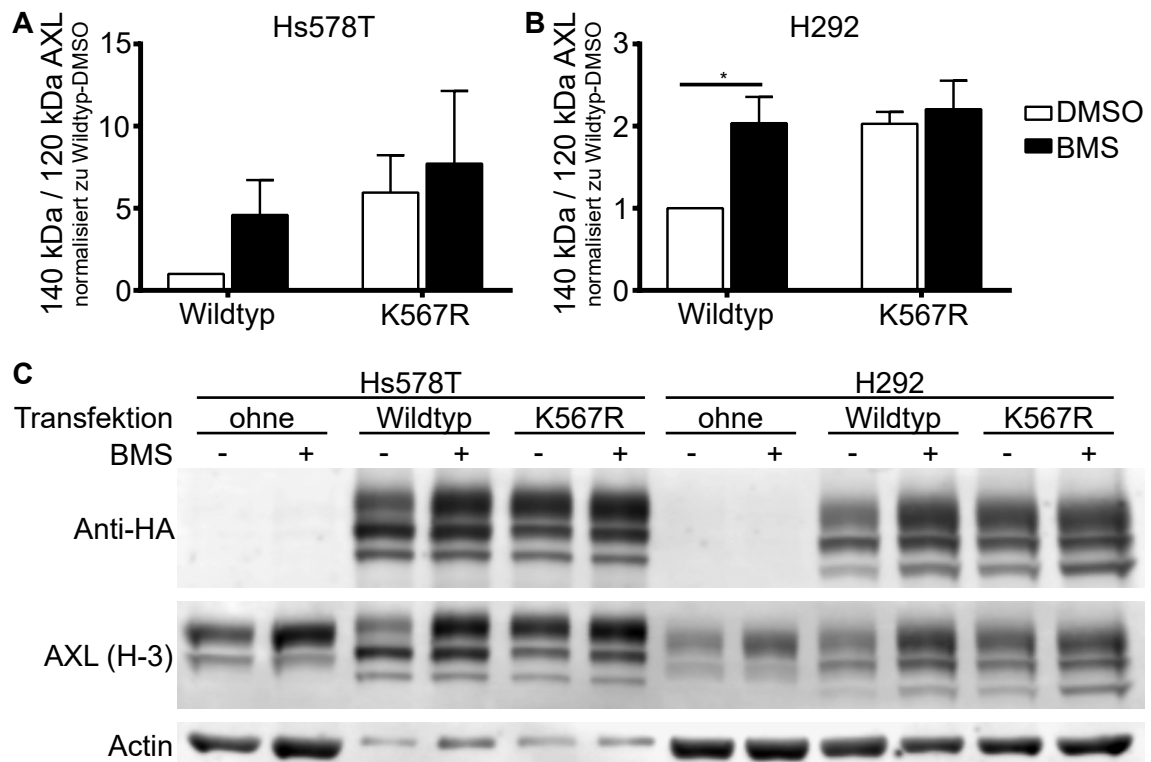


Abbildung 16: Auf K567R-mutiertes AXL hat BMS keine induzierende Wirkung. Zellen der Linien Hs578T (**A**) und H292 (**B**) wurden transient mit HA-markiertem AXL transfiziert, entweder mit intakter Kinase (Wildtyp) oder mit inaktiver Kinase (K567R). Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium gegen frisches FCS-haltiges Medium getauscht. Nach weiteren 24 h erfolgte die Behandlung mit 0,5 μ M BMS. Nach weiterer 24 h Inkubation erfolgte die Lyse und Analyse mittels Western-Blots. Dargestellt ist das Verhältnis von 140 kDa zu 120 kDa HA-markiertes AXL, normalisiert zu Wildtyp ohne BMS-Behandlung. (n = 3) *p < 0,05 (Two-Way ANOVA, Bonferroni). Es sind jeweils Mittelwerte und durch Fehlerbalken der SEM dargestellt. **C** Exemplarischer Western-Blot zu A und B. Anti-HA-Antikörper wurde zum Nachweis des exogenen AXLs verwendet. Der H-3-Antikörper bindet C-terminal endogenes und exogenes AXL.

4.4.8 Mutation des Lysins an Position 540 verhindert nicht den Abbau von AXL

Für AXL wurde Lysin an Position 540 in massenspektrographischen Analysen als die bislang am häufigsten bei AXL detektierte Stelle der Ubiquitinierung festgestellt (Povlsen et al., 2012; Danielsen et al., 2011). Daher wurde dieses Lysin gegen Arginin ausgetauscht. Es sollte dadurch analog zur K567R-Mutation, welche die Kinase inhibiert, die induzierende Wirkung von BMS aufgehoben und das Basis-Level von 140 kDa AXL angehoben werden. Es zeigten sich in diesem Experiment allerdings keine solchen Effekte (Abbildung 17). BMS war weiterhin in der Lage die AXL-Menge anzuheben und durch die Mutation alleine kam es zu keiner deutlichen Anreicherung. Es ist daher anzunehmen, dass weitere Lysine an der Ubiquitinierung beteiligt sind.

Ebenfalls aufgefallen ist in den Experimenten, dass in Hs578T vom Plasmid exprimiertes AXL im Western Blot ein etwas größeres Molekulargewicht aufweist als durch die HA-Markierung zu erwarten wäre. Diese Verschiebung ist in H292-Zellen nicht zu beobachten (Abbildung 16 und Abbildung 17).

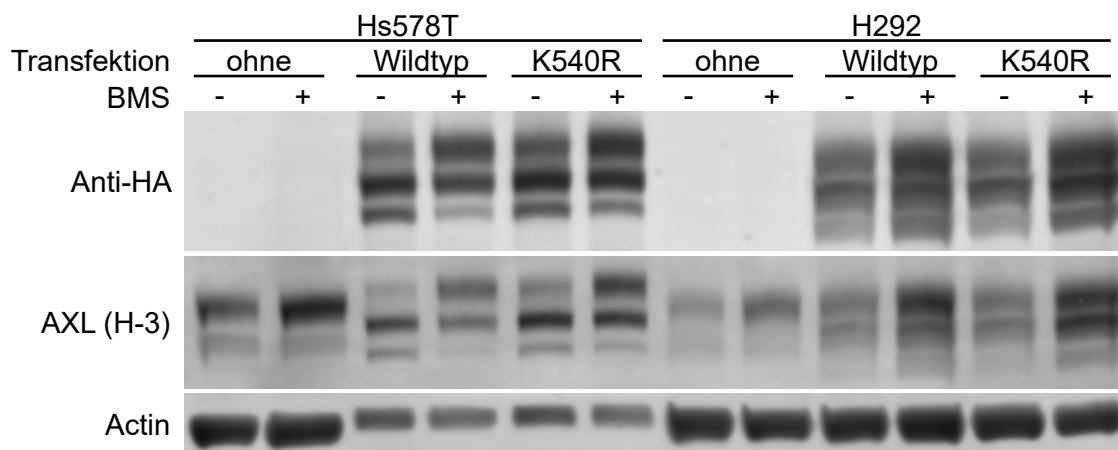


Abbildung 17: Durch K540R-Mutation kann der Abbau von AXL nicht wesentlich beeinflusst werden. Hs578T- und H292-Zellen wurden mit HA-markiertem AXL in Wildtyp- oder K540R-mutierter-Form transfiziert und 48 h später mit 0,5 μ M BMS für weitere 24 h behandelt. Das Transfektionsmedium wurde nach 24 h gewechselt. Ein repräsentativer Western-Blot zweier biologischer Replikate ist dargestellt.

4.5 HEK293-Zellen verändern ihre Form durch AXL-Überexpression

In der Zellkultur sind einige Auffälligkeiten bei der Transfektion von AXL bezüglich der Morphologie der transfizierten Zellen aufgetreten. Daher wurde der auf dem Plasmid befindliche HA-Tag mittels *Sequence and Ligation Independent Cloning* (SLIC) durch einen GFP-Tag ersetzt. Diese veränderten Plasmide (Wildtyp und K567R-mutiert, jeweils mit GFP-Tag) wurden in humane embryonale Nierenzellen (HEK293) transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Aufnahmen angefertigt (Abbildung 18). Die HEK293-Zellen veränderten dabei durch die Expression des AXLs ihre Form. Die flächige Anheftung der Zellen wurde aufgegeben, welche die in der Umgebung befindlichen nicht transfizierten Zellen zeigen. Stattdessen ergab sich die Form einer Kugel. Wurde alternativ AXL mit der die Kinase inaktivierenden Mutation K567R transfiziert, so unterschied sich die Morphologie nicht wesentlich von den untransfizierten Zellen. Ebenso verhielt es sich mit den GFP-transfizierten Kontrollzellen. Dies lässt darauf schließen, dass AXL in seiner aktiven Form auch ohne Gas6 Stimulation in der Lage ist, die Morphologie der Zelle zu verändern.

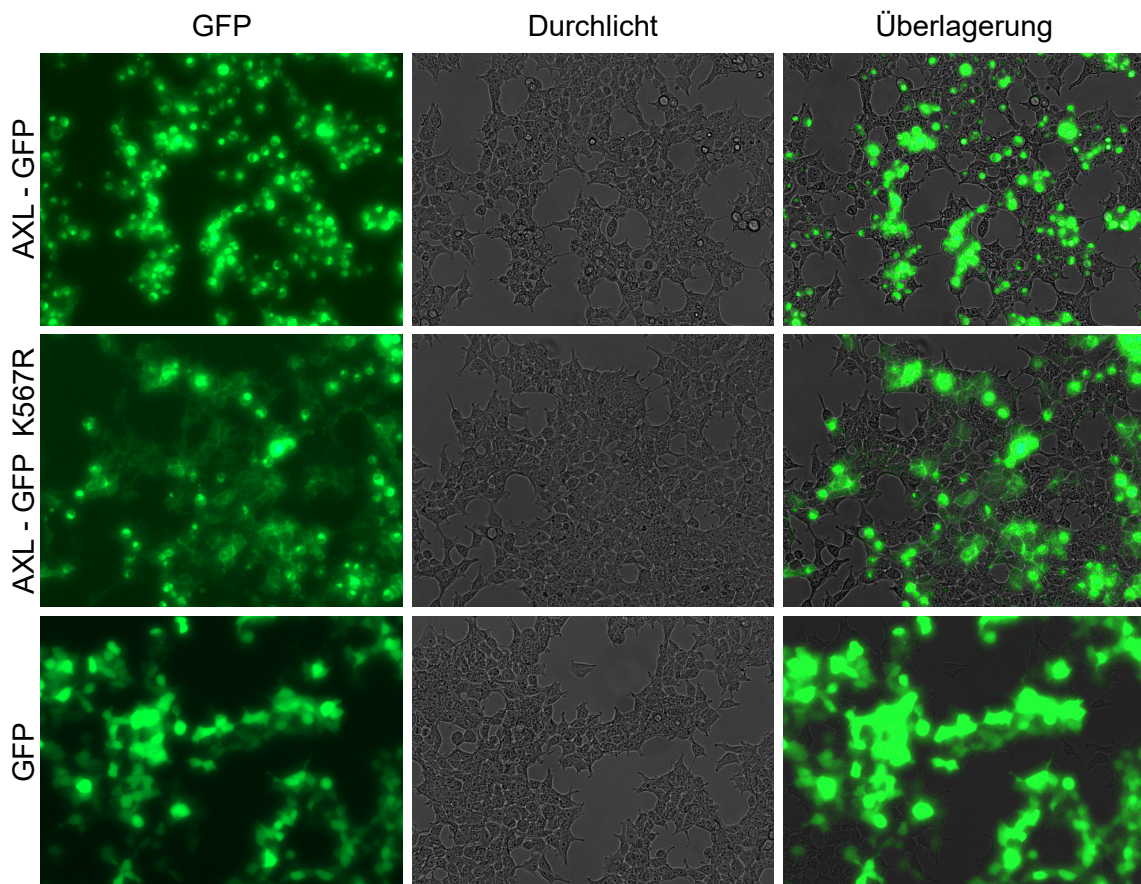


Abbildung 18: AXL-Überexpression in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) verändert die Morphologie der Zelle, sofern die Kinase aktivierbar ist. HEK293-Zellen wurden für 24 h mit GFP-markiertem AXL mit intakter (AXL-GFP) oder durch Mutation inaktivierter (AXL-GFP K567R) Kinase transient transfiziert. Als Kontrolle diente GFP alleine. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte.

5 Diskussion

Die diese Studie veranlasste Beobachtung, dass nach BMS-777607-Behandlung die AXL-Menge der behandelten Zellen ansteigt, konnte mehrfach nachvollzogen und verifiziert werden. Dabei wurden auch Unterschiede zwischen Zelllinien beobachtet und ihre Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen dargelegt. Die Anreicherung von AXL nach spezifischer Inhibition konnte zudem mit dem hochselektiven AXL-Inhibitor R428, auch BGB324 genannt, beobachtet werden (Brand et al., 2015, Abbildung 4c).

Die übermäßige Expression eines Proteins stellt einen möglichen Mechanismus dar, wodurch Tumorzellen gegen zielgerichtete Therapeutika resistent werden können (Groenendijk und Bernards, 2014). Daher war es von Bedeutung zu klären, wie diese Hochregulation stattfindet, sodass dies bei der Entwicklung der Inhibitoren gegebenenfalls mit adressiert werden kann.

Begonnen wurde die Untersuchung auf Transkriptionsebene. Für den EGFR ist die Gen-Amplifikation einer der bekannten Mechanismen zum Erreichen einer Resistenz gegen Erlotinib (Sequist et al., 2011). Für AXL sind mehrere Faktoren bekannt, wodurch die Transkription beeinflusst werden kann. Unter anderem handelt es sich dabei um DNA-Methylierung, Histon-Acetylierung und -Methylierung sowie Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 und -2, MZF1, Sp1 und Sp3, AP-1 und TEAD/YAP (siehe Unterunterabschnitt 1.1.2). Um hierauf einen Einfluss zu detektieren, wurde die mRNA-Menge von AXL im Zeitverlauf nach BMS-Behandlung bestimmt. Da sich hierbei keine Veränderung ergab, kann ausgeschlossen werden, dass BMS auf Ebene der Transkription die AXL-Anreicherung verursacht.

Für AXL ist außerdem bekannt, dass die relative mRNA-Menge je nach Gewebe deutlich von der Proteinmenge abweichen kann. Im Eileiter beispielsweise lässt sich immunhistochemisch kein AXL nachweisen. Im Skelettmuskel, wo sich eine etwas geringere Menge an AXL-mRNA quantifizieren lässt als im Eileiter, findet hingegen eine sehr ausgeprägte AXL-Expression in den Muskelzellen statt (www.proteinatlas.de, 2020; Thul et al., 2017). Die AXL-Expression muss daher auch posttranskriptional reguliert sein. Unter anderem können dafür die miRNAs 34a und 199a/b verantwortlich sein. Diese binden in der 3'-UTR der AXL-mRNA (Mudduluru et al., 2011). Da in den Experimenten keine Veränderung der AXL-mRNA beobachtet werden konnte, erscheint ein Einfluss von BMS auf die miRNAs unwahrscheinlich. Dass es bei der AXL-Translation von transfizierten Plasmiden, welche weder 3'-UTR noch 5'-UTR des AXLs beinhalten, ebenfalls zur AXL-Proteinanreicherung nach BMS-Behandlung kommt, bestätigt dies (Abbildung 16 und Abbildung 17).

Mittels ribosomaler Puromyzylierung und Polysomenfraktionierung wurde versucht einen möglichen Einfluss von BMS auf die Translation darzustellen (Abbildung 6 und Abbildung 7). Da leider keine der beiden Methoden aussagekräftige Ergebnisse erbringen konnte, kann zu diesem Abschnitt der Regulation nur eingeschränkt eine Aussage gemacht werden. In Zusammenschau aller Experimente ist der Einfluss von BMS auf den Abbau aber deutlich nachzuweisen und es ergab sich kein direkter Anhalt für eine Beeinflussung der AXL-Translation durch BMS. Ausgeschlossen werden kann dies aller-

dings nicht. Zur endgültigen Klärung sollte die Polysomenfraktionierung in einem Labor mit entsprechendem Equipment und Expertise erneut durchgeführt werden.

Medikamentös kann auch die Faltung und Reifung von AXL beeinflusst werden, was ebenfalls die Proteinmenge reguliert (Krishnamoorthy et al., 2013). In dieser Studie wurde ein vergleichbarer Einfluss von BMS nicht betrachtet. Beim angereicherten AXL handelt es sich um die 140 kDa schwere Form des Proteins, welches vollständig glykosyliert ist. Daher hätte BMS die Reifung und Faltung positiv beeinflussen müssen, um die Proteinmenge zu erhöhen.

Letztlich wird die Proteinmenge auch durch den Abbau reguliert. Dieser kann bei AXL auf mehreren Wegen passieren. AXL wird zum einen durch Sekretasen geschnitten. Das in die Membran integrierte 140 kDa AXL wird dabei durch α -Sekretasen in zwei Fragmente geteilt. Verantwortlich dafür sind Matrixmetalloproteinasen wie ADAM10 und ADAM17 (Miller et al., 2016). Der N-terminale Anteil wird als sAXL in den Überstand abgegeben und hat ein Gewicht von 80-85 kDa. In der Membran verbleibt folglich ein C-terminaler AXL-Teil von 55 kDa. Um eine Anreicherung von AXL auf diesem Wege zu erreichen, hätte BMS einen hemmenden Einfluss auf α -Sekretasen haben müssen. Dies wurde untersucht, indem BMS mit dem α -Sekretase-Inhibitor BB94 verglichen wurde. Außerdem wurden die beim Abbau anfallenden Fragmente stabilisiert, um diese im Western Blot detektierbar zu machen. Es konnte dabei beobachtet werden, dass BMS und BB94 quasi inverse Effekte auf die Abundanz der Fragmente haben (Abbildung 11). Die durch DAPT, einem γ -Sekretase-Inhibitor, stabilisierten 52 kDa Fragmente waren durch BMS vermehrt und durch BB94 vermindert nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde das durch Chloroquin (CQ) stabilisierte Fragment des lysosomalen Abbaus durch BMS vermindert und durch BB94 vermehrt detektierbar. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass BMS das AXL-Protein dem lysosomalen Abbau entzieht. Dadurch steht mehr Substrat den α -Sekretasen zur Verfügung, was die Anreicherung des 55 kDa Fragmentes durch BMS erklärt.

Wenn es um den Abbau von Rezeptortyrosinkinasen geht, kann man sich am EGFR orientieren. Dieser wurde sehr gut untersucht. Für den EGFR ist bekannt, dass der Rezeptor nach Homodimerisierung und Autophosphorylierung am Tyrosin 1045 eine Bindestelle für c-Cbl aufweist. Bei c-Cbl handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, welche nach EGFR-Aktivierung phosphoryliert wird. Diese katalysiert die Ubiquitinierung des EGFR, wodurch der Rezeptor der Clathrin-vermittelten Endozytose zugeführt wird. Anschließend wird der Rezeptor entweder wieder zur Zellmembran transportiert, also recycelt, oder er wird lysosomal abgebaut (Shtiegman und Yarden, 2003). Pennock und Wang (2008) berichteten außerdem von der Beteiligung von Cbl-b bei der Regulation des EGFR. Bei fehlender Interaktion von EGFR und c-Cbl bei einer an Position 1044 trunkierten Rezeptorvariante wurde diese dennoch in normalem Umfang internalisiert. Auch bei Knockdown beider Cbl-Varianten kam es zu einer normalen Internalisierungsrate des Rezeptors. Für die Degradation des EGFRs zeigten sich beide Cbl-Varianten als beteiligt. So konnte durch einen einzelnen Knockdown jeweils der Abbau reduziert,

durch Knockdown beider Cbl-Varianten dieser beinahe aufgehoben werden (Pennock und Wang, 2008, Abbildung 8).

Für AXL ist der Abbauweg noch nicht so eindeutig beschrieben. Bekannt ist, dass es nach Gas6-Behandlung analog zur Aktivierung des EGFR zur Phosphorylierung des Rezeptors selbst und zur Phosphorylierung von c-Cbl kommt. Mittels Immunpräzipitation konnte auch gezeigt werden, dass c-Cbl an AXL bindet nach dessen Stimulation mit Gas6 (Valverde, 2005). Neben c-Cbl verursacht auch Cbl-b eine Ubiquitinierung von AXL, wie Paolino et al. (2014) zeigen konnten. Der Zusammenhang zwischen AXL und Clathrin-abhängiger Endozytose wurde hingegen bislang nur indirekt ermittelt. Dabei wurde 2015 festgestellt, dass AXL die Aufnahme des Zika-Virus in Zellen unterstützt (Hamel et al., 2015). Das Virus bindet dabei an Gas6 und der entstehende Virus-Gas6-Komplex an AXL. Durch diese Bindung kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung der AXL-RTK, welche stärker ausfällt als durch Gas6 alleine. Anschließend wird das Virus Clathrin-abhängig endozytiert und dadurch in die Zielzellen aufgenommen. Dabei spielt die Phosphorylierung des Rezeptors eine entscheidende Rolle. Durch den AXL-spezifischen Inhibitor R428 konnte die Aufnahme des Virus konzentrationsabhängig vermindert werden (Meertens et al., 2017). 2011 wurde AXL bereits in Zusammenhang gebracht mit der Aufnahme des Zaire-Ebolavirus in humane Glioblastomzellen und embryonale Nierenzellen. Allerdings konnte hier keine Hemmung der Virusaufnahme nach AXL-Knockdown mittels interferierender RNA im Bezug zur Clathrin-abhängigen Endozytose festgestellt werden. Vielmehr wurde dadurch die Aufnahme durch Makropinozytose vermindert (Brindley et al., 2011). Die Virusaufnahme durch den Rezeptor scheint folglich nicht einheitlich abzulaufen.

In dieser Studie konnte außerdem bestätigt werden, dass Gas6-Stimulation die Ubiquitinierung von AXL zur Folge hat (Abbildung 15). BMS-777607 konnte dabei sowohl die Ubiquitinierung, als auch die Internalisierung von AXL verhindern (Abbildung 14). Da folglich der lysosomale Abbau des Rezeptors vermindert wird, erklärt sich die Anreicherung des Proteins bei translatierenden Zellen. Warum die Ergebnisse in den Cycloheximid-Chase-Experimenten so uneindeutig ausgefallen sind, ist unklar. Möglich ist die ebenfalls fehlende Synthese des Liganden, sodass generell weniger des Rezeptors abgebaut wird und der Effekt dadurch kleiner wird. Dass sich die im Cycloheximid-Chase behandelten Zellen unterschiedlich im Hinblick auf die Serumkonzentration im Medium verhielten (Abbildung 10), lässt sich durch die unterschiedliche Expression des Liganden Gas6 erklären (Abbildung 12). Dies unterstützt die Hypothese, dass Gas6 notwendig ist, damit BMS die scheinbare AXL-Anreicherung verursachen kann. Allerdings ist die erwartete Expressionssteigerung von Gas6 in H1792-Zellen deutlich schwächer ausgefallen, als erwartet. Jedoch wurde hierbei auch nur die Gas6-mRNA bestimmt. Wie bei AXL kann Gas6 entsprechend auch posttranskriptional reguliert sein, sodass eine Steigerung der Gas6-Produktion nicht wirklich dadurch quantifiziert werden konnte.

Für den EGFR ist des weiteren bekannt, dass eine intakte Kinase-Domäne für die erfolgreiche Internalisierung des Rezeptors notwendig ist (Lamaze und Schmid, 1995). Nicht direkt die Internalisierung, wohl aber die Abhängigkeit des AXL-Abbaus wurde

durch die Einführung einer die Kinase inaktivierenden Mutation (K567R) beleuchtet. Dabei kam eine deutliche Anreicherung durch verminderten Abbau von 140 kDa AXL zur Darstellung durch Transfektion einer K567R-mutierten AXL-Variante im Vergleich zum Wildtyp. BMS verlor durch diese Mutation ebenfalls seinen anreichernden Effekt auf AXL nach 24 stündiger Behandlung (Abbildung 16). Dies bestätigt die Annahme, dass BMS den Abbau des AXL-Proteins nach Liganden-abhängiger Aktivierung vermindert.

Den Versuch, die nachfolgend stattfindende Ubiquitinierung von AXL durch Mutation zu verhindern und dadurch einen ähnlichen Effekt wie durch die Mutation der Kinase zu erreichen, führte leider nicht zum gewünschten Erfolg (Abbildung 17). Zum einen wurde nur ein Lysin ausgetauscht, sodass noch weitere Lysine für die Bindung von Ubiquitin zur Verfügung stehen. Zum anderen hätte im Anschluss an das Experiment eine Ubiquitin-IP durchgeführt werden können. Sollte der Abbau wider Erwarten nicht notwendigerweise Ubiquitin-abhängig sein, so hätte möglicherweise eine fehlende Ubiquitinierung bei dennoch erfolgreichem Abbau beobachten werden können. Da diese Ubiquitin-IP nicht durchgeführt wurde, bleibt eine Aussage dazu weiterhin spekulativ. Wahrscheinlich ist jedoch, dass AXL an weiteren Positionen als an Lysin 540 ubiquitiniert werden kann. Eine andere Möglichkeit der Einflussnahme auf die Ubiquitinierung von AXL wäre der Knockdown der Ubiquitin-Ligasen gewesen. Wie für den EGFR hätten hier wahrscheinlich gleichsam sowohl c-Cbl als auch Cbl-b "ausgeknockt" werden müssen. Beide sind als Bindungspartner für AXL beschrieben.

Bei der Anreicherung durch einen AXL-Tyrosinkinaseinhibitor ist primär davon auszugehen, dass es sich bei der Anreicherung zunächst um AXL mit durch den Inhibitor blockierter Kinase handelt. Jedoch ist die Konzentration eines Medikamentes über die Zeit und auch innerhalb einer Tumorzellmasse nicht konstant, sodass hier bei Talspiegeln möglicherweise negative Effekte durch den dann in großer Dichte vorhandenen und aktivierbaren Rezeptor entstehen können. In dieser Studie konnte bei Überexpression von AXL in HEK293-Zellen eine morphologische Veränderung beobachtet werden. Diese war durch die Inaktivierung der Kinase durch K567R-Mutation reversibel (Abbildung 18). Andere Studien berichten von einer höheren Metastasierungsrate, Resistenz gegen Chemotherapeutika, reduziertem Gesamtüberleben und Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) durch AXL (Levin et al., 2016). So wurden beispielsweise Kopf-Hals-Karzinomzellen (HN5-Zellen) gegen Erlotinib resistent gemacht durch eine über 6 Monate langsam ansteigende Konzentration des EGFR-Inhibitors. Die mittlere effektive Wirkdosis konnte so von 0,1 μM auf über 20 μM gesteigert werden. Dies war assoziiert mit einer dramatischen Expressionssteigerung von AXL. Dabei konnte eine Reduktion der Expression von miRNA 34a als Ursache nachgewiesen werden. Sowohl eine Transfektion von AXL-siRNA als auch spezifische AXL-Inhibition mittels R428 konnten die zuvor resistenten Zellen gegen Erlotinib sensibilisieren (Giles et al., 2013). Gleichsam wurde in der NSCLC-Zelllinie HCC827 nach Resistenzentwicklung gegen Erlotinib eine vermehrte Expression von AXL und des Liganden Gas6 nachgewiesen. Auch hier konnte durch AXL-Inhibition die Erlotinibresistenz aufgehoben werden. Dabei wurden MP-470 und XL-880 verwendet. Auch der Knockdown von AXL mittels siRNA stellte die Empfindlichkeit gegenüber

Erlotinib wieder her. Durch Überexpression von WT-AXL konnte in HCC827 das weitere eine Erlotinibresistenz erreicht werden, nicht aber durch die Kinase-inaktive Variante mit K567R-Mutation. Zudem konnte der Zusammenhang zwischen EMT und AXL dargestellt werden. In den resistenten Zellen waren Vimentin vermehrt nachweisbar sowie Migration und Adhäsion gesteigert. Dies war jeweils durch Knockdown von AXL oder Inhibition mit XL-880 reversibel (Zhang et al., 2012).

Bereits 2001 kam es zu einer interessanten Entwicklung. Sakamoto et al. (2001) kamen auf die Idee Chimären herzustellen, welche sowohl an eine Ubiquitinligase als auch an das gewünschte Zielprotein binden und nannten dies *protein-targeting chimeric molecule* (PROTAC). Die Idee entwickelte sich weiter und Burslem et al. (2018) verbanden EGFR-TKIs wie Lapatinib, Gefetinib und Afatinib über einen Linker mit einer das Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) bindenden Einheit. VHL ist Bestandteil einer E3-Ubiquitinligase. Dadurch konnte eine deutliche Reduktion des EGFR in vitro erreicht werden. Als Kontrolle wurde ein nur die Kinase inhibierendes Diastereomer der jeweiligen PROTACs verwendet, wodurch die nachgeschaltete Signalkaskade weniger effektiv gehemmt werden konnte bei gleicher Konzentration des Inhibitors. Auch für c-Met wurde durch Verwendung von Foretinib als Basis ein PROTAC entworfen. Dieses war effektiv in der Hemmung und dem Abbau. Die Phosphorylierung des Downstream-Ziels AKT konnte auch unter HGF-Stimulation deutlich reduziert werden. Logische Schlussfolgerung wäre, dass für AXL ebenfalls ein solcher Ansatz gewählt werden sollte, um nicht nur die Anreicherung zu verhindern, sondern sogar die Proteinmenge dadurch zu reduzieren und das AXL-Signal besser zu blockieren als durch einen gewöhnlichen Kinaseinhibitor. Allerdings ist bei der Entwicklung der PROTACs auch zu beachten, dass eine starke Bindung des verbundenen Inhibitors alleine nicht ausreichend ist. So werden auch Proteine ubiquitiniert, zu denen der Inhibitor zwar nur eine schwache Affinität aufweist, mit denen die Ubiquitinligase jedoch gerne interagiert. Kommt es zu keiner Protein-Protein-Interaktion zwischen Ziel und Ligase, findet entsprechend keine Ubiquitinierung statt (An und Fu, 2018). Möglicherweise tritt ein solcher Effekt bei AXL auf. In einer Studie wurde an Foretinib entweder ein Bindemolekül für VHL oder CRBN (ebenfalls Bestandteil einer E3 Ubiquitin-Ligase) gebunden. Es zeigten sich hinsichtlich des Abbaus einzelner Kinasen deutliche Unterschiede in der Effektivität der beiden PROTACs. Auffällig war jedoch AXL, welches sich von keinem der PROTACs effektiv dem Abbau zuführen ließ (Bondeson et al., 2018). Für AXL besteht folglich weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der Entwicklung eines PROTACs.

Dass die AXL-Degradation dazu führen kann, dass erworbene Resistenzen wieder aufgehoben werden, konnte für das NSCLC gezeigt werden. Kim et al. (2019) verwendeten Yuanhuadine zur AXL-Degradation bei EGFR-TKI-resistenten Zellen. Durch die Kombination mit den EGFR-TKIs Gefitinib oder Osimertinib konnten synergistische Effekte in Bezug zur Hemmung der Proliferation von primär resistenten Tumoren mit EGFR-Mutation im Xenograft-Modell der Maus beobachtet werden. Der Ansatz der AXL-Degradation scheint folglich recht vielversprechend zu sein, um Tumoren gegen die Primärtherapie wieder sensibel zu machen.

6 Zusammenfassung

Die AXL-Rezeptortyrosinkinase wurde in Verbindung mit bösartigen Neoplasien gebracht. Dabei reduziert eine hohe Expression von AXL die 5-Jahresüberlebensrate und verursacht Resistenzen gegen unterschiedliche Krebstherapeutika. In den vergangenen Jahren wurden daher Inhibitoren gegen AXL entwickelt. Einer davon ist BMS-777607. Dieser blockiert die ATP-Bindetasche der Kinasedomäne mehrerer Rezeptortyrosinkinasen. Bei der Therapie mit diesem Inhibitor ist in vorangegangenen Untersuchungen aufgefallen, dass es nachfolgend zu einer Anreicherung des AXL-Proteins kommt. In dieser Studie wurde der Mechanismus aufgeklärt, wie es zur Akkumulation des Rezeptors durch BMS kommt.

Ein Einfluss auf die mRNA-Menge von AXL konnte dabei ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen zur Translation konnten kein zufriedenstellendes Ergebnis liefern, sodass ein Effekt hierauf leider nicht ausgeschlossen werden kann. Insgesamt lassen die weiteren Experimente dies allerdings unwahrscheinlich erscheinen.

BMS nahm einen deutlichen Einfluss auf den Abbau von AXL. So wurde der lysosomale Abbau des Rezeptors gehemmt. Dabei konnten vermehrt AXL-Fragmente, welche durch das Schneiden mittels α - und γ -Sekretasen entstehen, nachgewiesen werden. Dies kann bei therapierten Patienten hinsichtlich diagnostischer Möglichkeiten relevant sein, da somit auch mehr löslicher Rezeptoranteil (sAXL) generiert wird. Durch BMS wurde die Ubiquitinierung von AXL unterdrückt. Auch durch Gas6-Stimulation ließ sich AXL nicht mehr ubiquitinieren. Außerdem hemmte BMS die Internalisierung, sodass der Rezeptor tatsächlich auf der Oberfläche der Zelle verblieb und bei schwankenden Medikamentenspiegeln im Patienten ggf. aktiviert werden könnte. Durch Ausschalten der Kinase von AXL mittels Mutation (K567R-Mutation), konnte ein identischer Effekt wie durch BMS ausgelöst werden. Die Effekte konnten dabei nicht kombiniert werden. BMS war also nicht in der Lage das AXL mit der Gatekeeper-Mutation anzureichern und durch Einführung der Mutation konnte die Anreicherung nicht über das von BMS beobachtete Level gesteigert werden.

Die Forschung an Medikamenten, welche die Proteininhibition und -degradation kombinieren, sollte folglich weiter vorangetrieben werden. Diese als PROTAC bezeichneten Chimären wurden bereits für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und einige weitere Kinasen entwickelt und bergen großes Potential.

7 Literaturverzeichnis

- Alwan H. A., van Zoelen E. J. und van Leeuwen J. E. (2003). Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J. Biol. Chem.*, 278(37), 35781–35790.
- An S. und Fu L. (2018). Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs. *EBioMedicine*, 36, 553–562.
- Antony J., Zanini E., Kelly Z., Tan T. Z., Karali E., Alomary M., Jung Y., Nixon K., Cunnane P., Fotopoulou C., Paterson A., Roy-Nawathe S., Mills G. B., Huang R. Y., Thierry J. P., Gabra H. und Recchi C. (2018). The tumour suppressor OPCML promotes AXL inactivation by the phosphatase PTPRG in ovarian cancer. *EMBO Rep.*, 19(8).
- Axelrod H. und Pienta K. J. (2014). Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*, 5(19), 8818–8852.
- Bae S. Y., Hong J. Y., Lee H. J., Park H. J. und Lee S. K. (2015). Targeting the degradation of AXL receptor tyrosine kinase to overcome resistance in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(12), 10146–10160.
- Bellosta P., Costa M., Lin D. A. und Basilico C. (1995). The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.*, 15(2), 614–625.
- Bondeson D. P., Smith B. E., Burslem G. M., Buhimschi A. D., Hines J., Jaime-Figueroa S., Wang J., Hamman B. D., Ishchenko A. und Crews C. M. (2018). Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem Biol*, 25(1), 78–87.
- Brand T. M., Iida M., Stein A. P., Corrigan K. L., Braverman C. M., Coan J. P., Pearson H. E., Bahrar H., Fowler T. L., Bednarz B. P., Saha S., Yang D., Gill P. S., Lingen M. W., Saloura V., Villaflor V. M., Salgia R., Kimple R. J. und Wheeler D. L. (2015). AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 21(11), 2601–2612.
- Braunger J., Schleithoff L., Schulz A. S., Kessler H., Lammers R., Ullrich A., Bartram C. R. und Janssen J. W. (1997). Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*, 14(22), 2619–2631.
- Brindley M. A., Hunt C. L., Kondratowicz A. S., Bowman J., Sinn P. L., McCray P. B., Quinn K., Weller M. L., Chiorini J. A. und Maury W. (2011). Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology*, 415(2), 83–94.
- Brown J. E., Krodel M., Pazos M., Lai C. und Prieto A. L. (2012). Cross-phosphorylation, signaling and proliferative functions of the Tyro3 and Axl receptors in Rat2 cells. *PLoS ONE*, 7(5), e36800.

- Burchert A., Attar E. C., McCloskey P., Fridell Y. W. und Liu E. T. (1998). Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 16(24), 3177–3187.
- Burslem G. M., Smith B. E., Lai A. C., Jaime-Figueroa S., McQuaid D. C., Bondeson D. P., Toure M., Dong H., Qian Y., Wang J., Crew A. P., Hines J. und Crews C. M. (2018). The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chem Biol*, 25(1), 67–77.
- Caberoy N. B., Zhou Y. und Li W. (2010). Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J.*, 29(23), 3898–3910.
- Cavet M. E., Smolock E. M., Ozturk O. H., World C., Pang J., Konishi A. und Berk B. C. (2008). Gas6-axl receptor signaling is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28(5), 886–891.
- Danielsen J. M., Sylvestersen K. B., Bekker-Jensen S., Szklarczyk D., Poulsen J. W., Horn H., Jensen L. J., Mailand N. und Nielsen M. L. (2011). Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. *Mol. Cell Proteomics*, 10(3), M110.003590.
- David A., Dolan B. P., Hickman H. D., Knowlton J. J., Clavarino G., Pierre P., Bennink J. R. und Yewdell J. W. (2012). Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J. Cell Biol.*, 197(1), 45–57.
- Dufies M., Jacquelin A., Belhacene N., Robert G., Cluzeau T., Luciano F., Cassuto J. P., Raynaud S. und Auberger P. (2011). Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 2(11), 874–885.
- Ekman C., Stenhoff J. und Dahlbäck B. (2010). Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J. Thromb. Haemost.*, 8(4), 838–844.
- Entner N. (1979). Emetine binding to ribosomes of *Entamoeba histolytica*—inhibition of protein synthesis and amebicidal action. *J. Protozool.*, 26(2), 324–328.
- Gibault F., Coevoet M., Sturbaut M., Farce A., Renault N., Allemand F., Guichou J. F., Drucbert A. S., Foulon C., Magnez R., Thuru X., Corvaisier M., Huet G., Chavatte P., Melnyk P., Bailly F. und Cotelle P. (2018). Toward the Discovery of a Novel Class of YAP-TEAD Interaction Inhibitors by Virtual Screening Approach Targeting YAP-TEAD Protein-Protein Interface. *Cancers (Basel)*, 10(5).
- Giles K. M., Kalinowski F. C., Candy P. A., Epis M. R., Zhang P. M., Redfern A. D., Stuart L. M., Goodall G. J. und Leedman P. J. (2013). Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol. Cancer Ther.*, 12(11), 2541–2558.
- Groenendijk F. H. und Bernards R. (2014). Drug resistance to targeted therapies: déjà vu all over again. *Mol Oncol*, 8(6), 1067–1083.

- Hafizi S. und Dahlback B. (2006). Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J.*, 273(23), 5231–5244.
- Hamel R., Dejarnac O., Wichit S., Ekchariyawat P., Neyret A., Luplertlop N., Perera-Lecoin M., Surasombatpattana P., Talignani L., Thomas F., Cao-Lormeau V. M., Choumet V., Briant L., Desprès P., Amara A., Yssel H. und Missé D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.*, 89(17), 8880–8896.
- Ishikawa M., Sonobe M., Nakayama E., Kobayashi M., Kikuchi R., Kitamura J., Imamura N. und Date H. (2013). Higher expression of receptor tyrosine kinase Axl, and differential expression of its ligand, Gas6, predict poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Ann. Surg. Oncol.*, 20 Suppl 3, S467–476.
- Janssen J. W., Schulz A. S., Steenvoorden A. C., Schmidberger M., Strehl S., Ambros P. F. und Bartram C. R. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*, 6(11), 2113–2120.
- Jeong J. Y., Yim H. S., Ryu J. Y., Lee H. S., Lee J. H., Seen D. S. und Kang S. G. (2012). One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(15), 5440–5443.
- Kim D., Bach D. H., Fan Y. H., Luu T. T., Hong J. Y., Park H. J. und Lee S. K. (2019). AXL degradation in combination with EGFR-TKI can delay and overcome acquired resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Dis.*, 10(5), 361.
- Kirane A., Ludwig K. F., Sorrelle N., Haaland G., Sandal T., Ranaweera R., Toombs J. E., Wang M., Dineen S. P., Micklem D., Dellinger M. T., Lorens J. B. und Brekken R. A. (2015). Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis. *Cancer Res.*, 75(18), 3699–3705.
- Kirisits A., Pils D. und Krainer M. (2007). Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(12), 2173–2182.
- Krishnamoorthy G. P., Guida T., Alfano L., Avilla E., Santoro M., Carlomagno F. und Melillo R. M. (2013). Molecular mechanism of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)-induced AXL receptor tyrosine kinase degradation. *J. Biol. Chem.*, 288(24), 17481–17494.
- Kurokawa M., Ise N., Omi K., Goishi K. und Higashiyama S. (2013). Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Cancer Sci.*, 104(7), 904–911.
- Lamaze C. und Schmid S. L. (1995). Recruitment of epidermal growth factor receptors into coated pits requires their activated tyrosine kinase. *J. Cell Biol.*, 129(1), 47–54.

- Lanz T. A., Himes C. S., Pallante G., Adams L., Yamazaki S., Amore B. und Merchant K. M. (2003). The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A beta levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305(3), 864–871.
- Levin P. A., Brekken R. A., Byers L. A., Heymach J. V. und Gerber D. E. (2016). Axl Receptor Axis: A New Therapeutic Target in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 11(8), 1357–1362.
- Lew E. D., Oh J., Burrola P. G., Lax I., Zagórska A., Través P. G., Schlessinger J. und Lemke G. (2014). Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*, 3.
- Linger R. M., Cohen R. A., Cummings C. T., Sather S., Migdall-Wilson J., Middleton D. H., Lu X., Bar?n A. E., Franklin W. A., Merrick D. T., Jedlicka P., DeRyckere D., Heasley L. E. und Graham D. K. (2013). Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 32(29), 3420–3431.
- 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. und Lemke G. (1999). Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*, 398(6729), 723–728.
- Lu Q. und Lemke G. (2001). Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*, 293(5528), 306–311.
- Lu Y., Wan J., Yang Z., Lei X., Niu Q., Jiang L., Passtoors W. M., Zang A., Fraering P. C. und Wu F. (2017). Regulated intramembrane proteolysis of the AXL receptor kinase generates an intracellular domain that localizes in the nucleus of cancer cells. *FASEB J.*, 31(4), 1382–1397.
- Meertens L., Labeau A., Dejarnac O., Cipriani S., Sinigaglia L., Bonnet-Madin L., Le Charpentier T., Hafirassou M. L., Zamborlini A., Cao-Lormeau V. M., Couplier M., Missé D., Jouvenet N., Tabibiazar R., Gressens P., Schwartz O. und Amara A. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*, 18(2), 324–333.
- Melaragno M. G., Cavet M. E., Yan C., Tai L. K., Jin Z. G., Haendeler J. und Berk B. C. (2004). Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 37(4), 881–887.
- Miaczynska M. (2013). Effects of membrane trafficking on signaling by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(11), a009035.

- Miller M. A., Oudin M. J., Sullivan R. J., Wang S. J., Meyer A. S., Im H., Frederick D. T., Tadros J., Griffith L. G., Lee H., Weissleder R., Flaherty K. T., Gertler F. B. und Lauf-
fenburger D. A. (2016). Reduced Proteolytic Shedding of Receptor Tyrosine Kinases Is
a Post-Translational Mechanism of Kinase Inhibitor Resistance. *Cancer Discov*, 6(4),
382–399.
- Mudduluru G. und Allgayer H. (2008). The human receptor tyrosine kinase Axl gene–
promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and
CpG methylation. *Biosci. Rep.*, 28(3), 161–176.
- Mudduluru G., Ceppi P., Kumarswamy R., Scagliotti G. V., Papotti M. und Allgayer H.
(2011). Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-
199a/b in solid cancer. *Oncogene*, 30(25), 2888–2899.
- Mudduluru G., Vajkoczy P. und Allgayer H. (2010). Myeloid zinc finger 1 induces migrati-
on, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol.*
Cancer Res., 8(2), 159–169.
- O'Bryan J. P., Fridell Y. W., Koski R., Varnum B. und Liu E. T. (1995). The transforming
receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage.
J. Biol. Chem., 270(2), 551–557.
- O'Bryan J. P., Frye R. A., Cogswell P. C., Neubauer A., Kitch B., Prokop C., Espinosa R.,
Le Beau M. M., Earp H. S. und 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(10), 5016–5031.
- Ott M., Litzemberger U. M., Sahm F., Rauschenbach K. J., Tudoran R., Hartmann C.,
Marquez V. E., von Deimling A., Wick W. und Platten M. (2012). Promotion of glioblas-
toma cell motility by enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is mediated by AXL receptor
kinase. *PLoS ONE*, 7(10), e47663.
- Panda A. C., Martindale J. L. und Gorospe M. (2017). Polysome Fractionation to Analyze
mRNA Distribution Profiles. *Bio Protoc*, 7(3).
- Pao-Chun L., Chan P. M., Chan W. und Manser E. (2009). Cytoplasmic ACK1 interacti-
on with multiple receptor tyrosine kinases is mediated by Grb2: an analysis of ACK1
effects on Axl signaling. *J. Biol. Chem.*, 284(50), 34954–34963.
- Paolino M., Choidas A., Wallner S., Pranjić B., Uribealga I., Loeser S., Jamieson A. M.,
Langdon W. Y., Ikeda F., Fededa J. P., Cronin S. J., Nitsch R., Schultz-Fademrecht C.,
Eickhoff J., Menninger S., Unger A., Torika R., Gruber T., Hinterleitner R., Baier G.,
Wolf D., Ullrich A., Klebl B. M. und Penninger J. M. (2014). The E3 ligase Cbl-b and
TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature*, 507(7493),
508–512.
- Pennock S. und Wang Z. (2008). A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in
epidermal growth factor receptor downregulation. *Mol. Cell. Biol.*, 28(9), 3020–3037.

- Pfirrmann T., Lokapally A., Andreasson C., Ljungdahl P. und Hollemann T. (2013). SOMA: a single oligonucleotide mutagenesis and cloning approach. *PLoS ONE*, 8(6), e64870.
- Povlsen L. K., Beli P., Wagner S. A., Poulsen S. L., Sylvestersen K. B., Poulsen J. W., Nielsen M. L., Bekker-Jensen S., Mailand N. und Choudhary C. (2012). Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat. Cell Biol.*, 14(10), 1089–1098.
- Rankin E. B., Fuh K. C., Castellini L., Viswanathan K., Finger E. C., Diep A. N., LaGory E. L., Kariolis M. S., Chan A., Lindgren D., Axelson H., Miao Y. R., Krieg A. J. und Giaccia A. J. (2014). Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111(37), 13373–13378.
- Rescigno J., Mansukhani A. und Basilico C. (1991). A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene*, 6(10), 1909–1913.
- Rothlin C. V., Ghosh S., Zuniga E. I., Oldstone M. B. und Lemke G. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 131(6), 1124–1136.
- Sadahiro H., Kang K. D., Gibson J. T., Minata M., Yu H., Shi J., Chhipa R., Chen Z., Lu S., Simoni Y., Furuta T., Sabit H., Zhang S., Bastola S., Yamaguchi S., Alsheikh H., Komarova S., Wang J., Kim S. H., Hambardzumyan D., Lu X., Newell E. W., DasGupta B., Nakada M., Lee L. J., Nabors B., Norian L. A. und Nakano I. (2018). Activation of the Receptor Tyrosine Kinase AXL Regulates the Immune Microenvironment in Glioblastoma. *Cancer Res.*, 78(11), 3002–3013.
- Sakamoto K. M., Kim K. B., Kumagai A., Mercurio F., Crews C. M. und Deshaies R. J. (2001). Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(15), 8554–8559.
- Salian-Mehta S., Xu M., Knox A. J., Plummer L., Slavov D., Taylor M., Bevers S., Hodges R. S., Crowley W. F. und Wierman M. E. (2014). Functional consequences of AXL sequence variants in hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 99(4), 1452–1460.
- Sasaki T., Knyazev P. G., Clout N. J., Cheburkin Y., Gohring W., Ullrich A., Timpl R. und Hohenester E. (2006). Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J.*, 25(1), 80–87.
- Schroeder G. M., An Y., Cai Z. W., Chen X. T., Clark C., Cornelius L. A., Dai J., Gullo-Brown J., Gupta A., Henley B., Hunt J. T., Jeyaseelan R., Kamath A., Kim K., Lippy J., Lombardo L. J., Manne V., Oppenheimer S., Sack J. S., Schmidt R. J., Shen G., Stefanski K., Tokarski J. S., Trainor G. L., Wautlet B. S., Wei D., Williams D. K., Zhang Y., Zhang Y., Fargnoli J. und Borzilleri R. M. (2009). Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily. *J. Med. Chem.*, 52(5), 1251–1254.

- Sequist L. V., Waltman B. A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A. B., Fidias P., Bergethon K., Shaw A. T., Gettinger S., Cospers A. K., Akhavanfard S., Heist R. S., Temel J., Christensen J. G., Wain J. C., Lynch T. J., Vernovsky K., Mark E. J., Lanuti M., Iafrate A. J., Mino-Kenudson M. und Engelman J. A. (2011). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, 3(75), 75ra26.
- Shieh Y. S., Lai C. Y., Kao Y. R., Shiah S. G., Chu Y. W., Lee H. S. und Wu C. W. (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*, 7(12), 1058–1064.
- Shtiegman K. und Yarden Y. (2003). The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 13(1), 29–40.
- Statistisches Bundesamt (2019). Kapitel: 4 Gesundheit, Abschnitt: 4.1.11 Sterbefälle 2016. *Statistisches Jahrbuch Deutschland 2019*, (pp. 138–139).
- Taniguchi H., Yamada T., Wang R., Tanimura K., Adachi Y., Nishiyama A., Tanimoto A., Takeuchi S., Araujo L. H., Boroni M., Yoshimura A., Shiotsu S., Matsumoto I., Watanabe S., Kikuchi T., Miura S., Tanaka H., Kitazaki T., Yamaguchi H., Mukae H., Uchino J., Uehara H., Takayama K. und Yano S. (2019). AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. *Nat Commun*, 10(1), 259.
- Thul P. J., Åkesson L., Wiking M., Mahdessian D., Geladaki A., Ait Blal H., Alm T., Asplund A., Björk L., Breckels L. M., Bäckström A., Danielsson F., Fagerberg L., Fall J., Gatto L., Gnann C., Hober S., Hjelmare M., Johansson F., Lee S., Lindskog C., Mulder J., Mulvey C. M., Nilsson P., Oksvold P., Rockberg J., Schutten R., Schwenk J. M., Sivertsson S., Sjöstedt E., Skogs M., Stadler C., Sullivan D. P., Tegel H., Winsnes C., Zhang C., Zwahlen M., Mardinoglu A., Pontén F., von Feilitzen K., Lilley K. S., Uhlén M. und Lundberg E. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science*, 356(6340).
- Valverde P. (2005). Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333(1), 180–185.
- Vouri M., Croucher D. R., Kennedy S. P., An Q., Pilkington G. J. und Hafizi S. (2016). Axl-EGFR receptor tyrosine kinase hetero-interaction provides EGFR with access to pro-invasive signalling in cancer cells. *Oncogenesis*, 5(10), e266.
- Wimmel A., Glitz D., Kraus A., Roeder J. und Schuermann M. (2001). Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur. J. Cancer*, 37(17), 2264–2274.
- Wu F., Li J., Jang C., Wang J. und Xiong J. (2014). The role of Axl in drug resistance and epithelial-to-mesenchymal transition of non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(10), 6653–6661.
- www.proteinatlas.de (2020). <https://www.proteinatlas.org/ensg00000167601-axl/tissue> [abgerufen am 03.02.2020].

- Zhang Y. X., Knyazev P. G., Cheburkin Y. V., Sharma K., Knyazev Y. P., Orfi L., Szabadkai I., Daub H., K?ri G. und Ullrich A. (2008). AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res.*, 68(6), 1905–1915.
- Zhang Z., Lee J. C., Lin L., Olivas V., Au V., LaFramboise T., Abdel-Rahman M., Wang X., Levine A. D., Rho J. K., Choi Y. J., Choi C. M., Kim S. W., Jang S. J., Park Y. S., Kim W. S., Lee D. H., Lee J. S., Miller V. A., Arcila M., Ladanyi M., Moonsamy P., Sawyers C., Boggon T. J., Ma P. C., Costa C., Taron M., Rosell R., Halmos B. und Bivona T. G. (2012). Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.*, 44(8), 852–860.

8 Thesen

1. Die AXL-Proteinmenge wird durch BMS in Gas6 exprimierenden Zellen erhöht.
2. BMS verändert innerhalb von 24 h nicht die Transkription des AXL-Gens.
3. Die Stabilität der AXL-mRNA wird durch BMS nicht verändert.
4. α -Sekretasen sind kein Ziel von BMS.
5. BMS verhindert die Internalisierung und den Abbau von AXL nach Gas6-Bindung.
6. Ubiquitinierung von AXL findet mit BMS vermindert statt.
7. AXL-Überexpression hat einen Einfluss auf die Morphologie von HEK293-Zellen.

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Markus Lauter, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Ursache der Anreicherung des AXL-Proteins durch den AXL-Inhibitor BMS-777607“ selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Zitate habe ich entsprechend kenntlich gemacht.

Friedrichshafen, den 3. März 2022

Markus Lauter

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe und dass es keinen laufenden Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung gibt.

Friedrichshafen, den 3. März 2022

Markus Lauter

11 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Guido Posern, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Institut diese Studie durchzuführen und zu promovieren.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner zweiten Betreuerin Frau Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann für Ihre Unterstützung.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Robert Torka, meinem Gruppenleiter, für die strukturierte Einarbeitung, die Überlassung des Themas sowie seiner Hilfe bei aufkommenden Schwierigkeiten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den im Institut tätigen Mitarbeitern, die stets ein offenes Ohr für Probleme und Bedürfnisse hatten.

Auch danken möchte ich Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Erlaubnis der Nutzung der FPLC-Anlage und weiterer Gerätschaften ihres Instituts.

Meiner Familie sowie meiner Freundin möchte ich für die Geduld und den anhaltenden Beistand danken.

Unterstützt wurde diese Dissertation durch das Hallesche Promotionskolleg Medizin (HaPKoM).