

„Untersuchungen zur Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne
des Pro-Epidermalen Wachstumsfaktors in humanen
Schilddrüsenneoplasien“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Janette Pyka

geb. am 21.01.1978 in Dessau

Gutachter /in

1. Univ.-Prof. Dr. H.-J. Ferenz
2. Prof. Dr. J. Köhrle
3. Prof. Dr. T. Klonisch

Halle (Saale), 30.06.08

urn:nbn:de:gbv:3-000014707

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014707>]

Für Magda

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | EGF – der erste entdeckte Wachstumsfaktor | 1 |
| 1.1.1 | Die Familie der EGF-artigen Wachstumsfaktoren | 1 |
| 1.1.2 | Molekulare Struktur des EGF | 2 |
| 1.1.3 | Prozessierung des EGF und der EGF-artigen Wachstumsfaktoren | 3 |
| 1.1.4 | Die Familie der ErbB-Rezeptoren und EGF-vermittelte Signaltransduktion | 4 |
| 1.2 | Funktionen der EGF/ErbB-Familie | 6 |
| 1.2.1 | Die EGF/ErbB-Familie in Prozessen der Tumorigenese | 6 |
| 1.2.1.1 | Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Brust | 7 |
| 1.2.1.2 | Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Lunge | 7 |
| 1.2.1.3 | Die EGF/ErbB-Familie in ovariellen Karzinomen | 8 |
| 1.2.1.4 | Die EGF/ErbB-Familie in gastrointestinalen Karzinomen | 9 |
| 1.2.1.5 | Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Niere und der Harnwege | 9 |
| 1.2.1.6 | Die ErbB-Rezeptoren als Ziele in der Tumorthherapie | 10 |
| 1.3 | Die humane Schilddrüse | 10 |
| 1.3.1 | Anatomie und Physiologie der humanen Schilddrüse | 10 |
| 1.3.2 | Epitheliale Tumoren der Schilddrüse | 12 |
| 1.3.3 | EGF und EGFR in der humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomen | 13 |
| 1.4 | Die Proformen der EGF-artigen Wachstumsfaktoren | 15 |
| 1.5 | Zielstellung der vorliegenden Arbeit | 18 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Herkunft der Gewebe und Zelllinien | 19 |
| 2.1.1 | Die pTNM-Klassifikation | 19 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 20 |
| 2.2.1 | Isolation der total-RNA aus Geweben | 20 |
| 2.2.2 | Isolation der total-RNA aus Zelllinien | 20 |
| 2.2.3 | cDNA-Synthese (Reverse Transkription, RTr) | 21 |
| 2.2.4 | Polymerase Chain Reaktion (PCR) | 21 |
| 2.2.4.1 | PCR zur Klonierung von proEGF-Sequenzen | 22 |
| 2.2.4.2 | Semiquantitative RTr-PCR | 22 |
| 2.2.4.3 | Quantitative RTr-PCR (Q-PCR) | 23 |
| 2.2.5 | In-situ-Hybridisierung | 26 |
| 2.2.5.1 | Herstellung der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde (DIG-cRNA) | 26 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2.5.2 | Hybridisierung | 26 |
| 2.2.6 | LMP-Aufreinigung | 27 |
| 2.2.7 | Agarose-Gel-Elektrophorese | 28 |
| 2.2.7.1 | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) zur Auftrennung von DNA-Fragmenten | 28 |
| 2.2.8 | Ligation | 29 |
| 2.2.9 | Transformation | 29 |
| 2.2.10 | Plasmid-Präparation | 30 |
| 2.2.10.1 | Isolation der Plasmide mittels Mikro-Plasmid-Präparation | 30 |
| 2.2.10.2 | Isolation der Plasmide mittels Midi-Plasmid-Präparation | 30 |
| 2.2.11 | Restriktionsverdau | 31 |
| 2.2.12 | Sequenzierung | 31 |
| 2.3 | Zellkultur | 32 |
| 2.3.1 | Medien | 32 |
| 2.3.2 | Auftauen von Zellen | 32 |
| 2.3.3 | Kulturbedingungen | 32 |
| 2.3.4 | Passagieren | 33 |
| 2.3.5 | Einfrieren von Zellen | 33 |
| 2.3.6 | Transfektion | 33 |
| 2.3.6.1 | Metafectene™ Transfektion Reagent | 33 |
| 2.3.6.2 | Transfektion und Selektion | 33 |
| 2.3.7 | Inkubation mit Reagenzien | 34 |
| 2.4 | Proteinchemische Methoden | 34 |
| 2.4.1 | Protein-Präparation | 34 |
| 2.4.1.1 | Protein-Isolation aus Gesamtzelllysaten | 34 |
| 2.4.1.2 | Protein-Isolation aus cytosolischer und nukleärer Zellfraktion | 35 |
| 2.4.1.3 | Bestimmung der Protein-Konzentration durch die Bradford-Methode | 35 |
| 2.4.2 | SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) | 35 |
| 2.4.2.1 | Coomassie-Färbung | 36 |
| 2.4.3 | Western-Blotting | 37 |
| 2.4.3.1 | Blotting | 37 |
| 2.4.3.2 | Ponceau-Färbung | 38 |
| 2.4.3.3 | Antikörper-Nachweis | 38 |
| 2.4.3.3.1 | Verwendete Antikörper | 38 |
| 2.4.3.3.2 | Antikörper-Nachweis | 40 |
| 2.4.4 | Ablösen gebundener Antikörper von der Membran | 40 |
| 2.4.5 | Immunhistochemie | 40 |
| 2.4.6 | Immunfluoreszenzcytochemie | 41 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.7 | Immunopräzipitation | 42 |
| 2.5 | Funktionelle Assays | 43 |
| 2.5.1 | Proliferationstest mittels BrdU-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) und Zellzählung | 43 |
| 2.5.2 | Motilitätsassay | 44 |
| 2.5.3 | Migrationsassay | 44 |
| 2.5.4 | Invasionsassay / Soft-Agar-Test | 44 |
| 2.5.5 | Apoptose-Assay / TUNEL | 46 |
| 3 | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | proEGF in der humanen Schilddrüse | 47 |
| 3.1.1 | Expression des proEGF in der humanen Schilddrüse | 47 |
| 3.1.2 | Nachweis der cytoplasmatischen proEGF- <i>Spliceform</i> | 49 |
| 3.1.2.1 | Nachweis mittels RTr-PCR und Sequenzierung | 49 |
| 3.1.2.2 | Verteilungsmuster von proEGF und proEGFdel23 in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien und Schilddrüsengeweben | 51 |
| 3.2 | Herstellung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 | 55 |
| 3.2.1 | Klonierung von proEGFcyt-Konstrukten | 55 |
| 3.2.1.1 | Schema der Konstrukte | 55 |
| 3.2.1.2 | Herstellung der PCR-Fragmente | 56 |
| 3.2.2 | Selektion und Nachweis positiver Transfektanten mittels Western-Blot | 56 |
| 3.3 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Proliferations- und Motilitätsverhalten von FTC-133 | 57 |
| 3.3.1 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Proliferation | 57 |
| 3.3.2 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Motilität von FTC-133 | 58 |
| 3.3.3 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Wachstum von FTC-133 in 3D-Matrices (Koloniebildung) | 59 |
| 3.3.4 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Migration von FTC-133 | 61 |
| 3.3.5 | Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Apoptose-Neigung | 62 |
| 3.4 | Untersuchung potentieller Mechanismen der proEGFcyt-Funktionen | 64 |
| 3.4.1 | Lokalisation des proEGFcyt | 64 |
| 3.4.1.1 | Immunhistochemie / Immunfluoreszenz | 64 |
| 3.4.1.2 | Fragmentierung des Zelllysates | 64 |
| 3.4.2 | Einfluss von proEGFcyt auf das Cytoskelett in FTC-133 | 65 |
| 3.4.2.1 | Struktur-Untersuchung des Cytoskeletts: Aktin-, Cytokeratin-, | |

| | |
|--|-----|
| Tubulin-Färbungen | 65 |
| 3.4.2.2 Koimmunopräzipitation: proEGFcyt – Tubulin | 67 |
| 3.4.2.3 Beta-Tubulin-Isotypen | 67 |
| 3.4.2.4 Posttranslationale Tubulin-Modifikationen: Detyrosinierung, Polyglutamylierung, Acetylierung | 68 |
| 3.4.2.4.1 Struktur-Untersuchung posttranslatiionaler Tubulin-Modifikationen | 68 |
| 3.4.2.4.2 Western-Blot-Analyse der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen | 70 |
| 3.4.2.4.3 Nachweis erhöhter mikrotubulärer Stabilität: Inkubationen mit Taxol und Nocodazol | 70 |
| 3.4.2.5 Mikrotubuli-assoziierte Proteine | 73 |
| 3.4.2.6 Tubulin-Deacetylierung: Untersuchung der Histon-Deacetylase 6 | 75 |
| 3.4.3 Einfluss von proEGFcyt auf das vesikuläre System in FTC-133 | 78 |
| 3.4.3.1 Expression und Reifung von Cathepsinen | 78 |
| 3.4.3.2 Charakterisierung des Vesikel-Transportes der lysosomalen Protease Cathepsin L | 80 |
| 3.4.3.2.1 Verteilungsmuster der lysosomalen Protease Cathepsin L | 80 |
| 3.4.3.2.2 Transportvesikel der lysosomalen Protease Cathepsin L | 81 |
| 3.4.3.3 Abhängigkeit der Vesikel-Verteilung von der Mikrotubuli-Stabilität | 89 |
| 4 Diskussion | 92 |
| 4.1 Die Proformen der EGF-Familie besitzen funktionelle Bedeutung | 92 |
| 4.2 Das Modellsystem | 94 |
| 4.2.1 ProEGF im humanen Schilddrüsenkarzinom | 94 |
| 4.2.2 Die cytoplasmatische proEGF-Domäne ist funktional in der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 | 96 |
| 4.2.3 Stabile Transfektion in die humane Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 | 98 |
| 4.3 Potentielle Mechanismen der proEGFcyt-Funktionen | 100 |
| 4.3.1 Die Expression von proEGFcyt induziert eine erhöhte mikrotubuläre Stabilität in FTC-133 | 100 |
| 4.3.2 Potentielle Mechanismen der proEGFcyt-induzierten Motilitäts- und Proliferationshemmung | 105 |
| 4.3.3 Eine gehemmte Sezernierung von proCathepsin L kann zur verminderten Migrationsfähigkeit von FTC-133-proEGFcyt beitragen | 108 |
| 5 Zusammenfassung und Ausblick | 113 |
| Literatur-Verzeichnis | 116 |
| Anhang | |

1 Einleitung

1.1 EGF – der erste entdeckte Wachstumsfaktor

Der epidermale Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor*, EGF) wurde als erster entdeckter Wachstumsfaktor 1962 von Dr. Stanley Cohen aus der Speicheldrüse der Maus isoliert (Cohen et al. 1962). Cohen konnte zeigen, dass eine tägliche subkutane Injektion dieses teilaufgereinigten Speicheldrüsensekretes in neugeborenen Mäusen zu vorzeitiger Öffnung der Augenlider sowie auch zu vorzeitigem Zahndurchbruch führte. Für die Entdeckung und Isolierung des EGF erhielt Dr. Stanley Cohen 1968 den Nobelpreis für Medizin. Im Menschen wurde EGF zunächst aufgrund seiner gastrisch anti-sekretorischen Wirkung - es inhibiert Gastrin- und Pepsin-Sekretion und stimuliert gastrointestinale Zellproliferation - 1975 als sogenanntes „Urogastron“ aus Urin isoliert. Ein Sequenzvergleich mit dem Maus-Genom identifizierte das Urogastron als humanes EGF (Gregory 1975a, b). Seinen endgültigen Namen „Epidermaler Wachstumsfaktor“ erlangte das Protein aufgrund seines wachstums- und reifungsfördernden Effektes auf Epithelien in EGF-behandelten Mausgeweben (Carpenter et al. 1986). Mittlerweile ist bekannt, dass EGF die Proliferation und Migration vieler bekannter epithelialer Zelltypen stimuliert (Boonstra et al. 1995).

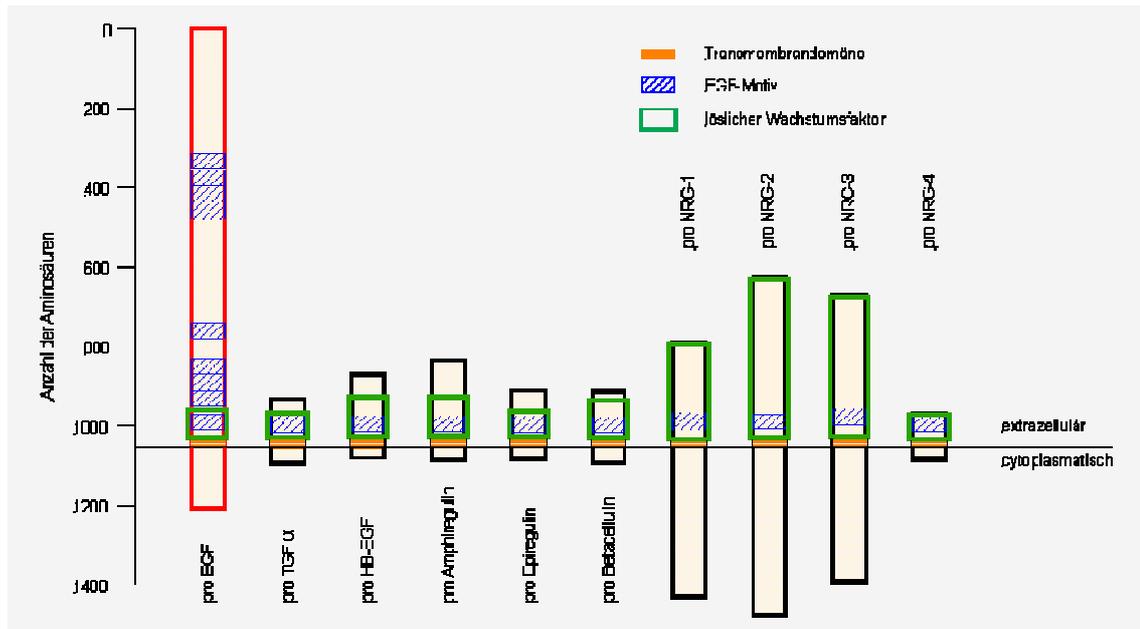
EGF wird von vielen, vorwiegend epithelialen Geweben von Speicheldrüse, Pankreas, Leber, Brust, Lunge, Niere, Haut, Augen, Uterus, Prostata und Schilddrüse exprimiert. EGF wird auch in vielen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Speichel, Urin, Prostata- und Samenflüssigkeit, Schweiß, Tränen, Muttermilch sowie Säfte von Magen, Pankreas und Duodenum sekretiert (Fisher et al. 1990; Rall et al. 1985). Die Expression und Sekretion von EGF unterliegt einer komplexen hormonellen Regulation, wobei Androgene, Östrogene, Glukocortikoide sowie Schilddrüsenhormone eine wichtige Rolle einnehmen (Fisher et al. 1990).

1.1.1 Die Familie der EGF-artigen Wachstumsfaktoren

Der Epidermale Wachstumsfaktor gehört zur Familie der EGF-artigen Liganden, zu welcher neben dem EGF noch der *Transforming Growth Factor alpha* (TGF α), das Heparin-bindende EGF (HB-EGF), Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin sowie die Familie der Neureguline zählen (Massague et al. 1993). Die Mitglieder der EGF-Familie besitzen als gemeinsames EGF-Motiv eine oder mehrere EGF-artige Domänen mit sechs konservierten Cystein-Resten im Molekül (Davis CG 1990; Engel J 1989). Alle EGF-artigen Liganden werden zunächst als membranständige Proformen exprimiert.

Sie bestehen aus einer cytoplasmatischen Domäne, einer hydrophoben Region, welche das Molekül in der Zellmembran verankert sowie einer extrazellulären Domäne. In dieser extrazellulären Domäne befinden sich die Aminosäure-Sequenzen der löslichen Wachstumsfaktoren, welche durch proteolytisches Spalten freigesetzt werden können (Abb. 1.1; Massague et al. 1993).

Abb. 1.1: Struktur der Proformen der EGF-artigen Wachstumsfaktoren.



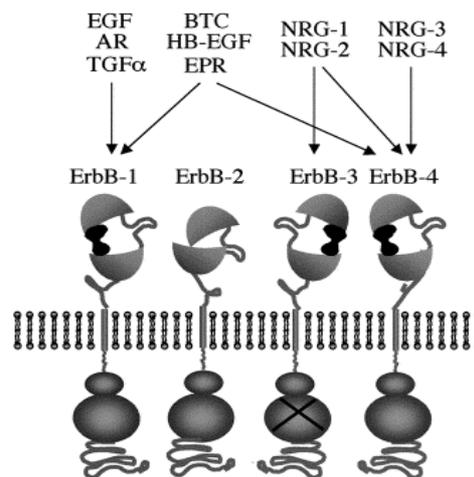
1.1.2 Molekulare Struktur des EGF

Das humane Gen des EGF ist auf Chromosom 4 lokalisiert und besteht aus einem Komplex von 24 Exonen, welche durch große nicht-kodierende Intron-Bereiche getrennt sind (Boonstra et al. 1995). Aus dem initialen Transkriptionsprodukt von 110 kb wird nach RNA-Prozessierung eine 4,871 kb große mRNA mit einem offenen Leseraster von 3,621 kb aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert, wo diese wiederum zu dem 1207 Aminosäuren (AS) umfassenden Glykoprotein preproEGF translatiert wird. Die 22 N-terminalen AS des preproEGF repräsentieren das Signalpeptid, welches nach Inserieren des preproEGF in die Zellmembran abgespalten wird. Das zurück bleibende proEGF ist durch eine zweite hydrophobe Region der AS 1.033 – 1.057 in der Zellmembran verankert. Die 150 C-terminalen AS bilden die cytoplasmatische Domäne. Die 1032 AS große extrazelluläre Domäne enthält insgesamt neun, in zwei Blöcken angeordnete Cystein-reiche EGF-Motive, wovon aber nur das neunte, der Zellmembran am nächsten stehende EGF-Motiv den löslichen Wachstumsfaktor EGF (53 AS) darstellt. Die Bedeutung der anderen acht EGF-Motive ist unbekannt (Abb. 1.2; Bell et al. 1986; Boonstra et al. 1995).

1.1.4 Die Familie der ErbB-Rezeptoren und EGF-vermittelte Signaltransduktion

Die EGF-artigen Wachstumsfaktoren vermitteln Signaltransduktionskaskaden durch die vier Rezeptoren der ErbB-Familie. Diese umfassen den EGF-Rezeptor (EGFR, ErbB1, HER1), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) sowie ErbB4 (HER4). Dabei weisen die EGF-artigen Liganden eine unterschiedliche ErbB-Rezeptor-Spezifität auf. EGF bindet an den EGFR, ebenso wie TGF α und Amphiregulin, nicht aber an ErbB2, ErbB3 oder ErbB4. HB-EGF und Betacellulin können sowohl den EGFR als auch ErbB4 aktivieren. Epiregulin bindet sowohl den EGFR als auch alle ErbB4-Homo- und Heterodimere. Die Neureguline Nrg1 und Nrg2 aktivieren sowohl ErbB3 als auch ErbB4, während für Nrg3 und Nrg4 ausschließlich ErbB4 als fungierender Rezeptor bekannt ist (Abb. 1.3; Marmor et al. 2004).

Abb. 1.3: Die ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden (Marmor et al. 2004).

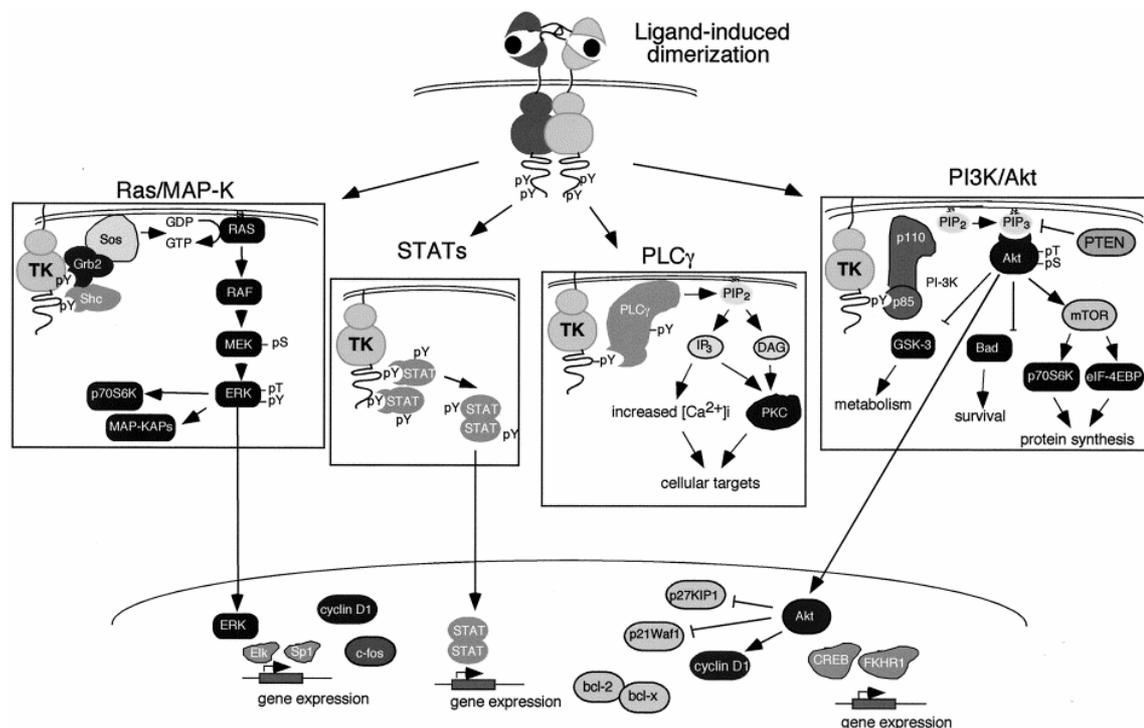


Die ErbB-Rezeptoren zählen zu den Typ-I-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Es sind einkettige allosterische Zell-Oberflächen-Moleküle, die mittels einer transmembranösen helikalen Domäne in der Zellmembran verankert sind. Ihre generelle Struktur umfasst eine stark glykosilierte extrazelluläre Domäne, welche für die Erkennung und Bindung der Liganden verantwortlich ist. Die transmembranöse Domäne verankert den Rezeptor in der Zellmembran, während der cytoplasmatische Anteil die Tyrosin-Kinase-Domäne enthält. Essentiell für die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren nach Liganden-Bindung ist ihre Dimerisierung. Es können sowohl Homo- als auch Heterodimere, d.h. Komplexe zwischen gleichen und verschiedenen ErbB-Rezeptoren gebildet werden. Insgesamt ist die Bildung von neun verschiedenen Homo- und Heterodimeren durch die ErbB-Rezeptoren bekannt. Der EGFR bildet bevorzugt Homodimere sowie Heterodimere mit ErbB2 oder ErbB3, kaum mit ErbB4 (Schlessinger 2002).

Nach Anbindung des EGF an die extrazelluläre Domäne des EGFR und anschließender Rezeptor-Dimerisierung erfolgt die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase sowie Tyrosin-Autophosphorylierung auf der intrazellulären EGFR-Domäne. Diese phosphorylierten Tyrosin-Reste repräsentieren spezifische Bindestellen für cytoplasmatische Zielproteine, welche ihrerseits an der Signalweiterleitung beteiligt sind (Boonstra et al. 1995). Mit dem EGFR interagierende bekannte Proteine sind die Phospholipase C- γ , das die *Ras*-GTPase aktivierende Enzym *rasGAP*, die *syp/SHPTP2*-Phosphotyrosinphosphatase sowie nicht-enzymatische Adaptoren wie die *p85*-Untereinheit der PI-3-Kinase, SHC, *GRB-2* und *Nck*. Folglich sind wichtige, durch EGFR-Homo- und Heterodimere aktivierte Signalwege die der Phospholipase C- γ und deren nachgeordnete Ca^{2+} - und Proteinkinase C-vermittelten Kaskaden, die Signalwege der *small GTPasen* wie der *Ras-Raf-MEK1/2-MAPK*-Weg, *rho* und *rac*, *multiple STAT*, die PI3-Kinase, die Phospholipase D oder *src* (Abb. 1.4; Singh et al. 2005; Marmor et al. 2004).

Die Diversifikation der ErbB-vermittelten Signalübertragung wird zudem durch deren Fähigkeit zur Rezeptor-Transaktivierung erweitert. So wurde eine Inter-Rezeptor-Kommunikation des EGFR mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), vermittelt durch *Src*, die PI-3-Kinase, Ca^{2+} / Calmoduline und die *small GTPasen* nachgewiesen. Darüber hinaus aktivieren auch einige Mitglieder der Cytokin-Superfamilie sowie die Zelladhäsionsmoleküle der Integrine die ErbB-Rezeptoren (Prenzel et al. 2000).

Abb. 1.4: Signalvermittlung durch die ErbB-Rezeptoren (Marmor et al. 2004).



Die negative Regulation der ErbB-Rezeptoren erfolgt über verschiedene Faktoren. So spielt zunächst die Verfügbarkeit der Liganden, expressionell wie lokal, eine entscheidende Rolle, ebenso wie mögliche Homo- und Heterodimerisierungspartner der Rezeptoren. Durch die Interaktion mit Phosphatasen können Signaltransduktionskaskaden in ihrer Aktivität moduliert werden. Zudem beenden die Internalisierung und Proteolyse der Liganden-Rezeptor-Komplexe die durch die EGF-artigen Liganden vermittelte ErbB-Aktivierung (Singh et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EGF/ErbB-Familie in ein sehr komplexes Netz von Signaltransduktionswegen eingreift. Neben den EGF-artigen Liganden sowie der Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle können weiterhin noch unphysiologische Bedingungen wie Hyperosmolarität, oxidativer und mechanischer Stress sowie UV- und Gammastrahlung die ErbB-Rezeptoren aktivieren. Bedenkt man außerdem, dass die GPCRs die größte Gruppe von Zell-Oberflächen-Rezeptoren darstellen und zudem weitreichende Funktionen in Bereichen der Neurotransmission, Photo- und Chemo-rezeption, Metabolismus, Wachstum, Differenzierung und Migration besitzen, erkennt man die weitreichende Diversität und Kapazität der EGF/ErbB-Signalvermittlung (Singh et al. 2005).

1.2 Funktionen der EGF/ErbB-Familie

Die biologische Antwort auf die EGF-Liganden-vermittelte ErbB-Aktivierung ist sehr vielseitig und umfasst Prozesse der Proliferation, Motilität und Invasivität, Sekretion, De-/Differenzierung, Mitogenese und Apoptose (Singh et al. 2005). Daraus ergeben sich für die EGF/ErbB-Familie vielfältige biologische Funktionen, insbesondere in Fortpflanzung und Entwicklung, Wundheilung sowie der Tumorigenese.

1.2.1 Die EGF/ErbB-Familie in Prozessen der Tumorigenese

In vielen humanen malignen Tumoren wurden Gen-Amplifikation- und Überexpression, Rearrangements und/oder Mutationen der EGF/ErbB-Familie detektiert (Olayioye et al. 2000; Marmor et al. 2004). Ein häufiges Phänomen in humanen malignen Tumoren ist zudem die Koexpression von ErbB-Rezeptoren und ihren Liganden, wie EGF, TGF α oder Amphiregulin (Normanno et al. 2003). Eine Überexpression und Aktivierung des EGFR konnte in 50% aller untersuchten epithelialen malignen Tumoren festgestellt werden. Die Über- und/oder Koexpression von EGFR, ErbB2 und/oder ErbB3

korrelierte dabei mit einer sehr schlechten Prognose des Krankheitsverlaufes (Prenzel et al. 2001; Earp et al. 2003).

1.2.1.1 Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Brust

In einem Großteil der Mammakarzinome ist eine erhöhte Expression von ErbB2 detektiert worden. Besonders auffallend ist dabei die zum Teil dramatische Überexpression und Aktivierung von ErbB2 in 20-25% dieser Tumoren (Earp et al. 2003). Untersuchungen an transgenen Mäusen und Ratten mit Expression einer aktiven Form von ErbB2 spezifisch im Brust-Epithelgewebe zeigten eine rasche Induktion von fokalen und multifokalen Mammakarzinomen (Bouchard et al. 1989; Lucchini et al. 1992; Guy et al. 1996). Neben ErbB2 konnte in diesen ErbB2-induzierten Brusttumoren auch eine um das 10-20-fache erhöhte Expression von ErbB3 beobachtet werden (Siegel et al. 1999).

Assoziiert mit der Expression von ErbB2 und dem EGFR erfolgt oft die Koexpression mit EGF-artigen Liganden. So wurden hohe Level an ErbB2 mit hoher Expression von TGF α und hohe Level von EGFR mit solchen der Neureguline in Brust-Epithelzellen detektiert (DiGiovanna et al. 1998; Kim et al. 1999). Die Brust-Epithelien-spezifische Expression von TGF α in transgenen Mäusen führte zur Induktion vieler morphologischer Abnormalitäten, wie lobularen und cystischen Hyperplasien. Die Koexpression von ErbB2 und EGFR mit TGF α resultierte in einer starken Beschleunigung der Tumorigenese (Guy et al. 1996; Kim et al. 1999).

ErbB2 gilt als ein prognostischer Marker für Mammakarzinome in der Klinik. Dieser ErbB-Rezeptor könnte als Tumorpromotor fungieren. ErbB2-Heterodimere sind stabiler an der Zelloberfläche als Dimere mit anderen ErbB-Rezeptoren. Sie weisen eine geringere Endocytoserate auf und verbleiben damit länger an der Zelloberfläche. Während EGFR-Heterodimere abgebaut werden, kommen ErbB2-Heterodimere der Wiederverwertung durch die Zelle zu. Außerdem wurde vermutet, dass ErbB2 in Tumoren seine Kinase-Domäne auch unabhängig von gebundenen Liganden aktiviert, wahrscheinlich durch spontane Homodimerformation. Und nicht zuletzt führt die erniedrigte Rate der Liganden-Dissoziation von ErbB2 zu einer längeren und stärkeren Aktivierung der Kinase-Signalvermittlung (Olayioye et al. 2000; Yarden 2001).

1.2.1.2 Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Lunge

Die Überexpression von EGFR ist eines der ersten und häufigsten Abnormalitäten im bronchialen Epithelium von Hoch-Risiko-Rauchern. Der EGFR ist dabei in allen Stadien der Lungenkarzinogenese präsent (Franklin et al. 2002). In 80% maligner

Nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (*Non-small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLCs) wurde eine Überexpression von EGFR und/oder ErbB2 beobachtet (Bunn et al. 2002). Die Gabe von rekombinantem humanen EGF stimulierte die Migration von NSCLCs (Bredin et al. 1999). In 15% aller NSCLCs und anderer solider Lungenkarzinome wurde eine mutierte Form des EGFR mit Liganden-unabhängiger konstitutiver Tyrosin-Kinase-Aktivierung und veränderter subzellulärer Lokalisation des EGFR ermittelt (Sridhar et al. 2003).

In humanen Plattenepithelkarzinomen (*Squamous Cell Carcinoma*, SCCs) der Lunge konnte eine Zunahme der Expression von EGFR, ErbB2 und TGF α mit zunehmender Progression des Tumors beobachtet werden. Auch hier zeigte der EGFR in Patienten mit geringen Überlebensraten eine abweichende, cytoplasmatische Lokalisation. Diese cytoplasmatische Lokalisation konnte dabei nach Gabe von EGF oder TGF α in normalen humanen bronchialen Epithelzellen und SCC-Linien induziert werden (Piyathilake et al. 2002). Präklinische Studien zeigten, dass der Einsatz von Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und monoklonalen Antikörpern gegen den EGFR *in vitro* das Wachstum humaner NSCLC-Linien blockierten. Ebenso verringerten diese Inhibitoren und Antikörper auch das Wachstum humaner NSCLC-Tumoren in Nacktmäusen (Bunn et al. 2002).

1.2.1.3 Die EGF/ErbB-Familie in ovariellen Karzinomen

Die Mehrzahl der ovariellen Karzinome stammt aus dem ovariellen Oberflächen-Epithel (Dunfield et al. 2003). Die EGF/ErbB-Familie nimmt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Follikel und ovariellen Epithelien ein. Eine Disregulation ihrer Funktionen durch Überexpression oder Mutation konnte als Mitverursacher der ovariellen epithelialen Tumorigenese gezeigt werden (Maihle et al. 2002). So hebt die Gabe von EGF den anti-proliferativen Effekt des *Transforming-Growth-Factor beta* (TGF β), einem Regulator der ovariellen Zellproliferation, in ovariellen Tumorzellen auf und führt zu deren unkontrollierter Proliferation (Dunfield et al. 2003). Den Einfluss der EGF-Liganden auf die ovarielle Tumorigenese verdeutlicht weiterhin die Detektion erhöhter Mengen TGF α 's und Amphiregulins in 87% der untersuchten primären und 92% der sekundären ovariellen Karzinome (D'Antonio et al. 2002) sowie eine erhöhte Expression und ein erhöhter Gewebeflüssigkeitsspiegel von HB-EGF im Tumorgewebe. Hierbei wurde die Prozessierung des membrangebundenen proHB-EGF zum löslichen Wachstumsfaktor als ein kritisches Moment in der ovariellen Tumorigenese beschrieben. Untersuchungen an transformierten humanen ovariellen Tumorzelllinien in Nacktmäusen wiesen nach Gabe von exogenem proHB-EGF eine erhöhte

Tumorbildung auf, welche mittels siRNA komplett geblockt wurde (Miyamoto et al. 2004; Tanaka et al. 2005).

1.2.1.4 Die EGF/ErbB-Familie in gastrointestinalen Karzinomen

In 26% der untersuchten Magentumore wurde eine Expression von EGF festgestellt. Dabei korrelierte die EGF-Expression mit dem Grad der Invasion in die Magenwand und der Ausprägung von Lymphknoten-Metastasen. Patienten mit EGF-positiven Tumoren wiesen eine schlechtere Überlebensrate auf als solche ohne EGF-Expression (Tokunaga et al. 1995). Ebenso korrelierte die gleichzeitige Expression von EGF, TGF α und EGFR mit erhöhter Invasivität, fortgeschrittenem Tumorstadium sowie schlechter Prognose für die Patienten (Yasui et al. 2005). Die Expression von ErbB2 korrelierte mit einem höheren Metastasierungsgrad und einer schlechteren Prognose für den Patienten (Tokunaga et al. 1995).

1.2.1.5 Die EGF/ErbB-Familie in Karzinomen der Niere und der Harnwege

In humanen Nierentumoren konnte eine erhöhte Expression von EGFR und EGF bzw. TGF α gezeigt werden. Auch hier korrelierte eine erhöhte EGFR-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie einer schlechteren Prognose für die Patienten. In Tumoren mit fehlender EGFR-Expression konnte keine Invasion in die Blutbahn oder Metastasierung beobachtet werden; die Patienten hatten eine bessere Prognose des Krankheitsverlaufes (Yoshida et al. 1994). Ähnliche Korrelationen konnten auch für die Expression von EGF in Tumoren der Blase gezeigt werden. Blasentumore mit höchster EGF-Expression wiesen auch die höchste Invasivität bzw. den geringsten Grad an Differenzierung auf (Berger et al. 1986). Untersuchungen an humanen renalen Tumorzelllinien zeigten ein um 35% erhöhtes Wachstum nach Gabe von EGF oder TGF α , während die Inhibition mit monoklonalen anti-EGFR-Antikörpern das Wachstum um 29-46% verringerte (Atlas et al. 1992).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EGF/ErbB-Familie weitreichend und komplex in die Tumorigenese vieler Gewebe eingreift. Durch die erhöhte Expression der ErbB-Rezeptoren und/oder der EGF-artigen Liganden schafft sich die Tumorzelle möglicherweise die Fähigkeit, auch ohne erhöhte Mengen exokriner Liganden hohe Proliferations-, Motilitäts- und Wachstumsraten zu erreichen. Durch ihre Funktionen in Invasivität und De-/Differenzierung ist das EGF/ErbB-System in die Metastasierung sowie Angiogenese in das umgebende Gewebe des Tumors involviert. Ihre weitreichende Bedeutung in der Tumorigenese machen das EGF/ErbB-System zu einem geeigneten Ziel in der therapeutischen Bekämpfung von Karzinomen.

1.2.1.6 Die ErbB-Rezeptoren als Ziele in der Tumorthherapie

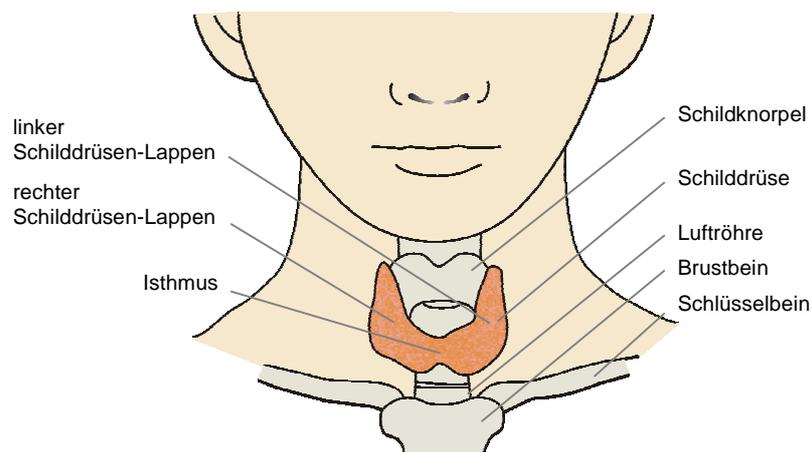
Das EGF/ErbB-System bietet mehrere Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen in Rahmen der Anti-Tumor-Therapie. So kann in die Synthese und Sekretion der Wachstumsfaktoren, die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren oder die Synthese und/oder Aktivierung des Rezeptors und anderer, in die Signalkaskaden involvierter Moleküle eingegriffen werden (Normanno et al. 2003). Derzeit in der Anwendung und klinischen Entwicklung befindliche Agenzien umfassen monoklonale anti-ErbB-Antikörper (z.B. *Trastuzumab*; *Cetuximab*) sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren.

1.3 Die humane Schilddrüse

1.3.1 Anatomie und Physiologie der humanen Schilddrüse

Die humane Schilddrüse ist ein bilobuläres Organ und liegt beiderseits der Luftröhre (Trachea) dicht unterhalb des Kehlkopfes an. Beide Schilddrüsenlappen sind durch einen kleinen Mittellappen, den Schilddrüsenisthmus, miteinander verbunden. Die Schilddrüse hat bei erwachsenen Frauen ein Gewicht von bis zu 18 g, bei Männern bis zu 25 g (Abb. 1.5).

Abb. 1.5: Anatomische Lage der humanen Schilddrüse.



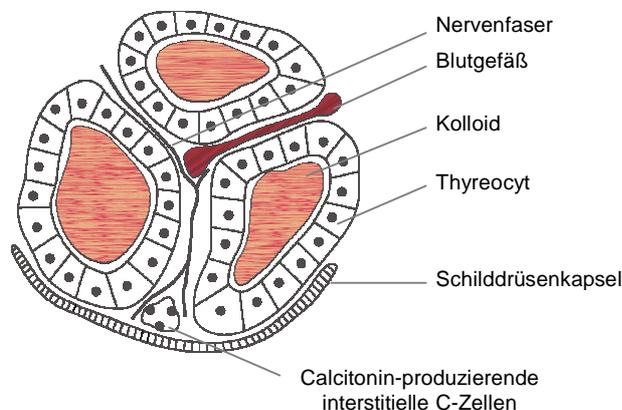
Mikroskopisch sind die einzelnen Schilddrüsenzellen, die Thyreocyten, zu funktionellen Einheiten, den Schilddrüsenfollikeln, zusammengeschlossen. Diese etwa 50-200 µm großen Follikel werden von einschichtig angeordneten Thyreocyten mit meist kubischer Gestalt begrenzt und enthalten im Lumen das Kolloid, welches im Wesentlichen aus Thyreoglobulin besteht. Zwischen den Follikelzellen und Follikeln finden sich die

calcitoninbindenden C-Zellen (Abb. 1.6). Form und Größe der Follikel, Gestalt des Follikelepithels und der Gehalt an Kolloid sind nicht konstant. Je nach Funktionszustand der Schilddrüse ändern sich die Form und das Volumen der Thyreocyten sowie die Zusammensetzung des Follikelinhalts.

Aufgabe der Schilddrüse ist es, den Organismus mit dem Prohormon L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (= Thyroxin = T_4) und dem Hormon L-3,5,3'-Trijodthyronin (T_3) zu versorgen. Ein wesentlicher Bestandteil der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 ist das Spurenelement Jod. Veränderungen der über die Nahrung zugeführten Jodmenge haben aus diesem Grund Einfluss auf die Morphologie und die Funktion der Schilddrüse. Das mit der Nahrung aufgenommene Jod wird als Jodid im Dünndarm resorbiert und aus der Blutbahn gegen ein Konzentrationsgefälle energieabhängig in die Schilddrüse transportiert. Nicht in die Schilddrüse aufgenommenes Jod wird über die Nieren ausgeschieden. Nur ein geringer Anteil des beim Abbau der Schilddrüsenhormone freiwerdenden Jods wird über den Stuhl ausgeschieden.

Das aufgenommene Jodid wird sofort zur apikalen Zellmembran befördert, oxidiert und als organische Jodidverbindungen, insbesondere unter Mitwirkung der Schilddrüsenperoxidase, in die Tyrosylreste des Thyreoglobulin eingebaut. Circa 25% der 140 Tyrosinreste des Thyreoglobulins bauen Jod in Form von Mono- oder Dijodthyronin ein. In weiteren Schritten der Schilddrüsenhormonsynthese werden durch Kopplungs- bzw. Dejodierungsreaktionen die Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 gebildet, welche kovalent an das Thyreoglobulin gebunden sind. Die jodierten Thyreoglobulinmoleküle werden in das Follikellumen sezerniert und dort gespeichert.

Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Schilddrüsenfollikel (nach Pfannenstiel et al. 1999).



Die Schilddrüse gibt entsprechend dem Bedarf des Organismus, reguliert durch das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH), ihre Hormone T₃ und T₄ an die Blutbahn ab. Die Schilddrüsenhormone sind im gesamten Organismus für einen normalen Ablauf verschiedener Entwicklungsprozesse erforderlich und führen in der Regel zu einer Aktivierung von Stoffwechselprozessen. Sie greifen regulierend in Prozesse von Kohlenhydrat-, Fett-, Eiweiß- und Knochenstoffwechsel sowie Reifung von Nervensystem und neuromuskulären Strukturen des Herzens ein (Pfannenstiel et al. 1999, S. 21-33).

1.3.2 Epitheliale Tumoren der Schilddrüse

Die von der Schilddrüse ausgehenden primären Tumoren werden laut WHO-Klassifikation in epitheliale (benigne und maligne Karzinome) und nichtepitheliale Tumoren, maligne Lymphome sowie verschiedene andere Tumoren unterschieden. Die malignen Tumoren gehen entweder vom Follikulepithel (Karzinome) oder den C-Zellen (medulläre Tumoren) aus. Im Folgenden sollen die Schilddrüsenkarzinome, deren Zellen die Forschungsgrundlage der vorliegenden Arbeit darstellten, kurz erläutert werden.

Die Schilddrüsenkarzinome werden definitionsgemäß morphologisch bzw. histologisch in differenzierte, d.h. papilläre und follikuläre, sowie die undifferenzierten (auch: anaplastische) Schilddrüsenkarzinome unterschieden.

Papilläre Schilddrüsenkarzinome (*Papillar Thyroid Carcinoma*; PTC) bilden definitionsgemäß hochdifferenzierte papillär angeordnete Schilddrüsentumorzellen aus. Ihre Metastasierung erfolgt in erster Linie auf lymphogenem Weg. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Schilddrüsenkarzinome, stellen jedoch mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von über 90% die prognostisch günstigsten Tumoren der Schilddrüse dar (Abb. 1.7 A).

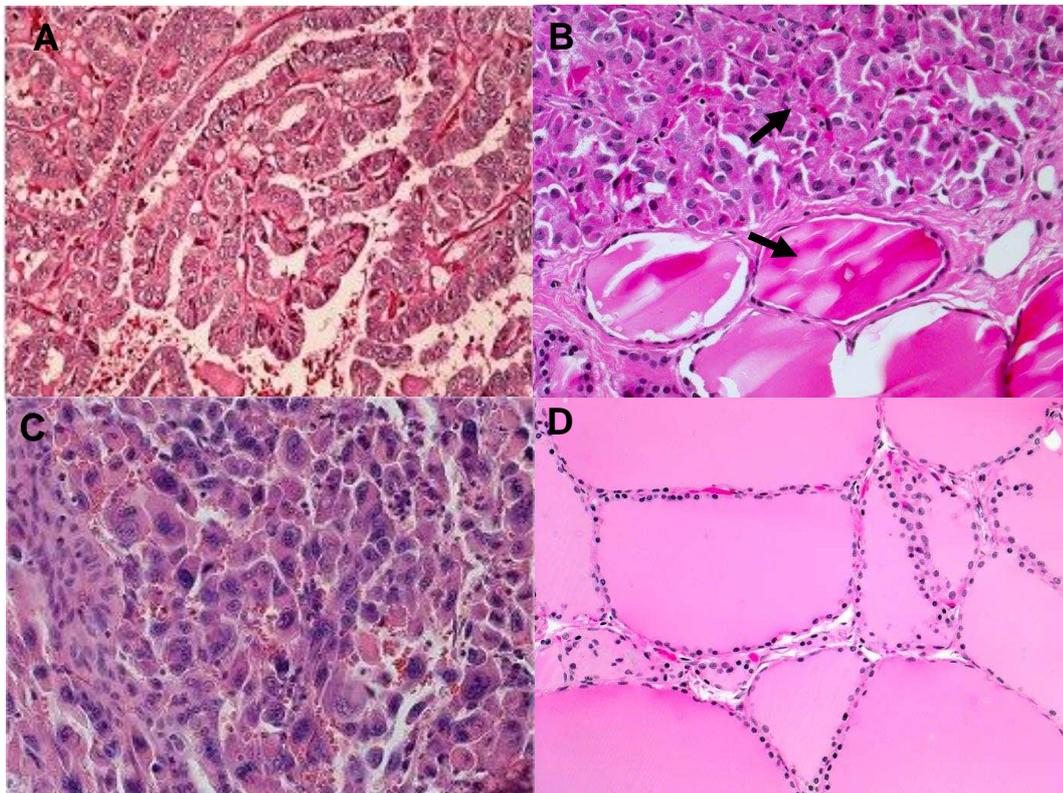
Das ebenfalls hoch differenzierte follikuläre Schilddrüsenkarzinom (*Follikular Thyroid Carcinoma*; FTC) weist einen Gewebeaufbau auf, bei dem die Anordnung der Schilddrüsentumorzellen der einer ausgereiften Schilddrüse weitgehend ähnlich ist. Histologisch findet man je nach Gewebeausreifung ein Tumorgewebe aus unterschiedlich großen kolloidhaltigen Follikeln. Follikuläre Schilddrüsenkarzinome metastasieren in erster Linie hämatogen, dabei neigen sie dazu, Fernmetastasen in Lunge, Skelett und Gehirn zu setzen. Lymphmetastasen sind nur selten. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 80% (Abb. 1.7 B).

Die undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome (*Undifferentiated Thyroid Carcinoma*; UTC) repräsentieren schnell wachsende, die Schilddrüse zerstörende Tumoren mit

einem geringen Differenzierungsgrad. Histologisch sind diese Karzinome aus Spindelzellen, Riesenzellen und kleinen Zellen in wechselnden Proportionen aufgebaut. Sie können aus differenzierten Schilddrüsenkarzinomen hervorgehen und machen ca. 15% aller Schilddrüsenkarzinome aus. Sie metastasieren frühzeitig sowohl lymphogen als auch hämatogen und weisen mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 0,1% eine sehr schlechte Prognose auf (Abb. 1.7 C).

Für die Gewebe-Expressionsstudien wurden in dieser Arbeit die nicht maligne-neoplastischen Strumen der Schilddrüse als Vergleich zu den Schilddrüsenkarzinomgeweben verwendet (Abb. 1.7 D).

Abb. 1.7: Gewebeschnitte eines PTC (A), eines FTC (B, oberer Pfeil), welches an normales Schilddrüsenparenchym angrenzt (B, unterer Pfeil), eines UTC (C) sowie eines normalen Schilddrüsenfollikel­epithels (D).



1.3.3 EGF und EGFR in der humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomen

Der Epidermale Wachstumsfaktor wird sowohl in der normalen als auch in der neoplastischen, d.h. tumorösen humanen Schilddrüse exprimiert und wurde im cytosolischen und nukleären Kompartiment follikulärer Schilddrüsenzellen nachgewiesen (Mizukami et al. 1991; Toda et al. 1999; Marti et al. 2001). EGF ist in

vitro und in vivo eines der potentesten Mitogene für neoplastische und nichtneoplastische Schilddrüsenfollikelzellen (Bergström et al. 2000). So konnte sein wachstums- und proliferationsfördernder Effekt auf kultivierte Schilddrüsenzellen von Hund, Ratte, Schaf, Schwein sowie Mensch gezeigt werden (Roger et al. 1982, 1985; Westermark et al. 1982; Errick et al. 1986; Stracke et al. 1987; Zerek-Melen et al. 1990; Nilsson 1995; Paschke et al. 1995). Der EGFR wurde sowohl in Zellmembranen von normalen als auch neoplastischen Schilddrüsengeweben nachgewiesen (Kasai et al. 1987).

Die EGF-artigen Wachstumsfaktoren zeigen einen signifikanten Einfluss auf die Karzinogenese von Schilddrüsenzellen. So wurde ein wachstums- und invasionsstimulatorischer Effekt von EGF und TGF α auf humane Schilddrüsenkarzinomzelllinien, und zwar durch Anbindung beider Liganden an den EGFR, beobachtet. Durch den Einsatz von Anti-EGFR- bzw. Anti-Tyrosinkinase-Antagonisten konnte dieser Effekt geblockt werden (Hoelting et al. 1994, 1995).

Es wird diskutiert, ob EGF sowohl differenzierendes als auch dedifferenzierendes Potential in Schilddrüsenzellen besitzt. In Kulturen von Schilddrüsenfollikeln auf Kollagen-Matrices konnte eine Beteiligung von EGF an der Formation follikulärer Strukturen beobachtet werden (Westermark et al. 1991). Auf der anderen Seite zeigten zahlreiche Arbeitsgruppen, dass EGF als Dedifferenzierungsfaktor sowohl in normalen als auch neoplastischen Schilddrüsenzellen wirkt (Westermark et al. 1982; Roger et al. 1985; Errick et al. 1986; Miyamoto et al. 1989; Paschke et al. 1995).

In Schilddrüsenkarzinomen wird eine Funktion von EGF und TGF α in der Metastasierung diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass differenzierte Schilddrüsenkarzinome mehr EGF binden als die normalen, nicht-neoplastischen Gewebe der Schilddrüse. Der größte stimulatorische Effekt von EGF auf Wachstum, Proliferation und Invasivität wurde dabei in direkt von der Schilddrüse ausgehenden humanen Tumorzelllinien beobachtet, während dieser Effekt in den Zelllinien von Subklonen aus Metastasen geringer war (Hoelting et al. 1994a, 1994b). In follikulären Schilddrüsentumoren wie auch in Knochenmetastasen von FTC konnte eine Assoziation von erhöhter EGFR-Expression mit erhöhter Vaskularität dieser Tumoren gezeigt werden (Younes et al. 2005). In der Mehrzahl der humanen Schilddrüsentumoren werden TGF α und der EGFR exprimiert, dabei ist ein Trend zu höherer Expression beider in maligneren Neoplasien zu beobachten (Lemoine et al. 1991). Zudem zeigten immunhistochemische Untersuchungen, dass Schilddrüsenkarzinome mit Koexpression der Systeme EGF/EGFR, TGF α /EGFR bzw. EGF/TGF α /EGFR ein aggressiveres pathologisches Krankheitsbild mit schlechter Prognose für die Patienten vorweisen (Gorgoulis et al. 1992).

Neben den Funktionen in Prozessen von Wachstum und Tumorigenese der Schilddrüse besitzt EGF auch einen Einfluss auf die Jodaufnahme sowie die Produktion und Sekretion der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 (Corcoran et al. 1986; Hishinuma et al. 1992; Kasai et al. 1992).

1.4 Die Proformen der EGF-artigen Wachstumsfaktoren

Die größte Aufmerksamkeit in der Erforschung der EGF-Familie galt bisher den löslichen Wachstumsfaktoren. Die EGF-artigen Wachstumsfaktoren werden jedoch zunächst als membranständige Proformen exprimiert. Diese verfügen über eine Drei-Domänen-Struktur, in welcher die löslichen Wachstumsfaktoren der extrazellulären Domäne aber nur einen verhältnismäßig kleinen Teil des Prohormons einnehmen (Abb. 1.1). Der lösliche Wachstumsfaktor EGF umfasst nur 53 der insgesamt 1207 Aminosäuren des proEGF. Die gesamte extrazelluläre Domäne des proEGF verfügt über 1032, die cytoplasmatische proEGF-Domäne über 150 Aminosäuren (Abb. 1.2; Bell et al. 1986). Somit stellt sich die Frage, ob und welche Funktionen die verbleibenden Peptidanteile erfüllen.

Erste Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung der Proformen der EGF-artigen Wachstumsfaktoren lieferte die Tatsache, dass in den distalen Tubuli der Niere sowie in Keratinocyten die membrangebundenen Proformen von EGF bzw. TGF α , nicht aber deren lösliche Wachstumsfaktoren vorherrschen (Rall et al. 1985; Salido et al. 1989; Shi et al. 2000). Der Nachweis von nicht membrangebundenem proHB-EGF im Cytoplasma humaner Blasenepithelzellen sowie im Zellkern von *Transitional Cell Carcinomas* (TCCs) der Blase (Adam et al. 2003) zeigt zudem, dass proHB-EGF nicht ausschließlich als membranständige Form des löslichen HB-EGF vorkommt. Ebenso konnte proTGF α in Hepatocyten-Zellkernen von Mensch, Ratte und Maus lokalisiert werden. Nach Applikation mit hepatotoxischen Chemikalien bzw. nach partieller Entnahme der Leber wurde dabei eine dramatische Erhöhung von proTGF α im Kern beobachtet, was eine kernständige Funktion von proTGF α in der Regeneration von Lebergewebe vermuten lässt (Grasl-Kraupp et al. 2002).

Die membrangebundenen Proformen weisen spezifische Funktionen auf, welche sie von deren löslichen Wachstumsfaktoren unterscheidet. Nur im membrangebundenen, nicht aber im prozessierten Zustand interagiert proHB-EGF mit CD9 (*cluster of differentiation-9*) und hemmt gleichzeitig seine Proteolyse zum löslichen Liganden (Shi et al. 2000; Singh et al. 2005). Ebenso fördert membrangebundenes proHB-EGF

benachbarte Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Interaktionen und erniedrigt somit – im Gegensatz zu prozessiertem HB-EGF – die zelluläre Migration (Takemura et al. 2002; Singh et al. 2004). In multipotenten Zellen dorsaler Wurzelganglien induziert nur proNeuregulin-I Typ III die Differenzierung angrenzender Zellen zu Schwannzellen, während der lösliche Wachstumsfaktor dazu nicht in der Lage ist (Leimeroth et al. 2002).

Ebenso können auch die ErbB-Rezeptoren nicht nur durch die löslichen Liganden auf auto- und parakrinem Weg, sondern auch durch die membrangebundenen Wachstumsfaktoren juxtakrin aktiviert werden (Miyoshi et al. 1997; Singh et al. 2005). Der Begriff „juxtakrin“ wurde dabei 1990 erstmalig von P. Anklesaria geprägt. Die Autoren konnten zeigen, dass proTGF α auf der Oberfläche von Maus-Nierenmarkstromalzellen mit dem EGFR auf angrenzenden hämapoetischen Progenitorzellen interagiert und zur EGFR-Aktivierung führte (Anklesaria et al. 1990). In kultivierten Hepatocyten wurde die Komplexbildung von überexprimiertem membranständigen proHB-EGF mit dem EGFR gezeigt (Miyoshi et al. 1997).

Strukturell besitzt proEGF Ähnlichkeit mit dem EGFR. Zudem weist seine extrazelluläre Domäne eine enge Homologie zum *Light Density* Lipoprotein- (LDL) Rezeptor auf (Russell et al. 1984; Pfeffer et al. 1985). Dies hat zur Vermutung geführt, dass proEGF nicht nur als Ligand, sondern auch als Rezeptor fungieren könnte (Rall et al. 1985; Cartlidge et al. 1989). Im Falle des proHB-EGF konnte diese Vermutung bestätigt werden. Membranständiges proHB-EGF wurde als Rezeptor des Diphterietoxins identifiziert, es vermittelt den Transport dieses Toxins nach intrazellulär (Naglich et al. 1992).

Neben einer Rezeptorfunktion können die membranständigen Proformen der EGF-Familie auch an Signaltransduktionsprozessen durch die Zellmembran und damit zwischen einzelnen Zellen beteiligt sein. In einer Studie von L. Shum wurden zwei Moleküle von 86 kDa und 106 kDa identifiziert, die mit der cytoplasmatischen Domäne des proTGF α koimmunopräzipitierten. Hierbei zeigte letzteres Protein Kinase-Aktivität (Shum 1996). Wenig später wurde die LIM-Kinase (LIMK1) als Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domänen der proNeureguline I-III identifiziert (Wang et al. 1998). Neueste Arbeiten wiesen die *Membran-assoziierte Guanylatkinase invertet-3* (MAGI-3) in verschiedenen humanen Hirnzellen in Kollokalisation mit proTGF α nach (Franklin et al. 2005).

Genauere Struktur-Funktions-Untersuchungen beschäftigten sich mit der Bedeutung der einzelnen Domänen der membranständigen Wachstumsfaktor-Proformen. Die hydrophobe Region der Proformen lokalisiert das Molekül in der Plasmamembran.

Damit präsentiert sie den Wachstumsfaktor für seine proteolytische Freisetzung durch Matrixmetalloproteasen auf der Zelloberfläche (Borrell-Pages et al. 2003; Le Gall et al. 2003; Gschwind et al. 2003; Hinkle et al. 2004). Die Sequenz der Transmembrandomäne scheint aber gleichzeitig auch die Prozessierungsrate zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der proEGF-Transmembrandomäne gegen die transmembranöse Domäne von proHB-EGF zu einer erhöhten Internalisierung des proEGF von der Zellmembran sowie zu einer verminderten proteolytischen Freisetzung des löslichen EGF führte (Dong et al. 2000). Zudem sind in den transmembranösen wie auch cytoplasmatischen Domänen von proTGF α und proAmphiregulin wichtige basolaterale Sortierinformationen kodiert (Urena et al. 1999; Brown et al. 2001). Da wiederum die Aktivität des EGF-Rezeptors juxtakrin von der Lokalisation des membrangebundenen Wachstumsfaktors bzw. para- und autokrin von der Menge freigesetzten löslichen Ligands abhängig ist, lässt dies vermuten, dass die transmembranöse und auch cytoplasmatische Domäne der Wachstumsfaktor-Proformen wichtige Rollen in der EGFR-Regulation einnehmen (Wiley et al. 1998; Dempsey et al. 2003).

Bisher ging man davon aus, dass die Prozessierung der membranständigen Proformen nur der Freisetzung der löslichen Wachstumsfaktoren dient, was ihre Funktion als Ankermolekül der löslichen Liganden unterstrich. In den letzten beiden Jahren jedoch gelang es D. Nanba und seinem Team, in humanen Fibrosarkomazellen und in primären Keratinocyten *in vivo* die Prozessierung der C-terminalen Domäne des proHB-EGF nachzuweisen. Die entstandene C-terminale proHB-EGF-Domäne translokalisierte in den Zellkern. Daraufhin wurde ein Transport des Negativ-Regulators und transkriptionellen Repressors des Zellzyklus` PLZF (*Promyelocytic Zink Finger*) aus dem Zellkern beobachtet, was wiederum einen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus beschleunigte. PLZF wurde mittels der *Yeast-Two-Hybrid*-Methode als Interaktionspartner des C-terminalen proHB-EGF bestätigt (Nanba et al. 2003, 2004a; Toki et al. 2005). Ebenso konnten J. Bao et al. intrazellulär die Prozessierung der cytoplasmatischen Domäne von proNeuregulin-I nachweisen. Auch das cytoplasmatische proNeuregulin-I translokalisiert in den Kern und unterdrückt dort die Expression von Regulatoren der Apoptose (Bao et al. 2003).

Diese Daten zeigen eindeutig, dass die Proformen der löslichen EGF-artigen Wachstumsfaktoren funktionell sind. Die Bedeutung der Proform des EGF ist dabei noch immer wenig erforscht. Eine Funktion der cytoplasmatischen Domäne des proEGF ist bisher nicht bekannt.

1.5 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne des proEGF (proEGFcyt) nachzuweisen. Dabei sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob und welche Funktion proEGFcyt in humanen Schilddrüsenneoplasien einnimmt.

Durch Etablierung stabiler Transfektanten einer humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie mit Überexpression von proEGFcyt sollte ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung oben genannter Fragestellung geschaffen werden. Dazu sollten mittels Gen- bzw. Proteinnachweis an verschiedenen dedifferenzierten Schilddrüsengeweben Ziel- und Entstehungszellen des (pro-) EGF in der humanen Schilddrüse identifiziert werden.

Die stabilen Transfektanten sollten hinsichtlich ihres Proliferations- und Apoptoseverhaltens sowie ihrer Motilitäts- und Migrationsfähigkeit untersucht werden. Durch phänotypische Charakterisierung der stabilen Transfektanten bzw. deren Charakterisierung hinsichtlich differentieller Gen- und Proteinexpression sollten dabei Ansatzpunkte zum mechanistischen Verständnis potentieller proEGFcyt-Funktionen in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen aufgedeckt werden.

Darüber hinaus sollten mittels Klonierung und stabiler Transfektion definierter proEGFcyt-Sequenzen potentiell interaktive Domänen auf dem proEGFcyt-Molekül eingegrenzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Gewebe und Zelllinien

Die Gewebeproben (Struma Nodosa: 46; Schilddrüsen-Karzinome: 40 papilläre, 22 follikuläre und 14 undifferenzierte) stammten von Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, welche aus klinischen Gründen Operationen unterlagen. Diese Studie wurde vom Ethischen Komitee der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Medizinische Fakultät, genehmigt. Die Genehmigung der informierten Patienten lag vor der Gewebe-Entnahme vor. Die Gewebe wurden entweder kryokonserviert oder Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133, FTC-236 und FTC-238 wurden von P. Goretzki (Düsseldorf), 8305C, 8305C und B-CPAP von der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) sowie C-643 und Hth74 von N.E. Heldin (Uppsala University, Uppsala, Schweden) bezogen.

2.1.1 Die pTNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation von Tumoren ist ein weltweit anerkanntes und verwendetes System zur Beschreibung und Einteilung des Stadiums von Krebserkrankungen. Sie wurde von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) eingeführt. In der pTNM-Klassifikation (= pathologische TNM-Klassifikation, postoperative histopathologische TNM-Klassifikation) erfolgt die Einstufung des Tumors nach einem chirurgischen Eingriff aus histopathologischen Untersuchungen. „T“ (*Tumor*) bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors, welche mit den Zahlen 0 bis 4 beschrieben wird. Die Bezeichnung „T0“ bedeutet, dass kein Anzeichen auf den Primärtumor vorliegt (z.B. wenn der Primärtumor vor der Operation mit Chemotherapie behandelt wurde) oder der primäre Tumor unbekannt ist. Ein Primärtumor der Schilddrüse im Stadium „T1“ hat eine maximale Ausdehnung von 1 cm, im Stadium „T2“ eine Ausdehnung von >1 cm bis <4 cm und im Stadium „T3“ eine Ausdehnung von >4 cm. Primäre Schilddrüsentumore im Stadium „T1“-„T3“ sind auf die Schilddrüse begrenzt. Ein primärer Schilddrüsentumor im Stadium „T4“ bezeichnet einen Tumor jeder Größe mit Ausdehnung über die Schilddrüse hinaus. „N“ (*Nodus*) beschreibt das Fehlen („N0“) oder Vorhandensein („N1“-„N3“, mit zunehmendem Lymphknotenbefall) von regionären Lymphknotenmetastasen. Die Bezeichnung „Nx“ erfolgt, wenn keine

Beurteilung des Lymphknotenbefalls möglich ist (z.B. wenn die Anzahl der untersuchten Lymphknoten für eine ausreichend gesicherte Aussage nicht genügt). „M“ (*Metastasen*) bezeichnet das Fehlen („M0“) oder Vorhandensein („M1“) von Fernmetastasen; bei der Einstufung „Mx“ ist keine Aussage über Fernmetastasen möglich.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation der total-RNA aus Geweben

Gesamt-RNA aus Geweben wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987) unter Verwendung von Trizol-Reagenz (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers gewonnen. In Flüssigstickstoff gemörsertes Gewebe wurde nach Zugabe von 1 ml Trizol mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform wurde für 3 min bei RT inkubiert und zur Trennung der wässrigen von der phenolischen Phase für 15 min bei 13.000 upm und 4°C zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase vorliegende RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert und für 20 min mit 13.000 upm bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol sedimentiert, bei RT getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Mögliche Kontamination der Gesamt-RNA mit genomischer DNA wurde durch einen DNase I-Verdau entfernt. Die in DEPC-Wasser vorliegende Gesamt-RNA wurde nach Zugabe von RNase-Inhibitor, NaOAc, MgSO₄ sowie 1U DNase I je µg RNA für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzymreaktion erfolgte durch Hitzedenaturierung bei 80°C für 15 min. Die RNA wurde mit 96%igem Ethanol und 3 M NaOAc präzipitiert, nach Sedimentation mit 70%igem Ethanol gewaschen und abschließend in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.2.2 Isolation der total-RNA aus Zelllinien

Total-RNA wurde von den humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien sowie deren Transfektanten gewonnen, indem die Zellen aus 50 ml-Kulturflaschen mit 1 ml Trizol-Reagenz (Life Technologies) lysiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, für 4 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (10.000 upm, 15 min, 4°C) wurden. Der klare Überstand wurde in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und dazu ein gleiches Volumen Isopropanol (-20°C) gegeben. Es wurde für 20 min bei -20°C inkubiert, zentrifugiert (10.000 upm, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml

75% Ethanol (-20°C) gewaschen, zentrifugiert (10.000 upm, 5 min, 4°C), vakuumgetrocknet und in 30 μl DEPC-Wasser gelöst.

Die Konzentration an total-RNA wurde spektrometrisch aus einer 1:100 Verdünnung der isolierten RNA in DEPC-Wasser bei OD_{260} und OD_{280} gegen DEPC-Wasser als Leerwert bestimmt. Aus dem Quotienten $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ wurde die Reinheit der RNA-Präparation bestimmt. Das Produkt aus $\text{OD}_{260} \times 40 \times 100$ (= Verdünnungsfaktor) ergab die Konzentration an RNA in $\mu\text{g/ml}$.

2.2.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription, RTr)

Die unter 2.2.1 bzw. 2.2.2 isolierte RNA wurde in kodierende DNA (cDNA) umgeschrieben (Reverse Transkription, RTr). Folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 12 μl wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 2-3 min auf Eiswasser gestellt:

2,0 μg RNA (entsprechendes Volumen wurde zuvor berechnet)
1,0 μl Oligo-dT (Gibco)
X μl DEPC-Wasser

Darauf folgte eine Inkubation (1 h, 37°C) mit folgenden Reagenzien sowie eine anschließende Verdünnung mit 20 μl DEPC- H_2O :

4,0 μl 5x *First Strand Buffer* (Gibco)
2,0 μl 0,1 M DTT (Gibco)
1,0 μl 12,5 mM dNTP (Fermentas GmbH)
1,0 μl Superskript II (Gibco)

2.2.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Mit dieser Methode ist eine Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente möglich. Dies erfolgte unter Verwendung von Oligonukleotidprimern humaner cDNA-Sequenzen, welche auf der Basis von „NCBI“ bekannter Sequenzen mit Hilfe des Programms *Gene Runner 3.05* konstruiert wurden (Tabelle 2.1).

2.2.4.1 PCR zur Klonierung von proEGF-Sequenzen

Für die Klonierung der gesamten cytoplasmatischen Domäne des proEGF (proEGF_{cyt}) wurde das humane proEGF-Expressionsplasmid phEGF101 (freundlicherweise bereit gestellt von Prof. G. Bell, Universität von Chicago, IL, USA) als Template verwendet, proEGF_{del23} wurde von cDNA der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-238 amplifiziert. Es wurden für die Amplifikation von proEGF_{cyt} und proEGF_{del23} die Primerpaare 5'-GGAATTCACCTCAGAAGCTGCTATCGAAAAACC-3' (*forward*) und 5'-GGCGGCCGCTCACTGAGTCAGCTCCATTTGGTG-3' (*reverse*), sowie für die Amplifikation von proEGF_{22.23} die Primerpaare 5'-GGAATTCACCTCAGAAGCTGCTATCGAAAAACC-3' (*forward*) und 5'-GGCGGCCGCTCACCCATCTGCTGCCTGGCCATC-3' verwendet, welche neben der entsprechenden proEGF-Sequenz noch die Restriktionsstellen *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3') bzw. *NotI* (5'-GC↓GGCCGC-3') enthielten, welche eine spätere Ligation in die verwendeten Plasmidvektoren ermöglichte. Der Ansatz entsprach dem in Abschnitt 2.2.4.2. Der Ansatz wurde mit Mineralöl (Sigma) überschichtet und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler prozessiert:

7 Zyklen liefen unter folgenden Bedingungen:

| | | |
|--|--------|--------|
| Denaturierung der doppelsträngigen DNA | : 95°C | 1 min |
| Hybridisierung mit dem Primer | : 65°C | 1 min |
| Elongation | : 72°C | 2 min, |

gefolgt von weiteren 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen :

| | | |
|--|--------|--------|
| Denaturierung der doppelsträngigen DNA | : 95°C | 1 min |
| Hybridisierung mit dem Primer | : 72°C | 1 min |
| Elongation | : 72°C | 2 min, |

Nach *Low Melting Point*- (LMP-) Aufreinigung (siehe 2.2.6) der PCR-Produkte erfolgte die weitere Aufarbeitung der Plasmide bis zur Sequenzierung (siehe 2.2.8 – 2.2.12).

2.2.4.2 Semiquantitative RTr-PCR

In der semiquantitativen RTr-PCR werden neben den spezifischen cDNA-Fragmenten noch sogenannte *house-keeping*-Gene koamplifiziert. In dieser Arbeit waren dies die Gene für die Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH) sowie die 18s-RNA der 40s-Untereinheit des 80s-Ribosoms (18s). Beide werden konstitutiv in normalen und Schilddrüsenkarzinomzellen sowie Schilddrüsentumorzelllinien exprimiert und können zur Kontrolle und Bestimmung gleicher cDNA-Ausgangskonzentrationen verwendet

werden. Die Auswertung der Genexpression erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate (2.2.7) und anschließender Detektion und Dokumentation unter UV-Licht mit Hilfe des Programmes *Kodac Digital Science 1D Image Analysis Software 3.0.2.* (Eastman Kodac Company).

Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 0,3 µl Taq DNA Polymerase (Gibco)
- 2,5 µl 10x PCR Puffer minus Mg²⁺ (Gibco)
- 1,0 µl 50 mM MgCl₂ (Gibco)
- 0,5 µl 10 mM dNTP (Fermentas GmbH)
- 1,0 µl Forward-Primer (siehe Tab. 2.1)
- 1,0 µl Reverse-Primer (siehe Tab. 2.1)
- 1,0 µl DNA-*template*
- 17,7 µl Reinstwasser

Dieser Ansatz wurde mit Mineralöl (Sigma) überschichtet und je nach verwendetem Primerpaar unter folgenden Bedingungen im Thermocycler prozessiert:

| | | |
|--|------------------------|-------------|
| Denaturierung der doppelsträngigen DNA | : 95°C | 0,5 - 1 min |
| Hybridisierung mit dem Primer | : Temp. siehe Tab. 2.1 | 0,5 - 1 min |
| Elongation | : 72°C | 0,5 - 2 min |

2.2.4.3 Quantitative RTr-PCR (Q-PCR)

Die Anfertigung der Q-PCR erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. A. Kehlen, Fi. Probiodrug AG Halle/Saale.

Mit Hilfe der Q-PCR ist eine exakte Quantifizierung von cDNA möglich. Für alle Q-PCR-Versuche wurde das „RotorGene2000“-System der Firma LTF Labortechnik GmbH & Co. KG verwendet. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR[®] Green*, dessen Fluoreszenz-Intensität in doppelsträngiger DNA deutlich höher liegt als im freien Zustand, kann bei der Q-PCR kontinuierlich die Menge des amplifizierten Produkts ermittelt werden. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils am Ende eines PCR-Zyklus bei einer Temperatur, die unter dem Schmelzpunkt des Produktes liegt. Auf diese Weise wurde erreicht, dass das Produkt, d.h. die amplifizierte DNA, doppelsträngig vorliegt. Somit kann der Farbstoff in das doppelsträngige Produkt interkalieren und dessen Fluoreszenz gemessen werden. Je mehr Matrizen-DNA in der Probe vorliegt, desto weniger PCR-Zyklen werden benötigt, bis das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA größer als der Fluoreszenzhintergrund wird. Dieser Wert wird beim „RotorGene2000“-System als C_t-Wert

(*threshold cycle*) bezeichnet und liegt immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Die relative Quantifizierung der spezifischen mRNA-Expression der generierten stabilen Transfektanten erfolgte nach der komparativen Methode, d.h. im Vergleich zu einer Kontrollprobe. Die hierfür verwendete „RotorGene“-Software (Vers. 6.0) berechnet aus der 2. Ableitung der Rohdaten und der mittleren Amplifikationseffizienz den Startpunkt (*take off point*), der in Analogie zum C_t -Wert den Punkt angibt, an dem das Fluoreszenzsignal größer wird als der Fluoreszenzhintergrund. Als Ergebnis erhält man die Konzentrationen der spezifischen mRNA im Verhältnis zu einer definierten Probe. Ein wichtiges Kriterium für die Aussagekraft dieser Methode ist, dass die Amplifikationseffizienz der einzelnen Proben nicht zu stark von der mittleren Amplifikationseffizienz abweicht.

Zur Kontrolle der PCR wurde nach dem letzten Zyklus eine Schmelzkurve aufgenommen. Dazu wurden die Proben in 0,5°C Schritten von 50°C auf 95°C erhitzt und gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen. Aus der 1. Ableitung der Fluoreszenzintensitäten über der Temperatur wird die Temperatur ermittelt, bei der die in der Probe vorhandenen Amplifikate nicht mehr doppelsträngig vorliegen. Das amplifizierte Produkt sollte in dieser Ableitung als einzelner *Peak* (Anstieg) zu sehen sein. Treten Nebenpeaks auf, die von Primerdimeren verursacht werden, muss die Messtemperatur entsprechend angepasst werden.

Für alle Q-PCR-Versuche wurde der *QuantiTect-Kit* (Qiagen GmbH) verwendet. Dieser enthält eine *HotStart-Taq*-Polymerase, die erst nach 15 min Inkubation bei 95°C aktiviert wird. Auf diesem Weg wird erreicht, dass alle Reaktionen zur gleichen Zeit starten. Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Versuche.

Reaktionsansatz:

| | |
|--|----------|
| 2 x <i>QuantiTect SYBR[®] Green PCR</i> | 12,50 µl |
| <i>Forward-Primer</i> (50 µM) | 0,25 µl |
| <i>Reverse-Primer</i> (50 µM) | 0,25 µl |
| Reinstwasser | ad 25 µl |

Die für die Q-PCR verwendeten Primer sind in Tab. 2.1 zusammengefasst. Die Kontrolle der Amplifikationsprodukte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung in 2%igen Agarosegelen (siehe 2.2.7). Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

Tabelle 2.1: Oligonukleotid-Primer, welche in der semiquantitativen, quantitativen sowie Sequenzier-PCR genutzt wurden.

| Amplifikat | Amplifikat- Größe (bp) | Sequenz <i>Forward</i> -Primer Sequenz <i>Reverse</i> -Primer 5' --- 3' | Hybridi- sierungs- temp. (°C) |
|---------------------------|---------------------------|---|-------------------------------------|
| GAPDH | 480 | CATCACCATCTTCCAGGAGCG TGACCTTGCCCACAGCCTTG | 60 |
| 18s | 344 | GTTGTTGGAGCGATTTGTCTGG AGGGCAGGGACTTAATCAACGC | 62 |
| proEGFcyt | 450 | GGCCATGGAGACTCAGAAGCTGCTATCGAAAAACCC | 68 |
| proEGFdel23 | 371 | ACGGATCCTCACTGAGTCAGCTCCATTTGGTG | |
| proEGF22.23 | 204 | GGAATTCACTCAGAAGCTGCTATCGAAAAACCC GGCGGCCGCTCACCCATCTGCTGCCTGGCCATC | 68 |
| β-Tubulin I | 154 | ACCTCGCTGCTCCAGCCTCT CCGGCCTGGATGTGCACGAT | 60 |
| β-Tubulin II | 208 | CGCATCTCCGAGCAGTTCAC TCGCCCTCCTCCTCCTCGA | 62 |
| β-Tubulin III | 141 | CTGCTCGCAGCTGGAGTGAG CATAAATACTGCAGGAGGGC | 62 |
| β-Tubulin IVa | 114 | TCTCCGCCGCATCTTCCACC CCGGCCTGGATGTGCACGAT | 60 |
| β-Tubulin IVb | 215 | GAGCTTGCCAGCCTCGTTCT CCGATCTGGTTGCCGCACTG | 60 |
| β-Tubulin V | 244 | CGGGGAGGAAGCTTTTGAGGAT CTGGGTAGAACCCGCAATTCTCT | 62 |
| β-Tubulin VI | 133 | AGTTGTGTTGGGCTCACACCA TTGCCCACTGGCCAATCTGA | 62 |
| MAP1a | 222 | TGAGAAGATTGTGCGTGTG TTGCTCACGGTCGTCTTG | 54 |
| MAP1b | 252 | GGACCAGGAACCTACCAAGACG GATCAGTGTACCTGCATGTTG | 60 |
| HDAC6 | 184 | ACGCCAGCACAGTCTTATG CGGTGGATGGAGAAATAGAGG | 60 |
| Pro-Cathepsin B | 150 | CTCTATGAATCCCATGTAGGGTGC CCTGTTTGTAGGTCGGGCTG | 60 |
| Pro-Cathepsin D | 178 | GCTGCACAAGTTCACGTCCAT TGCCAATCTCCCCGTAGTACTG | 60 |
| Pro-Cathepsin L | 184 | TTGCTAATGACACCGCTTTG ACCAGCACACCATGATCCATG | 60 |
| Sp6-Sequenzier- Primer | | ATTTAGGTGACACTATAGAATAC | 45 |
| T7-Sequenzier- Primer | | TAATACGACTCACTATAGGGGGA | 45 |

2.2.5 In-situ-Hybridisierung

Die *in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode, bei der eine cRNA-Sonde verwendet wird, um mRNA in einer Zelle oder einem Gewebe zu lokalisieren. Die cRNA-Sonde war speziell gegen die mRNA gerichtet, welche für die gesamte cytoplasmatische Domäne des proEGF kodiert.

2.2.5.1 Herstellung der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde (DIG-cRNA)

Fünf Mikrogramm Plasmid (Sequenz der cytoplasmatischen Domäne des proEGF kloniert in pGEM-T Vektor, siehe 2.2.8) wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* (NEB) und *NcoI* (NEB) verdaut (siehe 2.2.11) und das Insert über Phenol-Chloroform-Aufreinigung isoliert. Ein Mikrogramm der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden unter Verwendung eines cRNA-Synthese-Kits (AMS Biotechnology Ltd.) zur cRNA-Synthese eingesetzt. Es folgte die DIG-Markierung mit dem DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche Applied Science).

2.2.5.2 Hybridisierung

Folgende zusätzliche Lösungen wurden benötigt:

| | | |
|------------|---|--|
| 1x STB | : | 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 9,5 |
| 1x STBM | : | 1x STB + 50 mM MgCl ₂ |
| 1x PBSM | : | 1x PBS + 5 mM MgCl ₂ |
| 1x PBSM-TN | : | 1x PBSM + 0,04% Triton X-100 + 0,04% Nonidet P-40 |
| 1x TNMT | : | 0,1 mM Tris-HCl, 0,1 mM NaCl, 4 mM MgCl ₂ , 0,05% Triton X-100, pH 7,5 |
| 20x SSC | : | 3 M NaCl, 0,37 M NaCitrat, pH 7,0 |

| | |
|---------------------|---------------------------------|
| Detektionslösung: | 3,75 ml STBM |
| | 16,5 µl NTB |
| | 12,5 µl BCIP |
| | 15,0 µl 1 M Levamisol |
| Hybridisierungsmix: | 10 µl 10 µg/µl Salmon sperm DNA |
| | 10 µl 10 µg/µl tRNA |
| | 10 µl DIG-cRNA |

Von den Geweben wurden 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden wie folgt inkubiert (Tab. 2.2):

Tabelle 2.2: Inkubationen der Gewebe-Schnitte während der *in-situ*-Hybridisierung.

| Reagenz | Temperatur | Zeit |
|--------------------|------------|--|
| 1. Tag | | |
| PBSM | RT | 10 min |
| 4% Paraformaldehyd | RT | 15 min |
| PBSM-TN | RT | 2 x 5 min |
| PBSM | RT | 2 x 5 min |
| 20% Essigsäure | 4°C | 15-20 sek |
| PBSM | 4°C | 5 min |
| 20% Glycerol | RT | 1 h |
| 2x SSC | RT | kurz; anschließend 10 min 70°C- Heizplatte denaturieren |
| Hybridisierungsmix | 42°C | über Nacht |
| 2. Tag | | |
| 4x SSC | RT | 4 x 15 min |
| RNAse (30 µg/ml) | 37°C | 30 min |
| 4x SSC | 37°C | 5 x 7min |
| 2x SSC | 60°C | 20 min |
| 0,2x SSC | 42°C | 20 min |
| 0,1x SSC | RT | 5 min |
| 2x SSC | RT | 5 min |
| 1x TNMT | RT | 10 min |
| TNMT mit 3% BSA | RT | 1 h |
| DIG-cRNA | 4°C | über Nacht |
| 3. Tag | | |
| 1x TNMT | RT | 2 x 10 min |
| 1x STBM | RT | 2 x 5 min |
| Detektionslösung | RT | 6-24 h |

2.2.6 LMP-Aufreinigung

Mit Hilfe von *Low Melting Point* (LMP)- Gelen wurden die DNA-Amplifikate aus der RT-PCR aufgereinigt. Zur Verwendung kamen je nach Größe des DNA-Fragmentes 1%ige oder 2%ige Gele, zusammengesetzt aus LMP-Agarose, 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,001 M Na₄-EDTA; pH 8,4) und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG). Die PCR-Amplifikate wurden mit DNA-Ladepuffer (Fermentas GmbH: 6x *Loading Dye Solution*) versetzt und im Gel bei 80 V für ca. 1 h aufgetrennt

(siehe 2.2.7). Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gel wurde bei 70°C verflüssigt, anschließend in 1 ml WizardTM-PCR Preps DNA Purifikation Resin (Promega GmbH) aufgenommen und mit Hilfe von 1x Spritzen (B. Braun Melsungen AG; 2 ml) auf die WizardTM-Minicoloumns (Promega GmbH) aufgetragen. Diese wurden dann mit 2 ml 80%igem Isopropanol gewaschen und zentrifugiert (13.000 upm, 30 sek). Die DNA-Amplifikate wurden mit 50 µl DEPC-H₂O von der Säule eluiert. Anschließend erfolgte eine Kontrolle auf Reinheit und Konzentration mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese.

2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in 1-2%igem Agarose-Gel (SeaKern LE agarose (BMA) in 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,001 M Na₄-EDTA; pH 8,4)) und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG) bei 80-120 V für ca. 30 min bis 1 h.

2.2.7.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate (DNA) mit nur geringen Unterschieden in der Molekülgröße wurde eine 5% PAGE ohne SDS angefertigt.

Das Polyacrylamid-Gel (5%) hatte folgende Zusammensetzung :

| | |
|---------|---|
| 2,1 ml | 30% Acrylamid-Mix (29% Acrylamid und 1% NN'-Methylenbisacrylamid in H ₂ O) |
| 1,25 ml | 10xTBE (auf 1l H ₂ O: 100 g Tris-HCl, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0) |
| 9,17 ml | H ₂ O |
| 62,5 µl | 10% APS |
| 6,25 µl | TEMED |

Nach der Polymerisation wurde das PAGE-Gel in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingespannt und diese mit 1x TBE aufgefüllt. Die DNA wurde mit DNA-Ladepuffer (Fermentas 6x Loading Dye Solution; Fermentas GmbH) versetzt und nach Auftragen auf das Gel bei 80 V für ca. 1,5 h aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA in einer Ethidiumbromid-Lösung (100 ml 1x TBE, 0,5 mg/ml Ethidiumbromid) gefärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

2.2.8 Ligation

Mit Hilfe dieser Methode kann man PCR-Amplifikate in Vektoren einbauen. Für die Arbeiten an *E. coli* wurde das pGEM-T Vektor-System (Promega GmbH) genutzt. Des Weiteren wurde der eukaryote Expressions-Vektor pcDNA4/HisMaxC (Invitrogen) für die Arbeiten an der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 genutzt. Dieser Vektor bietet folgende Vorteile:

- den *Cytomegalovirus immediate-early* (CMV) Promotor für eine starke Expression in Säugerzellen
- der *QBI SP 163 Translations-Enhancer* für die Erhöhung der Expressionsrate rekombinanter Proteine in eukaryoten Zellen
- Plasmide in 3 Leserastern für die *in-frame*-Klonierung eines N-terminalen Xpress-Epitops und einer Polyhistidin-Tag-Sequenz mit dem zu exprimierenden Konstrukt
- ein ZeocinTM-Resistenzgen für die Selektion stabiler eukaryoter Zelllinien
- ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion stabiler *E. coli*-Transfektanden

Für alle verwendeten Vektoren wurde folgender Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert:

| | |
|--------|---|
| 1,0 µl | Vektor |
| 5,0 µl | 2x Rapid Ligation Buffer (Promega GmbH) |
| 1,0 µl | T4 DNA-Ligase (Promega GmbH) |
| 3,0 µl | aufgereinigte DNA |

2.2.9 Transformation

Für die Transformation standen *E. coli XLBlue ADW45* bereit, welche mit der Rubidiumchlorid-Methode (Sambrook und Russel, 2001) kompetent gemacht wurden.

Die folgenden Arbeiten wurden steril durchgeführt:

10 µl Ligation wurden zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dieser Mix für 2 min im 42°C-Wasserbad erhitzt, dann 1 min auf Eis abgekühlt. Nun wurden 300 µl LBA-Medium (auf 1l H₂O: 12 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 1 g Glukose und 0,1 mM Ampicillin) hinzugefügt, inkubiert (37°C, 15 min) und diese Zell-Suspension auf LB-Platten (12 g/l Agar-Agar in LB-Medium; zusätzlich mit 80 µl 0,05 M X-Gal (Gibco) und 8 µl 0,84 M IPTG (Carl Roth GmbH & Co. KG) versehen) ausgestrichen. Die Platten verblieben über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Weiße *E. coli*-Transformanten wurden

auf LBA-Platten isoliert. *E. coli* ohne erfolgreiche Transformation erschienen blau und wurden nicht verwendet.

2.2.10 Plasmid-Präparation

2.2.10.1 Isolation der Plasmide mittels Mikro-Plasmid-Präparation

Es wurde der „GFX™ Mikro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Zwei Milliliter LBA-Medium wurden mit jeweils einer Kolonie steril angeimpft und über Nacht geschüttelt (37°C, 235 upm). Die Kulturen wurden zentrifugiert (13.000 upm, 2 min, RT) und das Pellet in 150 µl Lösung 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 µg RNase 1) resuspendiert. Es wurden nacheinander 150 µl Lösung 2 (1 M NaOH, 5,3% SDS) bzw. 300 µl Lösung 3 (Acetat enthaltender Puffer) dazu pipettiert und geschüttelt. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 7 min, RT) wurde der klare Überstand auf die GFX™ Columns aufgetragen. Nach 1 min Einwirkzeit wurde die Säule mit 400 µl Waschpuffer gespült, Reste dieses Puffers durch Zentrifugieren (13.000 upm, 1 min, RT) entfernt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit je 50 µl DEPC-Wasser.

2.2.10.2 Isolation der Plasmide mittels Midi-Plasmid-Präparation

Die Midi-Plasmid-Präparation liefert größere Ausbeuten an isoliertem Plasmid als die unter 2.2.10.1 angegebene Methode.

Es wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH) verwendet.

LBA-Medium (30 ml; Zusammensetzung siehe 2.2.9) wurde mit den *E. coli*-Transformanten steril angeimpft und über Nacht geschüttelt (235 upm, 37°C). Die Kultur wurde zentrifugiert (13.000 upm, 15 min, 4°C), zum Pellet nacheinander 4 ml Lösung P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) und 4 ml Lösung P2 (20 mM NaOH, 1% SDS) gegeben und geschwenkt. Anschließend wurde für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 30 min, 4°C) wurde der klare Überstand durch einen Faltenfilter auf eine vorher mit 4 ml QTB-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100, pH 7,0) äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde 2x mit je 10 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, pH 8,5) gewaschen, die anschließende Elution der Plasmide von der Säule erfolgte mit 5 ml QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, pH 8,5). Zum Eluat wurden 3,5 ml 100% Isopropanol gegeben und zentrifugiert (11.500 upm, 30 min, 4°C). Nach Dekantieren wurde das Pellet mit 2 ml

70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 upm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde vakuumgetrocknet und die DNA in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen.

2.2.11 Restriktionsverdau

Die in der RT-PCR eingesetzten Primer-Paare (siehe Tab. 2.1) waren so konstruiert, dass sie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. *NotI* enthielten. Somit konnte mit diesen Restriktionsenzymen das PCR-Fragment am 5`- und 3`-Ende wieder aus dem Vektor heraus geschnitten werden.

Folgender Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert:

| | |
|--------|-------------------------------|
| 2,5 µl | Plasmid |
| 1,0 µl | 10x Puffer <i>EcoRI</i> (NEB) |
| 0,5 µl | <i>EcoRI</i> (NEB) |
| 0,5 µl | <i>NotI</i> (NEB) |
| 5,5 µl | Reinstwasser |

2.2.12 Sequenzierung

Die Ermittlung der korrekten DNA-Sequenz erfolgte durch Sequenzier-PCR in beiden Richtungen (Primer siehe Tab. 2.1) nach Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide. Es wurde der Sequenzierungs-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

| | |
|------|----------------------|
| 8 µl | Terminator-Mix |
| 1 µl | Primer |
| 4 µl | DNA- <i>template</i> |
| 7 µl | DEPC-Wasser |

Im Thermocycler (mit Heizdeckel) wurde unter folgenden Bedingungen prozessiert:

| | | |
|---|---------------------------|--------|
| Denaturierung der doppelsträngigen DNA: | 96°C | 30 sek |
| Hybridisierung mit dem Primer: | Temperatur siehe Tab. 2.1 | 15 sek |
| Elongation: | 60°C | 4 min |

Zu diesen 20 µl Reaktionsgemisch wurden anschließend 7 µl 7,5 M Ammoniumacetat sowie 68 µl 96%igem Ethanol addiert. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 30 min, 18°C) wurde das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und

anschließend mit 4 µl Ladepuffer versetzt. Die anschließende Sequenzier-PCR und Bereitstellung der ermittelten DNA-Nucleotid-Sequenz erfolgte durch das Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

2.3 Zellkultur

Ziel der Arbeit war die Expression unterschiedlicher Fragmente der cytoplasmatischen Domäne des proEGF in der humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-133 (siehe 2.1). Aus diesem Grund folgte die Transfektion von FTC-133 mit Konstrukten aus klonierten cDNA-Sequenzen für die cytoplasmatische EGF-Domäne in pcDNA4/HisMaxC (siehe 2.2.8).

2.3.1 Medien

Kulturmedium DMEM 42400-010 (Gibco), außerdem zugegeben auf 1000 ml:

100,0 ml Fetales Kälberserum (FKS; Lot: S04208S1810, Biowest)
1,125 g NaHCO₃

2.3.2 Auftauen von Zellen

Das Kryoröhrchen wurde nach Entnahme aus dem Stickstoffbehälter bei 37°C aufgetaut und danach in ein 15 ml Greinerröhrchen mit frischem Medium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen bei 1000 upm und 4°C 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in das vorgewärmte Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

2.3.3 Kulturbedingungen

CO₂-Gehalt 5%
O₂-Gehalt 20%
Temperatur 37°C

Kulturbehälter: Greiner bio-One GmbH: CELLSTAR® , 250 ml, 50 ml
TPP®: Zellkultur Testplatte (96well, 24well, 12well, 6well)

2.3.4 Passagieren

Das Medium wurde mit sterilen 1x Pipetten (TPP-dispenser 1x; TPP AG) abgesaugt und die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Zelldissoziationslösung (Sigma, enzymfrei) vom Flaschenboden abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und verdünnt in ein neues Kulturgefäß umgesetzt.

2.3.5 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, mit Zelldissoziationslösung vom Flaschenboden gelöst, in frischem Medium 10-fachen Volumens aufgenommen und 5 min bei 1000 upm, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Medium + 10% DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehälter (Kühlungsrate von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$) auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.6 Transfektion

2.3.6.1 Metafectene™ Transfektion Reagent

Es wurde der Transfektionskit Metafectene (Biontex Laboratories GmbH) verwendet. *Metafectene Transfektion Reagent* (Biontex Laboratories GmbH) besteht aus einem kationischen Lipid und einem ungeladenen Helferlipid und kommt bei der Transfektion eukaryotischer Zellen zur Anwendung. Die kationischen Liposomen (Felgner et al., 1987) reagieren spontan mit der zu transfektierenden DNA oder RNA und bilden Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren und durch Endozytose in die Zelle gelangen.

2.3.6.2 Transfektion und Selektion

Der für die Transfektion verwendete Plasmidvektor pcDNA4/HisMaxC verfügt über das Zeocin-Resistenzgen *Sh ble*. In nicht transfektierten Zellen interkaliert Zeocin™ in die DNA und schneidet diese, während transfektierte Zellen ein von *Sh ble* codiertes 13 kDa großes Protein exprimieren, welches eine Bindung von Zeocin™ mit der DNA verhindert und somit transfektierten Zellen eine Zeocin™-Resistenz vermittelt.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, mit Serum-freiem Medium gewaschen und mit 1 µg des zu transfektierenden Plasmids nach Angaben des Herstellers inkubiert. Nach 6 h wurde Vollmedium hinzugegeben und die Zellen über Nacht kultiviert. 24 h nach der Transfektion erfolgte erneuter Medienwechsel. 48-72 h nach

der Transfektion wurde mit Selektionsdruck unter Verwendung des Antibiotikums Zeocin™ (Invitrogen, 25 µg/ml) begonnen. Alle 3 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach 3 Wochen konnten Zellklone isoliert werden. Dazu wurden unter Mikroskopkontrolle entsprechende Einzelklone markiert, die Zellen mit 500 µl Zelldissoziationslösung vom Gefäßboden gelöst, mit einer Pipette die markierten Zellen aufgenommen und in ein neues Kulturgefäß überführt. Es erfolgte ein erneutes Kultivieren für ca. 1-2 Wochen. Die so angezüchteten Klone wurden bis ca. 80% Konfluenz kultiviert und standen nun für die Protein- und RNA-Isolation bereit.

2.3.7 Inkubation mit Reagenzien

Für die Inkubation mit Reagenzien Taxol, Nocodazol, Trichostatin A (TSA), dem Cyclotetrapeptid HC-Toxin sowie Natriumbutyrat wurden die Zellen ausgesät, nach 24 h mit sterilem PBS kurz gewaschen und für weitere 24 h in FKS-freiem Medium kultiviert. Die entsprechenden Reagenzien wurden in FKS-freiem Medium gelöst und zu den Zellen gegeben. Zur Zeit der Zellentnahme wiesen die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% auf.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Protein-Präparation

2.4.1.1 Protein-Isolation aus Gesamtzelllysaten

Es wurden folgende Lysepuffer verwendet:

SDS-Lysepuffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

10% Saccharose

2% SDS

1x Laemmli-Puffer : 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8

2% SDS

10% Glycerol

5% Mercaptoethanol

0,1% Bromphenolblau

Lysepuffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

50 mM NaCl

1 mM DTT

10% Glycerol

0,2% Triton X-100

Für die Protein-Isolation mit SDS-Lysepuffer bzw. Lysepuffer A wurden die Zellen mit Zelldissoziationslösung vom Kulturgefäßboden gelöst, zentrifugiert (11.500 upm, 5 min, 4°C) und das Pellet mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (13.000 upm, 5 min, 4°C), das Pellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Protein-Lösung wurde für 5 min bei 90°C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (13.000 upm, 5 min, 4°C). Die Proteinkonzentration des klaren Überstandes wurde nach der Bradford-Methode (siehe 2.4.1.3) bestimmt.

Für die Protein-Isolation mit 1x Laemmli-Lysepuffer wurden die Zellen mit PBS (4°C, kurz) gewaschen und direkt mit dem Lysepuffer vom Flaschenboden (100 µl, 500 µl oder 800 µl für Zellen kultiviert in 6wells, 50 ml- bzw. 250 ml-Kulturflaschen) gelöst. Das Zell-lysat wurde in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 90°C gekocht und auf Eis abgekühlt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei –80°C.

2.4.1.2 Protein-Isolation aus cytosolischer und nukleärer Zellfraktion

Für die Protein-Isolation aus cytosolischer und nukleärer Zellfraktion wurde der Kit „NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ (Pierce) verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert, mit Zelldissoziationslösung (siehe 2.3.4) vom Flaschenboden gelöst und pelletiert (1000 upm, 4°C, 5 min). Nach nochmaligem Waschen mit kaltem PBS stand das Zellpellet zur weiteren Bearbeitung laut Angaben des Herstellers zur Verfügung. Die Trennung in cytosolische und nukleäre Zellfraktionen beruhte dabei auf folgenden Schritten: (I) Lyse der Zellmembran bei gleichzeitigem Intakthalten der nukleären Membran, (II) Abtrennung der cytosolischen Fraktion von der Kernfraktion und (III) separate Extraktion der nukleären Proteine.

2.4.1.3 Bestimmung der Protein-Konzentration durch die Bradford-Methode

Mit dieser Methode ist eine Bestimmung der Protein-Konzentration einer farblosen Protein-Lösung möglich. Pro Küvette wurden 800 µl H₂O, 200 µl Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) und 1 µl der Protein-Lösung gemischt und die OD₅₉₅ spektrometrisch bestimmt. Anhand einer Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE ist eine Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes möglich.

Das Polyacrylamid-Gel bestand aus einem 5%igen Sammel- und einem Trenngel (8%, 10%, 12% oder 15%, je nach Größe des zu detektierenden Proteins) und hatte folgende Zusammensetzung:

| | | |
|------------|----------------|------------------------|
| Sammelgel: | 2,70 ml | H ₂ O |
| | 0,67 ml | 30% Acrylamid-Mix |
| | 0,50 ml | 1M Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 0,04 ml | 10% SDS |
| | 0,04 ml | 10% APS |
| | 0,004 ml | TEMED |
| Trenngel: | 2,30 - 4,60 ml | H ₂ O |
| | 2,70 - 5,00 ml | 30% Acrylamid-Mix |
| | 2,50 ml | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 |
| | 0,10 ml | 10% SDS |
| | 0,10 ml | 10% APS |
| | 0,004 ml | TEMED |

Das polymerisierte Gel wurde in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingespannt und diese mit 1x -Laufpuffer (26 mM Tris, 190 mM Glycin und 3,5 mM SDS) aufgefüllt. Die Proteine wurden folgendermaßen vorbereitet:

Vor Beladung einer Laufspur (max. Volumen ca. 50 µl) wurden durchschnittlich 15-20 µg Protein (isoliert mit SDS-Lysepuffer oder Lysepuffer A; siehe 2.4.1.1) mit entsprechendem Volumen 5x Laemmli-Ladepuffer (312,5 mM Tris-HCl, 10% SDS, 50% Glycerol, 25% Mercaptoethanol und 0,5% Bromphenolblau; pH 6,8; Endkonzentration: 1x -Laemmli-Ladepuffer) versetzt. Anschließend wurden diese Lösungen 5 min bei 90°C gekocht und dann auf Eis abgekühlt. Von Proteinen, welche mit 1x-Laemmli-Lysepuffer (siehe 2.4.1.1) isoliert wurden, konnten keine Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Sie wurden in gleichen Volumen aufgetragen (5-40 µl). Eine Vergleichbarkeit der Proteinmengen wurde durch die parallele Detektion von beta-Aktin als *house-keeping*-Protein gewährleistet. Nach Beladung des Geles erfolgte der Lauf bei 80-100 V für ca. 1,5-2 h.

2.4.2.1 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung kann man aufgetrennte Proteine im SDS-PAGE-Gel sichtbar machen. Diese Methode wurde zur Kontrolle des Protein-Transfers (Blotting; siehe 2.4.3.1) verwendet.

Coomassie-Färbelösung: 0,25 g Coomassie brilliant Blue R250
90 ml Methanol / H₂O (Vol/Vol = 1:1)
10 ml Eisessig

Entfärber-Lösung: 60% H₂O
30% Methanol
10% Essigsäure

Das Gel wurde 20 min in der Coomassie-Färbelösung geschüttelt, dann 2-3 x mit Leitungswasser gespült und anschließend in der Entfärber-Lösung wieder entfärbt. Proteine wurden als blaue Banden sichtbar.

2.4.3 Western-Blotting

Das Western-Blotting ist eine immunologische Methode des spezifischen Protein-Nachweises mit Hilfe geeigneter Antikörper, welche gegen Epitope auf dem nachzuweisenden Protein gerichtet sind.

2.4.3.1 Blotting

Hierbei werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (HybondTMECLTM bzw. HybondTM-P: Amersham Pharmacia Biotech) überführt. Es wurde das Nass-Blot-Verfahren angewendet. Dazu wurden vor Gebrauch die Blot-Filter (Bio-Rad Laboratories GmbH), Filterpapier (Whatman GmbH; 7 x 9 cm) und die Nitrocellulosemembran mit Blotpuffer (25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glycin, 20% MetOH), die PVDF-Membran kurz in MetOH getränkt. Die zu blottenden Gele wurden ebenfalls kurz in Blotpuffer äquilibriert.

Es wurde in folgender Reihenfolge gestapelt und bei 1 A für 2 h geblottet:

Kathode ⊖

Biorad-Blot-Filter
2 Lagen Whatman Filter-Papier
Nitrocellulose-Membran
SDS-PAGE-Gel
2 Lagen Whatman Filter-Papier
Biorad-Blot-Filter

Anode ⊕

2.4.3.2 Ponceau-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran in Ponceau-Lösung (auf 100 ml H₂O: 0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure 10 min inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült, bis Proteine als rot gefärbte Banden sichtbar wurden. Die Membran wurde zur Dokumentation photokopiert und anschließend der Marker (*Broad Range Protein Molecular Weight Marker*, Promega GmbH) vom Membrananteil mit den geblotteten Proteinen abgeschnitten.

2.4.3.3 Antikörper-Nachweis

2.4.3.3.1 Verwendete Antikörper

Zur Detektion der in den FTC-133 überexprimierten proEGF-Sequenzen wurde der Anti-Xpress-Antikörper (Invitrogen) verwendet. Der verwendete Vektor *pcDNA4/HisMaxC* ermöglichte die Produktion eines Fusionsproteins des klonierten proEGF-Konstruktes mit N-terminalem Xpress-Epitop. Dieses Epitop besitzt die folgende Aminosäuresequenz: N'-Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys-C'. Das Xpress-Epitop kommt nicht in den natürlichen Proteinsequenzen der Zellen vor und dient somit dem spezifischen Nachweis der in FTC-133 exprimierten XpressproEGF-Fusionsproteine. Der verwendete Anti-Xpress-Antikörper ist gegen die oben genannte Aminosäure-Sequenz gerichtet. Es handelt sich um einen Maus-monoklonalen IgG1-Antikörper. Im Western-Blot wurde er 1:5.000 verdünnt eingesetzt, als Sekundär-Antikörper wurde ein *Horseradish-Peroxydase*- (HRP-) gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Dianova GmbH) verwendet. In der Immunopräzipitation wurde die nicht HRP-gekoppelte Variante des Anti-Xpress-Antikörpers eingesetzt. Die in der Immunfluoreszenz verwendeten Sekundär-Antikörper Anti-Maus-FITC und Anti-Maus-TRITC wurden von der Firma `Molecular Probes` bezogen. Weiterhin wurden Antikörper sowohl im Western-Blot als auch in der Immunfluoreszenz (siehe 2.4.6) laut Tabelle 2.3 verwendet:

Tabelle 2.3: Eingesetzte Antikörper (AK = Antikörper, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie; * freundliche Gabe von Dr. med. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, MLU Halle).

| Primär-AK | Konz. im WB | Konz. in der IF/IHC | Sekundär-AK | Konz. im WB | Konz. in der IF/IHC |
|---|----------------|---------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------|
| Monoklonale AK: | | | | | |
| Anti- α -Tubulin clone 11126 (Molecular Probes) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:250 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-acetylated Tubulin clone 6- 11B-1 (Sigma) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-TRITC | | 1:400 |
| Anti-Polyglutamylated Tubulin clone B3 (Sigma) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:100 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-Tyrosine Tubulin clone TUB-1A2 (Sigma) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-MAP1B clone clone AA6 (Sigma) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-TRITC | | 1:400 |
| Anti-MAP2 clone HM-2 (Sigma) | 1:500 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-TRITC | | 1:400 |
| Anti-Mannose 6 Phosphate Receptor clone 2G11 (Abcam) | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-Cathepsin B clone CB 59- 4B11 * | 1:1.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-TRITC | | 1:400 |
| Anti-Cathepsin D clone "Hanni" * | 1:5.000 | | Anti-rabbit-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-rabbit-TRITC | | 1:400 |
| Anti-Cathepsin L clone CPLH 33/1 * | 1:600 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:100 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-Cathepsin L clone CPLH 2D4 * | 1:600 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:100 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-beta-Aktin | 1:20.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| Anti-Histones Lot.20021098 (Chemicon) | 1:2.000 | | Anti-Maus-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| Anti-EGF clone EGF-10 (Sigma) | | 1:250 | Anti-Maus-HRP (Dianova) | | 1:500 |
| Anti-Cytokeratin clone MNF 116 (Dako Deutschland GmbH) | | 1:100 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-Golgin-97 clone CDF4 (Molecular Probes) | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti-CD63 clone NKJ/C3 (Novocastra Laboratories Ltd.) | | 1:50 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti- α -Adaptin (BD Transduction Laboratories) | | 1:50 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti- γ -Adaptin (BD Transduction Laboratories) | | 1:50 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Anti- δ -Adaptin (BD Transduction Laboratories) | | 1:50 | Alexa fluor – Anti-Maus-FITC | | 1:400 |
| Polyklonale Antikörper : | | | | | |
| Anti-HDAC6 (Cell Signaling Technology) | 1:1000 | | Anti-rabbit-HRP (Dianova) | 1:20.000 | |
| | | 1:200 | Alexa fluor – Anti-rabbit-TRITC | | 1:400 |

2.4.3.3.2 Antikörper-Nachweis

Das Blocken unspezifischer Bindungen erfolgte je nach verwendetem Antikörper durch Inkubation der Membran in TBST 0,05% oder PBST 0,1% mit 1-5% Trockenmilch („Sucofin“, TSE GmbH) oder BSA (Sigma) oder einer Kombination von Trockenmilch und BSA für 1-2 h bei RT unter Schütteln. Nach 3x Waschen der Membran mit TBST 0,05% oder PBST 0,1% (5-10 min, RT) wurde die Membran mit dem Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 2.3) verdünnt im entsprechenden Blockpuffer versetzt. Die Inkubation erfolgte in Hybridisierungsfolie über Nacht bei 4°C. Nach 3x Waschen mit TBST 0,05% oder PBST 0,1% für je 10 min bei RT wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 2.3, verdünnt in TBST 0,05% oder PBST 0,1%) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde nochmals 3x mit TBST 0,05% oder PBST 0,1% gewaschen. Auf die abgetropfte Membran wurden mit ECLTM-Lösung (Amersham Biosciences) spezifische immunoreaktive Protein-Banden entwickelt und nach Exposition auf Röntgenfilm (Amersham Biosciences: HyperfilmTM ECLTM) dokumentiert (Entwickler und Fixierer: Processing Chemicals, Kodak; Sigma).

2.4.4 Ablösen gebundenener Antikörper von der Membran

Mit Hilfe dieser Technik werden auf der Membran gebundene Antikörper entfernt, so dass die Membran anschließend weiteren Antikörper-Inkubationen zur Verfügung steht. Die Membran wurde mit der Stripping-Lösung (6 ml 10 % SDS; 3,75 ml 1,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,21 ml Mercaptoethanol; H₂O addiert auf 30 ml) für 30 min bei 70 °C inkubiert. Danach erfolgte 3x Waschen und anschließendes Blocken mit den entsprechenden Puffern, bevor erneut Antikörper zugesetzt werden konnten.

2.4.5 Immunhistochemie

Mit dieser Methode war die Lokalisation von löslichem EGF im Schilddrüsen-gewebeschnitt auf Grund der spezifischen Interaktion zwischen EGF und dem Anti-EGF10-Antikörper (siehe Tabelle 2.3) möglich. Es wurden Bouin-fixierte und in Paraffin gebettete Gewebeschnitte einer Dicke von 6 µm auf Objektträger überführt. Die Schnitte wurden über Nacht im 60°C-Brutschrank deparaffiniert und anschließend laut Tabelle 2.4 inkubiert.

Tabelle 2.4: Vorgehensweise bei der Immunhistochemie.

| Reagenz | Temperatur | Zeit |
|---|------------|---|
| Xylol | RT | 2 x 10 min |
| 96% Ethanol | RT | kurz |
| 90% Ethanol | RT | kurz |
| 80% Ethanol | RT | kurz |
| 70% Ethanol | RT | kurz |
| 50% Ethanol | RT | kurz |
| H ₂ O | RT | kurz |
| PBST 0,1% | RT | kurz |
| 3% H ₂ O ₂ /MetOH | RT, dunkel | 25 min |
| PBST 0,1% | RT | 3 x 5 min |
| 10% Ziegennormalserum in PBST 0,1% mit 3% BSA (= Blockpuffer) | RT | 1 h |
| Primär-Antikörper in Blockpuffer | 4°C | über Nacht |
| PBST 0,1% | RT | 3 x 5 min |
| Sekundär-Antikörper | 4°C | 1 h |
| PBST 0,1% | RT | 3 x 5 min |
| DAB-Reagenz (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories) | RT | individuell, bis optimale Färbung erreicht |
| Leitungswasser | RT | 5 min |
| Aqua dest. | RT | kurz |
| Hämalaun | RT | 3 min |
| Leitungswasser | RT | 10 min |
| Aqua dest. | RT | kurz |
| Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol (s.o.) | RT | s.o. |

2.4.6 Immunfluoreszenzcytochemie

Mit dieser Methode ist eine Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen auf Grund der spezifischen Interaktion zwischen dem zu untersuchenden Protein und seinem Antikörper möglich. Die Zellen wurden dazu auf sterilen Objektträgern kultiviert, 1x mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT in 3,7%igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach anschließendem 3x Waschen mit PBS (10 min, RT) erfolgte für die Detektion einiger Proteine ein Permeabilisierungsschritt: für die Detektion von acetyliertem und polyglutamylisiertem Tubulin (5 mM PIPES + 1% Triton X-100 + 2 mM EGTA, pH 6,7; 40 sek, RT), für die Detektion von Cytokeratin (PAA Laboratories GmbH: 1 mg/ml Trypsin, 10 min, 37°C). Nach nochmaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation

mit dem Primär-Antikörper (siehe Tabelle 2.3) verdünnt Blockpuffer (PBS + 2% BSA + 0,05% Saponin + 0,01% NaAzid) über Nacht bei 4°C. Es wurde erneut 3x mit PBST 0,1% gewaschen. Das Blocken unspezifischer Bindungen erfolgte mit 10% Ziegennormalserum (Dako Deutschland GmbH) im Blockpuffer. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 2.3; verdünnt in Blockpuffer) für 1 h bei RT. Es wurde nochmals 3x mit PBST 0,1% gewaschen. Für eine blaue Kernfärbung wurden die Zellen mit 0,01 mg/ml Hoechst (Sigma; verdünnt in PBST 0,1%), für eine rote Kernfärbung mit 10 µg/ml 7-Amino-Actinomycin D (Molekular Probes) für 2 min bei RT inkubiert. Für die Immunfluoreszenz-Färbung des Endoplasmatischen Retikulums wurden die Zellen auf sterilen Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für eine Stunde mit in sterilem Medium verdünntem *ER-TrackerTM Blue-White DPX* (Endkonzentration: 1 µM; Molecular Probes) kultiviert. Anschließend erfolgte 1x Waschen mit PBS, Fixieren in 3,7% Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT und noch 2x Waschen in PBS (10 min, RT). Die gefärbten Zellen wurden mit *Fluoroguard Antifade Reagent* (Bio-Rad) eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Axioplan Fluoreszenz Mikroskopes, einer Axioplan Kamera sowie unter Verwendung von AxioVision Software (alles von: Carl Zeiss AG).

2.4.7 Immunopräzipitation

Mit Hilfe dieser Methode kann man Proteine aus Lösungen präzipitieren. Grundlage der Methode ist eine spezifische Interaktion des Anti-Xpress-Antikörpers (siehe 2.4.3.3.1) mit dem Xpress-Epitop des Xpress-EGFcyt-Fusionsproteins sowie die Interaktion von Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) mit dem Antikörper. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Maus-IgG1-Isotyp-Kontrolle (Cymbus Biotechnology Ltd.: Mouse 1gG1CBL600) eingesetzt.

Neben Lysepuffer A (siehe 2.4.1.1) wurde folgender Puffer B verwendet:

| | | |
|----------|-------|-------------------|
| Puffer B | 50 mM | HEPES-KOH, pH 7,3 |
| | 60 mM | Kaliumacetat |
| | 5 mM | Magnesiumacetat |
| | 1 mM | DTT |
| | 1 mM | PMSF |
| | 1 mM | NaF |
| | 10% | Glycerol |
| | 0,1% | Triton X-100 |

Die Zellen wurden mit Lysepuffer A lysiert (siehe 2.4.1.1; kein Kochen). Protein A-Sepharose (25 µl) wurde mit 50 µl PBS 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und 4x mit je 1 ml PBS gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 30 µl PBS mit 3 µl AntiXpress-Antikörper (Konz.: 1 µg/µl) zugefügt und für 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugieren (2.000 upm, 1 min, 4°C) wurde das Pellet 3x mit je 500 µl Puffer B gewaschen und anschließend in Blockpuffer (Puffer B + 5 mg/ml BSA) für eine halbe Stunde (4°C, schütteln) inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (2.000 upm, 1 min, 4°C) und Abnehmen des Überstandes wurde die Protein A-Sepharose mit der Lysepuffer A-Proteinlösung inkubiert (4°C, 90 min, schütteln). Anschließend wurde die Protein A-Sepharose 3x mit je 1 ml Puffer B gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 20 µl SDS-Puffer B (Puffer B und 20% SDS; 1:1 Vol/Vol) und 5 µl 5x Laemmli-Ladepuffer (siehe 2.4.2) für 15 min bei RT unter Schütteln. Das Eluat wurde 5 min bei 90°C gekocht und stand für die Western-Blot-Analyse bereit.

2.5 Funktionelle Assays

2.5.1 Proliferationstest mittels BrdU-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) und Zellzählung

Die Basis des BrdU-Assays beruht auf der Detektion von 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU), welches in proliferierenden Zellen anstelle des Thymidins eingebaut wird. Es wurde der kolorimetrische Immunoassay mit BrdU (Roche Applied Science) verwendet. In eine 96well-Platte wurden 1×10^3 Zellen mit 100 µl Medium eingesät und über Nacht kultiviert. Die Detektion des eingebauten BrdU erfolgte laut Angaben des Herstellers: Fixierung der Zellen, Markierung des BrdU mit Antikörpern, Gabe von Entwickler-Substrat sowie Stoppen der Reaktion mit 1 M H_2SO_4 . Die Messung erfolgte bei 450 nm gegen 620 nm am ELISA-Reader (SLT Labinstruments GmbH).

Die Messung der Proliferation mittels Zellzählung wurde wie folgt durchgeführt: die Zellen der zu vergleichenden Transfektanten wurden in der gleichen Zellzahl von 3×10^4 Zellen in die Kammern von 6well-Kulturplatten eingesät und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gelöst und im gleichen Volumen aufgenommen. Die Auszählung erfolgte in Neubauer-Zählkammern unter Mikroskop (Olympus IX70 oder Olympus BX40; Olympus).

2.5.2 Motilitätsassay

Der Motilitätstest dient zur Untersuchung des Wanderungsverhaltens von Zellen durch 8 µm große Poren einer Transwellkammer (Greiner bio-One GmbH) mit einer Transwell-Polyethylen-Membran (Membranstärke 10 µm, Membrangröße 0,33 cm²). Dabei wurden die Transwellkammern in dazu passende Kammern eines 24wells eingehängt. Es wurden 1x10⁴ Zellen in die obere Kammer in 0,2 ml Medium eingesät, in die untere Kammer des 24wells wurde 1 ml Medium pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die durch die Transwellmembran gewanderten und sich somit auf der Unterseite der Membran befindlichen Zellen für 15 min in MetOH fixiert und mit Toluidinblau (0,1% Toluidinblau in 2,5% Na₂CO₃) für 30 min bei RT angefärbt. Die nicht durch die Membran gewanderten, sich somit noch auf der Oberseite der Membran befindlichen Zellen wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Die gefärbte Membran wurde getrocknet, ausgestanzt und auf einem Objektträger mit Entellan (Merck KGaA) fixiert. Es wurden mit Hilfe des Zeiss-Mikroskopes und des Programmes „AxioVision 2.0.1“ (Zeiss) von jeder Membran 5 Aufnahmen (Nord, Süd, Ost, West, Mitte) gemacht (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 10x). Die angefärbten Zellen wurden mit dem Programm „Zell-zaehler“ gezählt.

2.5.3 Migrationsassay

Mit dem Migrationsassay wird die Fähigkeit von Zellen, extrazelluläre Matrices aktiv zu durchdringen, bestimmt. Dazu wurden Transwellkammern (Greiner bio-One GmbH; Membranstärke 10 µm, Membrangröße 0,33 cm², Porengröße 8 µm) mit 40 µl Elastin (50 µg/ml, gelöst in sterilem Wasser) beschichtet und in Kammern von 24wells eingehängt. Einsäen, Kultivieren sowie Anfärben der Zellen erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

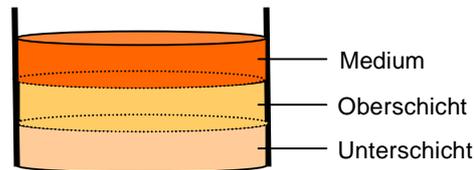
2.5.4 Invasionsassay / Soft-Agar-Test

Mit Hilfe des Soft-Agar-Tests kann das Wachstumsverhalten von Zellen unter nicht adhärennten Bedingungen, d.h. das Wachstumsverhalten in sie umgebende dreidimensionale Matrices, bestimmt und somit weitere Informationen über das Metastasierungsverhalten von Zellen erlangt werden.

Im Soft-Agar-Test wurden die stabilen Transfektanten in eine gelartige Agarschicht eingebettet und 3 Wochen bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die entstandenen Kolonien mit Iodnitrotetrazoliumchlorid angefärbt. Dieses Substrat kann nur von

lebenden Zellen umgesetzt werden, wodurch eine Blaufärbung der Kolonien hervorgerufen wird.

Der Aufbau des Soft-Agar-Tests war wie folgt:



2 ml der Unterschicht enthielten folgende Reagenzien:

| | |
|--------------|--|
| 333 μ l | steriler Agar (3%, verflüssigt) |
| 400 μ l | FKS |
| 0,5 μ l | Zeocin™ (100 mg/ml; Invitrogen) |
| 20 μ l | Amphotericin B (250 μ g/ml; Sigma) |
| 20 μ l | Gentamycin (10 μ g/ml; Sigma) |
| 1220 μ l | Medium |

Bis auf den Agar wurden die Lösungen vereinigt, dann der auf ca. 50°C erwärmte Agar zupipettiert und sofort in ein Well einer 6well-Platte überführt. Die Unterschicht wurde 15 min bei RT inkubiert und mit 1,5 ml Oberschicht abgedeckt:

1,5 ml Oberschicht enthielten folgende Reagenzien:

| | |
|--------------|--|
| 200 μ l | sterilen Agar (3 %, verflüssigt) |
| 300 μ l | FKS |
| 2,25 μ l | Zeocin™ (100 mg/m; Invitrogen) |
| 15 μ l | Amphotericin B (250 μ g/ml; Sigma) |
| 15 μ l | Gentamycin (10 μ g/ml; Sigma) |
| 1000 μ l | Medium |

Die Oberschicht wurde mit unterschiedlichen Zelldichten versehen (2 x 10⁴, 5 x 10⁴ oder 1 x 10⁵ Zellen). Nach 15 min Inkubation bei RT lag eine gallertartige Masse mit vereinzelt Zellen darin vor. Diese Masse wurde mit 1 ml Medium überschichtet und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Einmal pro Woche erfolgte Medienwechsel. Nach 6-8 Wochen wurden die Zellen mit 200 μ l Iodnitrotetrazoliumchlorid (5 mg/ml,

Fluka Chemie AG) über Nacht bei 37°C angefärbt. Die Größe der angefärbten Zellkolonien wurden mit Hilfe des Zeiss-Mikroskops und des Programmes „AxioVision 2.0.1“ (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 10x; Carl Zeiss AG) bestimmt.

2.5.5 Apoptose-Assay / TUNEL

Die Apoptose-Neigung von Zellen wurde mittels des „*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*“ (Roche Applied Science) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Markierung apoptotisch induzierter DNA-Oligonukleotide, welche in Zellen unter Apoptose entstehen. Diese Doppel- oder Einzelstrang-Oligonukleotide weisen freie 3'-OH-Enden auf, an welche die Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) Fluorescein-markiertes dUTP einbaut (*TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling*). Die so markierten Nukleotide können dann fluoreszenz-mikroskopisch detektiert werden.

Die Zellen wurden auf sterilen Objektträgern bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Detektion des eingebauten Fluorescein-dUTP erfolgte mit den im Kit enthaltenen Reagenzien: Fixierung der Zellen, Permeabilisierung und Markierung mit dem *TUNEL*-Reaktionsmix. Es wurde mit „*Fluoroguard Antifade Reagent*“ (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Axioplan Fluoreszenz Mikroskopes, einer Axioplan Kamera sowie unter Verwendung von AxioVision Software (Carl Zeiss AG).

3 Ergebnisse

3.1 proEGF in der humanen Schilddrüse

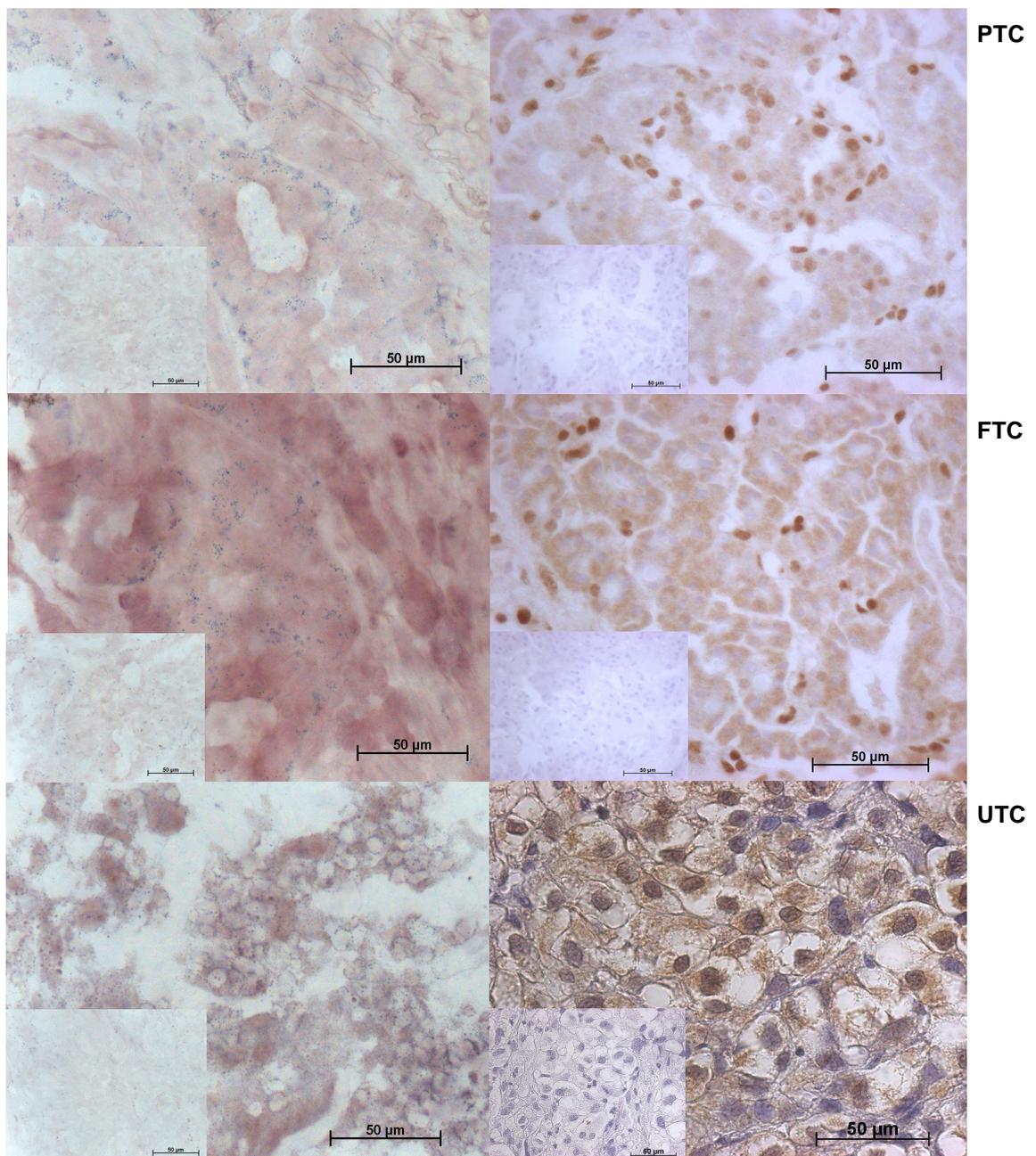
3.1.1 Expression des proEGF in der humanen Schilddrüse

Für die Untersuchungen zur Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne des proEGF wurde die humane neoplastische Schilddrüse als biologisch relevantes Modell-System gewählt. Bisherige Untersuchungen zeigten vorwiegend den exogenen Einfluss des reifen Wachstumsfaktors EGF auf Wachstum und Differenzierung der Schilddrüse. Der Nachweis der mRNA-Expression von EGF in der humanen Schilddrüse beschränkte sich bisher auf die Schilddrüse als Gewebe, d.h. auf einen Komplex verschiedener Zellpopulationen. Bisher erfolgte jedoch noch kein Nachweis der EGF-Expression in Schilddrüsenfollikelzellen, den Thyreocyten. Es sollte gezeigt werden, dass proEGF von den Thyreocyten verschieden dedifferenzierter Schilddrüsenkarzinome als mRNA exprimiert und auch als Protein produziert wird.

Mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte eine cytosolische Lokalisation von proEGF-mRNA in den Thyreocyten von humanem papillärem (PTC), follikulärem (FTC) und undifferenziertem (UTC) Schilddrüsenkarzinomgewebe (Abb. 3.1, linke Spalte) detektiert werden. Parallel durchgeführte Negativ-Kontrollen, in welchen die anti-sense-Sonde durch eine sense-Sonde ersetzt wurde, zeigten keine Hybridisierungsreaktion (Abb. 3.1, linke Spalte, kleine Abbildungen).

Der Nachweis von EGF auf Proteinebene gelang in o.g. Geweben mittels Immunhistochemie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers EGF-10 und eines HRP-gekoppelten sekundären anti-Maus-Antikörpers. Alle Schilddrüsenorgane zeigten eine cytosolische Lokalisation des immunoreaktiven EGF in den Thyreocyten (Abb. 3.1, rechte Spalte). In einigen Gewebeschnitten wurde EGF nicht ausschließlich in den Thyreocyten, sondern auch im Cytoplasma interstitieller Zellen nachgewiesen (nicht gezeigt). Parallel durchgeführte Negativ-Kontrollen, bei welchen der Primär-Antikörper durch Blockpuffer ersetzt wurde, zeigten keine Immunreaktion (Abb. 3.1, rechte Spalte, kleine Abbildungen).

Abb. 3.1: Nachweis der proEGF-mRNA-Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung an kryokonservierten Gewebeschnitten (linke Seite) sowie immunhistochemischer Nachweis des EGF an paraffinfixierten Gewebeschnitten (rechte Seite) von PTC, FTC und UTC. Entsprechende Negativ-Kontrollen waren frei von Komplementär-Doppelstrangbildung (linke Seite, kleine Abbildungen) oder Immunreaktion (rechte Seite, kleine Abbildungen).

In-situ*-Hybridisierung:*Immunhistochemie:**

3.1.2 Nachweis der cytoplasmatischen proEGF-Spliceform

3.1.2.1 Nachweis mittels RTr-PCR und Sequenzierung

Der Nachweis von proEGF-mRNA – Expressionsprodukten in den Geweben als auch in den Tumor-Zelllinien der humanen Schilddrüse erfolgte mittels semiquantitativer RTr-PCR. Neben dem erwarteten PCR-Produkt von 450 bp für die cytosolische Domäne des proEGF konnte noch ein zweites Expressionsprodukt von 371 bp nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Die anschließende Aufreinigung und Sequenzierung dieses 371 bp PCR-Produktes zeigte, dass es sich hierbei um eine neuartige *Spliceform* des proEGF handelt. Die komplette cytosolische Domäne des proEGF (proEGF_{cyt}) wird von den Exonen 22, 23 und 24 kodiert. In der proEGF-*Spliceform* liegt eine Deletion der letzten Base von Exon 22 sowie eine Deletion des kompletten Exon 23 vor. In Exon 24 kommt es, bedingt durch die Deletion in Exon 22, zur Verschiebung des Leserasters. Daraus ergibt sich eine auf Exon 22 folgende kodierende Sequenz von 36 Aminosäuren, welche komplett verschieden ist zu der von Exon 24 kodierten Sequenz (Abb. 3.3). Die proEGF-*Spliceform* wird im Folgenden mit proEGF_{del23} abgekürzt.

Abb. 3.2: Nachweis von mRNA-Expressionsprodukten der kompletten cytoplasmatischen Domäne des proEGF (proEGF_{cyt}; A, B) und der *Spliceform* der cytoplasmatischen Domäne (proEGF_{del23}; A) in Isolationen von Total-RNA aus FTC-Gewebe. Die Negativ-Kontrolle, in welcher die cDNA durch Wasser ersetzt wurde, war frei von PCR-Produkten (C). Als interner Standard wurde Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) amplifiziert.

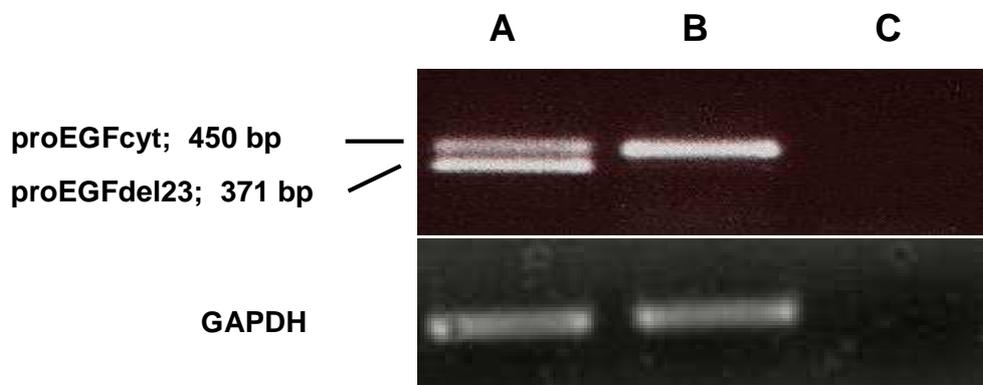


Abb. 3.3: Alignment der Nucleotid- und Aminosäure-Sequenzen von proEGFcyt und proEGFdel23. * bedeuten gleiche Nucleotide, * bedeuten gleiche Aminosäuren.

Exon 22

▼ 1060 1070

T Q K L L S K N P K N P Y E E S S R D
 ACT CAG AAG CTG CTA TCG AAA AAC CCA AAG AAT CCT TAT GAG GAG TCG AGC AGA GAT
 *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** ***
 *

1080 1090

V R S R R P A D T E D G M S S C P Q P
 GTG AGG AGT CGC AGG CCT GCT GAC ACT GAG GAT GGG ATG TCC TCT TGC CCT CAA CCT
 *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** ***
 *

Exon 23

▼ 1100 1110

W F V I K E H Q D L K N G G Q P V A
 TGG TTT GTG GTT ATA AAA GAA CAC CAA GAC CTC AAG AAT GGG GGT CAA CCA GTG GCT
 *** --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 *

Exon 24

1120 1130

G E D G Q A D G S M Q P T S W R Q E
 GGT GAG GAT GGC CAG GCA GCA GAT GGG TCA ATG CAA CCA ACT TCA TGG AGG CAG GAG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 G Q C N Q L H G G R S

1140 1150

P Q L C G M G T E Q G C W I P V S S D
 CCC CAG TTA TGT GGA ATG GGC ACA GAG CAA GGC TGC TGG ATT CCA GTA TCC AGT GAT
 CCC AGT TAT GTG GAA TGG GCA CAG AGC AAG GCT GCT GGA TTC CAG TAT CCA GTG ATA
 P S Y V E W A Q S K A A G F Q Y P V I

1160 1170

K G S C P Q V M E R S F H M P S Y G T
 AAG GGC TCC TGT CCC CAG GTA ATG GAG CGA AGC TTT CAT ATG CCC TCC TAT GGG ACA
 AGG GCT CCT GTC CCC AGG TAA TGG AGC GAA GCT TTC ATA TGC CCT CCT ATG GGA CAC
 R A P V P R &

1180 1190

Q T L E G G V E K P H S L L S A N P L
 CAG ACC CTT GAA GGG GGT GTC GAG AAG CCC CAT TCT CTC CTA TCA GCT AAC CCA TTA
 AGA CCC TTG AAG GGG GTG TCG AGA AGC CCC ATT CTC TCC TAT CAG CTA ACC CAT TAT

1200

W Q Q R A L D P P H Q M E L T Q &
 TGG CAA CAA AGG GCC CTG GAC CCA CCA CAC CAA ATG GAG CTG ACT CAG TGA
 GGC AAC AAA GGG CCN TGG ACC CAC CAC ACC AAA TGG AGC TGA CTC AGT GA

3.1.2.2 Verteilungsmuster von proEGF und proEGFdel23 in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien und Schilddrüsengeweben

Es wurden acht humane Schilddrüsenkarzinomzelllinien als auch humane Schilddrüsenkarzinomgewebe unterschiedlichen Dedifferenzierungsgrades (PTC, FTC, UTC) auf die mRNA-Expression beider cytoplasmatischer proEGF-Isoformen (proEGFcyt und proEGFdel23) untersucht. Die Expression von proEGFcyt- und proEGFdel23-mRNA wurde mittels semiquantitativer RTr-PCR untersucht.

Von allen untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien waren nur die Zelllinien FTC-133 bzw. 8305C frei von endogener proEGF-Expression (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: mRNA-Expressionsmuster der proEGF-Isoformen proEGFcyt bzw. proEGFdel23 in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien. (+) bedeutet schwach exprimiert, + bedeutet stark exprimiert, - bedeutet nicht exprimiert.

| Schilddrüsenkarzinomzelllinie | | proEGFcyt | proEGFdel23 |
|-------------------------------|---------|-----------|-------------|
| follikulär: | FTC-133 | - | - |
| | FTC-236 | (+) | (+) |
| | FTC-238 | + | + |
| papillär: | BCPAP | + | + |
| undifferenziert: | Hth-74 | + | + |
| | C-643 | + | (+) |
| | 8505C | + | + |
| | 8305C | - | - |

Sowohl in den Zelllinien als auch in den untersuchten Geweben der Schilddrüse wurde proEGFdel23 stets in Koexpression mit proEGFcyt nachgewiesen, proEGFcyt hingegen lag auch als singuläres mRNA-Expressionsprodukt vor.

In den untersuchten Schilddrüsenkarzinomgeweben konnten zwei Tendenzen ermittelt werden: mit Zunahme des Dedifferenzierungsgrades der Gewebe stieg der prozentuale Anteil an proEGF-freiem Gewebe (10% in den PTC, 64% in den UTC) bzw. nahm die alleinige Expression von proEGFcyt ab (42% in den PTC, 0% in den UTC; Tab.3.2).

Tabelle 3.2: mRNA-Expressionsmuster der proEGF-Isoformen proEGFcyt und proEGFdel23 in Strumen und Karzinomgeweben zunehmenden Dedifferenzierungsgrades der humanen Schilddrüse (PTC, FTC, UTC).

| Gewebe | Anzahl | Expression von proEGFcyt | Koexpression von proEGFcyt und proEGFdel23 | keine Expression |
|--------|--------|--------------------------|--|------------------|
| Struma | 46 | 59% | 17% | 24% |
| PTC | 40 | 42% | 48% | 10% |
| FTC | 22 | 59% | 18% | 23% |
| UTC | 14 | 0% | 36% | 64% |

Innerhalb der Gruppe der PTC wies ein besonders hoher Anteil der Gewebeproben mit Koexpression beider proEGF-Isoformen das Tumorstadium T3/4 auf (84%, 15 Patienten), während sich nur 16% (4 Patienten) dieser Gewebe im Tumorstadium T1/2 befanden (Abb. 3.4; pTNM-Klassifikation erläutert in 2.1.1).

Abb. 3.4: mRNA-Expressionsmuster der proEGF-Isoformen in Abhängigkeit vom Tumorstadium (T) der getesteten PTC.

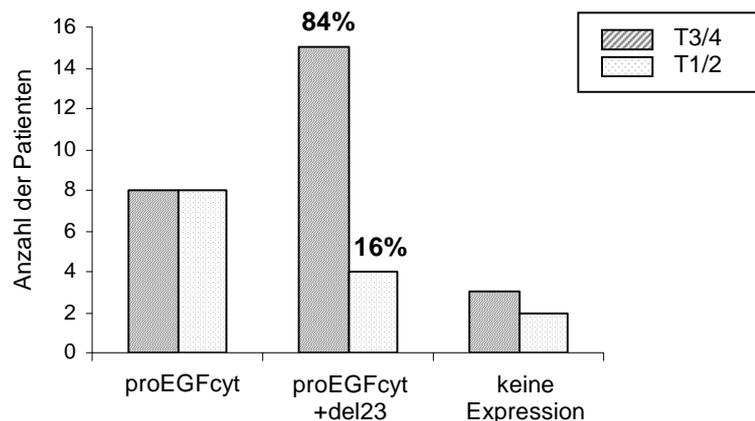


Tabelle 3.3: Liste der in dieser Studie verwendeten papillären (PTC), follikulären (FTC) bzw. undifferenzierten (UTC) Schilddrüsenkarzinomgewebe. „pTNM“ beschreibt die Tumorklassifikation. ProEGF-Isoformen: 0 = keine Expression, 1 = singuläre Expression von proEGFcyt, 2 = Koexpression beider proEGF-Isoformen.

| Gewebe proEGF | | | | Gewebe proEGF | | | | | |
|---------------|----------|-------|---------|---------------|------------|-------|---------|----|----------|
| Iso- | Ge- | Alter | pTNM | Iso- | Ge- | Alter | pTNM | | |
| formen | schlecht | | Tumor | formen | schlecht | | Tumor | | |
| | | | Stadium | | | | Stadium | | |
| PTC | 1 | F | 19 | T4N2Mx | FTC | 1 | F | 60 | T4N0M0 |
| | 1 | F | 10 | T4N2Mx | | 1 | M | 60 | T4NxM2 |
| | 1 | M | 25 | T4aN1bM1 | | 1 | F | 85 | T3NxMx |
| | 1 | F | 27 | T4bN1bMx | | 1 | M | 13 | T3NxMx |
| | 1 | F | 41 | T4N0Mx | | 1 | F | 46 | T3NxM0 |
| | 1 | F | 74 | T4NxMx | | 1 | F | 46 | T3NxM0 |
| | 1 | M | 11 | T3N1Mx | | 1 | M | 65 | T4N0Mx |
| | 1 | M | 36 | T2N1Mx | | 1 | M | 61 | T4NxMx |
| | 1 | M | 33 | T2aN1aMx | | 1 | F | 62 | T4N1bM1 |
| | 1 | M | 63 | T2aN0M0 | | 1 | F | 60 | T4N0Mx |
| | 1 | F | 49 | T2aNxMx | | 1 | F | 51 | T3N1bM0 |
| | 1 | F | 27 | T2N1aMx | | 1 | M | 67 | T3bN1bM1 |
| | 1 | F | 59 | T1N0M0 | | 1 | F | 54 | T2NxMx |
| | 1 | F | 39 | T1N0M0 | | 2 | F | 34 | T4N0M0 |
| | 1 | F | 55 | T1aN0M0 | | 2 | M | 43 | T3N0M0 |
| | 1 | M | 67 | T1bN0Mx | | 2 | M | 63 | T3N0M0 |
| | 2 | F | 58 | T4N0M0 | | 2 | F | 53 | T4N0M0 |
| | 2 | F | 14 | T4N0M0 | | 0 | F | 64 | T4bN1bMx |
| | 2 | F | 14 | T4N1M0 | | 0 | F | 60 | T4NxM1 |
| | 2 | F | 51 | T4N1aM0 | | 0 | F | 60 | T4NxM1 |
| | 2 | F | 70 | T4N1bM1 | | 0 | M | 72 | T3NxM1 |
| | 2 | F | 56 | T4N1bM1 | | 0 | F | 68 | T3NxMx |
| | 2 | F | 31 | T4N1Mx | | | | | |
| | 2 | F | 76 | T4N1Mx | UTC | 2 | F | 72 | T4N2Mx |
| | 2 | F | 33 | T4N1Mx | | 2 | F | 76 | T4N1Mx |
| | 2 | F | 74 | T4NxMx | | 2 | F | 79 | T4N2Mx |
| | 2 | F | 64 | T4NxMx | | 2 | F | 70 | T4N1aMx |
| | 2 | F | 74 | T4NxMx | | 2 | F | 87 | T4N0Mx |
| | 2 | F | 63 | T4NxMx | | 0 | F | 58 | T4N1Mx |
| | 2 | M | 24 | T3N1Mx | | 0 | M | 67 | T4N1xMx |
| | 2 | F | 71 | T3NxMx | | 0 | M | 66 | T4N0M0 |
| | 2 | F | 71 | T3N1M1 | | 0 | M | 52 | T3N0M0 |
| | 2 | F | 46 | T2aN0Mx | | 0 | F | 53 | T4N0M1 |
| | 2 | F | 31 | T2aN1bMo | | 0 | F | 75 | T4N0M1 |
| | 2 | M | 54 | T1aN0M0 | | 0 | F | 68 | T4N0M1 |
| | 0 | F | 84 | T4aN1bM1 | | 0 | F | 42 | T4N0M1 |
| | 0 | F | 11 | T4bN1bMx | | 0 | F | 69 | T3NxMx |
| | 0 | M | 65 | T3N1Mx | | | | | |
| | 0 | F | 47 | T2bN1Mx | | | | | |
| | 0 | F | 53 | T1bN0M0 | | | | | |

Kein Zusammenhang war erkennbar zwischen der Expression der proEGF-Isoformen und dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten (Tab. 3.3). Das Expressionsmuster der proEGF-Isoformen der Strumen entsprach dem der FTC.

Zwischenresümee: Es gelang der Nachweis von neoplastischen wie nicht-neoplastischen humanen Thyreocyten als Entstehungs- und Zielzellen des (pro-) EGF. Weiterhin konnte eine neuartige cytoplasmatische *Spliceform*, proEGFdel23, in humanen Schilddrüsenkarzinomgeweben und -zelllinien identifiziert werden. Die differenzierten PTC und FTC wiesen eine prozentual erhöhte Expression von proEGFcyt bzw. proEGFcyt/proEGFdel23 im Vergleich zu den undifferenzierten Karzinomen auf. Innerhalb der Gruppe der PTC mit Expression von proEGFdel23 wies der hohe Anteil von 84% das Tumorstadium T3/4 auf. In den humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133 und 8305C wurde keine proEGF-Expression nachgewiesen.

3.2 Herstellung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133

3.2.1 Klonierung von proEGFcyt-Konstrukten

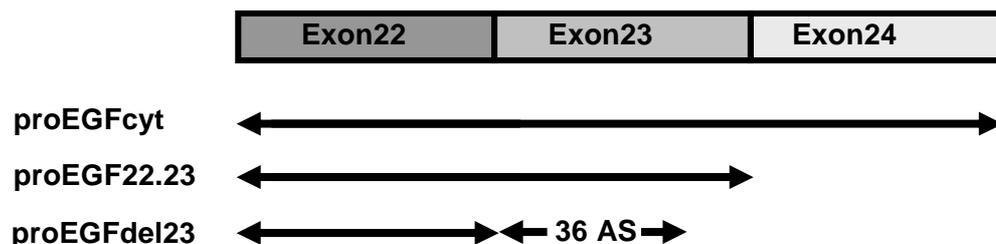
Als Modellsystem in diesem Projekt wurden stabile proEGF-Transfektanten der humanen epithelialen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 etabliert. Die Zelllinie FTC-133 exprimiert kein proEGF und schließt somit Interferenzen des über-exprimierten proEGF mit endogen exprimiertem proEGF aus. Um auch potentielle Interaktionsstellen auf dem proEGF-Molekül identifizieren zu können, wurden FTC-133-Transfektanten hergestellt, welche die cytosolische Domäne des proEGF in unterschiedlicher Länge exprimieren. Die Sequenzen der zu klonierenden proEGF-Moleküle wurden dabei anhand der drei proEGFcyt kodierenden Exone 22, 23 und 24 festgelegt (Abb. 3.5). Um mögliche funktionelle Unterschiede zum proEGFcyt untersuchen zu können, wurde auch die neuartige *Spliceform* des proEGF (proEGFdel23) stabil in FTC-133 transfektiert.

3.2.1.1 Schema der Konstrukte

Folgende proEGF-Sequenzen wurden kloniert und in den eukarioten Expressionsvektor pcDNA4/HisMaxC eingebaut (Abb. 3.5):

1. proEGF kodiert von den Exonen 22, 23 und 24 = proEGFcyt
2. proEGF kodiert von den Exonen 22 und 23 = proEGF22.23
3. die *Spliceform* des proEGF = proEGFdel23

Abb. 3.5: Schema der klonierten proEGF-Sequenzen. AS = Aminosäuren.



3.2.1.2 Herstellung der PCR-Fragmente

Für das Klonieren von proEGFcyt (450 bp) sowie proEGF22.23 (204 bp) wurde das humane Expressionsplasmid phEGF101 (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. G. Bell, Universität von Chicago, IL, USA) verwendet. Die Amplifikation von proEGFdel23 (371 bp) erfolgte unter Verwendung von cDNA der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-238. Die für die Amplifikation aller proEGF-Sequenzen verwendeten Primer (Tabelle 2.1, S. 25) wurden dabei so konstruiert, dass die proEGF-Sequenzen am 5'- bzw. am 3'-Ende die Restriktionsstellen *EcoRI* bzw. *NotI* enthielten und somit in die entsprechenden Vektoren ligiert werden konnten.

3.2.2 Selektion und Nachweis positiver Transfektanten mittels Western-Blot

Für die stabilen Transfektionen wurden die proEGF-Sequenzen in den eukarioten Expressionsvektor pcDNA4/HisMaxC ligiert. In diesen Vektor einklonierte Sequenzen werden am 5'-Ende (N-terminal) mit der Nukleotidsequenz eines Tags (Xpress-Tag) fusioniert exprimiert. Das Xpress-Tag besteht aus einer Sequenz von 7 Aminosäuren, welche in humanen Zellen nicht vorkommt und somit eine spezifische Detektion Xpress-Tag-markierter Proteine erlaubt. Die Selektion stabiler Transfektanten mit proEGF-Expression erfolgte mittels Western-Blot-Analyse der Zelllysate der Transfektanten unter Verwendung eines monoklonalen Anti-Xpress-Antikörpers (Abb. 3.6). Als Negativ-Kontrollen wurden FTC-133 mit dem Leervektor pcDNA4/HisMaxC stabil transfektiert. Die selektierten Klone wurden in Abständen von maximal sechs Monaten mittels RTr-PCR auf die Expression der proEGF-mRNA-Sequenzen sowie mittels Western-Blot auf die Produktion der proEGF-Xpress-Fusionsproteine getestet. Alle folgenden präsentierten Ergebnisse wurden an mindestens zwei, in der Regel jedoch drei Klonen mit stabiler Expression des entsprechenden proEGF-Peptides bzw. des Leervektors geprüft.

Abb. 3.6: Western-Blot-Detektion der stabil transfektierten proEGF-Moleküle in Zelllysaten der FTC-133-Transfektanten.



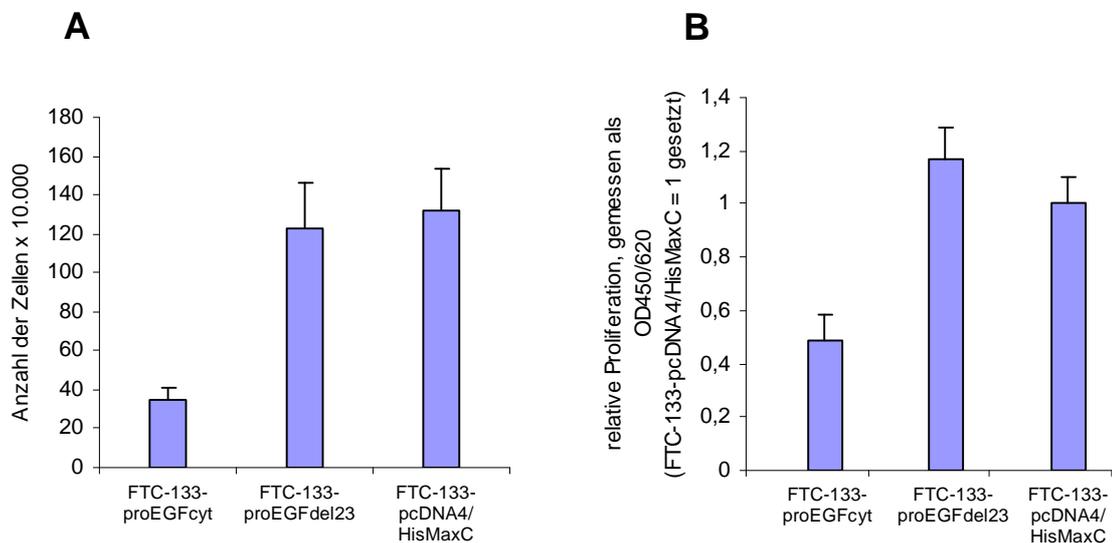
3.3 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Proliferations- und Motilitätsverhalten von FTC-133

3.3.1 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Proliferation

Der Einfluss der Expression von proEGFcyt auf die Proliferation in FTC-133 wurde mittels zweier verschiedener Proliferationsassays, der Zellzählung sowie des BrdU-Assays, untersucht. Für die Zellzählung wurden die stabilen Transfektanten in gleicher Zellzahl ausgesät, über einen definierten Zeitraum kultiviert, anschließend die Zellen vom Kulturgefäß gelöst und gezählt. In der Methode des BrdU-ELISA wird das Desoxythymidin-Analogon 5'-Brom-2'-desoxyuridin während der DNA-Synthese in proliferierende Zellen eingebaut. Das inkorporierte BrdU wird im ELISA detektiert, wobei die Menge des BrdU im direkten Verhältnis zu der Anzahl der in einem bestimmten Zeitraum geteilten Zellen steht.

Die Zellzählung ergab eine um 73% verringerte Proliferation in FTC-133-proEGFcyt und eine um 7,1% verringerte Proliferation in FTC-133-proEGFdel23 im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (Abb. 3.7A). Mittels BrdU-Assay wurde in FTC-133-proEGFcyt eine um 52% verringerte Proliferation im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC bestimmt. FTC-133-proEGFdel23 zeigte eine um 17% erhöhte Proliferation im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (Abb. 3.7B).

Abb. 3.7: Bestimmung der Proliferation in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mittels (A) Zellzählung und (B) BrdU-Assay. Repräsentatives Beispiel aus je drei unabhängig durchgeführten Assays.



3.3.2 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Motilität von FTC-133

Die Bestimmung der Motilität, dem Wachstumsverhalten in 3D-Matrices (Koloniebildung) und der Migrationsfähigkeit dienen der Untersuchung des Einflusses von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Metastasierungsverhalten von FTC-133.

Der Einfluss der Expression von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Motilität von FTC-133 wurde mittels Transwellkammern, welche eine unbeschichtete Polyethylen-Membran bestimmter Porengröße enthielten, getestet. Durch die 8 μm großen Poren können die Zellen nur durch aktives Wandern hindurch gelangen. Die Zellen der Transfektanten wurden in gleicher Zellzahl eingesät, über einen definierten Zeitraum kultiviert, anschließend die Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert und angefärbt (Abb. 3.8). Von jeder Membran wurden fünf Aufnahmen (Nord, Ost, Süd, West, Mitte; Größe 1 mm^2) gemacht, um das Ergebnis statistisch absichern zu können, und die darauf befindlichen Zellen gezählt. Nach 24 h Kultur wurden für FTC-133-proEGFcyt durchschnittlich 73 gewanderte Zellen pro mm^2 Membran gezählt, für FTC-133-pcDNA4/HisMaxC durchschnittlich 148 Zellen pro mm^2 Membran. Die Motilität von FTC-133 mit Expression von proEGFcyt war somit um die Hälfte reduziert (Abb. 3.9).

Abb. 3.8: Toluidinblaufärbung von Zellen auf einer Transwell-Polyethylen-Membran. Die 8 μm großen Poren sind statistisch auf der Membran verteilt. Durch das Toluidinblau wird der Kern stärker angefärbt als das Cytoplasma.

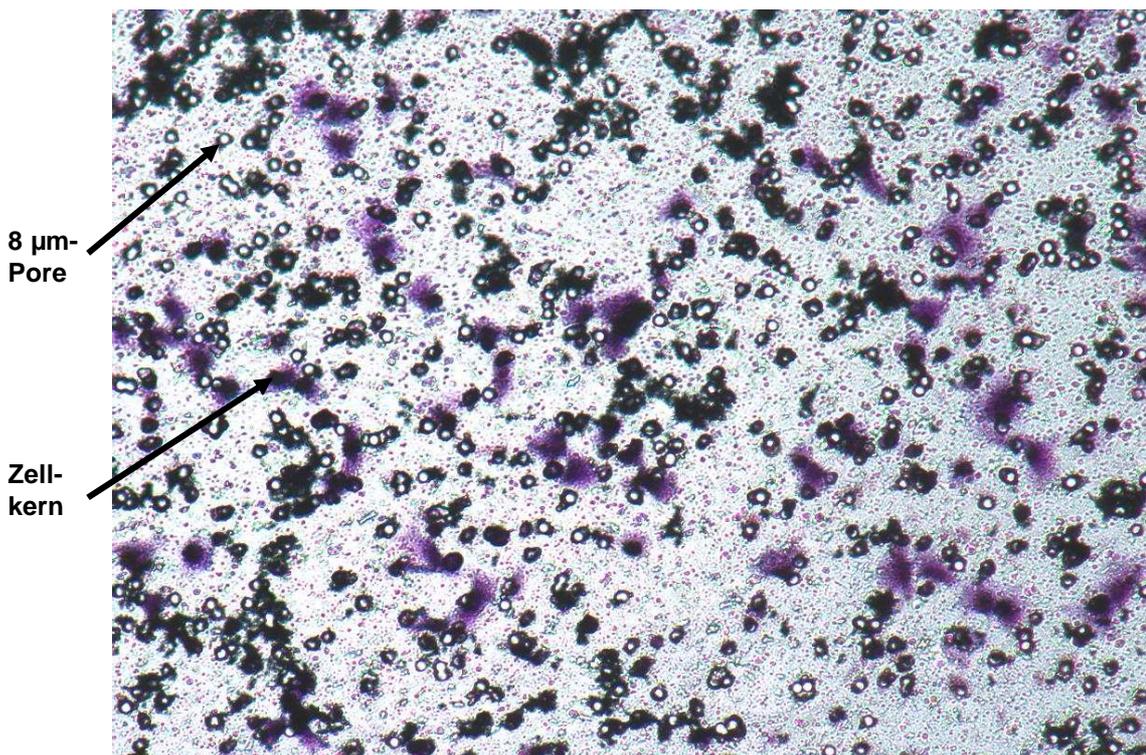
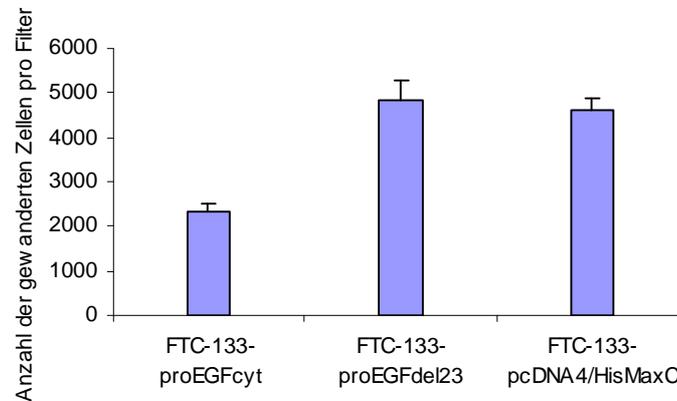


Abb. 3.9: Bestimmung der Motilität von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mittels eines 8 µm Porenfilter-Motilitäts-Assays. Repräsentatives Beispiel aus drei unabhängig durchgeführten Assays.

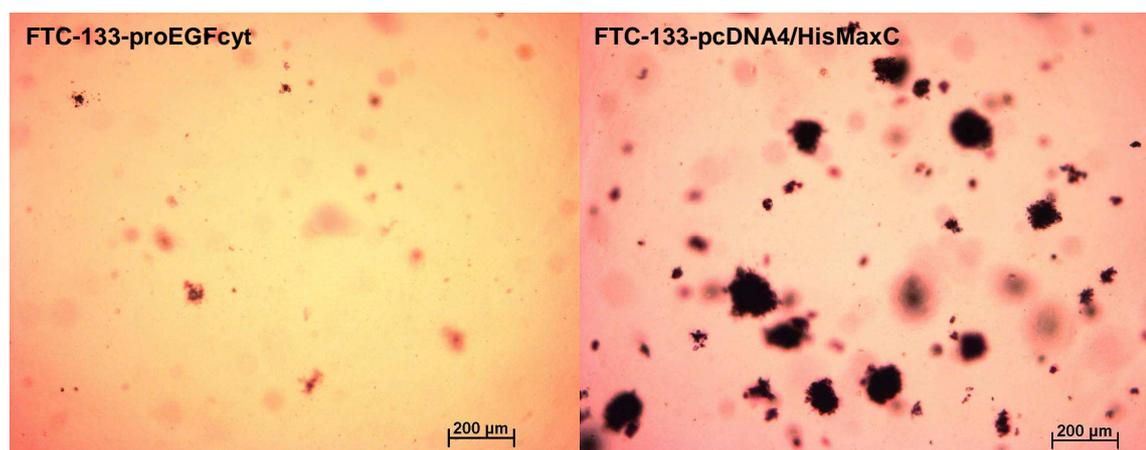


3.3.3 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Wachstum von FTC-133 in 3D-Matrices (Koloniebildung)

Mit Hilfe des Soft-Agar-Tests kann das Wachstumsverhalten von Zellen unter nicht adhärennten Bedingungen, d.h. das Wachstumsverhalten in sie umgebenden dreidimensionalen Matrices bestimmt und somit weitere Informationen über das Metastasierungsverhalten von Zellen erlangt werden. Im Soft-Agar-Test wurden die stabilen Transfektanten in eine gelartige Agarschicht eingebettet und 3 Wochen bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die entstanden en Kolonien mit Iodnitrotetrazoliumchlorid angefärbt. Dieses Substrat kann nur von lebenden Zellen umgesetzt werden, wodurch eine Blaufärbung der Kolonien hervorgerufen wird.

In Abb. 3.10 sind die unterschiedlich großen Kolonien von FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC abgebildet.

Abb. 3.10: Iodnitrotetrazoliumchlorid-Färbung von im Soft-Agar-Test gebildeten Kolonien von FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC .



Aus der 6-Well-Agarplatte wurden von fünf Bereichen Aufnahmen gemacht (Nord, Ost, Süd, West, Mitte; Größe 2 mm²), in welchen die darin befindlichen Kolonien gezählt und vermessen wurden. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 3.11 und Abb. 3.12 dargestellt.

In den eingesetzten Zellzahlen von 2×10^4 , 5×10^4 und 1×10^5 wurden von FTC-133-proEGFcyt durchschnittlich 34, 54 und 72 Kolonien pro 2 mm², von FTC-133-proEGFdel23 durchschnittlich 68, 103 und 139 sowie von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC durchschnittlich 64, 94 und 143 Kolonien pro 2 mm² gebildet (Abb. 3.11). Damit wies FTC-133-proEGFcyt in allen drei eingesetzten Zellzahlen jeweils nur die halbe Anzahl der im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC gebildeten Kolonien auf.

Die von FTC-133-proEGFcyt gebildeten Kolonien waren zudem deutlich kleiner. Im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 mit 31%, 25% und 25% sowie zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mit 34%, 39% und 37% wies ca. die doppelte Anzahl der von FTC-133-proEGFcyt gebildeten Kolonien (67%, 82% und 77%) Durchmesser kleiner als 20 µm auf. 32%, 17% und 17% der von FTC-133-proEGFcyt, 49%, 53% und 57% von FTC-133-proEGFdel23 sowie 48%, 5% und 48% der von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC gebildeten Kolonien hatten Durchmesser von 20-40 µm. Nur der geringe Prozentsatz von 1,2%, 0,84% und 5,6% von FTC-133-proEGFcyt bildete Kolonien mit einem Durchmesser größer als 40 µm, während 21%, 22% und 18% der Kolonien von FTC-133-proEGFdel23 sowie 18%, 20% und 14% der Kolonien von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC diese Größe überschritten (Abb. 3.12).

Abb. 3.11: Anzahl der gebildeten Kolonien im Soft-Agar von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Repräsentatives Beispiel aus drei durchgeführten Assays.

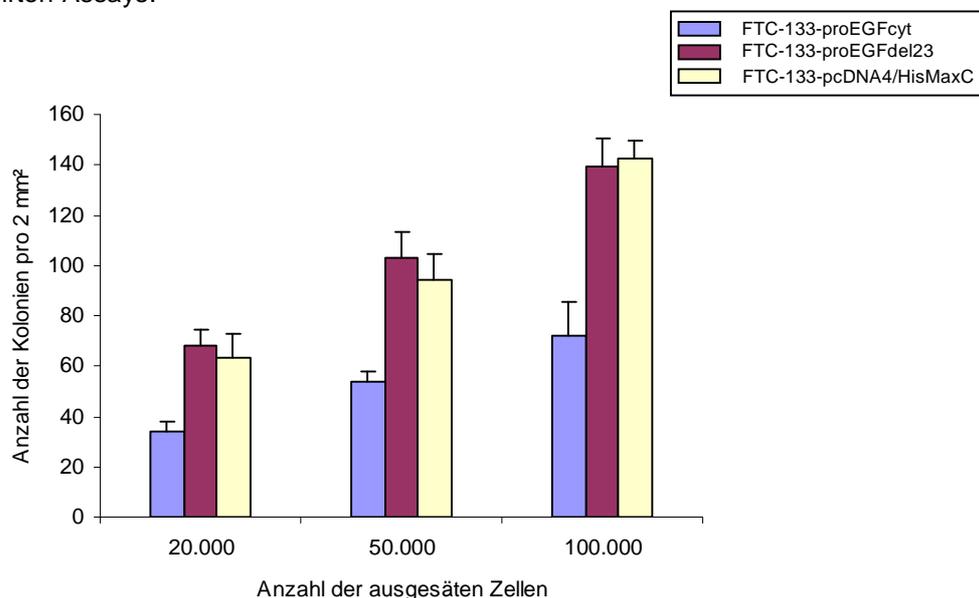
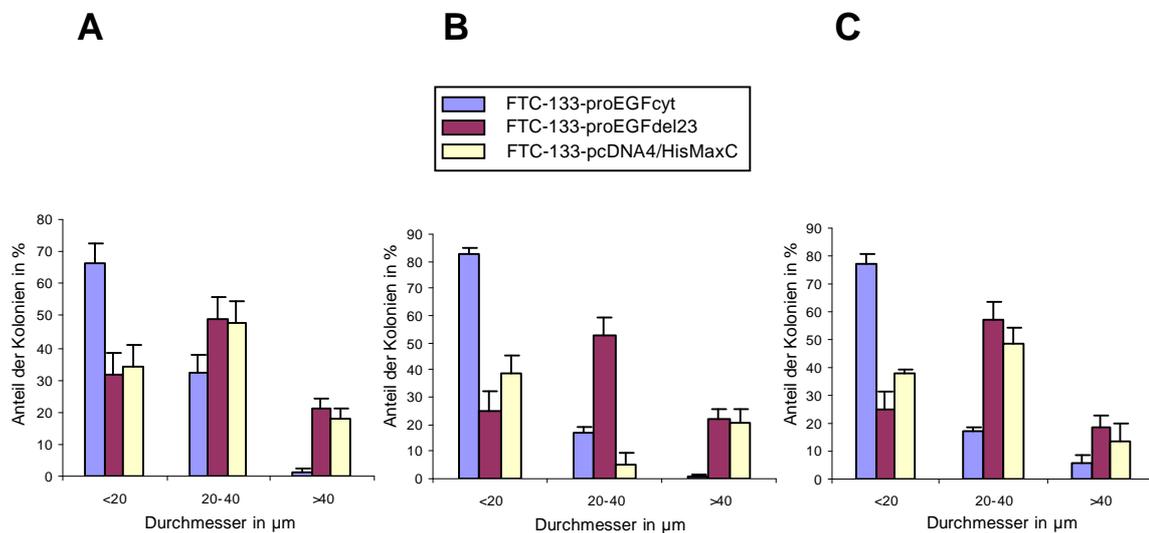


Abb. 3.12: Bestimmung der Größen der im Soft-Agar gebildeten Kolonien von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC bei 20.000 (A), 50.000 (B) und 100.000 (C) ausgesäten Zellen. Repräsentatives Beispiel aus drei durchgeführten Assays.



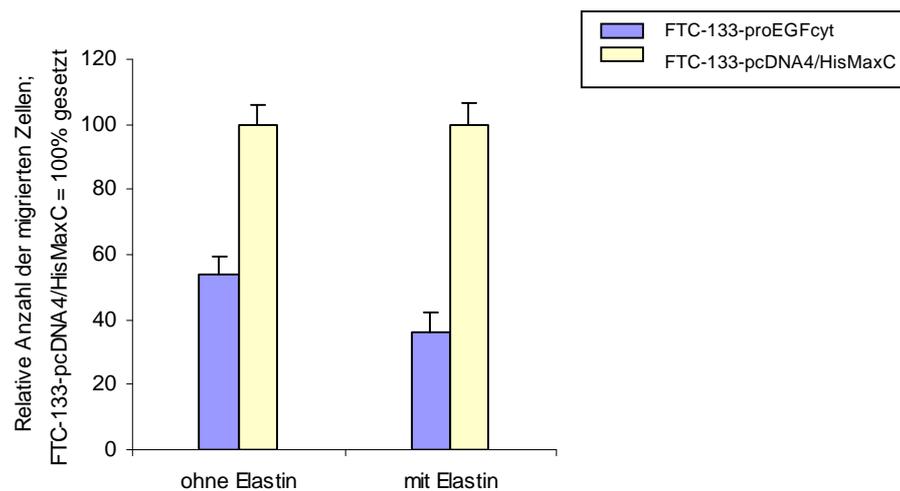
3.3.4 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Migration von FTC-133

Die Migration von Zellen beschreibt deren Fähigkeit, bestimmte Matrices zu durchwandern. Die extrazelluläre Matrix umgibt als ein komplexes Geflecht extrazellulärer Makromoleküle die Zellen aller Gewebe als ein geordnetes Gerüst, in dem Zellen wandern und miteinander in Kontakt treten können. Ein lokal begrenzter Abbau von Matrix-Bestandteilen ist unter anderem erforderlich, wenn Karzinomzellen von ihrer Entstehungsstelle über Blut- und Lymphkreislauf in weit entfernte Organe gelangen, d.h. metastasieren. Die Untersuchung der Migration der Transfektanten liefert somit eine wichtige Information über den Einfluss der Expression von proEGFcyt und proEGFdel23 auf das Metastasierungsverhalten von FTC-133.

Es wurde die Migrationsfähigkeit der Transfektanten durch Elastinmatrices getestet. Dazu wurden die Polyethylen-Membranen der in Abschnitt 3.3.2. beschriebenen Transwellkammern mit Elastin beschichtet. Die Zellen der Transfektanten wurden in gleicher Zellzahl auf die Elastinmatrix-Membranen gesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert und angefärbt. Um das Ergebnis statistisch absichern zu können, wurden von jeder Membran fünf Aufnahmen (Nord, Ost, Süd, West, Mitte; Größe 1 mm²) gemacht und die darauf befindlichen Zellen gezählt.

Abb. 3.13 zeigt die Anzahl der gewanderten Zellen durch Polyethylenmembranen mit und ohne Elastinbeschichtung. Im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC migrierten nur die Hälfte der Zellen von FTC-133-proEGFcyt durch die unbeschichteten Membranen (siehe auch Abschnitt 3.3.2.). Die Anzahl der durch die Membran gewanderten Zellen von FTC-133-proEGFcyt konnte durch die Elastin-Matrix um weitere 32,7% gesenkt werden. Die Anzahl der durch die Membran gewanderten Zellen von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC wurde durch die Elastin-Matrix nicht vermindert. Somit zeigte nur FTC-133-proEGFcyt eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit durch die Elastin-Matrix (Abb. 3.13).

Abb. 3.13: Bestimmung der Migrationsfähigkeit durch eine Elastinmatrix von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mittels eines Elastin-beschichteten 8 µm Porenfilter-Migrationsassays.



3.3.5 Einfluss von proEGFcyt und proEGFdel23 auf die Apoptose-Neigung

Es sollte geprüft werden, ob die verringerte Proliferation von FTC-133-proEGFcyt mit einer gesteigerten Apoptose-Neigung dieser Zellen korreliert. Dies wurde mit Hilfe des *TUNEL*-Test's untersucht. Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Markierung apoptotisch induzierter DNA-Oligonukleotide, welche in Zellen unter Apoptose entstehen. Diese Doppel- oder Einzelstrang-Oligonukleotide weisen freie 3'-OH-Enden auf, an welche die Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) Fluorescein-markiertes dUTP einbaut (*TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling*). Die so markierten Nukleotide können dann fluoreszenz-mikroskopisch detektiert werden.

Es konnten keine Unterschiede in der Apoptose-Neigung von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC festgestellt werden (nicht gezeigt).

Zwischenresümee: Die Expression von proEGFcyt in FTC-133 führte zu einer signifikant verringerten Proliferation und Motilität der Zellen. Die Anzahl der im Soft-Agar gebildeten Kolonien war um die Hälfte reduziert. Die durchschnittliche Größe der gebildeten Kolonien war deutlich verringert. Durch die Elastinmatrix konnten FTC-133 mit Expression von proEGFcyt nur eingeschränkt migrieren.

Die Expression von proEGFdel23 setzte die Proliferation von FTC-133 leicht herauf. Die Motilität sowie die Anzahl und Größe der gebildeten Kolonien wurde durch die Expression von proEGFdel23 nicht beeinflusst. Durch die Elastinmatrix konnten FTC-133 mit Expression von proEGFdel23 uneingeschränkt migrieren.

Es konnte kein Einfluss der Expression von proEGFcyt oder proEGFdel23 auf die Apoptose-Neigung von FTC-133 festgestellt werden.

3.4 Untersuchung potentieller Mechanismen der proEGFcyt-Funktionen

3.4.1 Lokalisation des proEGFcyt

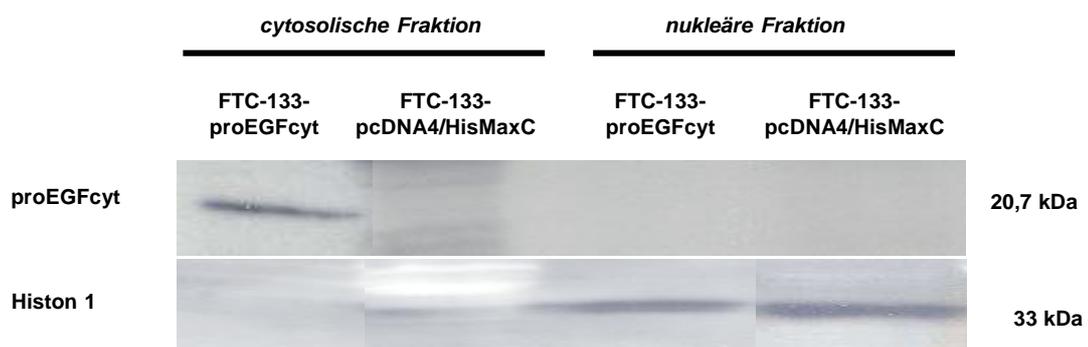
3.4.1.1 Immunhistochemie / Immunfluoreszenz

Eine immunhistochemische oder immunfluoreszenz-mikroskopische Lokalisation der stabil exprimierten proEGF-Moleküle in den FTC-133-Zellen war mangels eines geeigneten kommerziellen Antikörpers nicht möglich. Die Generierung eines Antikörpers gegen die cytosolische Domäne des proEGF führte aufgrund der geringen spezifischen Immunogenität der proEGFcyt-Sequenz nur zu gering affinen polyklonalen Antikörpern mit zu geringem spezifischen Immunsignal und konnte somit nicht eingesetzt werden.

3.4.1.2 Fragmentierung des Zelllysates

Eine Lokalisation des proEGFcyt im Cytosol, nicht aber im Kern der stabilen FTC-133-Transfektanten war mittels einer Fraktionierung des Zelllysates in cytosolische sowie nukleäre Fraktion und anschließender Western-Blot-Detektion des Xpress-proEGFcyt-Fusionsproteins in beiden Fraktionen unter Verwendung des Anti-Xpress-Antikörpers möglich. Xpress-proEGFcyt wurde nur in der cytosolischen Fraktion von FTC-133-proEGFcyt, nicht aber in der cytosolischen Fraktion der Leerplasmidkontrolle FTC-133-pcDNA4/HisMaxC oder den nukleären Fraktionen von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC detektiert. Um eine mögliche Verunreinigung der cytosolischen Fraktion durch die nukleäre Fraktion auszuschließen, wurde Histon 1 als ein nukleäres Markerprotein detektiert. Histon 1 wurde in der cytosolischen Fraktion von FTC-133-proEGFcyt nicht nachgewiesen (Abb. 3.14).

Abb. 3.14: Western-Blot-Detektion des proEGFcyt in der cytosolischen Fraktion, nicht aber in der nukleären Fraktion von Zelllysaten von FTC-133-proEGFcyt. FTC-133-pcDNA4/HisMaxC zeigte keine proEGF-Expression.



3.4.2 Einfluss von proEGFcyt auf das Cytoskelett in FTC-133

Die untersuchten stabilen Transfektanten konnten phänotypisch in zwei Gruppen unterschieden werden:

- (I) FTC-133-proEGFdel23 und die FTC-133-pcDNA4/HisMaxC zeigten den gleichen Phänotyp.
- (II) FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 zeigten den gleichen Phänotyp. Dieser unterschied sich zum Phänotyp von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC und FTC-133-proEGFdel23 durch einen deutlich größeren und ausladenderen Zellkörper (Abb. 3.15).

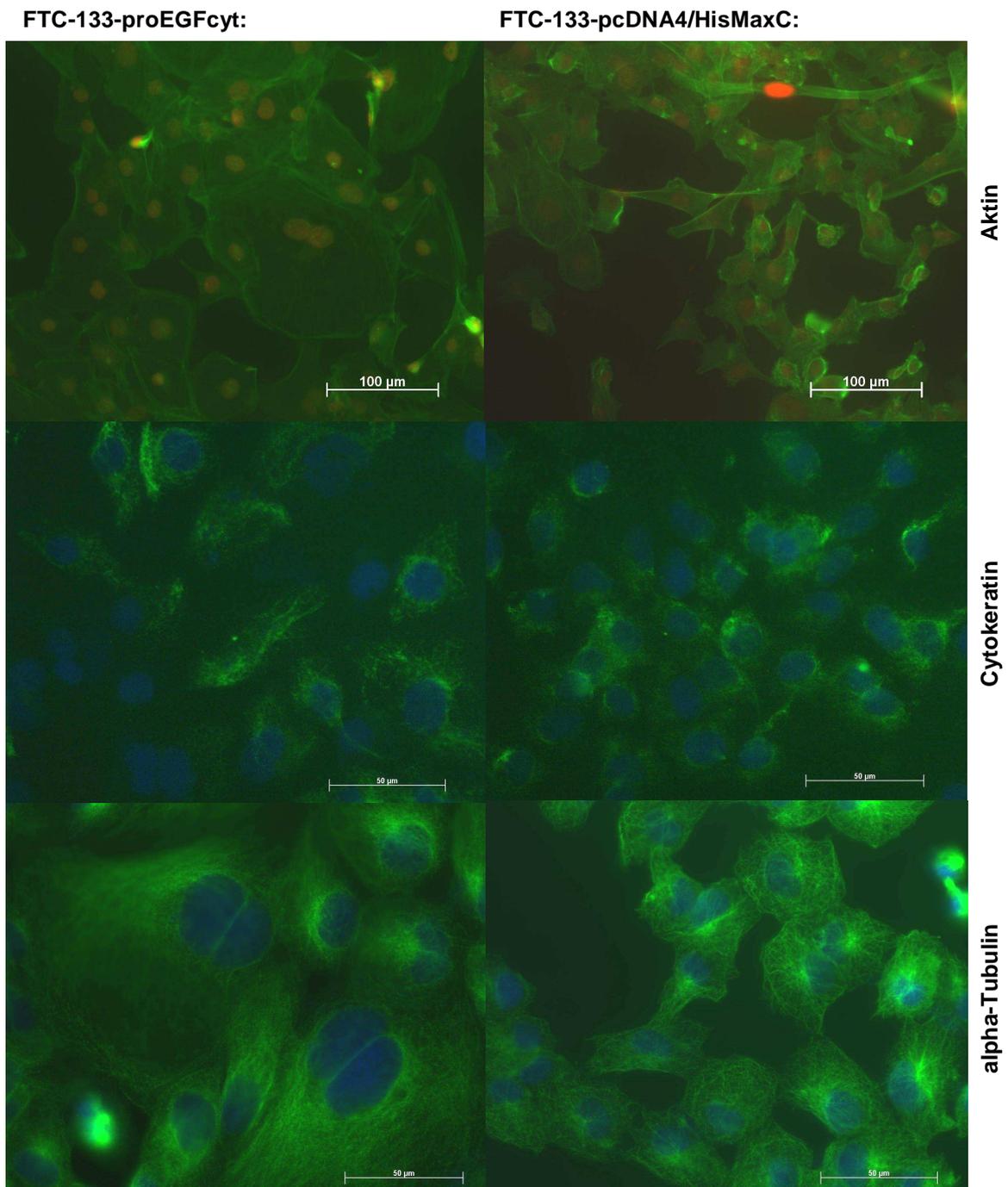
Es wurde eine Analyse des für die Zellform in großem Maße verantwortlichen Cytoskeletts durchgeführt. Untersucht wurden drei cytoskelettale Hauptkomponenten: Aktin, Cytokeratine als epitheliale Intermediärfilamente sowie Tubuline.

In allen folgenden immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen wurden zur besseren Übersicht immer FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC dargestellt.

3.4.2.1 Struktur-Untersuchung des Cytoskeletts: Aktin-, Cytokeratin-, Tubulin-Färbungen

Die Untersuchung der Filamentstrukturen von Aktin-, Cytokeratin- und Tubulin erfolgte immunfluoreszenz-mikroskopisch. Es konnten keine phänotypischen Unterschiede der Filamentstrukturen von Aktin- oder Cytokeratin in den stabilen Transfektanten nachgewiesen werden (Abb. 3.15, obere und mittlere Reihe). Einen deutlichen Unterschied zeigte die Filamentstruktur der Mikrotubuli, welche durch Immunfluoreszenz-Färbung des alpha-Tubulins detektiert wurde. Im Unterschied zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC wiesen die Mikrotubuli in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 weniger kondensierte, homogen verteilte Filamentstrukturen auf (Abb. 3.15, untere Reihe; Anhang Abb. A1).

Abb. 3.15: Immunfluoreszenz-Färbungen von Aktin, Cytokeratin und alpha-Tubulin in FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.



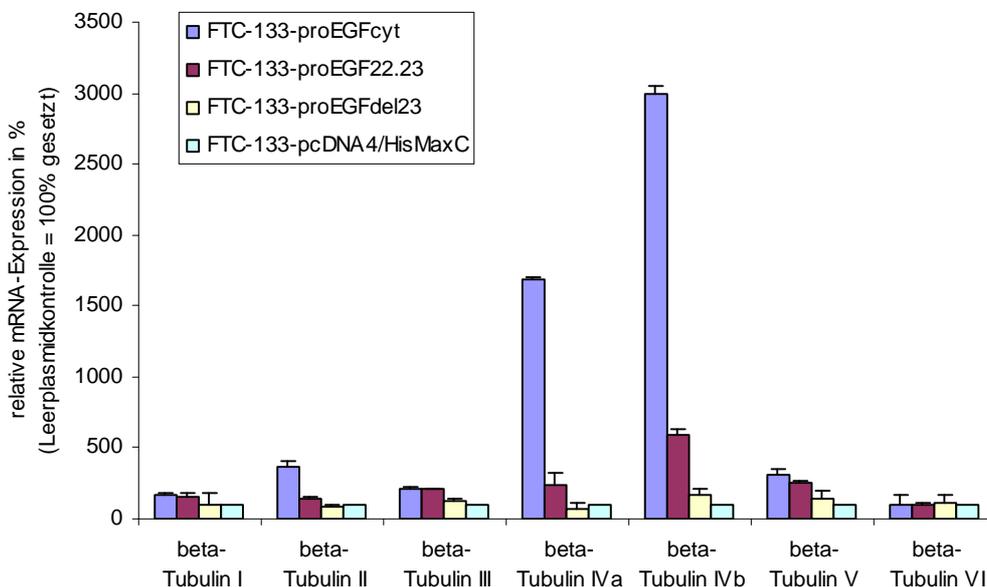
3.4.2.2 Koimmunopräzipitation: proEGFcyt – Tubulin

Es war nachzuprüfen, ob die Veränderungen der mikrotubulären Filamentstrukturen durch eine direkte Interaktion von proEGFcyt oder proEGF22.23 mit den Mikrotubuli hervorgerufen wurde. In der dazu durchgeführten Koimmunopräzipitationsstudie war keine direkte Interaktion von proEGFcyt mit alpha- oder beta-Tubulin nachweisbar (nicht gezeigt).

3.4.2.3 Beta-Tubulin-Isotypen

Alpha-Tubulin wird in humanen Zellen in sieben Isoformen, beta-Tubulin in acht Isoformen exprimiert. Zelllinien, Tumoren sowie Gewebe weisen entwicklungspezifische Expressionsmuster der beta-Tubulin-Isoformen auf. Diese stehen in Korrelation zur Mikrotubuli-Dynamik sowie zum Bindungsverhalten der Mikrotubuli zum Aktin-Gerüst. Es war zu prüfen, ob die Expression von proEGFcyt zu einem veränderten beta-Tubulin-Isoformenmuster führt. Die Analyse der Expression spezifischer beta-Tubulin-Isoformen mittels Q-PCR zeigte eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der beta-Tubuline der Klasse IVa (17-fach erhöht) bzw. IVb (30-fach erhöht) in FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC war in FTC-133-proEGF22.23 die mRNA-Expression von beta-Tubulin IVa 2,4-fach, die von beta-Tubulin IVb 6-fach erhöht. Das mRNA-Expressionsmuster der beta-Tubulin-Isoformen in FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.16).

Abb. 3.16: Q-PCR-Analyse der beta-Tubulin-Isoformen I-VI in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Es wurden zwei unabhängige Ansätze nach doppelt durchgeführter Q-PCR ausgewertet.



3.4.2.4 Posttranslationale Tubulin-Modifikationen: Detyrosinierung, Polyglutamylierung, Acetylierung

Mikrotubuli können verschiedenen posttranslationalen Modifikationen unterliegen, welche die Stabilität der Mikrotubuli sowie das Bindungsverhalten der Mikrotubuli zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beeinflussen. Untersucht wurden die C-terminale Detyrosinierung des alpha-Tubulins, die Polyglutamylierung des alpha- und beta-Tubulins sowie die N-terminale Acetylierung des alpha-Tubulins. Die Struktur-Untersuchungen der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen erfolgten immunfluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper.

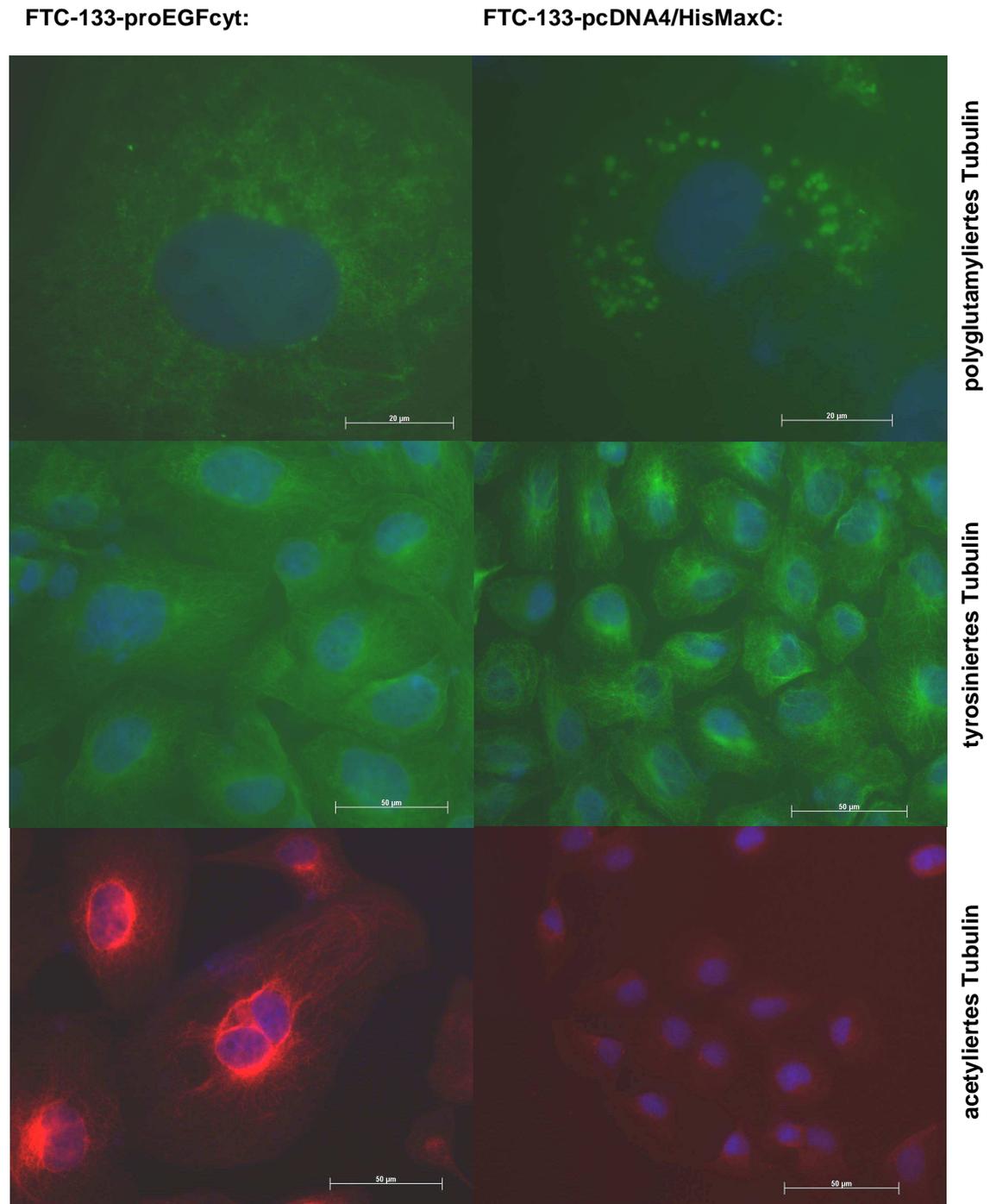
3.4.2.4.1 Struktur-Untersuchung posttranslationaler Tubulin-Modifikationen

Die Polyglutamylierung von Mikrotubuli beeinflusst die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs). Diese Art der Regulation ist abhängig von der Länge der Polyglutamyl-Kette und zeigt eine erhöhte Affinität des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP2 bei weniger als drei Einheiten pro Polyglutamyl-Strang (Bonnett et al., 2001). Das Fluoreszenzsignal des spezifisch detektierten polyglutamylierten Tubulins war in den stabilen Transfektanten vergleichbar. Das polyglutamylierte Tubulin war in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 als kleine punktförmige Strukturen im gesamten Cytoplasma der Zellen lokalisiert, während in FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC größere, kondensierte punktförmige Strukturen kernnah lokalisiert wurden (Abb. 3.17, obere Reihe; Anhang Abb. A2).

Die Anlagerung eines Acetylrestes an das Lysin40 am N-Terminus des alpha-Tubulins (Acetylierung) gilt als charakteristische Modifikation stabilisierter Mikrotubuli. Ebenso wird die Abspaltung eines C-terminalen Tyrosinrestes des alpha-Tubulins (Detyrosinierung) als Charakteristikum stabilisierter Mikrotubuli diskutiert. Das Immunfluoreszenzsignal und Verteilungsmuster des tyrosinierten Tubulins war in allen untersuchten stabilen Transfektanten vergleichbar (Abb. 3.17, mittlere Reihe).

Die Detektion des acetylierten alpha-Tubulins zeigte ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal, besonders im kernnahen Bereich von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (Abb. 3.17, untere Reihe; Anhang Abb. A3).

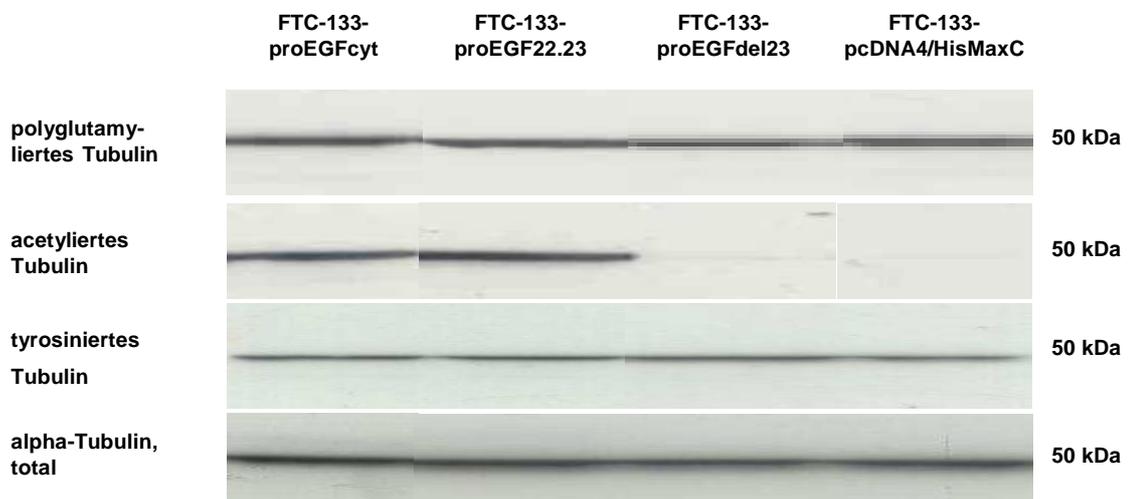
Abb. 3.17: Immunfluoreszenz-Färbungen von polyglutamyliertem (obere Reihe), tyrosiniertem (mittlere Reihe) und acetyliertem Tubulin (untere Reihe) in FTC-133-proEGFcyt (linke Seite) im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (rechte Seite). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.



3.4.2.4.2 Western-Blot-Analyse der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen

Es konnten keine quantitativen Unterschiede polyglutamylierten oder tyrosinierten Tubulins zwischen den untersuchten stabilen Transfektanten festgestellt werden. Der Anteil acetylierten alpha-Tubulins war im Vergleich zur totalen Menge alpha-Tubulin in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 signifikant erhöht (Abb. 3.18).

Abb. 3.18: Western-Blot-Analyse von polyglutamyliertem, acetyliertem und tyrosiniertem Tubulin in Zelllysaten von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Als interner Standard wurde die Totalmenge alpha-Tubulins, d.h. sowohl modifiziertes als auch unmodifiziertes alpha-Tubulin detektiert.



3.4.2.4.3 Nachweis erhöhter mikrotubulärer Stabilität: Inkubationen mit Taxol und Nocodazol

Ein erhöhter Acetylierungsstatus des alpha-Tubulins ist ein charakteristisches Merkmal erhöhter mikrotubulärer Stabilität. Das zu den Diterpenoiden zählende Taxol und das Benzimidazolcarbammat Nocodazol sind in der Lage, stabilisierend bzw. destabilisierend in die Dynamik der Mikrotubuli einzugreifen. Taxol lagert sich in eine hydrophobe Tasche auf der luminalen Seite der beta-Tubulin-Untereinheit der Protofilamente an und hat seine stabilisierende Wirkung durch Verstärkung der lateralen Interaktionen zwischen den Protofilamenten. Nocodazol verhindert die Polymerisation durch Anbindung an die Tubulin-Dimere.

Es war zu prüfen, ob der erhöhte Acetylierungsstatus in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 mit erhöhter mikrotubulärer Stabilität einhergeht. Dazu wurden

die Zellen mit Taxol oder Nocodazol inkubiert und anschließend deren Acetylierungsstatus sowohl immunfluoreszenz-mikroskopisch wie auch im Western-Blot untersucht. Nach Behandlung von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 mit dem Mikrotubuli-Stabilisator Taxol konnte keine weitere Erhöhung des Acetylierungsstatus beobachtet werden (Abb. 3.19A, C). Nach Behandlung von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 mit dem Mikrotubuli destabilisierenden Agens Nocodazol konnte eine Abnahme des Acetylierungsstatus sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western-Blot detektiert werden (Abb. 3.19A, E; Abb. 3.20).

Nach Behandlung von FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mit Taxol konnte eine Erhöhung des Acetylierungsstatus in der Immunfluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.19B, D). Nocodazol hingegen bewirkte keine weitere Abnahme des Acetylierungsstatus (Abb. 3.19B, F). Keine Veränderungen nach Taxol- oder Nocodazol-Behandlung konnten bei den posttranslationalen Modifikationen Polyglutamylierung und Tyrosinierung detektiert werden (nicht gezeigt).

Abb. 3.19: Immunfluoreszenz-Färbungen von acetyliertem Tubulin in FTC-133-proEGFcyt (A, C, E) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (B, D, F) unbehandelt (obere Reihe), nach Behandlung mit Taxol (mittlere Reihe) und nach Behandlung mit Nocodazol (untere Reihe). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.

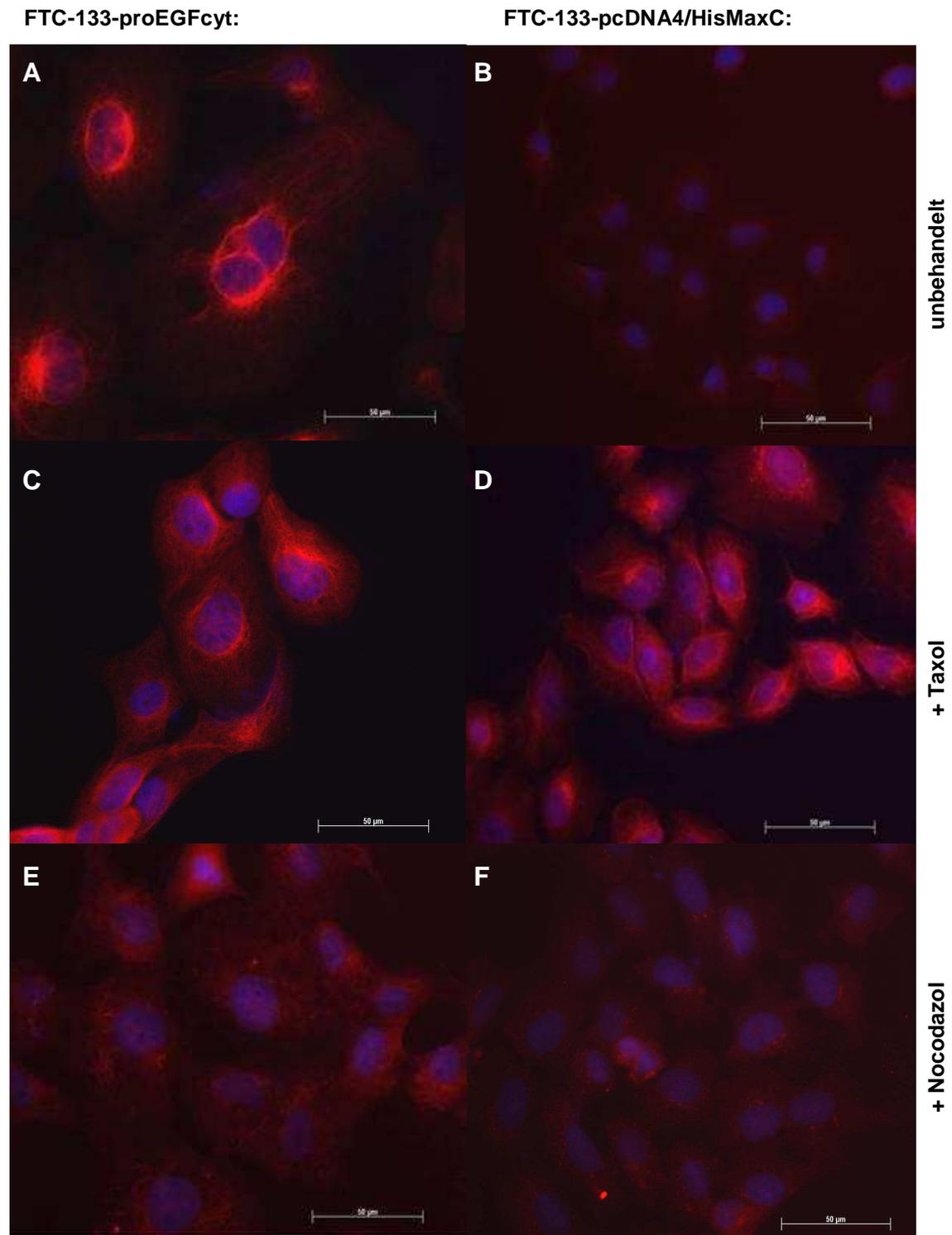
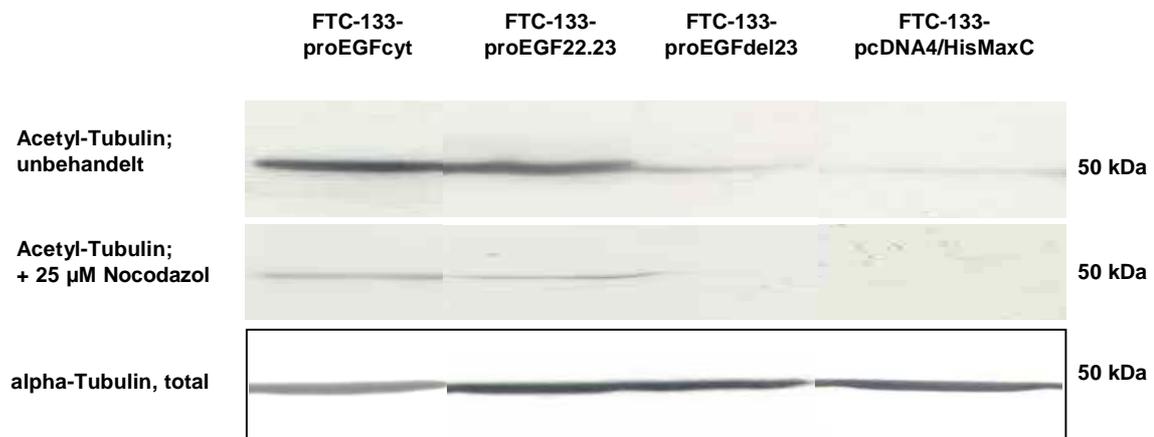


Abb. 3.20: Western-Blot-Detektion von acetyliertem Tubulin in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC unbehandelt und nach Behandlung mit Nocodazol. Als interner Standard wurde der Totalgehalt von alpha-Tubulin detektiert.



3.4.2.5 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Mikrotubuli besitzen die sogenannten Mikrotubuli-assoziierten Proteine. Affimetrix-Chip-Analysen von FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC zeigten dabei eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1a, MAP1b sowie MAP2c, während andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine, wie z.B. die große Gruppe der tau-Proteine, keine Veränderungen in der mRNA-Expression zeigten (nicht gezeigt). Es wurde die Expression von MAP1a, MAP1b sowie MAP2 untersucht. Die Q-PCR-Analyse zeigte in FTC-133-proEGFcyt eine ca. 55-fache, in FTC-133-proEGF22.23 eine 11-fache sowie in FTC-133-proEGFdel23 eine ca. 2-fache Erhöhung der mRNA-Expression von MAP1a im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Für MAP1b zeigte die Q-PCR-Analyse in FTC-133-proEGFcyt eine ca. 6-fache, in FTC-133-proEGF22.23 eine 3,4-fache sowie in FTC-133-proEGFdel23 eine 1,6-fache Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (Abb. 3.21). MAP2 wird in vier Isoformen exprimiert. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie dieser vier Isoformen war eine Q-PCR-Analyse nicht möglich. Die Primer konnten nur so konstruiert werden, dass jeweils zwei MAP2-Isoformen zugleich amplifiziert werden und somit eine Quantifizierung mittels Q-PCR ausschlossen.

Die anschließende Western-Blot-Analyse bestätigte die Ergebnisse der Q-PCR-Analysen für MAP1b sowie die MAP2c-Isoform auf Proteinebene (Abb. 3.22). Eine

Western-Blot-Detektion von MAP1a war mit dem derzeit einzigen kommerziell erhältlichen Antikörper gegen MAP1a nicht möglich. Die Isoformen MAP2a, b und d wurden im Western-Blot ebenfalls nicht detektiert. Die Immunfluoreszenz-Detektion von MAP1b und MAP2 ergab in den stabilen Transfektanten keine Unterschiede im Verteilungsmuster (Abb. 3.23). Der Nachweis von MAP1a war immunfluoreszenz-mikroskopisch nicht möglich.

Abb. 3.21: Q-PCR-Analyse der mRNA-Expression der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1a und MAP1b in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Es wurden zwei unabhängige Ansätze nach doppelt durchgeführter Q-PCR ausgewertet.

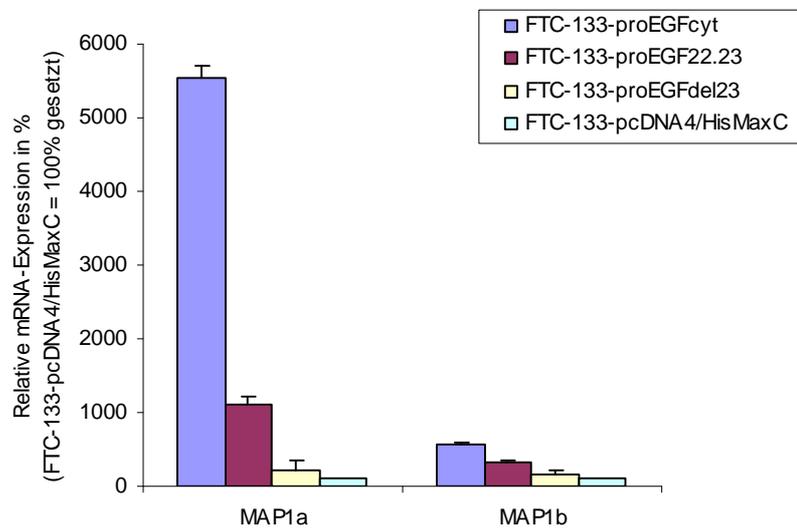


Abb. 3.22: Western-Blot-Detektion der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1b und MAP2c in Zelllysaten von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Als interner Standard wurde beta-Aktin detektiert.

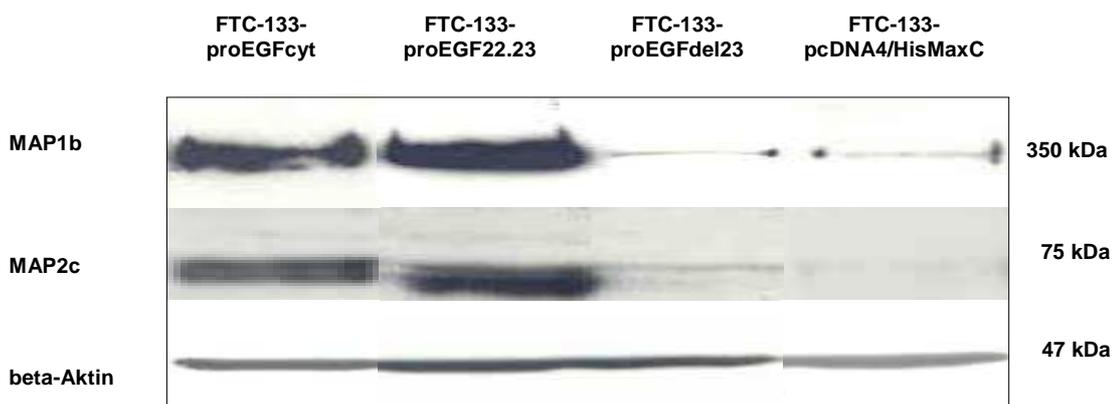
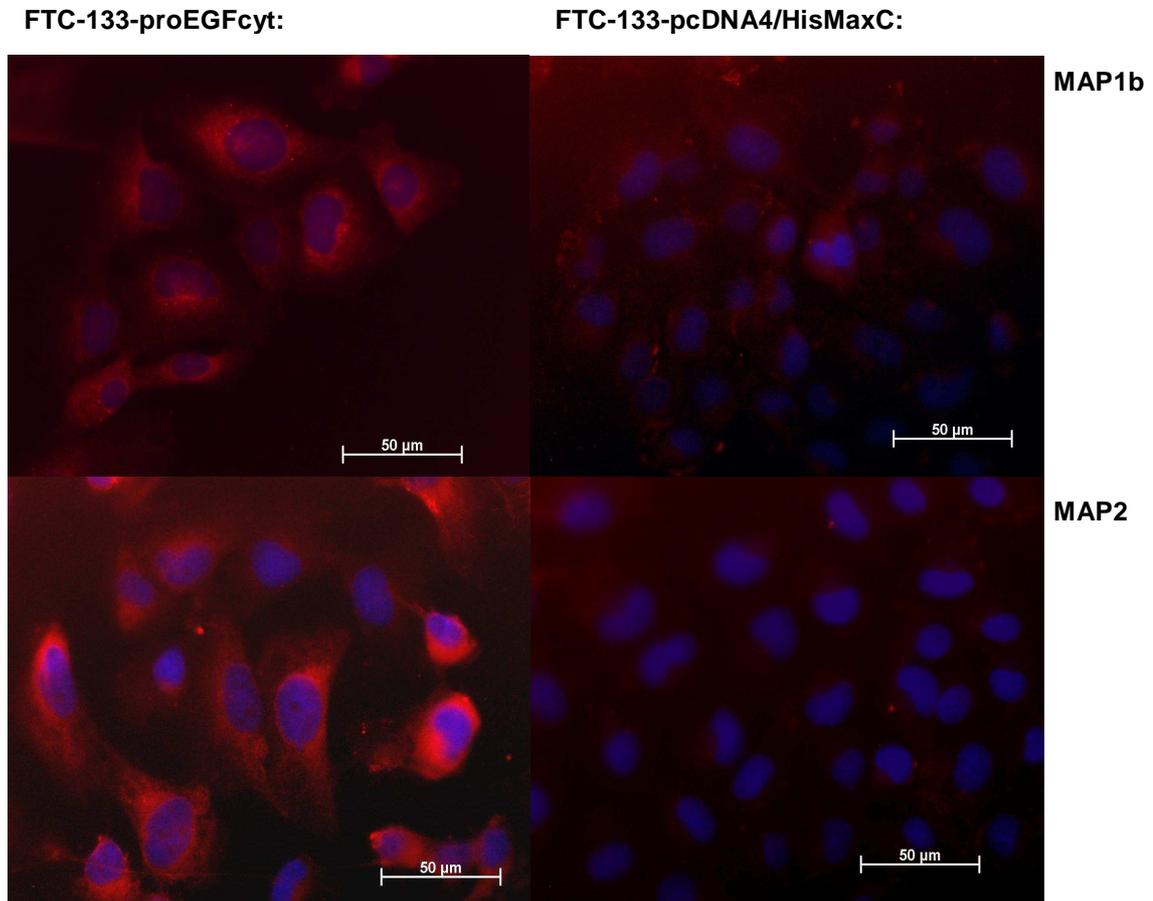


Abb. 3.23: Immunfluoreszenz-Färbungen von MAP1b (obere Reihe) und MAP2 (untere Reihe) in FTC-133-proEGFcyt (linke Seite) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (rechte Seite). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.

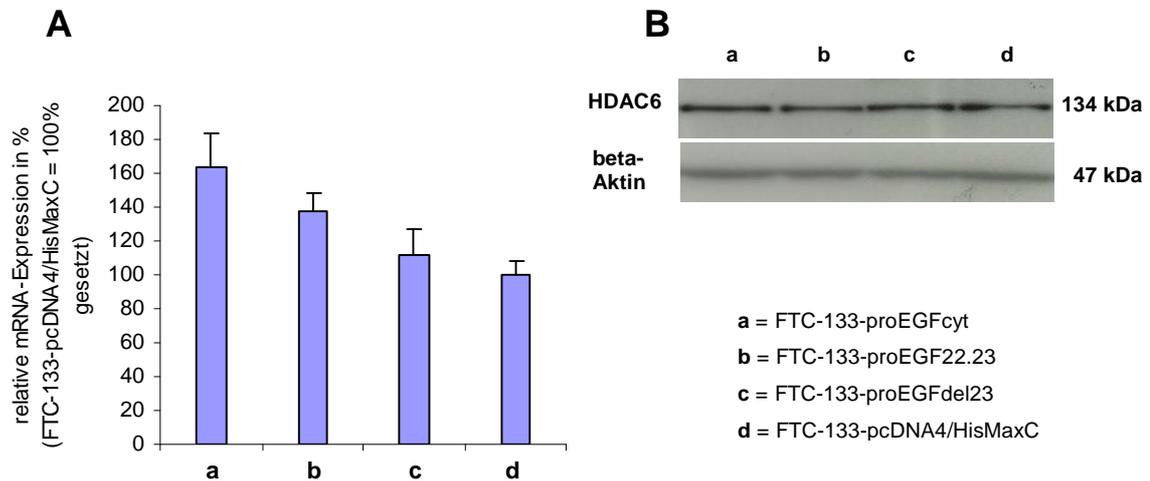


3.4.2.6 Tubulin-Deacetylierung: Untersuchung der Histon-Deacetylase 6

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob proEGFcyt die für die Mikrotubuli-Acetylierung verantwortlichen Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst. Das für die Acetylierung des alpha-Tubulins verantwortliche Enzym ist derzeit noch nicht bekannt und konnte somit auch nicht analysiert werden. Das derzeit einzig bekannte, die Mikrotubuli-Deacetylierung katalysierende Enzym ist die Histon-Deacetylase 6 (HDAC6).

Q-PCR-Analysen ergaben keine signifikante Erhöhung der HDAC6-mRNA-Expression (Faktor 1,6 in FTC-133-proEGFcyt, Faktor 1,4 in FTC-133-proEGF22.23 und Faktor 1,1 in FTC-133-proEGFdel23 im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC; Abb. 3.24A). Die Western-Blot-Analyse wies keine signifikant veränderte Protein-Expression von HDAC6 in den Transfektanten nach (Abb. 3.24B).

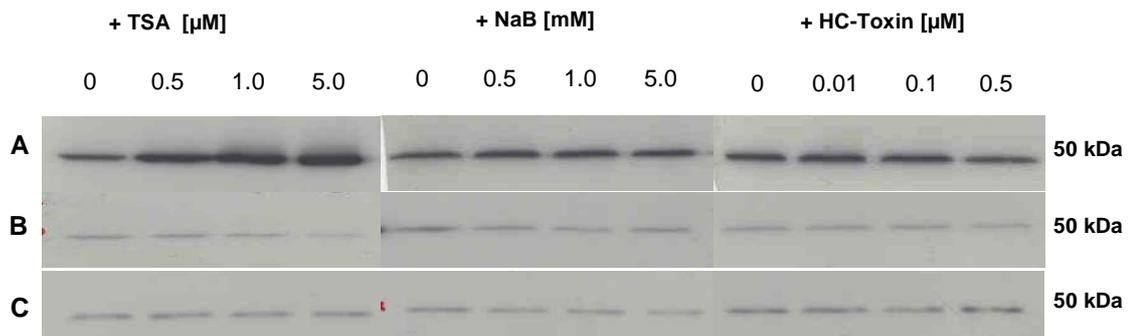
Abb. 3.24: (A) Q-PCR-Analyse der mRNA-Expression von HDAC6 in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Es wurden zwei unabhängige Ansätze nach doppelt durchgeführter Q-PCR ausgewertet. (B) Western-Blot-Detektion von HDAC6 in den stabilen Transfektanten. Als interner Standard wurde beta-Aktin detektiert.



Es war zu prüfen, ob die Expression von proEGFcyt zu Änderungen in der Aktivität von HDAC6 führt. Bisher liegt kein spezifischer Inhibitor für HDAC6 vor. Es ist allerdings bekannt, dass Trichostatin A (TSA) einen Inhibitor aller bekannten Histondeacetylasen darstellt. Ebenso ist bekannt, dass von allen bekannten HDACs nur HDAC6 und HDAC10 gegen die HDAC-Inhibitoren Natriumbutyrat sowie das Cyclotetrapeptid HC-Toxin resistent sind. HDAC10 steht dabei in keinem bekannten Zusammenhang mit Tubulin(de-)acetylierung. Der Test auf HDAC6-Aktivität erfolgte somit indirekt unter Verwendung aller drei Reagenzien: TSA, Natriumbutyrat sowie HC-Toxin. Gemessen wurde die HDAC6-Inhibition anhand des alpha-Tubulin-Acetylierungsstatus` mittels Western-Blot-Analyse: eine zunehmende Inhibition von HDAC6 sollte zu erhöhter Tubulin-Acetylierung führen.

Mit steigender Konzentration von TSA erhöhte sich der Tubulin-Acetylierungsstatus in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23, der Acetylierungsstatus in FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC blieb konstant. Ein Blockieren von HDAC6 führte somit nur in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 zu erhöhter alpha-Tubulin-Acetylierung. Die Behandlungen mit Natriumbutyrat und HC-Toxin führten in keiner der stabilen Transfektanten zu Veränderungen im Acetylierungsstatus und wiesen somit die spezifische Inhibition von HDAC6 nach (Abb. 3.25).

Abb. 3.25: Western-Blot-Detektion von acetyliertem Tubulin nach Inkubation von FTC-133-proEGFcyt (A) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (B) mit steigenden Konzentrationen TSA, Natriumbutyrat bzw. HC-Toxin. FTC-133-proEGF22.23 zeigte das gleiche Tubulin-Acetylierungsverhalten wie FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGFdel23 das gleiche wie FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (nicht gezeigt). Als interner Standard wurde der Totalgehalt von alpha-Tubulin detektiert (C).



Zwischenresümee: Die stabilen Transfektanten konnten phänotypisch in zwei Gruppen unterschieden werden: jeweils der gleiche Phänotyp wurde ausgebildet bei Expression von proEGFcyt oder proEGF22.23 sowie bei Expression von proEGFdel23 oder pcDNA4/HisMaxC.

FTC-133-proEGFcyt /-proEGF22.23 zeigten ein alterierendes mikrotubuläres Filamentmuster. Eine direkte Interaktion von proEGFcyt oder proEGF22.23 mit alpha- oder beta-Tubulin konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde ein signifikant erhöhter alpha-Tubulin-Acetylierungsstatus in diesen Transfektanten nachgewiesen. Inkubationen mit den Tubulin-stabilisierenden bzw. -destabilisierenden Agenzien Taxol und Nocodazol wiesen eine erhöhte mikrotubuläre Stabilität in proEGFcyt-/ proEGF22.23-exprimierenden Zellen nach und ließen auf ein funktionelles Tubulin-Acetylase-/Deacetylase-System der Transfektanten schließen. Es konnte kein Einfluss von proEGFcyt/proEGF22.23 auf die Expression und Funktionalität der alpha-Tubulin-Deacetylase HDAC6 festgestellt werden. Alpha-Tubulin-acetylierende Enzyme sind bisher nicht bekannt und konnten nicht untersucht werden. Als potentielle proEGFcyt-/proEGF22.23-induzierte Faktoren der erhöhten mikrotubulären Stabilität wurde eine erhöhte Expression der beta-Tubulin-Isoformen IVa und IVb sowie eine erhöhte Expression und Produktion der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1b und MAP2c ermittelt.

3.4.3 Einfluss von proEGFcyt auf das vesikuläre System in FTC-133

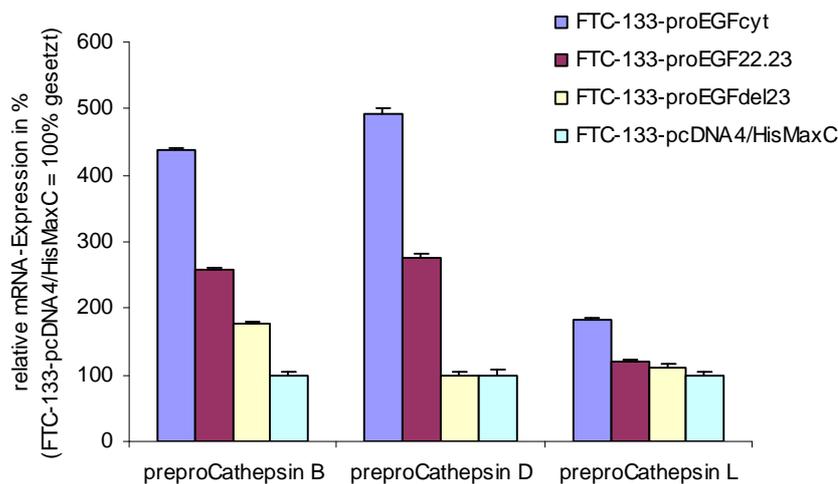
Lokalisation und Transport von vesikulären Strukturen erfolgen entlang des Cytoskeletts der Zelle. Veränderungen in der mikrotubulären Stabilität können daher auch Auswirkungen auf Transport und Funktion des vesikulären Systems der Zelle haben. Eine Funktion des vesikulären Systems der Zelle ist der Transport, und damit auch die Reifung und Sezernierung, lysosomaler Proteasen.

3.4.3.1 Expression und Reifung von Cathepsinen

Cathepsine sind lysosomale proteolytische Enzyme, welche Bedeutung in vielen physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen, u.a. der Progression und Metastasierung von Karzinomen, besitzen.

Q-PCR-Analysen von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGFdel23 im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC zeigten einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von preproCathepsin B und D sowie eine leicht erhöhte Expression von preproCathepsin L in FTC-133-proEGFcyt. Die Ergebnisse der Q-PCR-Analyse dieser Cathepsine in den stabilen Transfektanten sind in Abb. 3.26 dargestellt.

Abb. 3.26: Relative mRNA-Expression der preproCathepsine B, D und L in FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Es wurden zwei unabhängige Ansätze nach doppelt durchgeführter Q-PCR ausgewertet.



Die Q-PCR-Analyse ergab in FTC-133-proEGFcyt eine 4-fach, in FTC-133-proEGF22.23 eine ca. 3-fach und in FTC-133-proEGFdel23 eine 1,7-fach erhöhte mRNA-Expression von preproCathepsin B im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Die mRNA-Expression von preproCathepsin D war im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC in FTC-133-proEGFcyt 5-fach, in FTC-133-proEGF22.23

ca. 3-fach und in FTC-133-proEGFdel23 nicht erhöht. Die mRNA-Expression von preproCathepsin L variierte nur leicht zwischen den stabilen Transfektanten. Im Vergleich zu FTC-133-pcDNA4/HisMaxC wurde in FTC-133-proEGFcyt eine 1,82-fach, in FTC-133-proEGF22.23 eine 1,2-fach und in FTC-133-proEGFdel23 eine nicht erhöhte mRNA-Expression von preproCathepsin L ermittelt (Abb. 3.26).

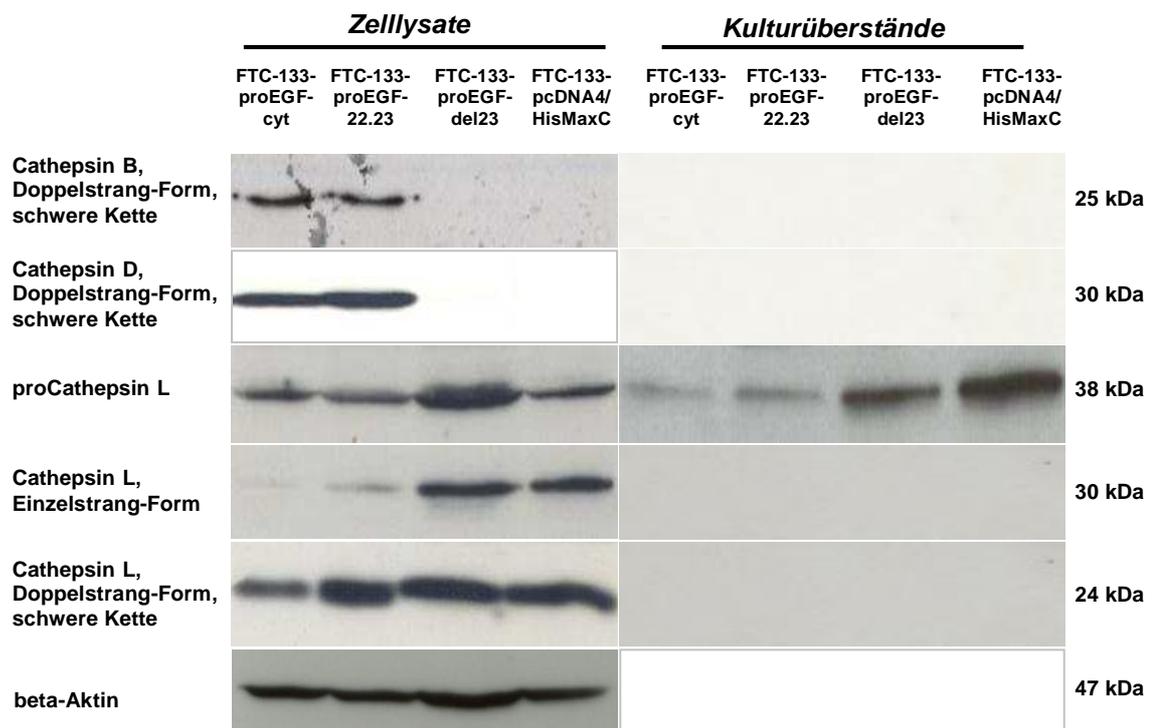
Western-Blot-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Q-PCR-Analysen für preproCathepsin B und D auf Proteinebene. Es konnte eine erhöhte Proteinexpression von reifem Cathepsin B (25 kDa) sowie reifem Cathepsin D (30 kDa) in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 nachgewiesen werden. Die Proformen von Cathepsin B und D konnten auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Ebenso wurden Cathepsin B und D nicht im Kulturüberstand als sezernierte Proteine detektiert (Abb. 3.27).

Für die Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von pro-/ Cathepsin L wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet, welche gegen unterschiedliche Epitope auf pro-/ Cathepsin L gerichtet waren. Das humane proCathepsin L ist ein aus 331 Aminosäuren bestehendes lysosomales Enzym mit einem Molekulargewicht von 38 kDa. Dabei umfasst das Signalpeptid 17, das N-terminale Propeptid 95 und das reife Enzym 219 Aminosäurereste. Das reife Enzym hat ein Molekulargewicht von 28 kDa und wird in den Lysosomen durch Abspaltung der Proregion hergestellt. Es kann als einkettige Form mit einem Molekulargewicht von 28 kDa oder als zweikettige Form, bestehend aus zwei Polypeptiden von 24 kDa und 4 kDa, vorliegen. Die zweikettige Form wird über einen weiteren Prozessierungsschritt aus der einkettigen Form generiert und ist über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Der monoklonale Antikörper *Anti-Cathepsin L clone CPLH 2D4* erkennt spezifisch das N-terminale Epitop Thr₆₇ – Gln₇₉ auf der Proregion von proCathepsin L, nicht aber die reife Cathepsin L Doppel- und Einzelstrangform. Der monoklonale Antikörper *Anti-Cathepsin L clone CPLH 33/1* erkennt spezifisch das die Aminosäuren Phe₂₄₁ – Glu₂₄₄ umfassende Epitop und somit sowohl proCathepsin L als auch das prozessierte Einzel- und Doppelstrang-Cathepsin L.

Die Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Cathepsin L zeigte äquivalente Mengen translatierten proCathepsin L sowie vergleichbare Mengen der schweren Kette des reifen Doppelstrang-Cathepsin L (24 kDa) in den Zelllysaten aller stabiler Transfektanten. Die reife Einzelstrangform von Cathepsin L (ca. 30 kDa) wurde in signifikant geringeren Mengen im Zelllysate von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/

HisMaxC detektiert. Von allen Reifestadien des Cathepsin L wurde nur proCathepsin L als sezerniertes Enzym nachgewiesen (Abb. 3.27).

Abb. 3.27: Western-Blot-Detektion von Cathepsin B, D und L in verschiedenen Reifestadien in Zelllysaten und Kulturüberständen von FTC-133-proEGFcyt, FTC-133-proEGF22.23, FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC. Als Kontrolle gleicher geladener Proteinmengen der Zelllysate wurde beta-Aktin detektiert; die Kulturüberstände wurden in vorher vermessenen, gleichen Proteinmengen aufgetragen.



3.4.3.2 Charakterisierung des Vesikel-Transportes der lysosomalen Protease Cathepsin L

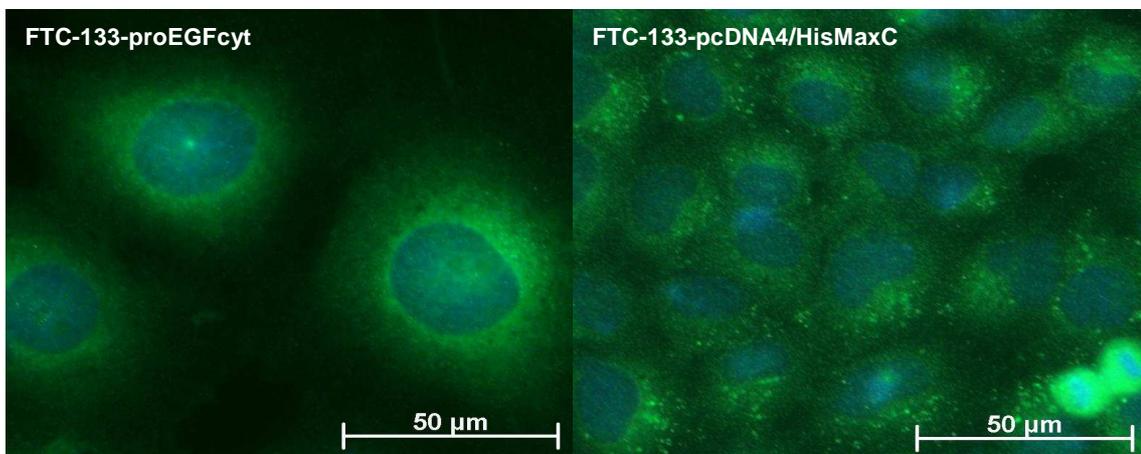
3.4.3.2.1 Verteilungsmuster der lysosomalen Protease Cathepsin L

Die Charakterisierung des zellulären Verteilungsmusters von proCathepsin L in den stabilen Transfektanten erfolgte immunfluoreszenz-mikroskopisch. Für die Immunfluoreszenz-Markierung von proCathepsin L wurde der monoclonale Antikörper *Anti-Cathepsin L clone CPLH 2D4*, welcher ausschließlich das Propeptid, nicht aber die reife Einzel- oder Doppelstrangform von Cathepsin L erkennt, verwendet. Der monoclonale Antikörper *Anti-Cathepsin L clone CPLH 33/1* wurde in der Immunfluoreszenz nicht eingesetzt, da mit diesem Antikörper mittels dieser Technik keine Unterscheidung zwischen den drei Reifegraden (proCathepsin L sowie Einzel- oder

Doppelstrang-Cathepsin L) möglich war (siehe auch Abschnitt 3.4.3.1.) und somit keine Aussage über deren spezifische Lokalisation gegeben werden konnte.

Die Immunfluoreszenz-Färbung zeigte ein abweichendes Verteilungsmuster von proCathepsin L in den stabilen Transfektanten. In FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 wurde proCathepsin L in feinen, vesikelähnlichen Strukturen im gesamten Cytoplasma der Zelle, verstärkt jedoch perinukleär lokalisiert. In FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC wurde proCathepsin L ebenfalls in feinen vesikelähnlichen Strukturen im gesamten Cytoplasma der Zelle detektiert. Zusätzlich konnte in diesen Transfektanten proCathepsin L auch in Form größerer Aggregat- oder vesikelähnlicher Strukturen detektiert werden. Die Lokalisation dieser größeren proCathepsin L-Strukturen erstreckte sich unregelmäßig über das gesamte Cytoplasma der Zelle (Abb. 3.28; Anhang Abb. A4).

Abb. 3.28: Immunfluoreszenz-Färbungen von proCathepsin L in FTC-133-proEGFcyt (linke Seite) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (rechte Seite). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.



3.4.3.2.2 Transportvesikel der lysosomalen Protease Cathepsin L

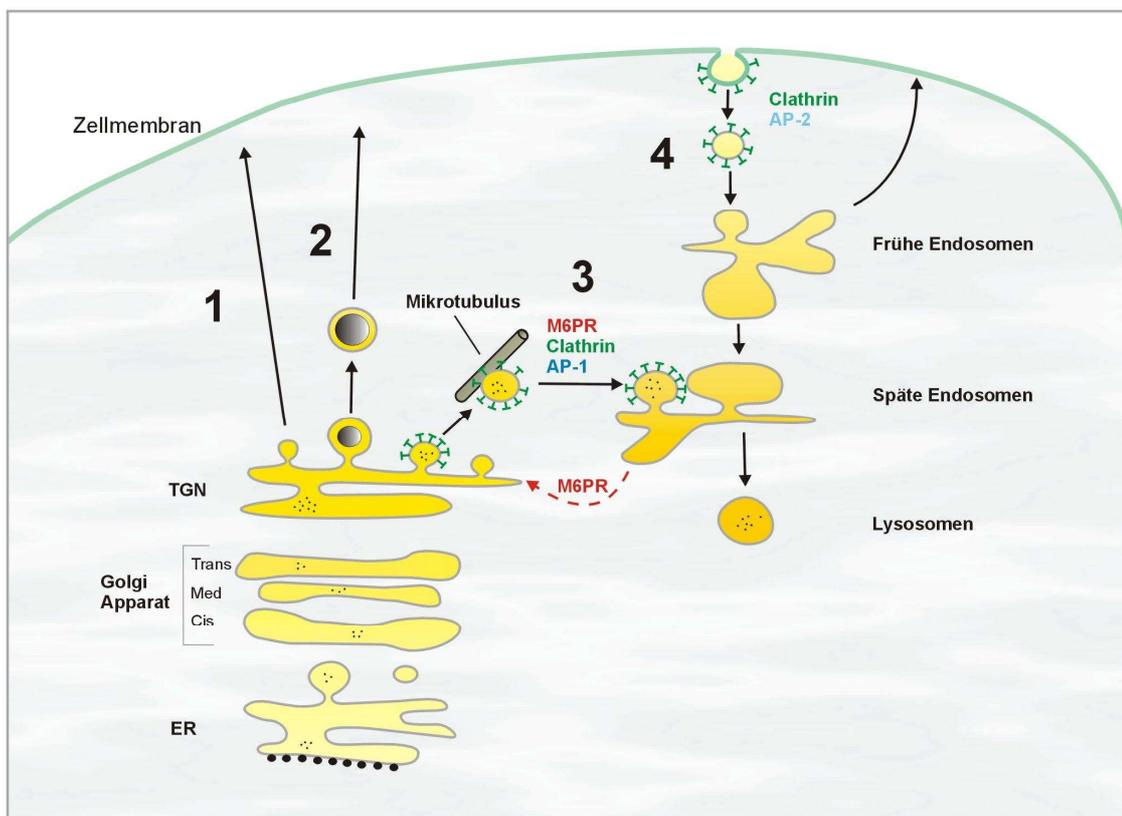
Abschnitt 3.4.3.1. zeigt keine signifikant alterierende mRNA-Expression von preproCathepsin L in den stabilen Transfektanten. Gleichzeitig wurde eine signifikant reduzierte Prozessierung zur reifen Einzelstrangform von Cathepsin L (ca. 30 kDa) sowie eine signifikant reduzierte Sezernierung des proCathepsin L (ca. 40 kDa) in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC ermittelt. Transport und Reifung lysosomaler Proteasen erfolgen über den endosomalen Vesikel-Transportweg.

Immunfluoreszenz-mikroskopisch wurde eine alterierende Lokalisation von proCathepsin L in den stabilen Transfektanten beobachtet (Abb. 3.28). Eine mögliche Ursache der veränderten enzymatischen Prozessierung und Sezernierung von proCathepsin L wurde darum in dessen Vesikel-Transport vermutet. Es sollte im Folgenden der Einfluss von proEGFcyt auf den endosomal-lysosomalen Vesikel-Transport untersucht werden.

Die Abbildung 3.29 zeigt ein Modell der Reifung und des Transportes lysosomaler Proteasen. Cathepsin L wird als prepro-Enzym am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert und aufgrund seiner Signalsequenz in das ER-Lumen internalisiert. Nach Abspaltung der Signalsequenz wird das für den lysosomalen Transportweg bestimmte Pro-Enzym in den Golgi-Apparat transportiert. Das Trans-Golgi-Netz (TGN) ist die letzte Station des sekretorischen Transportes, in welchem lösliche und Membran-gebundene Proteine abhängig von ihrem endgültigen Bestimmungsort sortiert und in ihre verschiedenen Transportintermediate verpackt werden: (I) zur Plasmamembran, (II) in sekretorische Granulae von exokrinen und endokrinen Zellen und (III) in die Endosomen. Letzterer Weg wird in höheren Eukarioten zum Transport neu synthetisierter lysosomaler Hydrolasen, zu welchen Cathepsin L zählt, genutzt. Diese werden – Mannose-6-Phosphat (M6P) markiert – von den an der Innenseite der TGN-Membran befindlichen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR) gebunden. Beide Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, der 46 kDa große Kationen-abhängige M6PR sowie der 300 kDa große Kationen-unabhängige M6PR, transportieren neu synthetisierte lysosomale Hydrolasen zum Späten endosomal Kompartiment. Vesikel mit dem Protein-Transport-Komplex schnüren sich, mit dem Strukturprotein Clathrin ummantelt, von den Rändern des TGN ab und verschmelzen mit den prälysosomalen Endosomen (Späte Endosomen, *Late Endosomes*). Die Bewegung und Lokalisation der vesikulären Strukturen der Zelle erfolgt dabei entlang der Mikrotubuli. Der 300 kDa-M6PR vermittelt zusätzlich die Reinternalisation sezernierter Proenzyme lysosomaler Hydrolasen von der Zellmembran in Clathrin-kodierte Vesikel und deren Transport zu den Frühen Endosomen (Endocytose), von wo aus diese weiter über die Späten Endosomen in die Lysosomen transportiert werden können. Der gerichtete Transport der Clathrin-kodierten M6PR-Protein-Transportvesikel vom TGN zu den Späten Endosomen wird vom Adaptorprotein-Komplex 1 (AP-1) vermittelt. Den gerichteten Transport Clathrin-kodierter Vesikel von der Plasmamembran zu den Frühen Endosomen vermittelt der Adaptorprotein-Komplex 2 (AP-2). AP-1 und AP-2 erkennen cytoplasmatische Sortiersignale der zu transportierenden M6PR-Protein-Komplexe und dirigieren, über die

Interaktion mit weiteren multiplen Sortier- und Transportkomponenten, spezifisch deren gerichteten Transport. Mit sinkendem pH in den Späten Endosomen dissoziieren die lysosomalen Hydrolasen vom M6PR, welcher nun wieder zum TGN recycelt. Der M6PR steht dabei in dynamischem Gleichgewicht zwischen TGN und den Späten Endosomen, wobei der überwiegende Anteil der M6P-Rezeptoren in den Späten Endosomen lokalisiert ist. Von den Späten Endosomen erfolgt der unmittelbare Transport des proCathepsin L in die Lysosomen, wo unter sauren Bedingungen die autokatalytische Prozessierung des Pro-Enzyms zu den reifen Einzelstrang- sowie Doppelstrangformen erfolgt (Le Borgne et al. 1998; Rouillé et al. 2000; Robinson 2004).

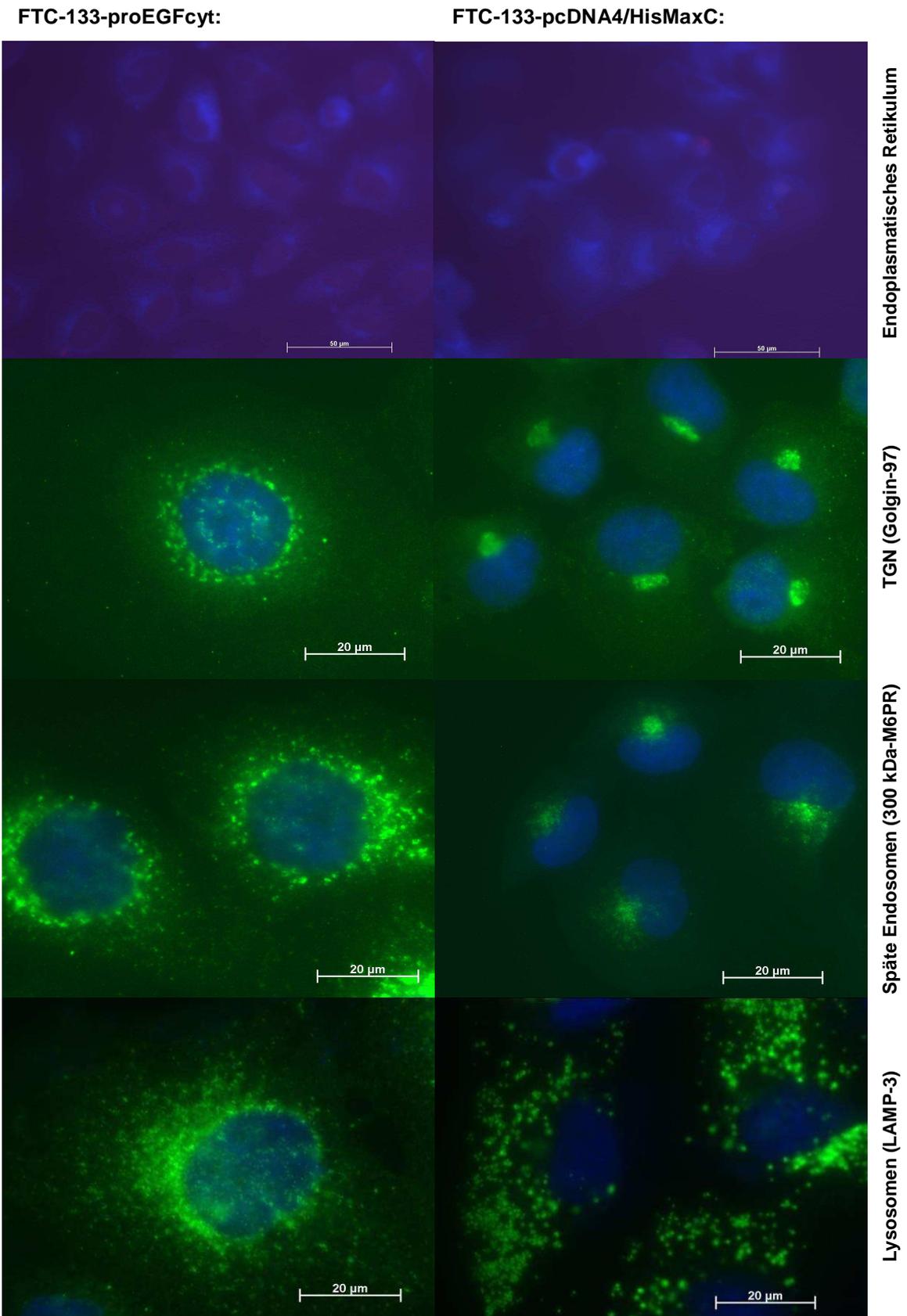
Abb. 3.29: Modell der Reifung und des Transportes lysosomaler Proteasen. Im TGN werden die Proteine entsprechend ihrer weiteren Bestimmung sortiert: (1) zur Zelloberfläche, (2) in sekretorische Granulae oder (3) zum Endosom. Letzterer Weg wird für den M6PR-vermittelten Transport lysosomaler Proteasen genutzt und erfolgt AP-1-vermittelt in Clathrin-kodierten Vesikeln. Der gerichtete Transport Clathrin-kodierter Endocytose-Vesikel (4) erfolgt AP-2 vermittelt.



Die Charakterisierung des Verteilungsmusters der endosomal-lysosomalen Transportvesikel in den stabilen Transfektanten erfolgte immunfluoreszenzmikroskopisch. Die Detektion des Endoplasmatischen Retikulums erfolgte mittels *ER-Tracker*. Die Lokalisation des TGN, der Späten Endosomen sowie der Lysosomen erfolgte über die spezifische Detektion von Markerproteinen. Mit Hilfe des für das TGN charakteristischen, zur Familie der *Golgine* zählenden Strukturproteins Golgin-97, wurden die Vesikel des TGN lokalisiert. Beide, der 46 kDa große Kationen-abhängige M6PR sowie der 300 kDa große Kationen-unabhängige M6PR sind anerkannte Marker des Späten Endosomalen Kompartments. In der vorliegenden Arbeit wurde der 300 kDa große M6PR als Markerprotein der Späten Endosomen detektiert. Durch Detektion des *Lysosomen-assoziierten Membran-Glykoproteins 3* (LAMP-3) wurde das lysosomale Kompartiment lokalisiert.

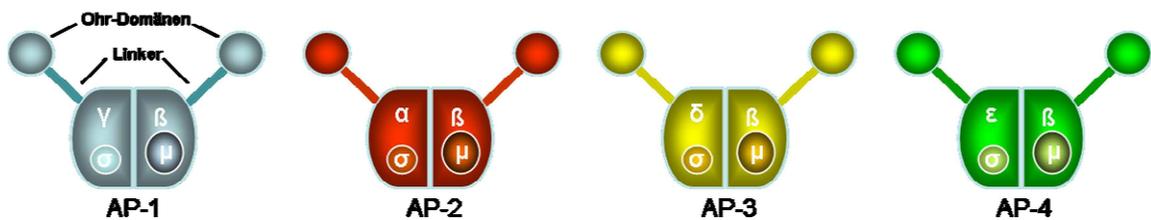
Die Detektion des Endoplasmatischen Retikulums ließ keine strukturellen Unterschiede zwischen den stabilen Transfektanten erkennen (Abb. 3.30, obere Reihe). Die Lokalisation der Vesikel von TGN, Späten Endosomen und Lysosomen zeigte deutliche Unterschiede zwischen FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-pcDNA4/HisMaxC. In FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 wurden die Vesikel des TGN sowie der Späten Endosomen in gleichmäßig perinukleärer Verteilung lokalisiert. Im Gegensatz dazu war in FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC das TGN und das Späte Endosomale Kompartiment perinukleär, deutlich auf eine Stelle polarisiert lokalisiert (Abb. 3.30, mittlere beide Reihen; Anhang Abb. A5 und Abb. A6). Die Lokalisation der Lysosomen erstreckte sich in allen stabilen Transfektanten auf das gesamte Cytoplasma der Zelle. Im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC schienen die Lysosomen in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 als kleinere Vesikelstrukturen vorzuliegen (Abb. 3.30, untere Reihe; Anhang Abb. A7).

Abb. 3.30: Immunfluoreszenz-Färbungen des Endoplasmatischen Retikulums, des TGN (Golgin-97), der Späten Endosomen (300 kDa-M6PR) sowie der Lysosomen (LAMP-3) in FTC-133-proEGFcyt (linke Seite) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (rechte Seite). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.



Bisher sind vier ubiquitäre und zwei zellspezifische AP-Komplexe bekannt. Ubiquitär verteilt sind AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4. AP-1B und AP-3B sind spezifisch für polarisierte epitheliale Zellen bzw. für Neuronen. AP-Komplexe verfügen über die gleiche heterotetramere Grundstruktur. Allen gleich sind eine kleine σ - bzw. mittlere μ -Untereinheit sowie eine große β -Untereinheit. Eine zweite große Untereinheit ist charakteristisch für den jeweiligen AP-Komplex: γ - für AP-1, α - für AP-2, δ - für AP-3 sowie ϵ - für AP-4. Die C-terminalen Domänen der beiden großen Untereinheiten („Ohr-Domänen“, *ear domains*) sind über flexible *Linker* mit dem Rest der Untereinheiten verbunden (Abb. 3.31).

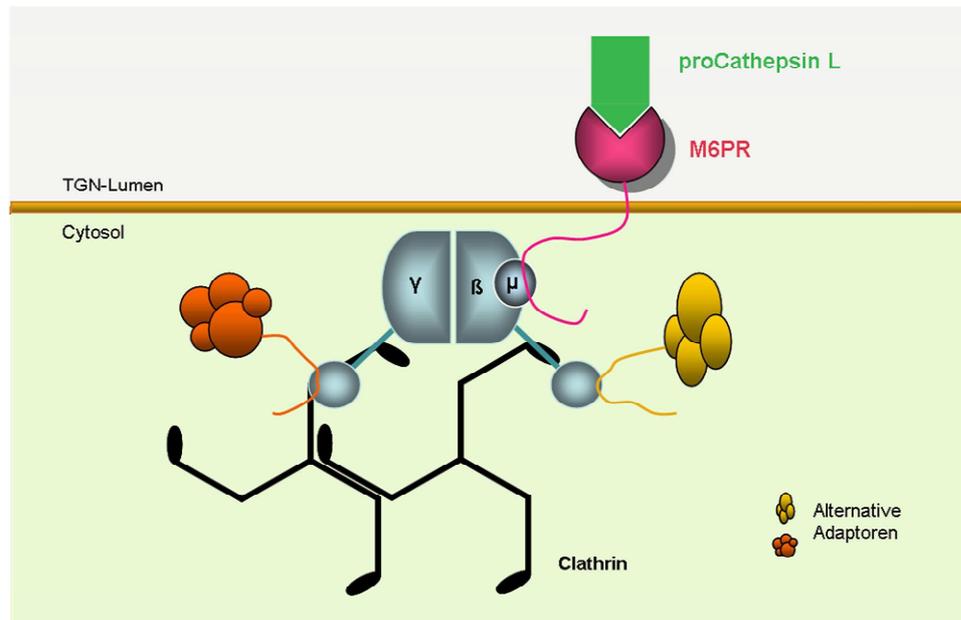
Abb. 3.31: Schematische Darstellung der Struktur der Adaptor-Protein-Komplexe.



Durch AP-1 wird der Transport Clathrin-kodierter M6PR-Vesikel vom TGN zu den Späten Endosomen vermittelt. Durch AP-2 wird die Endocytose Clathrin-kodierter 300 kDa-M6PR-Vesikel von der Zellmembran zu den Frühen Endosomen vermittelt. Beide M6P-Rezeptoren verfügen über multiple cytosolische Sortiersignale, welche ihren gerichteten intrazellulären Transport bestimmen. Der Transport zwischen TGN und Späten Endosomen wird vorwiegend durch Dileucin-basierende Motive der M6P-Rezeptoren signalisiert. Ein Tyrosin-basierendes Motiv des 300 kDa-M6PR fungiert als Internalisierungssignal. AP-1 und AP-2 erkennen durch ihre μ -Untereinheiten die cytosolischen Sortiersignale der M6PR-Protein-Komplexe auf der Donormembran und selektieren diese in spezifische Transportvesikel. Durch die flexiblen *Linker* ihrer großen Untereinheiten binden AP-1 und AP-2 an Clathrin und fördern die Ausbildung der Clathrin-Hülle der knospenden Transportvesikel. Gleichzeitig kommunizieren ihre „Ohr-Domänen“ mit weiteren Vesikel-Transport- und Sortierkomponenten und vermitteln so den gerichteten Transport der AP-1/-2-M6PR-Vesikel zu den Zielmembranen (Abb. 3.32).

AP-3 und AP-4 vermitteln ebenfalls den gerichteten Vesikel-Transport zwischen Endosom und TGN. Eine Beteiligung am M6PR-vermittelten Transport lysosomaler Hydrolasen durch Clathrin-kodierte Vesikel wurde ihnen jedoch nicht nachgewiesen (Robinson et al. 2001; Robinson 2004; Le Borgne et al. 1998).

Abb. 3.32: Schematische Darstellung der Interaktion von AP-1 während des M6PR-vermittelten Transportes von proCathepsin L.

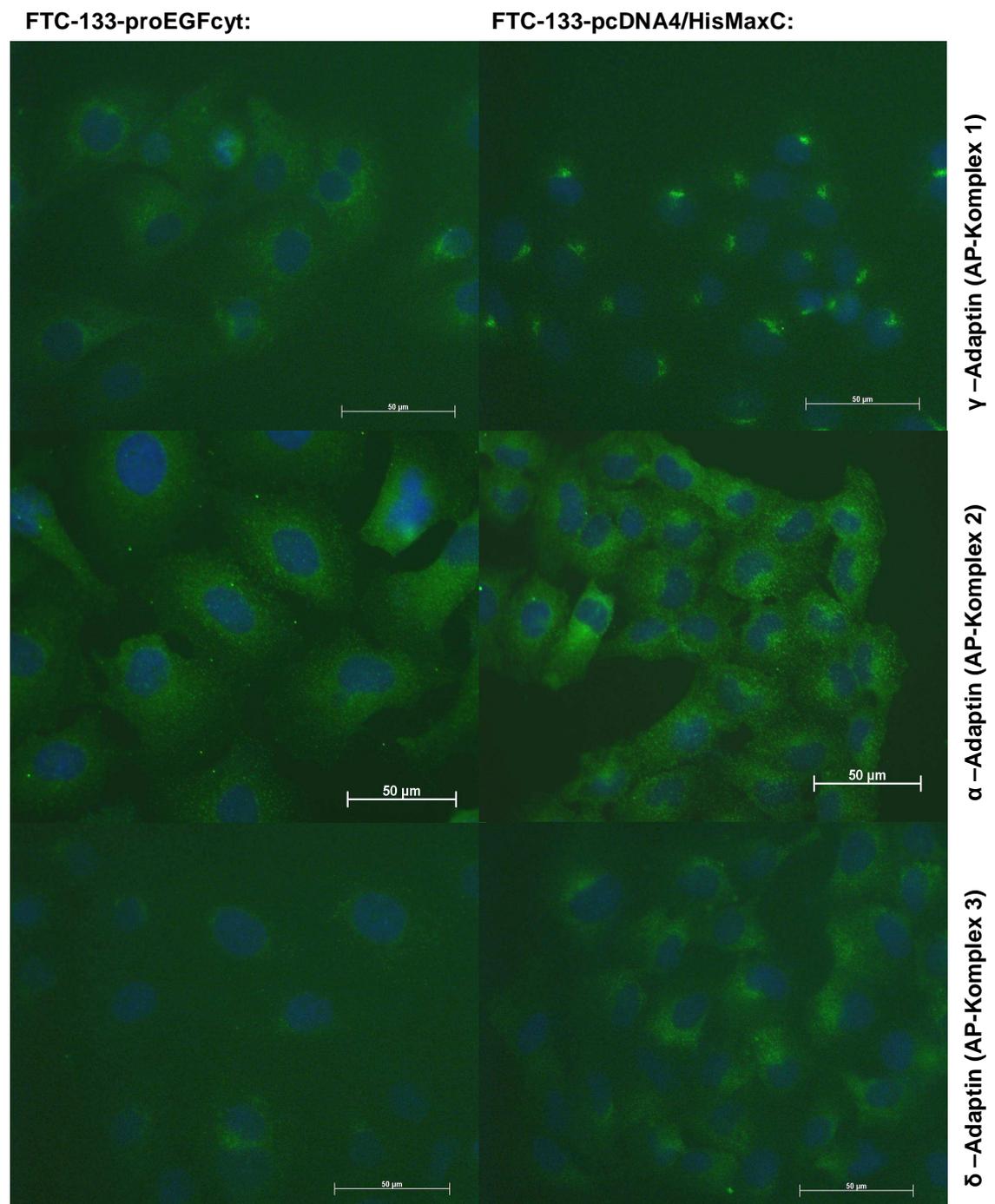


Die Untersuchung des Verteilungsmusters der AP-Komplexe erfolgte immunfluoreszenz-mikroskopisch über die spezifische Detektion ihrer charakteristischen γ -, α - bzw. δ -Untereinheiten.

In FTC-133-proEGF_{cyt} und FTC-133-proEGF_{22.23} wurde das γ -Adaptin des AP-1-Komplexes in vesikelähnlichen Strukturen homogen im gesamten Cytoplasma lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurde der AP-1-Komplex in FTC-133-proEGF_{del23} und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC deutlich perinukleär, auf eine Stelle polarisiert lokalisiert (Abb. 3.33, obere Reihe; Anhang Abb. A8). Damit wies das Verteilungsmuster des AP-1-Komplexes eine hohe Ähnlichkeit mit dem Verteilungsmuster des TGN sowie der Späten Endosomen in den jeweiligen Transfektanten auf. Der AP-2-Komplex (α -Adaptin) wurde in allen untersuchten stabilen Transfektanten in Form vesikelähnlicher Strukturen detektiert. Alle Transfektanten wiesen eine überwiegend homogene AP-2-Verteilung im gesamten Cytoplasma sowie der Zellmembran, mit leicht erhöhter Dichte von AP-2 im kernnahen Bereich auf (Abb. 3.33, mittlere Reihe; Anhang Abb. A9). Das δ -Adaptin des AP-3-Komplexes wurde ebenfalls in allen untersuchten stabilen Transfektanten in Form feiner vesikelähnlicher Strukturen detektiert. Das Verteilungsmuster des AP-3-Komplexes war zwischen den stabilen Transfektanten nicht signifikant verschieden. Eine streng perinukleär polarisierte Lokalisation, vergleichbar mit der Lokalisation von AP-1, TGN oder den Späten Endosomen, wurde

nicht nachgewiesen (Abb. 3.33, untere Reihe). Der AP-4-Komplex wurde nicht untersucht.

Abb. 3.33: Immunfluoreszenz-Färbungen von γ -Adaptin (AP-Komplex 1; obere Reihe), α -Adaptin (AP-Komplex 2; mittlere Reihe) und δ -Adaptin (AP-Komplex 3; untere Reihe) in FTC-133-proEGFcyt (linke Seite) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (rechte Seite). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.

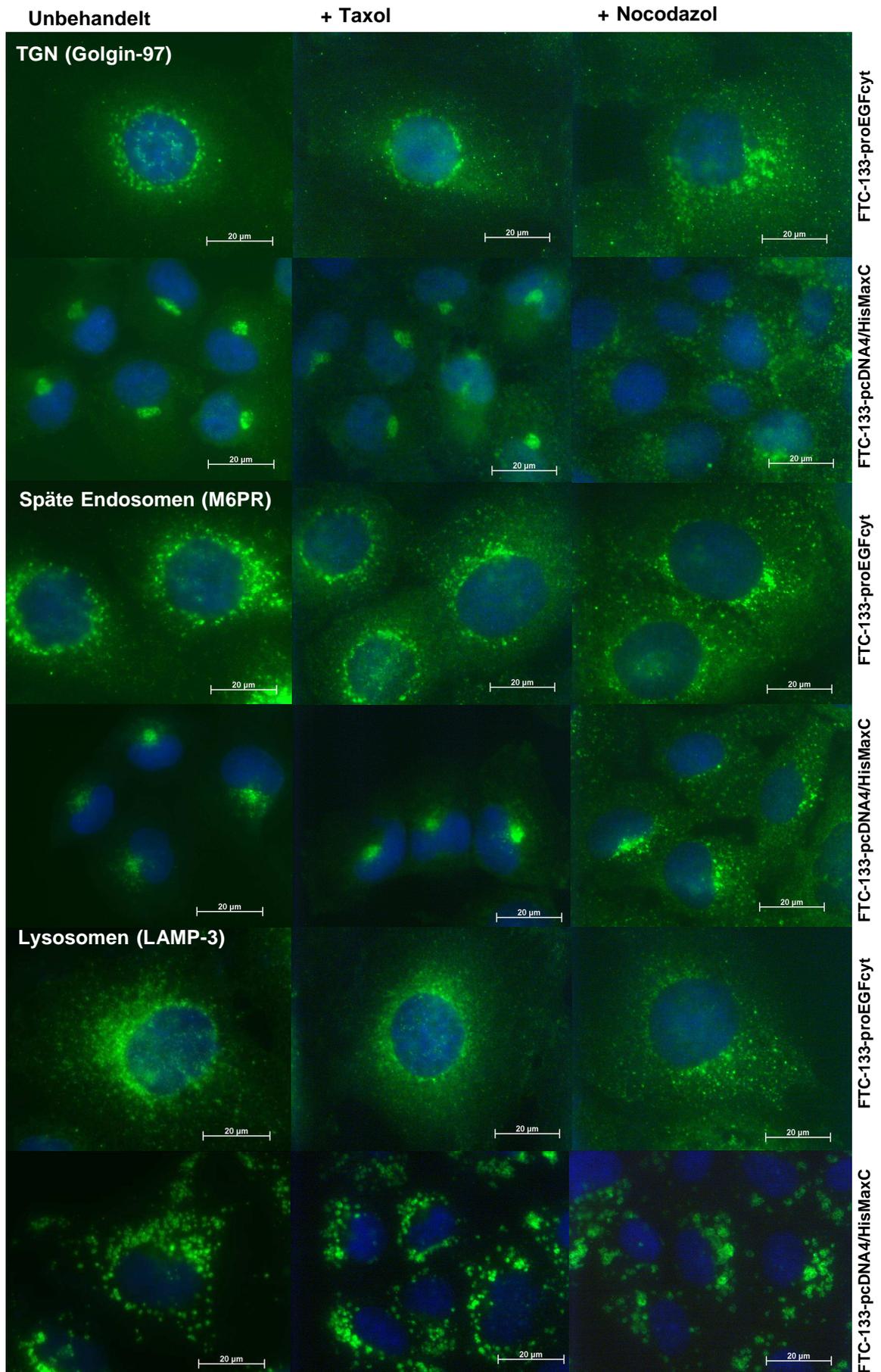


3.4.3.3 Abhängigkeit der Vesikel-Verteilung von der Mikrotubuli-Stabilität

Sowohl Verteilung als auch Transport vesikulärer Strukturen erfolgen entlang der Mikrotubuli der Zelle. Im Folgenden war zu untersuchen, ob das veränderte Verteilungsmuster von TGN, Späten Endosomen und Lysosomen in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 auf die erhöhte mikrotubuläre Stabilität dieser Transfektanten zurückzuführen war. Dies wurde mittels Inkubation der Transfektanten mit den Mikrotubuli stabilisierenden bzw. destabilisierenden Agenzien Taxol und Nocodazol und anschließender immunfluoreszenzmikroskopischer Detektion der Vesikel von TGN, Späten Endosomen und Lysosomen untersucht.

In allen stabilen Transfektanten führte die Inkubation mit dem Mikrotubuli destabilisierenden Agenz Nocodazol zu leicht vergrößerten lysosomalen Vesikeln (LAMP-3; Abb. 3.34 linke und rechte Spalte). Weiterhin führte die Inkubation mit Nocodazol zu einer Verlagerung der Vesikel des TGN (Golgin-97) sowie der Späten Endosomen (M6PR) von einer gleichmäßig perinukleären Lokalisation zu einer verstärkt cytosolischen Lokalisation in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 (Abb. 3.34, linke und rechte Spalte). Die Inkubation von FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC mit Nocodazol löste die deutlich auf eine Stelle lokalisierte perinukleäre Lokalisation der Vesikel von TGN und Späten Endosomen auf und führte zu einer Verlagerung dieser Vesikel ins gesamte Cytoplasma (Abb. 3.34, linke und rechte Spalte). Die Lokalisation der Vesikel in der Zelle ist somit von der mikrotubulären Stabilität abhängig. Die Inkubation mit dem Mikrotubuli stabilisierenden Agenz Taxol führte in keiner der stabilen Transfektanten zu einer Änderung der Lokalisation von TGN, Späten Endosomen oder Lysosomen (Abb. 3.34, linke und mittlere Spalte). Eine Erhöhung der mikrotubulären Stabilität in FTC-133-proEGFdel23 und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC konnte nicht das Vesikel-Verteilungsmuster von FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 induzieren. Das alterierende Vesikel-Verteilungsmuster in FTC-133-proEGFcyt und FTC-133-proEGF22.23 ist somit nicht ausschließlich auf deren erhöhte mikrotubuläre Stabilität zurückzuführen.

Abb. 3.34: Immunfluoreszenzfärbungen des TGN (Golgin-97, obere beiden Reihen), der Späten Endosomen (M6PR, mittlere beiden Reihen) sowie der Lysosomen (LAMP-3, untere beiden Reihen) von FTC-133-proEGFcyt (1., 3. und 5. Reihe) und FTC-133-pcDNA4/HisMaxC (2., 4. und 6. Reihe) unbehandelt (linke Spalte), nach Inkubation mit Taxol (mittlere Spalte) oder nach Inkubation mit Nocodazol (rechte Spalte). Der Phänotyp von FTC-133-proEGF22.23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-proEGFcyt, der von FTC-133-proEGFdel23 (nicht gezeigt) entsprach dem von FTC-133-pcDNA4/HisMaxC.



Resümee: Es wurde der Einfluss der Expression von proEGFcyt auf die Expression und Sezernierung von Cathepsinen, welche Bedeutung in der Progression und Metastasierung von Tumorzellen besitzen, untersucht. Die Expression von proEGFcyt und proEGF22.23 in FTC-133 induzierte eine Erhöhung der Transkriptionsrate von preproCathepsin B und D sowie der Produktion der Doppelstrangformen von reifem Cathepsin B und D. Ein Einfluss von proEGFcyt oder proEGF22.23 auf die Sezernierung dieser Cathepsine konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Expression von proEGFcyt und proEGF22.23 führte zu einer signifikant reduzierten Sezernierung von proCathepsin L. Cathepsin L degradiert u.a. das extrazelluläre Matrixprotein Elastin und ist damit an der Migrationsfähigkeit von Zellen im Extrazellulärraum beteiligt. In Abschnitt 3.3.4 wurde eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit von FTC-133 mit Expression von proEGFcyt durch die Elastinmatrix nachgewiesen. Es wurden mögliche Mechanismen der proEGFcyt-/proEGF22.23-induzierten, erniedrigten Sezernierung von proCathepsin L untersucht. Alterationen in der preproCathepsin L-Transkription konnten ausgeschlossen werden. Ein Einfluss von proEGFcyt und proEGF22.23 auf die Reifung von proCathepsin L wurde detektiert. Es wurde eine verringerte Menge von produziertem Einzelstrang-Cathepsin L nachgewiesen. Die Menge von produziertem Doppelstrang-Cathepsin L wurde durch die Expression von proEGFcyt oder proEGF22.23 nicht beeinflusst.

Als potentielle Ursache der verminderten Sezernierung und Einzelstrang-Reifung von proCathepsin L konnte ein stark verändertes Verteilungsmuster der proCathepsin L-Transportvesikel, des 300 kDa-M6P-Rezeptors sowie des AP-1-Komplexes ermittelt werden. Der proEGFcyt-/proEGF22.23-induzierte, veränderte Vesikel-Transport konnte dabei nicht ausschließlich auf die erhöhte mikrotubuläre Stabilität in diesen Transfektanten zurückgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Die Proformen der EGF-Familie besitzen funktionelle Bedeutung

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die cytoplasmatische Domäne von proEGF (proEGF_{cyt}) in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen funktionell aktiv ist. Es wurde gezeigt, dass proEGF_{cyt} sowohl die Proliferation, Motilität als auch Migration – und damit die Ausbreitung - der humanen follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 inhibiert. Signifikante proEGF_{cyt}-induzierte Alterationen des mikrotubulären und vesikulären sezernierenden Systems der Schilddrüsenkarzinomzelle wurden als potentielle Mechanismen der Inhibition aufgedeckt.

Erst in den letzten fünfzehn Jahren reifte die Erkenntnis, dass die Proformen der EGF-ähnlichen Liganden eine Funktionalität besitzen, welche über die einer bloßen Ankerfunktion ihrer löslichen Wachstumsfaktoren hinausgeht. Die These, dass die cytoplasmatische proEGF-Domäne funktionell aktiv ist, wurde durch verschiedene Arbeiten gestützt.

So wurde nachgewiesen, dass die cytoplasmatische Domäne von proAmphiregulin, proTGF α und proHB-EGF an Lokalisation und Prozessierung ihrer löslichen Wachstumsfaktoren beteiligt ist. In polarisierten Nierenzellen des Hundes (*Madin-Darby canine kidney cells*) wurde gezeigt, dass die cytoplasmatische Domäne von proAmphiregulin die basolaterale Lokalisation des Moleküls bestimmt. Mutanten mit trunkierter cytoplasmatischer Domäne lokalisierten vorwiegend auf der apikalen Zellseite (Brown et al. 2001). Ebenso konnte in CHO-Zellen gezeigt werden, dass eine Deletion der cytoplasmatischen Domäne des proTGF α dessen Transport zur Zelloberfläche hemmt (Urena et al. 1999). Dabei wurden bereits mehrere Interaktionspartner der cytoplasmatischen proTGF α - und proHB-EGF-Domänen identifiziert und in deren intrazellulären Transport impliziert. Das am frühen sekretorischen Transport beteiligte *Syntenin* (mda-9) wurde mittels *Yeast-Two-Hybrid*-Methode als Interaktionspartner des cytoplasmatischen proTGF α nachgewiesen (Fernandez-Larrea et al. 1999). Das in den Golgi-Vesikel-Transport involvierte GRASP55 konnte ebenfalls als ein mit der cytoplasmatischen proTGF α -Domäne assoziiertes Protein gezeigt werden (Kuo et al. 2000). Die cytoplasmatische proHB-EGF-Domäne wurde als Interaktionspartner des Ko-Chaparones BAG-1 nachgewiesen (Lin J et al. 2001). Bedenkt man nun, dass die Aktivität des EGF-Rezeptors juxtakrin von der Lokalisation des membrangebundenen Wachstumsfaktors bzw. para- und autokrin von der Menge

freigesetzten löslichen Ligands abhängig ist, zeigt dies, dass die cytoplasmatische Domäne der Wachstumsfaktor-Proformen eine wichtige Rolle in der EGFR-Aktivierung und -Regulation einnimmt.

Die cytoplasmatische Domäne der Wachstumsfaktor-Proformen scheint darüber hinaus auch an Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein. So wurde gezeigt, dass das C-terminale Valin der cytoplasmatischen proTGF α -Domäne für die Freisetzung des löslichen TGF α essentiell ist (Bosenberg et al. 1992). Die Prozessierung des proTGF α kann durch Aktivierung der Protein-Kinase-C (PKC) ausgelöst werden. Da proTGF α -Mutanten mit deletiertem C-terminalen Valin keiner PKC-aktivierten Prozessierung unterliegen, wird eine Beteiligung der cytoplasmatischen proTGF α -Domäne an der PKC-vermittelten Prozessierung und damit Signalvermittlung vermutet (Bosenberg et al. 1992). Diese Vermutung wird durch Arbeiten von L. Shum et al. gestützt. Die Arbeitsgruppe konnte zwei Proteine von 86 und 106 kDa mit dem cytoplasmatischen proTGF α koimmunopräzipitieren, wovon das 106 kDa große Protein Tyrosin-Kinase-Aktivität zeigte (Shum et al. 1996). Wenig später wurde die LIM-Kinase (LIMK1) als Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domänen der proNeureguline I-III identifiziert (Wang et al. 1998).

Bisher aufgedeckte Funktionen der cytoplasmatischen Domäne der Wachstumsfaktor-Proformen zeigten zumeist deren regulatorischen Einfluss auf die Lokalisation des Prohormons sowie die Freisetzung des löslichen Ligands. Ein entscheidender Durchbruch in der Erforschung der Proformen der EGF-artigen Liganden gelang jedoch in den letzten drei Jahren. D. Nanba und seinem Team war es möglich, in humanen Fibrosarkomazellen und in primären Keratinocyten *in vivo* die Prozessierung der C-terminalen Domäne des proHB-EGF nachzuweisen. Die entstandene C-terminale proHB-EGF-Domäne translokalisierte in den Zellkern. Daraufhin wurde ein Transport des Negativ-Regulators und transkriptionellen Repressors des Zellzyklus` PLZF (*Promyelocytic Zink Finger*) aus dem Zellkern beobachtet, was wiederum einen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus' beschleunigte. PLZF wurde mittels der *Yeast-Two-Hybrid*-Methode als Interaktionspartner des C-terminalen proHB-EGF bestätigt (Nanba et al. 2003, 2004; Toki et al. 2005). Ebenso konnten J. Bao et al. intrazellulär die Prozessierung der cytoplasmatischen Domäne von proNeuregulin-I nachweisen. Auch das cytoplasmatische proNeuregulin-I translokalisiert in den Kern und unterdrückt dort die Expression von Regulatoren der Apoptose (Bao et al. 2003).

Diese Daten zeigen eindeutig, dass C-terminale Domänen der Proformen der EGF-Familie die Genexpression durch Regulation von intranukleären Transkriptionsfaktoren kontrollieren und somit wichtige, eigenständig funktionale Moleküle der Zelle

sind. Die Untersuchung der bisher unbekanntenen Funktion der cytoplasmatischen Domäne des proEGF stellte somit eine interessante und lohnenswerte Fragestellung dar.

4.2 Das Modellsystem

4.2.1 ProEGF im humanen Schilddrüsenkarzinom

In der humanen Schilddrüse spielt der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) eine wichtige Rolle in der Proliferation und Karzinogenese. Als löslicher Wachstumsfaktor wurde EGF im cytosolischen und auch nukleären Kompartiment follikulärer Schilddrüsenzellen nachgewiesen (Mizukami et al. 1991; Toda et al. 1999; Marti et al. 2001). Der hier geführte Nachweis von proEGF-mRNA-Transkripten im Schilddrüsengewebe zeigte dabei, dass EGF nicht ausschließlich als exogener, d.h. in anderen Organen produzierter Ligand auf die Schilddrüse wirkt, sondern dass EGF sowohl von der normalen wie auch neoplastischen humanen Schilddrüse exprimiert wird. Aus den bisherigen Untersuchungen war aber nicht zu entnehmen, ob EGF von den nur für die Schilddrüse charakteristischen Follikelzellen, den Thyreocyten, exprimiert wird. PCR-Analysen von extrahierter mRNA aus einer Gewebeprobe lassen keine Aussage über die genaue Entstehungszelle des nachgewiesenen Transkriptes zu. Unter Verwendung einer Digoxigenin-markierten, gegen die cytosolische Domäne des proEGF gerichteten cRNA-Sonde (*in-situ*-Hybridisierung) gelang es erstmals in dieser Arbeit, an Gewebeschnitten die mRNA-Expression von proEGF in den Thyreocyten der Schilddrüse und ihrer Karzinome nachzuweisen.

EGF wird *in vitro* und *in vivo* als ein potentes Mitogen für Schilddrüsenfollikelzellen beschrieben (Bergström et al. 2000). Sein wachstums- und proliferationsfördernder Effekt konnte in Schilddrüsenkulturzellen von Hund, Ratte, Schaf, Schwein sowie Mensch gezeigt werden (Roger et al. 1982, 1985; Westermarck et al. 1982; Errick et al. 1986; Stracke et al. 1987; Zerek-Melen et al. 1990; Nilsson et al. 1995; Paschke et al. 1995). Schilddrüsenkarzinomgewebe zeigten ein aggressiveres pathologisches Krankheitsbild mit schlechter Prognose für den Patienten, wenn EGF sowie die Expression seines Rezeptors vorlagen (Gorgoulis et al. 1992). Diese Untersuchungen beschrieben jedoch die Wirkung des löslichen Wachstumsfaktors EGF. Somit war keine Aussage darüber möglich, ob diese Befunde parakriner Natur sind oder aber, ob die Schilddrüse durch Expression von EGF autokrin Einfluss auf die Karzinogenese nimmt.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfangreiche Analyse von proEGFcyt-Transkripten – und damit der Genexpression von proEGF – in humanen Geweben verschieden dedifferenzierter Schilddrüsenkarzinome durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte in der vorliegenden Dissertation die Existenz einer bisher unbekannt proEGF-Isoform - proEGFdel23 - gezeigt werden. Die Sequenzierung dieser neuartigen proEGF-Isoform ergab, dass proEGFdel23 durch alternatives *Splicen* der mRNA hervorgeht, welche die cytoplasmatische Domäne des proEGF kodiert. Durch alternatives *Splicen* einer Vorläufer-mRNA können Isoformen eines Proteingrundmotivs mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften hervorgehen (Stryer 1996). Beispiele dieser Art funktioneller Differenzierung findet man auch in der Familie der EGF-ähnlichen Liganden. Zwei Isoformen von NTAK (*Neural- und Thymus-derived Activator for ErbB-Kinases*), einem Mitglied der Neureguline der EGF-Familie, zeigten ein unterschiedliches Bindungsverhalten und damit eine unterschiedliche Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren (Nakano et al. 2000).

Die in dieser Arbeit durchgeführte proEGF-Expressionsanalyse spiegelt drei grundsätzliche Tendenzen wider:

1. Differenziertes Schilddrüsengewebe von Strumen sowie der Follikulären und Papillären Karzinome (FTC und PTC) wiesen eine hohe Expression von proEGFcyt bzw. Koexpression beider proEGF-Isoformen auf. Der überwiegende Anteil der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome war frei von jeglicher proEGF-Expression.

2. Innerhalb der PTC mit Expression von proEGFdel23 wies der überwiegende Anteil der Gewebeproben das Tumorstadium T3/4 auf.

3. ProEGFcyt und proEGFdel23 zeigten ein unterschiedliches Expressionsprofil. Die Expression von proEGFdel23 erfolgte in steter Koexpression mit proEGFcyt, während proEGFcyt auch als singuläres Expressionsprodukt vorlag.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren. ProEGFcyt wird sowohl von der neoplastischen wie auch nicht-neoplastischen humanen Schilddrüse exprimiert. Die Expressionsrate von proEGFcyt in den Gewebeproben von PTC und FTC unterscheidet sich nicht signifikant von denen der nicht-neoplastischen humanen Schilddrüse. Eine Tendenz zur autokrinen, EGF-vermittelten Schilddrüsenkarzinoneogenese ist somit nicht abzuleiten.

Die Abnahme der proEGFcyt-Expression im undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom (UTC) im Vergleich zu den hoch differenzierten PTC und FTC ist jedoch signifikant. Es wird diskutiert, dass UTC oft aus differenzierten Schilddrüsenkarzinomen hervorgehen (Pfannenstiel et al. 1999). Ebenso wird EGF in der Literatur als Dedifferenzierungs-

faktor für Schilddrüsenkarzinome beschrieben (Westermarck et al. 1982; Roger et al. 1985; Errick et al. 1986; Miyamoto et al. 1989; Paschke et al. 1995). Die stark erhöhte Transkriptionsrate von proEGFcyt in den PTC und FTC im Vergleich zu den UTC könnte eine mögliche autokrin beeinflusste Dedifferenzierung in Richtung UTC bedeuten.

Das Expressionsprofil von proEGFdel23 lässt keinen Einfluss in Richtung neoplastischer Veränderung der Schilddrüse annehmen. Eine erhöhte Expression von proEGFdel23 jedoch hebt sich in den PTC hervor, insbesondere in denen im T3- bzw. T4-Stadium. Schilddrüsenkarzinome im Stadium T3 weisen eine Ausdehnung von mehr als 4 cm im Durchschnitt auf, solche im Stadium T4 eine Ausdehnung über die Schilddrüse hinaus (pTNM-Klassifikation erläutert in Abschnitt 2.1.1, Seite 19). ProEGFdel23 könnte somit eine noch unbekannt Funktion in der Entwicklung und Ausdehnung von papillären Schilddrüsenkarzinomen zu besitzen, deren genauere Indikation noch weiterer intensiver Forschung bedarf.

Die beiden proEGF-Isoformen, proEGFcyt und proEGFdel23, scheinen verschiedene Funktionen in der Karzinogenese der Schilddrüse einzunehmen, was das unterschiedliche Expressionsmuster beider Isoformen in den untersuchten Geweben reflektiert. Die ausschließliche Detektion von proEGFdel23 mit proEGFcyt weist zudem auf eine mögliche funktionelle Abhängigkeit von proEGFdel23 zu proEGFcyt hin.

4.2.2 Die cytoplasmatische proEGF-Domäne ist funktional in der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die cytoplasmatische Domäne von proEGF in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen funktionell aktiv ist. Die Funktionen von proEGFcyt wurden in der humanen epithelialen follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 nachgewiesen. FTC-133 wurde aus der Lymphknotenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Mannes generiert und weist differenzierte Schilddrüsenfunktionen wie auch neoplastische Veränderungen auf.

Die Expression von proEGFcyt führte zu signifikant reduzierter Proliferation und Motilität von FTC-133. Beide Effekte der proEGFcyt-Expression, d.h. die Hemmung der Proliferation wie der Motilität, schlugen sich im Koloniebildungsverhalten von FTC-133-proEGFcyt nieder. Die signifikant verminderte Anzahl der von FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle gebildeten Kolonien reflektiert deren eingeschränkte Motilität, während die kleinen Koloniedurchmesser mit gehemmter

Proliferation begründet werden können. Ebenso führte die Expression von proEGFcyt zu einer reduzierten Migration von FTC-133 durch die Elastinmatrix.

Die beobachteten Effekte der proEGFcyt-Expression lassen auf einen hemmenden Einfluss der cytoplasmatischen proEGF-Domäne auf die Proliferation und Invasionsfähigkeit von FTC-133 schließen. Dem löslichen Wachstumsfaktor EGF wurde bisher die gegenteilige Wirkung in FTC-133 nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass lösliches EGF die Proliferation von FTC-133 zeit- und dosisabhängig stimuliert. Ebenso erhöhte die Gabe von löslichem EGF die Migrationsrate von FTC-133 sowohl durch unbeschichtete als auch durch matrigelbeschichtete Invasionsfilter. *In vivo*-Experimente in Nacktmäusen zeigten nach Applikation mit löslichem EGF ein gesteigertes Schilddrüsentumorwachstum (Hoelting et al. 1994a, 1994b). Der mito- und karzinogene Effekt von löslichem EGF wurde dabei durch Aktivierung des EGF-Rezeptors hervorgerufen (Hoelting et al. 1995). Damit steht der antiproliferative und –invasive Einfluss der proEGFcyt-Expression im Gegensatz zur bisher beschriebenen Wirkung des löslichen Wachstumsfaktors EGF in FTC-133.

Somit wären folgende potentielle Mechanismen der cytoplasmatischen Domäne von proEGF in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen denkbar:

1. Die cytoplasmatische Domäne von proEGF fungiert regulierend zum löslichen Wachstumsfaktor EGF in Form eines Gegenspielers. Diese Regulation könnte in Form von Rückkopplungsmechanismen – direkt transmembranös über das proEGF-Molekül oder indirekt durch Interaktion mit dem cytoplasmatischen EGFR – erfolgen.

2. proEGFcyt übernimmt als separates Molekül EGF-unabhängige Funktionen. Die Prozessierung der C-terminalen Domänen von proHB-EGF sowie proNeuregulin I und deren anschließende intranukleär transkriptionell regulatorische Funktionen konnten bereits *in vivo* nachgewiesen werden (Nanba et al. 2003, 2004; Toki et al. 2005; Bao et al. 2003).

Eine funktionelle Aktivität von proEGFdel23 in FTC-133 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Sowohl in den funktionellen Assays wie auch in der phänotypischen Charakterisierung zeigten FTC-133-proEGFdel23 keinen signifikanten Unterschied zur Leerplasmidkontrolle. Eine mögliche Funktionalität von proEGFdel23 ist jedoch nicht auszuschließen. Diese könnte z.B. von der transmembranösen und/oder extrazellulären proEGF-Domäne bzw. einer definierten Lokalisation von proEGFdel23 in der Zelle abhängig sein. In den hier dargelegten Untersuchungen wurde proEGFdel23 als lösliches Molekül exprimiert. Des Weiteren könnte eine mögliche Funktionalität von proEGFdel23 von der Koexpression mit proEGFcyt

abhängig sein. Die proEGF_{cyt}-/proEGF_{del23}-Expressionsstudien an den verschiedenen dedifferenzierten Schilddrüsenkarzinomgeweben deuten diese Möglichkeit der funktionellen Abhängigkeit an.

4.2.3 Stabile Transfektion in die humane Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133

Die komplexe Fragestellung dieses Projektes benötigte die Verwendung eines Modellsystems. Die vielschichtige Architektur der Schilddrüse bzw. eines Schilddrüsenkarzinoms bedingt, dass auf engstem Raum Zellen mit den unterschiedlichsten Funktionen miteinander interagieren. Um die Betrachtung nur einer Zellart unabhängig von der Gewebearchitektur oder dem extrazellulären Milieu zu ermöglichen, wurden Zellkulturmodelle geschaffen. Dazu dienen Zelllinien, die ursprünglich aus menschlichen Tumorgeweben gewonnen wurden und nun in Kultur gehalten werden. Dies impliziert natürlich den Nachteil, dass der so untersuchte Phänotyp *in vitro* sich von dem *in vivo* unterscheidet.

In dieser Studie wurde die humane epitheliale follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 verwendet. Neben der undifferenzierten humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie 8305C war FTC-133 die einzige, welche keine Expression von proEGF aufwies. Somit waren mögliche Interferenzen mit endogen exprimiertem proEGF auszuschließen, was wiederum eine bessere Interpretation der Ergebnisse erlaubte. Die Verwendung einer endogen proEGF exprimierenden Zelllinie könnte eine permanente Gleichgewichtssituation von vorliegendem proEGF reflektieren, welche phänotypische Veränderungen zu maskieren vermag. Zudem könnte eine Konkurrenzsituation der durch Transfektion exprimierten trunkierten proEGF-Sequenzen mit endogen vorliegendem proEGF eintreten, die einen Nachweis von Funktionen spezifischer proEGF-Sequenzen verhindern kann.

Die stabile Transfektion von markierten proEGF-Sequenzen erlaubte deren Detektion sowie Langzeit-Untersuchungen in der gewählten Zelllinie. Ersteres war insbesondere wichtig, da bisher keine kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne des proEGF vorliegen.

Die stabilen Transfektanten exprimierten die proEGF-Sequenzen konstitutiv. Das bedeutet, individuelle Unregelmäßigkeiten, wie sie mitunter bei transienter Transfektion auftreten, wurden damit verhindert. Die Klonierung und Transfektion der trunkierten proEGF-Sequenzen proEGF_{22.23} und proEGF_{del23} ermöglichten eine Eingrenzung der interaktiven Domänen auf dem cytoplasmatischen proEGF-Molekül.

Durch Transfektion können Proteine mit definierter Sequenz in der Zielzelle exprimiert werden. Das erlaubte die Möglichkeit der Expression und damit der gezielten Untersuchung der ausschließlich cytoplasmatischen Domäne von proEGF. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die rein cytoplasmatische Domäne von proEGF, welche als lösliches Protein exprimiert wurde. Damit wurden Funktionen, welche einer membranständigen Lokalisation des proEGFcyt bedürfen, nicht adressiert. Die separate Untersuchung von proEGFcyt war jedoch nötig, um Funktionen, welche sich ausschließlich auf die cytoplasmatische proEGF-Domäne beschränken, aufzudecken. Der Einsatz membranständiger proEGF-Formen soll in weiterführenden Arbeiten diese Frage klären helfen.

Es wurden je drei FTC-133-Klone mit deutlicher Expression von proEGFcyt, proEGF22.23 bzw. proEGFdel23 selektiert, ebenso drei Kontroll-Klone mit Expression des Leervektors. Durch das Testen mehrerer individueller Klone pro Transfektion konnten zufällige Phänotypen, die nicht auf der Expression des jeweiligen proEGF-Peptids beruhen, ausgeschlossen werden. Die Expression der entsprechenden proEGF-Domäne wurde dabei indirekt über das N-terminal mit dem klonierten proEGF fusionierte Xpress-Epitop, nach Berechnung des Molekulargewichtes des entsprechenden proEGF-Xpress-Fusionsproteins, nachgewiesen. Das Xpress-Epitop besitzt die Aminosäure-Sequenz N'-Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C'. Dieses Epitop kommt nicht in den natürlichen Proteinsequenzen der Zellen vor und dient somit dem spezifischen Nachweis der in FTC-133 exprimierten proEGF-Fusionsproteine. Der in regelmäßigen Abständen erfolgte Nachweis der entsprechenden proEGF-Sequenzen stellte deren kontinuierliche konstitutive Expression in den FTC-133-Transfektanten sicher.

Ein immuncytochemischer Nachweis der proEGF-Sequenzen in den FTC-133-Transfektanten, welcher genauere Information über die Lokalisation des Proteins in der Zelle geben würde, war in dieser Arbeit nicht möglich. Der zum Nachweis der Xpress-Fusionsproteine verwendete spezifische Anti-Xpress-Antikörper konnte im Western-Blot erfolgreich eingesetzt werden, war jedoch für einen immuncyto- oder immunhistochemischen Proteinnachweis nicht anwendbar. Ein für diese Techniken geeigneter adäquater Anti-Xpress- oder Anti-proEGFcyt-Antikörper liegt derzeit kommerziell nicht vor.

Eine weitere Methode der spezifischen histologischen und cytologischen Sequenz-Lokalisation ist der Transkript-Nachweis mittels *in-situ*-Hybridisierung, welcher jedoch keine Schlüsse auf die Lokalisation des entsprechenden Proteins in der Zelle zulässt. Durch Fraktionierung des Zelllysates und anschließender Western-Blot-Detektion

konnte proEGFcyt in der cytosolischen Fraktion von FTC-133 lokalisiert werden. Um eine mögliche Verunreinigung der cytosolischen Fraktion mit der nukleären Fraktion auszuschließen, wurde Histon 1 als nukleäres Markerprotein – ausschließlich in der nukleären Fraktion – nachgewiesen.

Die Western-Blot-Detektion von proEGFcyt in der cytosolischen Fraktion des Zelllysates wies die cytoplasmatische Lokalisation des Proteins in den stabilen FTC-133-Transfektanten nach. Sie erlaubte aber keine spezifische Ortsbestimmung im Cytoplasma der Zelle, wie die Kolo­kalisierung mit bestimmten intrazellulären Strukturen. Dem Experiment konnte jedoch die wichtige Information entnommen werden, dass proEGFcyt nicht primär intranukleär fungiert. Eine intranukleäre Funktion von proEGFcyt wäre denkbar, da bei zwei Mitgliedern der EGF-Familie eine nukleäre Funktion der cytoplasmatischen Domäne ihrer Proformen gezeigt wurde. Sowohl für proHB-EGF als auch für proNeuregulin I konnte *in vivo* und *in vitro* die proteolytische Freisetzung der C-terminalen Domänen und deren anschließende Translokation in den Kern nachgewiesen werden. Dort interagierten sie mit dem transkriptionellen Repressor des Zellzyklus` PLZF (*Promyelocytic Zink Finger*) bzw. Regulatoren der Apoptose (Nanba et al. 2003; Nanba et al. 2004a; Toki et al. 2005; Bao et al. 2003). Auch wenn keine primär kernständige Lokalisation von proEGFcyt nachweisbar war, sind funktionelle Parallelen von proEGFcyt und der cytoplasmatischen Domäne von proHB-EGF bzw. proNeuregulin I, etwa durch die Aktion sehr geringer, durch die hier verwendeten Methoden nicht nachweisbarer Proteinmengen, potentiell denkbar.

4.3 Potentielle Mechanismen der proEGFcyt-Funktionen

4.3.1 Die Expression von proEGFcyt induziert eine erhöhte mikrotubuläre Stabilität in FTC-133

Die Expression von proEGFcyt und proEGF22.23 führte im Vergleich zu FTC-133-proEGFdel23 und der Leerplasmidkontrolle zu deutlich abweichenden phänotypischen Veränderungen. Sowohl die morphologischen wie auch transkriptionell/translationalen Veränderungen wurden nur in den stabilen Transfektanten mit Expression von proEGFcyt oder proEGF22.23 nachgewiesen. Die Expression der cytoplasmatischen proEGF-Domäne kodiert von Exon 22 (proEGFdel23) führte zu keinen phänotypischen und funktionellen Veränderungen von FTC-133. Daraus lässt sich schließen, dass potentielle Interaktionsstellen auf proEGFcyt auf der von Exon 23 kodierten Sequenz lokalisiert sind. ProEGFdel23 verfügt zu der von Exon 22 kodierten

Sequenz noch über weitere 36 Aminosäuren, diese weisen jedoch keine bekannten konservierten Protein-Protein- bzw. Protein-Nukleotid-Interaktionsmotive auf (Suchprogramm *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*).

FTC-133-proEGFcyt zeigten eine wesentlich größere, ausladendere Zellform. In eukarionten Zellen gibt das Cytoskelett als ein komplexes Geflecht von Proteinfilamenten der Zelle Form und Bewegungsmöglichkeit (Alberts et al. 1995). Die Untersuchung der drei cytoskelettalen Hauptstrukturen – den Aktin-Filamenten, den Mikrotubuli und den Cytokeratinen als typisch epitheliale Vertreter der Intermediärfilamente – war somit primär nahe liegend. Die EGF/ErbB-Familie besitzt einen Einfluss auf die Morphologie der Zelle. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass der lösliche Wachstumsfaktor EGF eine extensive Aktin-Polymerisation und damit die Formation gewellter Zellmembranstrukturen verursacht (Chinkers et al. 1979; Boonstra et al. 1987; Rijken et al. 1991). Ebenso bindet der EGF-Rezeptor an Aktinfilamente des Cytoskeletts (Landreth 1985; Wiegant et al. 1986; Roy et al. 1989). Interessanterweise ist diese Interaktion an die cytoplasmatische Domäne des EGF-Rezeptors gebunden – Deletionsmutanten ohne die cytoplasmatische Domäne sind dazu nicht in der Lage (van Belzen et al. 1990).

Strukturelle Unterschiede zwischen FTC-133-proEGFcyt und der Leerplasmidkontrolle konnten nur im Filamentmuster der Mikrotubuli detektiert werden. Eine erste Vermutung, die abweichende Filamentstruktur werde durch direkte Interaktion der cytoplasmatischen proEGF-Domäne mit den Mikrotubuli hervorgerufen, konnte mittels der Methode der Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden. Weder alpha- noch beta-Tubulin, welche die Grundbausteine mikrotubulärer Filamente sind, wurden mit proEGFcyt präzipitiert.

FTC-133-proEGFcyt wiesen weniger kondensierte, dafür aber homogenere feinverteilte mikrotubuläre Filamente in der Immunfluoreszenzfärbung auf. Mikrotubuli sind dynamische Strukturen, deren Filamente einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen. Damit weisen Mikrotubuli, abhängig von der Halbwertszeit ihrer Filamente, eine unterschiedliche Stabilität auf (Alberts et al. 1995). In Säugerzellen werden, abhängig von der Halbwertszeit, zwei Untergruppen von Mikrotubuli unterschieden: dynamische, d.h. instabile Mikrotubuli mit einer Halbwertszeit von 5-10 Minuten und stabile Mikrotubuli mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden (Bulinski et al. 1991; Palazzo et al. 2003). Die abweichende Filamentstruktur in FTC-133-proEGFcyt im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle gab Anlass, einen Einfluss der Expression von proEGFcyt auf die Stabilität der Mikrotubuli in FTC-133 näher zu untersuchen.

Die Expression von proEGFcyt führte zu einer erhöhten mikrotubulären Stabilität in FTC-133. Dies konnte erstmals durch die Detektion des erhöhten Acetylierungsstatus', eines Markers stabilisierter Mikrotubuli (LeDizet et al. 1986; Webster et al. 1989), in FTC-133-proEGFcyt nachgewiesen werden. Die Acetylierung ist eine posttranslationale Modifikation stabiler Mikrotubuli und erfolgt an der ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysin-Restes (Lysin 40) nahe dem N-Terminus von Alpha-Tubulin (MacRae 1997; Rosenbaum 2000). Die Acetylierung vermittelt nicht die erhöhte mikrotubuläre Stabilität, sie ist jedoch in Taxol-stabilisierten Mikrotubuli signifikant induziert (LeDizet et al. 1986; Piperno et al. 1987; Webster et al. 1989; Hubbert et al. 2002). Dem Diterpenoid Taxol wurde seine Mikrotubuli-stabilisierende Wirkung eindeutig nachgewiesen. Es lagert sich in eine hydrophobe Tasche der beta-Tubulin-Untereinheit der Protofilamente ein und verstärkt dadurch die laterale Interaktion zwischen den Protofilamenten (Patocka et al. 1999; Downing 2000). Die Detyrosinierung, eine Abspaltung des C-terminalen Tyrosinrestes am alpha-Tubulin, wird ebenfalls in der Literatur mit erhöhter mikrotubulärer Stabilität in Verbindung gebracht (Webster et al. 1987; Baas et al. 1990). Die Expression von proEGFcyt führte jedoch zu keiner Veränderung des Tyrosinierungsstatus' in FTC-133. Die Detyrosinierung wird verstärkt mit Funktionen in der Rekrutierung von Intermediärfilamenten sowie Mikrotubuli assoziierten Motorproteinen, wie Vimentin und Kinesin, diskutiert (Gurland et al. 1995; Kreitzer et al. 1999), nicht jedoch als Ursache der erhöhten mikrotubulären Stabilität beschrieben (Khawaja et al. 1988; Webster et al. 1990). In kultivierten Fibroblasten führte eine durch Antikörper-Blockierung der Tyrosin-Ligase induzierte Detyrosinierung der Mikrotubuli nicht zur Erhöhung der Mikrotubuli-Halbwertszeit (Webster et al. 1990). Zudem konnten auch andere Autoren beobachten, dass beide posttranslationalen Modifikationen nicht zwangsläufig parallel auftreten. Die Inkubation mit Taxol induzierte die Acetylierung der Mikrotubuli, nicht jedoch die Detyrosinierung (Palazzo et al. 2003). Da Taxol eine Mikrotubuli stabilisierende Wirkung nachgewiesen wurde (Patocka et al. 1999), ist der alpha-Tubulin-Tyrosinierungsstatus als Stabilitätsmarker kritisch zu bewerten.

Durch das Mikrotubuli-destabilisierende Agens Nocodazol (Thyberg et al. 1993) war der Acetylierungsstatus in FTC-133-proEGFcyt revertierbar. Damit zeigten die FTC-133-Transfektanten ein funktionelles System von Acetylasen und Deacetylasen (Piperno et al. 1987; Hubbert et al. 2002). Der Einfluss von proEGFcyt auf das De-/Acetylase-System der Mikrotubuli ist schwer zu analysieren, da der derzeitige Wissensstand diesbezüglich nur mangelhaft ist. Erst in den letzten fünf Jahren gelang ein erster Einblick in die Mechanismen dieser posttranslationalen alpha-Tubulin-

Modifikation. Ein die Acetylierung des alpha-Tubulins katalysierendes Enzym ist bisher nicht bekannt und konnte somit nicht untersucht werden. Die Histondeacetylase 6 (HDAC6) ist das derzeit einzige bekannte Enzym, welches die Deacetylierung des alpha-Tubulins katalysiert (Verdel et al. 2000; Barlow et al. 2001; Zhang et al. 2003). Eine transkriptionelle oder translationale Regulation von HDAC6 durch proEGFcyt konnte mittels quantitativer PCR sowie Western-Blot-Analysen ausgeschlossen werden. Einen möglichen Einfluss von proEGFcyt auf die Aktivität bzw. Funktionalität von HDAC6 wurde mittels bekannter Inhibitoren der Histondeacetylasen (HDACs) geprüft. Bisher liegt kein spezifischer Inhibitor von HDAC6 vor. Allerdings ist beschrieben, dass Trichostatin A (TSA) einen Inhibitor aller bekannten Histondeacetylasen darstellt (Hubbert et al. 2002; Matsuyama et al. 2002; DeRuiter 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass von allen bekannten HDACs nur HDAC6 und HDAC10 aufgrund ihrer Zweidomänenstruktur gegen die HDAC-Inhibitoren Natriumbutyrat sowie das Cyclotetrapeptid HC-Toxin resistent sind (Hassig et al. 1997; Koeller et al. 2003; Hubbert et al. 2002; Guardiola et al. 2002). HDAC10 steht in keinem bekannten Zusammenhang mit Tubulin(de-)acetylierung (Fischer et al. 2002; Guardiola et al. 2002; Kao et al. 2002; Tong et al. 2002). Der Test auf HDAC6-Aktivität erfolgte somit indirekt unter Verwendung aller drei Reagenzien: TSA, Natriumbutyrat sowie HC-Toxin. Wenn proEGFcyt die Aktivität von HDAC6 reduziert und damit einen erhöhten Acetylierungsstatus in FTC-133 induziert, sollte durch Inhibieren von HDAC6 der Acetylierungsstatus in der Leerplasmidkontrolle dem in FTC-133-proEGFcyt anzunähern sein. Das Ergebnis der Untersuchungen widerlegte diese These: während durch Inhibieren von HDAC6 mit TSA der Acetylierungsstatus in der Leerplasmidkontrolle konstant blieb, konnte dieser in FTC-133-proEGFcyt mit steigender Konzentration von TSA noch weiter angehoben werden. Die parallelen Inkubationen mit Natriumbutyrat und HC-Toxin wiesen dabei die spezifische Aktion von HDAC6 nach. Somit ist HDAC6 und damit der Mechanismus der Deacetylierung auch in FTC-133-proEGFcyt aktiv. Der unter TSA-Inkubation fehlende Anstieg der alpha-Tubulin-Acetylierung in den proEGFcyt-defizienten FTC-133 ist nicht eindeutig zu beantworten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch TSA zwar HDAC6 inhibiert, nicht aber die Stabilität der Mikrotubuli erhöht wird. TSA ist ein HDAC-Inhibitor jedoch kein Mikrotubuli-stabilisierendes Agens. Die Acetylierung wiederum ist nicht als Urheber, sondern als Charakteristikum stabiler Mikrotubuli identifiziert (Palazzo et al. 2003). Eine Inhibition von HDAC6 allein könnte also kein ausreichendes Kriterium sein, einen erhöhten Acetylierungsstatus zu induzieren. Dieser Aspekt könnte in fortführenden Arbeiten durch Parallelinkubationen mit Taxol und Nocodazol vertieft werden. Des Weiteren kann auch das Verhältnis der Aktivität der Gegenspieler

Deacetylase und Acetylase entscheidend sein. Da bisher keine alpha-Tubulin-Acetylase bekannt ist, konnte dieser Gesichtspunkt nicht untersucht werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von proEGFcyt auf die Expression der Tubulin-Isoformen untersucht. Mikrotubuli sind hohlzylindrige Polymere, deren Protofilamente aus Dimeren von jeweils einem alpha- und einem beta-Tubulin-Monomer aufgebaut sind. Derzeit sind sieben Isoformen von humanem alpha-Tubulin sowie acht Isoformen von humanem beta-Tubulin bekannt, welche sich überwiegend in ihren 15 C-terminalen Aminosäuren unterscheiden (Joshi et al. 1990; Banerjee 2002; Verdier-Pinard et al. 2003). *In-vitro*-Studien haben gezeigt, dass die Komposition der beta-Tubulin-Isoformen einen Einfluss auf die Stabilität der Mikrotubuli einer Zelle hat (Panda et al. 1994; Lobert et al. 1995; Derry et al. 1997). Die Expression von proEGFcyt in FTC-133 führte zu einer signifikant erhöhten Expression der beta-Tubulin-Isoformen IVa und IVb im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle. *In-vitro*-Studien mit gereinigten Tubulin-Isoformen zeigten, dass die Isoform IV schneller und in größeren Mengen polymerisiert als die Isoform III und damit beta-Tubulin IV durch seine vermehrte Neigung zur Polymerisation den Mikrotubulus stabilisiert (Lu et al. 1994). Dem gegenüber stehen beta-Tubulin-Expressionsanalysen an Zellen, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber Mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien vorweisen. Viele Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in diesen Zellen eine erhöhte Expression der beta-Tubulin-Isoformen III und/oder IV vorliegt (Jaffrezou et al. 1995; Ranganathan et al. 1996; Derry et al. 1997; Ranganathan et al. 1998; Banerjee 2002). Eine Resistenz gegenüber Mikrotubuli stabilisierenden Agenzien geht mit einem erniedrigten Spiegel an polymerisiertem Tubulin einher (Minotti et al. 1991; Zang et al. 1999; Kavallaris et al. 2001). Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zusammenhänge wären also zwei kontroverse Mechanismen denkbar: (I) Die Expression von proEGFcyt induziert durch gesteigerte Expression der beta-Tubuline IVa und IVb eine erhöhte mikrotubuläre Stabilität in FTC-133; oder aber (II) die Tumorzelle FTC-133 versucht durch die gesteigerte Expression der beta-Tubuline IV der Mikrotubuli-stabilisierenden Wirkung von proEGFcyt zu entgehen. Vertiefende Experimente, wie z.B. die Inhibition der beta-Tubulin IV-Expression in den entsprechenden Transfektanten mittels siRNA, kombiniert mit Stabilitätsanalysen der Mikrotubuli, könnten in weiterführenden Arbeiten dazu Aufschluss liefern.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität von Mikrotubuli nehmen die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs). Die Expression von proEGFcyt induzierte eine signifikant erhöhte Expression von MAP1a, MAP1b und MAP2c. Allen dreien wurde die spezifische Interaktion mit den Mikrotubuli nachgewiesen (Vallee et al.

1984). Ihre Mikrotubuli-stabilisierenden Eigenschaften werden durch mehrere Faktoren vermittelt. Sowohl MAP1a, MAP1b als auch MAP2c stimulieren die Tubulin-Polymerisierung (Kuznetsov 1980, 1981; Takemura et al. 1992; Weisshaar et al. 1992; Gamblin et al. 1996). Dies wird durch eine Verringerung der kritischen, für die Polymerisation erforderlichen Konzentration freien Tubulins, bewirkt (Pedrotti et al. 1994). Diese Funktion wird mit gesteigerter Konzentration bzw. Expression dieser MAPs verstärkt (Umeyama et al. 1993; Gamblin et al. 1996). In FTC-133-proEGFcyt konnte eine erhöhte Produktion von MAP1b und MAP2c sowie Expression von MAP1a nachgewiesen werden. MAP2c fördert die laterale Interaktion zwischen den Mikrotubuli. Diese interagierenden Mikrotubuli zeigen ihre gesteigerte Stabilität u.a. durch einen erhöhten Acetylierungsstatus (Takemura et al. 1992; Takeuchi et al. 1992; Umeyama et al. 1993). Ein erhöhter Acetylierungsstatus wurde in FTC-133-proEGFcyt nachgewiesen. Darüber hinaus vermitteln MAP1a, MAP1b und MAP2c eine Verknüpfung von Mikrotubuli mit Aktin-Filamenten und damit sowohl eine erhöhte Stabilität als auch einen Einfluss auf die Zellform (Fujii et al. 1993; Togel et al. 1998; Noiges et al. 2002; Dehmelt et al. 2003; Roger et al. 2004). FTC-133-proEGFcyt unterschieden sich von den Zellen der Leerplasmidkontrolle durch eine wesentlich größere, ausladende Zellform.

Zudem kann die Interaktion der MAPs mit den Mikrotubuli durch Polyglutamylierung modifiziert werden. Die Polyglutamylierung ist eine C-terminale posttranslationale Modifikation von alpha- und beta-Tubulin, welche in Abhängigkeit von der Länge der Polyglutamyseitenkette die Affinität von Mikrotubuli zu den MAPs beeinflusst (Boucher et al. 1994; Bonnet et al. 2001). Die Expression von proEGFcyt induzierte keine quantitative Änderung polyglutamylierten Tubulins. Dennoch könnte das stark abweichende Verteilungsmuster des polyglutamylierten Tubulins in FTC-133-proEGFcyt die lokalen Kinetiken der MAP-Mikrotubuli-Interaktion potentiell beeinflussen.

4.3.2 Potentielle Mechanismen der proEGFcyt-induzierten Motilitäts- und Proliferationshemmung

Durch die Expression von proEGFcyt wurden FTC-133 in ihrer Motilität signifikant inhibiert. Die zelluläre Motilität umfasst drei wichtige koordinierte Vorgänge: (I) die gerichtete Ausbildung von Lamellipodien bzw. Filopodien in Bewegungsrichtung der Zelle (Ausstülpung), (II) die Adhäsion zwischen Aktin-haltigem Zellsaum und der Unterlage und (III) die Kontraktion der der Bewegungsrichtung abgewandten Zellseite (Alberts et al. 1995). Damit erhält die wandernde Zelle eine asymmetrische, polarisierte

Morphologie mit einer ausladenden Lamelle in Wanderungsrichtung und einer nachgezogenen, kontrahierenden Seite (Wittmann et al. 2001).

ProEGFcyt könnte zum einen durch Alteration des alpha-Tubulin-Acetylierungsstatus' die Motilität von FTC-133 beeinflussen. Für Mikrotubuli werden verschiedene Funktionen im Wanderungsprozess der Zelle diskutiert. Dabei scheint der Acetylierungsstatus einen wesentlichen Einfluss auf die Wanderungsfähigkeit einer Zelle zu besitzen. Hubbert et al. konnte zeigen, dass ein erniedrigter Acetylierungsstatus zu einer um das 3,5fach erhöhten Motilität kultivierter humaner Fibroblasten führte (Hubbert et al. 2002). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt: FTC-133-proEGFcyt wiesen eine um die Hälfte reduzierte Motilität bei gleichzeitig signifikant erhöhtem Acetylierungsstatus auf. Zudem berichten neuere Arbeiten, dass in Lamellipodien wandernder Zellen die in den Leitsaum einwachsenden Mikrotubuli durch eine bestimmte Gruppe von MAPs, die sogenannten +TIPs stabilisiert werden (Watanabe et al. 2005; Wadsworth et al. 1999). Das zu den +TIPs zählende *CLASP2* akkumuliert dabei vornehmlich an acetylierten Mikrotubuli (Akhmanova et al. 2001). ProEGFcyt könnte somit auch durch Alteration des alpha-Tubulin-Acetylierungsmusters die Assoziation von +TIPs und damit eine selektive Mikrotubuli-Stabilisation beeinflussen.

Zum zweiten könnte die proEGFcyt-induzierte MAP2c-Expression die Motilität von FTC-133 inhibieren. Mikrotubuli dienen als „Schienen“ für den gerichteten Vesikel- und damit Membrantransport zum Leitsaum, was die Ausbreitung der Lamellipodien fördert (Bergmann et al. 1983). Die Notwendigkeit des Mikrotubuli-basierenden Membran-Transports während der Zellwanderung wurde in Experimenten mit spezifischen Anti-Kinesin-Antikörpern demonstriert. Kinesine sind Mikrotubuli-abhängige Motorproteine, welche unter anderem am gerichteten Transport von Organellen und sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran mitwirken (Alberts et al. 1995). Die Blockierung der Kinesine mit spezifischen Antikörpern inhibiert die Zellmotilität (Rodionov et al. 1993). Die Interaktion von Kinesin mit den Mikrotubuli wiederum ist durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine reguliert, wobei MAP2 die Mikrotubuli-Kinesin-Interaktion und damit auch den Plasmamembran-gerichteten Vesikeltransport hemmt (Heins et al. 1991; von Massow et al. 1989; Lopez et al. 1993). Die Expression von proEGFcyt in FTC-133 führte zur erhöhten Expression von MAP2c. Da eine erhöhte MAP2c-Konzentration den Kinesin-abhängigen Transport signifikant inhibiert (Sato-Harada et al. 1996), kann die reduzierte Motilität in FTC-133-proEGFcyt unter anderem durch eingeschränkten Vesikeltransport und damit eingeschränkter Lamellipodien-Ausbreitung vermittelt sein.

Die Expression von proEGFcyt führte zu einer deutlichen Proliferationshemmung von FTC-133. Eine proapoptotische Wirkung der proEGFcyt-Expression konnte im *TUNEL*-Test als Ursache der verminderten Proliferation ausgeschlossen werden. Auch im Mechanismus der proEGFcyt-vermittelten Proliferationshemmung könnte die induzierte Überexpression von MAP2c eine wichtige Rolle spielen. Die Proliferation erfolgt im Laufe eines Zellteilungszyklus', welcher einer sehr komplexen Koordination und Regulation cytoplasmatischer und Zellkern-spezifischer Prozesse unterliegt. Essentiell für den Prozess der Zellteilung ist die Mitosespindel, welche jeweils einen vollständigen Satz von Schwester-Chromatiden zu den Polen der sich teilenden Zelle transportiert. Dieser Transport wird durch das Zusammenwirken der verschiedenen Spindel-Mikrotubuli, der dynamischen Molekül-Struktur der Mikrotubuli sowie einer großen Anzahl von Mikrotubuli-assoziierten Stabilisatoren, Destabilisatoren sowie Motorproteinen realisiert. Stabilisatoren wie MAP2 festigen dabei den gebildeten Mikrotubulus gegen Depolymerisation. Eine erhöhte MAP2-Expression kann jedoch die Proliferation hemmen. Humane metastatische Melanomzellen wurden durch erhöhte Expression von MAP2 in ihrer Proliferation signifikant inhibiert. Es wurde ein Arrest von MAP2-exprimierenden Zellen in der G2-M-Phase des Zellzyklus` nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen eine erhöhte mikrotubuläre Stabilität der Interphase-Mikrotubuli vorlag. Interessanterweise zeigten diese MAP2-positiven Melanomzellen vergrößerte Zellkerne mit multipolaren mitotischen Spindeln (Soltani et al. 2005). Auch in FTC-133-proEGFcyt konnten deutlich vergrößerte Zellkerne detektiert werden. Die proEGFcyt-induzierte MAP2c-Expression könnte zudem eine Proliferationshemmung durch Inhibition der Mikrotubuli-Kinesin-Interaktion vermitteln (Heins et al. 1991; von Massow et al. 1989; Lopez et al. 1993; Bonnet et al. 2001). Während der Mitose fokussieren die unidirektional, d.h. in Richtung Plus- oder Minus-Ende des Mikrotubulus` transportierenden Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine der Kinesin- und Dynein-Familien die Anbindung der Mikrotubuli-Enden an den Kinetochoren, Spindel-Polen und der Zellkortex. Außerdem verknüpfen sie die antiparallel verlaufenden interpolaren Mikrotubuli miteinander und können diese durch einen Plus- oder Minus-Ende-gerichteten Transport zusammen oder auseinander schieben (Gadde et al. 2004; Scholey et al. 2003; Cassimeris 1999). Eine Hemmung der Mikrotubuli-Motor-Interaktion durch Überexpression von MAP2c könnte somit einen hemmenden Effekt auf die Mitose in FTC-133-proEGFcyt ausüben.

4.3.3 Eine gehemmte Sezernierung von proCathepsin L kann zur verminderten Migrationsfähigkeit von FTC-133-proEGFcyt beitragen

Die Expression von proEGFcyt führte zu einer signifikant reduzierten Sezernierung von proCathepsin L durch FTC-133. Cathepsin L zählt zur Papain-Superfamilie der Cystein-Proteasen der lysosomalen Hydrolasen. Die Hauptfunktion von Cathepsin L *in vivo* ist die intralysosomale Hydrolyse von intra- und extrazellulären Proteinen sowie die Beteiligung an limitierter Proteolyse, wie der Proenzym-Aktivierung (Samarel et al. 1989), der Hormonreifung (Docherty et al. 1982) oder der Antigen-Prozessierung (Riese et al. 1996). Neben physiologischen Funktionen wird sezerniertem Cathepsin L große Bedeutung an der Progression maligner Tumoren beigemessen. Bei invasiven Prozessen werden das interstitielle Stroma, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran von Epithelien lokal zersetzt. Dadurch wird der Einbruch maligner Zellen, die Invasion, in angrenzende Gewebe und in die Blutbahn ermöglicht. Cathepsin L ist hierbei an der Zersetzung der extrazellulären Matrix, bestehend aus Kollagenen, Elastin, Glykoproteinen und Proteoglykanen, beteiligt. Elastin ist dabei ein spezifisch von den Cathepsinen L, S und K hydrolysiertes Substrat der extrazellulären Matrix (Beyer et al. 1991; Mason et al. 1986; Collins et al. 1981). Die Expression und Sezernierung der Cathepsine K und S wurden durch die proEGFcyt-Expression in FTC-133 nicht differentiell reguliert. Jedoch wurden FTC-133-proEGFcyt mit stark reduzierter proCathepsin L-Sezernierung in ihrer Migration durch die Elastin-Matrix gehemmt. ProEGFcyt-defiziente Zellen mit signifikanter Sezernierung von proCathepsin L hingegen durchwanderten und damit hydrolysierten die Elastin-Matrix uneingeschränkt.

Elastinolytische Aktivität wurde bisher nur für das prozessierte Cathepsin L, nicht aber für proCathepsin L berichtet. ProCathepsin L wird jedoch lokal an der Zelloberfläche zu reifem Cathepsin L prozessiert, dessen elastinolytische Aktivität bewiesen ist (Mason et al. 1986, Novinec et al. 2007). Die Prozessierung von proCathepsin L findet auf Zelloberflächen unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen statt (Kakegawa et al. 1995; Reddy et al. 1995). Niedrige pH-Werte sowie negativ geladene Seitenketten von Zelloberflächenmolekülen, wie Chondroitin- oder Keratansulfaten, katalysieren die Reifung zu Cathepsin L (Mason et al. 1992; Ishidoh et al. 1995; Kakegawa et al. 1995; Gal et al. 1986). Besonders maligne Tumorzellen, welche die extrazelluläre Matrix zersetzen können, scheinen sich die pH-abhängige Autokatalyse von proCathepsin L zunutze zu machen. Viele Arbeitsgruppen wiesen erhöhte Mengen an sezerniertem proCathepsin L an Zellen unter maligner Transformation nach (Gottesman 1978; Dong et al. 1989; Kane et al. 1990). Da Tumorzellen gleichsam zur

Ansäuerung ihrer unmittelbaren Umgebung befähigt sind (Young et al. 1992; Montcourrier et al. 1997), kann auf ihren Oberflächen die Autokatalyse von proCathepsin L zum prozessierten Cathepsin L stattfinden (Rubin 2005). ProEGFcyt könnte somit über verminderte Sezernierung von proCathepsin L die gehemmte Migrationsfähigkeit von FTC-133 durch die Elastin-Matrix vermitteln.

Die Sezernierung von proCathepsin L wurde an normalen Zellen, wie Makrophagen, Endometrialen Zellen, Sertoli-Zellen, Plazentalen Trophoblasten oder Thymusepithelzellen beobachtet (Reilly et al. 1989; Erickson-Lawrence et al. 1991; Hamilton et al. 1991; Jaffe et al. 1989). Erhöhte Mengen von sezerniertem proCathepsin L wurden unter Wachstumsstimulation bzw. malignen Transformation bestimmt (Gottesman 1978; Dong et al. 1989; Prencz et al. 1990; Kane et al. 1990). Die in diesen Fällen beschriebene Sezernierung der Proformen der lysosomalen Proteasen war eine spezifische Folge von mRNA-Induktion des Proteins. FTC-133-proEGFcyt wiesen signifikant erniedrigte Mengen an sezerniertem proCathepsin L bei gleichzeitig leichter Induktion von preproCathepsin L-Expression auf. Somit lässt sich eine proEGFcyt-vermittelte Inhibition der proCathepsin L-Expression als Ursache der reduzierten proCathepsin L-Sezernierung ausschließen.

Ein möglicher proEGFcyt-induzierter Mechanismus der verminderten proCathepsin L-Sezernierung wurde im alterierenden Vesikeltransport dieser Zellen vermutet. Diese konnte nicht direkt auf die erhöhte mikrotubuläre Stabilität in FTC-133-proEGFcyt zurückgeführt werden. Die mit Nocodazol provozierte Depolymerisierung der Mikrotubuli konnte in FTC-133-proEGFcyt nicht das Vesikelverteilungsmuster der proEGFcyt-defizienten Zellen induzieren.

Jedoch könnte auch hier die MAP2c-vermittelte Inhibition der Mikrotubuli-Kinesin-Interaktion eine wichtige Rolle spielen (Heins et al. 1991; von Massow et al. 1989; Lopez et al. 1993). Der gerichtete Vesikeltransport zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Zelle erfolgt entlang von Mikrotubuli. Die Motorproteine der Plus-Ende-gerichteten Kinesine sowie der Minus-Ende-gerichteten Dyneine sind dabei für den bidirektionalen Vesikeltransport essentiell (Sheetz 1999). Der Mechanismus der koordinierten Aktivität beider Motoren ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Jedoch sind Kofaktoren (z.B. *Dynaktin*, *p150/Glued*, *p50/Dynamitin*) sowie Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie MAP2 in die Regulation beider Motoren involviert (Welte 2004). MAP2c wurde dabei als Inhibitor der Mikrotubuli-Kinesin-Interaktion identifiziert (Heins et al. 1991; von Massow et al. 1989; Lopez et al. 1993). ProEGFcyt induzierte eine signifikant erhöhte Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP2c. Da

der Transport und damit die Lokalisation des Vesikels vom Verhältnis der Aktivität beider Motoren, Kinesin I und cytoplasmatischem Dynein, abhängt (Welte 2004), kann die erhöhte Produktion von MAP2c in FTC-133-proEGFcyt zum alterierenden Vesikeltransport und damit zur verminderten Sezernierung von proCathepsin L beitragen.

Gleichzeitig könnten Alterationen des Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR)-vermittelten vesikulären Transports eine Rolle spielen (Reifung und Transport lysosomaler Proteasen erläutert und illustriert in Abschnitt 3.4.3.2.2., Seite 82-83 und 86-87). Es wurde berichtet, dass fehlgeleitete und sezernierte lysosomale Proenzyme von der Zelloberfläche durch den 300 kDa-M6PR mittels Clathrin-abhängiger Endocytose reinternalisiert und zum Lysosom transportiert wurden. Dies führte zu einer verminderten Sezernierung des Proenzym sowie zu einer Konzentrierung der prozessierten Enzymformen in der Zelle (Linke et al. 2002; von Figura 1991). Wenn FTC-133-proEGFcyt einen solchen Rücktransport vermehrt nutzen würde, sollte man eine zellmembranständige Lokalisation des M6PRs in FTC-133-proEGFcyt detektieren können. Diese konnte jedoch in den stabilen Transfektanten nicht nachgewiesen werden. Auch das Verteilungsmuster des Adaptor-Protein-2- (AP-2-) Komplexes war zwischen den stabilen Transfektanten nicht signifikant verschieden und lieferte somit keinen initialen Hinweis auf eine alterierende Clathrin-abhängige Endocytose. Der AP-2-Komplex ist ein spezifischer Vermittler der Clathrin-abhängigen Endocytose und damit auch der Reinternalisation des 300 kDa-M6P-Rezeptors (erläutert und illustriert in Abschnitt 3.4.3.2.2., Seite 82-83 und 86-87; Le Borgne et al. 1998; Rouille et al. 2000).

Jedoch lässt das detektierte Verteilungsmuster von proCathepsin L sowie der Vesikel des lysosomalen Transportweges Alterationen im M6PR-vermittelten Transport von proCathepsin L vermuten. In proEGFcyt-defizienten Zellen beschränkte sich die Lokalisation von proCathepsin L nicht auf die Lysosomen sowie die signifikant perinukleär polarisierte Lokalisation des Trans-Golgi-Netzes (TGN) und des M6P-Rezeptors. ProCathepsin L schien zusätzlich in Form homogener feiner Vesikelstrukturen im gesamten Cytoplasma zwischen den spezifischen Vesikeln des Späten endosomalen und lysosomalen Kompartments vorzuliegen. Dass diese Vesikel nicht am M6PR-vermittelten Transport beteiligt zu sein scheinen, lässt das charakteristische, perinukleär polarisierte Verteilungsmuster des Adaptor-Protein-1- (AP-1-) Komplexes in den Zellen der Leerplasmidkontrolle vermuten. Der AP-1-Komplex vermittelt den Clathrin-abhängigen gerichteten Transport M6PR-markierter Vesikel des TGN zum Späten Endosom (Le Borgne et al. 1998; Rouille et al. 2000; Robinson 2004). Mit Expression von proEGFcyt wies das Verteilungsmuster von TGN und Späten

Endosomen sowie des AP-1-Komplexes eine signifikante Ähnlichkeit zum Verteilungsmuster von proCathepsin L auf. Diese Ähnlichkeit des Verteilungsmusters von proCathepsin L mit den Vesikeln des M6PR-abhängigen Transportweges könnte einen vermehrt M6PR-vermittelten Transport von proCathepsin L in FTC-133-proEGFcyt bedeuten. Ein verstärkt M6PR-abhängiger Transport könnte den proCathepsin L-Transport potentiell in Richtung Lysosomen verlagern. Dies wiederum könnte eine verminderte Sezernierung des Proenzym in FTC-133-proEGFcyt zur Folge haben. An dieser Stelle ist es interessant zu erwähnen, dass maligne Zellen den M6P-unabhängigen Transportweg in größerem Maße nutzen als nicht-maligne Zellen (Capony et al. 1994; Isidoro et al. 1997). Der genaue Mechanismus des M6P-unabhängigen Transportweges lysosomaler Hydrolasen ist noch nicht geklärt. Faktoren wie die geringe Bindungsaffinität von proCathepsin L zum M6PR scheinen dabei von Bedeutung zu sein (Dong et al. 1989; Lazzarino et al. 1990).

Die These eines verstärkt lysosomal verlagerten Transportes von proCathepsin L in FTC-133-proEGFcyt wird zudem durch das detektierte intrazelluläre Prozessierungsmuster des Enzyms gestützt. Eine ähnliche Verschiebung des Prozessierungs- und Sezernierungsmusters von proCathepsin L konnte auch die Arbeitsgruppe von Reilly et al. in humanen alveolaren Lungenmakrophagen feststellen (Reilly et al. 1989). Reifes Cathepsin L wird in den Lysosomen bei pH-Werten $< 5,5$ durch Abspaltung der Proregion hergestellt. Es kann als einkettige Form mit einem Molekulargewicht von 28 kDa oder als zweikettige Form, bestehend aus zwei Polypeptiden von 24 kDa und 4 kDa vorliegen. Die zweikettige Form wird dabei in den Lysosomen über einen weiteren Prozessierungsschritt aus der einkettigen Form generiert (Kirschke et al. 1995; Nomura et al. 1997; Ishido et al. 1998; Paroutis et al. 2004). ProEGFcyt-defiziente Zellen wiesen signifikante intrazelluläre Mengen des einzelsträngigen Enzyms auf. Mit Expression von proEGFcyt hingegen wurde proCathepsin L nahezu vollständig zu doppelsträngigem Cathepsin L prozessiert. Gleichzeitig nahm die Menge des sezernierten Proenzym deutlich ab. Dies spricht für eine Verschiebung des proenzymalen Transports in Richtung intralysosomal. Dort könnte zudem auch die Aspartylprotease Cathepsin D zur Prozessierung von proCathepsin L beitragen. Cathepsin D fungiert intralysosomal u.a. als Konversionsenzym für proCathepsin L und ist in FTC-133-proEGFcyt induziert (Keppler 1994). Einschränkend ist anzumerken, dass pH-Werte $< 5,5$ auch in den Lumina saurer sekretorischer Vesikel vorliegen (Nomura et al. 1997; Ishido et al. 1998; Paroutis et al. 2004). Bei einer Prozessierung von proCathepsin L innerhalb sekretorischer Vesikel sollten jedoch die reifen Enzymformen als sezernierte Produkte vorliegen. In den stabilen Transfektanten waren

jedoch weder Einzel- noch Doppelstrang-Cathepsin L in sezernierter Form nachweisbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eindeutig nach, dass die cytoplasmatische proEGF-Domäne in der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 funktional ist. Durch Inhibierung von Proliferation, Motilität und Migration zeigt proEGFcyt dabei ein antitumorprogressives Potential in FTC-133. Weiterführende sowie vergleichende Untersuchungen an verschiedenen dedifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien werden in Zukunft dazu beitragen, die Rolle von proEGFcyt in humanen Schilddrüsenkarzinomen besser einordnen zu können.

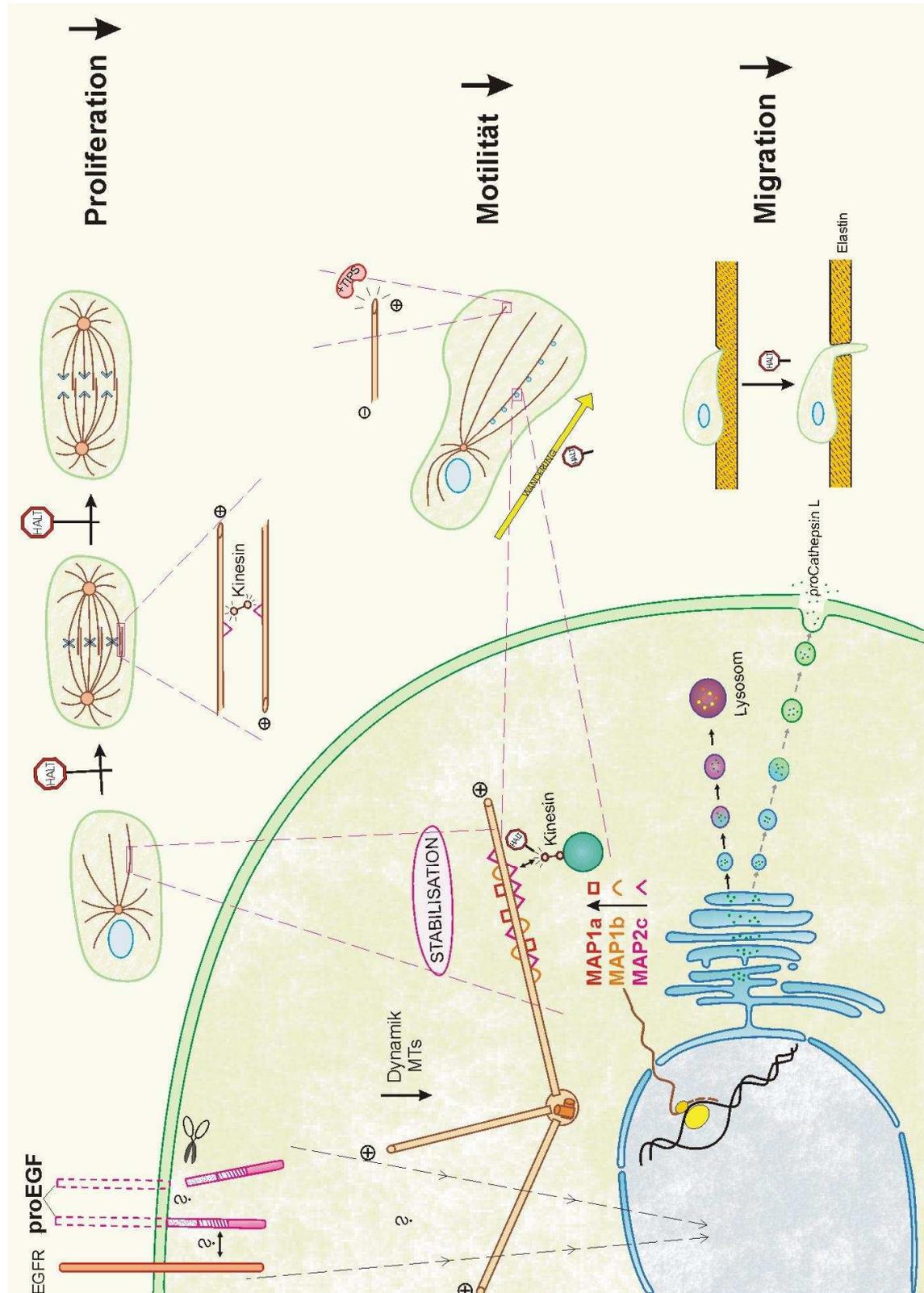
5 Zusammenfassung und Ausblick

Nicht nur der lösliche Ligand des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), sondern auch dessen Proform (proEGF) ist funktionell aktiv. Dies konnte in der vorliegenden Dissertation nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der cytoplasmatischen Domäne des proEGF (proEGF_{cyt}) sowohl die Proliferation, Motilität als auch Migrationsfähigkeit der humanen follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 hemmt. Die Expression der in der vorliegenden Arbeit neu identifizierten proEGF-Isoform mit Deletion der Exon 23-kodierten Sequenz (proEGF_{del23}) konnte diese hemmenden Effekte in FTC-133 nicht induzieren.

Es kann angenommen werden, dass beide proEGF-Isoformen eine unterschiedliche Funktion in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen einnehmen. Dies lassen sowohl die funktionellen Untersuchungen in FTC-133-Transfektanten mit stabiler Expression von proEGF_{cyt} oder proEGF_{del23} als auch die mRNA-Expressionsstudien beider proEGF-Isoformen an den Gewebeproben humaner Schilddrüsenkarzinome annehmen. Dabei scheinen proEGF_{cyt} und proEGF_{del23} weniger eine Bedeutung in der Neogenese, als in der Ausbreitung und Dedifferenzierung humaner Schilddrüsenkarzinome zu besitzen. Besonders für proEGF_{del23} ist eine Funktion in der Ausbreitung papillärer Schilddrüsenkarzinome zu vermuten.

Die proEGF_{cyt}-induzierte Hemmung von Proliferation, Motilität und Migrationsfähigkeit von FTC-133 steht im Gegensatz zur bereits bekannten proliferations- und motilitätsfördernden Wirkung des löslichen Wachstumsfaktors EGF in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen. In der vorliegenden Dissertation wurden potentielle Mechanismen der proEGF_{cyt}-vermittelten Proliferations-, Motilitäts- und Migrationshemmung untersucht. ProEGF_{cyt} scheint einen wichtigen Einfluss auf die Regulation cytoskelettaler Funktionen zu besitzen. Als potentiell interaktive Domäne konnte dabei die von Exon 23 kodierte Aminosäuresequenz auf proEGF_{cyt} ermittelt werden. ProEGF_{cyt} konnte ein stabilisierender Einfluss auf die Dynamik der Mikrotubuli in FTC-133 nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass proEGF_{cyt} die posttranslationale alpha-Tubulin-Acetylierung, einen Marker erhöhter mikrotubulärer Stabilität, in FTC-133 induziert. ProEGF_{cyt} könnte die erhöhte mikrotubuläre Stabilität potentiell auf transkriptioneller Ebene durch Induktion eines alterierenden beta-Tubulin-Isotypenmusters sowie einer erhöhten Expression der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1a, MAP1b und MAP2c in FTC-133 hervorrufen. Besonders die Induktion der MAP2c-Produktion könnte dabei einen Schlüsselfaktor im Mechanismus der proEGF_{cyt}-vermittelten Proliferations- und Motilitätshemmung darstellen.

Abb. 5.1: Potentielle antitumorprogressive Aktionen von proEGFcyt in der humanen folliculären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133.



Die MAP2c-vermittelte Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik sowie der Mikrotubuli-Kinesin-Interaktion stellen potentiell limitierende Faktoren in den Prozessen von Proliferation, Motilität und Migration dar. Durch das komplexe Interagieren von Cytoskelett und vesikulärem Kompartiment scheint proEGFcyt die Abläufe im Vesikeltransport von FTC-133 zu alterieren. Auch dies könnte für die Tumorzelle von folgenreicher Bedeutung sein, da parallel zum alterierenden Verteilungsmuster der lysosomen-gerichteten Transport-vesikel eine signifikant verminderte Sekretion von proCathepsin L in den proEGFcyt exprimierenden Schilddrüsenkarzinomzellen nachgewiesen wurde. Alterationen im Vesikeltransport könnten die Sekretion von proCathepsin L in FTC-133 vermindern und damit die Migrationsfähigkeit der Tumorzelle durch extrazelluläre Matrixproteine einschränken.

Proliferation, Motilität und Migrationsfähigkeit einer Tumorzelle sind entscheidende Kriterien für Wachstum und Ausbreitung des entsprechenden Tumors. Die cytoplasmatische Domäne des proEGF scheint in FTC-133 diese Prozesse entscheidend zu beeinflussen. Fungiert somit in humanen follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen die cytoplasmatische proEGF-Domäne regulierend zum löslichen Wachstumsfaktor EGF? Bietet proEGFcyt damit einen möglichen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen in der Bekämpfung von Schilddrüsenkarzinomen?

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen neue Fragen auf, wie z.B. der Zellspezifität. Besitzt proEGFcyt die gleiche Funktion auch in papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen? Sind die nachgewiesenen Funktionen spezifisch für neoplastisch veränderte Schilddrüsenzellen oder auch in nichtneoplastischen Zellen aktiv? Fungiert proEGFcyt gar gewebeunabhängig? Neben diesen Fragen sollten weiterführende Arbeiten versuchen aufzuzeigen, welche Signaltransduktionskaskaden durch proEGFcyt aktiviert werden, ob und in wie weit eine Kommunikation der cytoplasmatischen Domäne mit dem restlichen proEGF-Molekül besteht, welchen weiteren Prozessierungsschritten proEGF neben der Freisetzung des löslichen EGF unterliegt sowie ob eine Kommunikation von proEGFcyt mit dem EGF-Rezeptor besteht. Ein tieferes Verständnis dieser Zusammenhänge wird dazu beitragen, die Progression und Entwicklung eines Schilddrüsenkarzinoms besser zu verstehen und mögliche therapeutische Ansatzpunkte besser bemessen zu können.

Literatur-Verzeichnis

- Adam RM, Danciu T, McLellan DL, Borer JG, Lin J, Zurakowski D, Weinstein MH, Rajjayabun PH, Mellon JK, Freeman MR. A nuclear form of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor precursor is a feature of aggressive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):484-90.
- Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell.* 2001 Mar 23;104(6):923-35.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the Cell*, Third Edition. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH, 1995.
- Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, Pierce JH, Greenberger JS, Massague J. Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(9):3289-93.
- Atlas I, Mendelsohn J, Baselga J, Fair WR, Masui H, Kumar R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res.* 1992 Jun 15;52(12):3335-9.
- Baas PW, Black MM. Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):495-509.
- Banerjee A. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 26;293(1):598-601.
- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA. Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol.* 2003;161:1133-4.
- Barlow AL, van Drunen CM, Johnson CA, Tweedie S, Bird A, Turner BM. dSIR2 and dHDAC6: two novel, inhibitor-resistant deacetylases in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res.* 2001 Apr 15;265(1):90-103.
- Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res.* 1986 Nov 11;14(21):8427-46.
- Berger MS, Greenfield C, Waterfield MD. Altered expression of epidermal growth factor receptors in human bladder and lung tumours. *Princess Takamatsu Symp.* 1986;17:183-94.
- Bergmann JE, Kupfer A, Singer SJ. Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Mar;80(5):1367-71.
- Bergström JD, Westermark B, Heldin NE. Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2000 Aug 25;259(1):293-9.
- Beyer H, Walter W. *Lehrbuch der organischen Chemie*. 22. Auflage. S. Hirzel Verlag Stuttgart. 1991.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):12839-48.
- Boonstra J, Mummery CL, Feyen A, de Hoog WJ, van der Saag PT, de Laat SW. Epidermal growth factor receptor expression during morphological differentiation of pheochromocytoma cells, induced by nerve growth factor or dibutyryl cyclic AMP. *J Cell Physiol.* 1987 Jun;131(3):409-17.
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int.* 1995 May;19(5):413-30.
- Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J.* 2003 Mar; 22(5):1114-24.
- Bosenberg MW, Pandiella A, Massague J. The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid specifies cleavage of membrane TGF alpha into soluble growth factor. *Cell* 1992; 71:1157-65.

- Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P. Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell*. 1989 Jun 16;57(6):931-6.
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry*. 1994 Oct 18;33(41):12471-7.
- Bredin CG, Liu Z, Hauzenberger D, Klominek J. Growth-factor-dependent migration of human lung-cancer cells. *Int J Cancer*. 1999 Jul 30;82(3):338-45.
- Brown CL, Coffey RJ, Dempsey PJ. The proamphiregulin cytoplasmic domain is required for basolateral sorting, but is not essential for constitutive or stimulus-induced processing in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2001;276:36862.
- Bulinski JC, Gundersen GG. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays*. 1991 Jun;13(6):285-93. Review.
- Bunn PA Jr, Franklin W. Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*. 2002 Oct;29(5 Suppl 14):38-44.
- Capony F, Braulke T, Rougeot C, Roux S, Montcourrier P, Rochefort H. Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 1994 Nov;215(1):154-63.
- Cartledge SA, Elder JB. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor levels in normal human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer*. 1989 Nov;60(5):657-60.
- Carpenter G, Zendejui JG. Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res*. 1986 May;164(1):1-10.
- Cassimeris L. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Feb;11(1):134-41. Review.
- Chinkers M, McKanna JA, Cohen S. Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. *J Cell Biol*. 1979 Oct;83(1):260-5.
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962 May;237:1555-62.
- Collins JF, Fine R. The enzymatic digestion of elastin at acidic pH. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Jan 15;657(1):295-303.
- Corcoran JM, Waters MJ, Eastman CJ, Jorgensen G. Epidermal growth factor: effect on circulating thyroid hormone levels in sheep. *Endocrinology*. 1986 Jul;119(1):214-7.
- D'Antonio A, Losito S, Pignata S, Grassi M, Perrone F, De Luca A, Tambaro R, Bianco C, Gullick WJ, Johnson GR, Iaffaioli VR, Salomon DS, Normanno N. Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas. *Int J Oncol*. 2002 Nov;21(5):941-8.
- Dempsey PJ, Meise KS, Coffey RJ. Basolateral sorting of transforming growth factor-alpha precursor in polarized epithelial cells: characterization of cytoplasmic domain determinants. *Exp Cell Res*. 2003;285:159-74.
- Derry WB, Wilson L, Khan IA, Luduena RF, Jordan MA. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry*. 1997 Mar 25;36(12):3554-62.
- DiGiovanna MP, Lerman MA, Coffey RJ, Muller WJ, Cardiff RD, Stern DF. Active signaling by Neu in transgenic mice. *Oncogene*. 1998 Oct 8;17(14):1877-84.
- Docherty K, Carroll RJ, Steiner DF. Conversion of proinsulin to insulin: involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Aug;79(15):4613-7.
- Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signalling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6235-40.

- Dong J, Wiley HS. Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J Biol Chem.* 2000;275:557-64.
- Dong JM, Prence EM, Sahagian GG. Mechanism for selective secretion of a lysosomal protease by transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem.* 1989 May 5;264(13):7377-83.
- Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:89-111. Review.
- Dunfield LD, Nachtigal MW. Inhibition of the antiproliferative effect of TGFbeta by EGF in primary human ovarian cancer cells. *Oncogene.* 2003 Jul 24;22(30):4745-51.
- Earp HS 3rd, Calvo BF, Sartor CI. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2003;114:315-33; discussion 333-4.
- Erick JE, Ing KW, Eggo MC, Burrow GN. Growth and differentiation in cultured human thyroid cells: effects of epidermal growth factor and thyrotropin. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986 Jan;22(1):28-36.
- Erickson-Lawrence M, Zabludoff SD, Wright WW. Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol Endocrinol.* 1991 Dec;5(12):1789-98.
- Fernandez-Larrea J, Merlos-Suarez A, Urena JM, Baselga J, Arribas J. A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of proTGF-alpha to the cell surface. *Mol Cell.* 1999 Apr;3(4):423-33.
- Fischer DD, Cai R, Bhatia U, Asselbergs FA, Song C, Terry R, Trogani N, Widmer R, Atadja P, Cohen D. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6656-66.
- Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr Rev.* 1990 Aug;11(3):418-42.
- Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA Jr. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol.* 2002 Feb;29(1 Suppl 4):3-14.
- Franklin JL, Yoshiura K, Dempsey PJ, Bogatcheva G, Jeyakumar L, Meise KS, Pearsall RS, Threadgill D, Coffey RJ. Identification of MAGI-3 as a transforming growth factor-alpha tail binding protein. *Exp Cell Res.* 2005 Feb 15;303(2):457-70.
- Fujii T, Watanabe M, Ogoma Y, Kondo Y, Arai T. Microtubule-associated proteins, MAP 1A and MAP 1B, interact with F-actin in vitro. *J Biochem (Tokyo).* 1993 Dec;114(6):827-9.
- Gadde S, Heald R. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol.* 2004 Sep 21;14(18):R797-805. Review.
- Gal S, Gottesman MM. The major excreted protein of transformed fibroblasts is an activable acid-protease. *J Biol Chem.* 1986 Feb 5;261(4):1760-5.
- Gamblin TC, Nachmanoff K, Halpain S, Williams RC Jr. Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry.* 1996 Sep 24;35(38):12576-86.
- Gottesman MM. Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jun;75(6):2767-71.
- Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* 2003 May 15;22(10):2411-21.
- Grasl-Kraupp B, Schausberger E, Hufnagl K, Gerner C, Low-Baselli A, Rossmannith W, Parzefall W, Schulte-Hermann R. A novel mechanism for mitogenic signaling via pro-transforming growth factor alpha within hepatocyte nuclei. *Hepatology.* 2002 Jun;35(6):1372-80.
- Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature.* 1975a Sep 25;257(5524):325-7.
- Gregory H, Willshire IR. The isolation of the urogastrones - inhibitors of gastric acid secretion - from human urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975b Nov;356(11):1765-74.

- Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, Spandidos DA. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors. *In Vivo*. 1992 May-Jun;6(3):291-6.
- Guardiola AR, Yao TP. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3350-6. Epub 2001 Nov 28.
- Gurland G, Gundersen GG. Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1995 Dec;131(5):1275-90.
- Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Activated neu induces rapid tumor progression. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7673-8.
- Hamilton RT, Bruns KA, Delgado MA, Shim JK, Fang Y, Denhardt DT, Nilsen-Hamilton M. Developmental expression of cathepsin L and c-rasHa in the mouse placenta. *Mol Reprod Dev*. 1991 Dec;30(4):285-92.
- Hassig CA, Schreiber SL. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol*. 1997 Oct;1(3):300-8. Review.
- Heins S, Song YH, Wille H, Mandelkow E, Mandelkow EM. Effect of MAP2, MAP2c, and tau on kinesin-dependent microtubule motility. *J Cell Sci Suppl*. 1991;14:121-4.
- Hinkle CL, Sunnarborg SW, Loisel D, Parker CE, Stevenson M, Russell WE, Lee DC. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem*. 2004 Jun 4;279(23):24179-88. Epub 2004 Apr 5.
- Hishinuma A, Kasai K, Ichimura K, Emoto T, Shimoda S. Effects of epidermal growth factor, phorbol ester, and retinoic acid on hormone synthesis and morphology in porcine thyroid follicles cultured in collagen gel. *Thyroid*. 1992 Winter;2(4):351-9.
- Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994a Aug;79(2):401-8.
- Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Epidermal growth factor (EGF)- and transforming growth factor alpha-stimulated invasion and growth of follicular thyroid cancer cells can be blocked by antagonism to the EGF receptor and tyrosine kinase in vitro. *Eur J Endocrinol*. 1995 Feb;132(2):229-35.
- Hoelting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Aberrations of growth factor control in metastatic follicular thyroid cancer in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 1994b Jul;12(4):315-23.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002 May 23;417(6887):455-8.
- Ishidoh K, Kominami E. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Dec 14;217(2):624-31.
- Ishidoh K, Saido TC, Kawashima S, Hirose M, Watanabe S, Sato N, Kominami E. Multiple processing of procathepsin L to cathepsin L in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov 9;252(1):202-7.
- Isidoro C, Demoz M, De Stefanis D, Baccino FM, Hasilik A, Bonelli G. Differential targeting and processing of procathepsin D in normal and transformed murine 3T3 fibroblasts. *Int J Cancer*. 1997 Jan 27;70(3):310-4.
- Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*. 1998 Dec 15;17(24):7260-72.
- Jaffe RC, Donnelly KM, Mavrogianis PA, Verhage HG. Molecular cloning and characterization of a progesterone-dependent cat endometrial secretory protein complementary deoxyribonucleic acid. *Mol Endocrinol*. 1989 Nov;3(11):1807-14.
- Jaffrezou JP, Dumontet C, Derry WB, Duran G, Chen G, Tsuchiya E, Wilson L, Jordan MA, Sikic BI. Novel mechanism of resistance to paclitaxel (Taxol) in human K562 leukemia cells by combined selection with PSC 833. *Oncol Res*. 1995;7(10-11):517-27.

- Jorgensen PE, Nexø E, Poulsen SS, Almendingen M, Berg T. Processing of epidermal growth factor in the rat submandibular gland by Kallikrein-like enzymes. *Growth Factors*. 1994;11(2):113-23.
- Joshi HC, Cleveland DW. Diversity among tubulin subunits: toward what functional end? *Cell Motil Cytoskeleton*. 1990;16(3):159-63. Review.
- Kakegawa H, Tagami K, Ohba Y, Sumitani K, Kawata T, Katunuma N. Secretion and processing mechanisms of procathepsin L in bone resorption. *FEBS Lett*. 1995 Aug 14;370(1-2):78-82.
- Kane SE, Gottesman MM. The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin Cancer Biol*. 1990 Apr;1(2):127-36.
- Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, Evans RM. Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):187-93.
- Kasai K, Hiraiwa M, Suzuki Y, Emoto T, Banba N, Nakamura T, Shimoda S. Presence of epidermal growth factor receptors on human thyroid membranes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1987 Mar;114(3):396-401.
- Kasai K, Yamaguchi F, Hosoya T, Ichimura K, Banba N, Emoto T, Hiraiwa M, Hishinuma A, Hattori Y, Shimoda S. Effects of inorganic iodide, epidermal growth factor and phorbol ester on hormone synthesis by porcine thyroid follicles cultured in suspension. *Life Sci*. 1992;51(14):1095-103.
- Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, Haber M. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res*. 2001 Aug ;61(15):5803-9.
- Keppler D, Waridel P, Abrahamson M, Bachmann D, Berdoz J, Sordat B . "Latency of Cathepsin B secreted by human colon carcinoma cells is not linked to secretion of cystatin C and is relieved by neutrophil elastase." *Biochim Biophys Acta* 1994;1226:117-25.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol*. 1988 Jan;106(1):141-9.
- Kim H, Muller WJ. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):78-87.
- Koeller KM, Haggarty SJ, Perkins BD, Leykin I, Wong JC, Kao MC, Schreiber SL. Chemical genetic modifier screens: small molecule trichostatin suppressors as probes of intracellular histone and tubulin acetylation. *Chem. Biol*. 2003 May;10(5):397-410.
- Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 1999 Apr;10(4):1105-18.
- Kuo A, Zhong C, Lane WS, Derynck R. Transmembrane transforming growth factor- α tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J*. 2000 Dec 1;19(23):6427-39.
- Kuznetsov SA, Rodionov VI, Bershinsky AD, Gelfand VI, Rosenblat VA. High molecular weight protein MAP 2 promoting microtubule assembly in vitro is associated with microtubules in cells. *Cell Biol Int Rep*. 1980 Nov;4(11):1017-24.
- Kuznetsov SA, Rodionov VI, Gelfand VI, Rosenblat VA. Microtubule-associated protein MAP1 promotes microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett*. 1981 Dec 7;135(2):241-4.
- Landreth GE, Williams LK, Rieser GD. Association of the epidermal growth factor receptor kinase with the detergent-insoluble cytoskeleton of A431 cells. *J Cell Biol*. 1985 Oct;101(4):1341-50.
- Lazzarino D, Gabel CA. Protein determinants impair recognition of procathepsin L phosphorylated oligosaccharides by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem*. 1990 Jul 15;265(20):11864-71.
- Le Borgne R, Hoflack B. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 14;1404(1-2):195-209.
- LeDizet M, Piperno G. Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J Cell Biol*. 1986 Jul;103(1):13-22.

- Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P. Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45255-68. Epub 2003 Aug 28.
- Leimeroth R, Lobsiger C, Lussi A, Taylor V, Suter U, Sommer L. Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells. *Dev Biol*. 2002 Jun 15;246(2):245-58.
- Lemoine NR, Hughes CM, Gullick WJ, Brown CL, Wynford-Thomas D. Abnormalities of the EGF receptor system in human thyroid neoplasia. *Int J Cancer*. 1991 Oct 21;49(4):558-61.
- Linke M, Herzog V, Brix K. Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci*. 2002 Dec 15;115(Pt 24):4877-89.
- Lobert S, Frankfurter A, Correia JJ. Binding of vinblastine to phosphocellulose-purified and alpha beta-class III tubulin: the role of nucleotides and beta-tubulin isotypes. *Biochemistry*. 1995 Jun 27;34(25):8050-60.
- Lopez LA, Sheetz MP. Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1993;24(1):1-16.
- Lu Q, Luduena RF. In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins. *J Biol Chem*. 1994 Jan 21;269(3):2041-7.
- Lucchini F, Sacco MG, Hu N, Villa A, Brown J, Cesano L, Mangiarini L, Rindi G, Kindl S, Sessa F, et al. Early and multifocal tumors in breast, salivary, harderian and epididymal tissues developed in MMTV-Neu transgenic mice. *Cancer Lett*. 1992 Jul 10;64(3):203-9.
- MacRae TH. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*. 1997 Mar 1;244(2):265-78. Review.
- Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, Boardman CH, Christensen TA, Cora EM, Faupel-Badger JM, Greenwood T, Juneja SC, Lafky JM, Lee H, Reiter JL, Podratz KC. EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res*. 2002;107:247-58.
- Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz DR, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T, Schlessinger J. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J*. 1990b Dec;9(13):4375-80.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Mar 1;58(3):903-13.
- Marti U, Ruchti C, Kampf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, Gerber H, Burgi U. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid*. 2001 Feb;11(2):137-45.
- Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, Chapman HA. Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J*. 1986 Feb 1;233(3):925-7.
- Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:515-41.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*. 2002 Dec 16;21(24):6820-31.
- Minotti AM, Barlow SB, Cabral F. Resistance to antimetabolic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *J Biol Chem*. 1991 Feb 25;266(6):3987-94.
- Miyamoto S, Hirata M, Yamazaki A, Kageyama T, Hasuwa H, Mizushima H, Tanaka Y, Yagi H, Sonoda K, Kai M, Kanoh H, Nakano H, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5720-7.
- Miyamoto M, Sugawa H, Kuma K, Mori T, Imura H. Analysis of epidermal growth factor (EGF) receptor and effect of EGF on the growth of cultured Graves' and non-neoplastic human thyroid cells. *J Endocrinol Invest*. 1989 Feb;12(2):111-7.

- Miyoshi E, Higashiyama S, Nakagawa T, Hayashi N, Taniguchi N. Membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor acts as a tumor survival factor in a hepatoma cell line. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):14349-55.
- Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, Yanaihara N. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology.* 1991 Jan;18(1):11-8.
- Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis.* 1997 Jul;15(4):382-92.
- Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Pandiella A. Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Nov;16(5):631-48.
- Nakano N, Higashiyama S, Kajihara K, Endo T, Ishiguro H, Yamada K, Nagatsu T, Taniguchi N. NTAKalpha and beta isoforms stimulate breast tumor cell growth by means of different receptor combinations. *J Biochem (Tokyo).* 2000 May;127(5):925-30.
- Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K, Higashiyama S. Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol.* 2003;163:489-502.
- Nanba D, Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004a;15:13-9.
- Nanba D, Toki F, Higashiyama S. Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004b. Jul 23;320(2):376-82.
- Nilsson M, Ericson LE. Effects of epidermal growth factor and phorbol ester on thyroid epithelial integrity. *Exp Cell Res.* 1995 Aug;219(2):626-39.
- Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Nemeth Z, Wiche G, Propst F. Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci.* 2002 Mar 15;22(6):2106-14.
- Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer.* 2003 Mar;10(1):1-21.
- Nomura T, Fujisawa Y. Processing properties of recombinant human procathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jan 3;230(1):143-6.
- Novinec M, Grass RN, Stark WJ, Turk V, Baici A, Lenarcic B. Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 2007 Mar 16;282(11):7893-902.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
- Palazzo A, Ackerman B, Gundersen GG. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature.* 2003 Jan 16;421(6920):230.
- Panda D, Miller HP, Banerjee A, Luduena RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11358-62.
- Paroutis P, Touret N, Grinstein S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda).* 2004 Aug;19:207-15. Review.
- Paschke R, Eck T, Herfurth J, Usadel KH. Stimulation of proliferation and inhibition of function of xenotransplanted human thyroid tissue by epidermal growth factor. *J Endocrinol Invest.* 1995 May;18(5):359-63.
- Patocka J, Strunecka A. The most important microtubule natural inhibitors. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 1999;42(1):3-8. Review.
- Pedrotti B, Islam K. Purified native microtubule associated protein MAP1A: kinetics of microtubule assembly and MAP1A/tubulin stoichiometry. *Biochemistry.* 1994 Oct 18;33(41):12463-70.

- Pfannenstiel P, Hotze LA und Saller B. 1999 „Schilddrüsenkrankheiten, Diagnose und Therapie“ , Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH.
- Pfeffer S, Ullrich A. Epidermal growth factor. Is the precursor a receptor? *Nature*. 1985 Jan 17-23;313(5999):184.
- Piperno G, LeDizet M, Chang XJ. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*. 1987 Feb;104(2):289-302.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Weiss H, Bell WC, Heimburger DC, Grizzle WE. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res*. 2002 Mar;8(3):734-44.
- Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor:convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res*. 2000;2(3):184-90. Epub 2000 Mar 25.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*. 2001 Mar;8(1):11-31.
- Pyka J, Glogowska A, Dralle H, Hoang-Vu C, Klonisch T. Cytoplasmic domain of proEGF affects distribution and post-translational modification of microtubuli and increases microtubule-associated proteins 1b and 2 production in human thyroid carcinoma cells. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1343-51.
- Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other issues. *Nature*. 1985 Jan 17-23;313(5999):228-31.
- Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer*. 1998 Feb;77(4):562-6.
- Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Apr 25;92(9):3849-53.
- Reilly JJ Jr, Mason RW, Chen P, Joseph LJ, Sukhatme VP, Yee R, Chapman HA Jr. Synthesis and processing of cathepsin L, an elastase, by human alveolar macrophages. *Biochem J*. 1989 Jan 15;257(2):493-8.
- Riese RJ, Wolf PR, Braemme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 1996 Apr;4(4):357-66.
- Rijken PJ, Hage WJ, van Bergen en Henegouwen PM, Verkleij AJ, Boonstra J. Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells. *J Cell Sci*. 1991 Nov;100 (Pt 3):491-9.
- Robinson MS. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol*. 2004 Apr;14(4):167-74. Review.
- Rodionov VI, Gyoeva FK, Tanaka E, Bershady AD, Vasiliev JM, Gelfand VI. Microtubule-dependent control of cell shape and pseudopodial activity is inhibited by the antibody to kinesin motor domain. *J Cell Biol*. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1811-20.
- Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S. MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol*. 2004 Mar 9;14(5):363-71.
- Roger PP, Dumont JE. Epidermal growth factor controls the proliferation and the expression of differentiation in canine thyroid cells in primary culture. *FEBS Lett*. 1982 Aug 2;144(2):209-12.
- Roger PP, Van Heuverswyn B, Lambert C, Reuse S, Vassart G, Dumont JE. Antagonistic effects of thyrotropin and epidermal growth factor on thyroglobulin mRNA level in cultured thyroid cells. *Eur J Biochem*. 1985 Oct 15;152(2):239-45.
- Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol*. 2000 Nov 2;10(21):R801-3. Review.

- Rotin D, Margolis B, Mohammadi M, Daly RJ, Daum G, Li N, Fischer EH, Burgess WH, Ullrich A, Schlessinger J. SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor: identification of Tyr992 as the high-affinity binding site for SH2 domains of phospholipase C gamma. *EMBO J.* 1992b Feb;11(2):559-67.
- Rouille Y, Rohn W, Hoflack B. Targeting of lysosomal proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2000 Jun;11(3):165-71. Review.
- Roy LM, Gittinger CK, Landreth GE. Characterization of the epidermal growth factor receptor associated with cytoskeletons of A431 cells. *J Cell Physiol.* 1989 Aug;140(2):295-304.
- Rubin H. Systemic effects of cancer: role of multiple proteases and their toxic peptide products. *Med Sci Monit.* 2005 Jul;11(7):RA221-8. Epub 2005 Jun 29.
- Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell.* 1984 Jun;37(2):577-85.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 2004;164:769-79.
- Salido E. C., Yen, P. H., Shapiro, L. J., Fisher, D. A., and Barajas, L. In situ hybridization of prepro-epidermal growth factor mRNA in the mouse kidney. *Am J Physiol.*, 256: F632-8, 1989.
- Samarel AM, Ferguson AG, Decker RS, Lesch M. Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. *Am J Physiol.* 1989 Dec;257(6 Pt 1):C1069-79.
- Sato-Harada R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Hirokawa N. Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. *Cell Struct Funct.* 1996 Oct;21(5):283-95.
- Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):669-72.
- Scholey JM, Brust-Mascher I, Mogilner A. Cell division. *Nature.* 2003 Apr 7;422(6933):746-52. Review.
- Sheetz MP. Motor and cargo interactions. *Eur J Biochem.* 1999 May;262(1):19-25. Review.
- Shi W, Fan H, Shum L, Derynck R. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol.* 2000 Feb 7;148(3):591-602.
- Shum L, Turck CW, Derynck R. Cysteines 153 and 154 of transmembrane transforming growth factor-alpha are palmitoylated and mediate cytoplasmic protein association. *J Biol Chem.* 1996 Nov 8;271(45):28502-8.
- Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2149-64.
- Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 2005 Oct;17(10):1183-93.
- Singh AB, Tsukada T, Zent R, Harris RC. Membrane-associated HB-EGF modulates HGF-induced cellular responses in MDCK cells. *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1365-79.
- Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2003 Jul;4(7):397-406.
- Stracke H, Bar R, Muller F, Schatz H. Stimulation of thyroid cell growth by thyrotropin and epidermal growth factor in isolated porcine thyroid follicles. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 1987;281:270-2.
- Stryer L. *Biochemie.* 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford. 1996.
- Sunnarborg SW, Hinkle CL, Stevenson M, Russell WE, Raska CS, Peschon JJ, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Lee DC. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):12838-45. Epub 2002 Jan 31.

- Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31730-7.
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.* 1992 Dec;103 (Pt 4):953-64.
- Takemura T, Hino S, Okada M, Murata Y, Yanagida H, Ikeda M, Yoshioka K, Harris RC. Role of membrane-bound heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in renal epithelial cell branching. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):1968-79.
- Takeuchi M, Hisanaga S, Umeyama T, Hirokawa N. The 72-kDa microtubule-associated protein from porcine brain. *J. Neurochem.* 1992 Apr;58(4):1510-6.
- Tanaka Y, Miyamoto S, Suzuki SO, Oki E, Yagi H, Sonoda K, Yamazaki A, Mizushima H, Maehara Y, Mekada E, Nakano H. Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4783-92.
- Thyberg J, Moskalewski S. Relationship between the Golgi complex and microtubules enriched in deetyrosinated or acetylated alpha-tubulin: studies on cells recovering from nocodazole and cells in the terminal phase of cytokinesis. *Cell Tissue Res.* 1993 Sep;273(3):457-66.
- Toda S, Nishimura T, Yamada S, Koike N, Yonemitsu N, Watanabe K, Matsumura S, Gartner R, Sugihara H. Immunohistochemical expression of growth factors in subacute thyroiditis and their effects on thyroid folliculogenesis and angiogenesis in collagen gel matrix culture. *J Pathol.* 1999 Aug;188(4):415-22.
- Togel M, Wiche G, Propst F. Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol.* 1998 Nov 2;143(3):695-707.
- Toki F, Nanba D, Matsuura N, Higashiyama S. Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in the cell cycle. *J Cell Physiol.* 2005 Mar;202(3):839-48.
- Tokunaga A, Onda M, Okuda T, Teramoto T, Fujita I, Mizutani T, Kiyama T, Yoshiyuki T, Nishi K, Matsukura N. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer.* 1995 Mar 15;75(6 Suppl):1418-25.
- Tong JJ, Liu J, Bertos NR, Yang XJ. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 1;30(5):1114-23.
- Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* 1997 Aug 15;16(16):4938-50.
- Umeyama T, Okabe S, Kanai Y, Hirokawa N. Dynamics of microtubules bundled by microtubule associated protein 2C (MAP2C). *J Cell Biol.* 1993 Jan;120(2):451-65.
- Urena J. M., Merlos-Suarez, A., Baselga, J., and Arribas, J. The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid determines the subcellular localization of proTGF-(alpha) and membrane type matrix metalloprotease (MT1-MMP). *J Cell Sci.*, 112: 773-84, 1999.
- van Belzen N, Spaargaren M, Verkleij AJ, Boonstra J. Interaction of epidermal growth factor receptors with the cytoskeleton is related to receptor clustering. *J Cell Physiol.* 1990 Nov;145(2):365-75.
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemercier C, Yoshida M, Khochbin S. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol.* 2000 Jun 15;10(12):747-9.
- Verdier-Pinard P, Wang F, Martello L, Burd B, Orr GA, Horwitz SB. Analysis of tubulin isotypes and mutations from taxol-resistant cells by combined isoelectrofocusing and mass spectrometry. *Biochemistry.* 2003 May 13;42(18):5349-57.
- von Figura K. Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Aug;3(4):642-6. Review.

- von Massow A, Mandelkow EM, Mandelkow E. Interaction between kinesin, microtubules, and microtubule-associated protein 2. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1989;14(4):562-71.
- Wadsworth P. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1999;42(1):48-59.
- Wang JY, Frenzel KE, Wen D, Falls DL. Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20525-34.
- Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol*. 2005 Feb;15(2):76-83. Review.
- Webster DR, Borisy GG. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci*. 1989 Jan;92 (Pt 1):57-65.
- Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9040-4.
- Webster DR, Wehland J, Weber K, Borisy GG. Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol*. 1990 Jul;111(1):113-22. Erratum in: *J Cell Biol* 1990 Sep;111(3):1325-6.
- Weisshaar B, Doll T, Matus A. Reorganisation of the microtubular cytoskeleton by embryonic microtubule-associated protein 2 (MAP2c). *Development*. 1992 Dec;116(4):1151-61.
- Welte MA. Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol*. 2004 Jul 13;14(13):R525-37. Review.
- Westermarck K, Nilsson M, Ebendal T, Westermarck B. Thyrocyte migration and histiotypic follicle regeneration are promoted by epidermal growth factor in primary culture of thyroid follicles in collagen gel. *Endocrinology*. 1991 Oct;129(4):2180-6.
- Westermarck K, Westermarck B. Mitogenic effect of epidermal growth factor on sheep thyroid cells in culture. *Exp Cell Res*. 1982 Mar;138(1):47-55.
- Wiegant FA, Blok FJ, Defize LH, Linnemans WA, Verkley AJ, Boonstra J. Epidermal growth factor receptors associated to cytoskeletal elements of epidermoid carcinoma (A431) cells. *J Cell Biol*. 1986 Jul;103(1):87-94.
- Wiley H. S., Woolf, M. F., Opresko, L. K., Burke, P. M., Will, B., Morgan, J. R., and Lauffenburger, D. A. Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization. *J Cell Biol.*, 143: 1317-28, 1998.
- Wittmann T, Waterman-Storer CM. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci*. 2001 Nov;114(Pt 21):3795-803.
- Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:1-13.
- Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer*. 2005;8(2):86-94.
- Yoshida K, Tosaka A. Epidermal growth factor binding by membranes of human renal cell carcinomas: establishment of an epidermal growth factor receptor assay for clinical use. *Int J Urol*. 1994 Dec;1(4):319-23.
- Younes MN, Yigitbasi OG, Park YW, Kim SJ, Jasser SA, Hawthorne VS, Yazici YD, Mandal M, Bekele BN, Bucana CD, Fidler IJ, Myers JN. Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4716-27.
- Young PR, Spevacek SM. Substratum acidification by murine B16F10 melanoma cultures. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Jun 9;1139(1-2):163-6.
- Zerek-Melen G, Lewinski A, Szkudlinski M. Influence of somatostatin and epidermal growth factor (EGF) on the proliferation of thyroid follicular cells in organ culture. *Regul Pept*. 1990 May 21;28(3):293-300.
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J*. 2003 Mar 3;22(5):1168-79.

Zhang CC, Yang JM, Bash-Babula J, White E, Murphy M, Levine AJ, Hait WN. DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3663-70.

Abb. A1: Immunfluoreszenz-Färbungen von alpha-Tubulin.

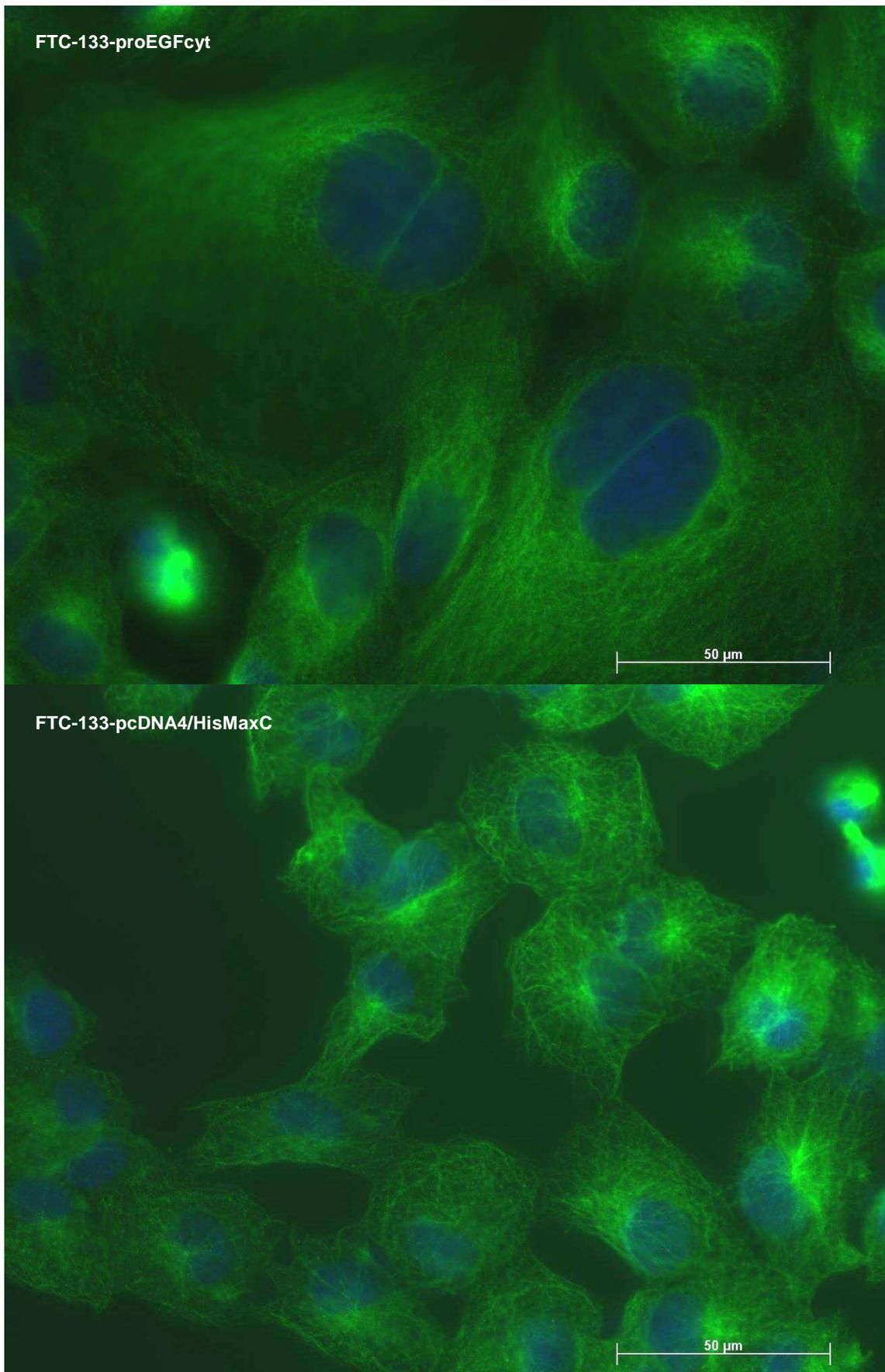


Abb. A2: Immunfluoreszenz-Färbungen von polyglutamyliertem alpha-Tubulin.

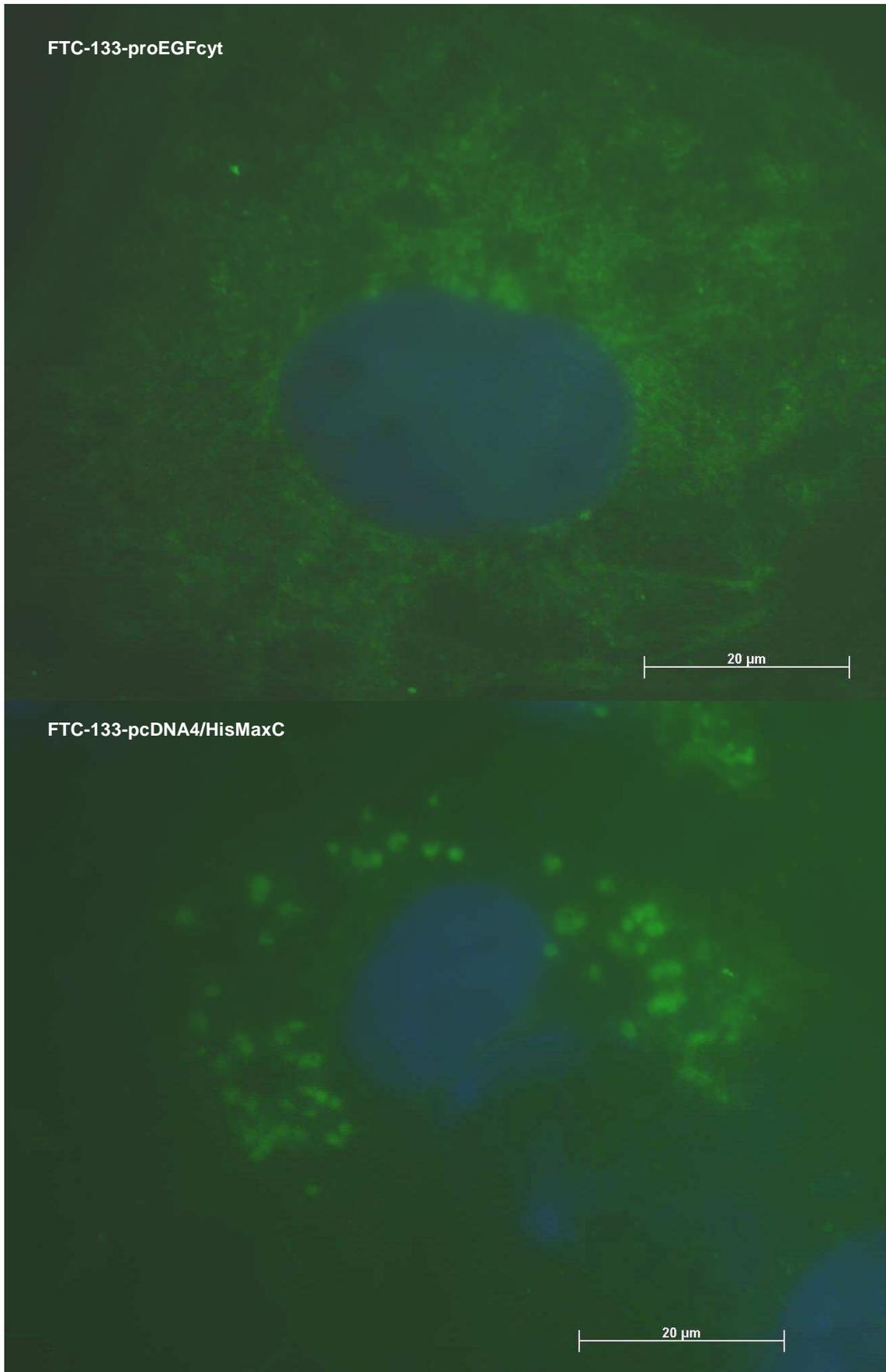


Abb. A3: Immunfluoreszenz-Färbungen von acetyliertem alpha-Tubulin.

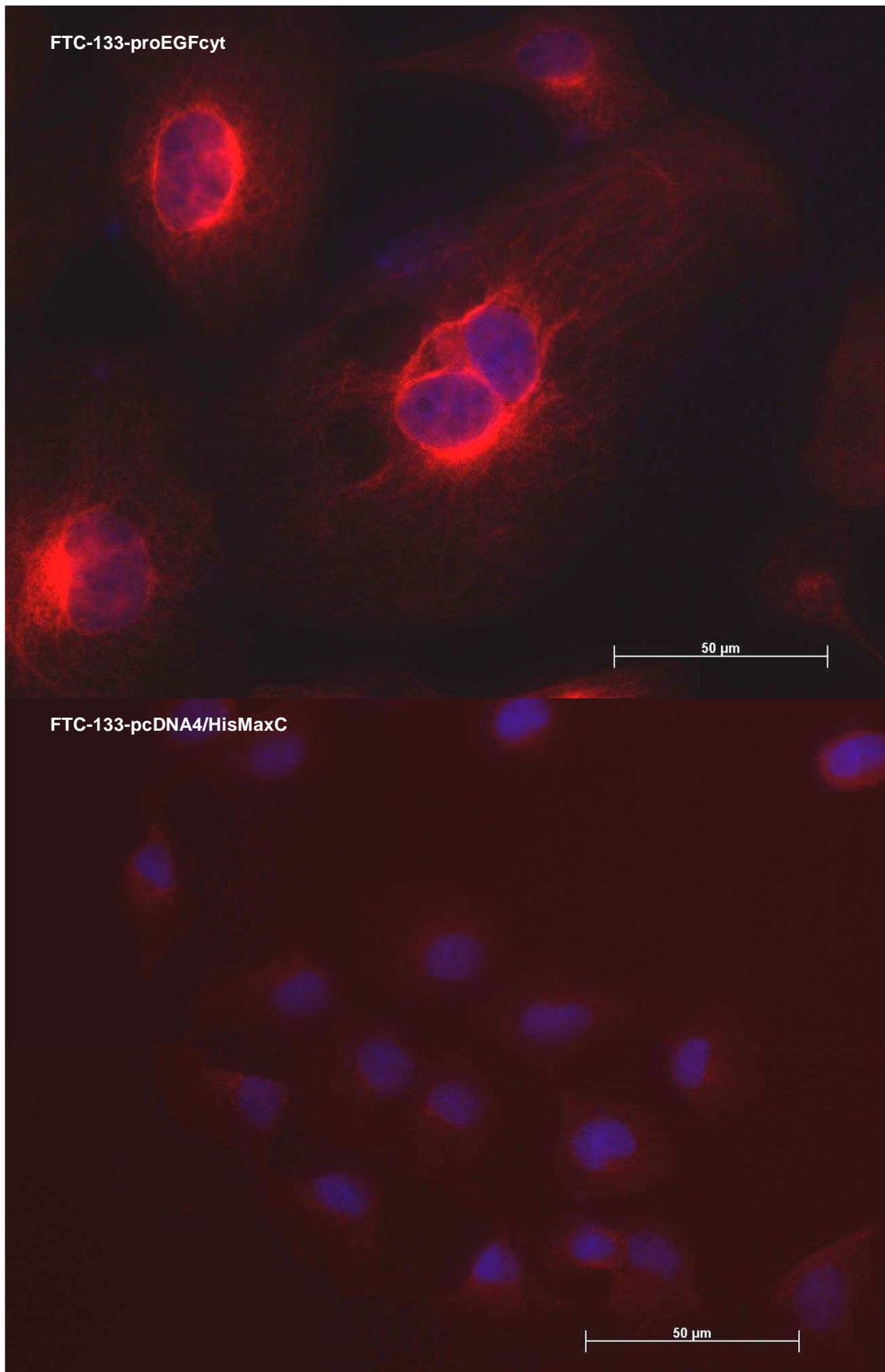


Abb. A4: Immunfluoreszenz-Färbungen von proCathepsin L.

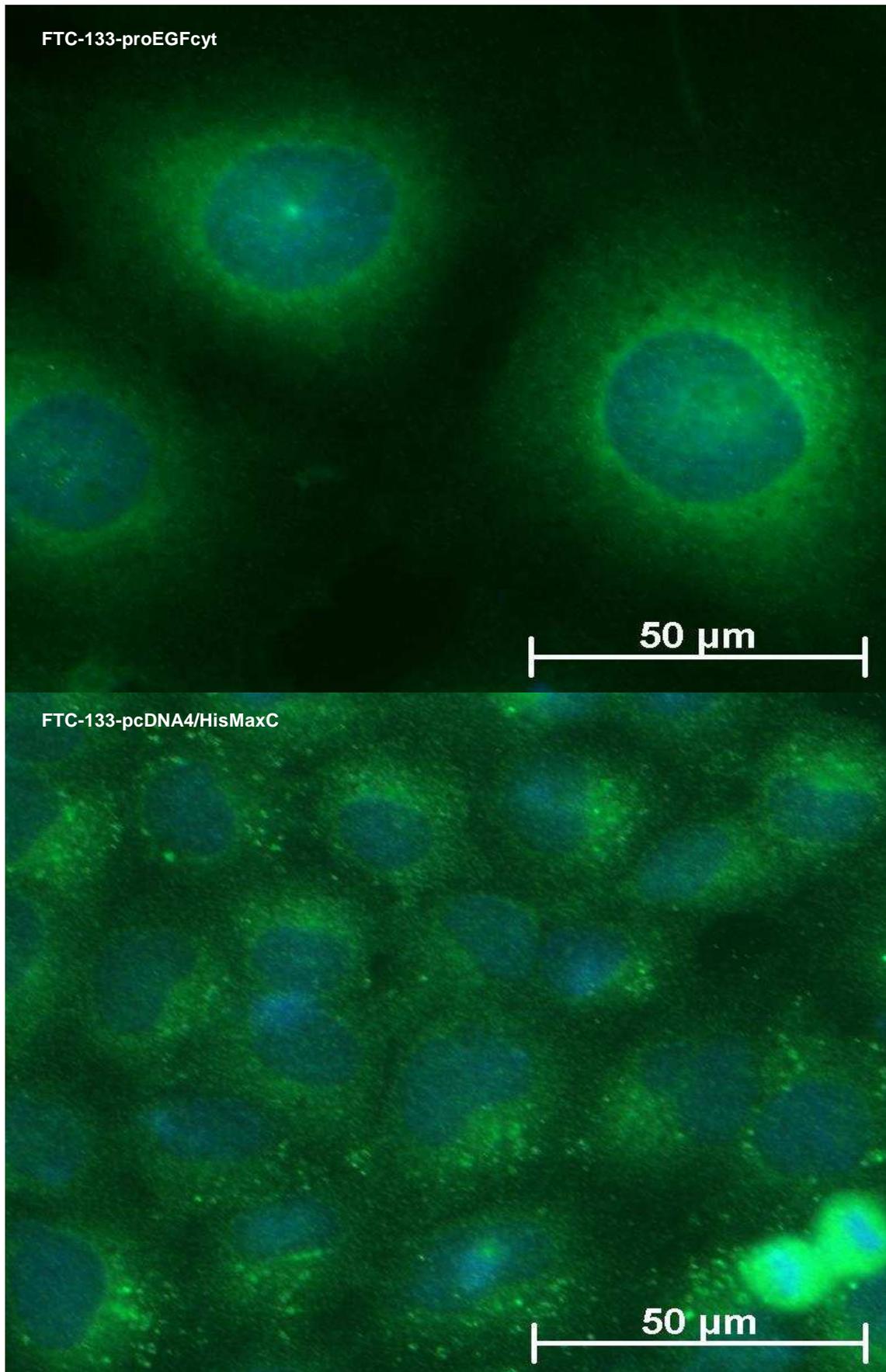


Abb. A5: Immunfluoreszenz-Färbungen des TGN.

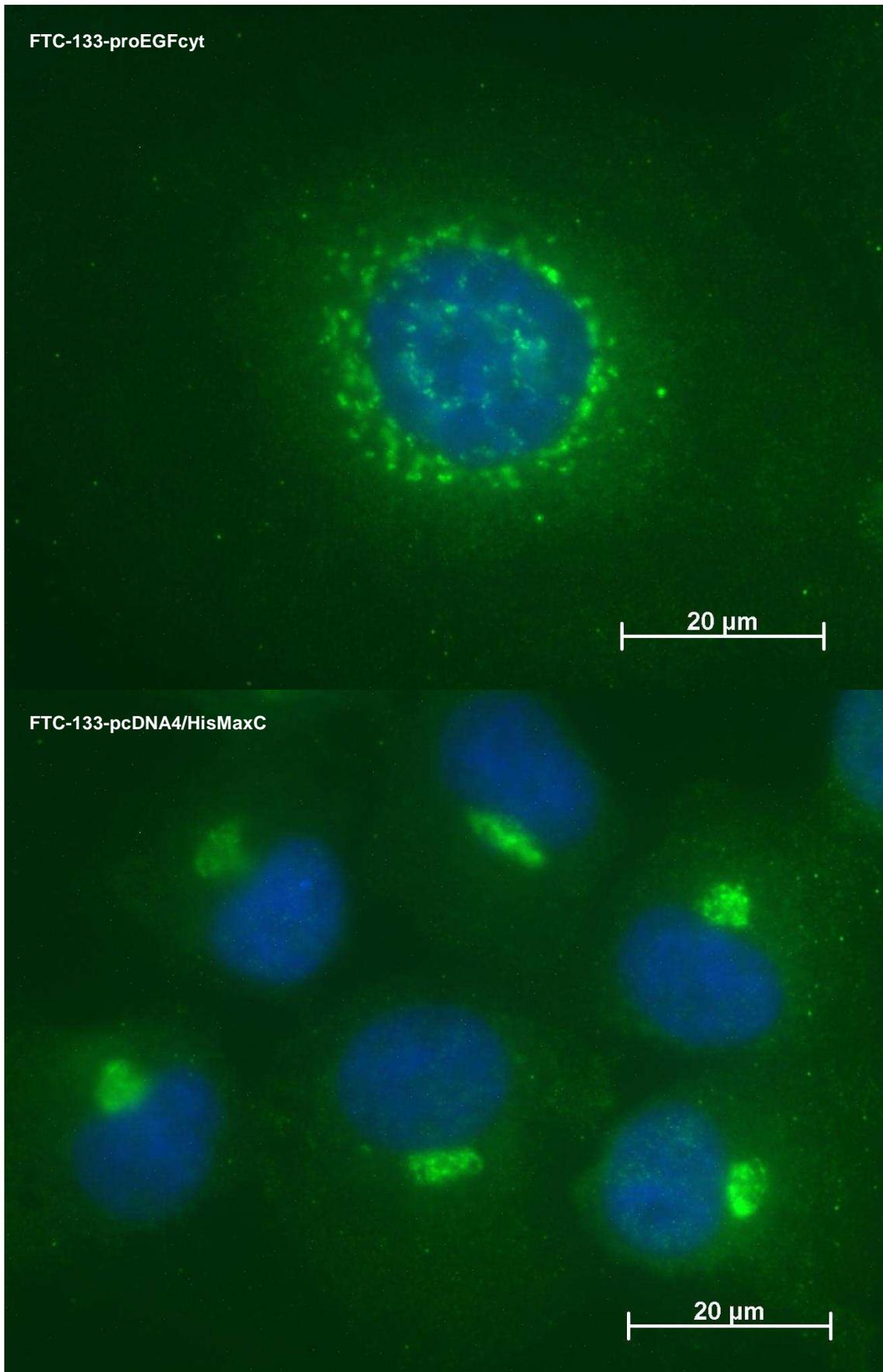


Abb. A6: Immunfluoreszenz-Färbungen der Späten Endosomen.

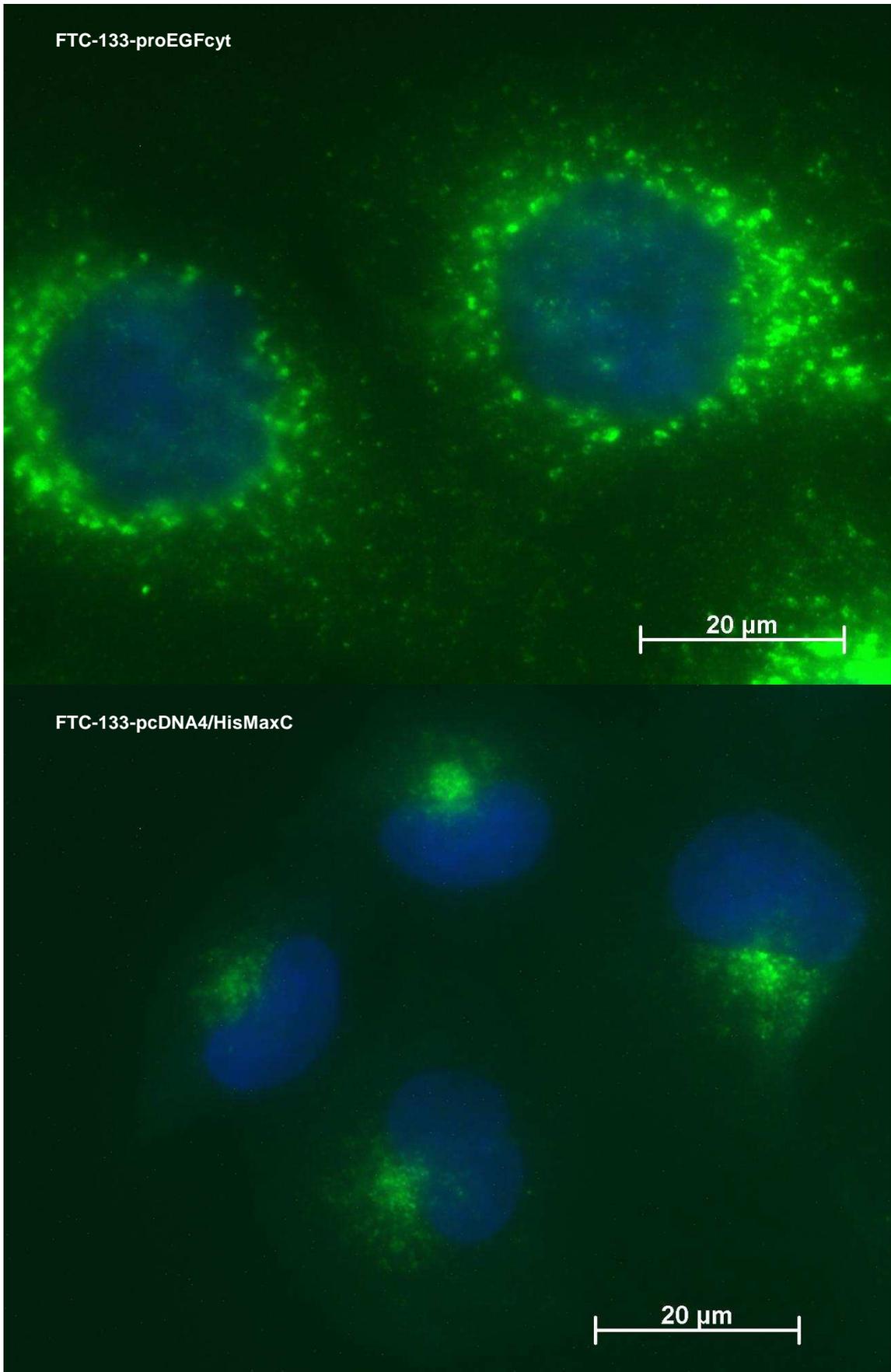


Abb. A7: Immunfluoreszenz-Färbungen der Lysosomen.

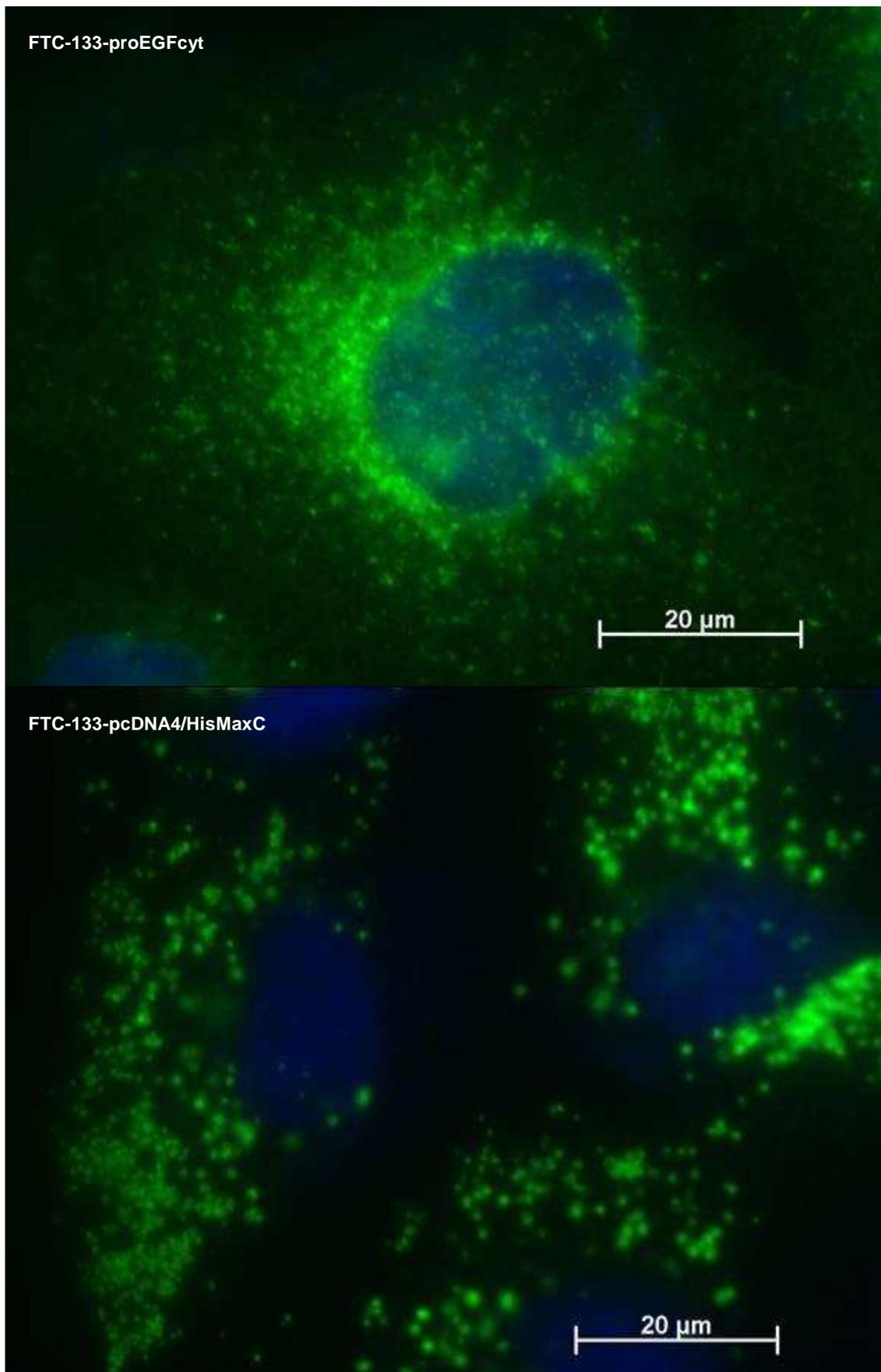


Abb. A8: Immunfluoreszenz-Färbungen von γ -Adaptin (AP-Komplex 1).

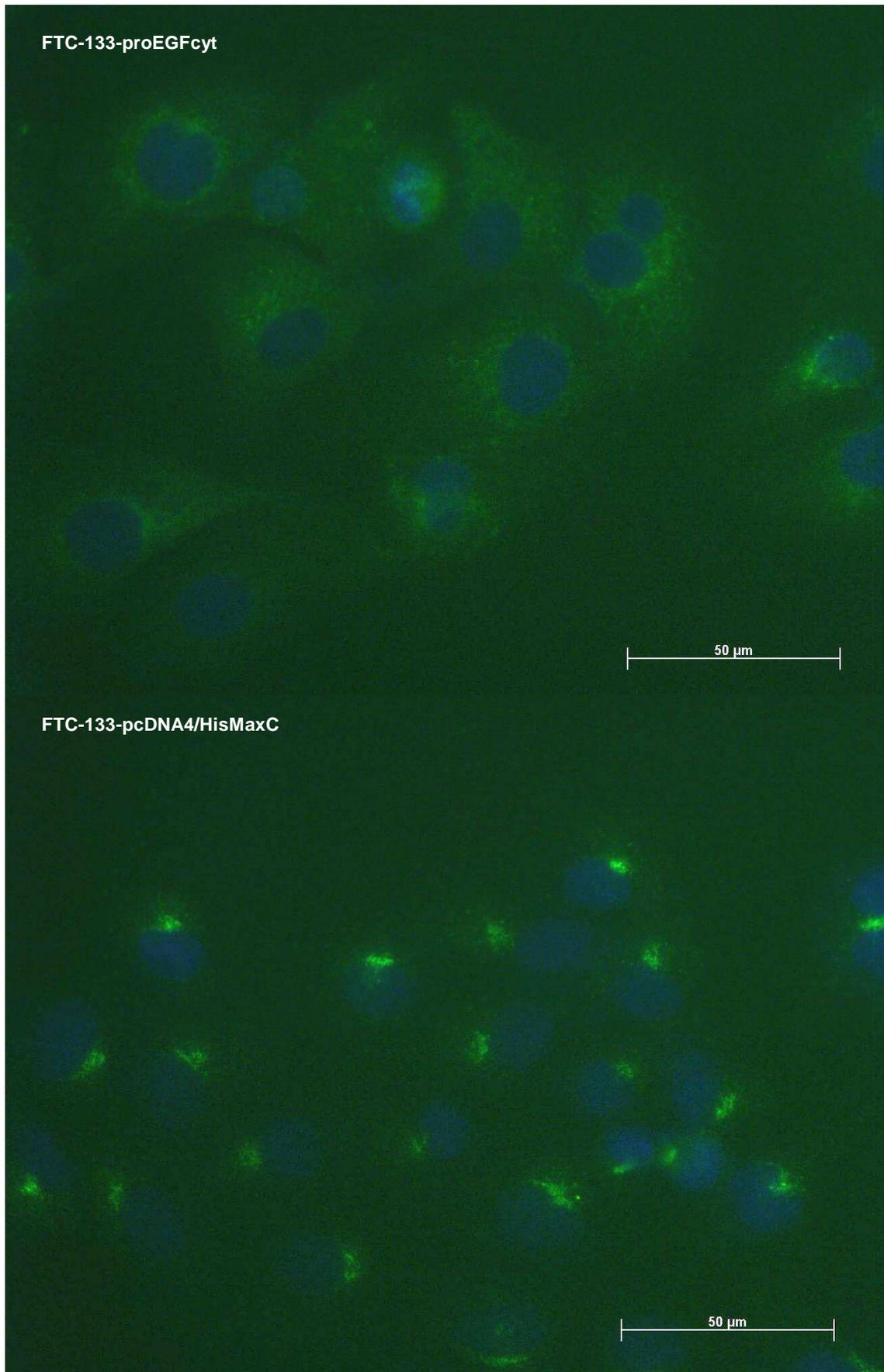
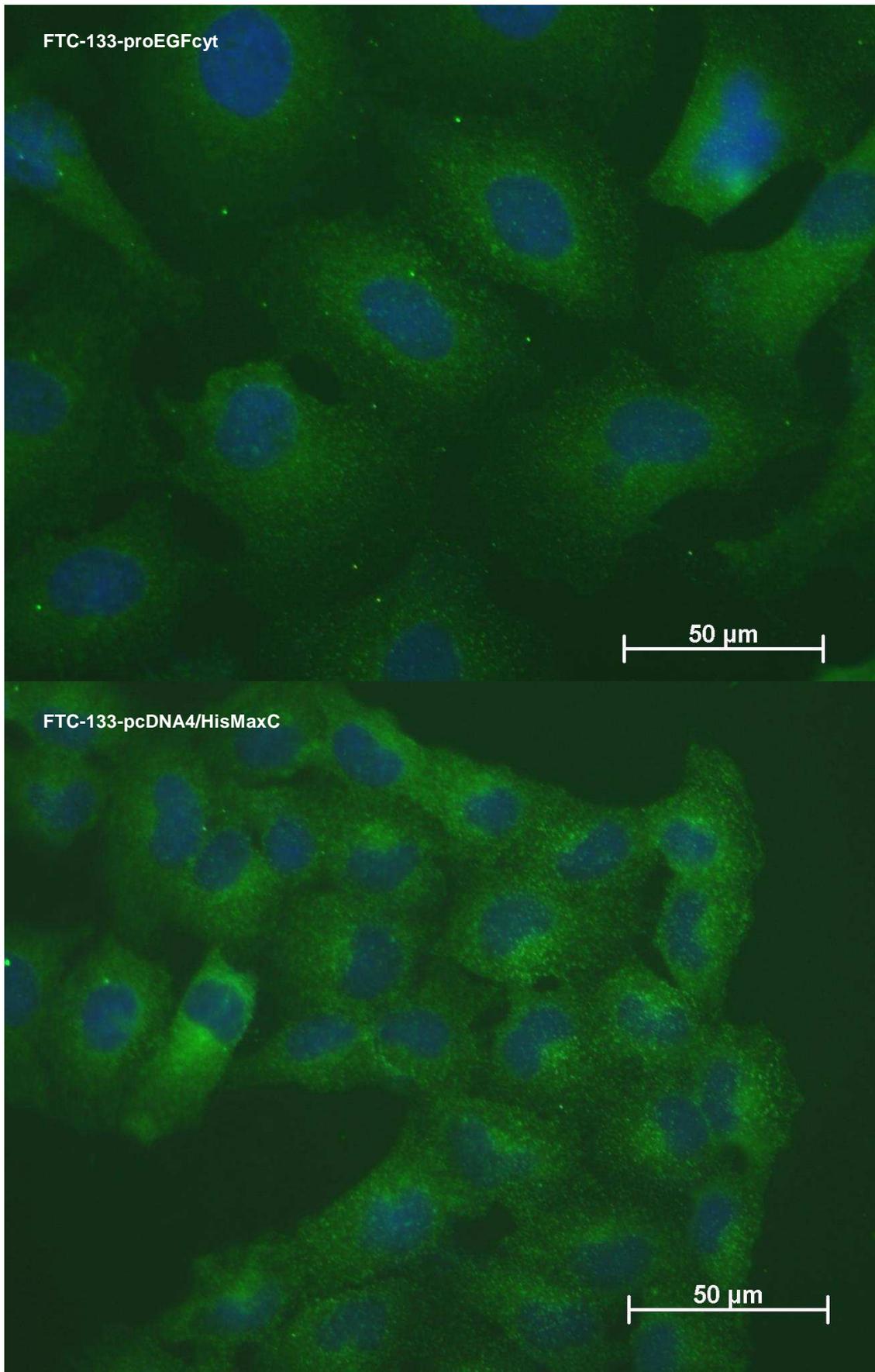


Abb. A9: Immunfluoreszenz-Färbungen von α -Adaptin (AP-Komplex 2).



Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| A | Amper |
| add | aufaddieren zu |
| AK | Antikörper |
| AP | Adaptor-Protein |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaar |
| BrdU | 5-Brom-2'-Desoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| CD9 | <i>cluster of differentiation-9</i> |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CHO | <i>Chinese hamster ovary</i> |
| cRNA | komplementäre RNA |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DEPC | 0,1% Diethylpyrocarbonat in Aqua dest. |
| DIG | Digoxygenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGFR | EGF-Rezeptor |
| ELISA | Enzym-gekoppelter Immun-Adsorptions-Assay |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FTC | Follikuläres Schilddrüsenkarzinom |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| GPCR | G-Protein-gekoppelte Rezeptoren |
| h | Stunde |
| HB-EGF | Heparin-bindendes EGF |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| His | Histidin |
| HRP | <i>Horse Raddish Peroxydase</i> |
| kb | Kilo-Basenpaar |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |

| | |
|---------|--|
| LDL | <i>Light Density</i> Lipoprotein |
| LMP | <i>Low Melting Point</i> |
| M | molar |
| MAP | Mikrotubuli-assoziiertes Protein |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| Nrg | Neuregulin |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PBST | Phosphat-gepufferte Saline mit Tween20 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | pH-Wert |
| PKC | Protein-Kinase C |
| PLFZ | <i>Promyelocytic Zink Finger</i> |
| pT | pathologische Tumorklassifikation |
| PTC | Papilläres Schilddrüsenkarzinom |
| PVDF | Polyvinylidindifluorid |
| Q-PCR | Quantitative PCR |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RTr | Reverse Transkription |
| RTr-PCR | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek | Sekunde |
| siRNA | silenced RNA |
| TACE | <i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i> |
| TAE | Tris-Acetate-EDTA |
| TBE | Tris-borate buffer-EDTA |
| TBS | Tris gepufferte Saline |
| TBST | Tris gepufferte Saline mit Tween20 |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGFα | <i>Transforming Growth Factor α</i> |
| TGN | Transgolgi-Netz |

| | |
|-------|--|
| TRITC | Tetramethylrhodamin-5-(und -6)-Isothiocyanat |
| tRNA | Transfer RNA |
| TSA | Trichostatin A |
| TUNEL | <i>TDT-mediated dUTP nick end labeling</i> |
| U | <i>Units</i> |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| vol | Volumen |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTC | Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom |

Chemikalien und Firmenverzeichnis

Alle Reagenzien und Chemikalien ohne separaten Herkunftsvermerk wurden von der Firma Sigma bezogen.

| Firmenname | Ort | Land |
|---|---------------------|-------------|
| Abcam | Cambridge | UK |
| Amersham Pharmacia Biotech | New York | USA |
| AMS Biotechnology Ltd. | Abingdon, Oxon | UK |
| B. Braun Melsungen AG | Melsungen | Deutschland |
| BD Transduction Laboratories: jetzt BD | San Diego | USA |
| Biosciences Pharmingen | | |
| Biontex Laboratories GmbH | München | Deutschland |
| Bio-Rad Laboratories GmbH | München | Deutschland |
| Biowest Nuaille | Nuaille | Frankreich |
| BMA = BioWhittaker Molecular Applications | Walkersville, Maine | USA |
| Carl Roth GmbH & Co. KG | Karlsruhe | Deutschland |
| Carl Zeiss AG | Jena | Deutschland |
| Cell Signalling Technology | Danvers | USA |
| Cymbus Biotechnology Ltd. | Hampshire | UK |
| Dako Deutschland GmbH | Hamburg | Deutschland |
| Dianova GmbH | Hamburg | Deutschland |
| DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH | Braunschweig | Deutschland |
| Eastman Kodac Company | Rochester, New York | USA |
| Fermentas GmbH | St. Leon-Roth | Deutschland |
| Fluka Chemie AG | Buchs | Schweiz |
| Gibco: jetzt Invitrogen | Karlsruhe | Deutschland |
| Greiner bio-One GmbH | Frickenhausen | Deutschland |
| KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories | Gaitersburg | USA |
| Life Technologies | Heidelberg | Deutschland |
| LTF Labortechnik GmbH & Co. KG | Wasserburg/ B. | Deutschland |
| Merck KGaA | Darmstadt | Deutschland |
| Molecular Probes: jetzt Invitrogen | Karlsruhe | Deutschland |
| NEB (New England Biolabs) | Ipswich, MA | USA |
| Novocastra Laboratories Ltd. | Newcastle upon Tyne | UK |
| Olympus | New York | USA |
| Pierce, Perbioscience Deutschland GmbH | Bonn | Deutschland |
| Promega GmbH | Mannheim | Deutschland |

Anhang

| | | |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| Qiagen GmbH | Hilden | Deutschland |
| Roche Applied Science | Mannheim | Deutschland |
| Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH | München | Deutschland |
| SLT Labinstrumente GmbH | Crailsheim | Deutschland |
| TPP AG | Trasadingen | Schweiz |
| TSE GmbH | Zeven | Deutschland |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern all den Menschen danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Univ.- Prof. Dr. H.-J. Ferenz für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, seine Unterstützung sowie seinem Interesse am Fortgang dieser Promotion.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. B. Fischer sowie Prof. Dr. H. Dralle, die es mir ermöglichten, am Institut für Anatomie und Zellbiologie sowie im Labor für experimentelle chirurgische Onkologie der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Visceral- und Gefäßchirurgie diese Promotionsarbeit durchzuführen.

Mein ausdrücklichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Klonisch für seine überaus engagierte Betreuung, die immerwährende Bereitschaft zu langen und wertvollen Diskussionen sowie seine stete hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Umsetzung wissenschaftlicher Fragestellungen. Als Projektleiter hat er maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich vielmals bei Herrn PD Dr. C. Hoang-Vu für die freundliche Aufnahme im Labor für Experimentelle chirurgische Onkologie, seine außerordentliche Fürsorge und immerwährende Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. P. Pocar, Frau PD Dr. S. Hombach-Klonisch und Frau PD Dr. A. Kehlen für die produktive Zusammenarbeit, die wertvollen Hinweise und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft. Zudem danke ich Frau PD Dr. A. Kehlen für die Durchführung der Q-PCR.

Vielmals bedanken möchte ich mich bei PD Dr. E. Weber für die freundliche Bereitstellung der anti-Cathepsin-Antikörper sowie die vielen hilfreichen Hinweise.

Frau A. Glogowska danke ich für die überaus schöne Zeit unserer gemeinsamen Projektarbeit, die vielen Hilfen und ihre ansteckende Fröhlichkeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau J. Bialek, Frau Y. Radestock sowie Frau K. Hammje für ihre große Hilfe im Labor während meiner Schwangerschaft.

Bedanken möchte ich mich bei Frau C. Fröhlich, Frau E. Schlüter und Frau K. Hammje für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe beim Management des Laboralltages sowie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Und nicht zuletzt danke ich meiner großartigen Familie, die immer für mich da ist.

Angaben zur Person und zum Bildungsgang

Angaben zur Person

| | |
|---------------------|--|
| Name | Janette Pyka |
| Geburtstag | 21.01.1978 |
| Geburtsort | Dessau/Anhalt |
| Wohnort | Dresden |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | geschieden; Lebensgemeinschaft, ein Kind: Magda (geb. 02.02.2006) |

Bildungsgang und Beruf

| | |
|-----------------|---|
| 1984-1990 | Besuch der Oberschule „Klement Gottwald“, Dessau |
| 1991-1996 | Besuch des Gymnasiums „Walter Gropius“, Dessau |
| 1996-2001 | Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU) |
| 2001 | Diplomprüfung; Diplomarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der MLU Halle- Wittenberg zum Thema: „Vorbereitende Studien zur Identifikation von Interaktionspartnern der cytoplasmatischen Domäne des proEGF“ |
| 03/2002-06/2002 | wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekulare Biochemie e.V. Jena |
| 07/2002-09/2005 | wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie sowie im Labor für experimentelle chirurgische Onkologie der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg |
| 02/2006-07/2007 | Geburt der Tochter und Erziehungszeit |
| 08/2007-dato | Koordinatorin Change Control im Bereich Qualitätssicherung der AWD.pharma & Co. KG in Radebeul |

Dresden, 30.06.08



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wort, Bild oder dem Sinn nach entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht. Es wurde weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades an einer anderen Einrichtung vorgelegt.

Dresden, 30.06.08 