

**Untersuchungen zur physiologischen Rolle der
Proteintyrosinkinase Syk in humanen
Brustepithelzellen**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Vorgelegt von

Anja Ruschel

aus Gera

München 2004

Dissertation eingereicht: 16.04.2004

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. E. A. Nigg

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. E. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2004

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität München noch an einer anderen Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen.

München, 16.04.2004

Anja Ruschel

Für meine Eltern

Für Alexander

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung	1
1.2	Proteintyrosinkinasen.....	2
1.2.1.1	Die EGFR (epidermal growth factor receptor)-Familie.....	3
1.2.1.2	Aktivierung von Rezeptoren der EGFR-Familie	4
1.2.1.3	EGF-induzierte Signalkaskaden.....	5
1.2.1.3.1	Die MAP-Kinase-Kaskade.....	6
1.2.1.4	Signaldiversifikation innerhalb der EGFR-Familie	8
1.2.1.5	Negativregulation von Rezeptoren der EGFR-Familie.....	9
1.2.2.1	Syk – eine zytoplasmatische Tyrosinkinase als Tumorsuppressor	11
1.3	Überblick zur Krebsentstehung.....	13
1.3.1	Überblick zur Brustkrebsentstehung.....	14
1.4	Zielsetzung	15
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Bezugsquellennachweis.....	23
2.2	Medien und Puffer	25
2.3	Bakterienstamm	27
2.4	Zelllinien	27
2.5	Antikörper	28
2.6	Mäusestämme	29
2.7	Plasmide und Oligonukleotide	30
2.8	Molekularbiologische Methoden	32
2.8.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	32

2.8.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	32
2.8.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	33
2.8.3.3	Phosphorylierung von Primern	33
2.8.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	33
2.8.3.5	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - ³² P]-dATP....	33
2.8.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	34
2.8.6.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	34
2.8.6.3	Dauerkultur von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	34
2.8.7.1	PCR-Amplifikation von DNA	35
2.8.7.2	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	35
2.8.8.1	Präparation von Total-RNA	36
2.8.8.2	Präparation von Poly(A ⁺)-RNA aus Total-RNA.....	36
2.8.8.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	37
2.8.8.4	Northern-Analyse.....	37
2.8.8.5	Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran.....	37
2.8.8.6	Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA	37
2.9	Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	38
2.9.3	Transfektion von Zellen.....	38
2.9.3.1	Kalziumphosphat-Transfektion.....	38
2.9.3.2	Transfektion mit anderen Methoden.....	39
2.10	Proteinanalytische Methoden.....	39
2.10.6	Zellfraktionierung	41
2.10.10	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	42
2.10.11	Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	42
2.11	Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen.....	43
2.11.1	Stimulation von Zellen.....	43
2.11.2	Autokinaseassay zur Bestimmung der Kinaseaktivität von Syk.....	43
2.11.3	Assays zum Nachweis von Chemotaxis	43
2.11.3.1	Migrationsassay	43
2.11.3.2	Tumorzellinvasionsassay	44
2.11.4	Propidiumjodidfärbung zur Bestimmung von apoptotischen Zellen.....	44
2.11.5	Kolorimetrische Bestimmung lebender Zellen mittels WST-1 Reagenz.....	44

3	ERGEBNISSE	45
3.1	Verbreitung und Vorkommen der Proteintyrosinkinase Syk in Zellen epithelialen Ursprungs	45
3.1.1	Expression von Syk in verschiedenen Zelllinien.....	46
3.1.1.1	Untersuchung der Expression von Syk auf mRNA Ebene	46
3.1.1.2	Untersuchung der Expression von Syk auf Proteinebene	48
3.1.2	Autokatalytische Aktivität von Syk in humanen Brustepithelzellen	49
3.1.3	Nachweis von Syk(L) in Zellkernextrakten.....	50
3.1.4	Nachweis von Syk im normalen und tumorigenen Gewebe der Maus.....	51
3.2	Untersuchungen zur Funktion von Syk in humanen Brustzelllinien	53
3.2.1	Transiente Unterdrückung der Syk Expression in humanen MCF-10A Brustepithelzellen mittels siRNA (<i>small interference RNA</i>)	53
3.2.1.1	Einfluss der Syk Reduktion auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in MCF-10A Zellen.....	54
3.2.1.2	Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von Adaptorproteinen	56
3.2.1.3	Der Einfluss der Syk Reduktion auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion ist EGFR-Kinase abhängig	58
3.2.2	Einfluss der stabilen Inhibition der Syk Expression in MCF-10A Zellen...	60
3.2.2.1	Analyse der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung in stabilen pRETRO-SUPER/Syk exprimierenden MCF-10A Zellen	61
3.2.2.2	Spezifischer Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-vermittelte Signaltransduktion	62
3.2.2.3	Erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression.....	64
3.2.2.4	Erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Expression von Syk ist EGF-abhängig	65
3.2.2.5	Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression gegenüber oxidativem Stress.....	66
3.2.2.6	Reduzierte Migration von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierten Syk-Leveln	68

3.2.3	Untersuchungen zur Funktion von Syk in normalen und transformierten humanen Brustzellen mittels des Syk-selektiven Inhibitors Piceatannol	69
3.2.3.1	Test der Spezifität des Syk-selektiven Inhibitors Piceatannol in Syk überexprimierenden CHO-K Zellen	69
3.2.3.2	Einfluss von Piceatannol auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in der MDA-MB-468 Brustkrebszelllinie.....	71
3.2.3.3	Einfluss von Piceatannol auf die Stabilität des Adaptorproteins Shc ..	72
3.2.3.4	Einfluss von Piceatannol auf die Phosphorylierung der MAPK Jnk ...	73
3.2.4	Einfluss exogener Expression von Syk bzw. Syk K- in MCF-10A Zellen..	74
3.2.4.1	Analyse der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in stabilen Syk bzw. Syk K- exprimierenden MCF-10A Zellen.....	74
3.2.4.2	Einfluss der exogenen Expression von Syk bzw. Syk K- auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc.....	77
3.2.4.3	Einfluss der exogenen Expression von Syk bzw. Syk K- auf die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen.....	78
3.2.4.4	Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von katalytisch-inaktivem Syk gegenüber H ₂ O ₂ -Behandlung.....	79
3.3	Untersuchungen zum Einfluss der EGFR-vermittelten Signalgebung auf Syk	81
3.3.1	Nachweis von membranständigem Syk in MCF-10A Zellen	82
3.3.2	Einfluss der EGFR-Kinaseaktivität auf Syk	84
3.3.2.1	Erhöhte autokatalytische Aktivität von Syk unter Einfluss von AG1478 in normalen und transformierten Brustzelllinien	84
3.3.2.2	Autokatalytische Aktivität von exogenem Syk in MCF-10A Zellen...	86
3.3.3	Untersuchungen zur Assoziation von Syk und EGFR.....	88
3.3.3.1	<i>In vitro</i> Assoziation von Syk und EGFR	88
3.3.3.2	<i>In vivo</i> Assoziation von Syk und EGFR	91
3.4	Untersuchungen zur Funktion von exogenem Syk in der Syk-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S.....	94
3.4.1	Einfluss der exogenen Expression von Syk auf die Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc in MDA-MB-435S Zellen	94

3.4.2	Einfluss der Reexpression von Syk auf das Invasionsvermögen von MDA-MB-435S Zellen.....	96
3.4.3	Untersuchung zur Migration von MDA-MB-435S Zellen mit reexprimiertem Syk.....	98
4	DISKUSSION	100
4.1	Vorkommen und Aktivität der PTK Syk in nichthämatopoetischen Zellen	101
4.2	Syk - ein Negativregulator EGFR-vermittelter Signaltransduktion?	104
4.3	Der Einfluss von Syk auf das Adaptorprotein Shc	108
4.4	Wechselseitiger Einfluss von Syk und EGFR.....	110
4.5	Ein Ausblick.....	112
5	ZUSAMMENFASSUNG	114
6	LITERATURVERZEICHNIS	115
7	ABKÜRZUNGEN	131
8	LEBENS LAUF	134
	DANKSAGUNG	136

*Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür,
dass dem forschenden Menscheist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben
und immer wieder von neuem angefacht werden:
Die Begeisterung und die Ehrfurcht.*

Max Planck

1 Einleitung

In multizellulären Organismen muss die Aktivität einer Zelle mit der ihrer mittelbaren und unmittelbaren Nachbarzellen sowie dem nichtzellulären Bereich koordiniert werden. Nur so kann die Entwicklung und der Erhalt der funktionellen Integrität des Organismus gewährleistet werden. Aus dieser Notwendigkeit entwickelte sich eine Vielzahl an inter- und intrazellulären Signaltransduktionswegen, die zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose steuern. Die interzelluläre Zellkommunikation wird durch ein breites Spektrum an Liganden vermittelt, zu denen zum Beispiel Hormone, Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsfaktoren gehören. Die Bindung dieser Liganden an spezifische Rezeptoren initiiert die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die zur Regulation von Genexpression und den daraus resultierenden biochemischen und physiologischen Vorgängen führen (van der Geer et al., 1994).

Bei der intrazellulären Signalweiterleitung spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle. So bilden die Rezeptortyrosinkinasen (RTK_n) eine der Hauptklassen an Zelloberflächenrezeptoren. Nach ihrer Aktivierung durch Ligandenbindung können RTK_n mittels Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine extrazelluläre Signale in die Zelle bis hin zum Zellkern weiterleiten und so eine zelluläre Antwort hervorrufen (Ullrich and Schlessinger, 1990).

1.1 Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von zellulären Proteinen erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten (Cohen, 1992; Sun and Tonks, 1994). Obwohl der Anteil an tyrosinphosphorylierten Proteinen nur 0,05 bis 0,1 % an der Gesamtphosphorylierung in der Zelle ausmacht, ist diese posttranslationale Modifikation essentiell für die Steuerung vieler physiologischer Prozesse (Hunter, 1995).

Tyrosinphosphorylierung ist ein reversibler, dynamischer Prozess, der durch die Aktivität von Proteintyrosinkinasen (PTK_n) und deren Gegenspielern, den Proteintyrosinphosphatasen (PTP_n) kontrolliert wird. Störungen im empfindlichen Wechselspiel von PTK_n und PTP_n können drastische Veränderungen im feinen

Regelwerk der Zelle bewirken, die zur Entstehung von Erkrankungen wie z. B. Krebs führen können (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2 Proteintyrosinkinasen

Eine Analyse der humanen Genomsequenzen im Rahmen des „Human Genome Projects“ ergab, dass unter den rund 26600 Genen ca. 11% für Proteine kodieren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie beispielsweise Rezeptoren oder G-Protein-Untereinheiten. Unter ihnen wurden mehr als 860 Proteinkinasen identifiziert, deren Gesamtheit als Kinom bezeichnet wird (Manning et al., 2002; Venter et al., 2001). Neben Serin- und Threoninkinasen bilden die PTKn eine der größten bekannten Familien homologer Proteine (Hanks and Hunter, 1995). PTKn katalysieren die Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes ihrer Substrate. Aufgrund ihrer Struktur lassen sich PTKn in die Gruppen der transmembranen RTKn und die Gruppe der intrazellulären PTKn einteilen.

1.2.1 Rezeptortyrosinkinasen

RTKn sind transmembrane Proteine, die sich aus einer N-terminalen extrazellulären, meist glykosilierten Domäne, einer einfachen Transmembranhelix und einem zytoplasmatischen Teil, der die Kinasedomäne trägt, zusammensetzen. Der extrazelluläre Anteil jeder RTK ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielfalt unterschiedlicher Sequenzmotive aus. Diese strukturellen Unterschiede wurden zur Einteilung der bislang 58 bekannten RTKn in 20 verschiedene Unterfamilien verwendet (Abb. 1) (Robinson et al., 2000). So besitzt z.B. die EGF (epidermal growth factor)-Rezeptorfamilie zwei Cystein-reiche Regionen in der extrazellulären Domäne, während sich die Mitglieder der PDGF (platelet derived growth factor)-Rezeptorfamilie durch ihre fünf Immunglobulin-ähnlichen Regionen auszeichnen.

Der zytoplasmatische Anteil der RTKn setzt sich aus der Juxtamembranregion, der Kinasedomäne und dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Schlessinger and Ullrich, 1992). Die katalytische Domäne ist 250-300 Aminosäuren lang und zwischen

allen RTKs hoch konserviert. Sie enthält die Bindungsstelle für den Phosphatdonor ATP und katalysiert sowohl die Autophosphorylierung des Rezeptors als auch die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Substrate (Yarden and Ullrich, 1988a; Yarden and Ullrich, 1988b). Der wenig konservierte carboxyterminale Bereich von RTKs enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen, die im phosphorylierten Zustand hochspezifische Bindungsstellen für Proteine darstellen oder zur katalytischen Aktivierung des Rezeptors beitragen (Hubbard et al., 1998; Schlessinger, 2000).

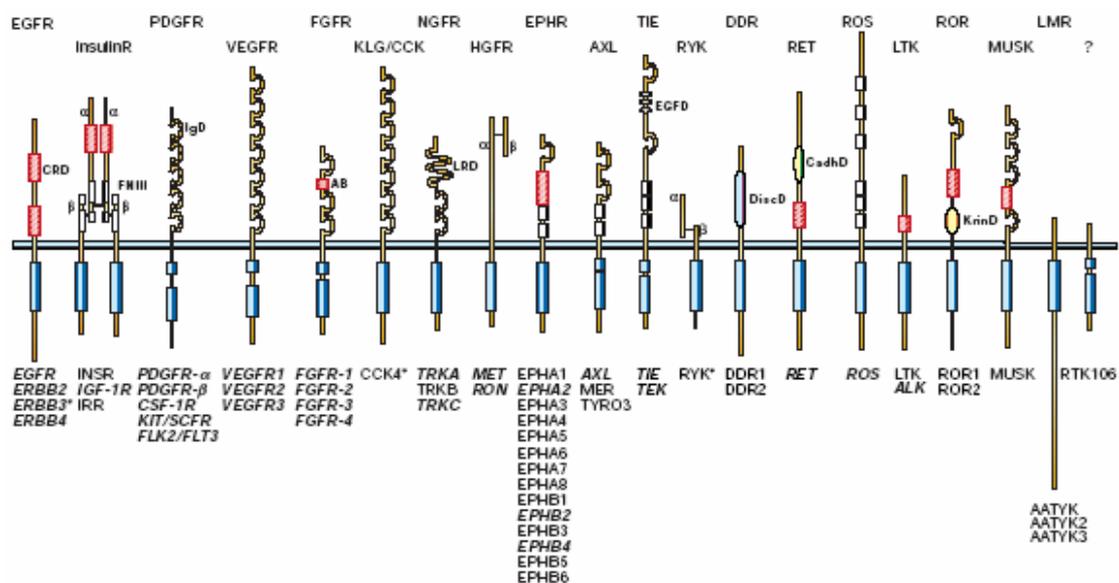


Abb. 1: Die Familien der Rezeptortyrosinkinasen. Die Abbildung zeigt die 20 identifizierten Familien der Rezeptortyrosinkinasen mit ihren klassifizierenden extrazellulären Domänen. EGFR, epidermal growth factor receptor; InsR, insulin receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; VEGFR; vascular endothelial growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; KLG/CCK, colon carcinoma kinase; NGFR, nerve growth factor receptor; HGFR, hepatocyte growth factor receptor, EphR, ephrin receptor; Axl, a Tyro3 PTK; TIE, tyrosine kinase receptor in endothelial cells; RYK, receptor related to tyrosine kinases; DDR, discoidin domain receptor; Ret, rearranged during transfection; ROS, RPTK expressed in some epithelial cell types; LTK, leukocyte tyrosine kinase; ROR, receptor orphan; MuSK, muscle-specific kinase; LMR, Lemur. Weitere Abkürzungen: AB, acidic box; CadhD, cadherin-like domain; CRD, cysteine-rich domain; DiscD, discoidin-like domain; EGFD, epidermal growth factor-like domain; FNIII, fibronectin type III-like domain; IgD, immunoglobulin-like domain; KrinD, kringle-like domain; LRD, leucine-rich domain (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

1.2.1.1 Die EGFR (epidermal growth factor receptor)-Familie

Eine der am besten erforschten Untergruppe der RTKs ist die EGFR-Familie. Sie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGFR (HER1, ErbB1) (Ullrich et al., 1984), HER2

(human EGFR-related gene, ErbB2/neu) (Coussens et al., 1985), HER3 (ErbB3) (Kraus et al., 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman et al., 1993). Dabei nehmen HER2 und HER3 eine Sonderstellung in dieser Familie ein. Während für HER2 bis heute kein direkter Ligand bekannt ist (Klapper et al., 1999), weist HER3 auf Grund von Punktmutationen innerhalb der katalytischen Domäne keine oder nur geringe enzymatische Aktivität auf (Guy et al., 1994).

Die Mitglieder der EGFR-Familie stehen häufig in Zusammenhang mit Tumorentstehung und -Progression beim Menschen (Olayioye et al., 2000). Eine erhöhte Expression des EGFR tritt bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungentumoren auf (Grandis et al., 1996; Salomon et al., 1995). In 20 bis 30% aller Brustkrebsfälle wurde eine Amplifikation des *her2*-Gens und ein damit assoziiertes aggressives Tumorverhalten beobachtet (Hynes and Stern, 1994; McCann et al., 1991). Der kausale Zusammenhang zwischen HER2-Überexpression und einer schlechten klinischen Prognose wird gestützt durch eine signifikant geringere Überlebensrate und einem früher auftretenden Rezidiv bei Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Brust- oder Ovarialkarzinom im Vergleich zu Patientinnen mit Tumoren ohne HER2-Überexpression (Berchuck et al., 1990; Slamon et al., 1989). Neben der klinischen Nutzung als prognostischer Marker stellt HER2 auch ein Zielprotein für eine spezifische Krebstherapie dar. So konnte mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalen Anti-HER2-Antikörper, das erste Onkogen-spezifische Medikament entwickelt werden, das gegen einen transmembranen Rezeptor gerichtet ist (Shawver et al., 2002).

1.2.1.2 Aktivierung von Rezeptoren der EGFR-Familie

Viele Prinzipien, die der Aktion von RTKs zugrunde liegen, wurden durch die Erforschung des EGFR aufgedeckt. So unterliegt der Aktivierung von RTKs in der Regel der Dimer- bzw. Multimerisierung von Rezeptormonomeren, die durch die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor ausgelöst werden (Schlessinger, 2002).

Zu den Liganden der EGFR-Familie zählen EGF, TGF- α (transforming growth factor- α), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), Epi- und Amphiregulin, Betacellulin sowie verschiedene Liganden der Heregulin/NDF (neu differentiation factor)- Untergruppe.

Zur Zeit existieren zwei verschiedene Modelle, welche die Rezeptordimerisierung erklären. Ein Modell beschreibt einen Liganden-induzierten Mechanismus, bei dem ein Ligandenmolekül auf Grund seiner Bivalenz an zwei Rezeptormoleküle bindet und so die Rezeptordimerisierung initiiert (Gullick, 1994). Gegen dieses Modell sprechen die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen des EGFRs im Komplex mit EGF oder TGF- α , die je Ligand nur eine Bindung an einen Rezeptor zeigen (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Diese Ergebnisse sprechen für einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus, bei dem die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung im Rezeptor bewirkt und so eine Interaktionsstelle zur Dimerbildung in der extrazellulären Domäne freilegt (Ferguson et al., 2003; Jorissen et al., 2003).

Neben der Bildung von Rezeptorhomodimeren kann die Bindung eines Liganden auch zur Dimerisierung zweier verschiedener Rezeptoren und somit zur Bildung von Heterodimeren führen (Daly, 1999; Wallasch et al., 1995). Die darauf folgende Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase leitet die Autophosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste ein. Diese Phosphorylierungsstellen dienen dann als spezifische Bindestellen für Adaptorproteine wie Grb2, Shc oder Gab1 und bilden den Ausgangspunkt für eine Reihe von Signalkaskaden (Hackel et al., 1999; Prenzel et al., 2001).

1.2.1.3 EGF-induzierte Signalkaskaden

Durch die Initiation intrazellulärer Signalkaskaden haben RTKs die Möglichkeit, externe Stimuli an zytoplasmatische und nukleäre Zielproteine weiterzuleiten. Die ersten Komponenten dieser Signalketten bilden in der Regel Adaptormoleküle, die SH2 (src-homology 2)-Domänen (Bradshaw and Waksman, 2002) oder PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive aufweisen (Guy et al., 2002). Die Interaktion von Adaptorproteinen mit phosphorylierten Tyrosinresten der RTKs über Phosphotyrosin-bindende Domänen bewirkt deren Tyrosinphosphorylierung durch die Kinase des Rezeptors. Außer den genannten Interaktionsmotiven besitzen viele Adaptormoleküle weitere Bindungsmodule wie z.B. PH (pleckstrin homology)-Domänen, die mit verschiedenen Phospholipiden sowie G $\beta\gamma$ -Dimeren heterotrimerer G-Proteine wechselwirken können (Shaw, 1996) oder SH3 (src homology 3)-Domänen, welche mit Prolin-reichen Proteinsequenzen assoziieren (Zarrinpar et al.,

2003). Die meisten Signalmoleküle tragen verschiedene Bindungsmodule in Kombination und können daher mit mehreren Proteinen interagieren, was zur Bildung multimerer Signalkomplexe führt (Abb. 2).

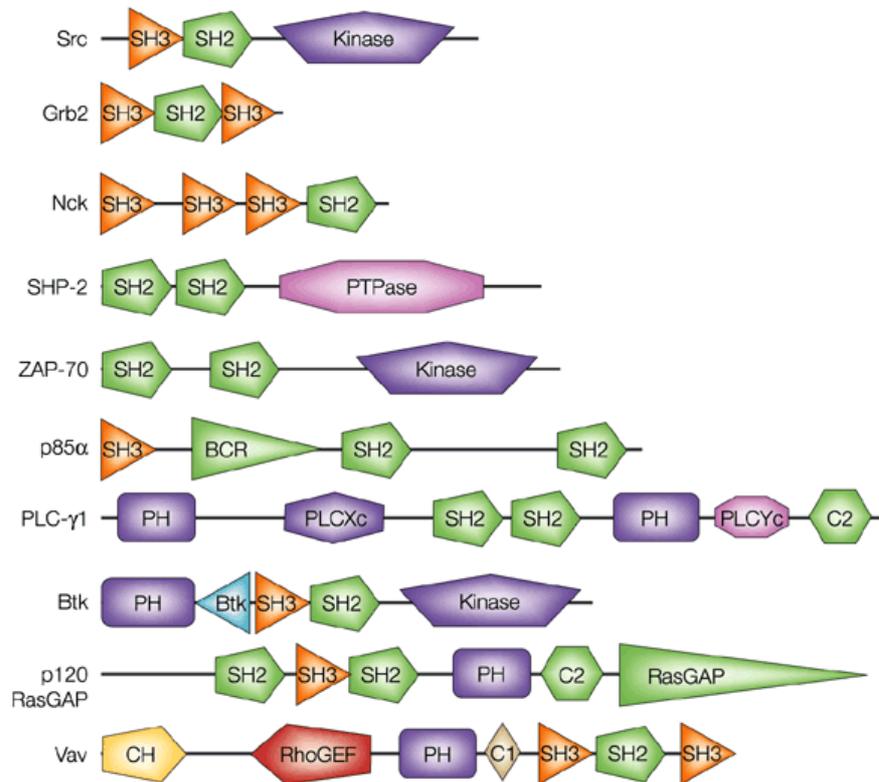


Abb. 2: Modulare Struktur einiger ausgewählter Signalmoleküle. Die farbigen Module repräsentieren konservierte funktionelle Domänen: BCR, GTPase-Aktivator-Domäne; Btk, Bruton-Tyrosinkinase-Cystein-reiches Motiv; C1 und C2, Proteinkinase C konservierte Domäne 1 und 2; CH, Calponin-Homologie-Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne; PLCXc und PLCYc, Teile der katalytischen Domäne von Phospholipase C; SH2 und SH3, src-Homologie-Domäne 2 und 3 (Yaffe, 2002).

1.2.1.3.1 Die MAP-Kinase-Kaskade

Die Kaskade biochemischer Ereignisse, die vom EGFR über die Aktivierung des Protoonkogens Ras zur Kontrolle der Genexpression durch MAPKn (mitogen-activated protein kinases) führt, gehört zu den am besten untersuchten Signalwegen und wird als Ras/MAPK-Signalweg bezeichnet (Graves et al., 1995). In diesem Szenario spielt das Adaptorprotein Grb2 eine Schlüsselrolle. Grb2 besteht aus zwei SH3- und einer SH2-Domäne und besitzt keine enzymatische Aktivität (Tari and Lopez-Berestein, 2001). Nach der Aktivierung und Autophosphorylierung des EGFRs

bindet Grb2 entweder direkt über seine SH2-Domäne oder indirekt durch die Interaktion mit Shc, einem weiteren Adaptormolekül, an den Rezeptor. Über seine SH3-Domäne rekrutiert Grb2 dann den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless) zur Zellmembran. Diese Translokation des Grb2/Sos-Komplexes begünstigt die Wechselwirkung von Sos mit dem membranassoziierten kleinen G-Protein Ras und den Austausch von Ras-gebundenem GDP gegen GTP. Das somit aktivierte Ras-Protein bewirkt seinerseits die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf-1. Dies führt über die intermediären Threonin-/Tyrosinkinase MEK1 und MEK2 (MAPK/Erk Kinasen 1 und 2) zur Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von Erk1 und Erk2 (extracellular regulated kinase 1 und 2), die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort durch Serin-/Threoninphosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Elk, die Genexpression regulieren (Abb. 3) (Cobb et al., 1991; Khokhlatchev et al., 1998; Treisman, 1996).

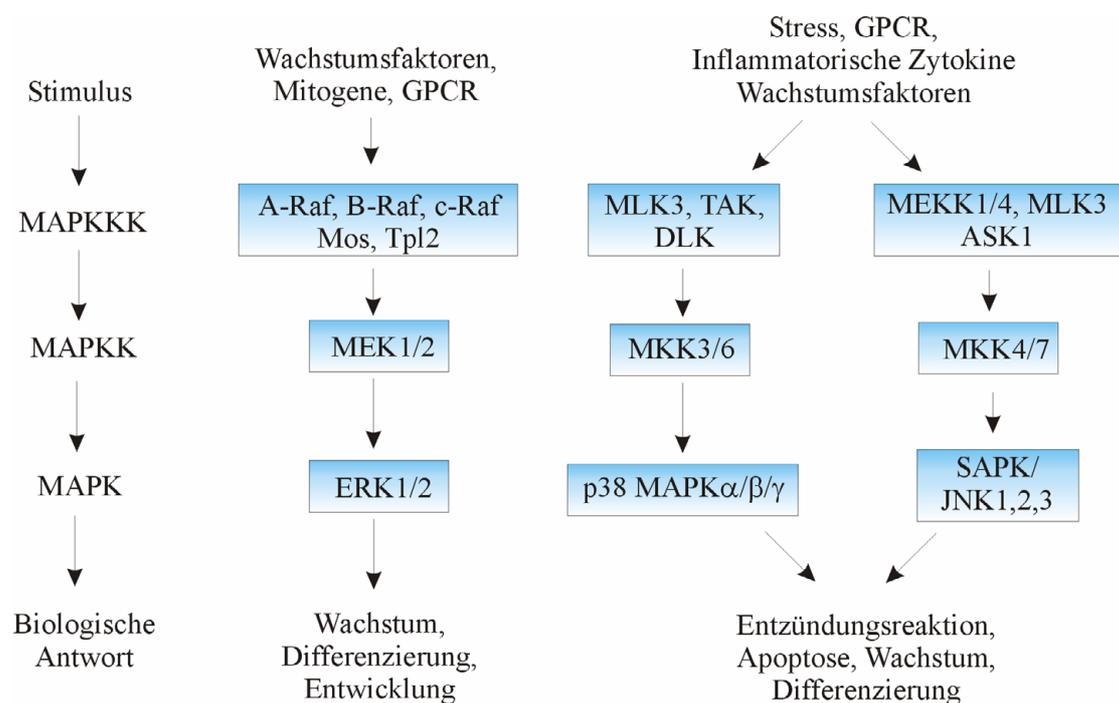


Abb. 3: Die MAPK-Signalwege. Schematische Darstellung der MAPK Kaskaden, die zur Aktivierung der MAPKn ERK1/2, JNK1/2/3 und p38 $\alpha/\beta/\gamma$ führen (Garrington and Johnson, 1999). GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor

Parallel zur Erk/MAPK-Kaskade werden in höheren eukaryotischen Systemen weitere MAPK-Kaskaden aktiviert, die ebenfalls die Signalübertragung in den Kern weiterleiten. Die daran beteiligten Proteinkinasen besitzen einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden Proteinen des Erk-Signalweges. So sind die den Erk1 und 2 homologen Kinasen Jnk1 und 2 (c-jun N-terminal kinase 1 und 2), sowie die nach ihrer Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Während Erk1/2 in der Regel hauptsächlich nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden, wird die Aktivität von Jnk1/2 und p38 von diesen Stimuli nur eingeschränkt induziert. Die Hauptaktivatoren dieser Kinasen sind zellulärer Stress in Form von UV-Bestrahlung oder osmotischem Schock sowie proinflammatorische Zytokine (Derijard et al., 1994; Su and Karin, 1996).

1.2.1.4 Signaldiversifikation innerhalb der EGFR-Familie

Signaltransduktion durch die Rezeptoren der EGFR-Familie trägt zu einer Vielzahl von Entwicklungs- und Krankheitsprozessen bei (Burden and Yarden, 1997). Ebenso zeigt die Stimulation von kultivierten Zellen mit verschiedenen Liganden der EGFRen ganz unterschiedliche Einflüsse auf das Migrations-, Proliferations- oder Differenzierungsverhalten der Zellen. Wie kommt es zu diesem breiten Spektrum an zellulären Antworten? Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung verschiedener Liganden an den gleichen Rezeptor zu einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster innerhalb des zytoplasmatischen Bereichs des Rezeptormoleküls führen kann, obwohl die absolute Gesamtphosphorylierung keine Unterschiede aufweist. So zeigten Sweeney und Kollegen, dass einige Tyrosinreste von HER4 nur nach Stimulation mit bestimmten Liganden phosphoryliert werden, während die Phosphorylierung anderer Tyrosine mit jedem Liganden für HER4 induziert werden kann (Sweeney et al., 2000). Ein einzelner Rezeptor scheint somit in der Lage zu sein, in Abhängigkeit des gebundenen Liganden, ganz unterschiedliche Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten und so zur Signaldiversität beizutragen. Andererseits kommt es, wie bereits erwähnt, nach der Bindung eines Liganden neben der Bildung von Homodimeren auch zur Wechselwirkung zweier unterschiedlicher Rezeptoren, wobei HER2 den bevorzugten Heterodimerisierungspartner darstellt. Da jeder Rezeptor mit einer spezifischen Auswahl intrazellulärer Adaptoren und

Signal­molekülen interagiert, besteht hier eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines breiten Spektrums zellulärer Antworten. Hinweise auf eine selektive Transphosphorylierung in Abhängigkeit vom Bindungspartner untermauern zusätzlich eine Rolle der Heterodimerisierung bei der Signaldiversifikation (Muthuswamy et al., 1999; Olayioye et al., 1998). Dieses interaktive und vielschichtige Signalnetzwerk mit seinen kombinatorischen Möglichkeiten sowohl auf Aktivierungs- als auch auf Expressionsebene erlaubt eine spezifische biologische Antwort hinsichtlich jedes physiologischen Kontexts (Abb. 4).

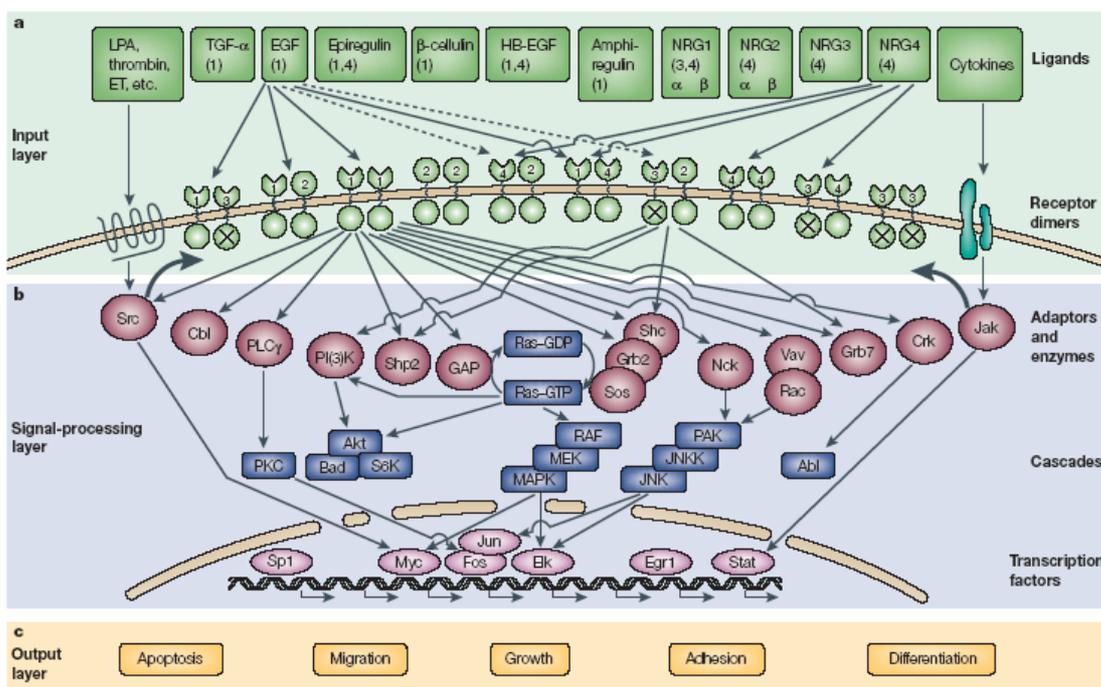


Abb. 4: Das komplexe Signalnetzwerk der EGFR-Familie. Die kombinatorischen Möglichkeiten der verschiedenen Liganden, Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden ermöglichen ein hohes Maß an Signaldiversifikation (Yarden and Sliwkowski, 2001). Nähere Erläuterungen im Text.

1.2.1.5 Negativregulation von Rezeptoren der EGFR-Familie

Die Vielfalt normaler zellulärer Funktionen, die durch die Mitglieder der EGFR-Familie reguliert werden, sowie die pathophysiologische Relevanz uneingeschränkter Kinaseaktivität unterstreichen die Notwendigkeit einer strengen aber fein abgestimmten Kontrolle der Signalweiterleitung durch RTKn. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen eine angemessene Dauer und Stärke des Signals von Rezeptoren garantiert. Im Falle des

EGFRs konnten mehrere Wege der Rezeptorregulation identifiziert werden (Fiorini et al., 2001). Diese schließen sowohl Liganden-induzierte Endozytose (Wiley and Burke, 2001) und Degradation durch die Ubiquitin-Proteasom-Maschinerie (de Melker et al., 2001; Levkowitz et al., 1998) als auch die Induktion inhibitorischer Proteine (Azios et al., 2001; Doherty et al., 1999; Hackel et al., 2001) sowie die Negativregulation durch Proteintyrosinphosphatasen ein (Tiganis, 2002).

1.2.2 Zytoplasmatische Tyrosinkinasen

Intrazelluläre Tyrosinkinasen sind an einer Vielfalt von Signalwegen beteiligt, die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden und die eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine bewirken. Viele zytoplasmatische PTKn übermitteln Signale von Transmembranrezeptoren wie z. B. Peptidhormon-, Zytokin- oder Immunrezeptoren. Andere Kinasen werden durch zelluläre Ereignisse wie Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion, zellulären Kalziumeinstrom oder Zellzyklus-spezifisch aktiviert (Kolibaba and Druker, 1997). Neben der katalytischen Domäne besitzen zytoplasmatische PTKn meist zusätzliche funktionelle Sequenzabschnitte, die die Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. über SH2- oder SH3-Domänen) oder deren intrazelluläre Lokalisation regulieren (Abb. 5).

Die Regulation zytoplasmatischer PTKn kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Aktivierung beruht meist auf intermolekularer oder autokatalytischer Tyrosinphosphorylierung. Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste kann allerdings auch zur Inaktivierung von PTKn führen, wie z.B. für c-Src gezeigt werden konnte (Parsons and Parsons, 1997). Ein anderer wichtiger Aspekt bei der Signalübertragung durch zytoplasmatische PTKn ist deren intrazelluläre Lokalisation. Die Kinase FAK (focal adhesion kinase) ist ausschließlich in Bereichen der Zell-Matrix-Adhäsion, den sogenannten „focal adhesions“ lokalisiert (Schaller et al., 1992). Ein anderes Beispiel ist die Kinase c-Src, die über Myristoylierung des Aminoterminus mit der Zellmembran assoziieren kann (Resh, 1994).

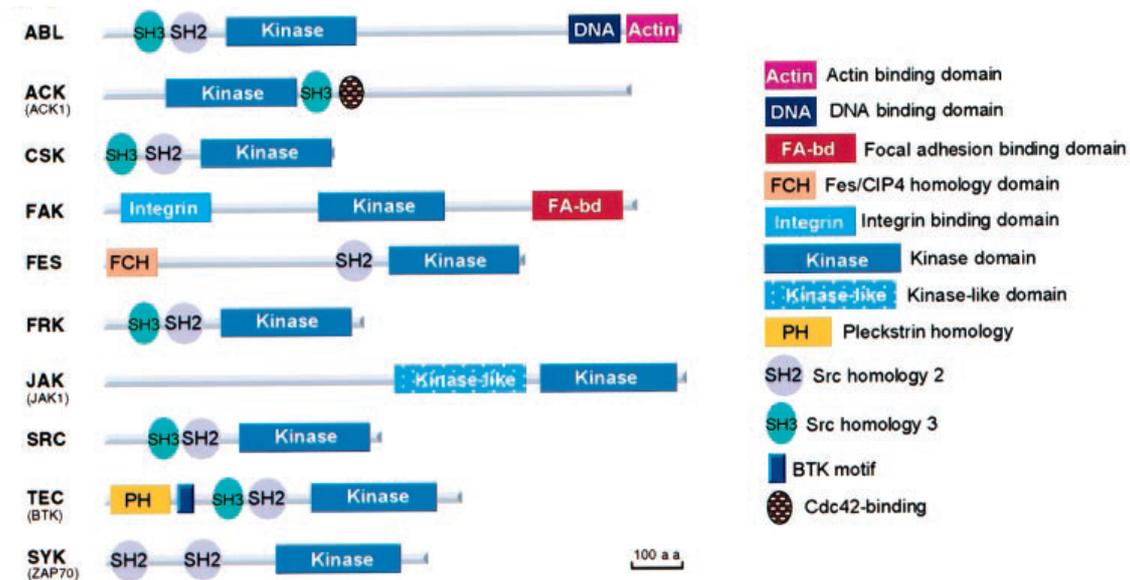


Abb. 5: Schematische Struktur einiger zytoplasmatischer Tyrosinkinasen. Die farbigen Abschnitte repräsentieren funktionelle Abschnitte innerhalb des Kinaseproteins (Robinson et al., 2000).

1.2.2.1 Syk – eine zytoplasmatische Tyrosinkinase als Tumorsuppressor

Die Proteintyrosinkinase Syk (*Spleen Tyrosin Kinase*) (Abb. 6), die ubiquitär in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird, wurde 1991 aus einer cDNA Bank der Schweinemilz kloniert (Taniguchi et al., 1991) und umfangreich als Effektorprotein der B-Zell-Rezeptor (BZR)-vermittelten Signalgebung untersucht (Turner et al., 2000). Syk-abhängige Signalwege regulieren dabei die klonale Expansion, Differenzierung und Apoptose von B-Zellen, wobei sowohl die Phospholipase C (PLC)- γ_2 als auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) nach BZR-Aktivierung von Syk tyrosinphosphoryliert werden. Dies resultiert in einer Aktivierung der MAPKs Erk und Jnk (Jiang et al., 1998) bzw. von Akt, das das Überleben der Zelle entscheidend reguliert (Craxton et al., 1999; Datta et al., 1997). Außerhalb hämatopoetischer Zellen konnte die Syk Expression auch in humanen Hepatozyten (Tsuchida et al., 2000), in humanen Kolonkarzinomzellen (Okamura et al., 1999), in humanen nasalen Fibroblasten (Yamada et al., 2001) und in humanen Endothelzellen (Yanagi et al., 2001a) nachgewiesen werden, wobei die Funktion von Syk in diesen Zellen noch weitestgehend ungeklärt bleibt.

Die Charakterisierung von Syk in der Maus ergab, dass Syk auch in normalem Brustdrüsengewebe nachweisbar ist (Fluck et al., 1995). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten Coopman und Kollegen zeigen, dass Syk ein potenter

Wachstumsmodulator von Brustepithelzellen ist (Coopman et al., 2000). Die Untersuchungen ergaben, dass sich sowohl Syk mRNA als auch Protein in einer Reihe von gut charakterisierten humanen Brustkrebszelllinien, in normalem humanem Brustdrüsengewebe und normalen Brustepithelzellen nachweisen lassen, jedoch in invasiven Brustkrebszelllinien nicht vorhanden sind bzw. in stark reduzierten Anteilen vorliegen (Coopman et al., 2000). Darauf folgende Untersuchungen im Maus Xenograftmodell zeigten, dass Syk-negative invasive Brustkrebszellen nach Re-expression von Syk in der Ausbildung von Tumoren und Lungenmetastasen inhibiert wurden. Zusätzlich konnte im Matrigelwachstumsassay gezeigt werden, dass für diesen suppressiven Effekt sowohl die Kinase- als auch die SH2-Domänen von Syk von Bedeutung sind. Es scheint, dass der Verlust der Syk-Expression mit einer erhöhten Motilität und Invasion von Brustkrebszellen assoziiert ist. Somit stellt die Expression von Syk einen prognostischen Marker in humanen Brusttumoren dar, welcher mit Metastasierung und einer schlechten klinischen Prognose korreliert (Toyama et al., 2003).

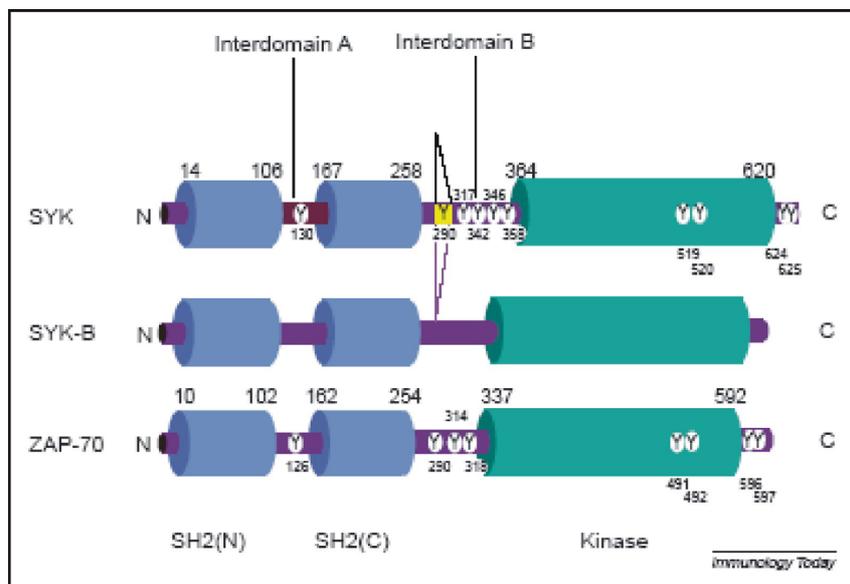


Abb. 5: Schematische Struktur der Syk/ZAP-70 Proteintyrosinkinase-Familie. Die hintereinander angeordneten SH2-Domänen und die Kinase-Domänen sind als blaue bzw. als grüne Zylinder dargestellt. Die violetten Bereiche stellen die Interdomänen dar, welche die SH2-Domänen untereinander bzw. die SH2- und die Kinase-Domänen miteinander verbinden. Die alternative Spleißform Syk-B weist im Vergleich zu Syk eine Deletion von 23 AS innerhalb der Interdomain B auf (in Gelb dargestellt). Dargestellt sind potentielle Phosphotyrosine, über welche die enzymatische Aktivität oder Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden können. Die Phosphorylierung der Tyrosine 317, 342 und 346 erfolgt durch Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, während die Phosphorylierung der Tyrosine 130, 519 und 520 durch Syk selbst erfolgt. Zusätzlich sind homologe Tyrosine in ZAP-70 dargestellt (Turner et al., 2000).

Yuan und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression von Syk in invasiven Brustkrebszellen und Brusttumoren infolge von Promotorhypermethylierung unterdrückt ist (Yuan et al., 2001). Interessanterweise scheint die Kernlokalisierung von Syk für die Unterdrückung der Invasion essentiell zu sein. Denn Wang und Kollegen veröffentlichten, dass Syk innerhalb der Interdomäne B über ein basisches Kernlokalisierungssignal verfügt, das in SykB infolge von alternativem Spleißen zerstört wird (Abb. 6) (Wang et al., 2003).

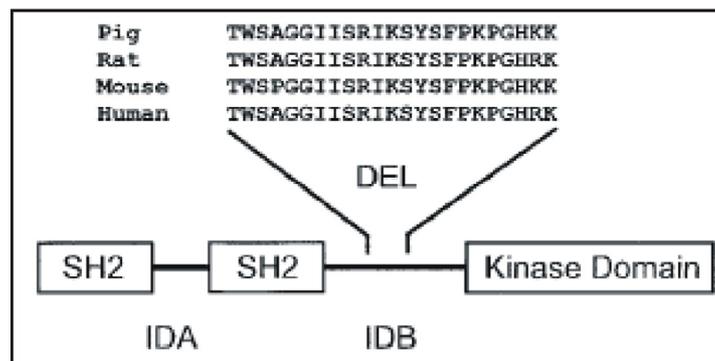


Abb. 6: Schematische Struktur von Syk und einer alternativen Spleißvariante SykB. SykB fehlen 23 AS (DEL) in der Interdomäne B (IDB). Dargestellt ist die Sequenzhomologie der 23 AS Deletion innerhalb verschiedener Spezies (Wang et al., 2003).

1.3 Überblick zur Krebsentstehung

Maligne Transformation wird durch genetische und epigenetische Veränderungen ermöglicht, die eine Störung der allgemeinen Kontrollmechanismen von zellulärer Proliferation und/oder programmiertem Zelltod bedingen (Holliday, 1996; Simons, 1995). Diese zellulären Störungen resultieren aus genetischer Prädisposition und/oder physikalischen (z.B. Strahlung), chemischen (Karzinogene), und biologischen (z.B. virale Infektion) exogenen Faktoren und sind häufig mit Veränderungen assoziiert, welche die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken (Couch, 1996). Die Aufklärung von zellulären und molekularen Prozessen, welche die Transformation normaler Zellen bewirken, stellt auch zukünftig eine zentrale Herausforderung der Tumorbiologie dar.

1.3.1 Überblick zur Brustkrebsentstehung

Verschiedenen Studien in den USA zur Folge stellt Brustkrebs die häufigste maligne Erkrankung von Frauen der westlichen Nationen dar, wobei jedes Jahr ungefähr eine Millionen an Neuerkrankungen allein in den USA zu verzeichnen sind. Die Studien belegen, dass bei 30% aller Krebspatientinnen Brustkrebs diagnostiziert wird, der bei 18% aller Frauen mit malignen Erkrankungen zum Tode führt (Greenlee et al., 2000). Trotz fortschreitender Aufklärung der Brustkrebsentstehung, bleiben noch viele biochemische und molekulare Mechanismen zu erforschen, welche den komplizierten Prozess der Karzinogenese begünstigen.

Die überwiegende Mehrheit der malignen Brusterkrankungen sind Karzinome, welche aus Zellen epithelialen Ursprungs entstehen. Basierend auf histologischen Untersuchungen wurde postuliert, dass Brustkrebs, wie andere maligne Erkrankungen auch, in einer Reihe von definierten Ereignissen verläuft (*multi-stepp process*), die anhand spezifischer qualitativer Unterschiede in einzelne Stadien eingeteilt werden können (Abb. 7) (Russo et al., 1993; Russo et al., 1998). Die Tumorprogression verläuft normalerweise schrittweise ausgehend von initialen duktaalen bzw. atypisch duktaalen Hyperplasien, über die Ausbildung eines duktaalen Karzinoms *in situ* und anschließend eines invasiven duktaalen Karzinoms, bis hin zur Ausbildung von Metastasen.

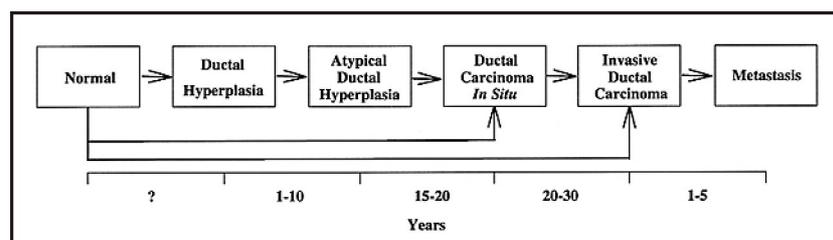


Abb. 7: *In vivo* Modell der neoplastischen Progression von humanen Brustkarzinomen. Entnommen aus Russo et al. (Russo et al., 1998).

Wachstumsfaktoren, welche RTKs epithelialer Zellen binden und aktivieren können, besitzen Schlüsselfunktionen während der Brustdrüseentwicklung. Interessanterweise korreliert die Überexpression von diesen Liganden und RTKs mit der Ausbildung von Brusttumoren (Grandis et al., 1996; Salomon et al., 1995).

1.4 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Hinweise darauf vor, dass die Tyrosinkinase Syk auch außerhalb hämatopoetischer Zellen exprimiert wird (Yanagi et al., 2001b). So konnte gezeigt werden, dass Syk sowohl das maligne Wachstum als auch die Invasivität von humanen Brustkrebszellen unterdrückt (Coopman et al., 2000). In Anbetracht der für Syk postulierten Tumorsuppressorfunktion ist dessen weitere Erforschung in physiologischen wie pathophysiologischen Prozessen in Brustepithelzellen von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl die Expression und die Aktivität von Syk als auch dessen biologische Funktion innerhalb von Wachstumsfaktor-vermittelter Signaltransduktion in nichttransformierten und transformierten Brustepithelzellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG1478	Alexis Biochemicals, Lausen
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Biotrend Chemikalien, Köln
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Polysciences, Eppenheim
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid)	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piceatannol	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A/G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

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

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt/Main
Reverse Transkriptase, AMV	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin (Gibco)	Invitrogen, Eggenstein

2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	>6000 Ci/mmol
---	---------------

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen.

2.1.4 Handelsübliche „Kits“ und Sonstiges

ECL Kit	PerkinElmer/NEN, Köln
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunc, Dänemark
	Falcon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Poly Prep® Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Gewebekultureinsätze (25 mm bzw. 10 mm)	Nunc, Dänemark
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Bioscience, USA
siACE-RNAi™, RNAi-Duplex	Dharmacon, USA
Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham, Schweden
Protein A/G Sepharose™ 4Fast Flow	Amersham, Schweden
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim

2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (Maus)	Toyoba, Japan
Heregulin- β 1 EGF domain	R & D Systems,
Insulin	Lilly, Giessen

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Medien für *E. coli*-Bakterien

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

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 μ g/ml) zugesetzt.

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

2.2.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Eggenstein), fötales Kälberserum bzw. fötales Pferdeserum von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose und 2 mM L-Glutamin

Minimum essential medium (MEM) mit 2 mM L-Glutamin

RPMI medium1640 mit 2 mM L-Glutamin

Ham's F-12 mit 2 mM L-Glutamin

L15 (Leibovitz) Medium

MCF-10A Medium	250 ml DMEM, 4,5 mg/ml Glukose, 2 mM L-Glutamin
	250 ml HAM's F-12
	5% fötales Pferdeserum
	Insulin (10 μ g/ml)
	EGF (20 ng/ml)
	Hydrokortison ($1,4 \times 10^{-6}$ M), Sigma, USA
	Cholera Enterotoxin (100 ng/ml), Sigma, USA

Die Medien wurden gemäß den Herstellerangaben mit 1mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Je nach kultivierter Zelllinie wurde den Medien hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt.

2.2.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. „x“ bezieht sich auf die „fache“ Konzentration der Stocklösung.

BBS (2x)	50 mM 280 mM 1,5 mM	BES NaCl Na ₂ HPO ₄ , pH 6,96 (NaOH)
Denhardt (100x)	2,0 % 2,0 % 2,0 %	Polyvinylpyrrolidon Ficoll BSA
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 % 0,25 % 30 % 100 mM	Bromphenolblau Xylencyanol Glyzerin EDTA pH 8,0
HBS (2x)	280 mM 1,5 mM 100 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ Hepes, pH 7,0
Lämmli-Puffer (3x)	20 % 3 % 10 mM 0,05 % 5 %	Glyzerin SDS EDTA pH 8,0 Bromphenolblau Mercaptoethanol
MOPS (10x)	200 mM 80 mM 10 mM	Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat EDTA pH 8,0
NET (10x)	150 mM 5 mM 50 mM 0,05 %	NaCl EDTA Tris/HCl pH 7,4 Triton X-100
PBS	137 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48 %	Formamid

	17 %	Formaldehyd
	11 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
SD-Transblot	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	40 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,004 %	SDS
SSC (20x)	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
„Strip“-Puffer	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	2 %	SDS
	100 mM	β -Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM	Tris/Acetat, pH 8,0
	10 mM	EDTA
TE 10/0,1	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1 mM	EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	250 mM	Tris/HCl pH 7,5
	2 M	Glycin
	1 %	SDS

2.3 Bakterienstamm

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α F'	F' endA1 hsd17 ($r_k^- m_k^+$) supE44 recA1 gyrA (Nal) thi-1 Δ (lacZYA-argF196)	Genentech, USA

2.4 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BT-549	Humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-122
CHO-K	Hamster Ovarialzelllinie	Sugen
HEK 293	Humane embryonale Nierenfibroblasten	ATCC CRL-1573
MCF-10A	Humane Mammaepithel-Zelllinie	ATCC CRL-10317
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-26
MDA-MB-435S	Humane Duktale Karzinomzelllinie	ATCC HTB-129
MDA-MB-468	Humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-132

ΦNX-Ampho Amphotrophe Retrovirus produzierende Zelllinie (w/c 293T Zellen) stabil transfiziert mit einem Moloney GagPol-IRES-Lyt2 Konstrukt mit RSV Promoter, pPGK Hygromycin selektierbaren Marker und amphotrophen *env* Gen Nolan Lab, Stanford

Alle nicht aufgeführten Zelllinien entsprechen in Charakterisierungen und Ursprung laut ATCC.

2.5 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunopräzipitation oder als primäre Antikörper im Immunoblot verwendet.

Antikörper	Beschreibung	Referenz
Akt 1/2	Kaninchen, polyklonal, gegen AS 345-480 des humanen Akt	Santa Cruz, USA
c-Cbl (C15)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen c-Cbl	Santa Cruz, USA
EGFR	Schaf, polyklonal, gegen die intrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	UBI, USA
EGFR (108.1)	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	(Lax et al., 1989)
EGFR (ICR-3R)	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	(Mateo et al., 1997)
Erk2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des Ratten Erk2	Santa Cruz, USA
Erk2 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Subdomäne XI des Ratten Erk2	Santa Cruz, USA
Gab1 (H-198)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der mittleren Region (AS 119-316) des humanen Gab1	Santa Cruz, USA
Gab1 C-terminal	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid (AS 664-694) des humanen Gab1	UBI, USA
GST	Maus, monoklonal, gegen rekombinantes GST	Biomol, Hamburg
HER2 13D1B1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen HER2	H. J. Bühring, diese AG
HER2-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen HER2	(Lee et al., 1989)
HER3	Maus, monoklonal, gegen AS 1295-1323 des humanen HER3	UBI, USA
HER3	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen HER3	R. Lammers, diese AG
JNK (C-17)	Kaninchen, polyklonal, gegen den C-Terminus des humanen JNK	Santa Cruz, USA
p38 (C-20)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales	Santa Cruz, USA

Phospho-Akt	Peptid des humanen p38 Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Serin 437 des murinen AKT	Cell Signaling, USA
Phospho-Erk2	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Erk1/2 (Thr-202/Tyr-204) MAPK	NEB, Frankfurt/M
Phospho-Jnk	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Jnk (Thr183/Tyr185) MAPK	NEB, Frankfurt/M
Phospho-p38	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182) MAPK	NEB, Frankfurt/M
PY (4G10)	Maus, monoklonal, gegen Phosphotyrosin	UBI, USA
RanGAP	Ziege, polyklonal	F.Melchior, Martinsried (Pichler et al., 2002)
SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 c-terminalen AS des humanen SHC als GST-Fusionsprotein	R. Lammers, diese AG
SHC	Maus. Monoklonal, gegen humanes Shc	UBI, USA
SIRP β 1 ex	Kaninchen, polyklonal, gegen extrazelluläre Domäne von SIRP β 1	C. Cant, diese AG
Syk (4D10)	Maus, monoklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen Syk (AS 313-339)	Santa Cruz, USA
Syk (N19)	Kaninchen, polyklonal, gegen die 19 N-terminalen AS des humanen Syk	Santa Cruz, USA
VSV (P5D4)	Maus, monoklonal, gegen 11AS des Glykoproteins des Virus für Vesikuläre Stomatitis (VSV-G)	Roche, Mannheim
α -Tubulin	Maus, monoklonal, Aszites	Sigma, Taufkirchen

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

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1:20000	BioRad, München
Ziege gegen Kaninchen	1:20000	BioRad, München
Kaninchen gegen Schaf	1:20000	Dianova, Hamburg

2.6 Mäusestämme

Maus	Referenz
MMTV-HER2	(Muller et al., 1988)
WAP-TGF α /Wnt	(Humphreys and Hennighausen, 2000)
MMTV-PMT	(Baribault et al., 1997)
MMTV-Wnt	(Shackleford et al., 1993)
WAP-SV40-TAg	(Li et al., 2000)

Alle Gewebeproben von transgenen Mäusen wurden freundlicherweise von Lothar Hennighausen, Bethesda, zur Verfügung gestellt und von Miriam Gensler, diese AG, präpariert.

Für die Analyse der Expression von Syk im Brustgewebe aus Mäusen verschiedener Schwangerschaftsstadien wurde der Mäusestamm C57/B6 verwendet.

2.7 Plasmide und Oligonukleotide

2.7.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , CMV Promoter, BGH poly A, fi(+) ori	Invitrogen, USA
pBlueScript KS+	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (+) IG, SK (MKS)	Stratagene, USA
pGEX-5X1-3	Prokaryotischer Expressionsvektor zur Herstellung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen, Amp ^r , IPTG-induzierbar	Amersham Pharmacia, Freiburg
pRK5	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, SV40 poly A	Genentech, USA
pRETRO-SUPER	siRNA generierender Vektor, H1 RNA Promotor, pBABE Backbone	OligoEngine
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori from pBR322, 5'-LTR and 3'-LTR from MoMuLV, SV40 Promoter	Clontech, USA
pcDNA3JVSV	Modifizierter pcDNA3 zur Proteinexpression, VSV-Epitop	J. Bange, diese AG
pLXSN EKS	Modifizierter pLXSN, enthält pBluescript KS MKS	J. Ruhe, diese AG

2.7.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCDNA3/Syk	cDNA von hSyk, (AS 1-635)	C. Cant, diese AG
pCDNA3/Syk K/R	cDNA von hSyk (K402R), katalytisch-inaktive Mutante, VSV-Epitop	C. Cant, diese AG
pcDNA3JVSV/Syk wt	cDNA von hSyk, (AS 1-635), VSV-Epitop	diese Arbeit

pcDNA3JVSV/Syk K/R	cDNA von hSyk, (K402R), katalytisch-inaktive Mutante, VSV-Epitop	diese Arbeit
pLXSN EKS/VSV-Syk wt	cDNA von hSyk, (AS 1-635), VSV-Epitop	diese Arbeit
pLXSN EKS/VSV-Syk K/R	cDNA von hSyk, (K402R), katalytisch inaktive Mutante, VSV-Epitop	diese Arbeit
pRK5-EGFR	cDNA von hEGFR	A. Chantry, diese AG
pRETRO-SUPER/Syk.1	Syk-spezifische "siRNA"-generierender Vektor. Syk Zielsequenz: GACTGGGCCCTTTGAGGAT	diese Arbeit
pRETRO-SUPER/Syk.6	Syk-spezifische "siRNA"-generierender Vektor. Syk Zielsequenz: GTA CTTGGAGGAGAGCAAT	diese Arbeit
pGEX-5X1-3/Syk	cDNA von hSyk, GST-fusioniert	diese Arbeit
pGEX-5X1-3/SH2(N)-SH2(C)	cDNA von SH2-Domänen des hSyk, GST-fusioniert	diese Arbeit

2.7.3 Wichtige Oligonukleotide

hSyk-, „sense“ Oligomer

5'-GCGGAATTCGCCACCATGGCCAGCAGCGGCATGGC-3'

hSyk-, „antisense“ Oligomer /ohne Stopcodon

5'-GGCCTCGAGGTTACCCACGTCATAGTAGTAATTG-3'

zur Klonierung von pcDNA3JVSV/Syk wt bzw. Syk K/R

SH2(N)-SH2(C) hSyk-, „sense“ Oligomer

5'-GCGGAATTCCTTCTTTTTTCGGGAACATCAC-3'

SH2(N)-SH2(C) hSyk-, „antisense“ Oligomer

5'-GCGCTCGAGGATTTTTTGACATGGGACAGTAAG

zur Klonierung von pGEX-5X1-3/SH2(N)-SH2(C)

pRETRO-SUPER/Syk.1-Oligo1

5'-gatccccGACTGGGCCCTTTGAGGATtcaagagaATCCTCAAAGGGCCCAGTCtttttgaaa-3'

pRETRO-SUPER/Syk.1-Oligo2

5'-agcttttccaaaaGACTGGGCCCTTTGAGGATtctcttgaaATCCTCAAAGGGCCCAGTCggg-3'

pRETRO-SUPER/Syk.6-Oligo1

5'-gatccccGTA CTTGGAGGAGAGCAATtcaagagaATTGCTCTCCTCCAAGTACtttttgaaa-3'

pRETRO-SUPER/Syk.6-Oligo2

5'-agcttttccaaaaGTACTTGGAGGAGAGCAATtctcttgaaATTGCTCTCCTCCAAGTACggg-3'

Klonierung von pRETRO-SUPER/Syk nach Vorschrift des Vertreibers

siACE-RNAiTM (AA-N₁₉)TM dTdT Template

Syk.1 5'-AAGACTGGGCCCTTTGAGGAT-dTdT-3'

GL2 Luciferase 5'-AACGTACGCGGAATACTTCGA-dTdT-3'

Zur gezielten Inhibition der Genexpression mittels synthetischer siRNAs nach Vorschrift des Vertreibers

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus 2 ml *E. coli*-Kultur mit Hilfe des QIAGEN Mini Kits präpariert.

2.8.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion verschiedener Zelllinien wurden größere DNA-Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.8.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.8.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden bei Temperaturoptimum des Enzyms.

2.8.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg verdaute Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 5 Units alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit eluiert.

2.8.3.3 Phosphorylierung von Primern

Zur direkten Ligation von synthetischen Oligomeren in Vektoren müssen die Oligomere zunächst phosphoryliert werden. 200 pmol Oligonukleotid wurden dazu mit 5 Units T4 Polynukleotidkinase, 1x Kinase Puffer und 10 mM ATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 min gestoppt.

2.8.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments sowie 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 Unit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.8.3.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α -³²P]-dATP

Zur radioaktiven Markierung von DNA- bzw. cDNA-Fragmenten wurde der „Random Primed Labeling Kit“ von Boehringer verwendet, der auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) beruht. 50 ng DNA bzw. ca. 300 ng cDNA wurden zusammen mit 2,5 µl Hexanukleotiden in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gebracht. Zum Reaktionsansatz wurden je 8,5 µl Reaktionsmix (Puffer:dTTP:dCTP:dGTP = 5:4:4:4), 50 µCi [α -³²P]-dATP und 1,5 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen gereinigt und die radioaktiv markierte DNA in einem Volumen von 500 µl eluiert.

2.8.4 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%-igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die

Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-200 Volt innerhalb von 1-2 Stunden. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

2.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

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

2.8.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (Chung and Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.8.6.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation von *E. coli*-Bakterien wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1000 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.8.6.3 Dauerkultur von *E. coli*-Bakterien

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

2.8.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

2.8.7.1 PCR-Amplifikation von DNA

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, einen DNA-Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligonukleotide wird der zwischen den Oligomeren liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis et al., 1986). Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA, 1-10 ng
 1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol/µl
 1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol/µl
 2,5 µl 10x PCR Puffer II mit 20 mM MgCl₂
 2 µl dNTP-Mix, 2,5 mM je dNTP
 0,5 µl Pfu DNA Polymerase (2,5 U/µl)
 17 µl ddH₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen ddH₂O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in einem Thermocycler „Progene“ der Firma Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

Erste Denaturierung:	3 min	94°C
Amplifikation 20-30 Zyklen:	1 min	94°C (Denaturierung)
	1 min	T _m -5°C (Hybridisierung)
	1,5 min/kb	72°C (Synthese)
Letzte Synthese:	5 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mittels Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden, wie unter 2.8.7.2 beschrieben, aufgereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.8.7.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.8.8 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNase-freier, Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation wurden ständig Handschuhe zum Schutz vor RNAsen der Haut getragen und häufig gewechselt.

2.8.8.1 Präparation von Total-RNA

Die Präparation von Total-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des „Roti-Quick-Kits“ für die RNA-Isolation nach Herstellerprotokoll. Hierzu wurden stets subkonfluente Zellen verwendet. Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese (s. 2.8.8.3) und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.8.8.2 Präparation von Poly(A⁺)-RNA aus Total-RNA

Durch spezifische Bindung der polyadenylierten 3'-Bereiche von mRNA an eine Affinitätssäule aus kovalent gekoppelten Oligo(dT)-Resten, kann eine Anreicherung der Transkripte aus Total-RNA ermöglicht werden, wobei nicht gebundene rRNA bzw. tRNA von der Säule gewaschen werden. Die gebundene mRNA kann anschließend wieder eluiert werden. 1g Oligo(dT)-Zellulose (Stratagene) wurde mit 10 ml Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS; in DEPC-H₂O) 2-3 h bei RT gequollen. Jeweils 500 µg der Suspension wurden in eine silanisierte, mit Glaswolle abgedichtete und autoklavierte Pasteurpipette gefüllt, mit 3 ml Elutionspuffer und anschließend mit 5 ml 1x Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5% SDS; in DEPC-H₂O) gewaschen. Die Total-RNA wurde 5 min bei 65°C inkubiert und mit dem gleichen Volumen, auf 65°C vorgewärmten, 2x Bindungspuffer versetzt. Der Ansatz wurde auf die Säule geladen und nach 2-3 min Exposition der Durchlauf ermöglicht. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml 1x Bindungspuffer wurde die Poly(A⁺)-RNA einmal mit 500 µl und zweimal mit je 400 µl Elutionspuffer eluiert. Die drei Fraktionen wurden mit je 1ml Ethanol absolut sowie 50 µl 5 M NaCl versetzt und die mRNA auf Trockeneis für 30 min präzipitiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (4°C, 13000 rpm, 30 min), mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Präzipitate der drei Fraktionen wurden in einem adäquaten Volumen ddH₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der mRNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft. Die Ausbeute der mRNA, die sich in den ersten beiden Fraktionen befand, betrug in der Regel 2-4% der eingesetzten Total-RNA.

2.8.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosekammern (Lehrach et al., 1977). 1,2 g Agarose wurden in 77 ml H₂O aufgeköcht und 10 min bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in 10 ml 10x MOPS und 13 ml Formaldehyd (37% v/v) aufgefüllt und das Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 3 µg Poly(A⁺)-RNA wurde mit 2,5 µl 10x MOPS, 4,4 µl Formaldehyd (37% v/v) und 12,5 µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H₂O auf 25 µl gebracht. Die Proben wurden 15 min bei 55°C erhitzt, anschließend mit 10 µl RNA-Auftragspuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm² Gelfläche wurden 6 V Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in 100 ml Laufpuffer mit 5 µl Ethidiumbromid gefärbt (10 mg/ml) und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 60 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (I = 302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

2.8.8.4 Northern-Analyse

Für eine Northern-Analyse muss die in einem denaturierenden Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennte mRNA auf einen Nitrozellulosefilter transferiert werden. Die im Formaldehyd/Agarosegel denaturierte, einzelsträngige RNA bindet an den Filter und wird durch Backen des Filters permanent an diesem fixiert.

2.8.8.5 Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran

Der Transfer der RNA auf Nitrozellulosemembran erfolgte durch Kapillarkräfte (Thomas, 1983). Das RNA-Agarosegel wurde auf die minimal notwendige Größe zurechtgeschnitten und 30 Min. in 20x SSC äquilibriert. Auf eine gesockelte Glasplatte, die sich in einer mit 20x SSC gefüllten Glaswanne befand, wurden drei Lagen in 20x SSC getränktes und zurechtgeschnittenes 3 MM Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt, so dass sie über den Rand der Glasplatte in den Puffer hingen. Darauf wurden zwei weitere, ebenfalls mit 20x SSC getränkte, in Gelgröße geschnittene, 3 MM Whatmanpapiere gelegt. Das Agarosegel wurde auf das oberste Whatmanpapier gebracht und luftblasenfrei mit einer in 2x SSC angefeuchteten Nitrozellulose gleicher Größe bedeckt. Anschließend wurden drei weitere Lagen, in 2x SSC getränktes, sowie etwa 20 Lagen trockenes 3 MM Whatmanpapier aufgelegt. Der Transfer der RNA auf die Nitrozellulose erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose vom Agarosegel abgezogen und 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Danach wurde die Lage der einzelnen Geltaschen sowie die Position der 28S und 18S RNA unter UV-Licht markiert.

2.8.8.6 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA

Die gebackenen Nitrocellulosefilter wurden für mindestens 4h bei 42°C in einer Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1% SDS) inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit gescherter Heringssperma-DNA (20 µg/ml Hybridisierungslösung) für 10 min bei 100°C denaturiert und zur Prähybridisierungslösung

gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 42°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie zweimal ca. 20 min in 2x SSC mit 0,1% SDS gewaschen und weitere 15 min in 0,2x SSC mit 0,1% SDS bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Exposition der Filter auf einer Phosphorimagerplatte und anschließend auf Röntgenfilm bei -80°C in einer Kassette mit Verstärkerfolie.

2.9 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.9.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Coulter Counter (Coulter Electronics, Krefeld).

2.9.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen beeinflussen die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führen hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit 20% Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen untersucht.

2.9.3 Transfektion von Zellen

2.9.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird die DNA mit CaCl₂ und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von der Zelle aufgenommen (Graham and van der Eb, 1973). Die DNA liegt als

Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei Zellteilung verloren (Scangos and Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale in 8 ml Medium ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 µg DNA in 260 µl H₂O verdünnt und mit 40 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung gemischt. Unter Schütteln wurden 400 µl 2x BBS zugetropft. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese über Nacht bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und gegebenenfalls mit serumfreiem Medium bis zur weiteren Verwendung gehungert.

2.9.3.2 Transfektion mit anderen Methoden

Zellen, bei denen eine Kalziumphosphat-Transfektion ineffizient war, wurden mit kommerziellen Transfektionsreagenzien behandelt. Die Transfektion mittels Lipofectamin™ (Invitrogen), Lipofectamin 2000™ (Invitrogen) bzw. PolyFect® (Qiagen) erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.9.4 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen

Zur Infektion mit pRETRO-SUPER bzw. pLXSN Konstrukten wurde die Verpackungszelllinie Phoenix A (ΦNX-Ampho) mittels Kalziumphosphatmethode (s. 2.9.2.1) mit pRETRO-SUPER bzw. pLXSN Konstrukten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit minimalem Volumen an Nährmedium versetzt. Nach weiteren 24 h wurde der virale Überstand gesammelt und durch einen 45 µm Filter steriltfiltriert. Der Überstand wurde dann mit 8 µg/µl Polybren versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gebracht. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde dieser Vorgang wiederholt. Nach erfolgter 4. Infektion wurde der letzte Überstand über Nacht auf den Zellen belassen. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und 8-12 h später 2 µg/ml Puromycin zur Selektion der infizierten Zellen zugegeben. Nach erfolgreicher Selektion standen stabil exprimierende Zellen für die entsprechenden Experimente zur Verfügung.

2.10 Proteinanalytische Methoden

2.10.1 Expression und Aufreinigung von Syk-GST-Fusionsproteinen

E. coli DH5αF' wurden mit pGEX-5X1-3/Syk bzw. pGEX-5X1-3/SH2(N)-SH2(C) Konstrukten transformiert. Eine Kolonie wurde in 100 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen 1:50 mit frischem LB-Medium verdünnt und die Proteinsynthese mit 0,2 µM IPTG bei einer Absorption von A₆₀₀=0.4-0.5 induziert. Nach 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm (GS-3)

geerntet und das Pellet in 18 ml eiskaltem PBS mit 0.5 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 0,5 % Aprotinin, 1mM PMSF und 0.5 mM DDT resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall lysiert und mit 1% Triton X-100 versetzt. Durch Zentrifugation bei 20000 rpm (SS-34) wurde unlösliches Material entfernt und der Überstand mit Glutathion Sepharose™ 4B über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit PBS wurden diese in eine Chromatographiesäule (BioRad, München) überführt und die Fusionsproteine mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) bei RT eluiert.

2.10.2 Triton X-100 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) versetzt, zu dem zusätzlich frisch 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM NaOrthovanadat (pH 10) gegeben wurde. Nach 5-10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und unlösliche Zellbestandteile mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde dann zur Immunopräzipitation verwendet oder als Totallysat analysiert.

2.10.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce, Sankt Augustin, nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.10.4 Immunopräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines spezifischen Proteins aus dem Zelllysaten wurden Immunopräzipitationen durchgeführt, bei denen das Protein mittels spezifischer Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt wird und so von Zelllysate abgetrennt werden kann (Chenais et al., 1977). Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag.

Zur Immunopräzipitation wurden 25 µl Protein A-Sepharose und eine angemessene Menge des spezifischen Antikörpers zu dem mit dem gleichem Volumen HNTG-Puffer versetzten Zelllysate gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden bei 6500 rpm (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit HNTG-Puffer wurden die Proben in 15 µl 3xLämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100 °C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen und die Proteine zu denaturieren.

2.10.5 GST-Pulldown-Assay

Durch die Bindung des GST-Teils von GST-Fusionsproteinen an Glutathion Sepharose lassen sich die Fusionsproteine zusammen mit assoziierten Bindungspartnern aus dem Zelllysat fällen.

Die Zellen wurden dazu 20 min mit 100 μ M Pervanadat stimuliert und mit Nonidet P-40-Puffer lysiert (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid). Zur irreversiblen Inhibition zellulärer Tyrosinphosphatasen wurde dem Lysepuffer außerdem 5 mM Iodessigsäure zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mM zum Lysat zugegeben, um noch freie Iodessigsäure zu inaktivieren. Unlösliches Material wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) und 4°C entfernt. Das Zelllysat wurde dann mit 100 μ g GST-Fusionsprotein und 30 μ l Glutathion Sepharose versetzt und 2 h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Nonidet P-40-Puffer wurden die Proben in 15 μ l 3xLämmli-puffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel 3 min bei 100°C gekocht.

2.10.6 Zellfraktionierung

Zur getrennten Analyse einzelner Zellkompartimente wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit einer entsprechenden Menge an hypotonischem Puffer (1 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCL, 0.5 mM Dithiothreitol) versetzt und abgeschabt. Zusätzlich wurden 10 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM Natriumorthovanadat pH 10 frisch zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem Homogenisator (Bellco, USA) mechanisch aufgeschlossen und das Lysat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden unlösliche Bestandteile wie Zytoskelett und nicht aufgeschlossene Zellen durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zum Sedimentieren der Zellkerne erneut bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde nun eine Ultrazentrifugation für 30 min bei 4°C und 100000 g durchgeführt, wodurch die Membranbestandteile pelletiert und somit von der zytoplasmatischen Fraktion abgetrennt wurden. Der Überstand (Zytosol) wurde abgenommen und zur weiteren Analyse verwendet. Die Membranfraktion wurde dann mit hypotonischem Puffer gewaschen und anschließend in einem adäquaten Volumen Triton X-100 Lysepuffer, dem Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt wurden, solubilisiert und zur weiteren Analyse verwendet.

2.10.7 Zellkernpräparation

MCF-10A Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS von der Kulturplatte geschabt und durch Zentrifugation bei 500 g gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf 4°C in hypotonischem Puffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40) lysiert und die erfolgreiche Trennung der Kerne vom Zytoplasma mittels Mikroskop kontrolliert. Die Zellkerne sedimentierten durch Zentrifugation bei 500 g und wurden, nach zweimaligem Waschen in hypotonischem

Lysepuffer, in Lämmli-Puffer gelöst und aufgeköcht. Die erhaltenen Zellkernextrakte wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

2.10.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Laufgeschwindigkeit im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15 %-ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%-iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook et al. (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert.

2.10.9 Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5-60 min gefärbt und anschließend mit 40% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt und fixiert. Anschließend wurden die Gele auf 3MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.10.10 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer „Semidry“-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt und blockiert.

2.10.11 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der spezifischen Erkennung des immobilisierten Proteins durch den spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt wird dieser primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper erkannt, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Aufgrund dieser enzymatischen Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion

erfolgte mit dem ECL-Kit der Firma NEN. Sollte die Membran ein zweites Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Strip-Lösung bei 50 °C für 1 h entfernt werden.

2.11 Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen

2.11.1 Stimulation von Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 20-24 h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Lyse wurden die Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Inhibitoren oder anderen Substanzen zu den angegebenen Inkubationszeiten stimuliert und anschließend lysiert.

2.11.2 Autokinaseassay zur Bestimmung der Kinaseaktivität von Syk

Die Aktivität von Kinasen kann anhand ihres Potentials zur Phosphorylierung von Substraten bestimmt werden. Syk besitzt autokatalytische Aktivität, weshalb alle Kinaseassays ohne die Zugabe von Substrat erfolgten (Yang et al., 1994). Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurde Syk aus Triton X-100 Zelllysaten immunopräzipitiert (s. 2.10.4), anschließend mehrmals mit HNTG-Puffer gewaschen und in Kinase-Puffer (50 mM Hepes pH 7,6, 10 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 100 µM NaVO₃) äquilibriert. Zur Kinasereaktion wurden die Proben mit Kinase-Puffer, 2 µM ATP und 5 µCi [γ -³²P]-dATP (6000mCi/mmol) versetzt und 10 min bei 30°C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl eiskaltem 3xLämmli-puffer gestoppt. Die Aktivität wurde nach der Exposition der Membran auf einer Phosphoimagerplatte bzw. auf einem Röntgenfilm quantifiziert.

2.11.3 Assays zum Nachweis von Chemotaxis

2.11.3.1 Migrationsassay

Zum Nachweis von Migration (Chemotaxis) wurden 24-Loch-*Transwell*-Kulturgefäße mit poröser Polykarbonatmembran (8-µm Porengröße) der Firma Nunc verwendet. In die unbeschichtete obere Kammer (Einsatz) wurden 1×10^5 Zellen in serumfreiem Medium ausgesät. Während in der unteren Kammer (24-Loch) normales Kulturmedium als chemischer Lockstoff diente. Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen wurden die Einsätze entfernt und nichtmigrierte Zellen von der Oberseite der Membran mittels Wattestäbchen entfernt. Die Membran wurde anschließend für 10 min in 100 % Methanol fixiert und die migrierten Zellen

für 20 min in 20% Methanol mit 0.5 % Kristallviolett gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit H₂O wurde das gebundene Kristallviolett aus den Zellen mit 10 %iger Essigsäure gelöst und anschließend bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt.

2.11.3.2 Tumorzellinvasionsassay

Zum Nachweis von Tumorzellinvasion wurden 24-Loch-Transwell-Kulturgefäße mit poröser Polykarbonatmembran (8-µm Porengröße) mit je 100 µl MatrigelTM Basement Membrane Matrix (5 mg/ml) der Firma BD Bioscience beschichtet. Anschließend wurde wie zum Nachweis von Migration (s. 2.11.3.1) verfahren.

2.11.4 Propidiumjodidfärbung zur Bestimmung von apoptotischen Zellen

Als schnelles Verfahren zur Bestimmung von Zelltod ist die Färbung mit Propidiumjodid anzusehen. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung, wodurch der DNA-Gehalt im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen abnimmt. Apoptotische Zellen besitzen deshalb einen DNA-Gehalt, der geringer ist als der von Zellen in der G₀/G₁-Phase. Nach Fixierung von Zellen und vollständiger Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Propidiumjodid, einer sequenzunspezifisch DNA-interkalierenden Substanz, ist die Fluoreszenz dieser Zellen abhängig von deren DNA-Gehalt. Bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 529 nm emittiert Propidiumjodid rotes Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm. Apoptotische Zellen zeigen im Durchflusszytometer deshalb weniger Fluoreszenz als Zellen in G₀/G₁, es erscheint ein sogenannter Sub-G₀/G₁-Wert. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurden je 2,5 x 10⁴ Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und mit 200 µM H₂O₂, 1 µM Doxorubicin bzw. ohne Serum für 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit hypotonischem Färbereagenz (0,1% (w/v) NaCitrat; 0,1% (v/v) Triton-X-100; 50 µg/ml Propidiumjodid) versetzt und für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Analyse des DNA Gehalts erfolgte mittels Durchflusszytometer (FACScalibur) der Firma Becton Dickinson.

2.11.5 Kolorimetrische Bestimmung lebender Zellen mittels WST-1 Reagenz

Mittels WST-1 Reagenz der Firma Roche können sowohl Zellproliferation als auch Zellvitalität kolorimetrisch bestimmt werden. Der Assay basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen von lebenden Zellen. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde nach Herstellerangaben verfahren.

3 Ergebnisse

Proteintyrosinkinassen (PTKs) sind fein regulierte Enzyme und von grundlegender Bedeutung für viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellmetabolismus, Migration und Überleben der Zelle. Genetische Veränderungen, die zur Deregulation der Kinaseaktivität führen, sind häufige Auslöser für zelluläre Transformation und Krebsentstehung. Dabei stellt HER2, ein Rezeptor aus der EGFR-Familie, das wohl prominenteste Beispiel einer Tyrosinkinase dar, die in 25-30% aller Brusttumore durch Überexpression deren Wachstum begünstigt (Slamon et al., 1989). Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Hinweise darauf vor, dass Syk, eine Tyrosinkinase aus der Familie der Syk/ZAP-70 PTKn, möglicherweise ebenfalls die Brustkrebsentstehung beeinflusst. Syk, das bis zu diesem Zeitpunkt nur aus der Signalvermittlung hämatopoetischer Zellen bekannt war und in Leukämien onkogenes Potential besitzt (Kuno et al., 2001), scheint sich überraschenderweise tumorsuppressiv auf die Tumorprogression und Invasion von Brustkrebszellen auszuwirken (Coopman et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von Syk als potentieller Wachstumsmodulator und Tumorsuppressor in Brustepithelzellen näher charakterisiert werden.

3.1 Verbreitung und Vorkommen der Proteintyrosinkinase Syk in Zellen epithelialen Ursprungs

Zu Beginn dieser Arbeit war die Expression von Syk außerhalb des hämatopoetischen Systems noch unzureichend geklärt. Flück et al. wiesen Syk Transkripte in Brustgeweben der Maus mittels Northernblotanalyse nach (Fluck et al., 1995). In 3T3-L1 Mausfibroblasten wurde für Syk eine Funktion in der Differenzierung beschrieben (Wang and Malbon, 1999). Syk Transkripte wurden zudem in humanen Hepatozyten und im Gehirn der Maus nachgewiesen (Tsuchida et al., 2000; Tsujimura et al., 2001). Auf Grund des unterschiedlichen Gewebeerstammes wurde eine weit verbreitete Expression von Syk außerhalb lymphoider Organe angenommen. Um genauere Informationen über die Verbreitung von Syk sowie dessen Expressionsniveau in anderen Geweben und damit Aufschluss über eine mögliche

Rolle von Syk in Zellen epithelialen Ursprungs zu erhalten, sollte die Expression der PTK Syk auf mRNA- und Proteinebene in diversen Tumorzelllinien und nichttransformierten Zellen untersucht werden.

3.1.1 Expression von Syk in verschiedenen Zelllinien

3.1.1.1 Untersuchung der Expression von Syk auf mRNA Ebene

Zur Untersuchung der Expression und einer eventuellen Bedeutung der Tyrosinkinase Syk außerhalb hämatopoetischer Zellen wurde zunächst auf bereits vorhandene Expressionsdaten aus cDNA Filteranalysen von Brustkrebszelllinien zurückgegriffen (P. Knyazev, diese AG). Das relative Expressionsniveau von Syk wurde als Verhältnis zum „Haushaltsgen“ β -Actin ermittelt. Als Kontrollen für die Expression von Syk dienten cDNA Filteranalysen von Blutzellen. Dabei zeigte sich, dass Syk-Transkripte hauptsächlich in den normalen und schwach tumorigenen Brustzelllinien vorhanden waren. Im Gegensatz dazu war in den invasiven Brustzelllinien keine bzw. nur eine geringe Syk Expression nachweisbar (Abb. 8). Verglichen mit den Expressionswerten von Syk aus hämatopoetischen Zellen, wurde Syk in Brustepithelzelllinien schwächer exprimiert.

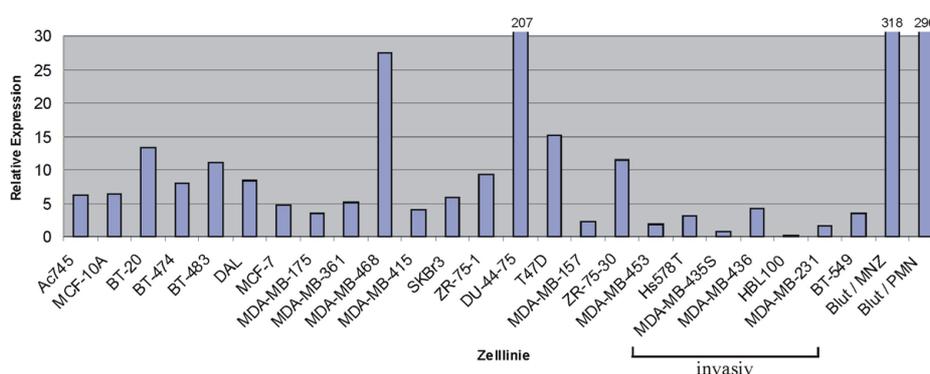


Abb. 8: cDNA Filteranalyse der Genexpression von Syk in verschiedenen Brustzelllinien. cDNA Filter wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus cDNA der entsprechenden Zelllinien hybridisiert. Die Werte der Syk Expression wurden nach Subtraktion des Hintergrunds (pBluescript) gegen die Gesamtintensität aller Signale normalisiert (Array -Vision 5.1). Ebenso wurde mit den Werten des „Haushaltsgens“ β -Actin verfahren. Die relative Expression ist als Verhältnis der Syk/ β -Actin-Expression wiedergegeben. 0-3, keine Expression; 5-10, geringe Expression; 10-50, moderate Expression; 50-500, hohe Expression. Zur Kontrolle diente cDNA aus Lymphozyten (Blut/MNZ) und Granulozyten (Blut/PMN).

Der Nachweis der Syk Transkripte in nichthämatopoetischen Zellen sollte mittels Northernblotanalyse bestätigt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob verschiedene Syk Transkripte durch alternative Spleißprozesse erzeugt werden. Dazu wurde Poly(A⁺)-RNA aus verschiedenen nichttransformierten Zelllinien und Tumorzelllinien zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Syk spezifischen cDNA Probe eingesetzt (T. Knyazev, diese AG). Poly(A⁺)-RNA aus NIH3T3 Zellen, welche humanes Syk exprimierten, diente zur Kontrolle auf spezifische Hybridisierung der radioaktiv markierten Syk-cDNA Probe. Durch die Expression von humanem Syk mit viralen Genen des pLXSN Expressionskonstrukts wurde ein Transkript mit einer Größe von ~ 5 kb erzeugt (Abb. 9, 2. Spur von links). Die Hybridisierung des Blots mittels radioaktiv markierter β -Actin cDNA Probe bestätigte die Integrität der eingesetzten Poly(A⁺)-RNA (Cleveland et al., 1980). Wie die Abbildung 9 zeigt, konnten Syk Transkripte in allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme der Glioblastomazelllinien U-373 und U-138 nachgewiesen werden. Die Transkripte entsprachen mit einer Größe von ~ 5,4 kb und ~ 3,5 kb den veröffentlichten Größen der Syk Transkripte, die bereits in der Maus nachgewiesen werden konnten. Die beiden Transkripte resultierten aus unterschiedlichen Längen der 3'UTR (Fluck et al., 1995).

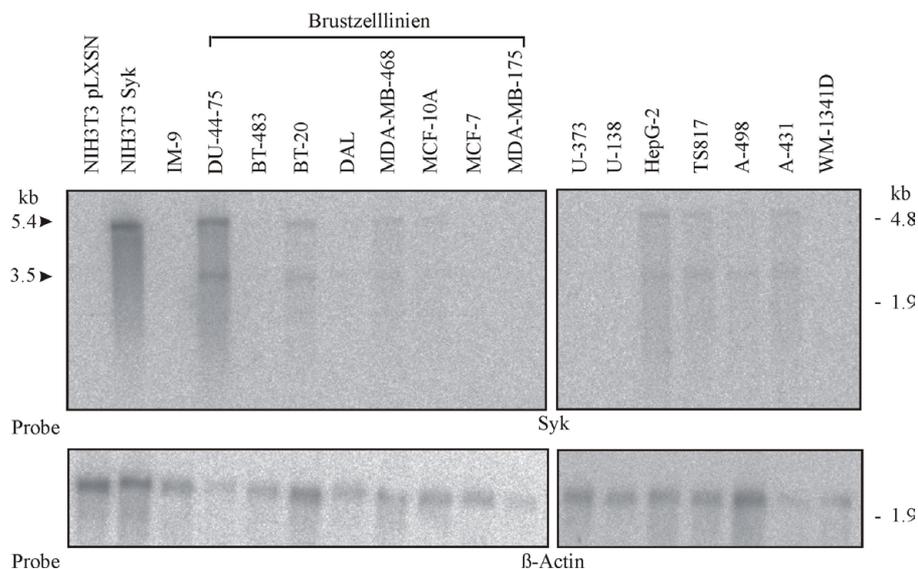


Abb. 9: Die Expression von Syk in verschiedenen humanen Zelllinien und Tumorzelllinien im Northernblot. Je Zelllinie wurden 2,5 μ g Poly(A⁺)-RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Syk Transkripte mittels radioaktiv markierter Syk cDNA Probe im Northernblot nachgewiesen. Die Hybridisierung des Blots mittels radioaktiv markierter β -Actin cDNA Probe zeigte die Integrität der Poly(A⁺)-RNA. Als Kontrolle diente Poly(A⁺)-RNA aus NIH3T3 Zellen, die humanes Syk exogen exprimierten (NIH3T3 Syk).

3.1.1.2 Untersuchung der Expression von Syk auf Proteinebene

Die Präsenz eines Proteins in der Zelle wird zum einen durch die Stabilität seiner mRNA und der damit verbundenen Translationseffizienz und zum anderen durch die Stabilität des Proteins selbst reguliert. Somit muss das Expressionsniveau von Syk auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Zellen nicht die tatsächlich vorhandene Proteinmenge widerspiegeln. Ferner kann die Proteinsynthese durch Mutationen beeinträchtigt werden. Desweiteren sagen die Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Filtern und Northernblotanalyse nichts darüber aus, ob das Protein in verschiedenen Isoformen vorliegt. Daher wurde die Expression von Syk in einer Reihe von Brustkrebszelllinien normalen und transformierten Ursprungs auf Proteinebene analysiert. Hierzu wurde Syk mittels Immunoblot in den verschiedenen Zelllysaten nachgewiesen. Hierbei wurde deutlich, dass die Expression auf Proteinebene nicht zwangsläufig der nachgewiesenen Transkriptmenge entsprach (Abb. 10). Während in den Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Filter nur eine geringe Expression in Brustzelllinien im Vergleich zu Zellen hämatopoetischen Ursprungs nachgewiesen werden konnte, zeigten sich im Immunoblot gut nachweisbare Syk-Level. Dabei konnten die beiden Isoformen Syk und SykB mit einer Größe von 72 bzw. 70 kDa detektiert werden. Die unterschiedliche Größe der Proteine wird durch die Deletion von 23 Aminosäuren in der Interdomäne B von Syk bedingt (Latour et al., 1996). In den untersuchten Zelllinien traten beide Isoformen sowohl in gleichen als auch in unterschiedlichen Anteilen auf. Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der verschiedenen Isoformen und krebsrelevanten Eigenschaften der untersuchten Zelllinien getroffen werden. Die vorangegangenen Daten wurden hinsichtlich der Syk-Expression bestätigt, denn auch auf Proteinebene konnte Syk nur in schwach tumorigenen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, konnte Syk in den invasiven Brustkrebszelllinien (BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-436) nicht detektiert werden. Damit wurden die zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Daten von Coopman und Kollegen bestätigt, die zeigten, dass Syk in normalem humanen Brustgewebe, in gutartigen Brusttumoren und schwach tumorigenen Brustzelllinien exprimiert wird, jedoch in tumorigenem invasivem Brustkrebsgewebe als auch in invasiven Brustkrebszelllinien nicht oder nur schwach detektierbar ist (Coopman et al., 2000). Yuan et al. zeigten später, dass die

Syk Expression in diesen Zellen aufgrund von Hypermethylierung des *syk*-Promotors inhibiert wird (Yuan et al., 2001).

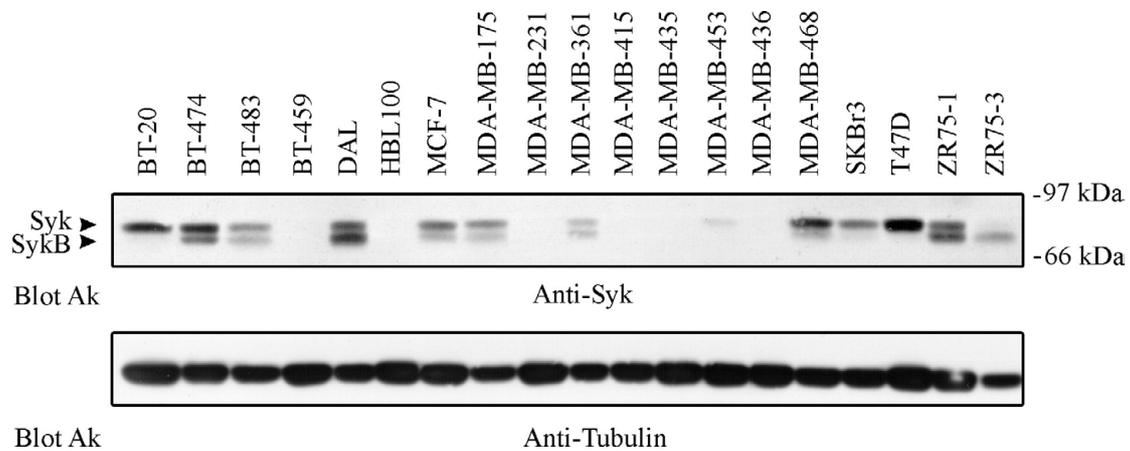


Abb. 10: Expression von Syk in humanen Brustkrebszelllinien. Die Zelllinien wurden unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach der Lyse wurden 50 µg des Totallysates mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse auf Syk Expression untersucht. Vergleichbare Proteinmengen wurden mittels Anti-Tubulin-Immunoblotanalyse bestätigt.

3.1.2 Autokatalytische Aktivität von Syk in humanen Brustepithelzellen

Die PTK Syk besitzt eine typische katalytische Tyrosinkinasedomäne, die zwischen den einzelnen Spezies hoch konserviert vorliegt (Muller et al., 1994; Taniguchi et al., 1991). In hämatopoetischen Zellen wurde gezeigt, dass Syk durch die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosine im Aktivierungsloop der Kinasedomäne aktiviert wird (El-Hillal et al., 1997; Keshvara et al., 1998). Es sollte nun untersucht werden, ob Syk autokatalytische Aktivität in Brustepithelzellen besitzt und in tyrosinphosphoryliertem Zustand vorliegt, der den Grad an Kinaseaktivität von Syk reflektiert. Dazu wurde Syk aus der spontan immortalisierten Zelllinie MCF-10A, die die Eigenschaften normaler Brustepithelzellen besitzt (Soule et al., 1990), immunpräzipitiert und im Kinaseassay hinsichtlich seiner autokatalytischen Eigenschaften untersucht. Wie die Abbildung 11A zeigt, konnte autokatalytische Aktivität von endogenem Syk aus Brustepithelzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Es war bekannt, dass Syk in ruhenden B-Zellen durch regulierte Dephosphorylierung im inaktiven Zustand gehalten wird (Maeda et al., 1999). Aus diesem Grund wurden MCF-10A Zellen im Autokinaseassay untersucht, die mit Pervanadat zur unspezifischen Inhibition von Tyrosinphosphatasen stimuliert wurden. Dabei sollte

die autokatalytische Aktivität von Syk aus Pervanadat stimulierten Zellen den Zustand maximaler Aktivität von Syk in Brustepithelzellen widerspiegeln. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Syk in Brustepithelzellen Kinaseaktivität *in vitro* besitzt, konnte tyrosinphosphoryliertes Syk nur nach Pervanadat Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 11B). Die Ergebnisse bestätigten die Daten von Coopman et al. (Coopman et al., 2000) und deuteten darauf hin, dass Syk in Brustepithelzellen katalytische Aktivität besitzt, die jedoch einer strengen Regulation durch Proteintyrosinphosphatasen (PTP) unterworfen ist.

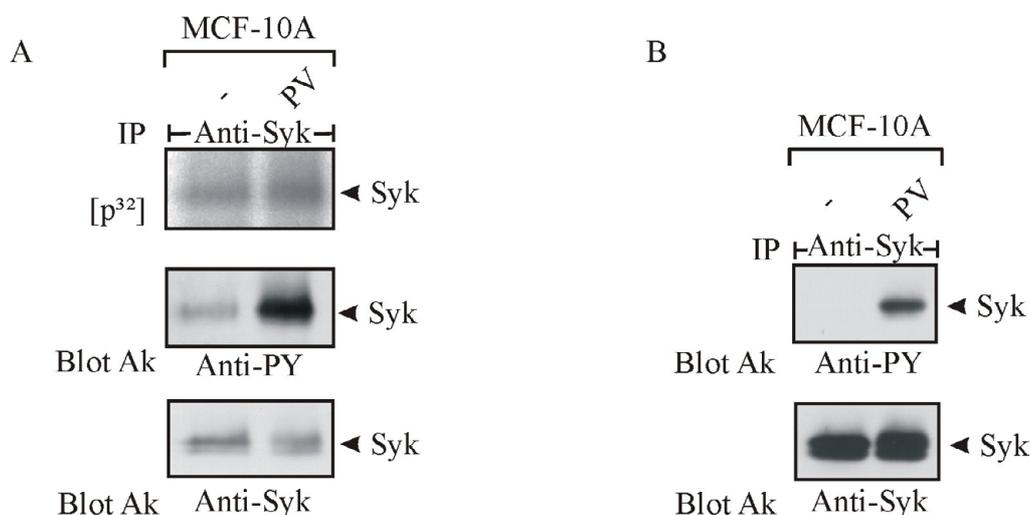


Abb. 11: Autophosphorylierungsaktivität und Tyrosinphosphorylierung von Syk in MCF-10A Zellen. A, Autokinaseaktivität von immunopräzipitiertem Syk aus unstimulierten bzw. Pervanadat (PV) (1mM, 10 min) behandelten MCF-10A Zellen wurde im Kinaseassay und anschließender Autoradiografie [³²P] bzw. in der Anti-Phosphotyrosin-Immunoblotanalyse (PY) nachgewiesen. Vergleichbare Mengen an immunopräzipitiertem Syk wurden im Anti-Syk Westernblot bestätigt. B, Tyrosinphosphorylierung von immunopräzipitiertem Syk aus unstimulierten bzw. Pervanadat (PV) (1mM, 10 min) behandelten MCF-10A Zellen wurde im Anti-Phosphotyrosin-Immunoblot (PY) und gleiche Mengen an immunopräzipitiertem Syk im Anti-Syk Westernblot nachgewiesen.

3.1.3 Nachweis von Syk(L) in Zellkernextrakten

Um noch mehr Aufschluss über Verbreitung und Vorkommen von Syk in Zellen epithelialen Ursprungs zu erhalten, sollte im Folgenden anhand von subzellulärer Fraktionierung überprüft werden, ob Syk in nukleären Fraktionen nachweisbar ist. Ma und Kollegen konnten bereits exogenes GFP-markiertes Syk im Zellkern von B-Zellen lokalisieren (Ma et al., 2001). Zum Nachweis von Syk wurden die Zellkerne aus MCF-10A Brustepithelzellen präpariert und im Westernblot analysiert. Der

Nachweis von RanGAP1 diente der qualitativen Kontrolle auf nukleäre Fraktionen, da RanGAP1 im Zellkern nur in SUMOylierter Form vorhanden ist (Pichler et al., 2002). Die Analysen ergaben, dass ausschließlich die lange Isoform von Syk, Syk(L), in den Zellkernextrakten von Brustepithelzellen nachweisbar war (Abb. 12). Die Ergebnisse deuteten auf eine mögliche Funktion von Syk(L) im Zellkern hin, was von Wang und Kollegen bestätigt werden konnte (Wang et al., 2003). Die Daten von Wang und Kollegen zeigten, dass Syk(L) eine Kernlokalisierungssequenz innerhalb der Interdomäne B (IDB) besitzt, die infolge des alternativen Spleißens in SykB zerstört wird. Die nukleäre Lokalisation von Syk ist dabei für eine signifikante Inhibition der Tumorzellinvasion hinreichend. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von nukleärem Syk im Hinblick auf potentielle Gen-regulatorische Eigenschaften nicht näher analysiert.

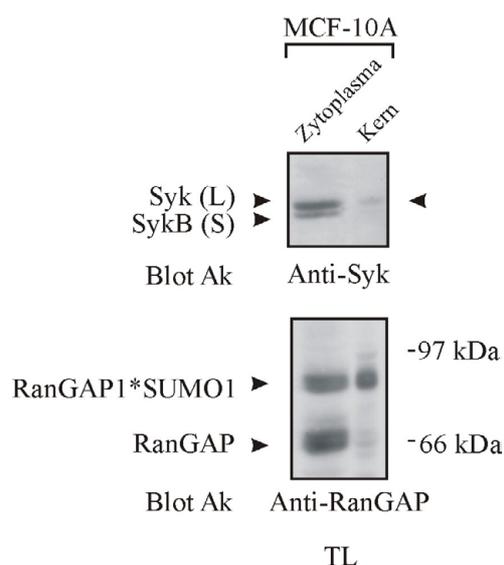


Abb. 12: Nachweis von Syk(L) in Zellkernextrakten von MCF-10A Zellen. Zellkernextrakte von MCF-10A Zellen wurden präpariert und gleiche Anteile von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse auf Syk Expression untersucht. Als Kontrolle diente der Nachweis von RanGAP1, welches im Kern nur in der SUMOylierten Form vorhanden ist (Pichler et al., 2002).

3.1.4 Nachweis von Syk im normalen und tumorigenen Gewebe der Maus

Im Abschnitt 3.1.1.2 konnte gezeigt werden, dass Syk in normalen Brustepithelzelllinien und schwach tumorigenen Brustkrebszelllinien exprimiert wird. Im folgenden Abschnitt sollte nun im Vergleich dazu die Expression von Syk in

normalem Brustdrüsen­gewebe der Maus analysiert werden, um Aufschluss über eine potentielle Rolle von Syk bei der normalen Brustentwicklung zu erhalten. Desweiteren wurde die Protein­expression von Syk in Lunge, Leber, Ovarien und Brusttumoren von transgenen Mäusen untersucht, in denen *c-neu* oder andere Onkogene unter der Kontrolle von Genpromotoren standen, welche die Expression der Onkogene auf das alveolare Brustepithel beschränkten (Baribault et al., 1997; Humphreys and Hennighausen, 2000; Li et al., 2000; Muller et al., 1988; Shackelford et al., 1993). Zu diesem Zweck wurden sowohl normale Brustdrüsen von Mäusen in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft, tumorigenes Brustdrüsen­gewebe sowie normales Leber-, Lungen- und Ovarialgewebe transgener Mäuse entnommen und die Expression von Syk auf Proteinebene untersucht (M. Gensler, diese AG). Syk konnte dabei in allen getesteten Proben detektiert werden, wobei geringere Proteinmengen während der Differenzierung des Brustdrüsen­gewebes auftraten (Abb. 13). Insgesamt konnten weder zwischen verschiedenen getesteten normalen Geweben noch zwischen malignen Geweben signifikante Unterschiede in der Proteinmenge von Syk festgestellt werden.

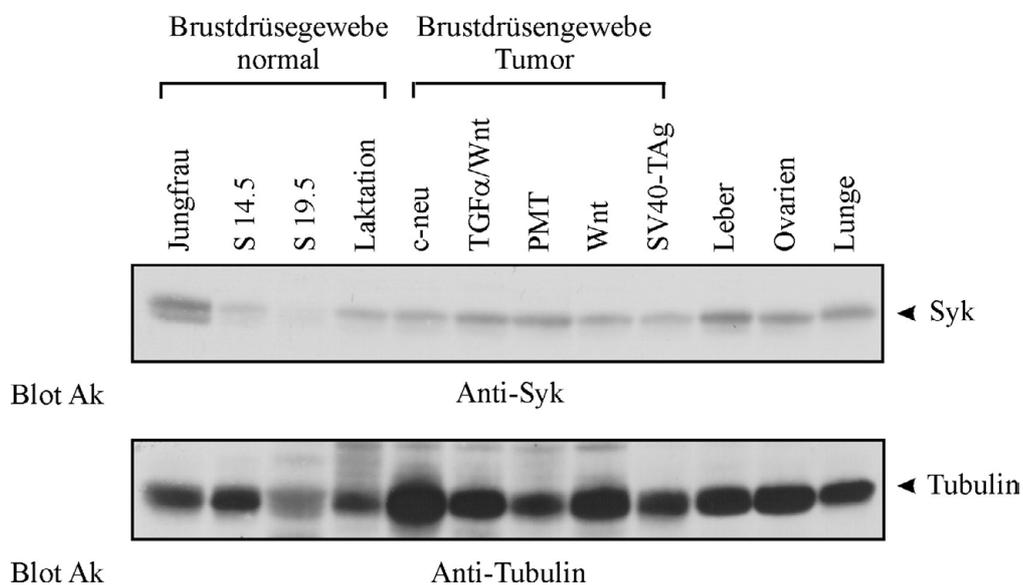


Abb. 13: Expression von Syk in normalen und tumorigenen Geweben von Mäusen. 50 μ g Totallysat von murinem Normalgewebe bzw. Brusttumoren transgener Mäuse, die die angegebenen Onkogene unter der Kontrolle brustspezifischer Promotoren tragen (MMTV-*c-neu*, WAP-TGF α /Wnt, MMTV-PMT, MMTV-Wnt, WAP-SV40-TAg) wurden im Immunoblot mit Anti-Syk-Antikörpern analysiert. Geladene Proteinmengen wurden mittels Anti-Tubulin-Immunoblotanalyse bestätigt.

3.2 Untersuchungen zur Funktion von Syk in humanen Brustzelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Funktion von Syk außerhalb des hämatopoetischen Systems nur wenig bekannt. Coopman und Kollegen vermuteten, dass Syk sowohl eine Rolle als wirksamer Modulator von epithelialem Wachstum als auch als potenzieller Tumorsuppressor in humanen Brustkarzinomen spielen könnte (Coopman et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Funktion von Syk in nichttransformierten humanen Brustepithelzellen näher untersucht werden. In den folgenden Abschnitten wurde dazu überprüft, wie sich die Reduktion der endogenen Syk-Level bzw. die Expression von exogenem Wildtyp Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante auf die Wachstumsfaktor-abhängige Signalvermittlung von MCF-10A Brustepithelzellen auswirken.

3.2.1 Transiente Unterdrückung der Syk Expression in humanen MCF-10A Brustepithelzellen mittels siRNA (*small interference RNA*)

Mit der siRNA-vermittelten, spezifischen Inhibition der Genexpression in somatischen Säugerzellen steht eine neuartige, zur traditionellen reversen Genetik alternative Methode zur Verfügung, die Funktion von Genen zu untersuchen (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Bei der siRNA-Strategie handelt es sich um einen posttranskriptionellen Mechanismus zur Unterdrückung der Genexpression, der zu einer durch eine dsRNA induzierten spezifischen Degradation der sequenzhomologen mRNA eines Gens führt (Fire et al., 1998). Dies resultiert bestenfalls in einer vollständigen Depletion des entsprechenden Proteins. Mit Hilfe dieser Methode sollten im Folgenden näherer Aufschluss über die biologische Funktion von Syk in normalen Brustepithelzellen erhalten werden.

3.2.1.1 Einfluss der Syk Reduktion auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in MCF-10A Zellen

Durch die Transfektion synthetischer siRNA (Syk.1) in humane MCF-10A Brustepithelzellen, die Eigenschaften von normalem Brustepithel aufweisen, konnte die Expression von endogenem Syk spezifisch um nahezu fünfzig Prozent reduziert werden (Abb. 14A und B). MCF-10A Zellen, die mittels synthetischer Luziferase-Gen-spezifischer siRNA transfiziert wurden (GL2), dienten dabei als Kontrolle. Es wurde vermutet, dass bereits die teilweise Depletion der Tyrosinkinase Syk zu einer reduzierten Tyrosinphosphorylierung von Syk-spezifischen Substraten führt. Aus diesem Grund wurde zunächst der Phosphotyrosinstatus von MCF-10A Zellen mit reduziertem Syk-Level analysiert. Dazu wurden MCF-10A Zellen, die nur in Anwesenheit von EGF proliferieren, nach Serumentzug mit EGF stimuliert und der Anteil an tyrosinphosphorylierten Proteinen in Totallysaten bzw. in Anti-EGFR- bzw. Anti-Phosphotyrosin-Immunopräzipitaten bestimmt. Überraschenderweise bewirkte die Reduktion von endogenem Syk nicht die erwartete Abnahme von tyrosinphosphorylierten Proteinen sondern eine Zunahme der EGF-stimulierten Gesamttyrosinphosphorylierung, was anscheinend auf eine Erhöhung der stimulierten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zurückgeführt werden konnte (Abb. 14C und D). Die erhöhte EGFR-Phosphorylierung resultierte wahrscheinlich nicht aus einer Zunahme der Gesamt-EGFR-Level, da die EGFR Anteile in MCF-10A Zellen mit unterdrückter Syk Expression im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen keine Unterschiede aufwiesen. Die offensichtliche Reduktion der EGFR-Level nach EGF Stimulation reflektiert wahrscheinlich die geringere Sensitivität des eingesetzten Immunoblot-Antikörpers gegenüber tyrosinphosphoryliertem EGFR, da das vom Antikörper detektierte Epitop einige phosphorylierbare Tyrosinreste enthält (Yamauchi et al., 1997).

Das Ergebnis deutete auf eine negativ-regulatorische Rolle von Syk bei der EGFR-vermittelten Signaltransduktion hin und sollte im Folgenden näher untersucht werden.

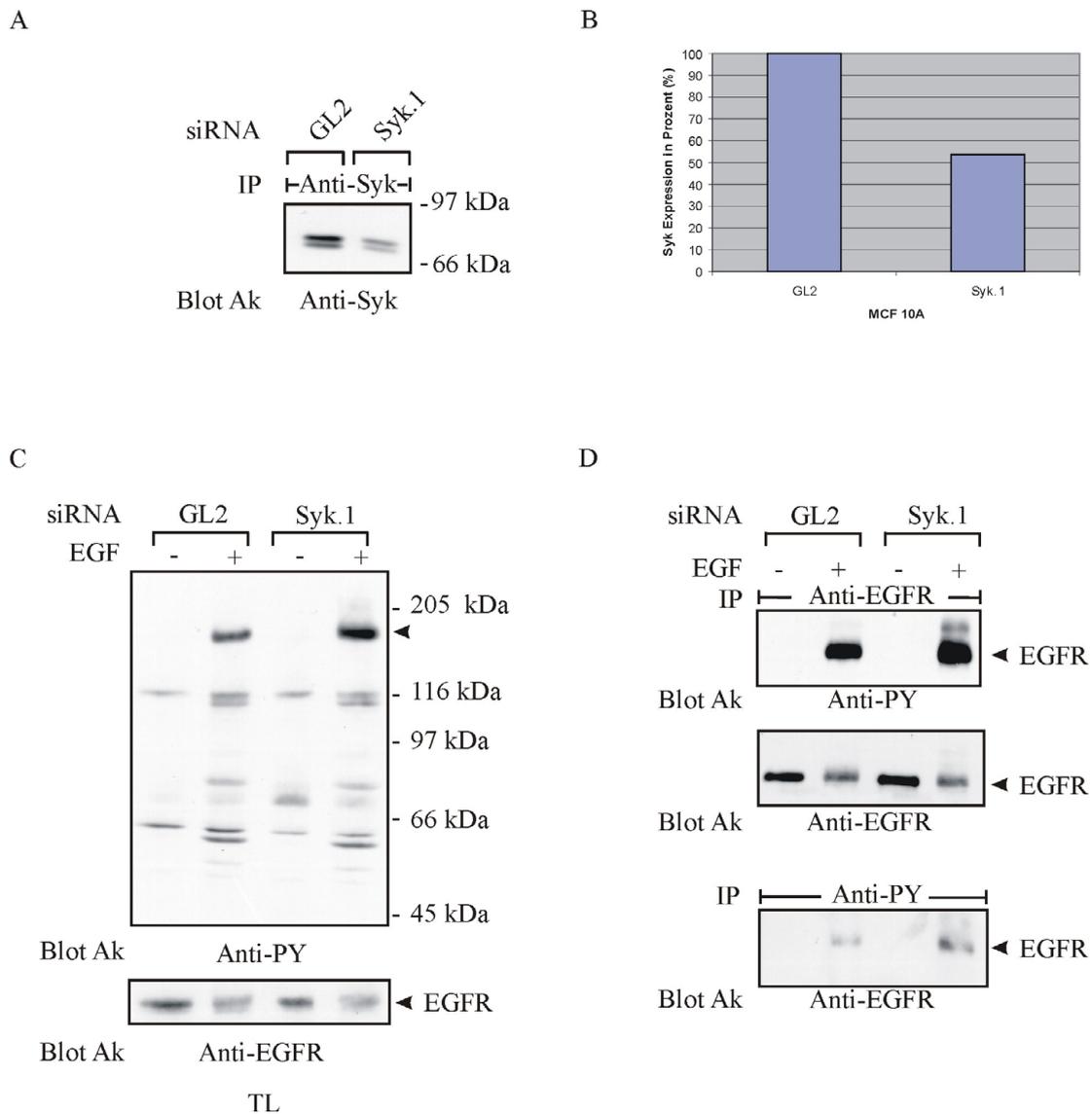


Fig. 14: Einfluss der Syk Reduktion auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in MCF-10A Zellen. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit Syk-spezifischen (Syk.1) bzw. zur Kontrolle mit GL2-Luziferase-spezifischen (GL2) siRNAs transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. **A**, der Syk Gehalt wurde mittels Immunopräzipitation und Anti-Syk Westernblotanalyse nachgewiesen. **B**, die Menge an immunopräzipitiertem Syk aus (A) wurde densitometrisch quantifiziert. **C**, die Zellen wurden mit 20 ng/ml EGF für 5 min stimuliert. Nach der Lyse wurden 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-EGFR-Antikörpern untersucht. **D**, Anti-EGFR- bzw. Anti-Phosphotyrosin (PY)- Immunopräzipitate wurden mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- bzw. Anti-EGFR-Antikörpern analysiert.

3.2.1.2 Einfluss der Reduktion von Syk auf die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von Adaptorproteinen

Aktivierte RTKs rekrutieren und phosphorylieren eine Reihe von Adaptorproteinen und initiieren dadurch Signalkaskaden, die letztlich in spezifischen zellulären Antworten resultieren (Schlessinger, 2000). Aufbauend auf vorangegangene Ergebnisse, die zeigten, dass die Reduktion der Syk Expression eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung und somit der Aktivierung des EGFRs bewirkte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Reduktion von Syk auch die Rezeptorproximale Signalweiterleitung durch den EGFR beeinflusst. Dazu wurde die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung der Adaptorproteine Shc und Gab1 als auch der Ubiquitin-Ligase c-Cbl in MCF-10A Zellen mit unterdrückter Syk Expression überprüft. Zur Analyse wurden MCF-10A Zellen mit Syk-spezifischer synthetischer siRNA (Syk.1) bzw. Kontroll-siRNA (GL2) transfiziert und nach Serumentzug mit EGF stimuliert. Dabei zeigte sich, dass die EGF-abhängige Tyrosinphosphorylierung von c-Cbl und Gab1, ebenfalls erhöht war (Abb. 15). Die Reduktion von endogenem Syk beeinflusste somit nicht nur die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs sondern auch die EGFR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen.

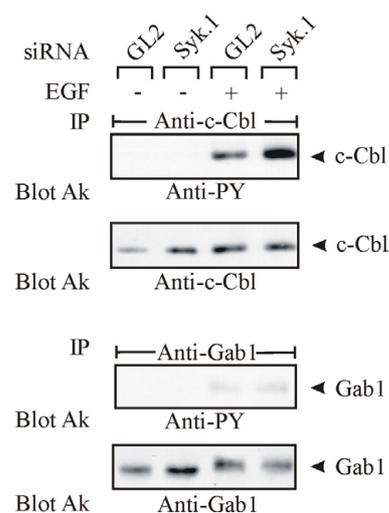


Abb. 15: Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung der Signalproteine c-Cbl und Gab1. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit Syk-spezifischen (Syk.1) bzw. zur Kontrolle mit GL2-Luziferase-spezifischen (GL2) siRNAs transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Die Zellen wurden mit 20 ng/ml EGF für 5 min stimuliert und anschließend lysiert. Anti-c-Cbl- und Anti-Gab1-Immunopräzipitate wurden im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-c-Cbl- oder Anti-Gab1-Antikörpern untersucht.

Im Gegensatz zu c-Cbl und Gab1 konnte für das Adaptorprotein Shc nach EGF-Stimulation von MCF-10A Zellen mit verringerter Syk Expression keine Erhöhung sondern vielmehr eine reduzierte Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Durch die Inkubation der Zellen mit Cycloheximid (CHX), zur Hemmung der Proteinsynthese (Siegel and Sisler, 1963), konnten die endogenen Syk-Level kurzfristig weiter verringert werden. Es sollte überprüft werden, ob die stimulationsabhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc durch die verstärkte Reduktion der Syk-Level nach Cycloheximid Behandlung ebenfalls stärker beeinflusst werden konnte. Dazu wurden MCF-10A Zellen nach der Transfektion von Syk-spezifischer (Syk.1) bzw. Kontroll-siRNA (GL2) und Serumentzug, für 4 Stunden mit CHX behandelt und anschließend mit EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Wie die Abbildung 16 zeigt, war sowohl die EGF- als auch die Pervanadat-stimulierte Phosphorylierung der Shc-Isoformen, p66, p52 und p46, nach Inhibition der endogenen Syk Expression in MCF-10A Zellen reduziert, was durch den Einfluss von CHX noch verstärkt werden konnte. Die Daten deuteten auf einen generellen Einfluss von Syk auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc in Brustepithelzellen hin. Eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc wurde bereits für B-Lymphozyten beschrieben (Nagai et al., 1995). Untersuchungen von Anti-Gab1-Immunpräzipitaten ergaben, dass die erhöhte EGFR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von Gab1 in MCF-10A Zellen mit reduzierter Syk Expression auch nach CHX Behandlung nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

Die Resultate deuteten darauf hin, dass Syk zum einen die stimulationsabhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc zum anderen den Phosphorylierungsstatus des EGFR sowie die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen in Brustepithelzellen reguliert.

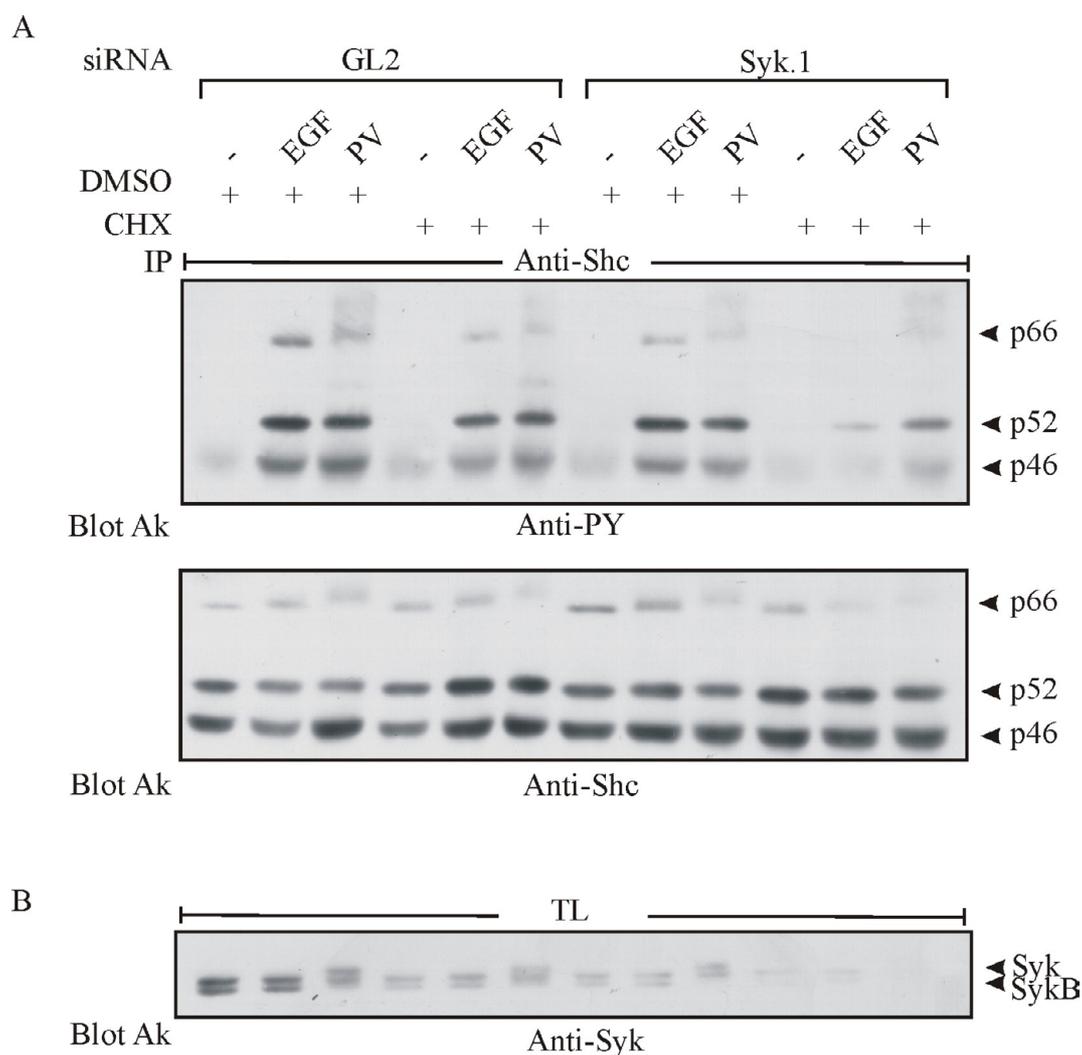


Abb. 16: Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit Syk-spezifischen (Syk.1) bzw. zur Kontrolle mit GL2-Luziferase-spezifischen (GL2) siRNAs transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Vor der Stimulation mit 20 ng/ml EGF für 5 min bzw. 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min wurden die Zellen wie angegeben für 4 h mit 1 µg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert. *A*, nach der Lyse wurden Anti-Shc-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-Shc-Antikörpern untersucht. *B*, 50 µg des Totallysates (TL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Syk-Antikörpern untersucht.

3.2.1.3 Der Einfluss der Reduktion von Syk auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion ist EGFR-Kinase abhängig

Im folgenden Abschnitt sollte der Effekt von Syk auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs bzw. die EGFR-vermittelte Signalgebung näher charakterisiert werden. Die Erhöhung der stimulationsabhängigen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach Syk Reduktion könnte zum einen durch aberrierende EGFR-Kinaseaktivität zum

anderen durch veränderte Level an EGFR Liganden bedingt werden. Die Prozessierung autokriner Liganden könnte in diesen Zellen durch veränderte Metalloproteaseaktivität (Tice et al., 1999), die z.B. während der EGFR-Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) induziert werden kann (Dong et al., 1999), gestört vorliegen. Aus diesem Grund wurden MCF-10A Zellen mit reduzierter Syk Expression mit dem EGFR-selektiven Kinaseinhibitor AG1478 (Levitzki and Gazit, 1995) bzw. mit Batimastat (BB-94), das die Metalloproteaseaktivität blockiert (Prenzel et al., 1999), behandelt und anschließend mit EGF stimuliert. Sowohl ungehungerte als auch unstimulierte MCF-10A Zellen wurden ebenfalls auf die EGF-vermittelte Gesamtphosphorylierung unter Einfluss der Inhibitoren überprüft.

Wie die Abbildung 17 zeigt, konnte die Reduktion endogener Syk Expression nach Inkubation mit dem EGFR-spezifischen Inhibitor AG1478 keine verstärkte EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs bewirken. Im Gegensatz dazu, konnte die Inhibition der Metalloproteaseaktivität die Hyperphosphorylierung des EGFRs infolge der reduzierten Syk Protein Anteile nicht beeinflussen.

Die reduzierte Syk Expression verursachte in den MCF-10A Zellen nicht nur eine verstärkte EGFR-Aktivität sondern auch eine erhöhte Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (Abb. 17, *links*). Wobei die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk trotz der erhöhten EGFR-Aktivierung nur in ungehungenerten Zellen, infolge der Reduktion von Syk, erhöht war. Die gewonnenen Resultate ließen vermuten, dass Syk die EGFR-Kinaseaktivität reguliert und somit die EGF-vermittelte Aktivierung von Signalmolekülen, wie z.B. Akt, beeinflusst.

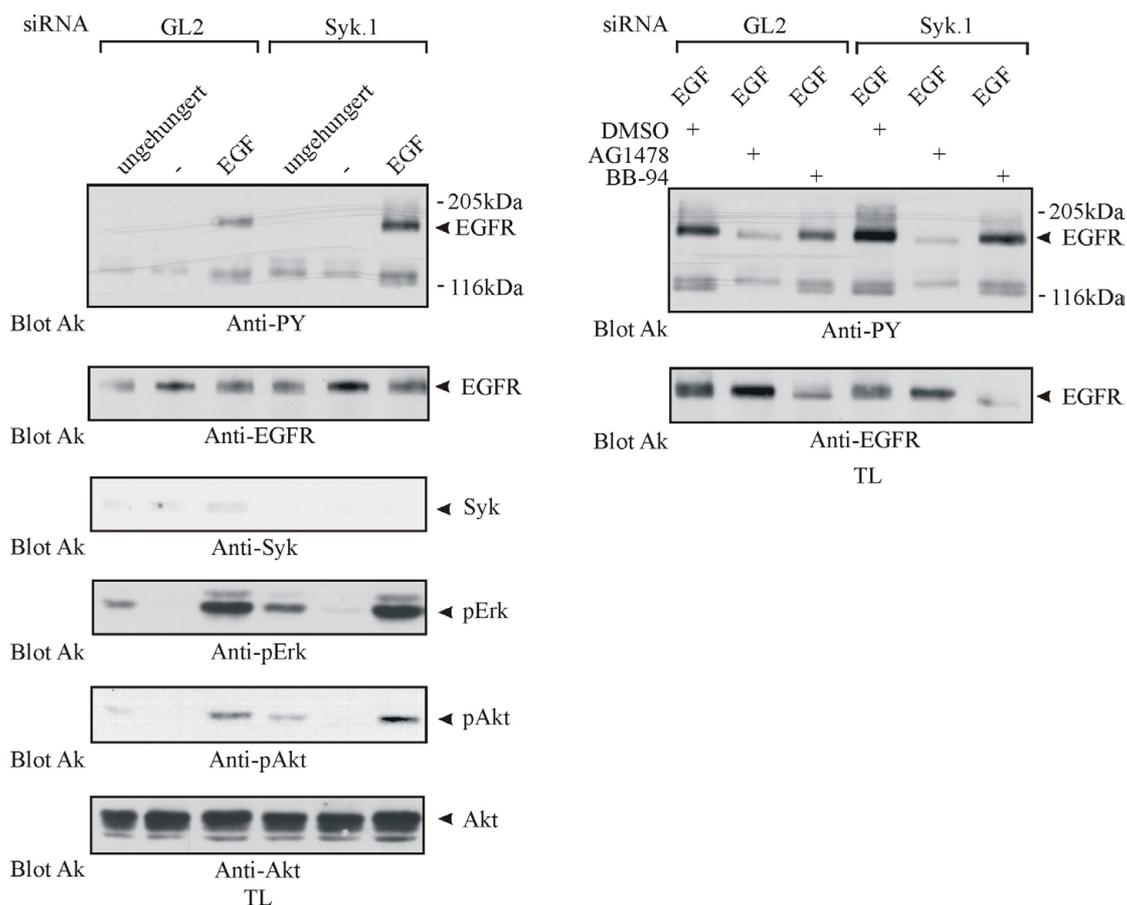


Abb. 17: Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung ist AG1478 sensitiv. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit Syk-spezifischen (Syk.1) bzw. zur Kontrolle mit GL2-Luziferase-spezifischen (GL2) siRNAs transfiziert, für 24 h in serumfreiem Medium gehungert oder unter normalen Bedingungen kultiviert und anschließend mit 20 ng/ml EGF für 5 min stimuliert (*linker Bereich*). Vor der Stimulation mit 20 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit AG1478 (250 nM) bzw. Batimastat (BB-94) (5 μ M) inkubiert (*rechter Bereich*). Nach der Lyse wurden 50 μ g des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR-, Anti-Syk-, Anti-Phospho-Erk (pErk)- und Anti-Phospho-Akt (pAkt)-Antikörpern untersucht. Gleiche Proteinmengen wurden in Anti-Akt-Immunoblotanalysen bestätigt.

3.2.2 Einfluss der stabilen Inhibition der Syk Expression in MCF-10A Zellen

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, konnte die endogene Syk Expression in MCF-10A Zellen mittels synthetischer siRNA spezifisch gehemmt werden, was zu einer erhöhten Aktivierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion führte. Eine deregulierte EGFR-abhängige Signaltransduktion korreliert mit neoplastischer Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz (Arteaga, 2003). Darauf bezogen, sollten MCF-10A Zellen mit stabil reduzierten Syk Anteilen auf Proliferation, Apoptose und Migration hin untersucht werden.

3.2.2.1 Analyse der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung in stabilen pRETRO-SUPER/Syk exprimierenden MCF-10A Zellen

Zunächst sollten MCF-10A Zellen mit stabil unterdrückter Syk Expression generiert werden. Durch die Infektion der humanen Brustepithelzelllinie MCF-10A mit verschiedenen retroviralen Expressionskonstrukten, die Syk-spezifische siRNA exprimierten, konnte die Expression von endogenem Syk spezifisch und stabil reduziert werden (Abb. 18). Unter Verwendung des pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6) Konstrukts konnte die Syk Expression am wirksamsten supprimiert werden (Daten nicht gezeigt), weshalb dieses Konstrukt für alle weiteren Experimente eingesetzt wurde. Nach der Selektion wurden polyklonale MCF-10A Zellen mit stabiler Syk-spezifischer siRNA Expression und die entsprechenden Kontrollzellen (pRS) mit EGF stimuliert und der Gesamtphosphotyrosinlevel untersucht. Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnten in den Totallysaten der MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression sowohl eine erhöhte basale und EGF-abhängige Tyrosinphosphorylierung des EGFRs als auch eine erhöhte Aktivierung der Kinasen Erk bzw. Akt nachgewiesen werden. Das Ergebnis bestätigte vorangegangenen Daten hinsichtlich der für Syk postulierten negativ-regulatorischen Funktion innerhalb der EGFR-vermittelten Signaltransduktion.

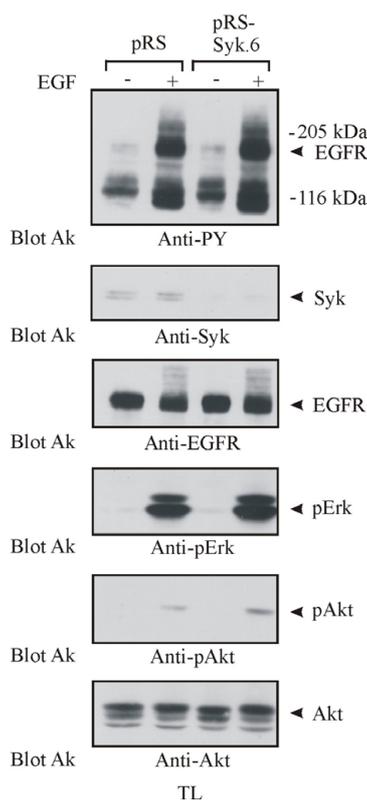


Abb. 18: Einfluss der stabilen Syk Reduktion auf die EGF-stimulierte Phosphorylierung in MCF-10A Zellen. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk (pRS-Syk.6) oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale Puromycin-resistente MCF-10A Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehungert und anschließend mit 20 ng/ml EGF für 5 min stimuliert und lysiert. Die Expression von endogenem Syk wurde mittels Westernblotanalyse des Totallysates (TL) mit Anti-Syk-Antikörpern ermittelt. Zusätzlich wurde der Gesamtposphotyrosin (PY)-, der Phospho-Akt (pAkt)- und Phospho-Erk-Gehalt (pErk) mittels Westernblotanalyse analysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in Anti-EGFR- bzw. Anti-Akt-Immunoblotanalysen bestätigt.

3.2.2.2 Spezifischer Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-vermittelte Signaltransduktion

Die EGFR-Familie besteht aus vier eng verwandten Mitgliedern, dem EGFR (HER1, ErbB1) (Ullrich et al., 1984), HER2 (human EGFR, ErbB2/neu) (Coussens et al., 1985), HER3 (ErbB3) (Kraus et al., 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman et al., 1993). Im Folgenden wurde zunächst untersucht, ob die Signaltransduktion der Rezeptoren der EGFR-Familie generell durch die Syk Reduktion beeinflusst wurde, oder ob sich Syk spezifisch auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs auswirkte. Zu diesem Zweck wurden MCF-10A Zellen mit stabil unterdrückter Syk Expression (pRS-Syk.6) nicht nur mit EGF zur Induktion der EGFR-Homodimer- bzw. EGFR/HER2-Heterodimerbildung sondern auch mit Heregulin- β 1 stimuliert, um die Tyrosinphosphorylierung der HER2/HER3-Heterodimere analysieren zu können.

Nach der Stimulation wurden die immunopräzipitierten Rezeptoren im Westernblot hinsichtlich ihrer Tyrosinphosphorylierung überprüft. Dabei zeigte sich, wie erwartet, eine erhöhte EGF-vermittelte Tyrosinphosphorylierung in Zellen mit reduzierter Syk Expression (pRS-Syk.6) im Vergleich zur Kontrolle (pRS) (Abb. 19). Im Gegensatz dazu wiesen die Heregulin- β 1-abhängigen Tyrosinphosphorylierungen von HER2 und HER3 keine Unterschiede auf. Dementsprechend konnte für Syk ein spezifischer Effekt auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion postuliert werden.

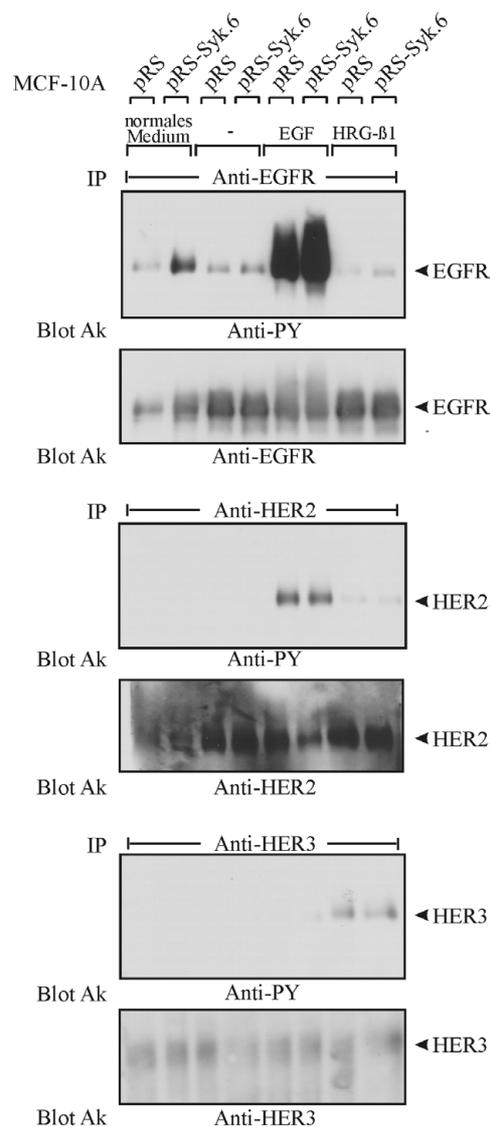


Abb. 19: Spezifischer Einfluss der Syk Reduktion auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6) oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale Puromycin-resistente MCF-10A Zellen für 24 h in serumfreiem bzw. normalem Medium kultiviert und anschließend, wie angegeben, mit 20 ng/ml EGF bzw. HRG- β 1 für 5 min stimuliert und lysiert. Anschließend wurden Anti-EGFR-, Anti-HER2- und Anti-HER3-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR-, Anti-HER2- und Anti-HER3-Antikörpern untersucht.

3.2.2.3 Erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression

Die EGFR-vermittelte Signalgebung reguliert zelluläres Wachstum und Proliferation (Yarden and Sliwkowski, 2001). Es sollte daher überprüft werden, ob humane Brustepithelzellen mit stabil reduzierten Syk-Leveln in Folge der gesteigerten Aktivierung des EGFRs Unterschiede in ihrer Proliferationsrate gegenüber Kontrollzellen zeigen. Zu diesem Zweck wurde die Zellzahl von MCF-10A Zellen mit stabil unterdrückter Syk Expression (pRS-Syk.6) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (pRS) nach 12, 24 und 48 Stunden bestimmt. Wie in der Grafik dargestellt, war die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabiler Expression des pRS-Syk.6-Konstrukts nach 48 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen, die den Leervektor pRS exprimierten, signifikant erhöht (Abb. 20).

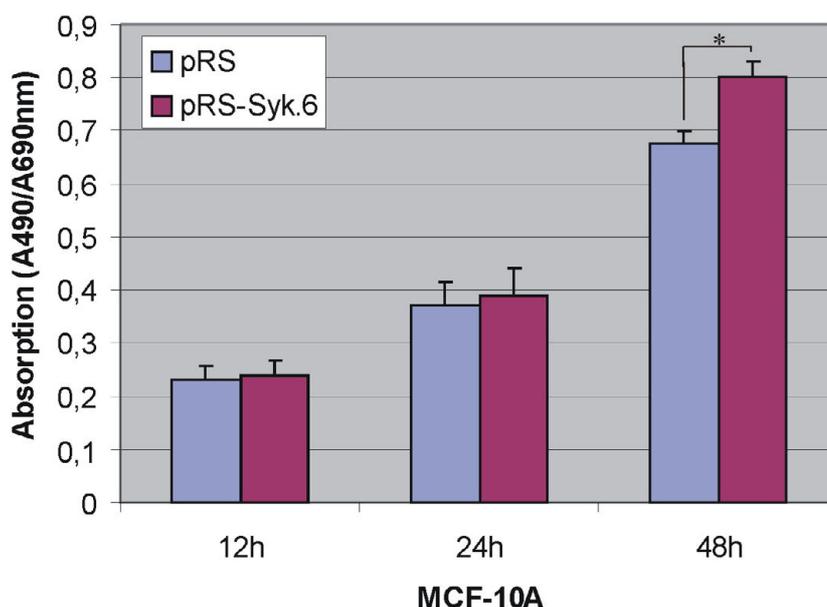


Abb. 20: Proliferationsanalyse von MCF-10A Zellen mit stabil unterdrückter Syk Expression unter normalen Wachstumsbedingungen. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6) oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurde die Proliferation von polyklonalen Puromycin-resistenten MCF-10A Zellen in der WST-1 Analyse bestimmt. Es ist das Ergebnis aus 4 verschiedenen Experimenten, die in je sechsfacher Bestimmung durchgeführt wurden, gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm der S.A. für $n = 4$. *Werte sind signifikant verschieden, $*p < 0,05$

3.2.2.4 Erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Expression von Syk ist EGF-abhängig

In den letzten Abschnitten wurde gezeigt, dass Syk anscheinend die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs reguliert und somit die Proliferation von Brustepithelzellen entscheidend beeinflusst. Um zu beweisen, dass die erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit reduzierter Syk Expression tatsächlich mit der verstärkten Aktivierung des EGFRs korrelierte, wurde das Proliferationsverhalten von MCF-10A Zellen, die das pRS-Syk.6-Konstrukt bzw. das Kontrollplasmid (pRS) stabil exprimierten, in Abhängigkeit von EGF untersucht. Wie im Vorfeld erläutert, besitzen MCF-10A Zellen Eigenschaften normaler Brustepithelzellen, so dass sie nur unter der Zugabe von Wachstumsfaktoren wie EGF und Insulin kultiviert werden können (Soule et al., 1990). Aus diesem Grund konnte das EGF-vermittelte Wachstum der Zellen analysiert werden. Dazu wurden die Zellen in Medium ohne bzw. mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren kultiviert und die Zellzahl nach 6, 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. MCF-10A Zellen, die ohne EGF bzw. Insulin kultiviert wurden, zeigten unabhängig vom Expressionskonstrukt keinerlei Proliferation. Im Gegensatz dazu war die Anzahl von MCF-10A Zellen mit stabiler Expression des pRS-Syk.6-Konstrukts im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht nur unter normalen Wachstumsbedingungen sondern auch in Medium, das nur EGF enthielt, nach 72 Stunden signifikant erhöht (Abb. 21). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Insulin nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis deutete auf einen Syk-abhängigen Einfluss auf die EGF-vermittelte Proliferation von Brustepithelzellen hin.

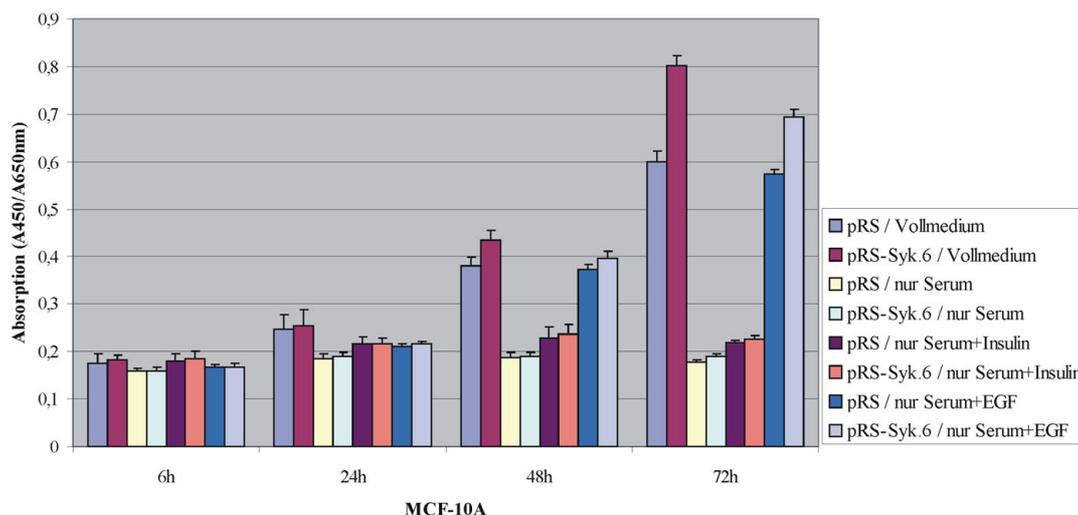


Abb. 21: Erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Expression von Syk ist EGF-abhängig. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6) oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurde die Proliferation von polyklonalen Puromycin-resistenten MCF-10A Zellen in der WST-1 Analyse bestimmt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus 4 verschiedenen Experimenten, die in je sechsfacher Bestimmung durchgeführt wurden, dargestellt.

3.2.2.5 Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression gegenüber oxidativem Stress

Brunet und Kollegen zeigten, dass die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt das Überleben der Zelle sichert (Brunet et al., 1999). In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Syk Expression eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs bewirkte, was eine gesteigerte Aktivierung von Akt zur Folge hatte. Es sollte nun überprüft werden, ob MCF-10A Zellen infolge dessen unempfindlicher auf Stressstimuli reagierten. Dazu wurden MCF-10A Zellen mit Expression des pRS-Syk.6-Konstrukts zur stabilen Reduktion der Syk-Level bzw. die entsprechenden Kontrollzellen (pRS) unter Serumentzug kultiviert oder mit H₂O₂ bzw. Doxorubicin (DOX) behandelt. Apoptotische Zellen wurden nach 16 Stunden mittels Propidiumjodidfärbung im Durchflusszytometer als subG0/G1 Populationen nachgewiesen. Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis aus 5 unabhängigen Experimenten, wobei die Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabil unterdrückter Syk Expression gegenüber der H₂O₂- bzw. der unter normalen Wachstumsbedingungen induzierten DNA-Fragmentierung im Vergleich zur Kontrollzelllinie signifikant erhöht war. Die generell hohe Apoptoserate der unbehandelten MCF-10A Zellen

resultierte wahrscheinlich aus den gegebenen Versuchsbedingungen. Im Gegensatz zu allen vorbehandelten Zellen ließen sich MCF-10A Zellen unter normalen Kulturbedingungen erst nach einer verlängerten Trypsinbehandlung von der Kulturschale entfernen, was anscheinend auch eine erhöhte DNA-Fragmentierung zur Folge hatte.

MCF-10A Zellen, die das pRS-Syk.6-Konstrukt exprimierten, zeigten unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei Serumentzug bzw. Doxorubicinbehandlung keinen Unterschied in der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Für DOX, das in die DNA interkaliert und so die Zellteilung blockiert, wurde erwartet, dass stark proliferierende Zellen stärker darauf ansprechen (Kalyanaraman et al., 2002). Unter Abwesenheit von Syk konnte eine erhöhte EGF-abhängige Zellproliferation gemessen werden (s. 3.2.2.4), weshalb diese Zellen anscheinend auch sensitiver auf die Doxorubicinbehandlung reagierten. Infolgedessen konnte vermutlich keine erhöhte Resistenz der Zellen mit reduzierter Syk Expression im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet werden. Ungeachtet dessen, deuteten die Resultate darauf hin, dass Syk in Brustepithelzellen negativ-regulatorische Funktion innerhalb der EGFR-vermittelten Signalwege, die zum Überleben der Zelle beitragen, besitzt, und so die Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress beeinflusst.

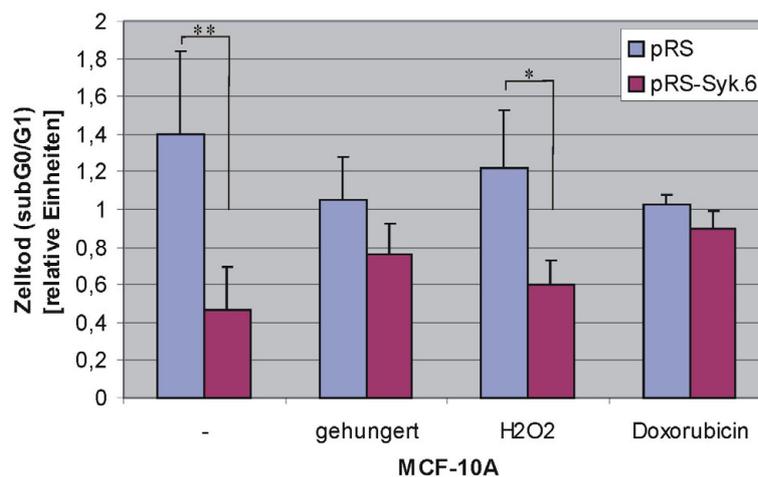


Abb. 22: Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabil reduziertem Syk gegenüber H₂O₂-Behandlung. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6) oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale Puromycin-resistente MCF-10A Zellen für 16 h wie angegeben mit serumfreiem Medium, 200 μ M H₂O₂, 1 μ M Doxorubicin oder unter normalen Bedingungen kultiviert und anschließend die subG0/G1 Fraktionen mittels Propidiumjodidfärbung bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für n = 5. *Werte bzw. **Werte sind signifikant verschieden. * p < 0,05; ** p < 0,01

3.2.2.6 Reduzierte Migration von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierten Syk-Leveln

Zelluläre Migration ist sowohl für physiologische Prozesse wie Wundheilung und Organentwicklung als auch für pathophysiologische Prozesse, wie Tumorzellinvasion notwendig. So wurde für Brustkrebszellen gezeigt, dass diese durch die Überexpression von EGFR und HER2 ein erhöhtes Migrationsvermögen erwerben (Brandt et al., 1999). Xie und Kollegen zeigten, dass die Zellmotilität durch die EGFR-Kinaseaktivität sowie die Anwesenheit von EGF direkt beeinflusst wird (Xie et al., 1998). In Anbetracht dessen sollte im Folgenden in *Transwell*-Versuchen überprüft werden, ob das Migrationsvermögen von MCF-10A Zellen mit unterdrückter Expression von Syk infolge der erhöhten basalen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert ist. Dazu wurden MCF-10A Zellen mit stabiler Expression des pRS-Syk.6-Konstrukts in serumfreiem Medium in *Transwells* ausgesät und migrierte Zellen nach 24 Stunden mit Kristallviolett angefärbt und quantifiziert. Als chemischer Lockstoff diente dabei serumhaltiges Medium. Wie die Abbildung 23 zeigt, war die Motilität von MCF-10A Zellen mit reduzierter endogener Expression von Syk (pRS-Syk.6) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (pRS) signifikant reduziert, was mit den Ergebnissen korrelierte, die zeigten, dass diese Zellen eine erhöhte Proliferation aufwiesen (Abb. 20 und 21). Tran und Berg zeigten in *Drosophila*, dass die Nicht-Rezeptortyrosinkinase *shark*, die dem humanem Syk homolog ist, für die Follikelzellmigration essentiell ist (Tran and Berg, 2003). Diese Daten ließen vermuten, dass das reduzierte Migrationsverhalten von Zellen mit fehlender Syk Expression nicht durch die erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen verursacht wurde, sondern möglicherweise durch das Fehlen von Syk selbst. Letzteres deutete auf eine physiologische Funktion von Syk als Modulator von Zellmigration in nichttransformierten Brustepithelzellen hin.

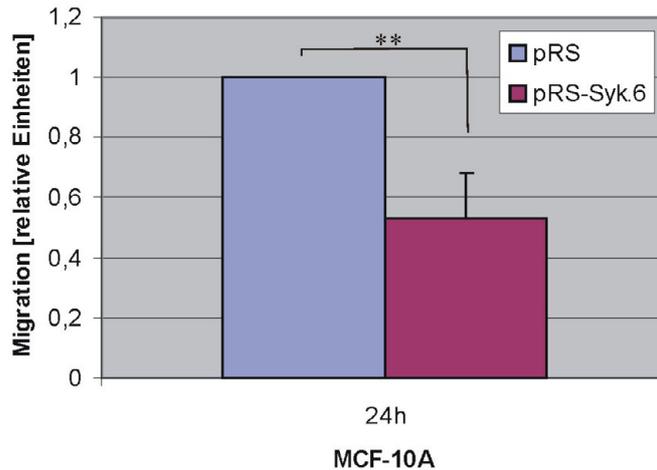


Abb. 23: Reduzierte Migration von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Syk Expression. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pRETRO-SUPER/Syk.6 (pRS-Syk.6), oder dem leeren Kontrollvektor (pRS) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale Puromycin-resistente MCF-10A Zellen in *Transwells* kultiviert und die Migration nach 24 h bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für $n = 5$. **Werte sind signifikant verschieden. ** $p < 0,01$

3.2.3 Untersuchungen zur Funktion von Syk in normalen und transformierten humanen Brustzellen mittels des Syk-selektiven Inhibitors Piceatannol

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die stabile Reduktion der Syk Expression eine deregulierte EGFR-vermittelte Signaltransduktion und demzufolge eine Veränderung physiologischer Eigenschaften von MCF-10A Zellen bewirkte. Um weiteren Aufschluss über die biologische Funktion von Syk in Brustepithelzellen zu erhalten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Inhibition der Kinaseaktivität von Syk mittels des Syk-selektiven Inhibitors Piceatannol, ebenfalls die Wachstumsfaktor-abhängige Signalübertragung in Brustepithelzellen beeinflusst.

3.2.3.1 Test der Spezifität des Syk-selektiven Inhibitors Piceatannol in Syk überexprimierenden CHO-K Zellen

Für Piceatannol, ein Stilben, das aus Pflanzen gewonnen werden kann, wurde gezeigt, dass es die Funktion der Kinaseaktivität von Syk im mikromolaren Bereich selektiv

hemmt (Oliver et al., 1994). Die Selektivität wird dadurch erzeugt, dass Piceatannol, im Gegensatz zu anderen Tyrosinkinaseinhibitoren, nicht um die Bindung im Bereich der ATP-Bindestelle sondern im Bereich der Substratbindestelle konkurriert (Geahlen and McLaughlin, 1989). Diese Selektivität gegenüber der Syk-Kinase sollte zunächst in CHO-K Zellen überprüft werden, die weder Syk noch die RTKs der EGF-Rezeptorfamilie endogen exprimierten. Dazu wurden CHO-K Zellen mit Konstrukten zur exogenen Expression von humanem Wildtyp Syk bzw. zur Kontrolle mit Konstrukten zur exogenen Expression einer katalytisch-inaktiven Syk Mutante (Syk K-) bzw. des EGFRs transfiziert und vor der Stimulation mit EGF für eine Stunde mit Piceatannol inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 dargestellt und zeigt, dass das exogen exprimierte Syk von Wildtyp im Gegensatz zur katalytisch-inaktiven Mutante Autokinaseaktivität besaß und demzufolge in tyrosinphosphoryliertem Zustand nachweisbar war, was durch die Piceatannolbehandlung spezifisch unterdrückt werden konnte. Piceatannol zeigte dabei keinen unspezifischen Effekt auf die EGFR-Kinaseaktivität bzw. dessen Tyrosinphosphorylierung.

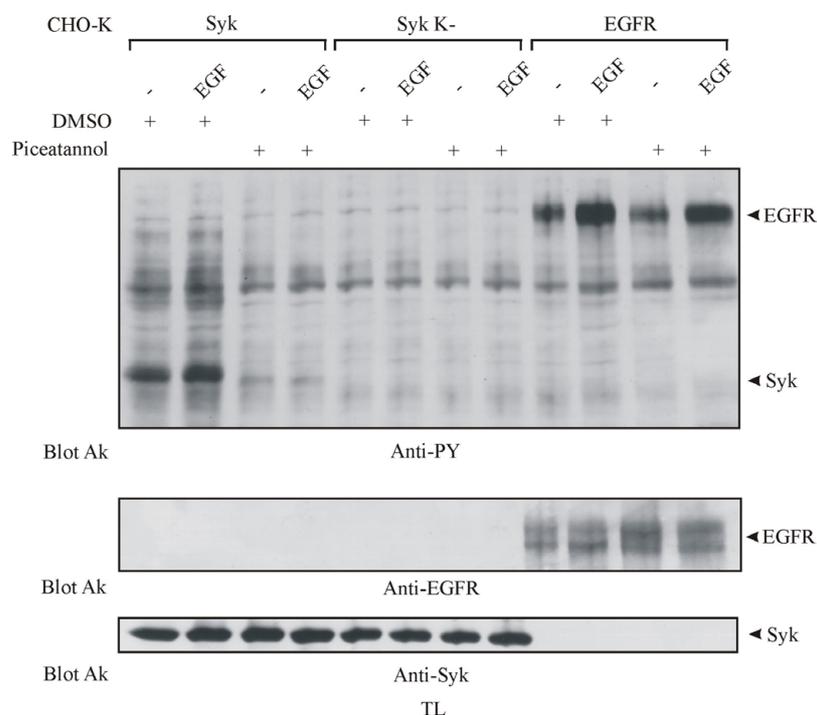


Abb. 24: Selektive Inhibition von Syk mittels Piceatannol. CHO-K Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für humanes Syk vom Wildtyp (Syk), einer katalytisch-inaktiven K/R-Mutante (Syk K-) oder den humanen EGFR transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Vor der Stimulation mit 20 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen für 1 h mit 10 µg/ml Piceatannol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-Syk- bzw. Anti-EGFR- Antikörpern analysiert.

3.2.3.2 Einfluss von Piceatannol auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in der MDA-MB-468 Brustkrebszelllinie

Es sollte nun überprüft werden, ob die EGFR-vermittelte Signaltransduktion auch durch die chemische Inhibition der Kinaseaktivität Syk beeinflusst werden kann. Dazu wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB-468, die den EGFR überexprimierte, nach einer einstündigen Piceatannolzugabe für eine bzw. fünf Minuten mit EGF stimuliert und der EGF-abhängige Phosphotyrosingehalt in der Immunoblotanalyse bestimmt. Dabei schien die Zugabe von Piceatannol sowohl eine Erhöhung der basalen als auch der EGF-abhängigen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zu verursachen (Abb. 25). Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einem hochspezifischen EGFR-Kinaseinhibitor (AG1478) konnte diesen Effekt verhindern. Die Ergebnisse bestätigten vorangegangene Daten dahingehend, dass Syk anscheinend an der Regulation der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in Abhängigkeit von dessen Kinaseaktivität in Brustepithelzellen beteiligt ist. Für diese Funktion schien die Kinaseaktivität von Syk essentiell zu sein.

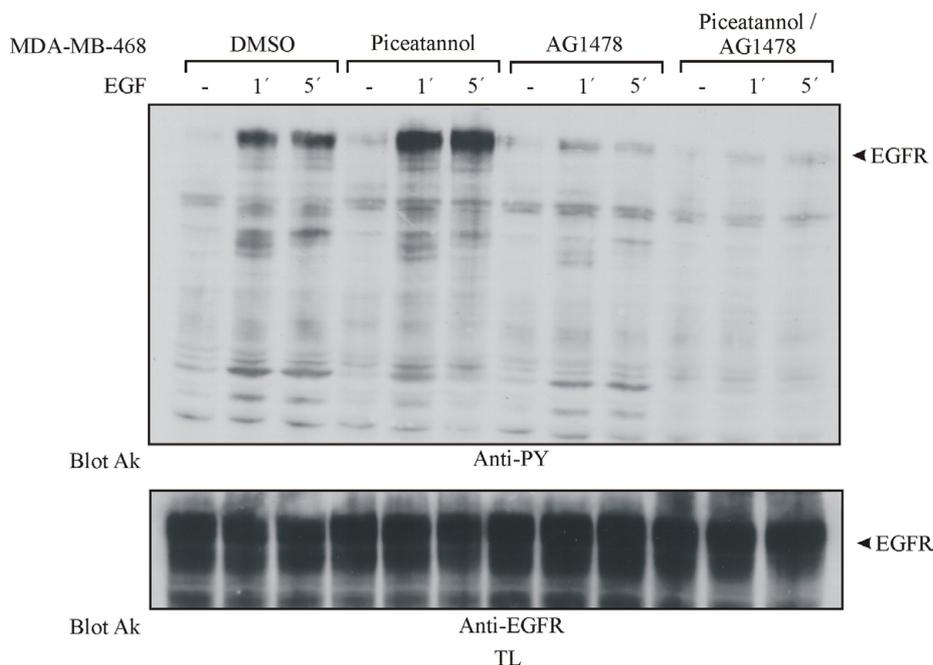


Abb. 25: Einfluss von Piceatannol auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468. MDA-MB-468 Brustkrebszellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Vor der Stimulation mit 10 ng/ml EGF für 1 (1') bzw. 5 min (5') wurden die Zellen wie angegeben für 1 h mit 10 µg/ml Piceatannol bzw. für 20 min mit 250 nM AG1478 einzeln oder zusammen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-EGFR- Antikörpern analysiert.

3.2.3.3 Einfluss von Piceatannol auf die Stabilität des Adaptorproteins Shc

Die Ergebnisse im Abschnitt 3.2.1.2 ließen vermuten, dass Syk die Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc in Brustepithelzellen beeinflusst. Aus diesem Grund sollte die Tyrosinphosphorylierung von Shc in normalen und transformierten Brustzelllinien nach Piceatannolinkubation analysiert werden. Dazu wurden sowohl die normale Brustzelllinie MCF-10A sowie die Brustkrebszelllinie MDA-MB-468, die endogenes Syk exprimierten, als auch die Syk-negative Brustkrebszelllinie BT-549 mit Piceatannol behandelt. Anschließend wurden Shc-Immunopräzipitate im Immunoblot analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Proteinmengen aller drei Isoformen von Shc nach Piceatannolbehandlung in Abhängigkeit der endogenen Syk Expression reduziert vorlagen, wobei die Menge an Syk unverändert blieb (Abb. 26). Anhand dieser Resultate konnte der bereits in vorangegangenen Abschnitten beschriebene Einfluss von Syk auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc dahingehend bestätigt werden, dass auch die EGF-induzierte nachweisbare Tyrosinphosphorylierung dieses Adaptorproteins wahrscheinlich infolge des reduzierten Shc-Proteinanteils abnahm (Daten nicht gezeigt).

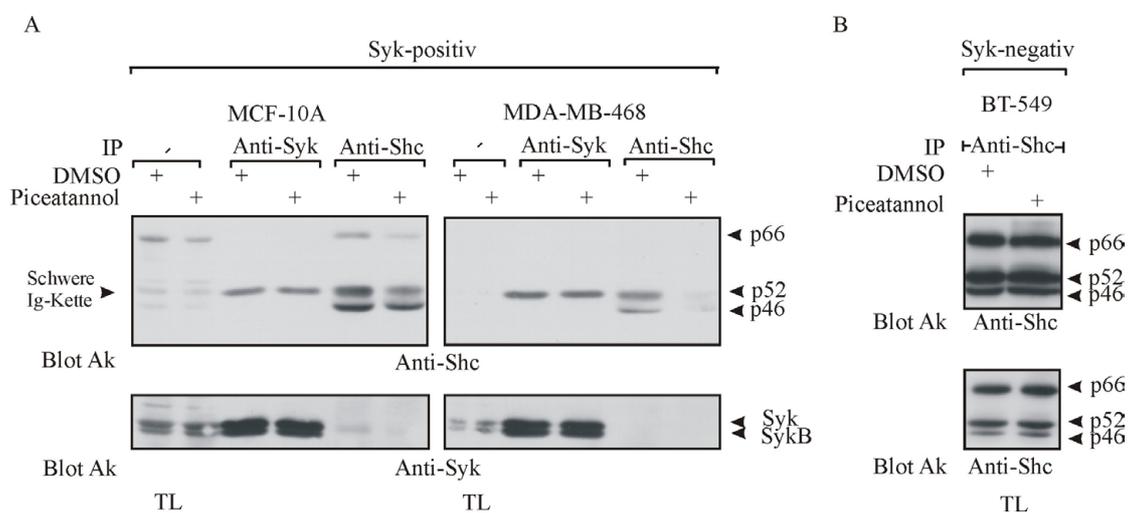


Abb. 26: Einfluss von Piceatannol auf die Stabilität von Shc. Syk-positive MCF-10A und MDA-MB-468 Zellen (A) und Syk-negative BT-549 Zellen (B) wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Vor der Lyse wurden die Zellen wie angegeben für 1 h mit 10 µg/ml Piceatannol inkubiert. Anschließend wurden Anti-Shc- und Anti-Syk-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Shc- und Anti-Syk-Antikörpern untersucht. Zusätzlich wurden 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Shc- und Anti-Syk-Antikörpern analysiert.

3.2.3.4 Einfluss von Piceatannol auf die Phosphorylierung der MAPK Jnk

Anhand von DT40/Syk *knock out* B-Zellen konnten Syk-abhängige Signalwege, die in Folge von oxidativem Stress zur Aktivierung der MAP-Kinase Jnk führen, nachgewiesen werden (Qin et al., 1997). Le und Kollegen zeigten, dass die p66 Isoform von Shc in Folge von oxidativen Stress durch Jnk an einem Serinrest phosphoryliert wird, wodurch Apoptose in diesen Zellen ausgelöst werden kann (Le et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Zellen mit einer reduzierten Expression von Syk eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress aufwiesen und dass Syk anscheinend die Stabilität von Shc bzw. dessen Tyrosinphosphorylierung beeinflusste. Mittels Piceatannol sollte getestet werden, ob Syk ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung der MAP-Kinase Jnk in Brustepithelzellen spielt und so möglicherweise auf Shc Einfluss nimmt. MCF-10A Zellen wurden dazu zur Erhöhung von oxidativem Stress für 24 Stunden ohne Serum kultiviert und anschließend im Immunoblot auf deren Shc-Gehalt bzw. deren Jnk-Phosphorylierung analysiert. Die Aktivierung von Jnk in MCF-10A Zellen benötigte serumhaltiges Medium (Abb. 27), was die Daten von Chen et al. bestätigte, die zeigten, dass für die Aktivierung von Jnk nach oxidativem Stress Cu^{2+} -Ionen aus dem Serum essentiell sind (Chen et al., 2001). Durch die Piceatannolzugabe konnte die Phosphorylierung von Jnk, die dessen Aktivität widerspiegelte, nur in Anwesenheit von Serum reduziert werden. Im Gegensatz dazu wurde Shc nur in serumfreiem Medium und unter Piceatannolzugabe destabilisiert. Um ausschließen zu können, dass Piceatannol in serumhaltigem Medium inaktiviert wurde, sollten gleichzeitig MCF-10A Zellen untersucht werden, die kurz vor der Piceatannolinkubation mit serumfreiem Medium behandelt wurden. Dabei zeigte sich, dass Piceatannol die Stabilität von Shc nur in gehungerten MCF-10A Zellen beeinflusste. Diese Resultate ließen vermuten, dass die Stabilität von Shc unter oxidativen Bedingungen durch die Kinaseaktivität von Syk reguliert wurde. Allerdings konnte der Syk-abhängige Einfluss auf Shc und auf die Aktivierung von Jnk in keinem direkten Zusammenhang gebracht werden. Anscheinend werden beide Effekte unabhängig voneinander durch Syk beeinflusst.

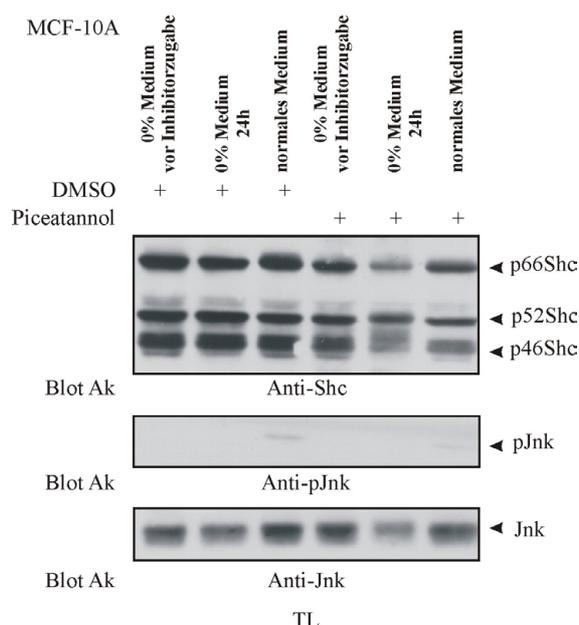


Abb. 27: Einfluss von Piceatannol auf die Phosphorylierung von Jnk. MCF-10A Zellen wurden entweder für 24 h in serumfreiem Medium gehungert oder in normalem Medium kultiviert bzw. in normalen Medium kultiviert und vor der einstündigen Piceatannolzugabe (10 µg/ml) mit serumfreiem Medium behandelt. Nach der Lyse wurden 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mittels Anti-Shc-, Anti-Phospho-Jnk (pJnk) und Anti-Jnk-Antikörpern untersucht.

3.2.4 Einfluss exogener Expression von Syk bzw. Syk K- in MCF-10A Zellen

Wie in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, wurden sowohl die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs als auch die EGF-vermittelte Aktivierung von Signalproteinen durch die Reduktion der endogenen Syk-Level erhöht. In den folgenden Abschnitten sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob durch die zusätzliche Expression von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) die EGFR-vermittelte Signalgebung in Brustepithelzellen beeinflusst werden kann.

3.2.4.1 Analyse der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in stabilen Syk bzw. Syk K- exprimierenden MCF-10A Zellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die reduzierte Expression als auch die Inhibition der Kinaseaktivität von Syk anscheinend eine Hyperphosphorylierung des EGFRs bewirkten. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse auf eine

Regulation des EGFRs durch die Kinaseaktivität von Syk hin. Im Folgenden sollten diese Daten mittels exogener Expression einer katalytisch-inaktiven Mutante von Syk, für die vermutet wurde, dass sie sich dominant-negativ auf endogenes Syk auswirkte (Takata et al., 1994), bestätigt werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob durch die zusätzliche exogene Expression von Wildtyp Syk eine Reduktion der EGF-abhängigen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs verursacht werden könnte. Dazu wurden MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Form von Syk (Syk K-), wobei beide Formen zur Differenzierung von endogenem Syk zusammen mit dem VSV-Epitop exprimiert wurden, und den entsprechenden Kontrollzellen (Mock) in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit EGF stimuliert. Dabei konnte durch die exogene Expression der katalytisch-inaktiven Form von Syk keine erhöhte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nachgewiesen werden, was darauf hindeutete, dass sich Syk K- nicht oder zumindest unzureichend auf die endogene Aktivität von Syk auswirkte (Abb. 28). Dagegen schien die zusätzliche exogene Expression von Wildtyp Syk eine Reduktion der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zu bewirken. Die Resultate konnten vorangegangene Daten dahingehend bestätigen, dass die Regulation des Phosphotyrosinstatus des EGFRs von katalytisch-aktivem Syk abhängig zu sein schien.

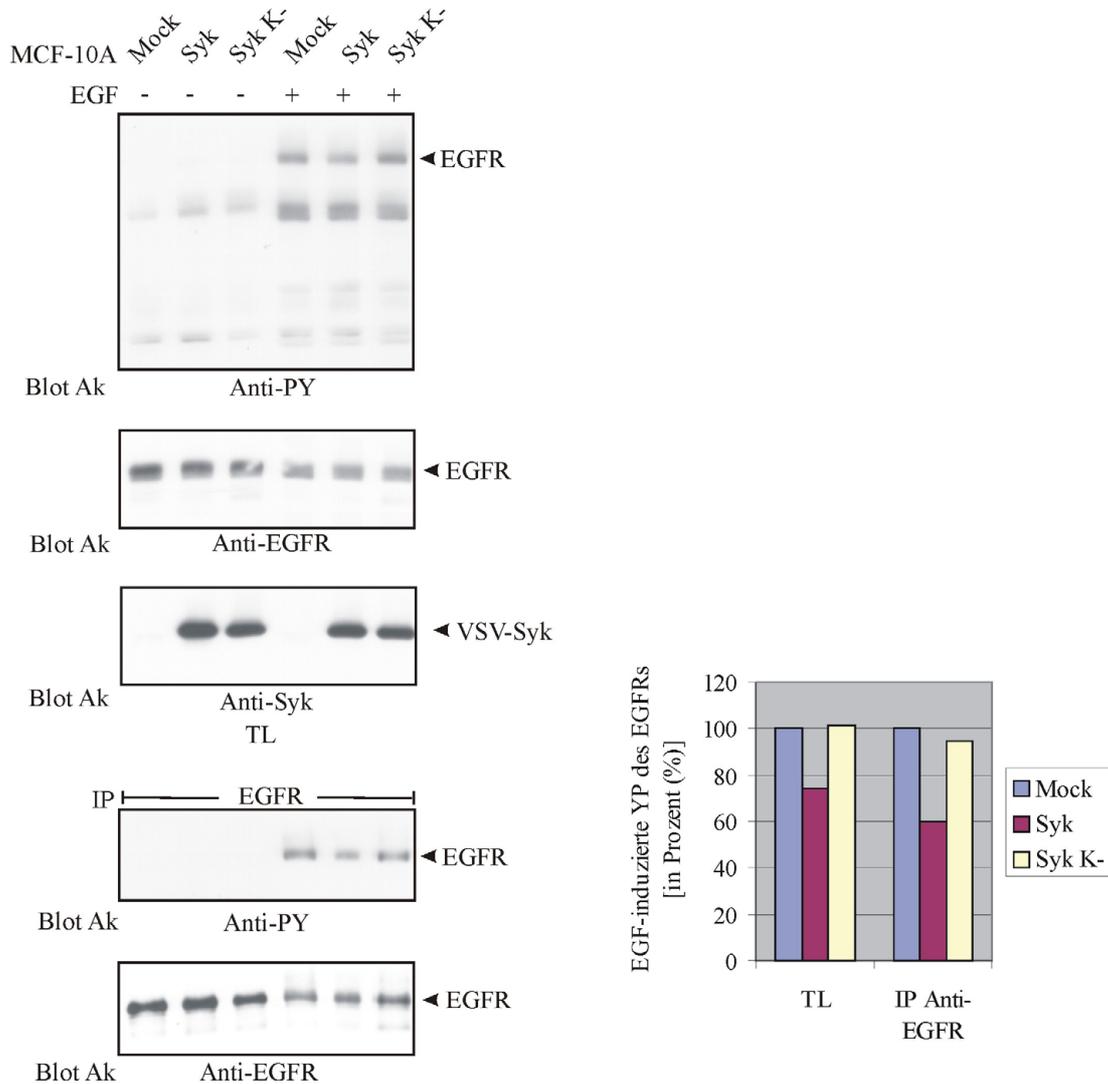


Abb. 28: Einfluss der exogenen Expression von Syk bzw. Syk K- auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit retroviralen Konstrukten zur Syk bzw. Syk K- Expression mit VSV-Epitop oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale G418-resistente MCF-10A Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit 20 ng/ml EGF für 5 min stimuliert. *Rechts*, nach der Lyse wurden 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR- und Anti-Syk-Antikörpern untersucht (*oberer Bereich*). Anti-EGFR-Immunopräzipitate wurden im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-EGFR-Antikörpern analysiert (*unterer Bereich*). *Links*, die Menge an tyrosinphosphoryliertem EGFR aus den Totallysaten (TL) bzw. der Immunopräzipitation (IP) wurde densitometrisch quantifiziert, wobei die Resultate aus der Westernblotanalyse mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- Antikörpern gegenüber der Menge an EGFR aus der Anti-EGFR-Westernblotanalyse normalisiert wurden.

3.2.4.2 Einfluss der exogenen Expression von Syk bzw. Syk K- auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc

Anhand der Daten, die mittels siRNA Technologie zur Unterdrückung der Syk Expression gewonnen werden konnten, wurde ein Syk-abhängiger Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc in Brustepithelzellen vermutet. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Kinaseaktivität von Syk zur Regulation der Tyrosinphosphorylierung von Shc befähigt ist, sollten MCF-10A Zellen, die exogenes Syk bzw. eine katalytisch-inaktive Mutante von Syk (Syk K-) exprimierten, nach EGF-Stimulation mit den entsprechenden Kontrollzellen (Mock) auf tyrosinphosphoryliertes Shc untersucht werden. Dazu wurden MCF-10A Zellen mit Konstrukten zur transienten Expression von Syk bzw. Syk K- mit VSV-Epitop sowie dem Leervektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in normalem bzw. in serumfreiem Medium kultiviert und mit EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Dabei konnte der Proteingehalt an Syk gegenüber endogenen Leveln mittels exogener Expression der Syk-Konstrukte signifikant erhöht werden (Abb. 29B). Jedoch zeigte nur Syk vom Wildtyp eine signifikant erhöhte Tyrosinphosphorylierung nach Pervanadatstimulation, die auf eine erhöhte Autokinaseaktivität von Syk im Vergleich zur Kinase-inaktiven Mutante zurückgeführt werden konnte. Durch die Überexpression von katalytisch-aktivem Syk konnte die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Shc erhöht werden, während sich die katalytisch-inaktive Form negativ auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc auswirkte (Abb. 29). Die Resultate bestätigten, dass die Kinaseaktivität von Syk zur Regulation der EGF-stimulierten Tyrosinphosphorylierung von Shc in MCF-10A Zellen essentiell zu sein scheint.

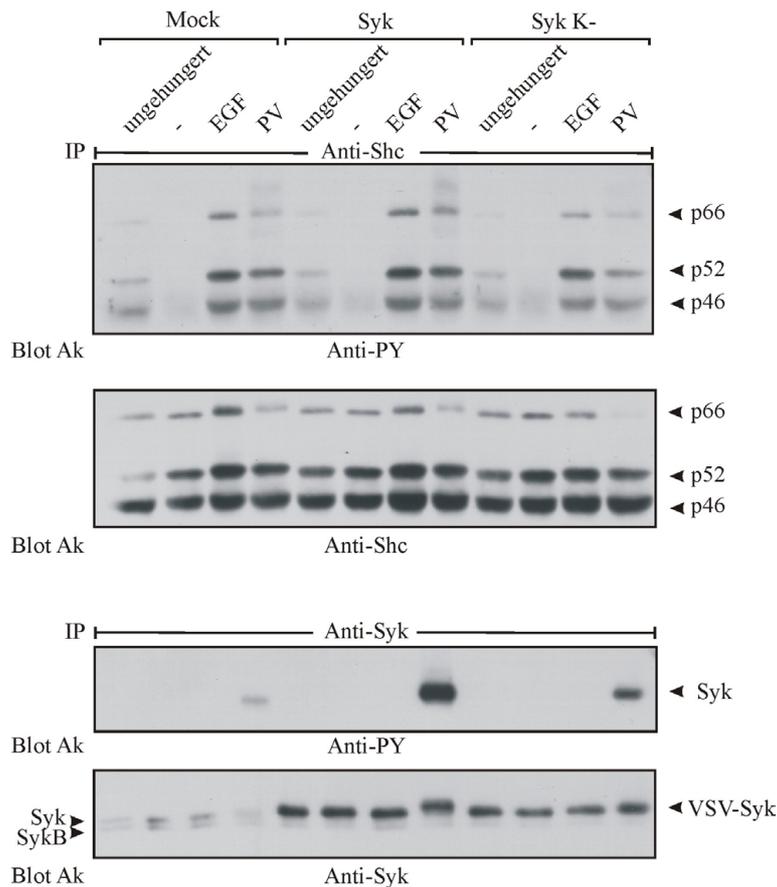


Abb. 29: Einfluss der exogenen Expression Syk bzw. Syk K- auf die stimulierte Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc. MCF-10A Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) mit VSV-Epitop oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) transfiziert. Nach der Kultivierung für 24 h in serumfreiem Medium bzw. normalem Medium wurden die Zellen mit 20 ng/ml EGF für 5 min bzw. 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min stimuliert. Nach der Lyse wurden Anti-Shc-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-Shc-Antikörpern untersucht (*oberer Bereich*). Nach der Lyse wurden Anti-Syk-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-Syk-Antikörpern analysiert (*unterer Bereich*).

3.2.4.3 Einfluss der exogenen Expression von Syk bzw. Syk K- auf die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass humane Brustepithelzellen mit reduzierter Expression von Syk infolge der gesteigerten EGFR-Aktivierung eine erhöhte Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen (s. 3.2.2.3). Desweiteren schien eine erhöhte Expression von Syk die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zu reduzieren (s. 3.2.4.1). Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob MCF-10A Zellen mit einer gesteigerten Expression von Syk reduzierte Proliferationsraten gegenüber Kontrollzellen aufweisen. Zu diesem Zweck wurde die Zellzahl von MCF-10A Zellen mit stabiler exogener Expression von Wildtyp Syk

bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Mock) nach 12, 24 und 48 Stunden bestimmt. Wie in der Grafik dargestellt, war die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen mit exogener Expression von Syk unabhängig von dessen Kinaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant verschieden (Abb. 30). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte kein Einfluss der erhöhten Expression von katalytisch-aktivem Syk auf die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen nachgewiesen werden.

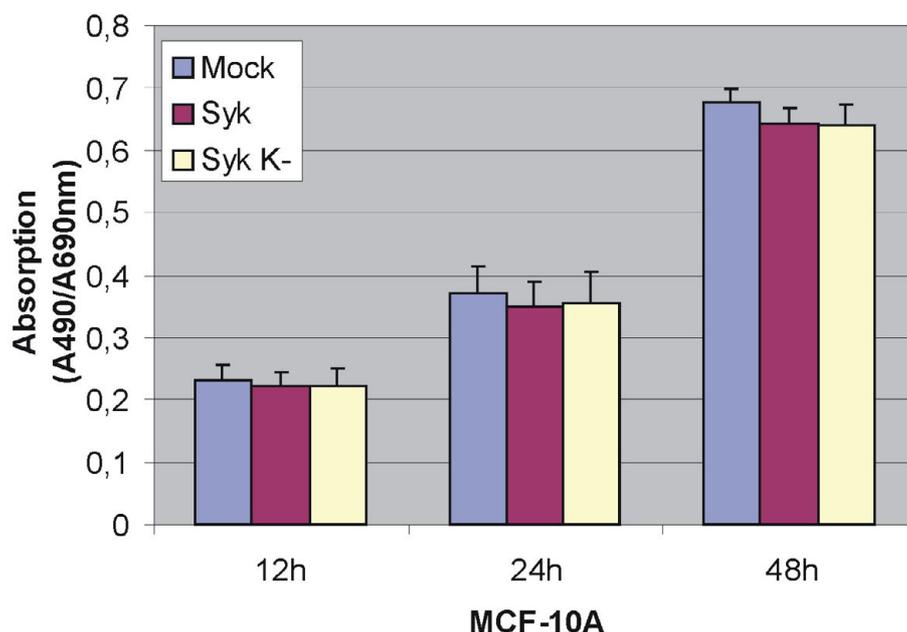


Abb. 30: Proliferationsanalyse von MCF-10A Zellen mit exogener Expression von Syk bzw. Syk K-. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit retroviralen Konstrukten zur Syk bzw. Syk K-Expression oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurde die Proliferation der polyklonalen G418-resistenten MCF-10A Zellen in der WST-1 Analyse nach 12, 24 und 48 h bestimmt. Es ist das Ergebnis aus 4 verschiedenen Experimenten, die in je sechsfacher Bestimmung durchgeführt wurden, gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm der S.A. für $n = 4$.

3.2.4.4 Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von katalytisch-inaktivem Syk gegenüber H_2O_2 -Behandlung

Wie in Abschnitt 3.2.2.5 gezeigt werden konnte, scheint Syk in Brustepithelzellen regulatorische Funktion innerhalb EGFR-vermittelter Signalwege zu besitzen, die zum Überleben der Zelle beitragen und so die Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress beeinflussen. Es sollte nun überprüft werden, ob die Erhöhung der

endogenen Syk-Level die Apoptosesensitivität von MCF-10A Zellen verändert. Zu diesem Zweck wurden MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) und die entsprechenden Kontrollzellen (Mock) unter Serumentzug kultiviert oder mit H₂O₂ bzw. Doxorubicin behandelt. Apoptotische Zellen wurden nach 16 Stunden mittels Propidiumjodidfärbung im Durchflusszytometer als subG0/G1 Populationen nachgewiesen. Die Abbildung 31 zeigt das Ergebnis aus 5 unabhängigen Experimenten, wobei die Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabiler exogener Expression von katalytisch-inaktivem Syk gegenüber H₂O₂- bzw. unter normalen Wachstumsbedingungen induzierter DNA-Fragmentierung im Vergleich zur Kontrollzelllinie signifikant erhöht war. Die generell hohe Apoptoserate der unbehandelten MCF-10A Zellen resultierte wahrscheinlich, wie bereits in Abschnitt 3.2.2.5 erwähnt wurde, aus den gegebenen Versuchsbedingungen, unter denen unbehandelte MCF-10A Zellen im Gegensatz zu allen vorbehandelten Zellen erst durch intensive Trypsinbehandlung von der Kulturschale gelöst werden konnten. Letzteres hatte anscheinend auch eine erhöhte DNA-Fragmentierung zur Folge. MCF-10A Zellen, die Syk vom Wildtyp exprimierten, zeigten unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Die Resultate bestätigten die Ergebnisse von MCF-10A Zellen mit stabil reduzierter Expression von Syk und deuteten darauf hin, dass die Kinaseaktivität von Syk hinreichend ist, um das Überleben von Zellen unter oxidativen Bedingungen zu beeinflussen. Obwohl vermutet wurde, dass die Erhöhung der EGFR-Kinaseaktivität als Folge der reduzierten Syk-Level die Apoptosesensitivität in diesen Zellen herabsetzte, schien auch die Kinaseaktivität von Syk, unabhängig von der EGFR-vermittelten Signalgebung, auf das Überleben von Brustepithelzellen Einfluss nehmen zu können.

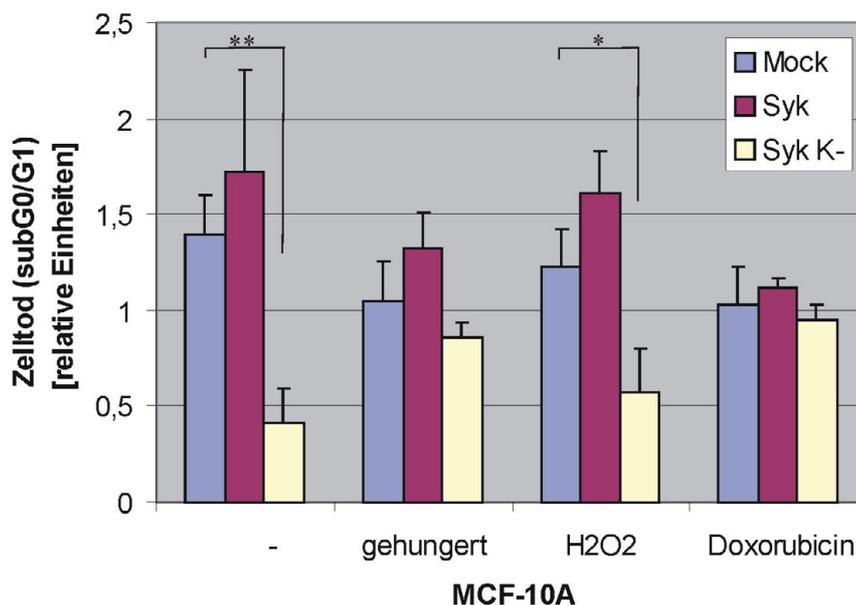


Abb. 31: Erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von katalytisch-inaktivem Syk gegenüber H₂O₂-Behandlung. MCF-10A Brustepithelzellen wurden mit retroviralen Konstrukten zur Expression von Syk bzw. Syk K- oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale G418-resistente MCF-10A Zellen für 16 h wie angegeben mit serumfreiem Medium, H₂O₂ (200 µM), Doxorubicin (1 µM) oder normalem Medium kultiviert und die subG0/G1 Fraktionen anschließend mittels Propidiumjodidfärbung untersucht. Es ist das Ergebnis aus 5 verschiedenen Experimenten gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für n = 5. *Werte bzw. **Werte sind signifikant verschieden. * bedeutet p < 0,05; ** bedeutet p < 0,01

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der EGFR-vermittelten Signalgebung auf Syk

Die bisher beschriebenen Resultate gaben wichtige Hinweise darauf, dass Syk negativ-regulatorisch in die EGF-vermittelte Signaltransduktion eingreift und somit Proliferation und Apoptose von Brustepithelzellen beeinflusst. Um eine physiologische Interaktion beider Signalproteine zu beweisen, sollte im Folgenden überprüft werden, ob sich EGFR-vermittelte Signalwege auch auf die biologische Funktion von Syk auswirken.

3.3.1 Nachweis von membranständigem Syk in MCF-10A Zellen

Es wurde vermutet, dass Syk für eine direkte Regulation der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs in dessen proximaler Nähe nachweisbar sein muss. Die Familie der Syk-/ZAP-70 Kinasen besitzt im Gegensatz zur Src-Kinasefamilie keine Myristoylierungsdomäne, die eine konstitutive Membranlokalisierung ermöglicht (Varmus et al., 1989). Aus diesem Grund könnte eine zum EGFR-proximale Lokalisierung von Syk nur über Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Es sollte zunächst untersucht werden, ob membranständiges Syk in MCF-10A Brustepithelzellen nachweisbar ist, und ob es sich dabei um eine konstitutive oder aber EGF-abhängige Membranlokalisierung handelte. Vor der subzellulären Fraktionierung wurden MCF-10A Zellen unter normalen Bedingungen bzw. unter Serumentzug kultiviert und anschließend mit EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Nach der Auftrennung der Zellen in ihre Membran- und Zytosolanteile wurden die einzelnen Fraktionen bzw. deren Anti-EGFR- und Anti-Syk-Immunopräzipitate anschließend im Immunoblot analysiert. Dabei konnte Syk nicht nur in den zytosolischen Fraktionen sondern auch, wenn auch in bedeutend geringeren Mengen, in den Membrananteilen nachgewiesen werden (Abb. 32). Tubulin und EGFR dienten als zytosolischer bzw. membranständiger Marker und zeigten eine effiziente Fraktionierung. Geringe Anteile an EGFR waren auch in der zytosolischen Fraktion detektierbar, da die auf diese Art abgetrennte Zytosolfraktion auch Membranstrukturen, wie z.B. Endosomen, Transportvesikel o.ä. enthielt. So konnte vermutet werden, dass Syk auch an solchen Strukturen lokalisiert war. Auffällig war zudem, dass nach Serumentzug in Unabhängigkeit vom zugesetzten Stimulus hauptsächlich die lange Form von Syk, Syk(L), an der Membran zu lokalisieren schien (Abb. 32B). Im Gegensatz dazu konnten unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl Syk(L) als auch SykB in den Membrananteilen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass geringe Mengen an Syk in proximaler Nähe zum EGFR lokalisieren, was eine Regulation der EGFR-vermittelten Signaltransduktion ermöglichen könnte.

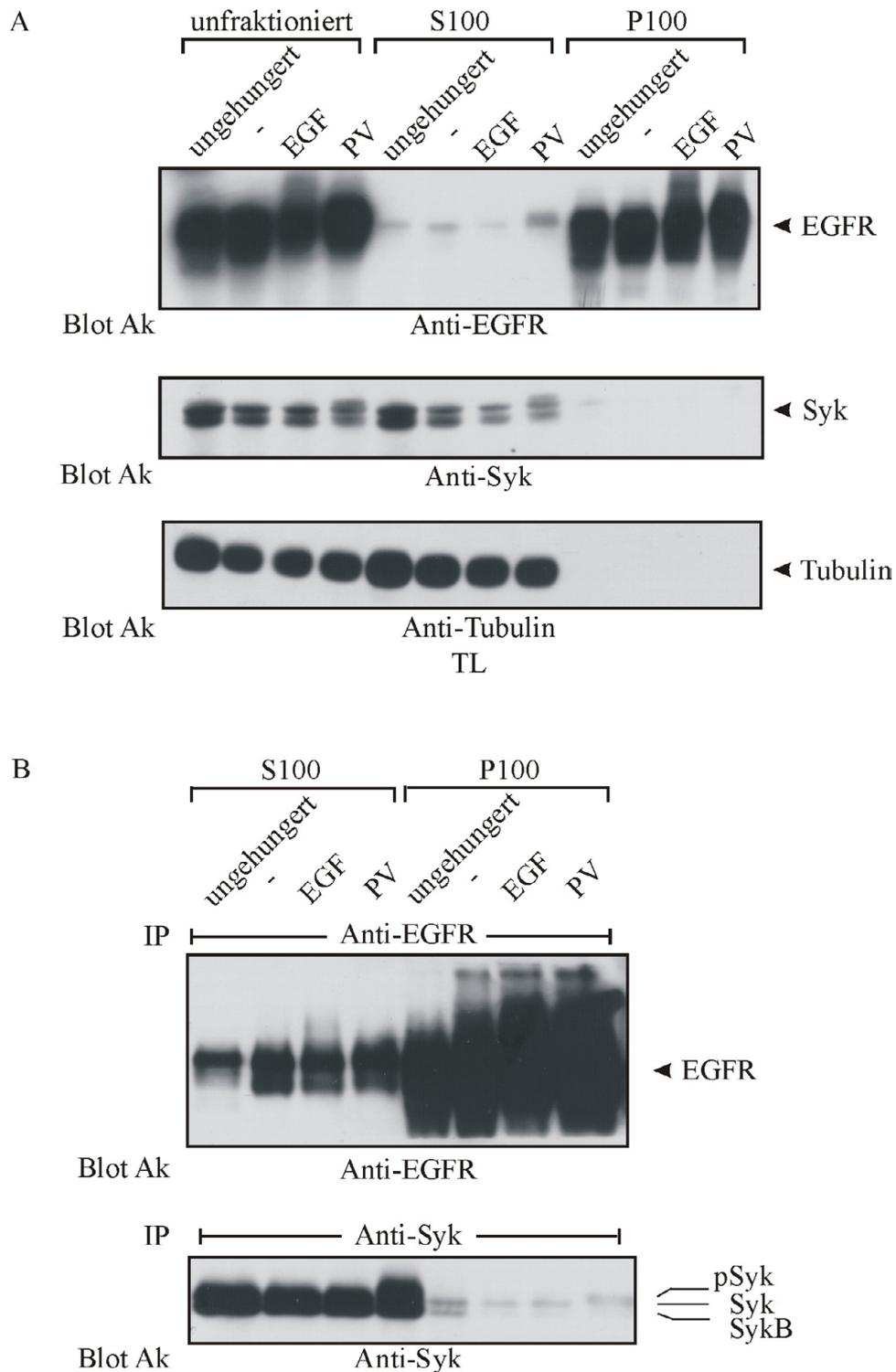


Abb. 32: Subzelluläre Lokalisation von Syk in MCF-10A Zellen. MCF-10A Brustepithelzellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium bzw. normalem Medium kultiviert und anschließend mit 20 ng/ml EGF für 5 min bzw. 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min stimuliert. *A*, es wurden zytosolische (S100) und membranhaltige Zellextrakte (P100) von MCF-10A Zellen präpariert. Gleiche Anteile der Fraktionen und unfraktionierte Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse auf Syk untersucht. Als Kontrollen für eine reine Membranfraktion dienten der Nachweis von EGFR und der negative Nachweis von α -Tubulin. *B*, Anti-EGFR- und Anti-Syk-Immunopräzipitate aus gleichen Anteilen von zytoplasmatischen und membranhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mittels Anti-EGFR- bzw. Anti-Syk-Antikörpern untersucht.

3.3.2 Einfluss der EGFR-Kinaseaktivität auf Syk

Die Daten vorangegangener Abschnitte deuteten auf eine Funktion von Syk in der Negativregulation der Tyrosinphosphorylierung und Aktivität des EGFRs hin. Antagonistisch wirkende Tyrosinphosphatasen werden im Verlauf der EGFR-Aktivierung reversibel, z.B. durch die Generierung von H_2O_2 , gehemmt, um eine Amplifikation der EGF-induzierten Signalweiterleitung zu ermöglichen (Rhee et al., 2000; Tiganis, 2002). In den folgenden Abschnitten sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die Kinaseaktivität des EGFRs ebenfalls auf die Tyrosinphosphorylierung von Syk sowie dessen Aktivierung auswirkt.

3.3.2.1 Erhöhte autokatalytische Aktivität von Syk unter Einfluss von AG1478 in normalen und transformierten Brustzelllinien

Zunächst sollte überprüft werden, ob die chemische Inhibition der EGFR-Kinase zu einer veränderten Kinaseaktivität von Syk führt. MCF-10A Brustepithelzellen wurden dazu unter normalen Bedingungen bzw. unter Serumentzug kultiviert und vor der Stimulation mit EGF bzw. Pervanadat mit Tyrphostin AG1478, zur irreversiblen Hemmung der EGFR-Kinase (Levitzki and Gazit, 1995), inkubiert (Abb. 33A). Danach wurde die Autokinaseaktivität von immunopräzipitiertem Syk im *in vitro* Kinaseassay mit anschließender Autoradiografie bzw. vergleichbare Mengen an immunopräzipitiertem Syk im Immunoblot nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 33B und C). Wie die Abbildung 33 zeigt, bewirkte die Inhibition der EGFR-Kinase nach Serumentzug und EGF-Stimulation eine signifikante Zunahme der Kinaseaktivität von Syk. Dieses Resultat deutete darauf hin, dass sich der aktivierte EGFR anscheinend negativ-regulativ auf die Aktivierung von Syk auswirkte. Die zusätzliche Inhibition von Tyrosinphosphatasen, die die Aktivität von Syk vermutlich negativ beeinflussten (Maeda et al., 1999), führte unter Einwirkung von AG1478 zu keiner weiteren Erhöhung der Syk-Aktivität. Anscheinend besaß Syk nach Pervanadatzugabe bereits seine maximale Aktivität, die nicht mehr gesteigert werden konnte.

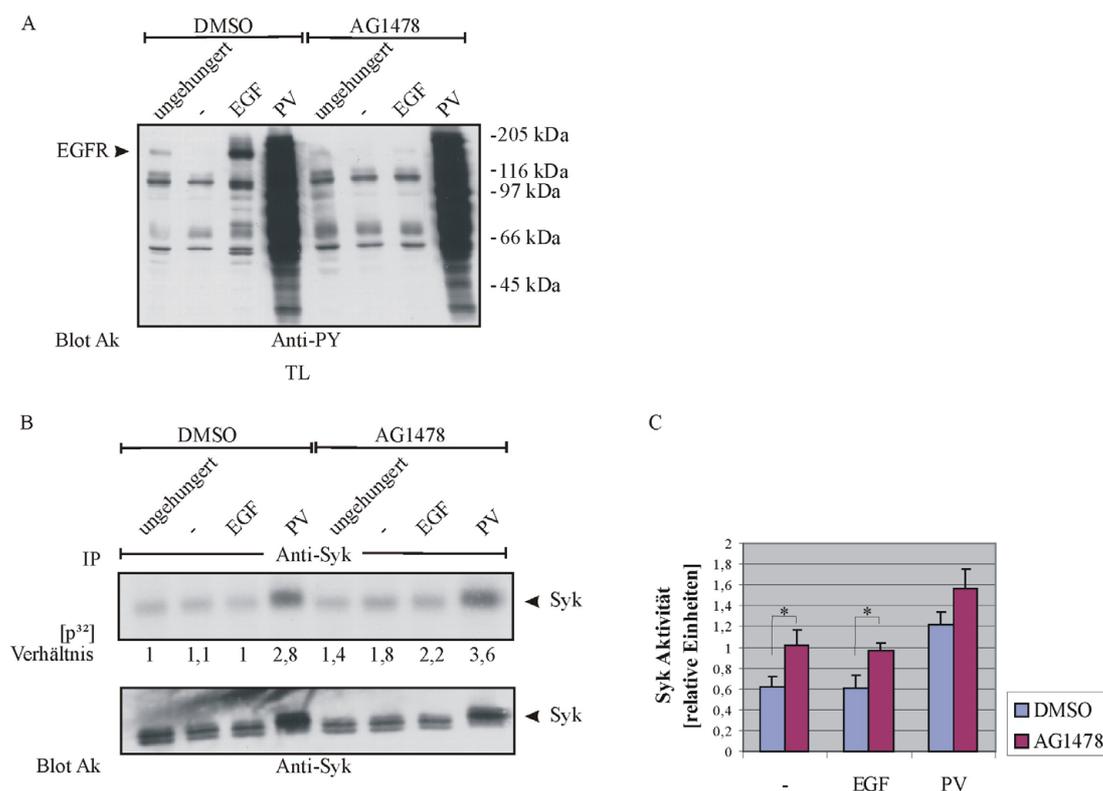


Abb. 33: Erhöhte Autokinaseaktivität von Syk unter Einfluss von AG1478 in MCF-10A Zellen. MCF-10A Brustepithelzellen wurden für 24 h in serumfreiem bzw. normalem Medium kultiviert, für 20 min mit AG1478 (250 nM) inkubiert und anschließend für 5 min mit 20 ng/ml EGF bzw. für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. *A*, 50 µg des Totallysates (TL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-Antikörpern analysiert. *B*, die Autokinaseaktivität von immunpräzipitiertem Syk wurde im *in vitro* Kinaseassay und anschließender Autoradiografie bzw. vergleichbare Mengen an immunpräzipitiertem Syk im Westernblot mit Anti-Syk-Antikörpern nachgewiesen und quantifiziert, wobei die Resultate aus der Autoradiografie gegenüber der Menge an immunpräzipitiertem Syk normalisiert wurden. *C*, dargestellt ist das Ergebnis der *in vitro* Autokinaseaktivität von Syk aus 3 verschiedenen Experimenten (es gingen nur Resultate von Zellen nach Serumentzug und EGF- bzw. Pervanadat-Stimulation in die Auswertung ein). Die Resultate aus der Autoradiografie wurden gegenüber der Menge an immunpräzipitiertem Syk normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± der S.A. für n = 3. *Werte sind signifikant verschieden. * bedeutet p < 0,05

Die Erhöhung der Kinaseaktivität von Syk durch die chemische Inhibition der EGFR-Kinase sollte zusätzlich in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 nachgewiesen werden. Dazu wurden MDA-MB-468 Zellen unter Serumentzug kultiviert. Vor der Stimulation mit EGF bzw. Pervanadat wurden die Zellen mit AG1478, zur Inhibition der EGFR-Kinase, bzw. mit Piceatannol zur Unterdrückung der Kinaseaktivität von Syk, einzeln oder zusammen inkubiert. Anschließend wurde die Autokinaseaktivität von immunpräzipitiertem Syk im *in vitro* Kinaseassay und anschließender Autoradiografie bzw. vergleichbare Mengen an immunpräzipitiertem Syk nachträglich im Immunoblot nachgewiesen. Wie die Abbildung 34 zeigt, bewirkte die

Inhibition der EGFR-Kinase nach Serumentzug und EGF-Stimulation auch in MDA-MB-468 Zellen eine Zunahme der Kinaseaktivität von Syk, die durch die Piceatannolzugabe inhibiert werden konnte. Interessanterweise konnte in diesen Zellen nach EGF-Stimulation eine Reduktion der Kinaseaktivität von Syk nachgewiesen werden. Die Daten ließen auf eine mögliche Wechselbeziehung zwischen aktiviertem EGFR und Syk schließen, so dass eine potentielle Funktion von Syk als Modulator von EGF-abhängiger Signalvermittlung postuliert werden konnte.

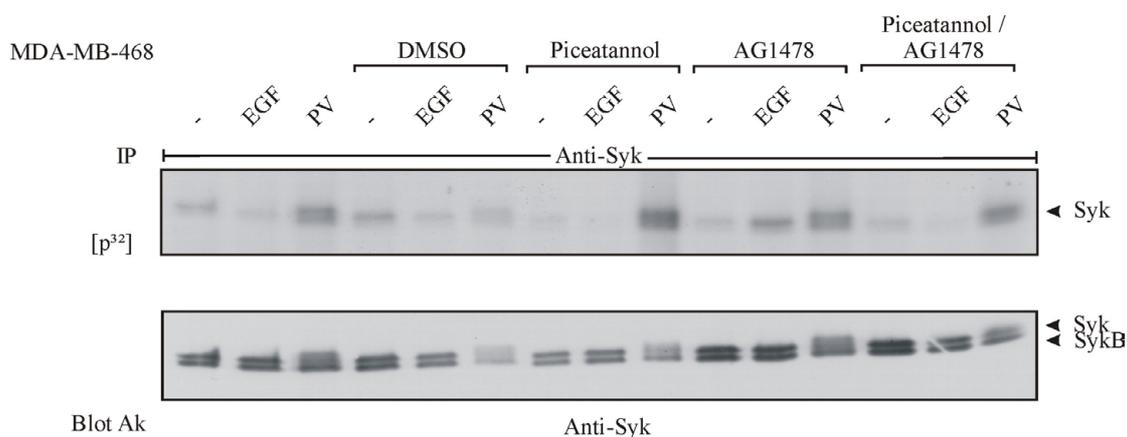


Abb. 34: Erhöhte Autokinaseaktivität von Syk unter Einfluss von AG1487 in MDA-MB-468 Zellen. MDA-MB-468 Brustkrebszellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Vor der Stimulation mit 20 ng/ml EGF für 5 min bzw. 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min wurden die Zellen wie angegeben für 1 h mit Piceatannol (10 µg/ml) und für 20 min mit AG1478 (250 nM) inkubiert. Die Autokinaseaktivität von immunopräzipitiertem Syk wurde im *in vitro* Kinaseassay und anschließender Autoradiografie bzw. vergleichbare Mengen an immunopräzipitiertem Syk im Westernblot mit Anti-Syk-Antikörpern nachgewiesen.

3.3.2.2 Autokatalytische Aktivität von exogenem Syk in MCF-10A Zellen

Es sollte nun die Tyrosinphosphorylierung und damit die Aktivität von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante von Syk unter Einfluss von EGF-abhängiger Stimulation überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden MCF-10A Zellen mit stabiler Expression von Syk bzw. katalytisch-inaktivem Syk (Syk K-) mit VSV-Epitop und die entsprechenden Kontrollzellen (Mock) unter normalen Bedingungen bzw. unter Serumentzug kultiviert und anschließend mit EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Immunpräzipitiertes Syk wurde im Westernblot auf Tyrosinphosphorylierung hin untersucht. Dabei zeigte erwartungsgemäß nur der Wildtyp im Vergleich zur katalytisch-inaktiven Mutante maximale Aktivität nach Pervanadat-Stimulation, die aufgrund der erhöhten Autophosphorylierungsaktivität

von exogenem Syk im Immunoblot mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Abb. 35). Im Gegensatz dazu unterschieden sich Wildtyp und Mutante nach Serumentzug und EGF-Stimulation nicht hinsichtlich ihrer nachweisbaren Tyrosinphosphorylierung. Letzteres wies auf eine Tyrosinphosphorylierung von Syk durch andere Proteinkinasen hin, was anscheinend eine Inaktivierung von exogenem Syk zur Folge hatte. Aufgrund der hohen konstitutiven autokatalytischen Aktivität von exogenem Syk im *in vitro* Kinaseassay konnte der Einfluss von AG1478 auf die Aktivität von Syk nicht überprüft werden (Daten nicht gezeigt). Desweiteren schien sich die katalytisch-inaktive Mutante nicht hinreichend dominant-negativ auf die Aktivität von endogenem Syk auszuwirken, da die nachweisbare Tyrosinphosphorylierung von Syk nach Pervanadat-Stimulation durch die Anwesenheit von katalytisch-inaktivem Syk nicht reduziert werden konnte.

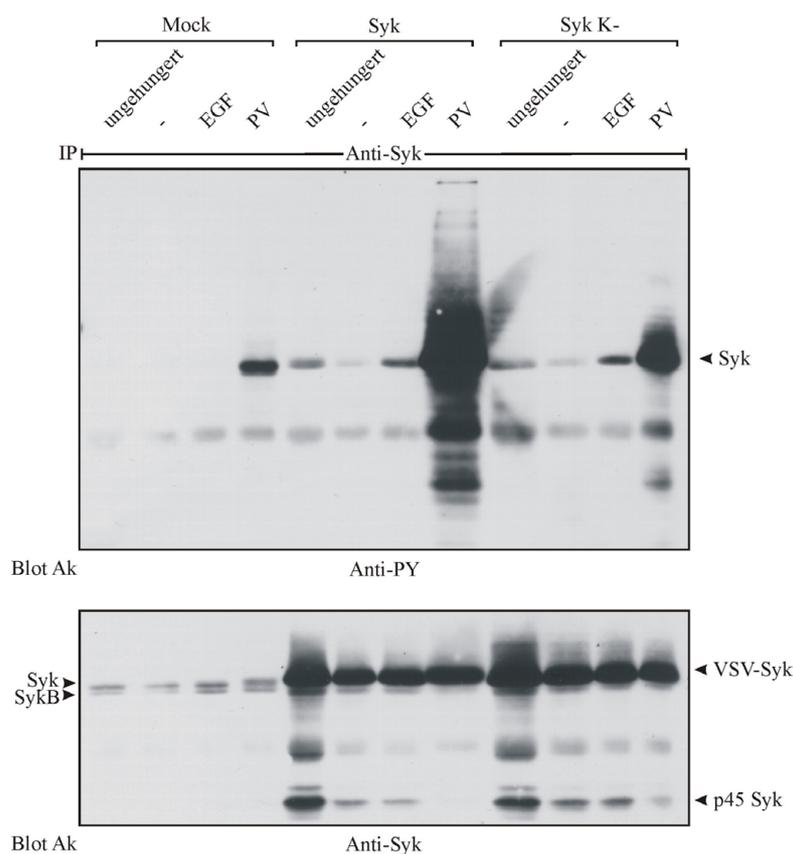


Abb. 35: Tyrosinphosphorylierung von exogenem Syk in MCF-10A Zellen. MCF-10A Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) mit VSV-Epitop oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurden polyklonale G418-resistente MCF-10A Zellen für 24 h in serumfreiem bzw. normalem Medium kultiviert und anschließend mit 20 ng/ml EGF für 5 min bzw. 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min stimuliert. Nach der Lyse wurden Anti-Syk-Immunopräzipitate im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-Syk-Antikörpern untersucht.

3.3.3 Untersuchungen zur Assoziation von Syk und EGFR

Ein Ziel der Charakterisierung von Syk war es, mögliche Bindungspartner und Substrate zu identifizieren, die eine Wechselbeziehung von Syk und EGFR ermöglichen. Dies könnte letztendlich vorangegangene Daten, die zeigten, dass Syk negativ-regulierend in die EGFR-vermittelte Signaltransduktion eingreift, bestätigen.

3.3.3.1 *In vitro* Assoziation von Syk und EGFR

Um Proteine zu identifizieren, die mit Syk assoziieren, wurden Präzipitationen mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Hierzu wurden sowohl GST-Syk- als auch GST-SH2-(NC)-Fusionsproteine eingesetzt. Im letztgenannten Konstrukt wurden nur die beiden SH2-Domänen von Syk zusammen mit GST exprimiert, da aus zahlreichen Veröffentlichungen bekannt war, dass Syk über seine SH2-Domänen mit diphosphorylierten Bindemotiven adaptorischer Proteine der Immunglobulinrezeptoren interagieren kann und so zur Zellmembran rekrutiert wird (Sada et al., 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch bei der Syk-vermittelten Signalgebung in Epithelzellen vermutet. Zunächst sollten die aufgereinigten GST-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften überprüft werden, um Aufschluss über deren korrekte Faltung zu erhalten. Dazu wurden NIH3T3 Zellen, die exogenes SIRP β 1 und DAP-12 stabil exprimierten, verwendet, da bekannt war, dass Syk über spezielle diphosphorylierte Bindemotive der DAP-12 Proteine die SIRP β 1-abhängige Signalgebung in humanen Monozyten vermittelt (Tomasello et al., 2000). Um eine Tyrosinphosphorylierung der DAP-12 Proteine zu garantieren wurden die NIH3T3 Zellen mit Pervandat zur irreversiblen Hemmung von Tyrosinphosphatasen behandelt und anschließend lysiert. Die GST-Syk- und GST-SH2(NC)-Präzipitate wurden dann im Immunoblot auf die Anwesenheit von SIRP β 1 und DAP-12 überprüft. Zur Kontrolle auf Spezifität wurden ebenfalls GST-Präzipitate analysiert. Wie die Abbildung 36 zeigt, konnten alle GST-Fusionsproteine eindeutig nachgewiesen werden, wobei GST-SH2(NC) die stärkste Degradation aufwies. Nach Pervanadat-Stimulation konnten sowohl tyrosinphosphoryliertes DAP-12 als auch SIRP β 1 in den GST-Syk- und GST-SH2(NC)- jedoch nicht in den GST-Präzipitaten detektiert werden, so dass eine korrekte Faltung der Fusionsproteine bestätigt werden konnte.

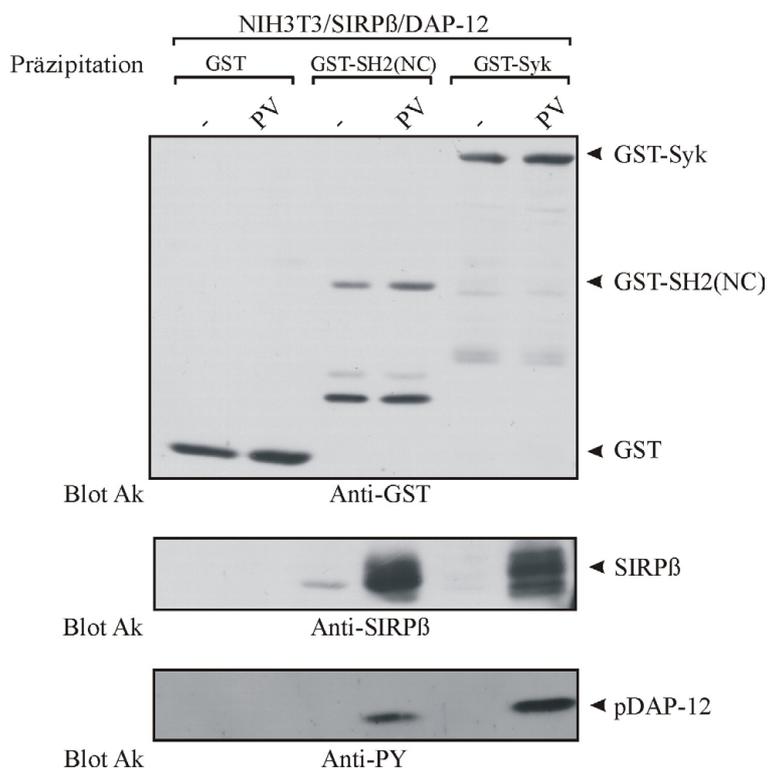


Abb. 36: Test der GST-Fusionsproteine im GST-Präzipitationsexperiment. NIH 3T3 Mausfibroblastenzellen, die SIRPβ und DAP-12 stabil exprimierten, wurden für 24 h gehungert und mit 1 mM Pervanadat (PV) für 10 min stimuliert. Anschließend wurden gleiche Mengen der Zelllysate mittels GST-Protein und GST-SH2(NC)- bzw. GST-Syk-Fusionsproteinen präzipitiert und im Westernblot mit Anti-GST-, Anti-SIRPβ- und Anti-Phosphotyrosin (PY)-Antikörpern zu Nachweis von DAP-12 untersucht.

Da Syk anscheinend die EGFR-vermittelte Signaltransduktion beeinflusste, sollte im Folgenden überprüft werden, ob auch tyrosinphosphorylierter EGFR in *in vitro* GST-SH2(NC)-Präzipitationsanalysen nachgewiesen werden könnte. Dazu wurden HEK 293 Zellen mit Konstrukten zur transienten Expression des EGFRs transfiziert und anschließend zusammen mit den entsprechenden Kontrollzellen (Mock) mit EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Dabei konnte tyrosinphosphorylierter EGFR nur mit den GST-SH2(NC)-Fusionsproteinen jedoch nicht mit GST allein präzipitiert werden (Abb. 37). Allerdings konnte endogener tyrosinphosphorylierter EGFR nur nach Pervanadat-Stimulation in den GST-SH2(NC)-Präzipitaten nachgewiesen werden. Das Ergebnis deutete auf eine transiente und indirekte Interaktion von Syk und EGFR hin, die anscheinend über die SH2-Domänen von Syk und andere Proteine vermittelt wurde.

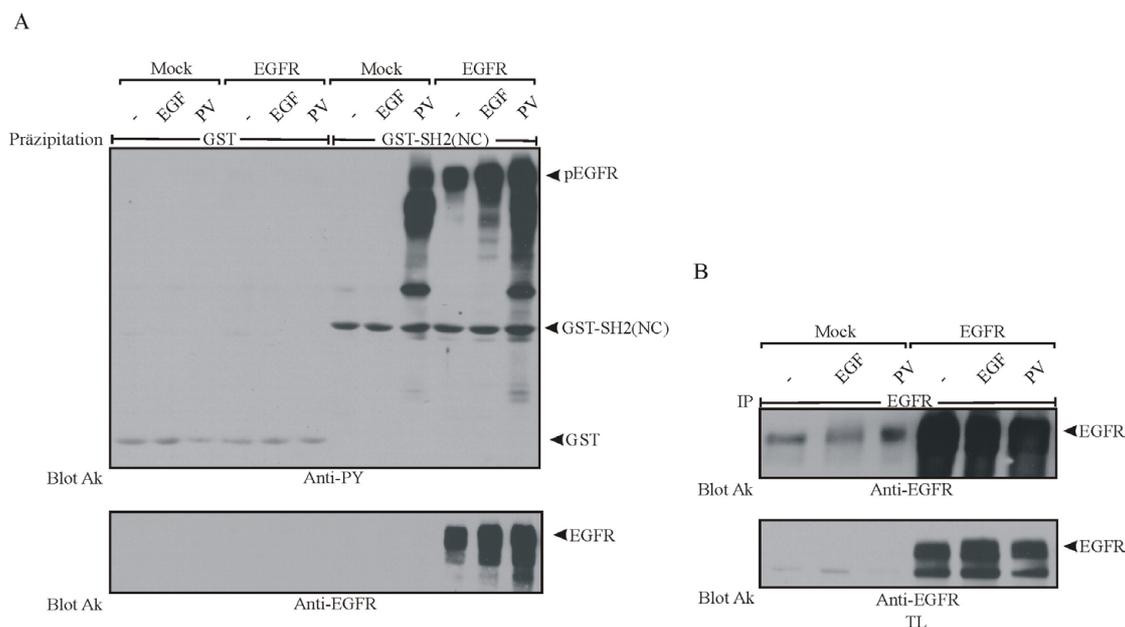


Abb. 37: *In vitro* Assoziation der Syk SH2-Domänen mit dem EGFR in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für den humanen EGFR vom Wildtyp oder dem Kontrollplasmid (Mock) transfiziert, für 24 h gehungert und anschließend für 5 min mit 20 ng/ml EGF bzw. für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. A, GST- und GST-SH2(NC)-Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-EGFR-Antikörpern untersucht. B, Anti-EGFR-Immunopräzipitate (*oberer Bereich*) und 25 µg des Totallysates (TL) (*unterer Bereich*) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-EGFR-Antikörpern analysiert.

Um eine biologisch relevante Wechselwirkung von Syk und EGFR in Brustepithelzellen aufzudecken, sollte der EGFR aus Totallysaten verschiedener Brustkrebszelllinien, die sich in ihrer endogenen Expression des EGFRs unterschieden, mittels GST-SH2(NC)-Fusionsproteinen präzipitiert werden. Dazu wurden die Brustkrebslinien DU-44-75, BT-20, MDA-MB-468 und MDA-MB-175 mit Pervanadat stimuliert und wie in Abbildung 38 dargestellt, mit GST-SH2(NC)-Fusionsproteinen präzipitiert. Nach der Pervanadat-Stimulation konnte eine Reihe an tyrosinphosphorylierten Proteinen in den GST-SH2(NC)-Präzipitaten nachgewiesen werden. Tyrosinphosphorylierter EGFR konnte jedoch nur aus Brustkrebszelllinie MDA-MB-468, die die stärkste endogene Expression des EGFRs zeigte, präzipitiert werden. Im Anti-EGFR-Immunoblot konnte der EGFR jedoch in allen GST-SH2(NC)-Präzipitaten detektiert werden. Letzteres deutete auf eine konstitutive stimulationsunabhängige Wechselwirkung von Syk und EGFR *in vitro* hin, die anscheinend über die SH2(NC)-Domänen von Syk vermittelt wurde.

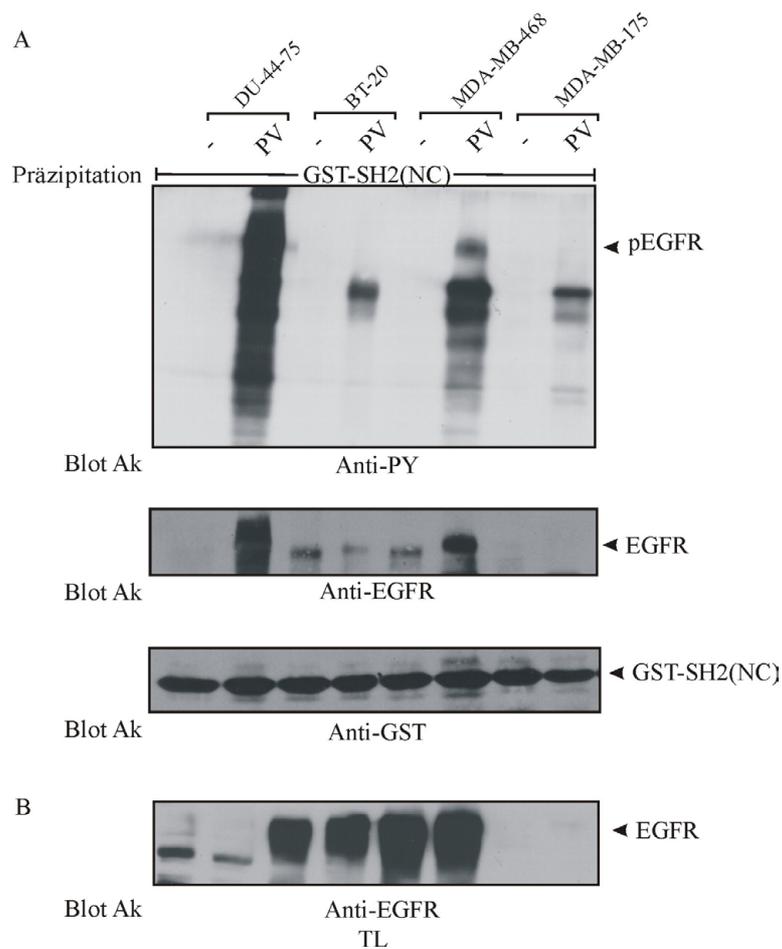


Abb. 38: *In vitro* Assoziation von Syk SH2-Domänen und EGFR in Brustkrebszellen. Verschiedene Brustkrebszellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehungert und für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. A, GST-SH2(NC)-Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR- und Anti-GST-Antikörpern untersucht. B, 50 μ g des Totallysates (TL) wurden in der Westernblotanalyse mit Anti-EGFR-Antikörpern analysiert.

3.3.3.2 *In vivo* Assoziation von Syk und EGFR

Die Ergebnisse aus den GST-Präzipitationsanalysen sollten nun *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurden sowohl die Syk-positiven Brustlinien BT-20 und MCF-10A als auch die Syk-negative invasive Brustkrebszelllinie BT-549 mittels Pervanadat stimuliert und in Anti-Syk-Immunopräzipitationsanalysen eingesetzt. Die Untersuchungen ergaben, dass der EGFR aus MCF-10A Zellen nur nach Pervandat-Stimulation mit Syk koimmunopräzipitierte (Abb. 39). Im Gegensatz dazu, konnte in BT-20 Zellen eine von der Tyrosinphosphorylierung unabhängige konstitutive Assoziation von Syk und EGFR nachgewiesen werden, was vorangegangenen Daten

bestätigte. Wie erwartet, konnte kein EGFR in den Anti-Syk-Immunopräzipitaten der Syk-negativen BT-549 Zellen detektiert werden.

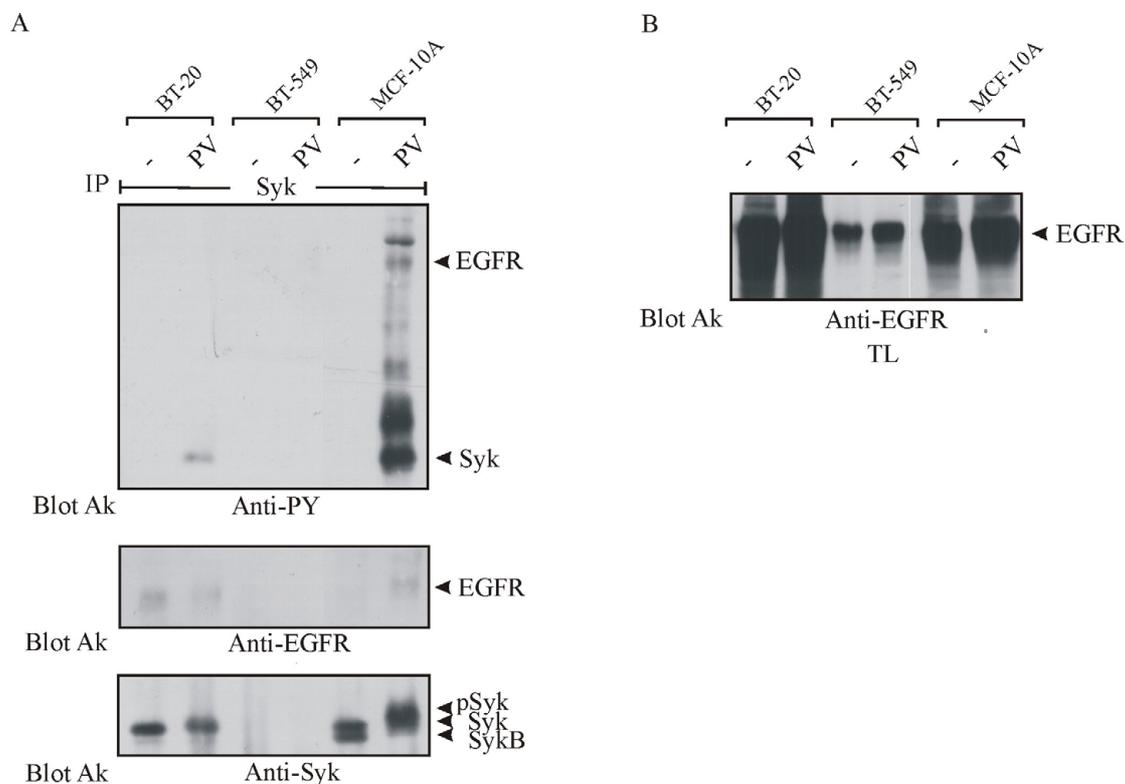


Abb. 39: *In vivo* Assoziation von Syk und EGFR in Brustkrebszellen. Verschiedene Brustkrebszelllinien wurden für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. A, Anti-Syk-Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR- und Anti-Syk-Antikörpern untersucht. B, 50 µg des Totallysates (TL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-EGFR-Antikörpern analysiert.

Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, ob Syk in den Anti-EGFR-Immunopräzipitaten nachgewiesen werden könnte. Dazu wurden die Brustkrebszelllinien MDA-MB-486 und BT-549 in normalem Medium bzw. unter Serumentzug kultiviert und mittels EGF bzw. Pervanadat stimuliert. Die Anti-EGFR- bzw. Anti-Syk-Immunopräzipitate wurden anschließend auf Syk bzw. den EGFR analysiert. Dabei konnte Syk in allen Anti-EGFR-Immunopräzipitaten der Syk-positiven MDA-MB-468 Zellen nachgewiesen werden, wobei beide Isoformen von Syk am stärksten aus Totallysaten ungehungerter Zellen koimmunopräzipitierten (Abb. 40). Der Serumentzug schien sich auf die Bindung der SykB Isoform auszuwirken, da aus den Totallysaten gehungerter Zellen hauptsächlich Syk(L) mit dem EGFR kopräzipitierte. Dagegen konnte der EGFR in den Anti-Syk-

Immunopräzipitaten nur nach Pervanadat Stimulation detektiert werden, was wahrscheinlich auf die unterschiedliche Qualität der eingesetzten Antikörper zurückzuführen war. In den Anti-EGFR- bzw. Anti-Syk-Immunopräzipitaten aus BT-549 Zellen konnte erwartungsgemäß kein Syk nachgewiesen werden. Zusammengenommen deuteten die Resultate auf eine transiente und indirekte Wechselwirkung von Syk und EGFR in Brustepithelzellen *in vivo* hin.

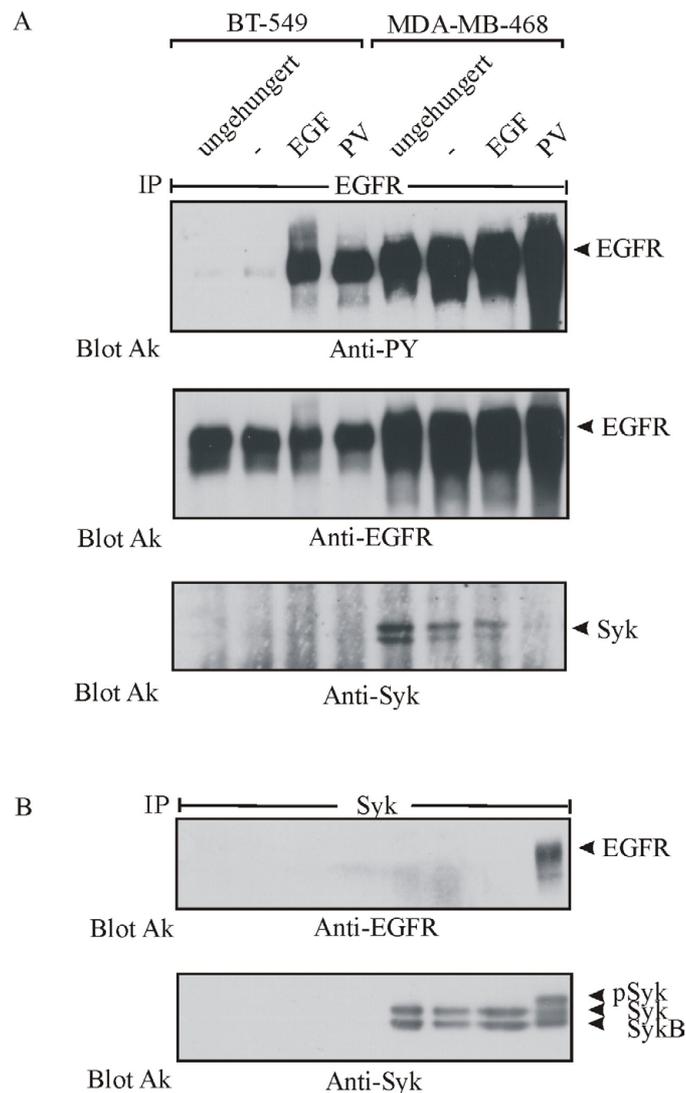


Abb. 40: *In vivo* Assoziation von Syk und EGFR in MDA-MB-468 Brustkrebszellen. Syk-negative BT-549 und Syk-positive MDA-MB-468 Brustkrebszelllinien wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehungert bzw. in normalem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 20 ng/ml EGF bzw. für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. *A*, Anti-EGFR-Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-EGFR- und Anti-Syk-Antikörpern untersucht. *B*, Anti-Syk-Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mittels Anti-EGFR- und Anti-Syk-Antikörpern analysiert.

3.4 Untersuchungen zur Funktion von exogenem Syk in der Syk-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S

Wie Coopman und Kollegen bereits zeigten, bewirkt die Expression von Wildtyp Syk in Syk-negativen invasiven Brustkrebszellen eine signifikante Inhibition von Tumorprogression und Metastasierung dieser Zellen (Coopman et al., 2000). Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, wie sich die Expression von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante auf die EGF-vermittelte Signalgebung von Syk-negativen Brustkrebszellen sowie deren Migration auswirken.

3.4.1 Einfluss der exogenen Expression von Syk auf die Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc in MDA-MB-435S Zellen

Es sollte zunächst überprüft werden, ob die Reexpression von Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante die EGF-abhängige Signalgebung von MDA-MB-435S Zellen beeinflusst, die infolge von Promotorhypermethylierung des *syk*-Gens kein endogen exprimiertes Syk aufweisen (Yuan et al., 2001). Dazu wurden zunächst polyklonale MDA-MB-435S Zellen mit stabiler Expression von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) mit VSV-Epitop und die entsprechenden Kontrollzellen (Mock) unter Serumentzug kultiviert und anschließend auf deren Gesamttyrosinphosphorylierung bzw. auf tyrosinphosphoryliertes Shc untersucht. MDA-MB-435S Brustkrebszellen exprimierten nur geringe Mengen an EGFR (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte nur eine schwache Gesamttyrosinphosphorylierung nach EGF-Stimulation nachgewiesen werden, die jedoch in Zellen mit exogener Expression von Syk in Unabhängigkeit von der Kinaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert war (Abb. 41A). Dies konnte zusätzlich durch den Nachweis der reduzierten Aktivierung der MAP-Kinase Erk in Zellen mit exogener Expression von Syk bzw. Syk K- bestätigt werden. Im Gegensatz dazu, wurden infolge der Syk Expression nach Pervanadat-Stimulation mehr tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen. Die Expression der katalytisch-inaktiven Mutante von Syk bewirkte dagegen einen verringerten Gesamtphosphotyrosingehalt nach Pervanadat-Behandlung. Die exogene Expression

der Syk-Mutante bewirkte anscheinend deren Bindung mit potentiellen Substraten von Syk, die jedoch infolge der mangelnden Substratumsetzung assoziiert blieben und weder von Syk noch von anderen Proteinkinasen tyrosinphosphoryliert werden konnten. Dadurch schien die katalytisch-inaktive Mutante auch eine reduzierte EGF- bzw. Pervanadat-abhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc zu bewirken (Abb. 41B). Im Gegensatz dazu konnte durch die Expression von Syk vom Wildtyp die stärkste Tyrosinphosphorylierung von Shc in MDA-MB-435S Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise schien die Anwesenheit von Syk in Unabhängigkeit von seiner Kinasedomäne die p66-Shc Isoform zu stabilisieren, die in den Kontrollzellen nur schwach detektiert werden konnte. Die Daten konnten vorangegangene Ergebnisse in Bezug auf den bereits postulierten Einfluss von Syk auf die Phosphorylierung und/oder –Stabilität von Shc bestätigen.

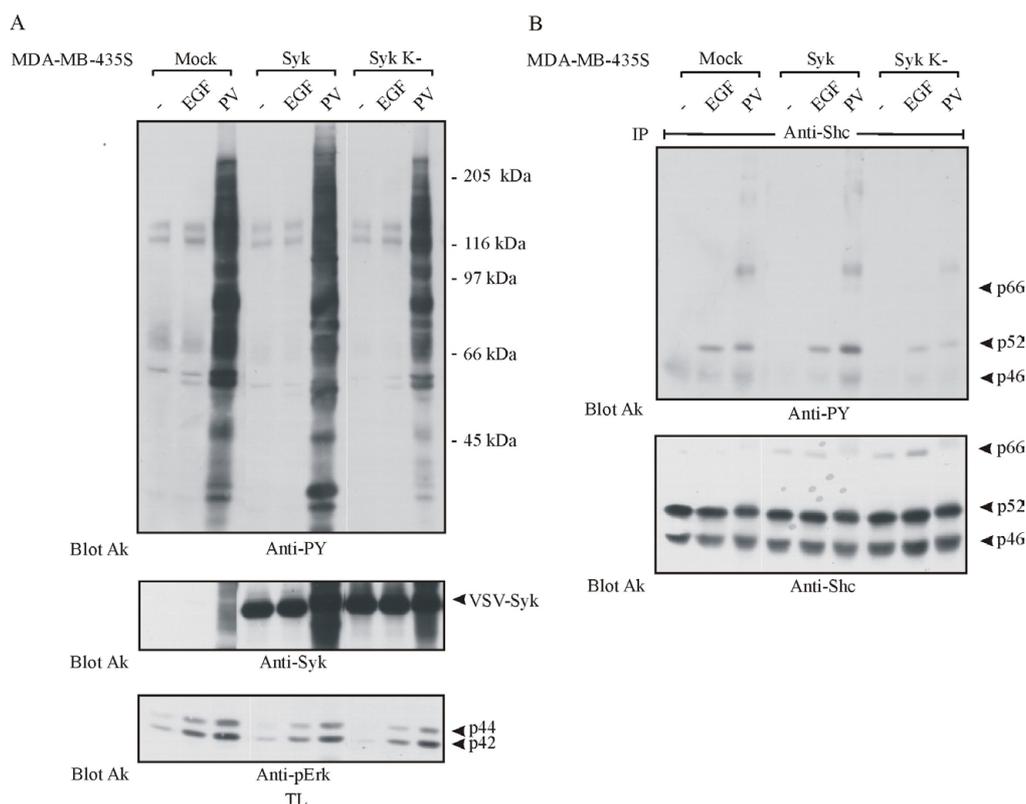


Abb. 41: Einfluss der exogener Expression von Syk in MDA-MB-435S Zellen. MDA-MB-435S Brustkrebszellen wurden mit retroviralen Expressionskonstrukten für humanes Syk vom Wildtyp, einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurden G418-resistente polyklonale MDA-MB-435S Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehungert und für 5 min mit 20 ng/ml EGF bzw. für 10 min mit 1 mM Pervanadat (PV) stimuliert. A, 50 µg des Totallysates (TL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-Syk- und Anti-Phospho-Erk- (pErk) Antikörpern untersucht. B, Anti-Shc-Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-Shc-Antikörpern analysiert.

3.4.2 Einfluss der Reexpression von Syk auf das Invasionsvermögen von MDA-MB-435S Zellen

Das Durchdringen von Basallamina stellt eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen dar. Dazu interagieren diese über Rezeptoren, die in der zellulären Adhäsion eine Rolle spielen, wie z.B. Integrine oder Proteoglykane, mit Komponenten der Basallamina (Friedl and Wolf, 2003). Im Folgenden sollte die biologische Konsequenz der exogenen Expression von Syk auf das Invasionsvermögen der Tumorzelllinie MDA-MB-435S überprüft werden, die als Modellsystem für Tumorzellinvasion etabliert wurde (Thompson et al., 1992). Matrigel Matrix wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom der Maus gewonnen und enthält nicht nur die Komponenten extrazellulärer Matrix, wie Kollagene, Laminin und Proteoglykane, sondern auch Matrix-degradierende Enzyme bzw. deren Antagonisten sowie Wachstumsfaktoren (Kleinman et al., 1982). Gepoolte MDA-MB-435S Zellklone mit stabiler Expression von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) sowie die entsprechenden Kontrollzellen (Mock) wurden in normalem Medium auf Matrigel ausgesät und zufällig gewählte Bereiche nach 10 Tagen in 10- und 32facher Vergrößerung fotografiert. Dabei konnten die Daten von Coopman und Kollegen bestätigt werden, die zeigten dass die Expression von Syk die Bildung von invasiven Kolonien in Matrigel Matrix verhindert (Abb. 42) (Coopman et al., 2000). Die Kontrollzellen bildeten Kolonien mit invasiver Morphologie, in denen einzelnen Zellen in das umgebende Matrigel eindringen (Abb. 42 A-F). Im Gegensatz dazu zeigten Syk-exprimierende Kolonien eher scharf abgegrenzte, traubenförmige und nicht invasive Kolonien (Abb. 42 G-L). Die stabile Expression von katalytisch-inaktivem Syk war jedoch nicht hinreichend um den invasiven Phänotyp der MDA-MB-435S Zellen zu supprimieren (Abb. 42 M-R).

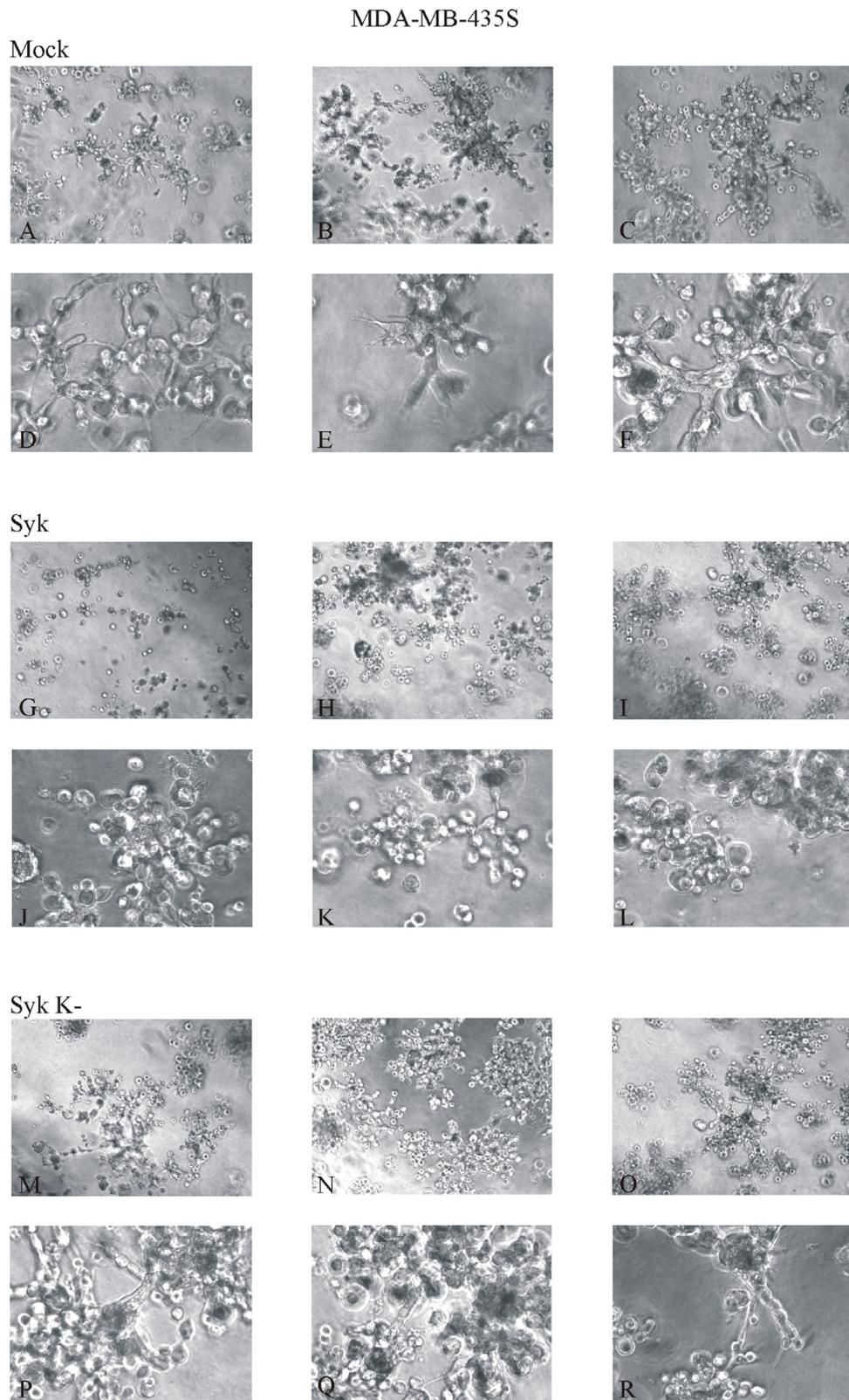


Abb. 42: Einfluss der exogenen Expression von Syk auf das Wachstum von MDA-MB-435S Zellen in Matrigel Matrix. MDA-MB-435S Brustkrebszellen wurden mit retroviralen Expressionskonstrukten für humanes Syk vom Wildtyp (G-L), einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) (M-R) oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) (A-D) infiziert. Nach der Selektion wurden G418-resistente MDA-MB-435S Zellklone gepoolt und auf Matrigel Matrix beschichtete 96-Loch-Platten in normalem Medium ausgesät (5000 Zellen pro Loch). Nach 10 Tagen wurden zufällig gewählte Bereiche in 10- bzw. 32facher Vergrößerung fotografiert.

3.4.3 Untersuchung zur Migration von MDA-MB-435S Zellen mit reexprimiertem Syk

Damit sich Tumorzellen in einem Gewebe ausbreiten können, müssen sie die Fähigkeit zur Migration erlangen. Dabei unterscheidet sich die Migration von Tumorzellen mechanistisch kaum von jener Migration, die physiologische Prozesse durch nichttransformierte Zellen, wie z.B. Wundheilung, ermöglichen. (Friedl and Wolf, 2003). Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Expression von Syk ausreicht, um auch das Migrationsvermögen von MDA-MB-435S Zellen zu inhibieren. Für diese Untersuchungen wurden MDA-MB-435S Zellklone mit stabiler Expression von exogenem Syk bzw. einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) gepoolt und im *Transwell*-Versuch hinsichtlich ihrer Migration im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Mock) überprüft. Die Zellen wurden dazu auf unbeschichtete *Transwells* unter Serumentzug ausgesät, wobei serumhaltiges Medium als chemischer Lockstoff diente. Die migrierten Zellen wurden nach 16 Stunden an der Unterseite der *Transwells* mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bestimmt. In der Abbildung 43 ist das Ergebnis aus 6 verschiedenen Experimenten dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Migration von MDA-MB-435S Zellen durch die Expression von exogenem Syk signifikant inhibiert werden konnte. Die Expression einer katalytisch-inaktiven Mutante war dagegen nicht hinreichend, um die Migration von MDA-MB-435S Zellen zu supprimieren. Diese Ergebnisse bestätigten vorangegangene Daten dahingehend, dass die Anwesenheit von katalytisch-aktivem Syk ausreicht, um den invasiven Phänotyp von MDA-MB-435S Zellen im Matrigelwachstumsassay zu inhibieren. Die Resultate widersprechen jedoch den Daten von Wang und Kollegen, die keinen Effekt von Syk auf die Migration von MDA-MB-435S Zellen nachweisen konnten, was möglicherweise auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückgeführt werden kann (Wang et al., 2003).

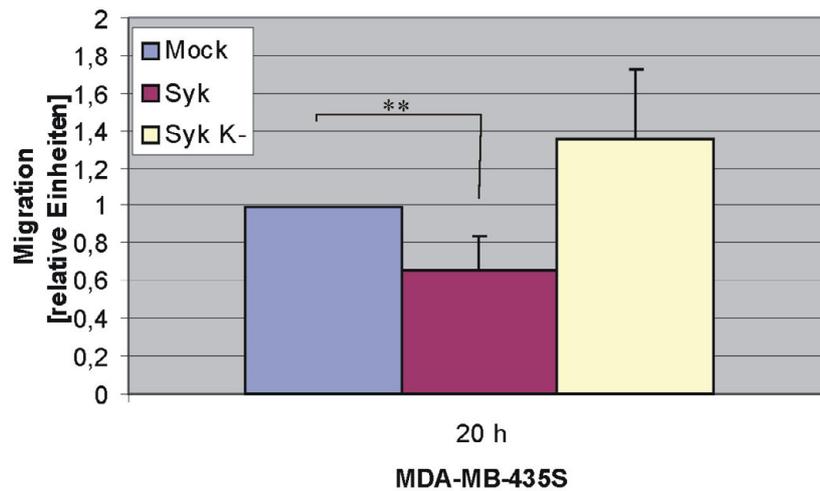


Abb. 43: Reduzierte Migration von MDA-MB-435S Zellen mit reexprimiertem Syk. Syk-negative MDA-MB-435S Brustkrebszellen wurden mit retroviralen Expressionskonstrukten für humanes Syk vom Wildtyp, einer katalytisch-inaktiven Mutante (Syk K-) oder einem leeren Kontrollvektor (Mock) infiziert. Nach der Selektion wurden G418-resistente MDA-MB-435S Klone gepoolt, in *Transwells* kultiviert und die Migration nach 20 h bestimmt. Es ist das Ergebnis aus 6 verschiedenen Experimenten dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für $n = 6$. **Werte sind signifikant verschieden. ** bedeutet $p < 0,01$

4 Diskussion

Um grundlegende zelluläre Ereignisse wie Wachstum, Migration oder Differenzierung zu ermöglichen, muss das Gleichgewicht von Aktivierung und Inaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren ständiger und genauer Regulation unterworfen sein. Die Rezeptoren der EGFR-Familie vermitteln biologische Funktionen einer ganzen Reihe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, und regulieren eines der biologisch potentesten Systeme auto- und parakriner Signaltransduktion (Schlessinger, 2000). Die Deregulation solcher Prozesse, z.B. durch unkontrollierte Kinaseaktivität, begünstigt die Entstehung hyperproliferativer Erkrankungen, wie z.B. Krebs (Jost et al., 2000; Zwick et al., 2002). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass der Phosphorylierungsstatus und die Signalgebung von RTKs nicht nur durch ihre Kinaseaktivität sondern in gleichem Maße durch die Aktivität von antagonistisch wirkenden Proteinen bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Hinweise dafür, dass die Proteintyrosinkinase (PTK) Syk eine negativ-regulatorische Funktion in der EGFR-abhängigen Signaltransduktion in humanen Brustepithelzellen vermittelt.

Im Verlauf dieser Arbeit konnten die von Coopman und Kollegen veröffentlichten Daten hinsichtlich des Nachweises der Syk Expression in nichthämatopoetischen Zellen bestätigt werden (Coopman et al., 2000). Coopman und Kollegen postulierten, dass Syk tumorsuppressive Eigenschaften besitzt, die das Tumorstadium und die Metastasierung von Brustkrebszellen beeinträchtigen (Coopman et al., 2000). Die biologische Funktion von Syk bei der Regulation spezifischer physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozesse außerhalb des hämatopoetischen Systems ist bis heute nur unzureichend geklärt. Darauf beruhend, wurden in dieser Arbeit zunächst Vorkommen und katalytische Aktivität von Syk in Zellen epithelialen Ursprungs analysiert, sowie dessen Funktion in der Wachstumsfaktor-vermittelten Signaltransduktion in normalen und transformierten humanen Brustepithelzellen untersucht. Die Resultate sollen im Folgenden im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit postulierten Rolle von Syk als potentieller Negativregulator der EGF-abhängigen Signalvermittlung in Brustepithelzellen diskutiert werden.

4.1 Vorkommen und Aktivität der PTK Syk in nichthämatopoetischen Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit war noch unzureichend geklärt, ob die PTK Syk ausschließlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass Syk homologe Proteine in Epithelialzellen von phylogenetisch älteren Metazoen wie *Hydra vulgaris* (Chan et al., 1994) und *Drosophila* (Fernandez et al., 2000) vorhanden sind. Flück und Kollegen detektierten Syk-Transkripte auch in der murinen Brustdrüse und bestätigten damit das Vorkommen von Syk in Zellen epithelialen Ursprungs in Säugern (Flück et al., 1995). Aus diesem Grund wurde eine weit verbreitete Expression und Funktion von Syk postuliert. Anhand von Daten aus Makro-Array Analysen, die zu Beginn dieser Arbeit vorlagen, konnten Transkripte von Syk in humanen Brustepithelzellen nachgewiesen und anschließend in Northernblotanalysen bestätigt werden (s. 3.1.1.1). Die cDNA-Filteranalysen ergaben Unterschiede in der Expression von Syk zwischen normalen bzw. schwach tumorigenen Brustzelllinien und invasiven Brustkrebszelllinien. Während in nichttransformierten und transformierten nicht-invasiven Brustzelllinien Syk-Transkripte nachweisbar waren, konnte in den invasiven Brustkrebszelllinien keine oder nur eine sehr geringe Expression von Syk detektiert werden. Diese Unterschiede wurden in den durchgeführten Westernblotanalysen noch deutlicher, denn in keiner der untersuchten invasiven Brustkrebszelllinien konnte Syk nachgewiesen werden (s. 3.1.1.2). Die Daten bestätigten Ergebnisse von Coopman und Kollegen, die zeigten, dass der Verlust von Syk mit erhöhten Tumorwachstum und Metastasierung von Brustkrebszellen korreliert (Coopman et al., 2000).

Wie in den Zellen des hämatopoetischen Systems nachgewiesen werden konnte (Latour et al., 1996; Latour et al., 1998), tritt Syk in Brustepithelzellen ebenfalls in zwei verschiedenen Isoformen, Syk (L, *long*) und SykB (S, *short*), auf, wobei in den verschiedenen Zelllinien keine Korrelation zwischen dem Auftreten der einen bzw. der anderen Isoform und krebisrelevanten Eigenschaften der Zellen getroffen werden konnten (s. 3.1.1.2). Dies steht im Widerspruch zu den von Wang et al. veröffentlichten Daten, die eine abweichende Expression der kürzeren Isoform von Syk, SykB, in Brustkrebszellen und Primärtumoren der Brust zeigten (Wang et al., 2003). Wang und Kollegen zeigten zusätzlich, dass Syk(L) mittels einer Kernlokalisationssequenz innerhalb der Interdomäne B, die in SykB infolge alternativen Spleißens zerstört wird, im Kern nachgewiesen werden kann. Die Kernlokalisierung von Syk(L) scheint dabei hinreichend zur Unterdrückung der Invasivität von Brustkrebszellen zu sein. Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation beider Isoformen von Syk konnte in

nichttransformierten Brustepithelzellen bestätigt werden (s. 3.1.3). MCF-10A Zellen exprimieren jedoch, entgegen der publizierten Daten von Wang et al., beide Isoformen in vergleichbaren Mengen.

Obwohl Coopman und Kollegen bereits zeigten, dass nach Pervanadat-Behandlung zur irreversiblen Inhibition von Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) tyrosinphosphoryliertes Syk in Brustepithelzellen nachweisbar ist und katalytische Aktivität *in vitro* besitzt, bleibt bis heute unklar, unter welchen physiologischen Bedingungen Syk im tyrosinphosphorylierten Zustand vorliegt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die katalytische Aktivität von Syk nach Pervanadat-Behandlung *in vitro* bestätigt werden. Ferner wurde gezeigt, dass Syk in nichttransformierten und transformierten Brustzelllinien basale autokatalytische Aktivität *in vitro* besitzt, die durch die Inhibition von PTPn maximal erhöht werden kann (s. 3.1.2 und 3.3.2.1). Letzteres ist wahrscheinlich auf die Dephosphorylierung von drei carboxyterminalen Tyrosinen (Y629-31) zurückzuführen, für die eine regulative Rolle in der Aktivierung von Syk angenommen wird. Es wird vermutet, dass über die Phosphorylierung dieser Tyrosine eine Interaktion des C-terminalen Bereichs mit den N-terminalen SH2-Domänen von Syk erfolgt, die in eine geschlossene Konformation resultiert. Erst die Interaktion der SH2-Domänen mit anderen tyrosinphosphorylierten Motiven bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins und ermöglichen so eine maximale Aktivierung der Kinase (Futterer et al., 1998). Hsueh und Kollegen zeigten, dass die Kinaseaktivität von Syk nicht hinreichend für die Signalvermittlung in B-Lymphozyten zu sein scheint, sondern die proximale Lokalisation des Enzyms zum B-Zell-Rezeptorkomplex für die Signaltransduktion benötigt wird (Hsueh et al., 2002). Ferner konnten Hsueh et al. eine Autokinaseaktivität von Syk ohne detektierbare Tyrosinphosphorylierung des Proteins nachweisen. Anhand der veröffentlichten und der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate wurde vermutet, dass Syk auch in Brustepithelzellen strenger Regulation durch PTPn unterworfen ist. Ob die Basalaktivität *in vitro* der biologischen Aktivität von Syk in Brustepithelzellen entspricht, kann nur spekuliert werden, wobei anscheinend auch nukleäres Syk katalytische Aktivität aufweist (S. Kumar, persönliche Mitteilung). Der Mangel an detektierbarer Tyrosinphosphorylierung von endogenem Syk bei gleichzeitig nachweisbarer Aktivität *in vitro* könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur ein sehr geringer Anteil an Syk in tyrosinphosphoryliertem Zustand in Brustepithelzellen vorhanden war, der unterhalb der Detektionsgrenze des eingesetzten Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers lag. Dieser Anteil reichte jedoch aus, um im *in vitro* Kinaseassay die Aktivierung weiterer Syk-Proteine zu vermitteln. Ungeklärt bleibt, welche Aminosäurereste unter physiologischen Bedingungen in Brustepithelzellen

phosphoryliert werden und ob diese eine Aktivierung bzw. Inaktivierung und/oder eine veränderte zelluläre Lokalisation von Syk bedingen.

Alle bekannten Tyrosinkinassen besitzen innerhalb der Kinasedomäne eine Struktur, den Aktivierungsloop, der zentrale Tyrosinreste enthält (Hubbard et al., 1994). Basierend auf Strukturanalysen wurde ein autoinhibitorischer Mechanismus zur Inaktivierung von Tyrosinkinassen postuliert (Hubbard et al., 1994). Eine maximale Aktivierung der Tyrosinkinassen setzt dabei die Phosphorylierung der Tyrosine im Aktivierungsloop voraus. Daraufhin bewegen sich Strukturen im Aktivierungsloop aus dem Aktivierungsbereich heraus und gewähren so den Zutritt von Substrat und ATP. Anhand von *in vitro* Untersuchungen zur Kinaseaktivität von rekombinatem Syk aus Insektenzellen konnten bereits zehn potentielle Autophosphorylierungsstellen identifiziert werden (Furlong et al., 1997). Die Phosphorylierung der Tyrosine im Aktivierungsloop erfolgt unter physiologischen Bedingungen, wie z.B. der Immunglobulinrezeptor-vermittelten Signalisierung in Lymphozyten, hauptsächlich durch Syk selbst und nur zum geringeren Teil durch die Aktivität von Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen (El-Hillal et al., 1997; Keshvara et al., 1998). Um weiteren Aufschluss über die Mechanismen zu erhalten, die eine Aktivierung von Syk ermöglichen, wurde die Phosphorylierung von exogenem Syk in Brustepithelzellen untersucht. Es wurde erwartet, dass sich aktivierende Phosphorylierungen auf die Autokinaseaktivität von exogenem Syk niederschlagen, und damit eine erhöhte nachweisbare Tyrosinphosphorylierung von exogenem Syk induziert werden kann, die sich jedoch nicht auf eine katalytisch-inaktive Mutante von Syk auswirken sollten. Interessanterweise konnten unter den gegebenen physiologischen Bedingungen keine Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung von exogenem Syk im Vergleich zur katalytisch-inaktiven Mutante nachgewiesen werden (s. 3.3.2.2). Nur durch die irreversible Inhibition von PTPn konnte die erwartete Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von Syk detektiert werden. So handelte es sich bei den nachgewiesenen Tyrosinphosphorylierungen von Syk unter den Bedingungen exogener Expression wahrscheinlich nicht um Phosphorylierungen der Tyrosine im Aktivierungsloop, die die autokatalytische Aktivität von Syk vermitteln (Zhang et al., 2000). Diese Ergebnisse belegen erneut, dass Syk in Brustepithelzellen unter physiologischen Bedingungen sowohl einer strengen Regulation durch PTPn als auch inaktivierenden Tyrosinphosphorylierungen unterworfen ist. Möglicherweise wird dadurch auch die zelluläre Lokalisation sowie die Stabilität von Syk reguliert. Es ist denkbar, dass für bestimmte Funktionen von Syk, nicht dessen katalytische Aktivität sondern eher adaptorische Eigenschaften essentiell sind. Dabei könnten phosphorylierte Tyrosine, die zumindest für

exogenes Syk nachgewiesen werden konnten, potentielle Bindestellen für Signalmoleküle darstellen, die durch eine Interaktion mit Syk in proximaler Nähe zum Signalkomplex lokalisiert werden. Infolge der exogener Expression von Syk konnte in Immunoblotanalysen ein Fragment von ca. 45 kDa nachgewiesen werden, das der katalytischen Domäne von Syk entspricht, und anscheinend durch die proteolytische Aktivität von Calpain erzeugt wurde (Baldock et al., 2000). Unklar bleibt, ob es sich dabei um einen Mechanismus zur Regulation der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Syk handelte, bzw. ob das Fragment als Folge der Überexpression von Syk innerhalb von Degradationsprozessen verstärkt generiert wurde.

Syk-Transkripte konnten bis heute in einer ganzen Reihe von verschiedenen Zellen und Geweben nachgewiesen werden (Yanagi et al., 2001b), was für eine weit verbreitete Expression und Funktion von Syk spricht, die jedoch zusätzlicher Aufklärung bedürfen.

4.2 Syk - ein Negativregulator EGFR-vermittelter Signaltransduktion?

Für Syk wurde bereits eine Funktion in der Brustkrebsprogression und Invasion impliziert (Coopman et al., 2000; Wang et al., 2003), über seine Funktion in normalen Mammaepithelialzellen ist jedoch bis heute wenig bekannt. Um näheren Aufschluss über die biologische Funktion of Syk zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob die physiologische Unterdrückung der Expression von Syk Wachstumsfaktor-abhängige Signalwege in normalen Brustepithelzellen beeinflusst. Dazu sollte die Expression von Syk in der nichttransformierten Brustzelllinie MCF-10A, die ein etabliertes Modellsystem für normale humane Brustzellen darstellt, mittels der RNA Interferenz Technologie unterdrückt werden. Diese Zelllinie konnte durch spontane Immortalisierung isoliert werden und ähnelt Primärkulturen von normalen humanen Mammaepithelialzellen, zum einen hinsichtlich ihrer strikten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, wie EGF und Insulin (Soule et al., 1990), und zum anderen in ihrem Unvermögen, Tumore im Nacktmausmodell zu bilden (Ram et al., 1995). So wurde erwartet, dass die stimulationsabhängigen Tyrosinphosphorylierungen von Syk-abhängigen Substraten nach supprimierter Expression von Syk reduziert waren. Überraschenderweise konnte nach der Reduktion der endogenen Syk-Level eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs und damit auch eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von EGFR-abhängigen Signalproteinen, wie c-Cbl bzw. Gab1, nachgewiesen werden (s. 3.2.1 und 3.2.2). Syk schien sich dabei nicht generell auf alle Mitglieder der EGFR-Familie auszuwirken, sondern spezifisch auf die EGFR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung, da keine Unterschiede im

Phosphorylierungsstatus von HER2 und HER3 nach Heregulin- β 1-abhängiger Stimulation von MCF-10A Zellen mit reduziertem Syk-Level nachgewiesen werden konnten (s. 3.2.2.2). Zwar konnte teilweise auch eine geringe Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von HER2 in den EGF-stimulierten Zellen mit reduzierter Syk-Expression beobachtet werden, was jedoch den Einfluss der gesteigerten Aktivierung des EGFRs in diesen Zellen widerspiegeln könnte. Vermutlich wurde HER2 infolge der Hyperaktivierung des EGFRs innerhalb der EGFR-HER2 Heterodimere in stärkerem Ausmaß transphosphoryliert.

Wan und Kollegen veröffentlichten, dass die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRn) in DT40 B-Zellen von Syk beeinflusst wird (Wan et al., 1996) und Tsuchida et al. postulierten für Syk eine essentielle Funktion in der Angiotensin II-vermittelten MAPK (mitogen-activated protein kinases)-Aktivierung (Tsuchida et al., 2000). Durch den Einsatz von AG1478 (Levitzki and Gazit, 1995) bzw. Batimastat (Prenzel et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach Reduktion der endogenen Syk-Level anscheinend durch dessen veränderte Kinaseaktivität verursacht wurde, jedoch nicht aus veränderter Metalloproteaseaktivität resultierte, über die die GPCR-vermittelte Transaktivierung des EGFR induziert wird (s. 3.2.1.3). So scheint die Reduktion von Syk hinreichend zu sein, um Mechanismen zu stören, die eine Inaktivierung des EGFRs induzieren. Dieser Effekt war in MCF-10A Zellen mit stabil reduziertem Syk im Vergleich zur transienten Reduktion von Syk eher moderat, was vermutlich auf die Komplexität der *in vivo* Situation zurückzuführen ist. So wurde vermutet, dass nichttransformierte Brustepithelzellen zur Regulation einer konstant erhöhten Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. über die Aktivierung von PTPn, befähigt sind. Es konnte jedoch auch unter den Bedingungen der stabilen Reduktion von Syk gezeigt werden, dass die Hyperphosphorylierung des EGFRs ebenfalls in eine erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase Erk bzw. der anti-apoptisch wirkenden Proteinkinase Akt (Datta et al., 1997) resultierte (s. 3.2.2.1). Eine deregulierte Aktivierung des EGFRs, z.B. infolge von Überexpression bzw. autokriner Stimulation, ist in Krebszellen häufig mit erhöhter Proliferation, Migration, Invasion, Tumorneovaskularisation bzw. Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen assoziiert (Schlessinger, 2000). So zeigten MCF-10A Zellen mit reduzierten Syk-Leveln, wahrscheinlich aufgrund der verstärkten EGFR-abhängigen Signalvermittlung, im Vergleich zur Kontrollzelllinie nicht nur eine Erhöhung in Wachstum und Proliferation sondern auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli, wie z.B. oxidativem Stress (s. 3.2.2.3 und 3.2.2.5). Das verstärkte Proliferationsverhalten von MCF-10A Brustepithelzellen mit reduzierter Expression von Syk

konnte dabei eindeutig mit der erhöhten EGFR-vermittelten Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht werden, da dieser Effekt nur unter Zugabe von EGF nachweisbar war (s. 3.2.2.4). Anhand dieser Daten kann für Syk eine negativ-regulatorische Rolle in der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in Brustepithelzellen postuliert werden. Die EGF-abhängige erhöhte Proliferation von MCF-10A Zellen mit reduzierter Expression von Syk bestätigten den spezifischen Einfluss von Syk auf die EGFR-Aktivität.

Es wurde vermutet, dass sich die gesteigerte EGFR-abhängige Signalvermittlung auch auf das Migrationsverhalten von Brustepithelzellen auswirkt (Xie et al., 1998). Interessanterweise waren MCF-10A Zellen mit reduzierten Syk Anteilen trotz der erhöhten Aktivierung des EGFRs in ihrer Motilität eingeschränkt (s. 3.2.2.6), was jedoch auf die gegebenen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden könnte. Im *Transwell*-Versuch wurden die Zellen unter Serumentzug kultiviert und die migrierten Zellen bereits nach 24 Stunden bestimmt, wobei normales Medium als chemischer Lockstoff diente. So wäre es denkbar, dass MCF-10A Zellen mit reduziertem Syk aufgrund der erhöhten Aktivierung des EGFRs weniger sensitiv auf den Serumentzug reagierten und im Vergleich zu den Kontrollzellen schwächer von serumhaltigem Medium angezogen wurden. Andererseits könnte auch das gesteigerte Proliferationsverhalten von MCF-10A Zellen mit unterdrückter Expression von Syk selbst ein Argument gegen eine erhöhte Motilität darstellen, da sich proliferierende Zellen phänotypisch grundlegend von migrierenden Zellen unterscheiden (Friedl and Wolf, 2003). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass auch die Migration von normalen Epithelzellen von Syk beeinflusst wird. So wurde bereits veröffentlicht, dass Syk die Migration von Endothelzellen kontrolliert (Inatome et al., 2001). Zusätzlich konnte für *shark*, ein Syk homologes Protein aus *Drosophila*, demonstriert werden, dass es die Migration von Follikelzellen reguliert (Tran and Berg, 2003). Eine potentielle Funktion von Syk in der Migration normaler Brustepithelzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

In unabhängigen Versuchen sollten die zuvor beschriebenen Effekte von Syk auf die EGF-vermittelte Signaltransduktion mittels eines Syk-spezifischen Inhibitors bestätigt werden. Über den als „Syk-selektiv“ bezeichneten Inhibitor Piceatannol wurden bereits Effekte auf andere Proteine berichtet (Miura et al., 2001; Oliver et al., 1994). Aus diesem Grund wurde die Spezifität des Inhibitors für Syk zunächst in CHO-K Zellen bestätigt, die Syk bzw. dessen katalytisch-inaktive Mutante sowie den EGFR exogen exprimierten (s. 3.2.3.1). Die kurzfristige Inhibition von Syk mittels Piceatannol bewirkte sowohl in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (3.2.3.2) als auch in MCF-10A Brustepithelzellen (Daten nicht gezeigt) eine

erhöhte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, was die bereits diskutierten Ergebnisse stützt. Unspezifische Effekte konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden, da der Inhibitor in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt wurde.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs anscheinend von katalytisch-aktivem Syk reguliert wird. Die exogene Expression von Syk jedoch nicht von einer katalytisch-inaktiven Mutante bewirkte eine stimulationsabhängige Reduktion an tyrosinphosphoryliertem EGFR (3.2.4.1). Die exogene Expression der katalytisch-inaktiven Mutante wirkte sich nicht hinreichend dominant-negativ auf endogenes Syk aus und verursachte demzufolge keinen erhöhten Level an tyrosinphosphoryliertem EGFR. Aus diesem Grund konnte keine erhöhte Proliferationsrate von MCF-10A Zellen nachgewiesen werden, die Syk K- exprimierten (s. 3.2.4.4). Auch die zusätzliche Expression von exogenem Syk konnte das Wachstum von MCF-10A Zellen nicht signifikant beeinflussen (s. 3.2.4.4). Die Reduktion der stimulierten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, die durch exogenes Syk induziert werden konnte, war anscheinend zu gering, um die Proliferationsrate von MCF-10A Zellen nachhaltig zu beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu scheint die erhöhte Resistenz von MCF-10A Zellen mit einer reduzierten Expression von Syk gegenüber oxidativem Stress nicht nur auf einer erhöhten EGFR-abhängigen Aktivierung von Akt zu beruhen, da die Expression von katalytisch-inaktivem Syk ebenfalls eine erhöhte Resistenz dieser Zellen gegenüber H₂O₂ Behandlung vermittelte. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass katalytisch-aktives Syk zur Apoptoseregulation in Brustepithelzellen befähigt ist. Gestützt wird diese Vermutung durch die Veröffentlichung von Mahabeleshwar und Kollegen, die zeigten, dass die Aktivität der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K), die die Aktivierung von Akt vermittelt (Brazil et al., 2002), in Brustkrebszellen durch Syk negativ reguliert wird (Mahabeleshwar and Kundu, 2003). Im Gegensatz dazu, scheint die Syk-abhängige Aktivierung von Akt hinreichend für das Überleben von B-Zellen in Folge von oxidativem Stress zu sein (Ding et al., 2000). Ungeachtet dessen ist es wahrscheinlich, dass sich die biologische Funktion von Syk in hämatopoetischen Zellen von jener in Brustepithelzellen grundlegend unterscheidet.

Coopman und Kollegen postulierten für Syk einen inhibitorischen Einfluss auf die Invasion von Tumorzellen (Coopman et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Ausbildung invasiver Kolonien von Syk-negativen MDA-MB-435S Zellen in Matrigel Matrix durch die Expression von katalytisch-aktivem Syk unterdrückt werden konnte (s. 3.3.4.2). Zusätzlich konnte auch ein reduziertes Migrationsverhalten für diese Zellen nachgewiesen werden. Letzteres steht im Widerspruch zu den veröffentlichten Daten

von Wang und Kollegen, die keinen spezifischen Effekt von exogenem Syk auf die Migration von MDA-MB-435S Zellen nachweisen konnten (Wang et al., 2003). Damit sich Tumorzellen im Gewebe ausbreiten können, müssen sie jedoch die Fähigkeit zur Migration erlangen (Friedl and Wolf, 2003), so dass ein inhibitorischer Einfluss von Syk auch auf die Motilität von invasiven Brustkrebszellen zu erwarten wäre. Welche Mechanismen für die Syk-abhängige Unterdrückung von Motilität und Invasion verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Unzureichend geklärt ist zudem, wie sich Syk zum einen positiv auf das Migrationsvermögen von nichttransformierten Brustepithelzellen zum anderen negativ auf die Motilität von invasiven Tumorzellen auswirken könnte. So kann nur spekuliert werden, dass sich normale Brustepithelzellen hinsichtlich ihrer Expression von Syk-spezifischen Substraten bzw. Interaktionspartnern von invasiven Brustkrebszellen unterscheiden, was zu einer veränderten Funktion von Syk in diesen Zellen führt.

4.3 Der Einfluss von Syk auf das Adaptorprotein Shc

Im vorangegangenen Abschnitt wurde der negativ-regulatorische Einfluss von Syk auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion diskutiert. Im Gegensatz zu den bereits besprochenen Signalproteinen war die EGF-abhängige Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc in Zellen mit einer reduzierten Expression von Syk nicht erhöht (s. 3.2.1.2). Shc, das in den drei Isoformen p66, p52 und p46 in Epithelzellen exprimiert wird, stellt ein wichtiges Substrat des aktivierten EGFRs dar, über das die Aktivierung des MAPK-Signalweges ermöglicht wird (Ravichandran, 2001). Es zeigte sich, dass die EGF- bzw. Pervanadat-abhängige Tyrosinphosphorylierung der Shc-Isoformen in Abhängigkeit von der Syk-Reduktion im Vergleich zur Kontrolle verringert war, wobei die Proteinmenge unverändert blieb. Die Syk-Level konnten durch Cycloheximid Behandlung kurzfristig weiter reduziert werden, was den Effekt auf die stimulationsabhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc weiter verstärkte (s. 3.2.1.2). Im Gegensatz dazu, bewirkte die Inhibition von Syk mittels Piceatannol eine Reduktion der Proteinmenge von Shc und infolgedessen auch eine reduzierte nachweisbare EGF-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von Shc. Zur Kontrolle diente dabei die Syk-negative Brustkrebszelllinie BT-549, in der kein Effekt auf die Proteinmenge von Shc nach Piceatannol Inkubation nachweisbar war (s. 3.2.3.3). Anhand dieser Daten wurde vermutet, dass die Kinaseaktivität von Syk für die stimulationsabhängige Tyrosinphosphorylierung und/oder Stabilisierung von Shc notwendig ist. Demzufolge konnte durch die exogene Expression von Syk in MCF-10A Zellen eine Erhöhung der EGF-abhängigen

Tyrosinphosphorylierung von Shc erzeugt werden. Dagegen konnten in Zellen mit exogener Expression einer katalytisch-inaktiven Mutante von Syk geringere Mengen an tyrosinphosphoryliertem Shc im Vergleich zur Kontrollzelllinie nachgewiesen werden (s. 3.2.4.2). Der positive Einfluss von katalytisch-aktivem Syk auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc konnte auch in der Syk-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S nach exogener Expression von Syk bestätigt werden (s. 3.4.1). Nagai und Kollegen zeigten bereits in B-Zellen eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung von Shc sowie die direkte Interaktion beider Proteine (Nagai et al., 1995). Ob eine Wechselwirkung von Syk und Shc auch in Brustepithelzellen biologische Relevanz hat, kann jedoch nur spekuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zumindest keine direkte Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden, so dass vermutet wurde, dass der Einfluss von Syk auf Shc durch andere Signalproteine vermittelt wird. Es bleibt offen, ob der Syk-spezifische Einfluss auf Shc in Zusammenhang mit der für Syk postulierten negativ-regulatorischen Rolle innerhalb der EGFR-vermittelten Signaltransduktion gebracht werden kann, oder ob es sich dabei um zwei voneinander unabhängige Funktionen der PTK Syk in Brustepithelzellen handelt. Interessanterweise wird durch Shc auch die Negativregulation von Wachstumssignalen vermittelt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass über Shc die PTP PEST zusammen mit Csk (*c-src tyrosine kinase*) zum Signalkomplex rekrutiert werden (Davidson et al., 1997), wobei Csk für die Inaktivierung von c-Src verantwortlich ist, das infolge von Tyrosinphosphorylierung durch den EGFR diesen an Tyrosin 845 phosphoryliert (Olayioye et al., 2000). Ferner wurde für die p66 Shc-Isoform gezeigt, dass es zwar nach EGF-Stimulation tyrosinphosphoryliert wird, jedoch im Vergleich zu p52 und p46 Shc keine erhöhte Aktivierung der MAPK-Kaskade bewirkt, sondern die Aktivität des *fos*-Promotors unterdrückt (Migliaccio et al., 1997). Migliaccio und Kollegen veröffentlichten, dass durch die gezielte Zerstörung des *p66 Shc*-Gens in Mäusen, diese eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und damit ein verlängertes Leben aufweisen (Migliaccio et al., 1999). Dabei scheint p66 Shc zusammen mit p53 nicht nur den intrazellulären Redoxstatus und die oxidationsabhängige DNA-Schädigung messen zu können, sondern reguliert auch Apoptose als Folge von oxidativem Stress (Trinei et al., 2002). Wie bereits diskutiert wurde, weisen Brustepithelzellen mit reduzierten Syk-Leveln bzw. mit exogener Expression einer katalytisch-inaktiven Mutante von Syk sowohl eine deregulierte Tyrosinphosphorylierung von Shc als auch eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf. Ferner konnte gezeigt werden, dass auch die Aktivierung von Jnk von Syk abhängig zu sein scheint (s. 3.2.3.4). Im Zusammenhang damit wurde bereits publiziert, dass Jnk seinerseits p66 Shc in Antwort auf

oxidativen Stress phosphoryliert (Le et al., 2001). Krebszellen weisen einen erhöhten Metabolismus und infolge dessen auch erhöhte ROS-Level (*reactive oxygen species*) auf (Benhar et al., 2002; Spitz et al., 2000). So ist es denkbar, dass Tumorzellen durch den Verlust von Syk eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativen Stress erwerben, was ihnen einen Wachstumsvorteil verschaffen würde. Überdies ist bekannt, dass durch die EGF-Stimulation der H₂O₂-Anteil in der Zelle transient erhöht wird, was zu einer reversiblen Inhibition von PTPn führt und so eine verstärkte Wachstumssignal-vermittelte Signaltransduktion in der Zelle induziert werden kann (Meng et al., 2002). Wie bereits erwähnt wurde, weisen Brusttumore häufig eine erhöhte Expression und Aktivierung von RTKn der EGFR-Familie auf, was ebenfalls zu einer Erhöhung der zellulären ROS-Anteile beiträgt. Brustkrebszellen ohne die Expression von Syk sollten demzufolge eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen, die durch die verstärkte Aktivierung von RTKn und der damit verbundenen erhöhten ROS-Entwicklung normalerweise induziert werden würde. Interessanterweise konnte unter Kulturbedingungen auch in Doxorubicin (DOX)-resistenten Brustkrebszellen keine Syk Expression mehr nachgewiesen werden (A. Roidl, persönliche Mitteilung). Das quinonhaltige Anthrazyklin DOX wird zur Behandlung verschiedenster Tumore eingesetzt. Seine Umsetzung durch mitochondriale Enzyme, wie z.B. NADH-Dehydrogenasen, verursacht erhöhte ROS-Level, die für die Zytotoxizität und der damit verbundenen Apoptose von Krebszellen verantwortlich sind (Kalyanaraman et al., 2002). So kann spekuliert werden, dass Syk-negative Tumorzellen eine DOX-Behandlung besser tolerieren würden, da sie eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und der dadurch erzeugten Zellschädigung aufweisen.

4.4 Wechselseitiger Einfluss von Syk und EGFR

Damit sich Syk regulatorisch auf die Aktivierung des EGFRs auswirken kann, wurde erwartet, dass sich beide Signalproteine, zumindest unter bestimmten physiologischen Bedingungen, in proximaler Nähe zueinander befinden müssen. So konnte gezeigt werden, dass in normalen Brustepithelzellen zumindest gewisse Anteile von Syk an der Membran bzw. davon abgeleiteten Strukturen, wie Endosomen, Transportvesikel o.ä., lokalisieren (s. 3.3.1). Interessanterweise, konnte nach Serumentzug in Unabhängigkeit vom zugesetzten Stimulus hauptsächlich die lange Form von Syk (Syk(L)) in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Diese Daten entsprechen Veröffentlichungen von Latour und Kollegen, die zeigten, dass SykB im Vergleich zu Syk(L) schlechter an tyrosinphosphorylierte

Bindemotive in hämatopoetischen Zellen, den sogenannten ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), assoziiert und demzufolge nicht in der Lage ist eine effiziente Signaltransduktion über die Immunglobulinrezeptoren basophiler Zellen zu vermitteln (Latour et al., 1998). Die hohe Flexibilität der hintereinander angeordneten SH2-Domänen von Syk, die von Futterer und Kollegen gezeigt werden konnte, ermöglicht nicht nur die Bindung an diphosphorylierte ITAMs der zytoplasmatischen Bereiche der Immunrezeptorkomplexe sondern liefert die molekulare Voraussetzung für eine ubiquitäre Funktion von Syk in einer Reihe von Signaltransduktionswegen (Futterer et al., 1998). Obwohl Woodside und Kollegen veröffentlichten, dass die Bindung von Syk und $\beta 3$ -Integrin in CHO-Zellen konstitutiv über die N-terminale SH2-Domäne und die Interdomäne A von Syk, ohne den Einfluss der C-terminalen SH2-Domäne, vermittelt wird, und die Phosphorylierung der NXXY Motive von $\beta 3$ -Integrin diese Interaktion stört (Woodside et al., 2002), konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Syk mit dem tyrosinphosphorylierten EGFR-Signalkomplex anscheinend über die SH2-Domänen erfolgt (s. 3.3.3.1). Immunopräzipitationsanalysen konnten die postulierte Interaktion von Syk und EGFR bestätigen. Auffallend war, dass die lange Form von Syk (Syk(L)) anscheinend stärker mit dem EGFR-Signalkomplex assoziierte, was die Resultate aus der subzellulären Fraktionierung bestätigte (s. 3.3.3.2). Die Brustkrebszelllinie BT-20, die nur Syk(L) exprimierte, zeigte eine eher konstitutive Assoziation von Syk und EGFR. Im Gegensatz dazu konnte diese Interaktion in MCF-10A Brustepithelzellen, die beide Formen von Syk in vergleichbaren Mengen aufwiesen, erst nach Pervanadat-Stimulation nachgewiesen werden. Nach Serumentzug koimmunopräzipitierte auch in MDA-MB-468 Brustkrebszellen hauptsächlich Syk(L) in Unabhängigkeit vom zugesetzten Stimulus, während unter normalen Bedingungen beide Isoformen in den Anti-EGFR-Immunopräzipitaten detektiert werden konnten. Diese Resultate sprechen für eine kompetitive Wechselwirkung von Syk(L) und SykB, wobei SykB anscheinend eine Interaktion von Syk(L) mit dem EGFR stört. Die unterschiedliche physiologische Rolle der beiden Syk Isoformen in Brustepithelzellen bedarf jedoch noch weiterer Aufklärung. Ferner konnte nicht eindeutig belegt werden, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion von Syk und EGFR handelt. Aufgrund der schwachen Assoziation konnte nur eine indirekte Wechselwirkung, die weitere Signalproteine einschließt, vermutet werden. Diese Interaktionen könnten über die zehn Autophosphorylierungsstellen innerhalb der Interdomänen bzw. die SH2-Domänen von Syk vermittelt werden. In hämatopoetischen Zellen konnten bereits eine ganze Reihe von Syk-spezifischen Substraten und Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Sada et al., 2001), wobei davon ausgegangen

werden muss, dass sich die Funktion von Syk in Brustepithelzellen grundlegend von jener in Blutzellen unterscheidet.

Interessanterweise scheint sich die EGFR-Kinase auf die katalytische Aktivität von Syk auszuwirken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die chemische Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität die basale bzw. EGF-abhängige Kinaseaktivität von Syk *in vitro* erhöht, was für einen wechselseitigen Einfluss spricht, der in eine Inaktivierung von Syk resultiert (s. 3.3.2.1). Wenn Syk regulativ in der EGFR-vermittelten Signalgebung einwirkt, so wäre es denkbar, dass auch Syk von EGFR-abhängigen Signalwegen beeinflusst wird. Anscheinend bewirkte die Aktivierung des EGFRs eine Inhibition der katalytischen Aktivität von Syk, um möglicherweise die durch Syk vermittelten negativ-regulierenden Signalwege vorübergehend abzuschalten. Auch PTPn, die den Phosphorylierungsstatus des EGFRs regulieren, werden infolge einer transienten EGF-abhängigen Erhöhung der endogenen H₂O₂-Level reversibel in ihrer Funktion gehemmt (Meng et al., 2002).

4.5 Ein Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Resultate konnte für Syk eine potentielle biologische Funktion als Regulator von Wachstumssignalen, die über den EGFR in Brustepithelzellen vermittelt werden und zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Migration und Apoptose beeinflussen, postuliert werden. Der Mechanismus über den Syk diese physiologische Funktion ausübt, bleibt jedoch ungeklärt. So ist es denkbar, dass Syk zum einen die Aktivität zum anderen die Lokalisierung einer EGFR-spezifischen PTP direkt bzw. indirekt beeinflussen könnte. Obwohl keine Unterschiede in der Gesamtproteinmenge des EGFRs in Brustepithelzellen mit reduzierter Expression von Syk nachgewiesen werden konnten, besteht dennoch die Möglichkeit, dass Syk in die Endozytose und der damit verbundenen Degradation der EGFR-Signalkomplexe involviert ist. Für c-Cbl, das die Ubiquitinylierung und Degradation des aktivierten EGFRs vermittelt (Levkowitz et al., 1998), wurde in hämatopoetischen Zellen bereits eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung gezeigt (Ota et al., 1996; Ota and Samelson, 1997). Ebenso wäre es vorstellbar, dass Syk den Phosphotyrosinstatus des EGFRs über die Aktivität von Csk (*c-src tyrosine kinase*) und damit über die Aktivität der Src-Kinasen reguliert. Faruki et al. zeigten eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung von α -Tubulin und postulierten, dass Syk die Bildung von Signalkomplexen über seine Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts beeinflusst (Faruki et

al., 2000). Demzufolge könnte Syk generell die Bildung der EGFR-abhängigen Signalkomplexe in Epithelzellen regulieren.

Die funktionelle Relevanz der hier beschriebenen Interaktion von Syk auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion hinsichtlich der von Coopman und Kollegen postulierten tumorsuppressiven Aktivität von Syk in Brusttumoren (Coopman et al., 2000) bleibt noch zu klären und bietet Raum für weitere Untersuchungen. Die Resultate dieser Arbeit liefern jedoch erste Hinweise für eine biologische Funktion von Syk innerhalb von Wachstumsfaktor-abhängigen Signaltransduktionswegen in Brustepithelzellen.

5 Zusammenfassung

Die Proteintyrosinkinase (PTK) Syk wird ubiquitär in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist für die Weiterleitung von Signalen aktivierter Immunrezeptoren unerlässlich. Eine biologische Funktion von Syk wurde auch außerhalb hämatopoetischer Zellen postuliert. In Anbetracht dessen sollten in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Funktion von Syk in humanen Brustepithelzellen durchgeführt werden. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Analyse zur Expression und katalytischen Aktivität von Syk in nichttransformierten und transformierten humanen Brustzelllinien. So konnte katalytisch-aktives Syk in nichttransformierten und schwach-tumorigenen humanen Brustepithelzellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in invasiven Brustkrebszellen, was bereits veröffentlichte Daten bestätigte (Coopman et al., 2000).

Die Unterdrückung der endogenen Expression von Syk in nichttransformierten Brustepithelzellen vermittelte eine erhöhte EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, während die exogene Expression von katalytisch-aktivem Syk diese reduzieren konnte. Ferner konnte gezeigt werden, dass reduzierte Syk-Level die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen steigerte und somit die Proliferationsrate nichttransformierter Brustepithelzellen sowie deren Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhte. Aufbauend auf diesen Daten kann eine Funktion von Syk in der Regulation von EGFR-vermittelten Signalen in Brustepithelzellen postuliert werden. Die gesteigerte autokatalytische Aktivität von Syk *in vitro*, die durch die chemische Inhibition der EGFR-Kinase erzielt werden konnte, sowie die nachgewiesene Assoziation beider Proteine, suggerieren ebenfalls einen wechselseitigen Einfluss von Syk und EGFR.

Andere Untersuchungen demonstrierten einen Syk-abhängigen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Brustepithelzellen, wobei nichttransformierte Zellen mit reduzierter Expression von Syk in ihrer Motilität eingeschränkt waren, während invasive Brustkrebszellen durch die exogene Expression von katalytisch-aktivem Syk sowohl in ihrem Migrations- als auch in ihrem Invasionsvermögen supprimiert wurden.

Zusätzlich konnte ein Syk-spezifischer Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc nachgewiesen werden, der über die Kinaseaktivität von Syk vermittelt wurde.

Zusammengenommen liefern die vorgestellten Ergebnisse neue Erkenntnisse zur Funktion, Expression und Regulation von Syk in Brustepithelzellen und postulieren für Syk eine regulative Funktion innerhalb der EGF-stimulierten Signaltransduktion.

6 Literaturverzeichnis

- Arteaga C. (2003) Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* **30**, 3-14.
- Azios N. G., Romero F. J., Denton M. C., Doherty J. K. and Clinton G. M. (2001) Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene* **20**, 5199-209.
- Baldock D., Graham B., Akhlaq M., Graff P., Jones C. E. and Menear K. (2000) Purification and characterization of human Syk produced using a baculovirus expression system. *Protein Expr Purif* **18**, 86-94.
- Baribault H., Wilson-Heiner M., Muller W., Penner J. and Bakhiet N. (1997) Functional analysis of mouse keratin 8 in polyoma middle T-induced mammary gland tumours. *Transgenic Res* **6**, 359-67.
- Benhar M., Engelberg D. and Levitzki A. (2002) ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* **3**, 420-5.
- Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R., Soper J. T., Dodge R., Clarke-Pearson D. L., Marks P. and et al. (1990) Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **50**, 4087-91.
- Blume-Jensen P. and Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-65.
- Bradshaw J. M. and Waksman G. (2002) Molecular recognition by SH2 domains. *Adv Protein Chem* **61**, 161-210.
- Brandt B. H., Roetger A., Dittmar T., Nikolai G., Seeling M., Merschjann A., Nofer J. R., Dehmer-Moller G., Junker R., Assmann G. and Zaenker K. S. (1999) c-erbB-2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a motogenic phenotype in human breast cancer cells. *Faseb J* **13**, 1939-49.
- Brazil D. P., Park J. and Hemmings B. A. (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* **111**, 293-303.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J. and Greenberg M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Burden S. and Yarden Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* **18**, 847-55.

- Caplen N. J., Parrish S., Imani F., Fire A. and Morgan R. A. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9742-7.
- Chan T. A., Chu C. A., Rauen K. A., Kroiher M., Tatarewicz S. M. and Steele R. E. (1994) Identification of a gene encoding a novel protein-tyrosine kinase containing SH2 domains and ankyrin-like repeats. *Oncogene* **9**, 1253-9.
- Chen C. and Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.
- Chen Y. R., Shrivastava A. and Tan T. H. (2001) Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene* **20**, 367-74.
- Chenais F., Virella G., Patrick C. C. and Fudenberg H. H. (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sepharose as substrate. *J Immunol Methods* **18**, 183-92.
- Chung C. T. and Miller R. H. (1993) Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods Enzymol* **218**, 621-7.
- Cleveland D. W., Lopata M. A., MacDonald R. J., Cowan N. J., Rutter W. J. and Kirschner M. W. (1980) Number and evolutionary conservation of alpha- and beta-tubulin and cytoplasmic beta- and gamma-actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell* **20**, 95-105.
- Cobb M. H., Boulton T. G. and Robbins D. J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* **2**, 965-78.
- Cohen P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci* **17**, 408-13.
- Coopman P. J. P., Do M. T. H., Barth M., Bowden E. T., Hayes A. J., Basyuk E., Blancato J. K., Vezza P. R., McLeskey S. W., Mangeat P. H. and Mueller S. C. (2000) The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* **406**, 742-747.
- Couch D. B. (1996) Carcinogenesis: basic principles. *Drug Chem Toxicol* **19**, 133-48.
- Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P. H., Libermann T. A., Schlessinger J., Francke U. and et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**, 1132-9.

- Craxton A., Jiang A., Kurosaki T. and Clark E. A. (1999) Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol Chem* **274**, 30644-50.
- Daly R. J. (1999) Take your partners, please--signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth Factors* **16**, 255-63.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and Greenberg M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-41.
- Davidson D., Cloutier J. F., Gregorieff A. and Veillette A. (1997) Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Biol Chem* **272**, 23455-62.
- de Melker A. A., van der Horst G., Calafat J., Jansen H. and Borst J. (2001) c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci* **114**, 2167-78.
- Derijard B., Hibi M., Wu I. H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M. and Davis R. J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-37.
- Dhanasekaran N. and Premkumar Reddy E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**, 1447-55.
- Ding J., Takano T., Gao S., Han W., Noda C., Yanagi S. and Yamamura H. (2000) Syk is required for the activation of Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* **275**, 30873-7.
- Doherty J. K., Bond C., Jardim A., Adelman J. P. and Clinton G. M. (1999) The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10869-74.
- Dong J., Opresko L. K., Dempsey P. J., Lauffenburger D. A., Coffey R. J. and Wiley H. S. (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6235-40.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8.
- El-Hillal O., Kurosaki T., Yamamura H., Kinet J. P. and Scharenberg A. M. (1997) syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1919-24.

- Faruki S., Geahlen R. L. and Asai D. J. (2000) Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci* **113** (Pt 14), 2557-65.
- Ferguson K. M., Berger M. B., Mendrola J. M., Cho H. S., Leahy D. J. and Lemmon M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**, 507-17.
- Fernandez R., Takahashi F., Liu Z., Steward R., Stein D. and Stanley E. R. (2000) The Drosophila shark tyrosine kinase is required for embryonic dorsal closure. *Genes Dev* **14**, 604-14.
- Fiorini M., Alimandi M., Fiorentino L., Sala G. and Segatto O. (2001) Negative regulation of receptor tyrosine kinase signals. *FEBS Lett* **490**, 132-41.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fluck M., Zurcher G., Andres A. C. and Ziemiecki A. (1995) Molecular characterization of the murine syk protein tyrosine kinase cDNA, transcripts and protein. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **213**, 273-281.
- Friedl P. and Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-74.
- Furlong M. T., Mahrenholz A. M., Kim K. H., Ashendel C. L., Harrison M. L. and Geahlen R. L. (1997) Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* **1355**, 177-90.
- Futterer K., Wong J., Grucza R. A., Chan A. C. and Waksman G. (1998) Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* **281**, 523-37.
- Garrett T. P., McKern N. M., Lou M., Elleman T. C., Adams T. E., Lovrecz G. O., Zhu H. J., Walker F., Frenkel M. J., Hoyne P. A., Jorissen R. N., Nice E. C., Burgess A. W. and Ward C. W. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* **110**, 763-73.
- Garrington T. P. and Johnson G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 211-8.
- Geahlen R. L. and McLaughlin J. L. (1989) Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 241-5.

- Gershoni J. M. and Palade G. E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**, 1-15.
- Graham F. L. and van der Eb A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-9.
- Grandis J. R., Melhem M. F., Barnes E. L. and Tweardy D. J. (1996) Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **78**, 1284-92.
- Graves J. D., Campbell J. S. and Krebs E. G. (1995) Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann N Y Acad Sci* **766**, 320-43.
- Greenlee R. T., Murray T., Bolden S. and Wingo P. A. (2000) Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* **50**, 7-33.
- Gullick W. J. (1994) A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. *Eur J Cancer* **30A**, 2186.
- Guy G. R., Yusoff P., Bangarusamy D., Fong C. W. and Wong E. S. (2002) Dockers at the crossroads. *Cell Signal* **14**, 11-20.
- Guy P. M., Platko J. V., Cantley L. C., Cerione R. A. and Carraway K. L., 3rd. (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8132-6.
- Hackel P. O., Gishizky M. and Ullrich A. (2001) Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem* **382**, 1649-62.
- Hackel P. O., Zwick E., Prenzel N. and Ullrich A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 184-9.
- Hanahan D. and Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanks S. K. and Hunter T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**, 576-96.
- Holliday R. (1996) Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. *Cancer Surv* **28**, 103-15.
- Hsueh R. C., Hammill A. M., Lee J. A., Uhr J. W. and Scheuermann R. H. (2002) Activation of the Syk tyrosine kinase is insufficient for downstream signal transduction in B lymphocytes. *BMC Immunol* **3**, 16.
- Hubbard S. R., Mohammadi M. and Schlessinger J. (1998) Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **273**, 11987-90.

- Hubbard S. R., Wei L., Ellis L. and Hendrickson W. A. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-54.
- Humphreys R. C. and Hennighausen L. (2000) Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene* **19**, 1085-91.
- Hunter T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-36.
- Hynes N. E. and Stern D. F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1198**, 165-84.
- Inatome R., Yanagi S., Takano T. and Yamamura H. (2001) A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 195-9.
- Jiang A., Craxton A., Kurosaki T. and Clark E. A. (1998) Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Exp Med* **188**, 1297-306.
- Jorissen R. N., Walker F., Pouliot N., Garrett T. P., Ward C. W. and Burgess A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**, 31-53.
- Jost M., Kari C. and Rodeck U. (2000) The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* **10**, 505-10.
- Kalyanaraman B., Joseph J., Kalivendi S., Wang S., Konorev E. and Kotamraju S. (2002) Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 119-24.
- Keshvara L. M., Isaacson C. C., Yankee T. M., Sarac R., Harrison M. L. and Geahlen R. L. (1998) Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J Immunol* **161**, 5276-83.
- Khokhlatchev A. V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E. and Cobb M. H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605-15.
- Klapper L. N., Glathe S., Vaisman N., Hynes N. E., Andrews G. C., Sela M. and Yarden Y. (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4995-5000.

- Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robey P. G., Tryggvason K. and Martin G. R. (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188-93.
- Kolibaba K. S. and Druker B. J. (1997) Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F217-48.
- Kraus M. H., Issing W., Miki T., Popescu N. C. and Aaronson S. A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9193-7.
- Kuno Y., Abe A., Emi N., Iida M., Yokozawa T., Towatari M., Tanimoto M. and Saito H. (2001) Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood* **97**, 1050-5.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Latour S., Chow L. M. and Veillette A. (1996) Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**, 22782-90.
- Latour S., Zhang J., Siraganian R. P. and Veillette A. (1998) A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *Embo J* **17**, 2584-95.
- Lax I., Bellot F., Howk R., Ullrich A., Givol D. and Schlessinger J. (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *Embo J* **8**, 421-7.
- Le S., Connors T. J. and Maroney A. C. (2001) c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* **276**, 48332-6.
- Lee J., Dull T. J., Lax I., Schlessinger J. and Ullrich A. (1989) HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *Embo J* **8**, 167-73.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M. and Boedtker H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-51.
- Levitcki A. and Gazit A. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* **267**, 1782-8.

- Levkowitz G., Waterman H., Zamir E., Kam Z., Oved S., Langdon W. Y., Beguinot L., Geiger B. and Yarden Y. (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**, 3663-74.
- Li M., Lewis B., Capuco A. V., Laucirica R. and Furth P. A. (2000) WAP-TAg transgenic mice and the study of dysregulated cell survival, proliferation, and mutation during breast carcinogenesis. *Oncogene* **19**, 1010-9.
- Ma H., Yankee T. M., Hu J., Asai D. J., Harrison M. L. and Geahlen R. L. (2001) Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization. *J Immunol* **166**, 1507-16.
- Maeda A., Scharenberg A. M., Tsukada S., Bolen J. B., Kinet J. P. and Kurosaki T. (1999) Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* **18**, 2291-7.
- Mahabeleshwar G. H. and Kundu G. C. (2003) Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6209-6221.
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T. and Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34.
- Mateo C., Moreno E., Amour K., Lombardero J., Harris W. and Perez R. (1997) Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* **3**, 71-81.
- McCann A. H., Dervan P. A., O'Regan M., Codd M. B., Gullick W. J., Tobin B. M. and Carney D. N. (1991) Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* **51**, 3296-303.
- Meng T. C., Fukada T. and Tonks N. K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* **9**, 387-99.
- Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P. P., Lanfrancone L. and Pelicci P. G. (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309-13.
- Migliaccio E., Mele S., Salcini A. E., Pelicci G., Lai K. M., Superti-Furga G., Pawson T., Di Fiore P. P., Lanfrancone L. and Pelicci P. G. (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *Embo J* **16**, 706-16.

- Miura K., Lavens-Phillips S. and MacGlashan D. W., Jr. (2001) Piceatannol is an effective inhibitor of IgE-mediated secretion from human basophils but is neither selective for this receptor nor acts on syk kinase at concentrations where mediator release inhibition occurs. *Clin Exp Allergy* **31**, 1732-9.
- Muller B., Cooper L. and Terhorst C. (1994) Molecular cloning of the human homologue to the pig protein-tyrosine kinase syk. *Immunogenetics* **39**, 359-62.
- Muller W. J., Sinn E., Pattengale P. K., Wallace R. and Leder P. (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**, 105-15.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Muthuswamy S. K., Gilman M. and Brugge J. S. (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* **19**, 6845-57.
- Nagai K., Takata M., Yamamura H. and Kurosaki T. (1995) Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. *J Biol Chem* **270**, 6824-9.
- Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J. H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M. and Yokoyama S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-87.
- Okamura S., Ng C. C., Koyama K., Takei Y., Arakawa H., Monden M. and Nakamura Y. (1999) Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncology Research* **11**, 281-285.
- Olayioye M. A., Graus-Porta D., Beerli R. R., Rohrer J., Gay B. and Hynes N. E. (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* **18**, 5042-51.
- Olayioye M. A., Neve R. M., Lane H. A. and Hynes N. E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**, 3159-67.
- Oliver J. M., Burg D. L., Wilson B. S., McLaughlin J. L. and Geahlen R. L. (1994) Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J Biol Chem* **269**, 29697-703.

- Ota Y., Beitz L. O., Scharenberg A. M., Donovan J. A., Kinet J. P. and Samelson L. E. (1996) Characterization of Cbl tyrosine phosphorylation and a Cbl-Syk complex in RBL-2H3 cells. *J Exp Med* **184**, 1713-23.
- Ota Y. and Samelson L. E. (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* **276**, 418-20.
- Parsons J. T. and Parsons S. J. (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 187-92.
- Pichler A., Gast A., Seeler J. S., Dejean A. and Melchior F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-20.
- Plowman G. D., Green J. M., Culouscou J. M., Carlton G. W., Rothwell V. M. and Buckley S. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* **366**, 473-5.
- Prenzel N., Fischer O. M., Streit S., Hart S. and Ullrich A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* **8**, 11-31.
- Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C. and Ullrich A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-8.
- Qin S., Minami Y., Hibi M., Kurosaki T. and Yamamura H. (1997) Syk-dependent and -independent signaling cascades in B cells elicited by osmotic and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 2098-103.
- Ram T. G., Kokeny K. E., Dilts C. A. and Ethier S. P. (1995) Mitogenic activity of neu differentiation factor/hergulin mimics that of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* **163**, 589-96.
- Ravichandran K. S. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* **20**, 6322-30.
- Resh M. D. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**, 411-3.
- Rhee S. G., Bae Y. S., Lee S. R. and Kwon J. (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**, PE1.
- Robinson D. R., Wu Y. M. and Lin S. F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-57.
- Russo J., Calaf G. and Russo I. H. (1993) A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* **4**, 403-17.

- Russo J., Yang X., Hu Y. F., Bove B. A., Huang Y., Silva I. D., Tahin Q., Wu Y., Higgy N., Zekri A. and Russo I. H. (1998) Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci* **3**, D944-60.
- Sada K., Takano T., Yanagi S. and Yamamura H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *Journal of Biochemistry* **130**, 177-186.
- Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F. and Normanno N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**, 183-232.
- Scangos G. and Ruddle F. H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene* **14**, 1-10.
- Schaller M. D., Borgman C. A., Cobb B. S., Vines R. R., Reynolds A. B. and Parsons J. T. (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5192-6.
- Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25.
- Schlessinger J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669-72.
- Schlessinger J. and Ullrich A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-91.
- Shackleford G. M., MacArthur C. A., Kwan H. C. and Varmus H. E. (1993) Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in Wnt-1 transgenic mice by insertional activation of int-2/Fgf-3 and hst/Fgf-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 740-4.
- Shaw G. (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* **18**, 35-46.
- Shawver L. K., Slamon D. and Ullrich A. (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* **1**, 117-23.
- Siegel M. R. and Sisler H. D. (1963) Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* **200**, 675-6.
- Simons J. W. (1995) Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis. *Crit Rev Oncog* **6**, 261-73.
- Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S. G., Keith D. E., Levin W. J., Stuart S. G., Udove J., Ullrich A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-12.

- Soule H. D., Maloney T. M., Wolman S. R., Peterson W. D., Jr., Brenz R., McGrath C. M., Russo J., Pauley R. J., Jones R. F. and Brooks S. C. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* **50**, 6075-86.
- Spitz D. R., Sim J. E., Ridnour L. A., Galoforo S. S. and Lee Y. J. (2000) Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci* **899**, 349-62.
- Su B. and Karin M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* **8**, 402-11.
- Sun H. and Tonks N. K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **19**, 480-5.
- Sweeney C., Lai C., Riese D. J., 2nd, Diamonti A. J., Cantley L. C. and Carraway K. L., 3rd. (2000) Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer. *J Biol Chem* **275**, 19803-7.
- Takata M., Sabe H., Hata A., Inazu T., Homma Y., Nukada T., Yamamura H. and Kurosaki T. (1994) Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* **13**, 1341-9.
- Taniguchi T., Kobayashi T., Kondo J., Takahashi K., Nakamura H., Suzuki J., Nagai K., Yamada T., Nakamura S. and Yamamura H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* **266**, 15790-6.
- Tari A. M. and Lopez-Berestein G. (2001) GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol* **28**, 142-7.
- Thomas P. S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted nitrocellulose paper. *Methods Enzymol* **100**, 255-66.
- Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmaier G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E. and et al. (1992) Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* **150**, 534-44.
- Tice D. A., Biscardi J. S., Nickles A. L. and Parsons S. J. (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1415-20.
- Tiganis T. (2002) Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor. *IUBMB Life* **53**, 3-14.

- Tomasello E., Cant C., Buhning H. J., Vely F., Andre P., Seiffert M., Ullrich A. and Vivier E. (2000) Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12. *Eur J Immunol* **30**, 2147-56.
- Toyama T., Iwase H., Yamashita H., Hara Y., Omoto Y., Sugiura H., Zhang Z. H. and Fujii Y. (2003) Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Letters* **189**, 97-102.
- Tran D. H. and Berg C. A. (2003) bullwinkle and shark regulate dorsal-appendage morphogenesis in Drosophila oogenesis. *Development* **130**, 6273-82.
- Treisman R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-15.
- Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., Barozzi S., Ventura A., Migliaccio E., Milia E., Padura I. M., Raker V. A., Maccarana M., Petronilli V., Minucci S., Bernardi P., Lanfrancone L. and Pelicci P. G. (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* **21**, 3872-8.
- Tsuchida S., Yanagi S., Inatome R., Ding J., Hermann P., Tsujimura T., Matsui N. and Yamamura H. (2000) Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 321-7.
- Tsujimura T., Yanagi S., Inatome R., Takano T., Ishihara I., Mitsui N., Takahashi S. and Yamamura H. (2001) Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett* **489**, 129-33.
- Turner M., Schweighoffer E., Colucci F., Di Santo J. P. and Tybulewicz V. L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* **21**, 148-54.
- Ullrich A., Coussens L., Hayflick J. S., Dull T. J., Gray A., Tam A. W., Lee J., Yarden Y., Libermann T. A., Schlessinger J. and et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418-25.
- Ullrich A. and Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-12.
- van der Geer P., Hunter T. and Lindberg R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337.

- Varmus H., Hirai H., Morgan D., Kaplan J. and Bishop J. M. (1989) Function, location, and regulation of the src protein-tyrosine kinase. *Princess Takamatsu Symp* **20**, 63-70.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K. A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G. V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.
- Wallasch C., Weiss F. U., Niederfellner G., Jallal B., Issing W. and Ullrich A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J* **14**, 4267-75.
- Wan Y., Kurosaki T. and Huang X. Y. (1996) Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* **380**, 541-4.
- Wang H. and Malbon C. C. (1999) G(s)alpha repression of adipogenesis via Syk. *J Biol Chem* **274**, 32159-66.
- Wang L., Duke L., Zhang P. S., Arlinghaus R. B., Symmans W. F., Sahin A., Mendez R. and Le Dai J. (2003) Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Research* **63**, 4724-4730.
- Wiley H. S. and Burke P. M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* **2**, 12-8.
- Woodside D. G., Obergfell A., Talapatra A., Calderwood D. A., Shattil S. J. and Ginsberg M. H. (2002) The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* **277**, 39401-8.

- Xie H., Pallero M. A., Gupta K., Chang P., Ware M. F., Witke W., Kwiatkowski D. J., Lauffenburger D. A., Murphy-Ullrich J. E. and Wells A. (1998) EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* **111** (Pt 5), 615-24.
- Yaffe M. B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 177-86.
- Yamada T., Fujieda S., Yanagi S., Yamamura H., Inatome R., Sunaga H. and Saito H. (2001) Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol* **166**, 538-43.
- Yamauchi T., Ueki K., Tobe K., Tamemoto H., Sekine N., Wada M., Honjo M., Takahashi M., Takahashi T., Hirai H., Tushima T., Akanuma Y., Fujita T., Komuro I., Yazaki Y. and Kadowaki T. (1997) Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* **390**, 91-6.
- Yanagi S., Inatome R., Ding J., Kitaguchi H., Tybulewicz V. L. and Yamamura H. (2001a) Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood* **98**, 2869-71.
- Yanagi S., Inatome R., Takano T. and Yamamura H. (2001b) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 495-8.
- Yang C., Yanagi S., Wang X., Sakai K., Taniguchi T. and Yamamura H. (1994) Purification and characterization of a protein-tyrosine kinase p72syk from porcine spleen. *Eur J Biochem* **221**, 973-8.
- Yarden Y. and Sliwkowski M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-37.
- Yarden Y. and Ullrich A. (1988a) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **57**, 443-78.
- Yarden Y. and Ullrich A. (1988b) Molecular analysis of signal transduction by growth factors Growth factor receptor tyrosine kinases. *Biochemistry* **27**, 3113-9.
- Yuan Y. F., Mendez R., Sahin A. and Dai J. L. (2001) Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Research* **61**, 5558-5561.
- Zarrinpar A., Bhattacharyya R. P. and Lim W. A. (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* **2003**, RE8.
- Zhang J., Billingsley M. L., Kincaid R. L. and Siraganian R. P. (2000) Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a

specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem* **275**, 35442-7.

Zwick E., Bange J. and Ullrich A. (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* **8**, 17-23.

7 Abkürzungen

''	Sekunde
'	Minute
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp ^r	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Blot Ak	Antikörper, der im Westernblot eingesetzt wurde
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalo Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB	avian erythroblastosis virus oncogene B
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gab1	Grb2-associated binder 1
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
ddH ₂ O	zweifach destilliertes, entionisiertes Wasser
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-
HER	Human EGFR-related gene
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
K-	katalytisch-inaktive Kinase
K/R	Lysin zu Arginin mutiert
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli
M	Molar
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/Erk Kinase
MEKK	MAPK/Erk Kinase Kinase
MKS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MMTV	mouse mammary tumor virus
Mock	kontrolltransfiziert
n	Nano
NDF	neu differentiation factor
Neo ^r	Neomycin Resistenz
OD	optische Dichte
p.a.	Per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Polyoma middle T antigen
pRS	pRetroSuper Vektor
PTB	Phosphotyrosin-bindend
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PY	Phosphotyrosin
RNAi	RNA interference
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.A.	Standardabweichung
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src homology
siRNA	small interfering RNA
Sos	Son of sevenless
c-Src	Homologue to v-src (sarcoma viral oncogene)
SV40- TAg	simian virus 40 large T antigen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	transforming growth factor alpha
TL	Totallysat
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Einheit für enzymatische Aktivität
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Westernblot
wt	Wildtyp

8 Lebenslauf

Name: Anja Ruschel
Geburtsdatum: 20. September 1975
Geburtsort: Gera
Adresse: Schulenburgstraße 5, 81369 München

Promotion

Seit März 2000 Promotion bei Prof. Dr. A. Ullrich, Direktor am MPI für Biochemie, Martinsried, Abteilung Molekularbiologie,
Thema: „Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Proteintyrosinkinase Syk in humanen Brustepithelzellen“

Studium

Januar 2000 Erwerb des Diploms in Biologie, Gesamtnote „sehr gut“ (1,0)

März-Dezember 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Immunologie der FAU Erlangen-Nürnberg bei Prof. Dr. H.-M. Jäck
Thema: „Untersuchung der intrazellulären Signalkompetenz einer schweren Immunglobulinkette in stabilen Plasmazell-Transfektanten“ Note „sehr gut“ (1,0)

Februar 1999 Diplomprüfungen in Biologie

Mai 1996 Vordiplom Biologie, Note „gut“ (2,0)

November 1994 Beginn des Biologiestudiums an der FAU Erlangen-Nürnberg

Schulausbildung

1994 Allgemeine Hochschulreife, Note „gut“ (1,8)

1990 – 1994 Gymnasium Gera

1982 – 1990 Polytechnische Oberschule Gera

Veröffentlichungen

Ruschel A., Ullrich A. "Syk protein tyrosine kinase-mediated signalling in breast epithelial cells"; Posterpräsentation, International Summer School (FEBS/EMBO) "Molecular Mechanisms in Homeostasis and Disease", Spetses, Griechenland

Ruschel A., Ullrich A. "Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells"; *Cell. Signal.* (im Druck)

Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich all jene namentlich verewigen, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Aufnahme in seine Gruppe, die Vergabe des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen. Besonders danke ich ihm für seine immerwährende Unterstützung bei meiner Arbeit und all die Freiheiten, die er mir während der gesamten Zeit für mein Forschungsvorhaben einräumte.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erich Nigg für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der LMU München zu betreuen.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danken möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich während meiner Promotion sowohl sozial als auch fachlich unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei allen Mitgliedern des Freitagseminars, Lars Anders, Miriam Gensler, Marcus Buschbeck, Marta Murgia, Andreas Roidl und Andreas Weiß für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre wertvollen Anregungen und ihre konstruktive Kritik. Miriam Gensler und Brigitte Biesinger danke ich zudem für die Korrektur meiner Manuskripte. David Ermert danke ich für die praktische Unterstützung.

Ich danke allen jetzigen und früheren Kollegen, die zu einem entspannten und stets heiteren Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Brüdern und meinem Freund Alexander, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vorallem für ihre immerwährende emotionale Unterstützung...