

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Identifikation von Signalweginteraktionspartnern des
Zelladhäsionsmoleküls Muc18/MCAM/CD146**

von

Edith Konak

aus

München

2000

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Judith Johnson betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 04.08.2000

.....
Edith Konak
.....

(Edith Konak)

Dissertation eingereicht am	04.08.2000
1. Gutachter	Prof. Dr. Judith Johnson
2. Gutachter	Prof. Dr. Horst Domdey
Mündliche Prüfung am	28.11.2000

Herzlichen Dank,

Frau Prof. Dr. Judith Johnson für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Immunologie der medizinischen Fakultät der Universität München zu arbeiten und ganz besonders für ihre praktische Anleitung und Betreuung, sowie für ihre Geduld und stete Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für die Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München,

den Mitarbeitern des Labors, besonders Daniel Kramer, Anja Zimmermann und Andrea Urban,

und ganz besonders meinen Eltern und meinem Mann.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Das maligne Melanom	2
2.2 Der Tumorprogressionsmarker Muc18/MCAM/CD146	4
3. Material	8
3.1 Zelllinien und Transfektanden	8
3.2 Antikörper	9
3.3 Enzyme	13
3.4 Bakterien	14
3.5 Plasmide	14
3.6 Größenstandards	15
3.7 Chemikalien	15
3.8 Kommerzielle Analysesysteme (Kits)	18
3.9 Grundstoffe für Kulturmedien	18
3.10 Verbrauchsmaterial	19
3.11 Geräte	19
3.12 Puffer und Stammlösungen	21
3.13 Kulturmedien	24
4. Methoden	25
4.1 Zellkultur	25
4.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
4.1.2 Zellernte	25
4.1.3 Mykoplasmentest	26
4.2 Proteinchemie	26
4.2.1 Präparation von Zelllysaten	26
4.2.2 Stimulation von Zellen	27
4.2.2.1 Mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	27
4.2.2.2 Mit Antikörpern	27
4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	28
4.2.4 Immunpräzipitation	28

4.2.5 Koimmunpräzipitation	29
4.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
4.2.7 Western Blotting	30
4.2.8 Immunfärbung der Nitrocellulosemembran	31
4.2.8.1 Färbung mit der Chemilumineszenz-Methode	31
4.2.8.2 Färbung mit der o-Dianisidin/Natriumnitroprussid-Methode	32
4.2.8.3 Färbung mit der TMB-Methode (Vector Lab.)	32
4.2.8.4 Wiederverwendung einer gefärbten Membran	33
4.2.8.5 Färbung einer Membran mit Indian Ink	33
4.2.8.6 Coomassie-Färbung eines Gels	33
4.3 Immunfluoreszenz	34
4.3.1 Oberflächen-Antigene	34
4.3.2 Zytoplasmatische Antigene	34
4.3.3 Auswertung der Ergebnisse am Mikroskop	35
4.3.4 Auswertung der Ergebnisse am FACScan-Gerät	35
4.4 Zeitabhängige FACScan-Messungen (Calcium-Einstrom)	35
4.4.1 Markierung von Zellen	35
4.4.2 Kontrolle am Mikroskop	36
4.4.3 Durchführung von zeitabhängigen FACScan-Messungen	36
4.5 DNS-Arbeitstechniken	37
4.5.1 Präparation von Plasmid-DNS mit dem Plasmid-Maxi-Kit Jetstar (Genomed)	37
4.5.2 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNS mit JetQuick (Genomed)	37
4.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNS	38
4.5.4 Verdau von DNS mittels Restriktionsendonukleasen	38
4.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNS	38
4.5.6 Herstellung kompetenter Bakterien	39
4.5.7 Transformation kompetenter Bakterien	39
4.5.8 Einfrieren von Bakterien	39
4.6 Luziferase-Assays	40
4.6.1 Transiente Transfektion von Zellen mit Fugene	40
4.6.2 Stimulation der transient transfizierten Zellen	40
4.6.3 Herstellung von Zellextrakten	41
4.6.4 Luziferase-Assays	41
4.6.5 Bestimmung von Proteinmengen nach Bradford	42

5. Ergebnisse	43
5.1 Charakterisierung der verschiedenen Muc18-Antikörper	43
5.2 Calcium-Einstrom nach Muc18-Kreuzvernetzung auf Zellen	46
5.3 Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster nach Kreuzvernetzung von Muc18	52
5.3.1 Phosphorylierungsstatus von Muc18	52
5.3.2 Neu phosphorylierte Proteine im Zelllysate nach Muc18-Stimulation	53
5.4 Identifikation von durch Muc18-Stimulation neu auftretenden Phosphoproteinen	57
5.4.1 Expression von Signalweg-Proteinen	57
5.4.2 Phosphorylierung von Signalwegproteinen durch Muc18-Kreuzvernetzung	60
5.4.2.1 Phosphorylierung von p130Cas/p105CasL nach Muc18-Stimulation	60
5.4.2.2 Phosphorylierungsstatus von fak nach Kreuzvernetzung von Muc18	62
5.4.2.3 Phosphorylierungsstatus von fyn nach Kreuzvernetzung von Muc18	63
5.5 Koimmunpräzipitation von Signalwegproteinen mit Muc18	65
5.5.1 Koimmunpräzipitation von p130Cas/p105CasL nach Muc18-Stimulation	65
5.5.2 Versuch der Koimmunpräzipitation von fak nach Muc18-Stimulation	70
5.5.3 Versuch der Koimmunpräzipitation von fyn nach Muc18-Stimulation	71
5.5.4 Versuch der Koimmunpräzipitation von Paxillin nach Muc18-Stimulation	73
5.5.5 Koimmunpräzipitation von nck mit Muc18	74
5.6 Zusammenfassung der Versuche zu Phosphorylierung und Koimmunpräzipitation	76
5.7 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Kreuzvernetzung von Muc18	77
5.7.1 cAMP-responsives Element (CRE)	77
5.7.2 pIC277 Δ AP2, ein Konstrukt aus dem ICAM-1-Promotor	78
5.7.3 Ermittlung des responsiven Elements aus dem ICAM-1-Promotor	80
5.7.4 Weitere getestete Konstrukte	82
6. Diskussion	83
6.1 Partielle Identifizierung des Muc18-Signalweges	86
6.2 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Muc18	93
6.3 Der Signalkomplex um Muc18	94
7. Literaturverzeichnis	95
Abkürzungen	104
Publikationen	107
Lebenslauf	108

1. Zusammenfassung

Muc18/MCAM/CD146, ein Zelloberflächenglykoprotein von 113 kD, wurde ursprünglich als Melanom-Antigen identifiziert, dessen Expression mit Tumorprogression und der Fähigkeit zur Metastasierung assoziiert ist. Es ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und vermittelt homotypische und heterophile Adhäsion.

Aus diesem Grund wurde vermutet, dass Muc18, wie auch andere Zelladhäsionsmoleküle, der Beginn einer Signalkette ist. Da der zugehörige Ligand immer noch unbekannt ist, wurden zur Untersuchung dieser Vermutung monoklonale α -Muc18-Antikörper verwendet, um die Bindung des Liganden zu imitieren.

Nach Kreuzvernetzung von Muc18 in Muc18-Transfektanten und in natürlich Muc18-exprimierenden Melanomzellen mit verschiedenen α -Muc18-Antikörpern konnte kein Calcium-Einstrom festgestellt werden, aber eine Reihe von neu Tyrosin-phosphorylierten Proteinen wurden mittels Western Blot detektiert. Diese lagen bei etwa 50, 70 – 90, 128 und 146 kD. Zwei dieser neu phosphorylierten Proteine wurden als das Adapterprotein p130Cas (crk-associated substrate) und sein Ligand p105CasL identifiziert. Eine Muc18-assoziierte Phosphorylierung von fak („focal adhesion kinase“) und fyn (eine Proteintyrosinkinase der src-Familie) wurde nicht beobachtet. P130Cas und p105CasL, sowie nck, ein weiteres Adapterprotein, wurden mit Muc18, unabhängig von Muc18-Aktivierung, kopräzipitiert. Fak, fyn und Paxillin konnten nicht kopräzipitiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Muc18-Signalweg ähnlich, aber nicht identisch mit dem β_1 -Integrin-Signalweg ist. Zusätzlich zu diesen zytosolischen Interaktionspartnern konnten noch weitere, im Zellkern wirksame Signalpartner von Muc18 identifiziert werden. Bei transienter Transfektion von Melanomzellen mit Luziferase-Reporterkonstrukten, die jeweils verschiedene Transkriptionsfaktor-responsive Elemente enthielten, führte Kreuzvernetzung von Muc18 zur Aktivierung von CRE (cAMP responsive element) und der NF- κ B-responsiven Elemente aus dem ICAM-1-Promotor. Damit sind wahrscheinlich auch CRE-bindende Proteine und NF- κ B am Muc18-Signalweg beteiligt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bindung von Muc18 an seinen Liganden nicht nur zur Muc18-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion führt, sondern auch zu Veränderungen in der Genexpression und vielleicht zu verstärkter Expression von anderen Zelladhäsionsmolekülen.

Somit konnte in dieser Arbeit die Frage, ob Muc18 ein Signalweg-Initiator ist, bejaht, und die ausgelöste Signalkette punktuell aufgeklärt werden.

2. Einleitung

2.1 Das maligne Melanom

In Industrieländern ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Von den jährlich diagnostizierten bösartigen Neubildungen fallen 2% auf das maligne Melanom, das so 1% aller Krebstodesfälle verursacht. Jährlich erkranken in Deutschland 6.900 Menschen an einem malignen Melanom der Haut (Zahlen vom Robert-Koch-Institut, Berlin). Das maligne Melanom kann aber nicht nur an der Haut auftreten, sondern auch an den Schleimhäuten, z. B. des Darms und an der Netzhaut des Auges.

Tumoren sind genetische Erkrankungen von somatischen Zellen, wobei eine einzelne Zelle sukzessiv eine unterschiedliche Anzahl von genetischen Veränderungen durchmacht, welche letztlich zum transformierten Phänotyp führen (Hunter, 1997; Hanahan et al. , 2000). Wenn eine Mutation in einem Protoonkogen stattfindet, so gerät das Zellwachstum außer Kontrolle. Die Mutation der Codons 12 oder 61 liefert z. B. ein ras-Gen und damit ein ras-Protein, welches eine andere Proteinkonformation besitzt und physiologisch nicht mehr durch GAP inaktiviert werden kann (Waldmann und Rabes, 1996); also ist das ras-Gen nun ein ras-Onkogen. Andererseits kommen Mutationen in Tumorsuppressorgenen vor, d. h. Gene, welche normalerweise das Wachstum kontrollieren, verlieren ihre Funktion (Hunter, 1997). Erst durch das Zusammenwirken mehrerer solcher Ereignisse, kommt es zur malignen Transformation. Die im malignen Melanom vorzugsweise mutierten Gene sind die Onkogene ras und bcl-2 und die Tumorsuppressorgene p53, p16, Rb und NF-1 (Waldmann et al. , 1999). Diese Mutationen treten insgesamt gesehen jedoch nicht so häufig auf, es sind wohl weitere Gene an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt, die noch nicht identifiziert werden konnten.

Das kutane Melanom wird von Melanozyten, den Pigment-produzierenden Zellen, die als einzelne Zellen entlang der dermalen-epidermalen Grenzschicht lagern, entwickelt. Man weiß, dass definierte Stadien, die mit der Prognose für den Patienten verknüpft sind, existieren (Clark et al. , 1984; Herlyn et al. , 1987). Durch Proliferation der Melanozyten können über die Stufen nävozellulärer Nävus, dysplastischer Nävus, der schon durch zelluläre

und architektonische Atypie auffällt (Greene et al. , 1985), frühes malignes Melanom und fortgeschrittenes malignes Melanom, Melanommetastasen entstehen. Wahrscheinlich ist aber auch die direkte Transformation eines Melanozyten zum frühen malignen Melanom möglich. Des weiteren weiß man, das die Fähigkeit eines Melanoms zu metastasieren proportional zur vertikalen Dicke des Tumors (Breslow, 1970) ist. Die Überlebensrate nach 5 Jahren beträgt bei einem Tumor von weniger als 0,75 mm Dicke über 99%, bei 0,76 bis 1,5 mm ca. 90%, bei 1,51 bis 3 mm etwa 70% und bei mehr als 3 mm nur noch etwas mehr als 40% (Koh, 1991). Damit ist die Tumordicke ein guter prognostischer Parameter der Tumorprogression.

Der Prozess der Metastasierung ist eine komplexe Abfolge von Schritten. Zunächst tritt die Tumorzelle über umgebendes Gewebe in das vaskuläre System ein, um an einem anderen Ort die Blutbahn wieder zu verlassen und in das Gewebe zu invasieren. Dieser neue Ort hängt auch vom Ausgangsort der Metastase ab. So findet man Melanommetastasen häufig in Lymphknoten, Haut, Lunge und Gehirn, wo sie dann einen Sekundärtumor ausbilden können. Um jedoch den alten Zellverband verlassen und einen neuen bilden zu können, müssen sich die Eigenschaften der Tumorzellen ändern. Das heißt, es müssen neue Moleküle exprimiert werden, andere verändern sich oder gehen verloren. Eines der in diesem als Tumorprogression bezeichneten Prozess (Foulds, 1954) bei Melanomen neu auftretenden Moleküle ist Muc18/MCAM/CD146. Der monoklonale Antikörper Muc18 färbt selten benigne Nävi, jedoch 40% der dünnen Melanome (bis 1mm), sowie 60% der Melanome mit einer Dicke von 1,5 bis 3 mm, ab 3 mm Dicke sogar 80% der Tumoren und 71% der Melanommetastasen (Lehmann et al. , 1989). Die Expression von Muc18 nimmt also mit der Tumorprogression zu. Die Zunahme der Tumorgenizität und des metastatischen Potentials in Abhängigkeit von der Muc18-Expression konnte auch in vivo gezeigt werden (Xie et al. , 1997; Schlagbauer-Wadl et al. , 1999), was vermuten lässt, dass es tatsächlich eine Rolle bei der Melanomprogression im Menschen spielt.

2.2 Der Tumorprogressionsmarker Muc18/MCAM/CD146

Wie schon erwähnt, ist Muc18 ein mit der fortschreitenden Malignität eines Tumors assoziiertes Molekül. In seiner Eigenschaft der Melanom-Assoziierung wurde es auch entdeckt (Lehmann et al. , 1987). Man findet Muc18 hauptsächlich auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, d. h. auf Melanom, Gliom und Neuroblastom. Es wird aber auch von etwa 10 bis 20% der Mammakarzinome exprimiert. Im normalen Gewebe kommt Muc18 auf glatten Muskelzellen und auf manchen vaskulären Endothelien (Sers et al. , 1994; Shih et al. , 1994; Bardin et al. , 1996), sowie auf einer Subpopulation von aktivierten T-Zellen (Pickl et al. , 1997) und im Knochenmark (Filshie et al. , 1998) vor.

Muc18/MCAM/CD146 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (Lehmann et al. , 1989) und ist verwandt mit anderen Zelladhäsionsmolekülen („cell adhesion molecules“, CAMs) dieser Familie. Dies sind z. B. NCAM (Cunningham et al. , 1987) und BEN (Pourquie et al. , 1992), sowie ICAM-1 (Marlin et al. , 1987) und VCAM-1 (Rice et al. , 1989). Das ursprünglich als Muc18 (Lehmann et al. , 1987) bezeichnete Molekül erhielt den Namen MCAM („melanoma cell adhesion molecule“) von der Genome Database (GDB ID 304548) und den Namen CD146 vom „6th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens“ (Kishimoto et al. , 1997). Wie in Abb. 1 zu sehen ist, enthält Muc18 fünf immunglobulin-artige Domänen (V-V-C2-C2-C2), eine Transmembranregion und einen zytoplasmatischen Rest von 63 Aminosäuren mit 5 potentiellen Phosphorylierungsstellen an Serin und Threonin. Außerdem liegen neun potentielle N-Glykosylierungsstellen vor. Das Molekulargewicht von 113 kD verringert sich nach Verdau mit einer N-Glykosidase auf 65 kD (Lehmann et al. , 1989).

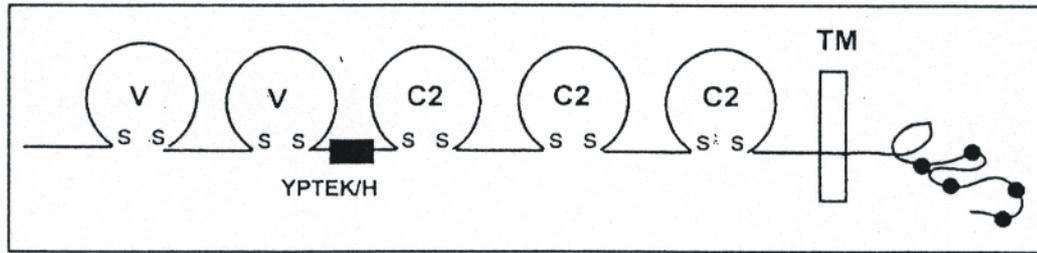


Abb. 1: Schematischer Aufbau von Muc18: TM (Transmembranregion), ausgefüllte Kreise (potentielle Phosphorylierungsstellen). Die dunkle Box zeigt die Lage einer mit anderen Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie konservierten Sequenz.

Wie vorher schon kurz erwähnt, führt in vivo die Expression von Muc18 zu erhöhter Tumorgenizität und zur Zunahme des metastatischen Potentials (Xie et al. , 1997; Schlagbauer-Wadl et al. , 1999). In vitro führt Muc18-Expression zu verstärkter homotypischer Adhäsion. Für diese Versuche wurden stabil mit Muc18-cDNA transfizierte Zellen benutzt. Bei subkutaner Injektion in „nude“- oder „scid“-Mäuse bildeten die Muc18-transfizierten Klone schnell wachsende Tumore in allen Mäusen (Xie) und in einem experimentellen Lungenmetastasen-Test zeigte sich, dass lediglich die Muc18-transfizierten Zellen nach intravenöser Injektion Lungenmetastasen hervorrufen (Xie, Schlagbauer-Wadl). Somit spielt Muc18 in vivo eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression. In keinem der beiden Fälle bildeten Muc18-transfizierte Zellen Lungenmetastasen nach subkutaner Injektion und für eine transfizierte Zelllinie (SK-2, Melanom) konnte keine Bildung von metastasierten Zellen in der Lunge bei intravenöser Injektion nachgewiesen werden. Somit kann man davon ausgehen, dass Muc18 eher spätere Prozesse der Metastasierung beeinflusst, aber dafür allein nicht ausreichend ist.

Muc18 ist ein Zelladhäsionsmolekül, wie mittels Adhäsions-Assays (Takeichi, 1977) beobachtet werden konnte (Johnson et al. , 1997; Shih et al. , 1997). Wie für Melanomzellen gezeigt werden konnte, aggregieren Muc18-positive Transfektanden auch in 2 mM EDTA zu homotypischen Zellverbänden, während die untransfizierte Zelllinie nicht aggregiert. Da von EDTA zweiwertige Kationen (Calcium, Magnesium) abgefangen werden, wird die Adhäsion durch Cadherine und Integrine unterbunden; die Adhäsion über Muc18 findet jedoch statt, d. h. sie ist Kation-unabhängig. Die Aggregation der Melanomzellen kann jedoch verhindert werden, wenn man die Versuche bei 4°C durchführt. Somit ist die Adhäsion Temperatur-

abhängig. Des Weiteren findet man im Vergleich zu CEA („carcinoembryonic antigen“), welches homophile Adhäsion, d. h. zwischen Molekülen gleicher Art, eingeht, ein völlig verschiedenes Muster in „mixed aggregation assays“. Hier werden zu gleichen Teilen Muc18-transfizierte und nicht-transfizierte Melanomzellen, die vorher mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen gefärbt wurden, gemischt, und die Zahl der Cluster mit bestimmten Farbzusammensetzungen gezählt. Hierbei liegt der Hauptteil der Zellen in Clustern mit gleich vielen Zellen jeder Farbe vor, das bedeutet Muc18 zieht im Gegensatz zu CEA, bei dem man die meisten Zellen in Clustern aus nur CEA-transfizierten Zellen findet, heterophile Adhäsion vor. Dies bedeutet, Muc18 interagiert mit einem Molekül (Ligand), welches von den Muc18-negativen nicht-transformierten neo-Zellen exprimiert wird. Weitere Experimente zeigten, dass dieser potentielle Ligand von Melanomzellen exprimiert wird. Muc18 vermittelt also homotypische, d. h. zwischen der gleichen Zellart und heterophile (Interaktion mit einem anderen Molekül) Adhäsion. Man könnte somit für das im Verlauf der Tumorprogression verstärkt auftretende Protein eine Rolle in der Bildung des Sekundärtumors postulieren. Es ermöglicht wahrscheinlich neue Zell-Zell-Interaktionen in der entstehenden Metastase. Normalerweise sind Melanozyten Einzelzellen, die nicht mit anderen Melanozyten, aber dafür mit Keratinozyten interagieren.

Adhäsion von Zellen mit anderen Zellen oder von Zellen mit extrazellulärer Matrix ist ein Prozess der u. a. bei Entwicklung, Differenzierung und Immunantwort, aber auch bei der Tumorgenese bzw. -progression eine entscheidende Rolle spielt. Dabei sind für Zell-Zell-Verbindungen Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine, Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, Integrine und Selektine verantwortlich, wobei die Bindung von Cadherinen homophil erfolgt. Integrine und Selektine binden heterophil. Die CAMs der Immunglobulinsuperfamilie dagegen können sowohl homophil als auch heterophil binden. Als Beispiel sei hier CEA aufgeführt, welches homophile und heterophile Kontakte eingeht (Benchimol et al. , 1989). Alle genannten Proteingruppen sind in ihrer Bindungsfähigkeit Kationen-abhängig, außer die CAMs der Immunglobulinsuperfamilie, welche für die Zelladhäsion kein Calcium benötigen.

Die Zelladhäsionsmoleküle, die auf der Zelloberfläche sitzen, können nach dem initialen Adhäsionskontakt eine Serie von Ereignissen auslösen. Die Rezeptoren können aggregieren, Signale in die Zelle weitergeben und im Zellinneren weitere komplexe Vorgänge verursachen. Für viele Zelladhäsionsmoleküle ist bereits bekannt, dass sie Teil von Signaltransduktionsketten sind, und auch die Signalwege sind z. T. schon aufgeklärt. Ein Beispiel ist ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“), welches an LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen 1“) oder Mac-1 bindet (Marlin und Springer, 1987; Diamond et al. , 1990). Die Auswahl des Rezeptors hängt dabei vom Glykosylierungsstatus von ICAM-1 ab (Diamond et al. , 1991). Diese beiden Rezeptoren sind Leukozyten- β_2 -Integrine. Die Bindung von ICAM-1 an seine Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe und verstärkt Effektor-Target-Interaktionen (Dustin et al. , 1988; Dustin und Springer, 1991). In diesem Fall werden Signale von beiden Partnern übertragen. ICAM-1 gibt das Signal über fak („focal adhesion kinase“) weiter (Etienne et al. , 1998), die β_2 -Integrine über die Phosphatidylinositol-3-kinase (Axelsson et al. , 2000). Ein interessanter Punkt ist auch, dass sich diese Zelladhäsionsmoleküle gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen können. Stimuliert man LFA-1, so wird ICAM-1 hochreguliert (Yamada et al. , 1997). Von den β_1 -Integrinen weiß man, dass sie eine Zahl von Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinkinasen (PTKs), wie fak, c-Src, Abl und Syk aktivieren (Schlaepfer und Hunter, 1998). In alle diese Vorgänge der Signalübermittlung sind eine Vielzahl von Rezeptoren, Liganden und Kinasen eingebunden.

Da Muc18/MCAM/CD146 ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül ist, sollte nun im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob es der Beginn einer Signalkette ist und wenn ja, mit welchen Molekülen es stromabwärts kommuniziert.

3. Material

3.1 Zelllinien und Transfektanden

Alle Zelllinien sind menschlicher Herkunft und sämtliche Transfektanden wurden im Institut für Immunologie, München hergestellt.

Name	Zelllinie	Transfektion	Bezugsquelle
CEM	T-Zell-Lymphom	-	ATCC (Amer. Tissue Culture Coll.), U. S. A.
Colo320-drop8 as TR1	Colonkarzinom	Mader drop8-cDNA antisense in pcDNA-3	J. Johnson, Inst. für Immunologie, München
Colo320-M18 TR4	Colonkarzinom	Muc18-cDNA in pcDNA-1 Expr.-vektor (drop 4.7 Klon) mit neo ^R Plasmid	J. Johnson, Inst. für Immunologie, München
HeLa	Zervikalkarzinom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.
Jurkat	T-Zell-Lymphom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.
K-562	Myeloide Leukämie	-	ATCC, Rockville, U. S. A.
Mel888 neo TR4	Melanom	Mel888 mit neo ^R Plasmid	M. Bar-Eli, Houston, Tex. , U. S. A.
Mel888-M18 TR1	Melanom	wie Colo320-M18 TR4; nicht kloniert	J. Johnson, Inst. für Immunologie, München
MelJuSo	Primär-melanom	-	Inst. für Immunologie, München
Molt-4	T-Zell-Lymphom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.

SKBr3	Mamma- karzinom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.
SKMel25	Melanom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.
SKMel25-M18 TR3	Melanom	wie Colo320- M18 TR4; kloniert	ATCC, Rockville, U. S. A.
SW480	Colon- karzinom	-	ATCC, Rockville, U. S. A.

Tab. 1 : Zelllinien und Transfektanden

3.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Antigen	Isotyp	Hersteller
CD11a	20 µg/ml	CD11a (LFA-1)	IgG ₁	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD18	20 µg/ml	CD18 (β ₂ -Integrin)	IgG ₁	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD45	Kulturüberst. 1:30	CD45 (LCA)	IgG ₁	Dianova, Hamburg
CD45 RO	unverdünnt	CD45 RO	IgG _{2a}	Immunotech, Marseille, Frankreich
CEA	20 µg/ml	CEA	IgG ₁	Immunotech, Marseille, Frankreich
CK2	20 µg/ml	Cytokeratin 18	IgG ₁	Boehringer, Mannheim
ECAD	20 µg/ml	E-Cadherin	IgG ₁	Cell Systems, St. Katharinen

fak	1:500	fak	IgG ₁	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.
FR4H12	Kulturüberst. pur	CD66c (NCA, Nonspecific Cross Reacting Antigen)	IgG ₁	Daniel et al. , 1993, Inst. für Immunologie, München
fyn	1:500	fyn	IgG _{2b}	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.
R α fyn	1:500	fyn	polyklonales Kaninchen-serum	Upstate Biotech. , Lake Placid, NY, U. S. A.
F261 (R α M-FITC)	Serum 1:25	Maus-Ig	polyklonales Serum	DAKO, Kopenhagen, DK
G α MIgG-PE	1:200	Maus-IgG	polyklonales Serum	Jackson Lab. , West Grove, U. S. A.
gp89-11	Kulturüberst. pur	ICAM-1	IgG ₁	Johnson et al., 1988, Inst. für Immunologie, München
HB116 (MB40.5)	Kulturüberst. pur	MHC Klasse I	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB118 (PA2.6)	Kulturüberst. pur	MHC Klasse I	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB12 (GAP8.3)	Kulturüberst. pur	CD45 (LCA)	IgG _{2a}	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB120 (BB7.5)	Kulturüberst. pur	MHC Klasse I	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB2 (T3-3A1)	Kulturüberst. pur	CD7	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB202 (TS1/22.1.1.13)	Kulturüberst. pur	CD11a (LFA-1)	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB203 (TS2/18.1.2.11)	Kulturüberst. pur	CD18 (β ₂ -Integrin)	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB205 (TS2/9.1.4.3)	Kulturüberst. pur	CD58	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.

HB28 (BBM.1)	Kulturüberst. pur	β_2 -Mikro- globulin	IgG _{2a}	ATCC, Rockville, U. S. A.
HB81-90 (2G8.D6)	Kulturüberst. pur	Phospho- tyrosin	IgG ₁	ATCC, Rockville, U. S. A.
α IL4	5 μ g/ml (Ca-Einstrom)	IL4 rekombinant	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
L243	Kulturüberst. pur	HLA-DR α -Kette	IgG _{2a}	ATCC, Rockville, U. S. A.
MAd-M18- 1B4	Kulturüberst. pur	natives Muc18	IgM	Inst. für Immunologie, München
MAd-M18- 5D7	Kulturüberst. pur	natives Muc18	IgM	Inst. für Immunologie München
MAd-M18- 6A8	Kulturüberst. pur	natives Muc18	IgG _{2b}	Inst. für Immunologie, München
α -Melanom	20 μ g/ml	Melanom- proteoglykan	IgG ₁	Immunotech, Marseille, Frankreich
MOPC21	5 μ g/ml (Ca-Einstrom)	nicht bekannt; Maus- Myelom-AK	IgG ₁	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
MPC11	Kulturüberst. pur	nicht bekannt; Maus- Myelom-AK	IgG _{2b}	J. Anderson, Basel Inst. Im- munol. , Basel
M-T 281	20 μ g/ml	CD28	IgM	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 301	20 μ g/ml; 5 μ g/ml (Ca-Einstrom)	CD3	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 310	20 μ g/ml	CD4	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 426	20 μ g/ml	CD4	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 427	20 μ g/ml	CD4	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 429	20 μ g/ml	CD4	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München

M-T 441	20 µg/ml	CD4	IgG _{2b}	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 805	20 µg/ml	CD8	IgG _{2a}	Rieber, Inst. für Immunol., München
M-T 811	20 µg/ml	CD8	IgG ₁	Rieber, Inst. für Immunol., München
Muc18	Kulturüberst. pur	natives Muc18	IgG _{2a}	Lehmann et al., 1987, Inst. für Immunologie, München
MucBA18.1	Kulturüberst. pur	denat. Muc18	IgG ₁	Lehmann et al., 1989, Inst. für Immunologie, München
MucBA18.2	Kulturüberst. pur	denat. Muc18	IgG ₁	Lehmann et al., 1989, Inst. für Immunologie, München
MucBA18.3	Kulturüberst. pur	denat. Muc18	IgG ₁	Lehmann et al., 1989, Inst. für Immunologie, München
MucBA18.4	Kulturüberst. pur	denat. Muc18	IgG ₁	Lehmann et al., 1989, Inst. für Immunologie, München
M630	20 µg/ml	Cytokeratin 1, 5, 10,14	IgG ₁	DAKO, Kopenhagen, DK
M821	20 µg/ml	Cytokeratin 5, 6, 8, 17	IgG ₁	DAKO, Kopenhagen, DK
α-NCAM (T199)	20 µg/ml	NCAM	IgG ₁	Immunotech, Marseille, Frankreich
nck	1:500	nck	IgG _{2b}	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.
Rønck	1:20000	nck	IgG	Upstate Biotech., Lake Placid, NY, U. S. A.
Paxillin	1:12000 – 1:15000	Paxillin	IgG ₁	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.

pSer (1C8, 4A3, 4A9, 4H4)/ pThr (1E11)- Sampler Kit	1:500	Phosphoserin bzw. -threonin	pSer IgM pThr IgG ₁	Biomol, Hamburg
pTyrosin (4G10)	1:500	Phosphotyrosin	IgG _{2bκ}	Upstate Biotech. Lake Placid, NY, U. S. A.
PY20	1:500	Phosphotyrosin	IgG	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.
p130Cas	1:500	p130Cas (kreuzreaktiv gg. p105CasL)	IgG ₁	Transduction Lab., Lexington, KY, U. S. A.
P161 (RαM-POX)	1:200– 1:5000	Maus-Ig	polyklonal	DAKO, Kopenhagen, DK
P217 (PαR-POX)	1:1000	Kaninchen-Ig	polyklonal	DAKO, Kopenhagen, DK
RαM IgG+IgM- POX	1:5000- 1:12000	Maus-Ig	polyklonal	Jackson Lab. , West Grove, U. S. A.
RαMIgM	1:500- 1:1000	Maus-IgM	polyklonal	Jackson Lab. , West Grove, U. S. A.
RC20:HRPO	1:500- 1:1000	Phosphotyrosin	IgG (rekombinant aus PY20)	Transduction Lab. , Lexington KY, U. S. A.
UPC10	gereinigt 20 µg/ml	Mausmyelom- Protein; bindet an Fructosan	IgG _{2a}	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
W6/32	Kulturüberst. pur	MHC-Klasse I	IgG _{2a}	ATCC, Rockville, MD, U. S. A.
Z420 (GαMIg)	4 - 80 µg/ml	Maus-Ig	polyklonal	DAKO, Kopenhagen, DK
141-11	Kulturüberst. pur	H2-κ	IgM	G. Hämmerling, DKFZ, Heidelberg

Tab. 2: Antikörper

3.3 Enzyme

Restriktionsenzyme

Boehringer, Mannheim

3.4 Bakterien

E. coli JM101: supE, thi, Δ(lac-proAB), F'[traD36 pro AB+ lacI^q lacZΔM15]

3.5 Plasmide

- pCIS-CK: cis-Reporterplasmide Stratagene, La Jolla, CA, U. S. A.
 - pAP1-Luc [AP1: (TGACTAA)₇]
 - pCRE-Luc [CRE: (AGCCTGACGTCAGAG)₄]
 - p53-Luc [p53 : (TGCCTGGACTTGCCTGG)₁₅]
 - pCIS-CK [kein Insert]
- pβTATALuci: STAT-Reporterplasmid Ziegler, Inst. für Immunologie, München
 - pSTAT [STAT3: (TGTGCCGGGA)₃]
 - pβTATALuci [kein Insert; Ausgangsvektor von p3xκB]
 - pβTATALuciDel [wie pSTAT mit Deletion im Insert]
- pXP2: ICAM-Promotor-Plasmide Johnson, Inst. für Immunologie, München
 - pIC135
 - pIC189
 - pIC277
 - pIC277ΔAP2
 - pIC277ΔSma
 - pIC277ΔAP2NFκBMut
- pXP2: Muc18-Promotor-Plasmide Johnson, Inst. für Immunologie, München
 - pSMAI [CRE: (TGACGTCA)]
 - pSMAICREMut [CRE mutiert: (TCAGGACA)]
- p3xκB.luc: weitere Reporterplasmide
 - p3xκB [NFκB: (AGGGGACTTTCCGA)₃]

Ziegler, Inst. für Immunologie, München

Ziegler, Inst. für Immunologie, München

Johnson, Inst. für Immunologie, München

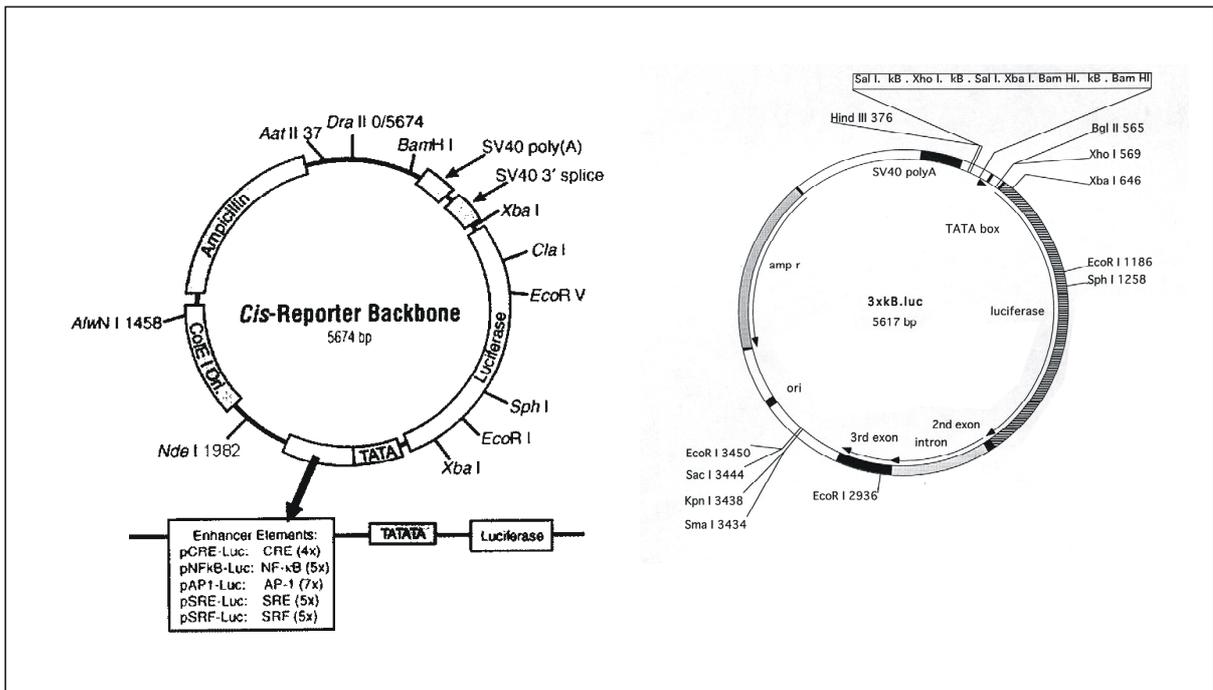


Abb. 2: Luziferase-Reportervektoren pCIS-CK und p3xB.luc

3.6 Größenstandards

DNS-Leiter

Rainbow-Marker (14,3 – 220 kD)

Rainbow-Marker (14,3 – 200 kD)

Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U. S. A.

Amersham, Buckinghamshire, GB

Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U. S. A.

3.7 Chemikalien

Chemikalie

Aceton

Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)

Agarose Typ II Medium EEO

Ammoniumperoxodisulfat

Ampicillin (Natriumsalz)

Benzamidinhydrochlorid

D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-

N-hydroxysuccinimidester

Hersteller

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

Merck, Darmstadt

Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

Boehringer, Mannheim

Blotto (Blocking Reagenz)	Pierce, Rockford, Illinois, U. S. A.
Borsäure	Merck, Darmstadt
Brij96	Fluka, Buchs, CH
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Calcimycin A-23187	Molecular Probes, Eugene, Oregon, U. S. A.
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Casein/PBS	Pierce, Rockford, Illinois, U. S. A.
Casein/TBS	Pierce, Rockford, Illinois, U. S. A.
Coomassie Blue R250	Serva, Heidelberg
Cyprobay 200	Bayer, Leverkusen
o-Dianisidin	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N, N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiobissuccinimidylpropionat (DSP)	Pierce, Rockford, Illinois, U. S. A.
Dithiothreitol (DTT)	Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U. S. A.
Essigsäure (100%, Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, CH
Fluo-3 AM	Molecular Probes, Eugene, Oregon, U. S. A.
Fugene	Boehringer, Mannheim
Gelatine	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
β -D-Glucose	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
L-Glutamin	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Indian Ink Black	Winsor & Newton, London, GB
Isopropanol	Fluka, Buchs, CH
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Luziferase Assay-Reagenz	Promega, Madison, WI, U. S. A.

Luziferase Lyse-Reagenz 5x	Promega, Madison, WI, U. S. A.
Magermilchpulver	Fluka, Buchs, CH
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Methanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitroprussid	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Natriumpyruvat	Serva, Heidelberg
NP-40	Calbiochem, La Jolla, CA, U. S. A.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Pferdeserum	Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U. S. A.
1,10-Phenanthrolin	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Proteaseninhibitorencocktail (Tabletten)	Boehringer, Mannheim
Protein-A Agarose	Santa Cruz Biotech. Inc. , Santa Cruz, CA, U. S. A.
Protein-A Sepharose	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Protein-G Plus Agarose	Santa Cruz Biotech. Inc. , Santa Cruz, CA, U. S. A.
Protein-G Sepharose	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Rinderserumalbumin (RSA)	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Salzsäure, 25%ig	Roth, Karlsruhe
Sepharose CL-4b	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Streptavidin-POD	Boehringer, Mannheim
Streptomycin	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

Substrat (Chemilumineszenz)	Pierce, Rockford, Illinois, U. S. A.
Substrat (Chemilumineszenz)	Amersham, Buckinghamshire, GB
Substrat (Chemilumineszenz)	NEN, Boston, MA, U. S. A.
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Tween-20	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.
Wasserstoffperoxid, 30%ig	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

3.8 Kommerzielle Analysensysteme (Kits)

Fix & Perm	Caltag, Burlingame, CA, U. S. A.
JetQuick	Genomed, Bad Oeynhausen
JetStar	Genomed, Bad Oeynhausen
Protein-Assay (Bradford)	Biorad, München
Protein-Assay (Lowry)	Biorad, München
TMB-Substrat-Kit	Vector Lab. , Burlingame, CA, U. S. A.

3.9 Grundstoffe für Kulturmedien

Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U. S. A.
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco, Augsburg

3.10 Verbrauchsmaterial

Cell Scraper	Costar, Cambridge, MA, U. S. A.
Deckgläser für Objektträger	GFL, Würzburg
Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Kanülen	Braun, Melsungen
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen	Costar, Cambridge, MA, U. S. A.
Lochplatten	
6-Loch	Costar, Cambridge, MA, U. S. A.
96-Loch	Greiner, Nürtingen
Nitrocellulosemembran BA85	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilm CEA	Linhart, München
Spritzen	Becton & Dickenson, San Jose, CA, U. S. A.
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Whatman 3mm Papier	GFL, Würzburg
Zentrifugenröhrchen	
50 ml (PP)	Greiner, Nürtingen
15 ml (PP), 15 ml (PS)	Greiner, Nürtingen
2 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

3.11 Geräte

Blotting-Apparatur	Biorad, München
Elektrophoresekammer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Elisa-Reader Easy Reader EAR 400 AT	SLT-Labinstruments, Grödig, A
Filmentwicklergerät Airclean 200	Protec, Deutschland
Fluorescence Activated Cell Scanner (FACS)	Becton & Dickenson, San Jose, CA, U. S. A.
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau

Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikropipetten (Pipetman)	Abimed, Düsseldorf
Mikroskope	
Diavert	Leitz, München
Dialux 20	Leitz, München
Laborlux (Fluoreszenz)	Leitz, München
Netzgeräte	
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Labornetzgerät EA3003 Macrodrive 1	LKB, Uppsala, Schweden
Powersupply	Desaga, Heidelberg
pH-Elektrode	Ingold, Steinbach
pH-Meter PHM 62	Radiometer, Kopenhagen, DK
Photometer	
Spektralphotometer U-3200	Hitachi, Tokio, Japan
Ultrospec 3000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Victor	Wallach, Turku, Finnland
Rollmischer Mixer 5	Denley, GB
Schüttelinkubator CH-4103	Infors AG, Bottmingen
Schüttler Celloshaker Vario-Speed	Biotech Fischer, Pittsburgh, PA, U. S. A.
Sterilwerkbank «Laminar Flow»	Büttner-Schilde-Haas AG
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex-Genie	Scientific Instr. , Hawthorne, NY, U. S. A.
Waagen	
Präzisionswaage HL32	Metteler, Gießen
Portable Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Würzburg
Zentrifugen	
Biofuge A	Heraeus Christ, Hanau
Minifuge 2	Heraeus Christ, Hanau
Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	DuPont, Wilmington, DE, U. S. A.
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg

3.12 Puffer und Stammlösungen

Für die Herstellung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

Blotting-Puffer	10 mM	Natriumhydrogencarbonat
	3 mM	Natriumcarbonat
	20% (v/v)	Methanol, reinst
Coomassie-Färbelösung	0,2% (w/v)	Coomassie Blue R250
	30% (v/v)	Methanol
	7% (v/v)	Eisessig
Coomassie-Entfärbelösung	wie Färbelösung ohne Coomassie Blue R250	
Elutionspuffer (für Western Blot)	0,1 M	Glycin, pH 2,9
Hepes (für Ca ²⁺ -Einstrom)	10 mM	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, pH 7,4
	137 mM	Natriumchlorid
	5 mM	Kaliumchlorid
	1 mM	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	5 mM	Glucose
	1 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	0,5 mM	MgCl ₂ · 2 H ₂ O
Laufpuffer	384 mM	Glycin
	50 mM	Tris
	0,1% (w/v)	SDS
Luziferase-Assay-Reagenz	20 mM	Trizin
	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ · 5 H ₂ O
	2,67 mM	MgSO ₄
	0,1 mM	EDTA

	33,3 mM	DTT
	270 μ M	Coenzym A
	470 μ M	Luziferin
	530 μ M	ATP
	pH 7,8	
Lyse-Puffer I	50 mM Tris, pH 7,4	
	200 mM	Natriumchlorid
	2 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	1 mM	Benzamidinhydrochlorid
	10 mM	Natriumflourid
	2 mM	Natriumvanadat
	1% (v/v)	NP-40
	1 St./10 ml	Proteaseninhibitoren-Cocktail-Tablette
Lyse-Puffer II	PBS 1x, pH 7,2	
	1% (v/v)	NP-40
	2 mM	Benzamidinhydrochlorid
	2 mM	PMSF
Lyse-Reagenz für Luziferase-Assays	25 mM Tris/Phosphat, pH 7,8	
	2 mM	DTT
	2 mM	1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
	10% (v/v)	Glycerin
	1% (v/v)	Triton X –100
PBS 1x, pH 7,2	1,47 mM	KH ₂ PO ₄
	2,68 mM	KCl
	137 mM	NaCl
	7,87 mM	Na ₂ HPO ₄

PBST	PBS, 0,1% Tween-20	
Probenpuffer für DNA	TE	
	50% (v/v)	Glycerin
	0,4% (w/v)	Bromphenolblau
	0,4% (w/v)	Xylencyanol
Probenpuffer für Protein	4% (w/v)	SDS
	0,125 M	aus 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	20% (w/v)	Glycerin
	9,3% (w/v)	DTT <u>oder</u> 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol
	einige Körner Bromphenolblau	
Substratlösung I	1 Teil	Luminol-Lösung
	1 Teil	Wasserstoffperoxid-Lösung
Substratlösung II	1,26 mM	o-Dianisidin
	15,3 mM	Natriumnitroprussid
	0,007%	H ₂ O ₂
TBE 1x	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7,5	
	150 mM	NaCl
TBST	TBS, 0,1% Tween-20	
TE	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
Waschmedium	RPMI 1640 Medium	
	0,1%	Natriumazid

3.13 Kulturmedien

Bakterien

LB-Agarplatten 1,5% Bacto-Agar in LB-Medium
(+ 100 µg/ml Antibiotikum, hier: Ampicillin)

LB-Medium 1% (w/v) Bacto Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl

Einfriermedium 2x 0,6 mM Magnesiumsulfat
55 mM Dikaliumhydrogenphosphat
26 mM Kaliumdihydrogenphosphat
3 mM Natriumcitrat
89 mM Ammoniumsulfat
6,2% Glycerin

Säugerzellen

Einfriermedium RPMI 1640 Medium
10% (v/v) FCS
10% (v/v) DMSO

Zellkulturmedium RPMI 1640 Medium
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
10% (v/v) FCS
1 mM Natriumpyruvat
2 mM L-Glutamin

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung werden $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen in 500 μ l Zellkulturmedium resuspendiert und 1:1 mit Einfriermedium vermischt. Dann friert man die Zellen ein bis zwei Tage bei -80°C und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff ein. Dabei sollte der Einfriervorgang möglichst langsam vor sich gehen, um eine Auskristallisation der Zellflüssigkeiten zu verhindern.

Das Auftauen von Zellen soll dagegen möglichst schnell geschehen. Man holt die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff und lagert sie auf Trockeneis zwischen. Dann erwärmt man die Suspension im 37°C -Wasserbad schnell, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden ist. Schließlich nimmt man die Zellen in 5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium auf und zentrifugiert 10 min bei Raumtemperatur und 350 xg. Dies dient zur Entfernung von im Einfriermedium vorhandenem DMSO. Jetzt setzt man die Zellen in eine Kulturflasche mit der entsprechenden Menge Medium.

4.1.2 Zellernte

In Gewebekulturflaschen aus Kunststoff werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 6% Kohlendioxid gezüchtet. Zur Ernte saugt man bei adhären wachsenden Zellen das Zellkulturmedium ab und löst diese 10 min bei 37°C mit PBS pH 7,2/1mM EDTA vom Boden der Flasche ab. EDTA ist ein anorganisches Anion, welches mit Calcium- und Magnesiumionen Komplexe bildet und so die Integrin-vermittelte Adhäsion an extrazellulären Matrixproteinen hemmt, da diese von zweiwertigen Kationen abhängt. Die Zellen trennt man durch Zentrifugation (10 min, 350 xg) ab, wäscht einmal in PBS oder TBS und zählt sie mit Hilfe eines Hämocytometers. Im Folgenden kann man die Zellen lysieren, stimulieren oder bei -20°C lagern.

4.1.3 Mykoplasmentest

Der Test basiert auf der Anfärbung von DNS durch den Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid. Um Säugerzellen auf Mykoplasmeninfektion hin zu testen, gibt man $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und wäscht zweimal mit PBS. Dazu wird in der Eppendorf-Zentrifuge bei Raumtemperatur 3 min bei 7000 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird zur Fixierung in 500 μ l Methanol resuspendiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach Pelletion wäscht man wieder zweimal in PBS. Schließlich werden die Zellen in 500 μ l einer Bisbenzimidlösung (1 μ g/ml in PBS) aufgenommen, für 15 min bei 37°C inkubiert und noch zweimal mit PBS gewaschen. Die in 50 bis 100 μ l PBS resuspendierten Zellen betrachtet man unter dem Fluoreszenzmikroskop (A_{\max} bei 343 nm) und man erkennt sowohl die DNS der Wirtszelle als auch die DNS der eventuell vorhandenen Mykoplasmen auf der Oberfläche der Zelle durch eine blaue Fluoreszenz.

4.2 Proteinchemie

4.2.1 Präparation von Zelllysaten

Frisch geerntete oder bei -20°C gelagerte Zellen werden einmal in PBS bzw. TBS (für Phosphorblots) gewaschen und bei Raumtemperatur 10 min bei 350 xg zentrifugiert. Dann lysiert man sie in 500 μ l bis 1 ml Lysepuffer (bis $4 \cdot 10^7$ Zellen möglich) und lässt 30 min auf Eis stehen. Im Lyse-Puffer befindet sich neben NP-40 als Detergenz ein Gemisch aus Proteaseninhibitoren, welche den Protein-Abbau verhindern. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C nimmt man den Überstand ab. Dieses Zelllysate kann nach Bestimmung der Proteinkonzentration und Inkubation mit Sepharose CL-4b (mit Pferdeserum gesättigt) immunpräzipitiert oder direkt auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

4.2.2 Stimulation von Zellen

4.2.2.1 Mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)

In Zellkulturflaschen ausgesäte, adhärent wachsende Zellen werden bis zu etwa 80%iger Konfluenz herangezogen und anschließend für die entsprechende Zeit mit PMA (Stammlösung 10 µg/ml, 1:1000 in Medium) stimuliert. Um diese Reaktion zu beenden, erntet man die Zellen und lysiert sie.

4.2.2.2 Mit Antikörpern

Zu etwa $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ frisch geernteten, einmal mit TBS gewaschenen Zellen gibt man 200 µl Stimulationsantikörper (Kulturüberstand), in diesem Fall anti-Muc18, und lässt die Suspension 10 min auf Eis stehen. Parallel dazu gibt man in einem anderen Eppendorf-Gefäß 200 µl eines Isotypantikörpers (Kulturüberstand bzw. 20 µg/ml) zu der gleiche Menge Zellen. Dann fügt man 10 µl Z420 (Kaninchen-anti-Maus-Ig; Endkonzentration 80 µg/ml; DAKO) zu und stellt das Gemisch wieder 10 min auf Eis. Der 2. Antikörper dient zur Kreuzvernetzung und damit zur räumlichen Annäherung von Muc18 um die Aktivierung zu intensivieren. Daraufhin gibt man die Proben für die jeweilige Stimulationszeit (soweit nicht anders erwähnt 30 min) bei 37°C auf einen Heizblock, zentrifugiert kurz ab (Eppendorfszentrifuge, max. Geschwindigkeit), verwirft den Überstand und lysiert das Pellet in etwa 500 µl Lysepuffer mit TBS. Die Vermeidung von Phosphatpuffern bei allen Arbeitsschritten ist sehr wichtig, da später nach Gelelektrophorese und Western Blot mit anti-Phosphor-Antikörpern inkubiert wird. Wenn dabei Reste von Phosphat vorhanden sind, treten diese in Konkurrenz zu den Phosphoproteinen und verhindern so eine Färbung des Blots. Nach 30 min auf Eis werden Zellreste und Kerne durch Zentrifugation (350 xg, 4°C, 10 min) entfernt und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. Anschließend wird das Lysat mit 100 µl Sepharose-CL4b, die mit Pferdeserum gesättigt ist, vorgereinigt.

4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein-Assay-Kit nach Lowry (Biorad) benutzt. Dazu gibt man nach Vorbereitung des Reagenzes A' aus 20 µl Reagenz S (SDS) pro ml Lösung A (enthält Natriumhydroxid, Kaliumcarbonat, Natriumtartrat und Kupfersulfat) zu 100 µl Standard (verschiedene Konzentrationen RSA) bzw. Probe 500 µl Lösung A'. Anschließend fügt man 4,0 ml Lösung B (Folin) zu und wartet 15 min. Nun können die Absorptionen am Photometer bei 750 nm gemessen werden. Die automatische Auswertung bezieht den Messwert der Probe auf den des Standards und man erhält den Proteingehalt in µg/µl.

4.2.4 Immunpräzipitation

Um verschiedene Proteine anzureichern präzipitiert man pro geplanter Spur auf dem Polyacrylamidgel das Lysat von etwa $1 \cdot 10^7$ stimulierten oder unstimulierten Zellen (ca. 4 – 5 mg Gesamtprotein) mit einem spezifischen Antikörper. Im Lysat misst man zuerst die Proteinkonzentration (Lowry, 1951) und gibt dieses dann 24h bei 4°C auf den Rollmischer mit 100 µl Sepharose CL-4b, die mit Pferdeserum gesättigt ist. Dieser Reinigungsschritt wird für weitere 6h wiederholt, um Proteine zu entfernen, welche später unspezifisch an Protein A- oder Protein G-Agarose bzw. -Sepharose binden könnten. Gleichzeitig gibt man pro geplanter Gelspur je nach Antikörper 5 – 20 µg desselben in 1 ml Waschmedium und fügt je nach Isotyp des Antikörpers pro Spur entweder 30µl immobilisiertes Protein A oder G zu, die nun den F_c-Teil binden. Protein A, ein bakterielles Protein aus Staph. Aureus, bindet spezifisch an Antikörper der Isotypen IgG₂ und IgG₃; Protein G dagegen präzipitiert IgG₁. Um Antikörper des Isotyps IgM zu immobilisieren benötigt man einen weiteren Linker-Antikörper, z. B. Kaninchen-Anti-Maus-IgM. Dieser wird zuerst an die Festphase gekoppelt (1 – 2 µg/ml; 1 - 16 h Inkubation). Nach dreimaligem Waschen des Agarose/Sepharose-Protein A/G – Antikörper-Komplexes mit PBS oder TBS fügt man das gereinigte Zelllysat zu und inkubiert 16 h bei 4°C. Zur Vorbereitung der Proben für die Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel muss das Präzipitat fünfmal mit TBS oder PBS/0,1% NP10 gewaschen (1 min, 500 xg), mit Probenpuffer versetzt und drei bis fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht werden. Durch das im Probenpuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol bzw. DTT werden vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Das SDS denaturiert die Proteine und lädt sie negativ, was eine elektrophoretische

Trennung im Gel ermöglicht. Die Masse des Proteins ist nun proportional zur Ladung und damit zur Laufweite auf dem Acrylamidgel.

4.2.5 Koimmunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation von Proteinen wird analog der Präzipitation von Proteinen durchgeführt. Der Unterschied besteht später bei der Färbung im Western Blot, da bei der Koimmunpräzipitation gegen andere Proteine, also nicht gegen das präzipitierte Protein, gefärbt wird. Damit sollen nicht-kovalente Interaktionspartner eines Proteins ermittelt werden. Diese nicht-chemisch gebundenen Partner wechselwirken mit dem bekannten Protein und können unter bestimmten Bedingungen, die stark vom Detergenz abhängig sind, mitpräzipitiert werden.

4.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Methode von U. K. Laemmli (1970) werden folgende Reagenzien für zwei kleine 7,5%ige (je etwa 8 cm x 5 cm x 0,75 mm) bzw. ein großes 10%iges (15 cm x 15 cm x 0,75 mm) Gel zusammengegeben:

<u>klein</u>	<u>groß</u>	
4,4 ml	12,6 ml	30% Acrylamid-0,8% N, N'-Methylen-bisacrylamid-Stammlösung
4,4 ml	8,8 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
8,6 ml	13,4 ml	entgastes, bidest. Wasser
100 µl	200 µl	20% (w/v) SDS
20 µl	40 µl	TEMED
90 µl	100 µl	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung.

Dieses Gemisch wird für die kleinen Gele zwischen ein Glas- und eine Aluminiumoxidplatte und für das große Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 0,1%iger SDS-Lösung überschichtet. Nach etwa 1 h ist das Trenngel polymerisiert und kann mit dem Sammelgel (für zwei kleine oder ein großes Gel) aufgefüllt werden:

3,0 ml	30% Acrylamid-0,8% N, N'-Methylenbisacrylamid-Stammlösung
7,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
18,9 ml	entgastes, bidest. Wasser
150 µl	20% (w/v) SDS
30 µl	TEMED
300 µl	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung.

In die Flüssigkeit gibt man einen Kamm, welcher die Taschen während der Polymerisation formt, in die später die Proben pipettiert werden. Nach etwa 1h füllt man die Pufferreservoirs der Gelkammer mit Laufpuffer und gibt das Probenpuffer-Eluat des Immunpräzipitats (von mindestens $1 \cdot 10^7$ Zellen) bzw. das zu gleichen Teilen mit 2x Probenpuffer versetzte Zelllysat (Gesamtprotein: kleine Gele: 20 – 50 µg, große Gele: 50 – 200 µg) in die Taschen des Gels. Die Proben werden dazu vorher drei bis fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Als Größenstandard wird in eine weitere Tasche Rainbow-Marker mit aufgetragen. Dieser zeigt eine blaue Bande bei 220 kD (Myosin), eine braune bei 97,4 kD (Phosphorylase b), eine rote bei 66 kD (BSA), eine gelbe bei 46 kD (Ovalbumin), eine orangefarbene bei 30 kD (Carboanhydrase), eine grüne bei 21,5 kD (Trypsin-Inhibitor) und eine magentafarbene bei 14,3 kD (Lysozym). So kann das Molekulargewicht der Proteine auf den anderen Spuren abgeschätzt werden. An die kleine Gelkammer wird dann bei 4°C für 1,5 h eine Spannung von 150 V und an die große Elektrophorese-Kammer bei Raumtemperatur für etwa 18h eine Spannung von 75 V angelegt.

4.2.7 Western Blotting

Um die auf einem Polyacrylamid aufgetrennten Proteine spezifisch mittels Antikörperfärbung nachweisen zu können, müssen diese zuerst auf eine Membran überführt werden. Nach Towbin et al. (1979) dient ein sog. „Wet Blot“ zum elektrophoretischen Transfer vom Gel auf die Membran (0,45 µm). In senkrechter Anordnung werden folgende Materialien luftblasenfrei aufgeschichtet:

- Kathode
- Plastik-Halterung
- Schwamm
- Whatman 3MM Papier
- Polyacrylamidgel (Trenngel)
- Nitrocellulosemembran
- Whatman 3MM Papier
- Schwamm
- Plastik-Halterung
- Anode.

Das Whatman Papier, die Nitrocellulosemembran und das Gel gibt man vorher einige Minuten in eine Schale mit Blotting-Puffer, um eine bessere Benetzung bzw. eine Umpufferung zu ermöglichen. Die Kammer wird nun ebenfalls mit Blotting-Puffer befüllt und für 1,5 h bei 50 V an ein Stromgerät angeschlossen. Die Stromstärke liegt dabei zwischen 0,8 und 1,4 A. Gleichzeitig wird das System durch eine interne Kühlschlange mit Wasserdurchfluss auf etwa 10°C abgekühlt. Die mittels SDS negativ geladenen Proteine wandern in Richtung Anode, also vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran.

4.2.8 Immunfärbung der Nitrocellulosemembran

4.2.8.1 Färbung mit der Chemilumineszenz-Methode

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern, werden diese potentiellen Proteinbindungsstellen auf der Membran abgedeckt. Dazu benützt man für α -Phosphotyrosin-Blots TBS mit 1% Magermilchpulver/1% BSA, für alle anderen 5% Magermilchpulver/PBS und lässt dies 1h bei Raumtemperatur einwirken. Darauf folgt eine weitere Stunde Inkubation in einer feuchten Kammer auf einer Glasplatte mit dem 1. Antikörper (100 μ l/10 cm² Membranfläche; Verdünnung s. Tab. 2). Eine Isotypkontrolle dient zum Nachweis einer spezifischen Bindung über die F_{ab}-Fragmente. Nach viermaligem Waschen mit TBST (Phosphorblots) bzw. PBST (alle anderen) für je 5 - 10 min gibt man analog den 2. Peroxidase-gekoppelten Antikörper R α MPOX (bzw. P α RPOX) je nach

Chemilumineszenzsystem (R α MPOX: NEN: 1:12000, Amersham, Pierce: 1:5000; P α RPOX: NEN: 1:1000) in unterschiedlichen Konzentrationen in Blocking-Puffer für 1h zu und wäscht anschließend wieder viermal mit TBST oder PBST. Dann lässt man den Blot gut antrocknen, schwenkt ihn 1 min in der Substratlösung und trocknet erneut. Schließlich legt man den Blot zwischen zwei Klarsichtfolien und exponiert ihn gegen einen Röntgenfilm. Optimale Ergebnisse liefert eine Expositionszeit von 30 s bis 2 min.

4.2.8.2 Färbung mit der o-Dianisidin/Natriumnitroprussid-Methode

Diese ältere Färbemethode wurde für Blots mit Immunpräzipitaten, aber nicht für solche mit Koimmunpräzipitaten verwendet, da sie nicht so empfindlich ist. Die Färbung erfolgt ähnlich der Chemilumineszenzmethode. Zuerst werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran mit einem Blocker abgedeckt. Dazu benützt man PBS mit 0,1% Gelatine/0,1% Azid für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach Inkubation mit dem 1. Antikörper wäscht man dreimal 10 min mit PBST. Als 2. Antikörper folgt P161. Wiederum wird dreimal 10 min gewaschen und der Blot etwas angetrocknet. Dann schwenkt man die Membran in der Substratlösung und die Protein-Banden an die Antikörper gebunden haben, werden sichtbar. Diese Färbung geschieht durch o-Dianisidin, welches vom Wasserstoffperoxid oxidiert wird, aber nur an den Stellen, an denen die Peroxidase sitzt. Natriumnitroprussid verstärkt den Färbeeffect. Nach kurzem Waschen der Nitrocellulosemembran in destilliertem Wasser lässt man sie auf Whatman-Papier trocknen.

4.2.8.3 Färbung mit der TMB-Methode (Vector Lab.)

Eine weitere Methode zur Detektion von Proteinbanden ist die TMB-Färbung. Die Inkubation mit 1. und 2. Antikörper erfolgt analog der o-Dianisidin/Natriumnitroprussid-Methode, lediglich die Färbelösung unterscheidet sich. Zu 60 ml destilliertem Wasser fügt man laut Anleitung 8 Tropfen (vom Hersteller geeichte Kunststoffflasche) der Pufferstammlösung, 12 Tropfen TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin)-Stammlösung, 8 Tropfen Stabilisierungslösung und 8 Tropfen der Wasserstoffperoxidlösung zu, mischt diese Lösung und schwenkt die Membran darin 10 – 30 min. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser wird der Blot luftgetrocknet.

4.2.8.4 Wiederverwendung einer gefärbten Membran

Eine mittels Chemilumineszenzmethode gefärbte Membran kann wiederverwendet, d. h. nochmals mit anderen Antikörpern inkubiert werden. Man wäscht die exponierte Membran zweimal 10 min in PBST und legt sie dann für 1h 15 min in Elutionspuffer („Stripping“). Nach erneutem zweimaligem Waschen inkubiert man sie 1 min im Substrat und exponiert nach dem Trocknen 10 min gegen einen Röntgenfilm. Falls dieser leer ist, sind alle vorher gebundenen Antikörper entfernt, und die Membran kann nach nochmals zweimal Waschen in PBST wie gewohnt geblockt und anschließend gefärbt werden.

4.2.8.5 Färbung einer Membran mit Indian Ink

Die Membran wird zunächst zweimal 10 min in PBS geschwenkt. Dann gibt man sie für 30 min bis über Nacht in eine Lösung aus 100 µl Indian Ink in 100 ml PBS/0,3% Tween. Wenn die Proteinbanden deutlich schwarz gefärbt sind, wird zweimal 10 min in PBS gewaschen. Schließlich trocknet man die Membran auf einem Stück Whatman-Papier. Dieses Verfahren dient zur Kontrolle der Auftragsmenge an Gesamtprotein auf die Gelspuren und zeigt, ob die Proteine in ausreichender Qualität vom Gel auf die Membran geblottet wurden.

4.2.8.6 Coomassie-Färbung eines Gels

Zum Sichtbarmachen von Proteinen auf einem Gel kann dieses mit Coomassie, einem blauen Farbstoff, gefärbt werden. Da das Gel danach nicht mehr geblottet werden kann, wurde die Färbung meist lediglich als Kontrolle des Blottens benützt, d. h. ob der Übergang der Proteine auf die Membran vollständig, also das Gel leer war. Dazu schüttelt man das Gel 5 – 20 min in Coomassie-Färbelösung bis es völlig blau ist und entfärbt es dann in der Entfärbelösung bis der Hintergrund wieder klar ist. Dazu muss die Lösung mehrmals gewechselt werden. Vorhandene Proteinbanden sind nun sichtbar.

4.3 Immunfluoreszenz

4.3.1 Oberflächen-Antigene

Etwa $1 \cdot 10^6$ frisch geerntete, lebende Zellen werden einmal in PBS gewaschen, mit 100 μ l 1. Antikörper (Kulturüberstand bzw. 20 μ g/ml) versetzt und 15 – 30 min auf Eis gelagert. Als Negativkontrolle verwendet man einen Isotyp-Antikörper. Nach zweimal Waschen (5 min, 550 xg, 4°C) mit PBS/0,1% Azid gibt man 50 μ l eines in PBS/2% RSA verdünnten Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpers (F261; Dako, Kopenhagen, DK) für weitere 15 –30 min zu und lässt wieder auf Eis stehen. Nach wiederum zweimal Waschen in je 1 ml PBS/Azid werden die Zellen in 100 μ l PBS/1% Paraformaldehyd fixiert und können für einige Monate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden. Alle Arbeitsschritte finden unter Kühlung statt, um ein „patching and capping“ zu verhindern, d. h. es würden alle Antigen-Antikörper-Komplexe durch den zweiten Antikörper kreuzvernetzt und so auf einer Stelle der Zelle sitzen oder sogar internalisiert. Dies führt zu einer Verfälschung des Ergebnisses. Natriumazid in allen Lösungen dient als Inhibitor der Atmungskette, was ebenfalls ein „patching and capping“ vermeidet.

4.3.2 Zytoplasmatische Antigene

Hierzu verwendet man das Kit „Fix and Perm“ (Caltag) mit einem etwas modifiziertem Protokoll. Lebende, frisch geerntete Zellen ($1 - 5 \cdot 10^6$) werden einmal mit PBS gewaschen und auf Eppendorf-Gefäße verteilt. Dann inkubiert man 15 min in 50 – 100 μ l Lösung A (Fixierungsreagenz) bei Raumtemperatur. Nach dreimal waschen in PBS (Zentrifugation 3 min, 550 xg) bei Raumtemperatur gibt man für weitere 15 min 50 μ l Lösung B (Permeabilisierungsreagenz) mit 50 μ l 1. Antikörper zu, zentrifugiert und fügt erneut 50 μ l Antikörper für 20 min zu. Wiederum wird dreimal mit PBS/0,1% Natriumazid bei RT gewaschen, wobei die Proben zwischen den Waschschritten jeweils 5 min stehen gelassen werden. Nach 20-minütiger Inkubation mit 50 – 150 μ l FITC-Antikörper (1:25 in PBS/2% RSA) auf Eis, wäscht man erneut dreimal mit PBS/0,1% Natriumazid, wobei diesmal 5 min auf Eis stehen gelassen wird. Das Zellpellet wird in 100 μ l PBS/1% Paraformaldehyd aufgenommen und kann mehrere Monate bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

4.3.3 Auswertung der Ergebnisse am Mikroskop

Es werden 20 µl der vorher Oberflächen- oder zytoplasmatisch gefärbten Zellen aus der Suspension entnommen und unter einem Fluoreszenzmikroskop (A_{\max} bei 495 nm für Fluoreszein; Leitz, München) betrachtet. Ist die Färbung positiv, so sieht man bei den Oberflächen-gefärbten Zellen einen grünen Kranz und bei den zytoplasmatisch markierten Zellen eine Zellzytoplasma-Färbung. Man schätzt nun die Anzahl an gefärbten Zellen in Prozent, sowie die Stärke der Färbung der einzelnen Zellen ab. Das bedeutet, man erhält nicht nur einen Eindruck darüber, wie viele Zellen einer Population das Antigen exprimieren, sondern auch wie stark das Protein präsentiert wird. Da diese Art der Auswertung jedoch subjektiv ist, erfolgt eine genaue Messung am FACScan-Gerät.

4.3.4 Auswertung der Ergebnisse am FACScan-Gerät

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zu quantifizieren, werden die Proben am FACScan (Fluorescence Activated Cell Scanner) ausgewertet. Dabei bestimmt das Messgerät von einer bestimmten Anzahl an Zellen den Prozentanteil der positiven Zellen; dieser Wert sagt aus, wie viele Zellen einer Population das gesuchte Antigen tragen. Ein weiterer Messwert ist der „mean channel“, also die Fluoreszenzintensität, welche die meisten der Zellen aufweisen. So kann man ablesen, wie stark positiv die Zellen sind. Das FACScan zeigt also wie viele Zellen ein Antigen tragen und wie stark dieses exprimiert ist.

4.4 Zeitabhängige FACScan-Messungen (Calcium-Einstrom)

4.4.1 Markierung von Zellen

Je $1 - 2 \cdot 10^7$ frisch geerntete Zellen werden in 2,5 ml HEPES-Puffer aufgenommen und mit 15 µl Fluo-3 AM-Stammlösung (Molecular Probes; Stammlösung: 50 µg in 30 µl DMSO; Endkonzentration in HEPES: 8,8 µM) versetzt. Das Gefäß verschließt man lichtdicht mit Alufolie und inkubiert den Ansatz für 30 min bei 37°C im Brutschrank. Dabei schwenkt man alle 10 min mehrmals um. Anschließend zentrifugiert man die Zellsuspension 3 min bei 800 xg und wäscht einmal mit HEPES-Ladepuffer. Daraufhin wird das Gemisch aliquotiert, wobei

jedes Gefäß etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen in 200 μ l Hepes enthalten soll. Bis zur Messung am FACScan können die Zellen etwa 1h im Dunklen auf Eis aufbewahrt werden.

Bei Zellen mit Antikörper-Vorinkubation, d. h. Vorbeladung der Zellen mit dem 1. Antikörper, werden die gewaschenen Zellen in 100 μ l Hepes aufgenommen, mit 200 μ l Antikörper versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, anschließend einmal mit Hepes-Puffer gewaschen und dann für die Messung aliquotiert.

4.4.2 Kontrolle am Mikroskop

Vor der Messung am FACScan werden die Zellen am Mikroskop kontrolliert. Sind diese gleichmäßig und etwa gleich stark untereinander beladen, können sie zur zeitabhängigen Messung des Calcium-Einstroms benutzt werden.

4.4.3 Durchführung von zeitabhängigen FACScan-Messungen

Die auf Eis aufbewahrten Zellproben werden als erstes exakt eine Minute im Heizblock auf 37°C erwärmt, dann an das FACS-Gerät gebracht und etwa 30 s vorgemessen um das Grundlevel an Fluoreszenz zu erhalten, welches durch den aufgenommenen Farbstoff Fluo-3 AM verursacht wird, der an bereits im Zytosol vorhandenen Ca^{2+} - Ionen gebunden hat. Nun gibt man bei nicht mit Antikörper vorinkubierten Zellen den 1. Antikörper zu (Endkonzentration etwa 5 – 15 μ g/ml) und fährt mit der Messung fort. Die Messung kann erneut unterbrochen werden, um einen 2. Antikörper zur Kreuzvernetzung (Z420; Endkonzentration 40 μ g/ml; 3,3- bis 8-facher Überschuss) zuzufügen. Bei mit 1. Antikörper vorinkubierten Zellen wird bei der ersten Messunterbrechung Z420 zugefügt. Als Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit des Experiments dient ein Zusatz eines Calciumchelators (Calcimycin; Stammlösung 10 mg in 100 μ l DMSO; Endkonzentration $1 - 2,5 \cdot 10^{-4}$ M).

4.5 DNS – Arbeitstechniken

4.5.1 Präparation von Plasmid-DNS mit dem Plasmid-Maxi-Kit JetStar (Genomed)

Nach Äquilibration der Säule mit 30 ml E4 (600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15% Triton X-100, Essigsäure ad pH 5,0) werden 150 ml einer Übernachtskultur plasmidtragender Bakterien in LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum (hier immer Ampicillin) bei 25°C und 4000 xg 15 min zentrifugiert. Dann resuspendiert man die Bakterien in 10 ml E1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, HCl ad pH 8,0, RNase) und lysiert diese in 10 ml E2 (200 mM NaOH, 1,0% SDS (w/v)). Nach 5 min Wartezeit fügt man 10 ml Lösung E3 (3,1 M Kaliumacetat, Essigsäure ad pH 5,5) zur Neutralisation hinzu. Nach mehrmaligem Invertieren des Zentrifugenröhrchens zentrifugiert man für 10 min bei 20°C und 15000 xg. Dabei werden Proteine und chromosomale DNS entfernt. Den Überstand der Zentrifugation gibt man dann auf die vorbereitete Säule. Nachdem das neutralisierte Bakterienlysat durchgelaufen ist, wobei die Plasmid-DNS in der Säule gebunden wird, wäscht man mit 60 ml E5 (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, Essigsäure ad pH 5,0). Schließlich wird mit 15 ml Lösung E6 (1259 mM NaCl, 100 mM Tris, Salzsäure ad pH 8,5) eluiert. Dann fällt man die DNS durch Zusatz von 10,5 ml Isopropanol (0,7 Volumen), zentrifugiert bei 4°C und 15000 xg für mindestens 30 min. Die so erhaltene Plasmid-DNS wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und danach in 200 µl sterilem, destilliertem Wasser gelöst.

4.5.2 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNS mit JetQuick (Genomed)

Um schnell geringe Mengen an Plasmid-DNS zu gewinnen, zentrifugiert man zweimal nacheinander insgesamt 3 ml Bakterienkultur 3 min bei 2500 xg. Das Pellet wird in 210 µl G1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen, mit 210 µl G2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) lysiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Neutralisation mit 280 µl G3 (Acetat, Guanidinhydrochlorid) und mehrmaligem Invertieren der Eppendorf-Röhrchen zentrifugiert man für 10 min bei 19000 xg. Der Überstand wird auf die Säule gegeben, dann zentrifugiert man die Flüssigkeit 30'' bis 1 min wieder bei 19000 xg ab. Mit 700 µl Waschlösung G4 (Tris-HCl, Ethanol, NaCl, EDTA) wird erneut zweimal 30'' zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge bei 19000 xg) und der Durchlauf

verworfen. Die in der Säule gebundene Plasmid-DNS eluiert man mit 50 - 75 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 oder sterilem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 19000 xg.

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes einer Lösung erfolgte durch Messung der optischen Dichte im Spektralphotometer bei 260 nm (Maniatis et al. , 1989). Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

Wert OD_{260} · Verdünnung · Faktor X = µg Nukleinsäure/ml Lösung

Faktor X: 50 für doppelsträngige DNS

Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation. Für DNS liegt das Optimum des Quotienten zwischen 1,6 und 1,8.

4.5.4 Verdau von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Das Plasmid wird mit einer Einheit Enzym pro Mikrogramm DNS verdaut. Nach Definition verdaut eine Einheit Restriktionsenzym 1 µg Lambda-DNS in einer Stunde. Die DNS wurde in den entsprechenden Puffern zusammen mit dem Enzym 1h inkubiert. Die Temperatur hängt vom verwendeten Restriktionsenzym ab. Anschließend werden die erhaltenen DNS-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt.

4.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNS

DNS-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Agarosegel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu werden 1 µg DNS mit 1/10 Auftragspuffer versetzt und bei maximal 100 V in einem Horizontalgel aufgetrennt. Die Agarosekonzentration beträgt 0,7 – 1% in TBE-Puffer; je nach aufzutrennenden Fragmentgrößen. Als Laufpuffer benützt man 1x TBE-Puffer mit 0,03 µg/ml

Ethidiumbromid. Als Größenstandard dient ein DNS-Marker. Zur Dokumentation des Ergebnisses fotografiert man das Gel unter UV-Licht bei 302 nm.

4.5.6 Herstellung kompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium mit 2% Trypton werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des erforderlichen E. coli-Stammes angeimpft und bei 37°C in einem Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (OD_{650}) von 0,3 kultiviert. Nach Abkühlen der Bakterien auf Eis zentrifugiert man bei 1000 xg für 10 min bei 4°C. Mit 25 ml kalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung wird das Bakteriensediment vorsichtig resuspendiert und anschließend 20 min auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert. Nach Aufnehmen in 2,5 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung können die Bakterien zur Transformation eingesetzt werden.

4.5.7 Transformation kompetenter Bakterien

Diese Methode dient zur Vermehrung von Plasmid-DNS. Dazu gibt man in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 1 - 10 ng Plasmid zu 100 µl kompetenten E. coli Bakterien und mischt den Ansatz vorsichtig. Nach einstündiger Inkubation des Ansatzes auf Eis setzt man die Bakterien exakt 45 s einem Hitzeschock von 42°C aus und pipettiert diese zu 900 µl vorgewärmtem LB-Medium/2% Trypton/10 mM $MgCl_2$, mischt wieder vorsichtig und hält für 1h bei 37°C. Dann wird die Suspension bei 1000 xg 10 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Bakterien im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wird der Transformationsansatz auf einer LB-Agarplatte mit Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.8 Einfrieren von Bakterien

5 ml Bakterienübernachtskultur, angeimpft aus einer Einzelkolonie, werden bei 800 xg für 10 min zentrifugiert. Das Pellet löst man in 500 µl LB-Medium, versetzt 1:1 mit 2x Einfriermedium und friert bei -80°C ein.

4.6 Luziferase-Assays

4.6.1 Transiente Transfektion von Zellen mit Fugene

Zur transienten Transfektion von Zellen setzt man alle Experimente in unabhängig transfizierten Triplikaten an, verwendet DNS aus verschiedenen Präparationen und wiederholt die gleichen Ansätze mehrmals. Dazu werden $1 \cdot 10^5$ bis $2,5 \cdot 10^5$ frisch geerntete Zellen pro Loch in 6-Lochplatten mit 2 ml Medium ausgesät. Die Zellen werden wie gewohnt bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Nach 24 h tropft man pro Loch 3 µl Fugene (Boehringer, Mannheim) auf 97 µl serumfreies Medium (RPMI 1640). Diese vorbereitete Lösung gibt man nach 5 min Wartezeit auf 1 µg Plasmid-DNS (0,33 µg/µl) und wartet erneut 15 min. In der Zwischenzeit wechselt man das Zellkulturmedium in den 6-Lochplatten und pipettiert die nunmehr 103 µl des Fugene-DNS-Gemisches auf die Zellen.

4.6.2 Stimulation der transient transfizierten Zellen

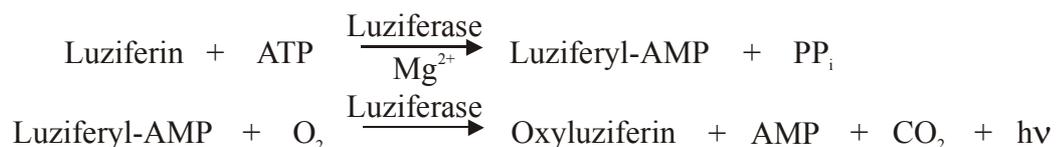
Die transient transfizierten Zellen können nach weiteren 24 h stimuliert werden. Da hier interessant war, ob Muc18 eine Signalwirkung hat, wurden verschiedene Muc18-mAKs zur Stimulation verwendet. Nach Wechsel des Zellkulturmediums gibt man 100 µl Hybridomüberstand auf die Zellen; außerdem benützt man auch eine Isotypkontrolle (ebenfalls 100 µl: UPC10, 20 µg/ml, IgG_{2a}; 141-11, Hybridomüberstand, IgM), um eine falsch positive Reaktion, die durch die Bindung des F_c-Teils des Antikörpers verursacht wird, zu erkennen. Als weitere Kontrolle für die Spezifität des Muc18-Signalwegs wurden auch andere gegen Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper getestet. Zur Kreuzvernetzung der Antikörper, was eine Verstärkung des Stimulus verursacht, gibt man dann 5 µl Z420 (GαMIg; DAKO) in jedes Loch der Platte. Nach weiteren 24 bis 48h im Brutschrank werden die Zellen geerntet. Als Positivkontrolle dient eine Stimulation der Zellen mit PMA (5 – 10 µl; Endkonzentration 25 – 50 ng/ml), welches die Proteinkinase C (PKC) direkt aktiviert und so viele Signalwege anschaltet, dass auch für die verschiedensten Reporterkonstrukte ein Signal erwartet wird.

4.6.3 Herstellung von Zellextrakten

Die Herstellung von Zellextrakten aus transienten Transfektanden erfolgt unter Verwendung des „Luciferase-Assay-System“-Kits der Firma Promega. Die in 6-Lochplatten gewachsenen transienten Transfektanden werden vom Medium befreit, einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und mit 125 µl Lysepuffer versetzt. Nach kurzer Einwirkzeit (10 – 15 min) schabt man die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Plastikgefäßes ab und füllt das Lysat in vorbereitete 1,5 ml Eppendorf-Gefäße. Die Proben zentrifugiert man einige s bei 19000 xg um Zelltrümmer abzutrennen, und der Überstand kann zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität und des Proteingehaltes verwendet werden.

4.6.4 Luziferaseassays

Für diese Luziferase-Experimente wurde ebenfalls das „Luciferase-Assay-System“-Kit der Firma Promega benützt. Im allgemeinen verwendet man Luziferase-Messungen eigentlich um die Aktivität von Promotoren zu testen. Aber auch für andere Zwecke, nämlich zur Ermittlung von Zusammenhängen in Signalketten, kann dieses Experiment dienen. In diesem Fall wurden verschiedene Plasmide getestet, in die verschiedene responsive Elemente in unterschiedlicher Anzahl vor einen schwachen Promotor und ein Luziferasereporter gen kloniert waren. Gibt man von außen einen Antikörper gegen ein Zelloberflächenmolekül zu, kann man eine Veränderung der Luziferase-Aktivität sehen, wenn in die Zelle vorher das Plasmid transient transfiziert wurde, mit dessen reponsivem Element das Molekül kommuniziert. Ein Problem dabei kann aber sein, dass nicht jeder Antikörper tatsächlich aktivierend wirkt, d. h. man kann falsch negative Ergebnisse bekommen. Das Enzym Luziferase katalysiert dabei mit dem zugefügten Substrat Luziferin eine lichtemittierende Reaktion (De Wet et al. , 1987), welche mit einem Luminometer quantifiziert werden kann:



Dazu gibt man je 20 μl Zellextrakt (s. 4.6.3) in ein Loch einer schwarzen 96-Lochplatte und fügt 100 μl des Luziferase-Assay Reagenzes (Substrat) zu. Die in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessene Aktivität ist proportional zur exprimierten Luziferasemenge und ist somit ein indirektes Maß für die Transkriptionsrate. Letztendlich bedeutet eine höhere Luziferase-Aktivität eine Reaktion des responsiven Elements auf den Stimulus von außen.

4.6.5 Bestimmung von Proteinmengen nach Bradford

Die Proteinbestimmung der Proben des Luziferase-Assays erfolgte nach der Bradford-Methode in 96-Lochplatten. Zur Erstellung einer Eichgerade werden in die oberste Reihe der Löcher Dupletts mit 0 μg , 1 μg , 2 μg , 4 μg , 6 μg und 10 μg Rinderserumalbuminlösung pipettiert. In die folgenden Löcher gibt man je 2 μl des Zellextrakts ebenfalls in Dupletts. Zu allen Proben fügt man dann 150 μl Farbreagenz (Biorad; 1:5 in H_2O verdünnt, filtriert) zu und entfernt alle größeren Luftblasen durch Zerstechen mit einer Kanüle. Nach Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur folgt eine automatische Auswertung mit einem Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 620 nm. Als Ergebnis der Messung erhält man den Gesamtproteingehalt in μg pro μl Zellextrakt.

5. Ergebnisse

Da für viele Zelladhäsionsmoleküle (Immunglobuline, Integrine, Cadherine) bekannt ist, dass sie Teil von Signaltransduktionsketten sind, z. B. β_1 -Integrine (Schlaepfer und Hunter, 1998) und ICAM-1 (Etienne et al. , 1998), kann man Muc18 auch eine mögliche Fähigkeit zur Signalübermittlung unterstellen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Teilnahme von Zelladhäsionsmolekülen an Zellsignalwegen zu untersuchen. Der wichtigste Punkt ist hierbei sicherlich die Beobachtung von Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster. Nach Stimulation des jeweiligen Rezeptors werden stromabwärts verschiedene Phosphorylierungskaskaden in Gang gesetzt, welche mit immunologischen Methoden wie Färbung von Western Blots oder Immunpräzipitation mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern nachgewiesen werden können. Außerdem kann man etwaige Veränderungen im zytoplasmatischen Calcium-Gehalt der Zellen beobachten, welche ebenfalls in Signalwegen auftreten. Einen weiteren Versuchsansatz kann auch im Zellkern vorgenommen werden, indem man die Auswirkungen des Stimulus auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren untersucht.

Alle drei Möglichkeiten zur Ermittlung von Signalwegen des Zelladhäsionsmoleküls Muc18 wurden untersucht.

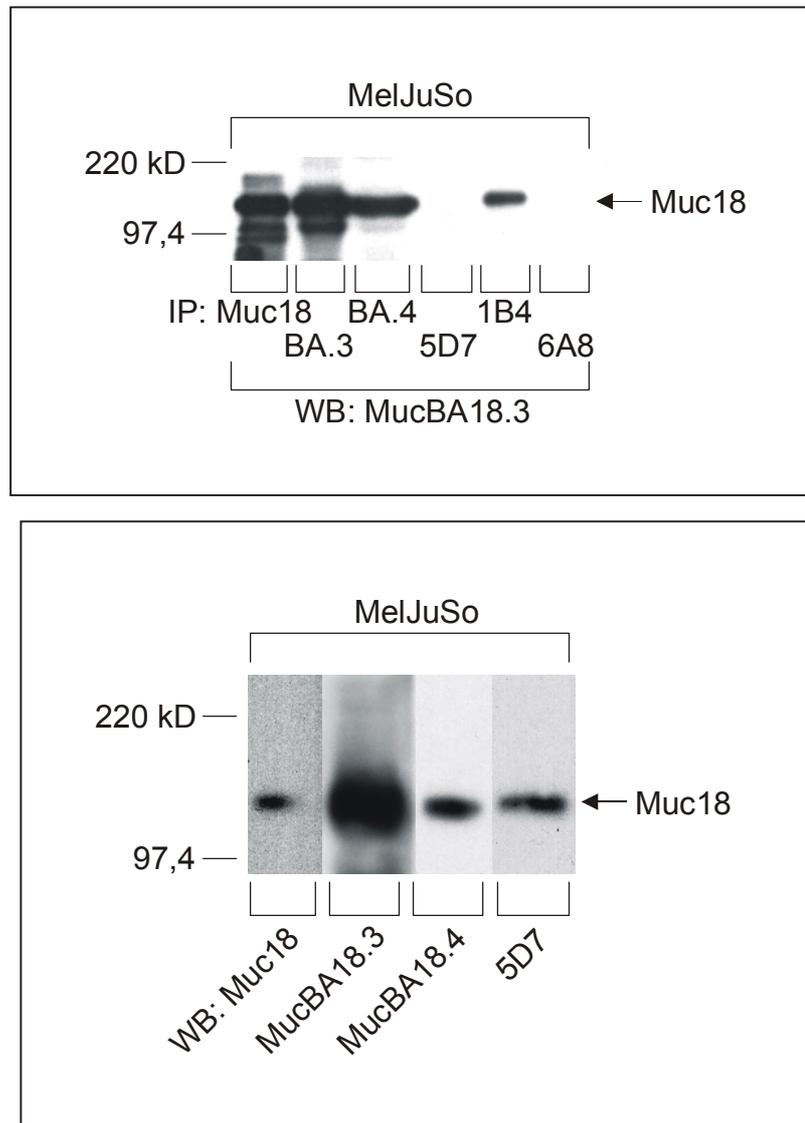
5.1 Charakterisierung der verschiedenen Muc18-Antikörper

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist bekannt, dass Muc18 einen Liganden besitzen muss. Da dieser jedoch noch nicht charakterisiert werden konnte, bedient man sich für Stimulationsversuche ersatzweise mit Antikörpern, die das Verhalten des Liganden imitieren (Zheng et al. , 1996; Zubiaur et al. , 1997). Wenn ein Antikörper jedoch einen Rezeptor erkennt, bedeutet das nicht automatisch, dass er auch fähig ist, eine Signalkaskade auszulösen (Levine et al. , 1996). Da verschiedene monoklonale Antikörper gegen ein Protein auch unterschiedliche Epitope erkennen, besitzen sie auch untereinander andersartige Stimulationseigenschaften, da ja die räumliche Anordnung des Rezeptors von entscheidender

Bedeutung für die Stimulation ist. Ein weiterer entscheidender Punkt ist, dass die meisten Stimulationsantikörper eine Kreuzvernetzung benötigen, d. h. einen zweiten, gegen den spezifischen 1. Antikörper gerichteten, Antikörper, der eine räumliche Annäherung des Proteins ermöglicht. Dazu wird z. B. ein Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper benutzt, wenn der 1. Antikörper ein Mausimmunglobulin ist. Dies alles bedeutet, dass man vor Beginn aller Kreuzvernetzungsversuche gezielt die aktivierenden Antikörper auswählen und sich über ihre Eigenschaften im Klaren sein muss.

Im Falle von Muc18 waren aus den Adhäsionsassays (Johnson et al. , 1997) bereits drei Antikörper bekannt, die potentielle Stimulationseigenschaften besitzen, nämlich die monoklonalen Antikörper MAd 5D7, 1B4 und 6A8. Diese Antikörper zeigten in den Adhäsionsversuchen bei Zugabe eine Verstärkung der Adhäsion, d. h. sie sind möglicherweise fähig, die sterische Anordnung der Muc18-Moleküle für die Stimulation günstig zu beeinflussen. Außerdem waren einige weitere gegen Muc18 gerichtete Antikörper bekannt, die sich eventuell als Stimulationsantikörper geeignet zeigen würden.

Zunächst wurden also die Muc18-Antikörper hinsichtlich ihrer Präzipitations- und Blottingeigenschaften getestet; d. h. wie gut erkennt ein Antikörper „sein“ Protein im nativen bzw. im denaturiertem Zustand. Hierzu folgende Western Blots:



*Abb. 3: Eigenschaften von verschiedenen Muc18-Antikörpern:
 Oben: Auftragung von Immunpräzipitat: Austesten von Antikörpern
 bzgl. ihrer Präzipitations-Eigenschaften
 Unten: Auftragung von Zelllysate (250 µg Gesamtprotein):
 Austesten von Antikörpern bzgl. ihrer Blotting-Eigenschaften
 [IP: Immunpräzipitationsantikörper; WB: Blotting-Antikörper]*

Die beiden exemplarischen Western Blots aus Abb. 3 zeigen, dass die mAK Muc18, MucBA18.3, MucBA18.4 und 1B4 ausgezeichnet präzipitieren, d. h. sie erkennen Muc18 sehr gut im nativen Zustand. Die Antikörper Muc18, MucBA18.4 und 5D7 färben das denaturierte Muc18 gut, MucBA18.3 sehr gut. 1B4 und 6A8 färben etwa in der Stärke von 5D7 (Daten nicht gezeigt).

Antikörper	Bindungsstelle	Beeinflussung der Adhäsion
Muc18	Domäne 1, 2	-
MucBA18.3	intrazellulär	-
MucBA18.4	Domäne 1	-
5D7	extrazellulär	+
1B4	extrazellulär	+
6A8	extrazellulär	+

Tab. 3: Bindungsstellen und Adhäsionseigenschaften von Muc18-mAKs (Domänen vgl. Abb. 1, gezählt ab N-Terminus)

Bei der Entscheidung für die zukünftigen Stimulationsantikörper fiel die Wahl also auf 5D7, da dieser in den Adhäsionsassays die Adhäsion verstärkte. Aus dem gleichen Grund erschien auch 1B4 geeignet. Da Muc18 das native Muc18 ebenfalls sehr gut erkennt, könnte er ebenfalls für Stimulationsexperimente geeignet sein. MucBA18.3 dagegen fällt als Stimulationsantikörper aus, da er, wie aus Tab. 3 ersichtlich ist, intrazytoplasmatisch bindet, und die Zellen bei der Stimulation ja noch intakt und lebendig sind, also der zytoplasmatische Schwanz von Muc18 zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugänglich ist. Zur Immunpräzipitation geeignet sind Muc18, MucBA18.4 und 1B4. Als Blotting-Antikörper kann man Muc18, MucBA18.4 und 5D7 benutzen. MucBA18.3 ist ein ausgezeichneter Präzipitations- und Blottingantikörper, was später für Koimmunpräzipitationsexperimente von Nutzen war.

5.2 Calcium-Einstrom nach Muc18-Kreuzvernetzung auf Zellen

Calcium-Signaling ist Bestandteil der wichtigsten Signalwege der Zelle überhaupt (Berridge et al. , 1998). Zytoplasmatisches Calcium, welches entweder extrazellulär eintritt oder aus intrazellulären Lagern, wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER), stammt, löst eine Vielzahl von Reaktionen aus. Der Calcium-Einstrom aus intrazellulären Lagern tritt hauptsächlich in nicht-erregbaren Zellen auf. Dabei wird Calcium ausgeschüttet, wenn nach einem extrazellulären Stimulus aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-

biphosphat (PtdIns(4,5)P₂) durch das Enzym Phospholipase C (PLC) das freie Inositol-1,4,5-triphosphat gebildet wird (Ins(1,4,5)P₃), welches an Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum bindet. In einigen Zellen, wie z. B. Lymphozyten, wird aber auch PtdIns(3,4,5)P₃ aus PtdIns(4,5)P₂ durch die Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase (PI(3)K) gebildet, welche die Aktivität der PLC unterstützt. Etwas des zytoplasmatischen Calciums wird schließlich von den Mitochondrien aufgenommen und dann an das ER zurückgegeben. Wenn die Mitochondrien jedoch mit Calcium überladen bleiben, resultiert daraus abnormaler mitochondrialer Metabolismus, was wahrscheinlich zu Apoptose führt. Ein Beispiel für einen durch ein Zelladhäsionsmolekül vermittelten raschen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Gehalts nach Kreuzvernetzung ist L-Selektin (Po et al. , 1995).

Obwohl Muc18 hauptsächlich auf Zellen neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird, kommt es auch auf manchen hämatopoetischen Zellen und Zelllinien vor. Die Zelllinien K562 und Mel888 TR1 wurden darauf untersucht, ob eine Muc18-Kreuzvernetzung Ca²⁺-Einstrom hervorruft. Der Western Blot in Abb. 4 zeigt, dass sowohl K562 (Myeloide Leukämie-Zelllinie), als auch Mel888 TR1 (Muc18-cDNA-transfizierte Melanomzelllinie) ausreichend Muc18 exprimieren:

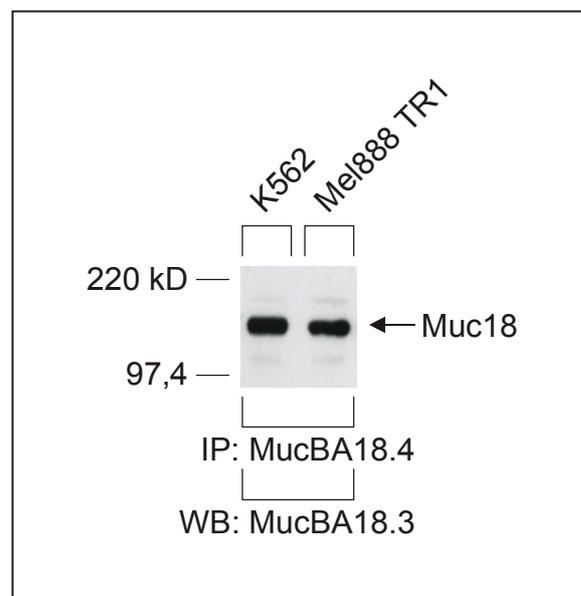


Abb. 4: Muc18-Expression von K562 und Mel888 TR1.
 Immunpräzipitat von $2 \cdot 10^6$ Zellen
 [IP: Immunpräzipitationsantikörper;
 WB: Blotting-Antikörper]

Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, wurde der Calcium-Gehalt durch eine Untersuchung am Durchflusszytometrie-Gerät (FACScan) ermittelt. Dazu wurden verschiedene Muc18-Antikörper während der Messung zugefügt, aber auch schon vorgebunden an Muc18 und erst am FACS-Gerät kreuzvernetzt. Als Positivkontrolle für diese Versuche diente ein Calcium-Chelator, welcher nach analoger Zugabe Ca^{2+} -Ionen aus dem Puffer ins Zellinnere transportiert und diese an den Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM abgibt (Wedi et al. , 1996). In Abb. 5 ist zunächst die Stimulation von K562 gezeigt:

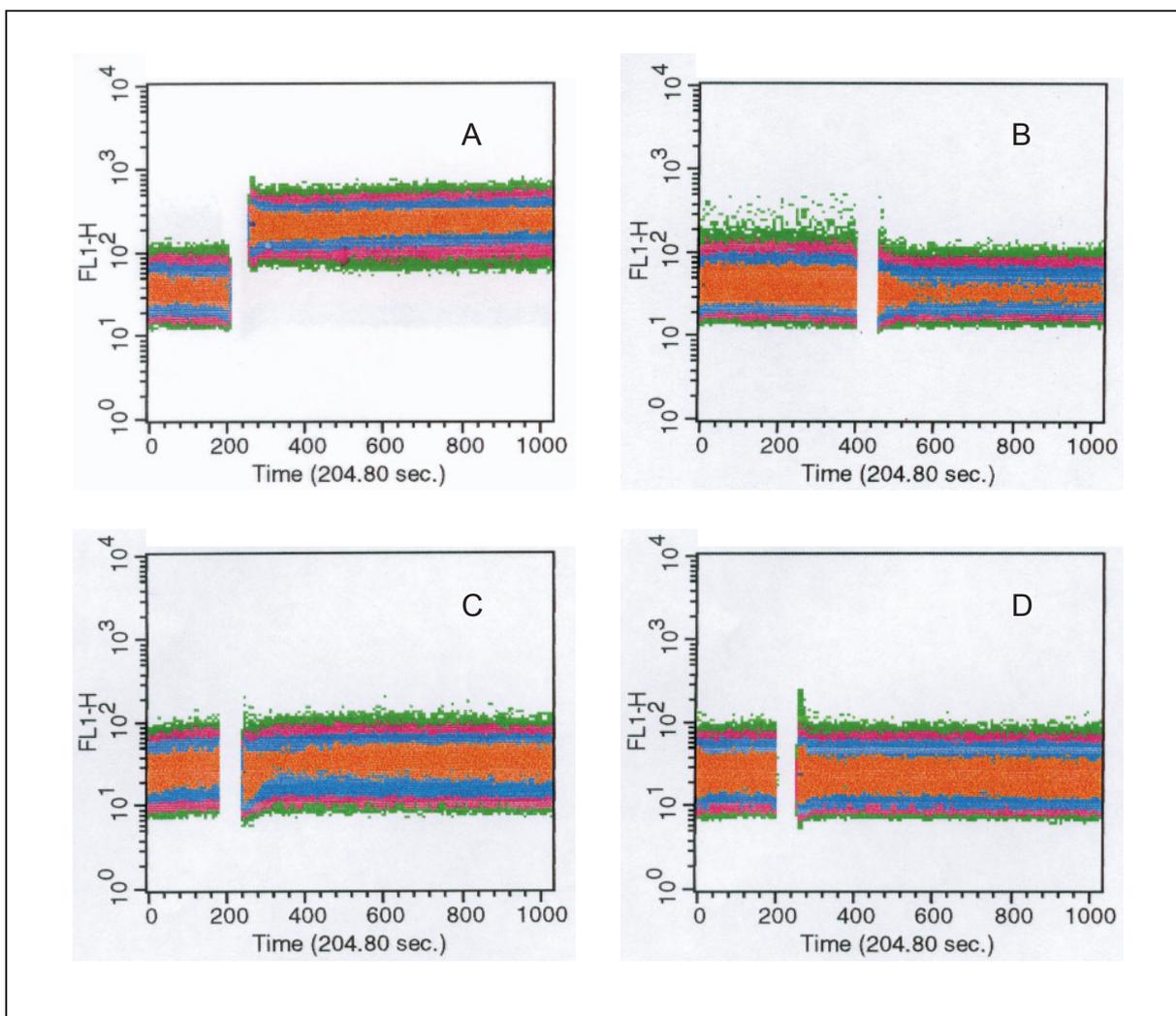


Abb. 5: Zeitabhängige FACS-Messung des zytosolischen Calcium-Gehalts:

K562 mit A: Calcimycin, B: Muc18; C: K562/5D7 mit $G\alpha Mlg$, D: K562/Muc18 mit $G\alpha Mlg$

In Abb. 5 (A) ist exemplarisch zu erkennen, dass die Zugabe von Calcimycin den intrazellulären Ca-Gehalt signifikant erhöht. Jedoch zeigen sowohl die Zugabe von Muc-18-Antikörper alleine (B) als auch von mit 5D7 bzw. Muc18 (C, D) vorinkubierten und während der FACS-Messung kreuzvernetzten Zellen, keinen Hinweis auf Calcium-Einstrom. Analog wurde der Versuch auch mit Mel888 TR1, einer mit Muc18 transfizierten Zelllinie, durchgeführt:

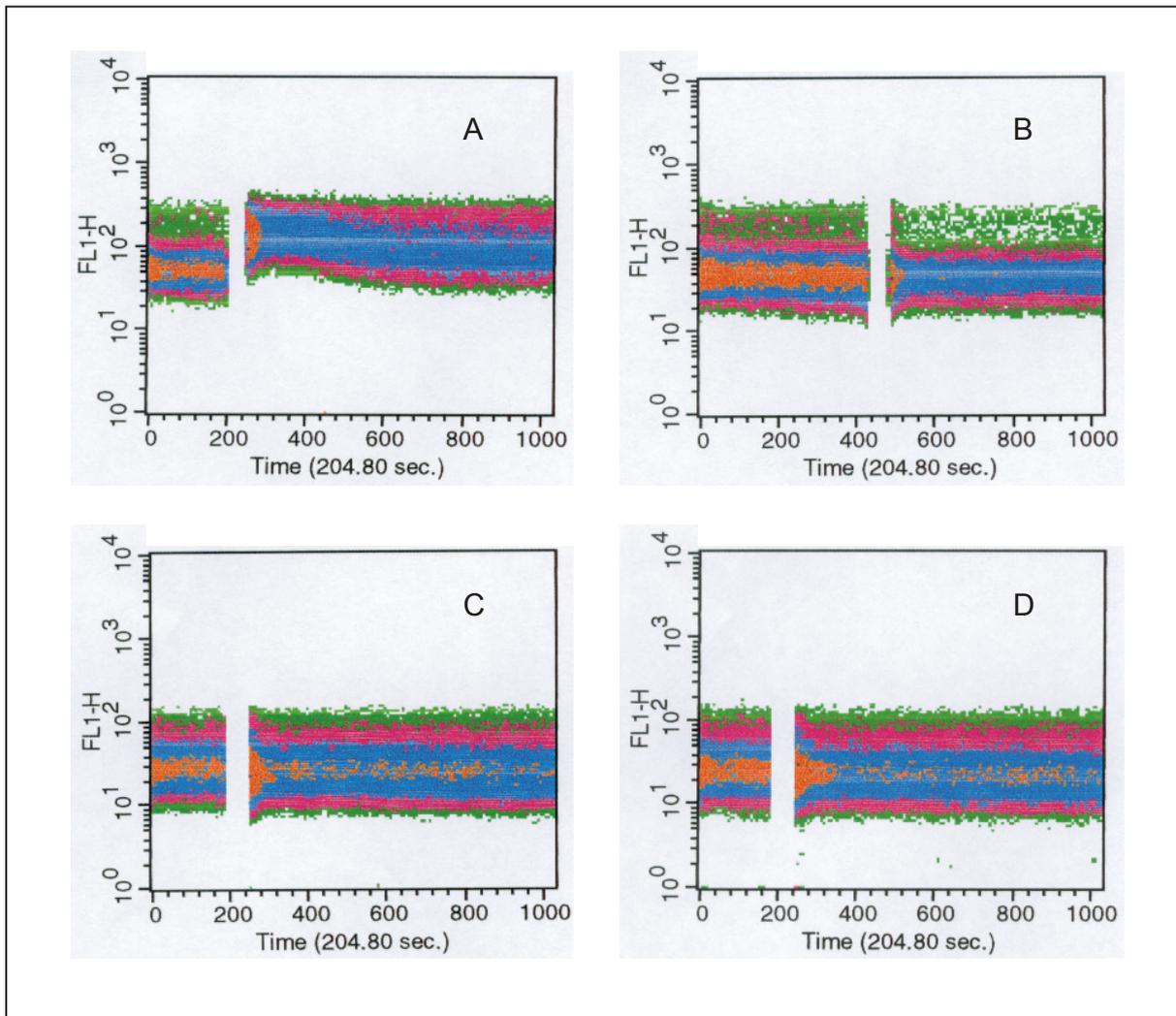


Abb. 6: Zeitabhängige FACS-Messung des zytosolischen Calcium-Gehalts:

Mel888 TR1 mit A: Calcimycin, B: Muc18; C: Mel888 TR1/5D7 mit $G\alpha M\mu$, D: Mel888 TR1/1B4 mit $G\alpha M\mu$

Jedoch auch hier konnte für sämtliche Muc18-Antikörper kein Calcium-Einstrom nachgewiesen werden. In Abb. 6 sieht man, dass die Zellen zwar auf den Zusatz von Calcimycin (A) reagiert haben, aber weder auf eine Stimulation mit Muc18 (B) noch auf Kreuzvernetzung von vorinkubierten Zellen (C, D).

Insgesamt konnte für die Zelllinien Mel888 TR1 und K562 für die α -Muc18-Antikörper 5D7, 1B4, 6A8, Muc18, MucBA18.3 und MucBA18.4 weder durch direkte Zugabe und anschließende Kreuzvernetzung, noch durch Vorbeladung und Kreuzvernetzung während der Messung, ein Calcium-Einstrom festgestellt werden. Die Positivkontrolle Calcimycin lieferte jedoch das erwartete Ergebnis.

Es ist bekannt, dass T-Zell-Stimulation durch CD3 zur Ca^{2+} -Mobilisierung führt. Darum wurden zur Kontrolle der gezeigten Experimente die Versuchsbedingungen (Sharp et al. , 1996) an der T-Zelllinie Jurkat mit einem α -CD3-Antikörper getestet. Diese zeigte in der Immunfluoreszenzfärbung und deren Auswertung am Mikroskop eine 100%ige und starke Färbung mit dem α -CD3-Antikörper M-T301.

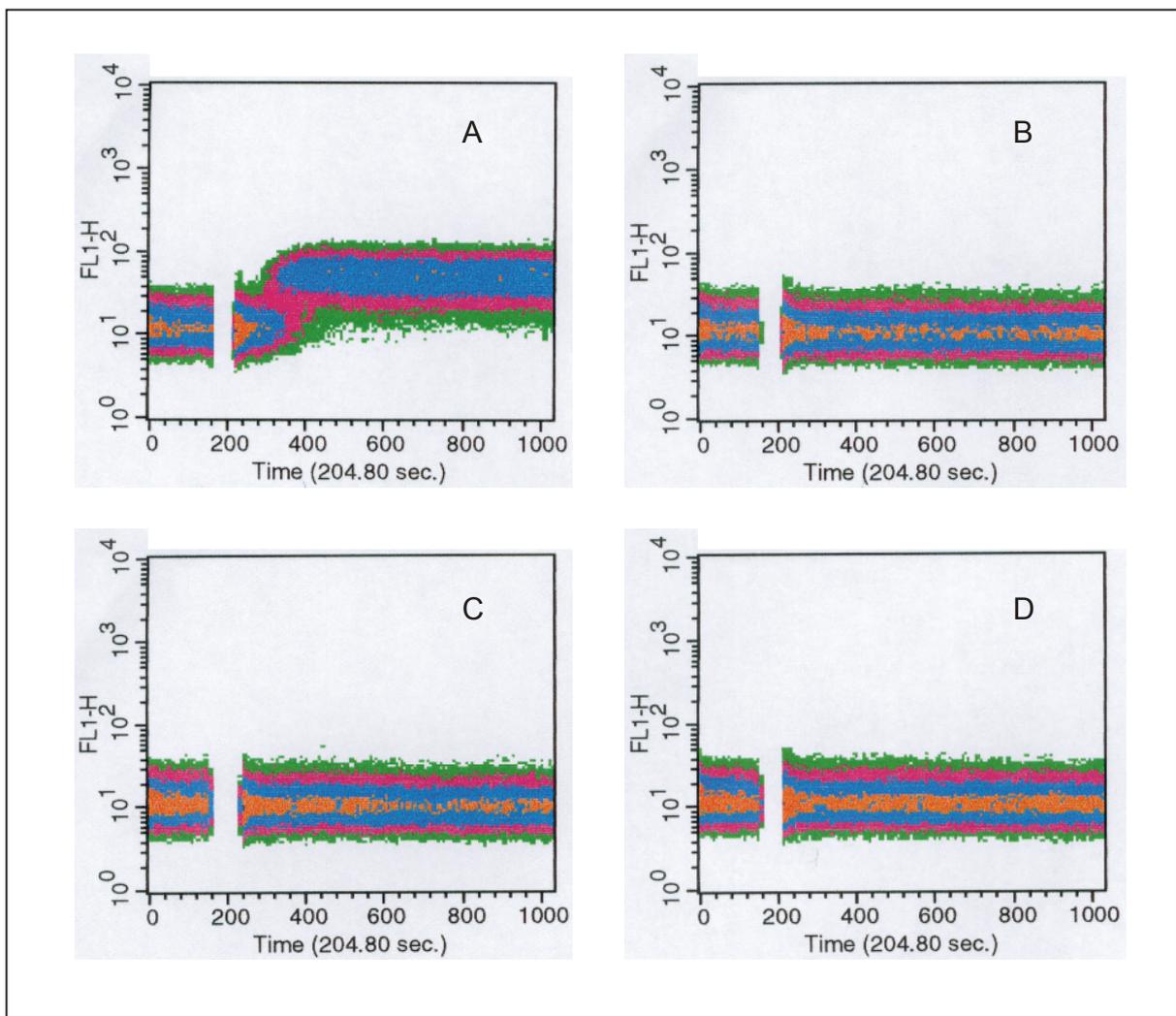


Abb. 7: Zeitabhängige FACS-Messung des zytosolischen Calcium-Gehalts:
Jurkat mit A: M-T 301, B: Hepes, C: α IL4, D: MOPC-21

Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, funktioniert prinzipiell die Stimulation von Zellen mit Antikörpern (Levine et al. , 1996) in einem zeitabhängigen FACScan-Experiment. Hierzu wurden Jurkat-Zellen mit einem α -CD3-Antikörper stimuliert (A) und bereits wenige Sekunden nach der Zugabe desselben, tritt ein massiver Calcium-Einstrom auf, was durch die Erhöhung der Fluoreszenz zu erkennen ist. Zugabe von Puffer (B) oder Isotypkontroll-Antikörpern (C, D) dagegen führt nicht zur Calcium-Mobilisierung, was die Spezifität des Signals beweist.

Somit konnte mit der Methode der zeitabhängigen Messung des Calcium-Einstroms kein Hinweis auf eine Signalwegfunktion von Muc18 gefunden werden.

5.3 Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster nach Kreuzvernetzung von Muc18

5.3.1 Phosphorylierungsstatus von Muc18

Muc18 besitzt eine potentielle Phosphorylierungsstelle für Phosphotyrosin. Wird Muc18 stimuliert, könnte es sein, dass es zuerst selbst am zytoplasmatischen Rest phosphoryliert wird, bevor das Signal weiter stromabwärts gegeben wird. Um dies genauer zu untersuchen, wurde Muc18 von den Melanomzelllinien Mel888 TR1 und MelJuSo präzipitiert und gegen α -Phosphotyrosin (4G10) geblottet.

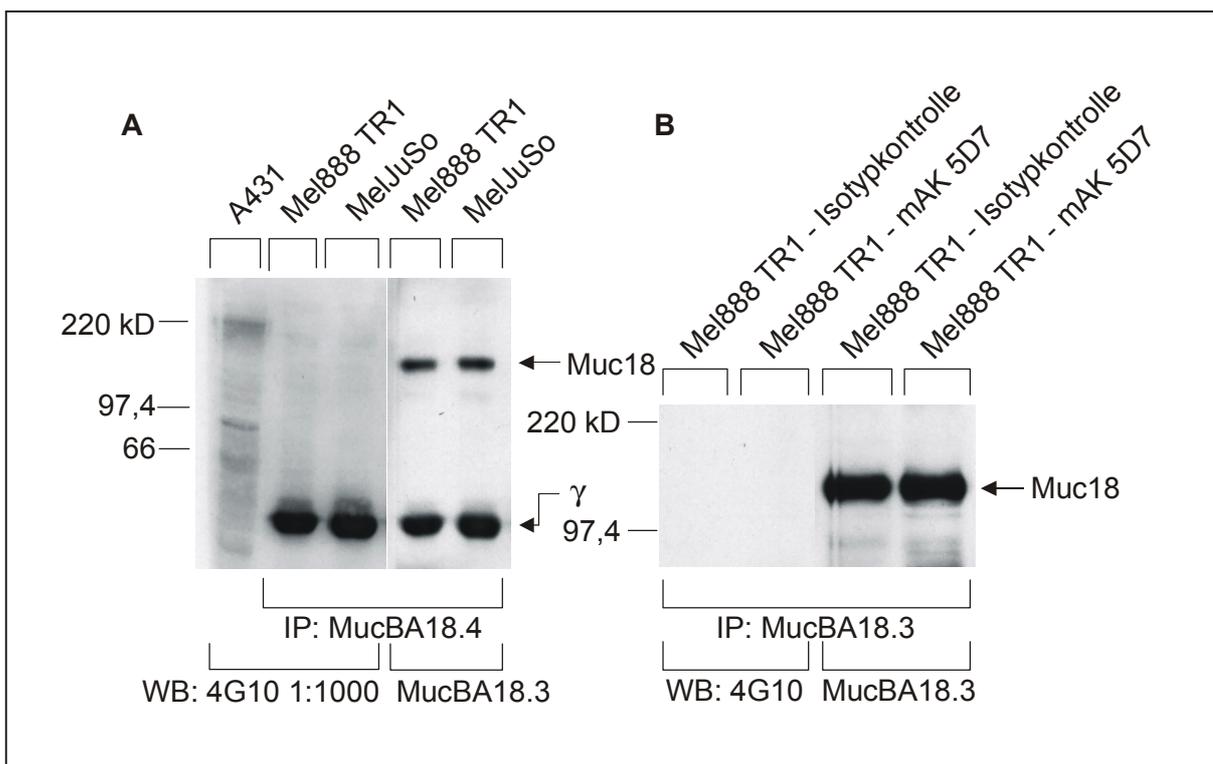


Abb. 8: Tyrosinphosphorylierung von Muc18 im unstimulierten Zustand (A) und im stimulierten Zustand (B). Die Stimulationszeit in B betrug 30 min. Über den jeweiligen Western Blots sind in dieser und allen folgenden Abbildungen die Zelllinien und Kreuzvernetzungsantikörper genannt. Außerdem wurde immer α MIg als 2. Antikörper zugefügt.
[γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers; IP: Immunpräzipitationsantikörper; WB: Blotting-AK]

Abb. 8A zeigt die Ergebnisse für nicht-stimulierte Zellen. Die Positivkontrolle A431, ein EGF-stimuliertes Karzinomzelllysate, liefert eine Reihe von phosphorylierten Proteinen, d. h. der Antikörper ist funktionell. Die Präzipitate reagieren mit MucBA18.3, aber nicht mit dem α -Phosphotyrosinantikörper, d. h. Muc18 liegt unstimuliert nicht Tyrosin-phosphoryliert vor. In Abb. 8B sieht man, dass Muc18 auch nach Stimulation mit mAK 5D7 nicht phosphoryliert wird. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass pMuc18 von 4G10 aufgrund einer fehlenden flankierenden Erkennungssequenz um das Phosphotyrosin nicht erkannt wird.

5.3.2 Neu phosphorylierte Proteine im Zelllysate nach Muc18-Stimulation

Der eigentlich wichtigste Versuch zum Nachweis von Signalwegen ist die Tyrosin-phosphorylierung von Proteinen des Zelllysates. Treten neu phosphorylierte Proteine auf, so kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass das stimulierte Zelloberflächenprotein tatsächlich der Auslöser einer Signalkette ist.

Als Vorversuch wurde Mel888 TR1 für verschiedene Zeiten mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) stimuliert, einem Phorbol-ester, der die Proteinkinase C (PKC) von der regulären Signalkaskade entkoppelt und zu deren dauernden Aktivierung unabhängig von einem äußeren Stimulus führt. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, ist die Zelllinie Mel888 TR1 generell zur Stimulation geeignet, da der α -Phosphotyrosin-Antikörper (α -PTyr-AK) bereits nach 10 min PMA-Stimulation eine Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen des Zelllysates zeigt.

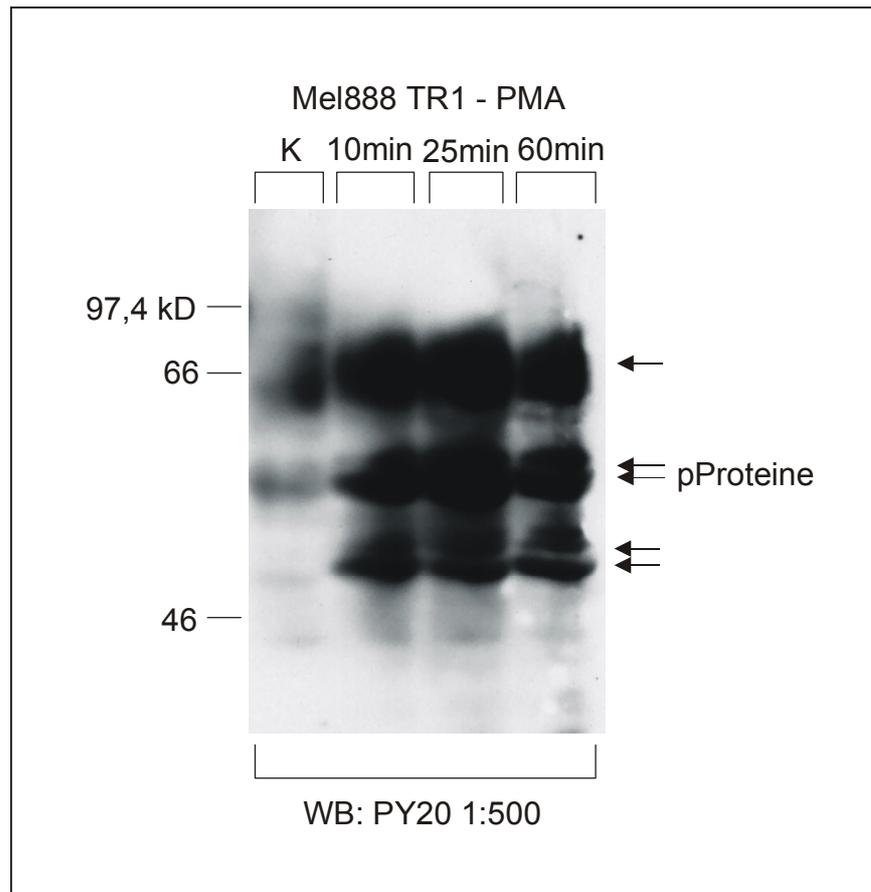


Abb. 9: Western Blot: Phosphorylierte Proteine im Zelllysate (150 μ g Gesamtprotein) nach PMA-Stimulation. [WB: Blotting-AK]

Es wurden mehrere α -PTyr-AK getestet, weil diese nicht nur das Phosphotyrosin erkennen, sondern auch eine gewisse Erkennungssequenz darum herum benötigen. Liegt diese nicht vor, so wird ein Tyrosinrest, obwohl phosphoryliert, nicht erkannt. Prinzipiell kann man sowohl den Antikörper HB 81-90 (nicht gezeigt), als auch die AK 4G10 und PY20 zur Detektion benutzen.

Für die Stimulation von Muc18 wurde folgender Blot erhalten:

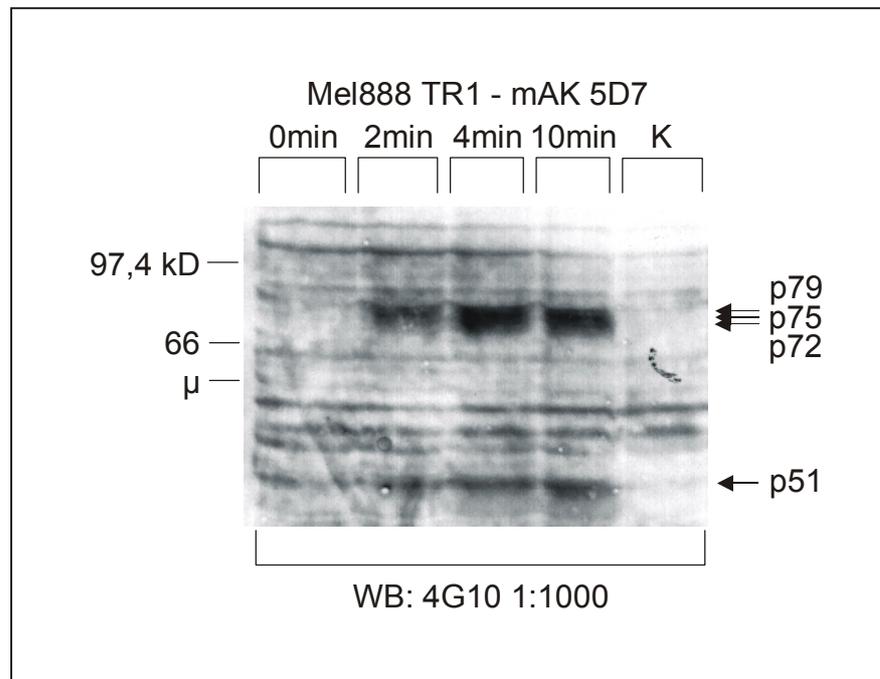


Abb. 10: Western Blot: Phosphorylierte Proteine im Zelllysate nach Muc18-Kreuzvernetzung. Mit μ ist die Laufweite der schweren Kette des kreuzvernetzenden Antikörpers 5D7 bezeichnet. [WB: Blotting-AK]

Die unterschiedlich lange Zeit der Kreuzvernetzung von Muc18 in der Melanomzelllinie Mel888 TR1 mit mAK 5D7 und GoMIg liefert, wie in Abb. 10 zu sehen ist, eine ganze Reihe an neu phosphorylierten Proteinen im Bereich um 51 kD, sowie zwischen 72 und 79 kD. Ein vergleichbares Bild wird im übrigen auch für die Kreuzvernetzung mit dem Antikörper 1B4 erhalten. Stimuliert man dagegen Mel888, die ursprüngliche, nicht mit Muc18 transfizierte Zelllinie, erhält man keines der Signale (hier nicht gezeigt). In der Spur mit der Bezeichnung „K“ wurde nur Kreuzvernetzungsantikörper Z420 zugefügt, welcher keine Veränderungen im Muster aufweist. Ein weiterer interessanter Punkt ist auch, dass die Phosphorylierung bereits in einer sehr kurzen Zeit von nur 2 min zum erstenmal detektiert werden kann.

Ebenfalls die Kombination MelJuSo mit 5D7 zeigt ein vergleichbares Ergebnis:

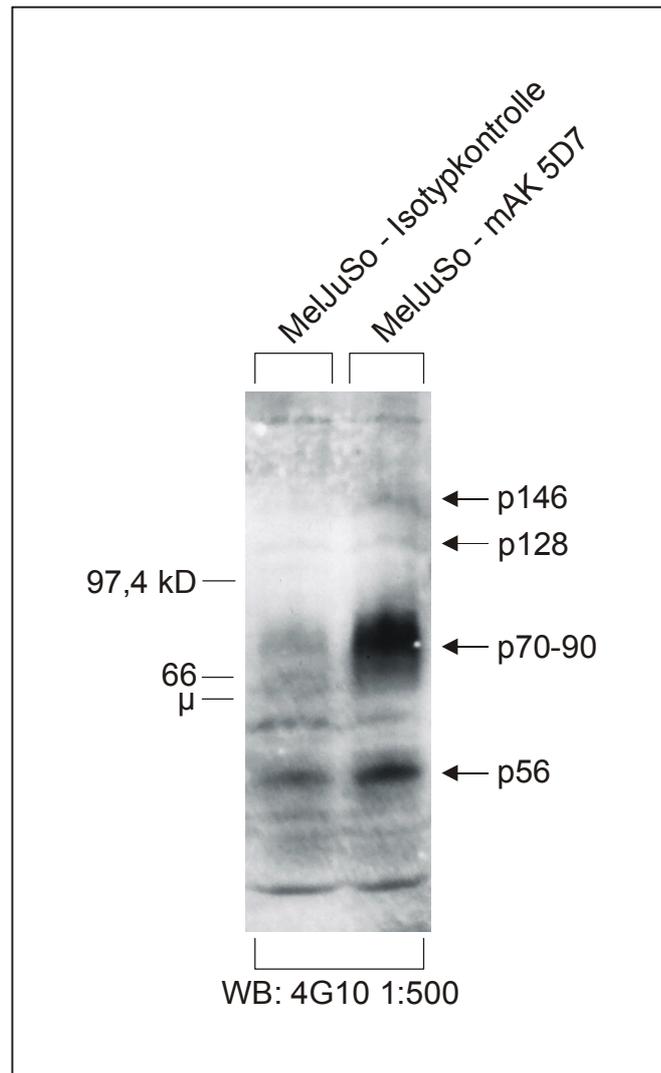


Abb. 11: Western Blot: Tyrosinphosphorylierung der Proteine im Zelllysate nach Muc18-Kreuzvernetzung von MelJuSo mit 5D7 bzw. mit Isotypkontrolle-AK (30 min).

Auch Abb. 11 zeigt neben den Phosphoproteinen bei etwa 50 kD (hier 56 kD) und im mittleren molekularen Bereich (hier 70-90 kD) weitere im höhermolekularen Bereich (hier 128 und 146 kD). Ein ähnliches Muster wurde auch für Mel888 TR1 und 1B4 bzw. MelJuSo und Muc18 erhalten; außerdem zeigte eine Behandlung von Mel888 mit 5D7, sowie nur die Anwendung des 2. AK G α Mi γ auf Mel888 TR1 keine dieser Banden (nicht gezeigt).

Wie also zu sehen ist, treten nach Stimulation der Zelllinien Mel888 TR1 und MelJuSo mit den α -Muc18-Antikörpern 5D7, 1B4 und Muc18 zahlreiche neu Tyrosin-phosphorylierte Proteine auf. Die Kreuzvernetzung von Muc18 an der Zelloberfläche initiiert Signalübermittlung.

5.4 Identifikation von durch Muc18-Stimulation neu auftretenden Phosphoproteinen

Nach der Feststellung, dass Muc18 tatsächlich ein Zelladhäsionsmolekül ist, das Signale in die Zelle weiterleiten kann, stellt sich natürlich die Frage, welche Proteine im Zellinneren phosphoryliert werden. Bei anderen Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. die Integrinen, sind die Signalwege z. T. schon aufgeklärt. Ein zentraler Punkt im Integrinsignalweg ist fak („focal adhesion kinase“), das Autophosphorylierung eingeht und dann die src-Familie-Proteintyrosinkinasen (src-PTKs) rekrutiert und auch zur Bindung und Tyrosinphosphorylierung der Adaptermoleküle p130Cas, crk und nck führt.

Da Muc18 auch ein Zelladhäsionsmolekül ist, liegt die Möglichkeit nahe, dass es ebenfalls einen Signalweg wie diesen beschreitet. Dazu wurden einige Signalproteine ausgewählt und auf Phosphorylierung nach Muc18-Stimulation mittels Antikörper untersucht, welche vom Molekulargewicht zu den vorher detektierten neu phosphorylierten Proteinen passen. Für die Proteingruppen p51/56 wurden fyn und nck, für p70-90 Paxillin und für p128 und p146 fak und p130Cas getestet.

5.4.1 Expression von Signalweg-Proteinen

Verschiedene Melanom- und eine Karzinomzelllinie wurden auf Expression der ausgewählten Signalwegproteine untersucht. Mel888 exprimiert kein Muc18, Mel888 TR1 dagegen ist eine Muc18-Transfektant, MelJuSo und HeLa sind ebenfalls Muc18-positiv (Abb. 12). Diese Zelllinien können somit für Phosphorylierungstests bzw. Koimmunpräzipitation (vgl. 5.5) verwendet werden.

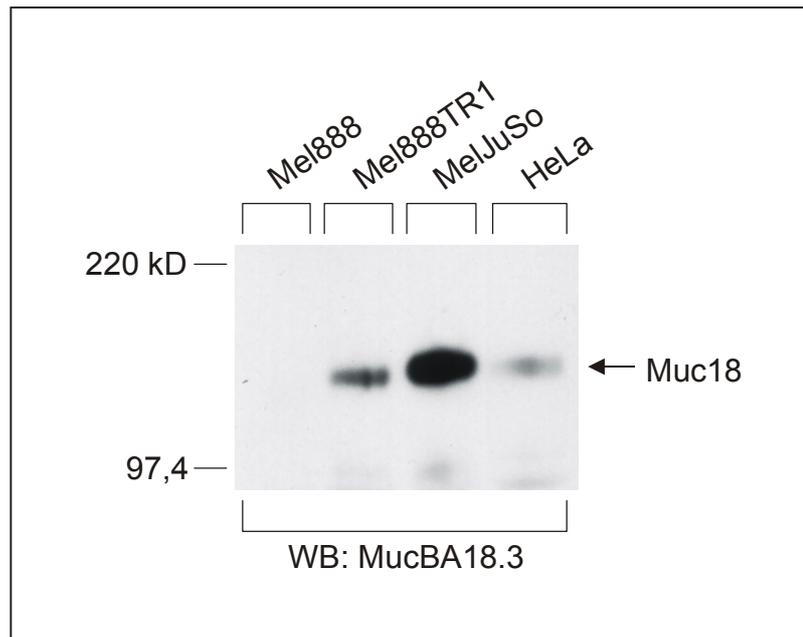


Abb. 12: Western Blot: Muc18-Expression der getesteten Zelllinien
(Auftragsmenge: 200 μ g Gesamtzelllysate pro Spur)

Wie man sieht ist MelJuSo sehr stark Muc18-positiv, Mel888 TR1 positiv, seine Ausgangszelllinie Mel888 negativ und HeLa schwach positiv.

Zuerst wurde die Expression der Signalwegproteine fyn, nck, Paxillin, fak und p130Cas untersucht. Man findet fyn theoretisch bei 59 kD, nck bei 47 kD, sowie Paxillin bei 68 kD, fak bei 125 kD und p130Cas bei 130 kD. Man erkennt in Abb. 13, dass die Zelllinien MelJuSo und HeLa bei Auftragung der gleichen Menge Gesamtprotein auf das Gel vergleichbar viel nck, fak und Paxillin exprimieren, lediglich MelJuSo hat weniger fyn.

Außerdem wurde die Expression von p130Cas auf verschiedenen Zelllinien getestet (Abb. 13), wobei eine weitere Eigenschaft des Antikörpers zu sehen ist. Dieser kreuzreagiert mit p105CasL, einem weiteren wichtigen Signalmolekül, identifiziert im Integrin-Signalweg, welches mit p130Cas nahe verwandt ist.

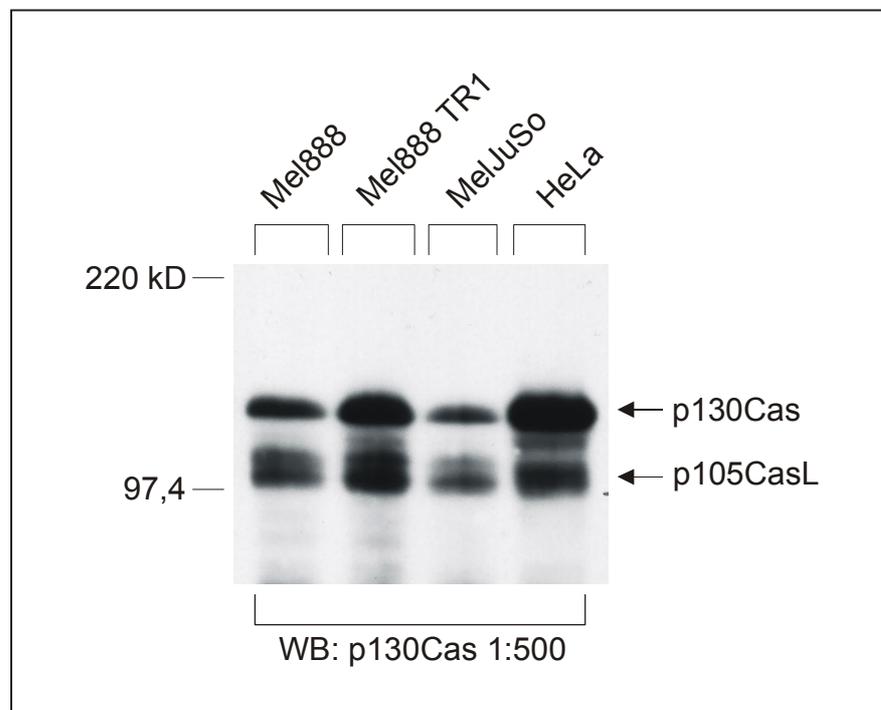
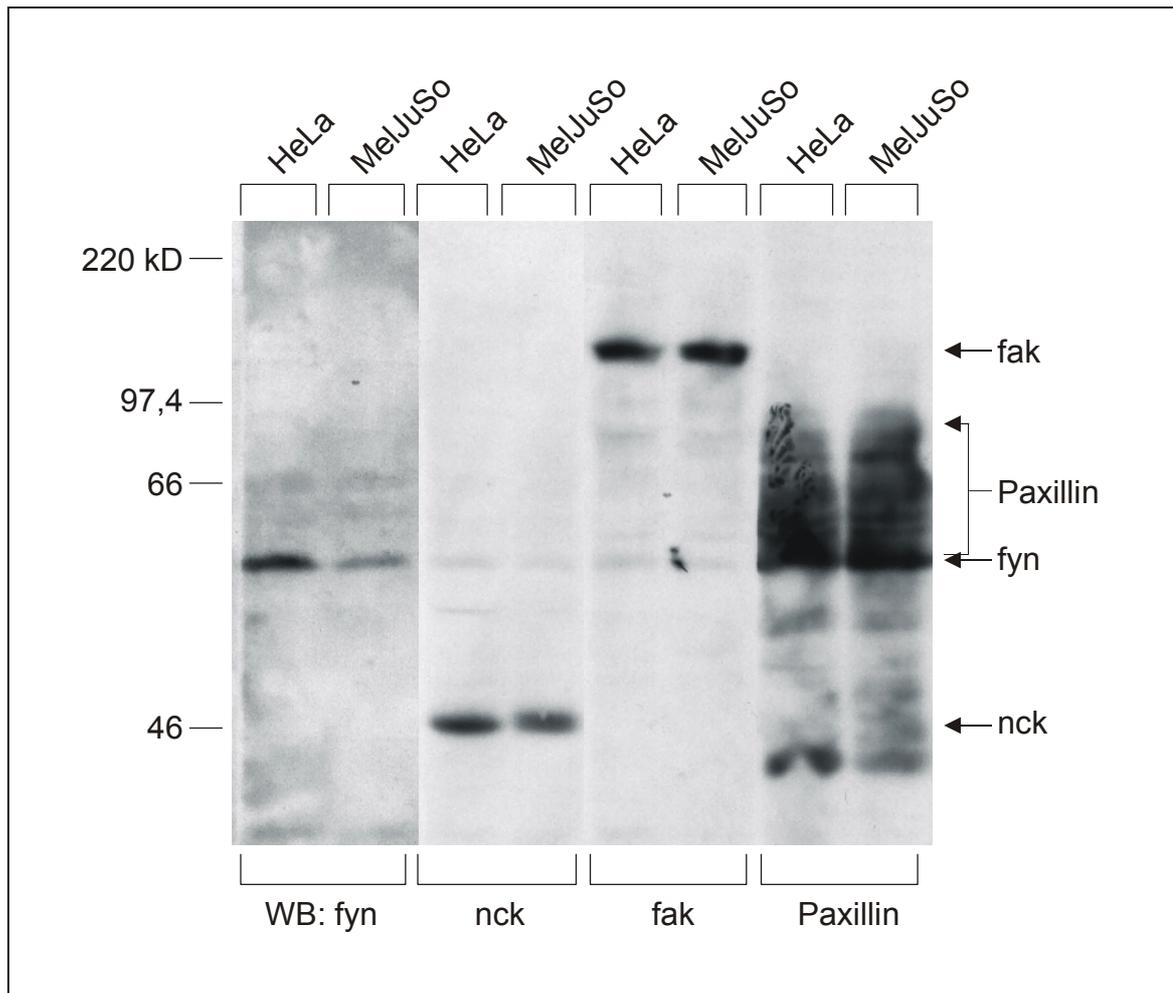


Abb. 13: Western Blot: oben: Expression von fyn, nck, fak und Paxillin (Auftragsmenge: 150 µg Gesamtprotein pro Spur); unten: Expression von p130Cas und p105CasL auf verschiedenen Zelllinien (200 µg Gesamtprotein).

Wie der Western Blot (pro Spur Zellysate mit 200 µg Gesamtprotein aufgetragen) in Abb. 13 zeigt, besitzt MelJuSo im Vergleich weniger p130Cas und p105CasL als Mel888 und Mel888 TR1; HeLa jedoch deutlich mehr. Es sind also alle getesteten Zelllinien positiv und die ausgesuchten Signalwegproteine können bzgl. Muc18-Kreuzvernetzung getestet werden.

5.4.2 Phosphorylierung von Signalwegproteinen durch Muc18-Kreuzvernetzung

Wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben, können durch Muc18-Stimulation einige neu phosphorylierte Proteine erhalten werden und darum wurden mehrere potentielle Signalwegproteine ausgewählt, die ein entsprechend passendes Molekulargewicht besitzen, um deren Phosphorylierung nach Muc18-Stimulation zu ermitteln. Das zu untersuchende Protein wurde zuerst präzipitiert und anschließend mit α -Phosphotyrosin-mAK 4G10 geblottet, um eine ausreichende Menge zu erhalten und das Problem der Nachweisgrenze zu umgehen. Diese Blots wurden anschließend „gestripped“, d. h. die Detektionsantikörper entfernt, und mit dem Antikörper gegen das Signalwegprotein, als Kontrolle für die Auftragsmenge, gefärbt.

5.4.2.1 Phosphorylierung von p130Cas/p105CasL nach Muc18-Stimulation

Abb. 14 zeigt den Phosphorylierungsstatus von p130Cas und p105CasL nach 30-minütiger Stimulation von Muc18 mit mAK 5D7:

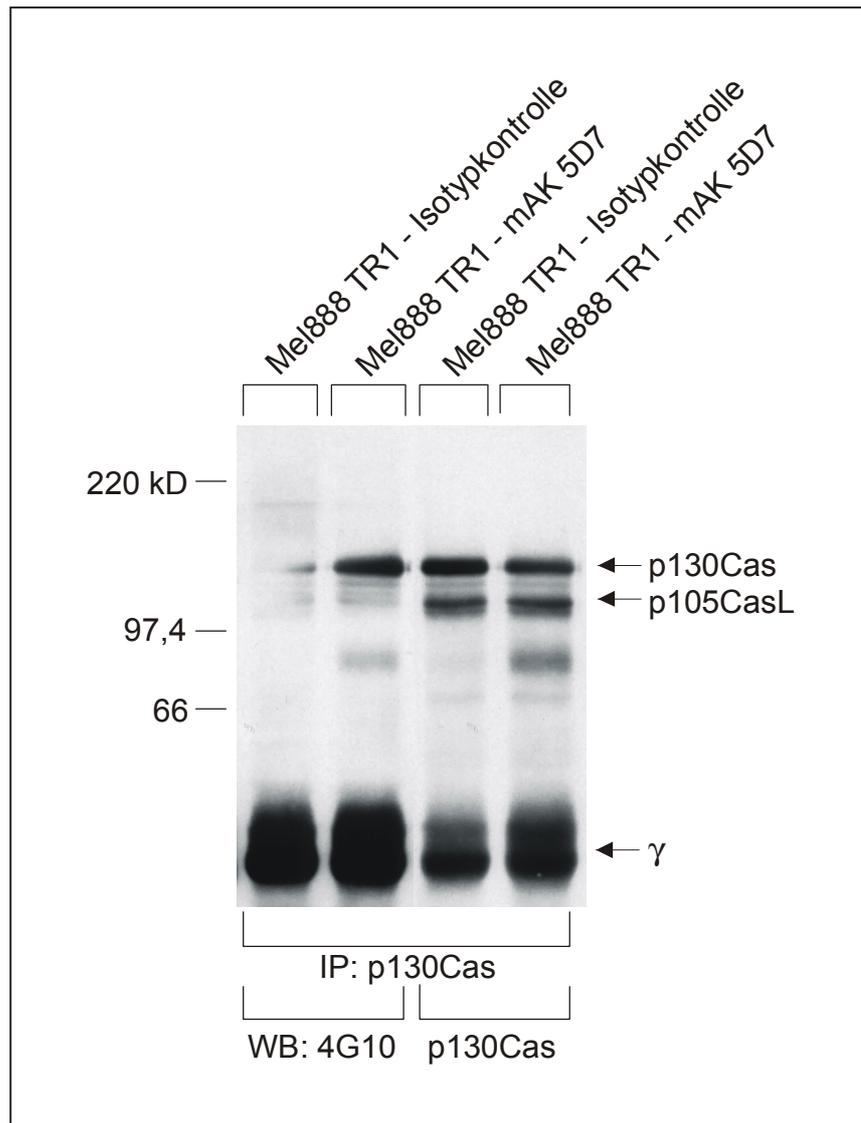


Abb. 14: Western Blot: Phosphorylierung von p130Cas/p105CasL nach Muc18-Kreuzvernetzung: Zellen mit mAK 5D7 und G α M1g 30 min kreuzvernetzt, anschließend mit α -p130Cas immunpräzipitiert, mit α -pTyr gefärbt (die beiden Spuren links), und die Spuren nach „strippen“ mit α -p130Cas inkubiert (die beiden Spuren rechts). [γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Nach Kreuzvernetzung mit mAK 5D7 ist eine deutliche Phosphorylierung von p130Cas zu erkennen (Spur 2), aber nicht bei den mit Isotypkontrollantikörper behandelten Zellen (Spur 1). Die beiden linken Spuren des Blots wurden „gestrippt“ und sind mit p130Cas inkubiert als die beiden rechten Spuren zu sehen, d. h. es liegen sowohl in der nicht-stimulierten als auch im stimulierten Probe p130Cas und p105CasL vor, jedoch nur nach Stimulation wird pp130Cas und schwach auch pp105CasL erhalten.

5.4.2.2 Phosphorylierungsstatus von fak nach Kreuzvernetzung von Muc18

Fak zeigte folgendes Bild nach Muc18-Aktivierung:

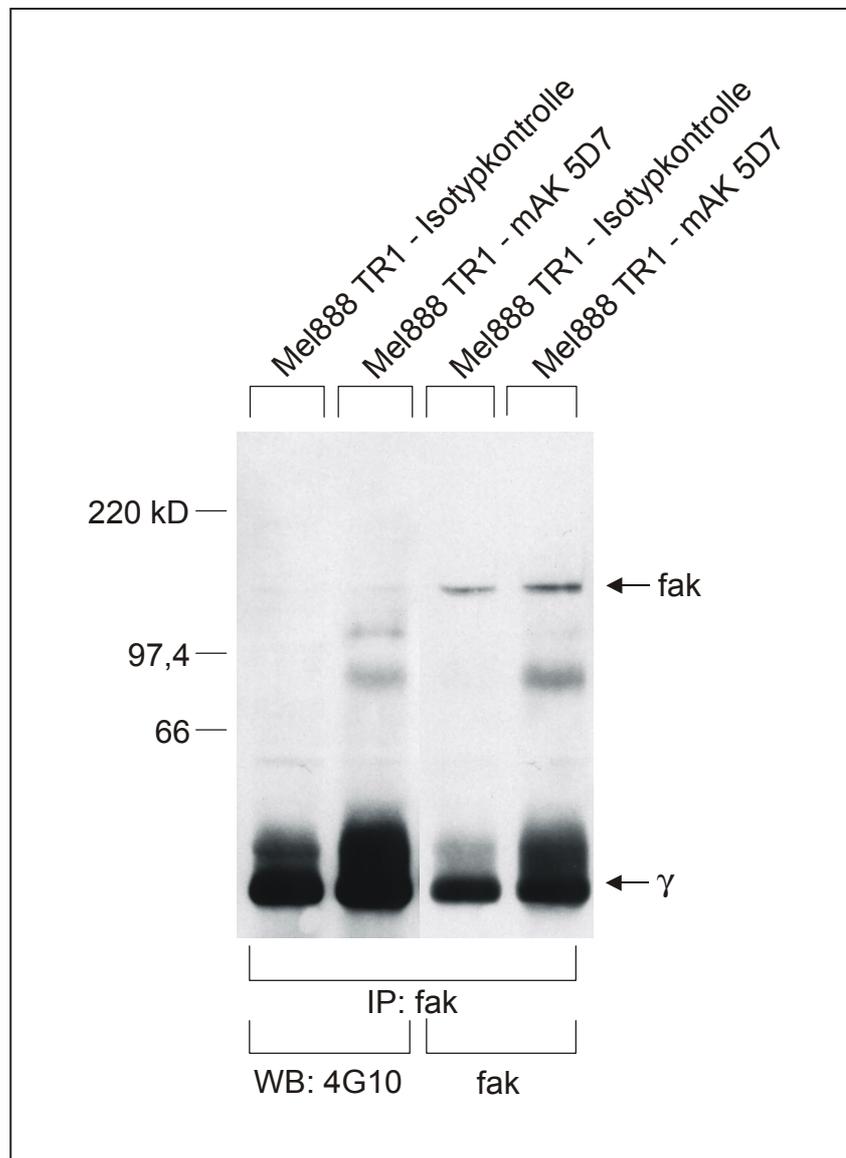


Abb. 15: Western Blot: Phosphorylierung von fak nach Muc18-Kreuzvernetzung: Zellen mit mAK 5D7 oder Isotypkontroll-AK und G α MIg 30 min kreuzvernetzt, dann mit α -fak immunpräzipitiert, mit α -pTyr gefärbt (die beiden Spuren links), und die Spuren nach „strippen“ mit α -fak inkubiert (die beiden Spuren rechts).
[γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Wie Abb. 15 zeigt, konnte nach 30-minütiger Kreuzvernetzung der Zellen mit mAK 5D7 oder Isotypkontrollantikörper, anschließender Lyse der Zellen und Immunpräzipitation gegen fak

in der Zelllinie Mel888 TR1 keine Phosphorylierung von fak detektiert werden. Das tatsächliche Vorhandensein von fak in diesem Experiment zeigen die beiden rechten Spuren, die nach Abtrennen von 4G10 durch Inkubation mit fak erhalten wurden.

5.4.2.3 Phosphorylierungsstatus von fyn nach Kreuzvernetzung von Muc18

Als nächstes Protein wurde fyn auf Phosphorylierung nach Muc18-Stimulation getestet:

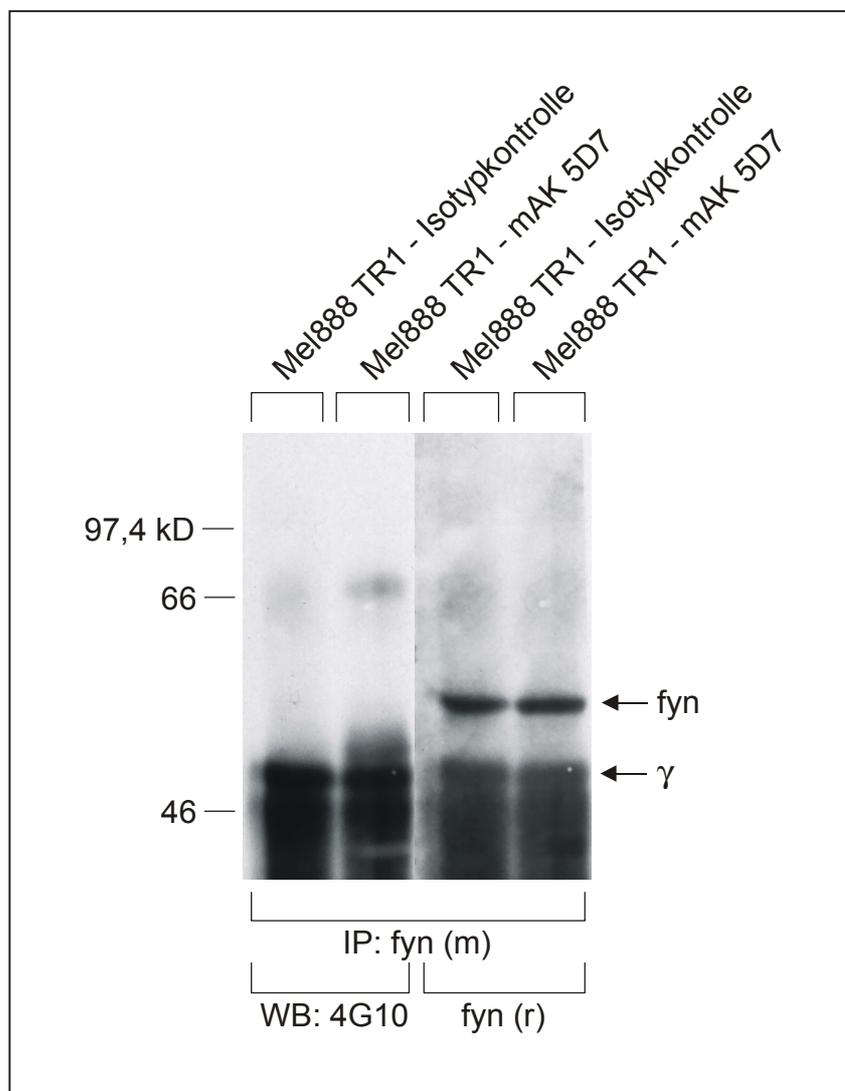


Abb. 16: Western Blot: Immunpräzipitate von fyn gegen pTyr (die beiden Spuren links) und gegen fyn (die beiden Spuren rechts) gefärbt zur Detektion der Phosphorylierung von fyn nach 30 min Muc18-Kreuzvernetzung (fyn (m): Maus- α -fyn; fyn (r): Kaninchen- α -fyn). [γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Wie aus Abb. 16 zu ersehen ist, zeigt sich auch für fyn keine Änderung im Phosphorylierungsstatus nach Muc18-Stimulation. Als Kontrolle dienen wiederum die beiden rechten Spuren des Blots; die Präzipitation von fyn war in Ordnung, da sowohl nicht-stimuliertes als auch stimuliertes Lysat ein deutliches Signal mit α -fyn-AK zeigen.

Zusammengefasst kann man also sagen, dass nach Muc18-Kreuzvernetzung p130Cas und p105CasL phosphoryliert werden. Für fak und fyn konnte kein Signal mit α -pTyr-AK erhalten werden. Paxillin wurde nicht getestet, da das Bandenmuster zu unübersichtlich ist. Desweiteren war ein Test, ob nck ebenfalls phosphoryliert wird, unmöglich, da trotz Austestens verschiedenster Bedingungen stets der Antikörper 4G10 ein zu undeutliches, mit der schweren Kette des Präzipitationsantikörpers (γ : 50 kD; nck: 47 kD) überlappendes Signal lieferte.

5.5 Koimmunpräzipitation von Signalwegproteinen mit Muc18

Eine weitere entscheidend wichtige Möglichkeit zur Ermittlung von Signalwegen ist die Identifikation von im Signalkomplex enthaltenen Partnern eines Proteins, denn nur wenn die Moleküle für eine bestimmte Zeit in Kontakt treten, kann das Signal in der Zelle weitergegeben werden. Eine Methode um die Interaktionen von Oberflächenproteinen mit zytoplasmatischen Signalwegproteinen aufzuklären, ist die Koimmunpräzipitation. Dazu präzipitiert man das Zelloberflächenprotein und färbt dann aber auf dem Western Blot nicht gegen das ursprüngliche Protein, sondern gegen ein anderes Protein. War dieses vorher in Kontakt mit dem Rezeptor, eventuell auch in einem Komplex und bleibt es daran haften, dann wird es mit dem ersten Protein präzipitiert, im Polyacrylamidgel mit aufgetrennt und kann detektiert werden. Der wichtigste Punkt bei dieser Vorgehensweise ist dabei die Wahl des Detergenzes, welches „stark“ genug sein muss, um das Zelloberflächenprotein aus der Membran zu lösen, aber gleichzeitig mild sein muss, da eine zu starke Solubilisierung des Protein-Komplexes die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zerstört, und somit das gekoppelte Protein verloren geht.

Auch in den im Folgenden beschriebenen Experimenten der Koimmunpräzipitation wurden wiederum die bereits in den Phosphorylierungs-Versuchen getesteten Src-PTKs und Adapterproteine untersucht.

5.5.1 Koimmunpräzipitation von p130Cas/p105CasL nach Muc18-Stimulation

Wie oben bereits erklärt, zeigt Abb. 17 einen Western Blot mit Koimmunpräzipitaten. Zur Kontrolle der Spezifität des Signals wurden nicht nur die nicht-stimulierte und stimulierte Muc18-positive Zelllinie MelJuSo, sondern auch die Muc18-negative Zelllinie Mel888 mit α -Muc18-mAK präzipitiert. Nach Zugabe von 5D7 oder Isotypkontroll-AK und Kreuzvernetzung der Zellen mit Ziege- α -Maus-AK für 30 min erfolgte eine Zelllyse mit anschließender Präzipitation gegen Muc18. Schließlich wurde der Blot mit p130Cas-mAK inkubiert.

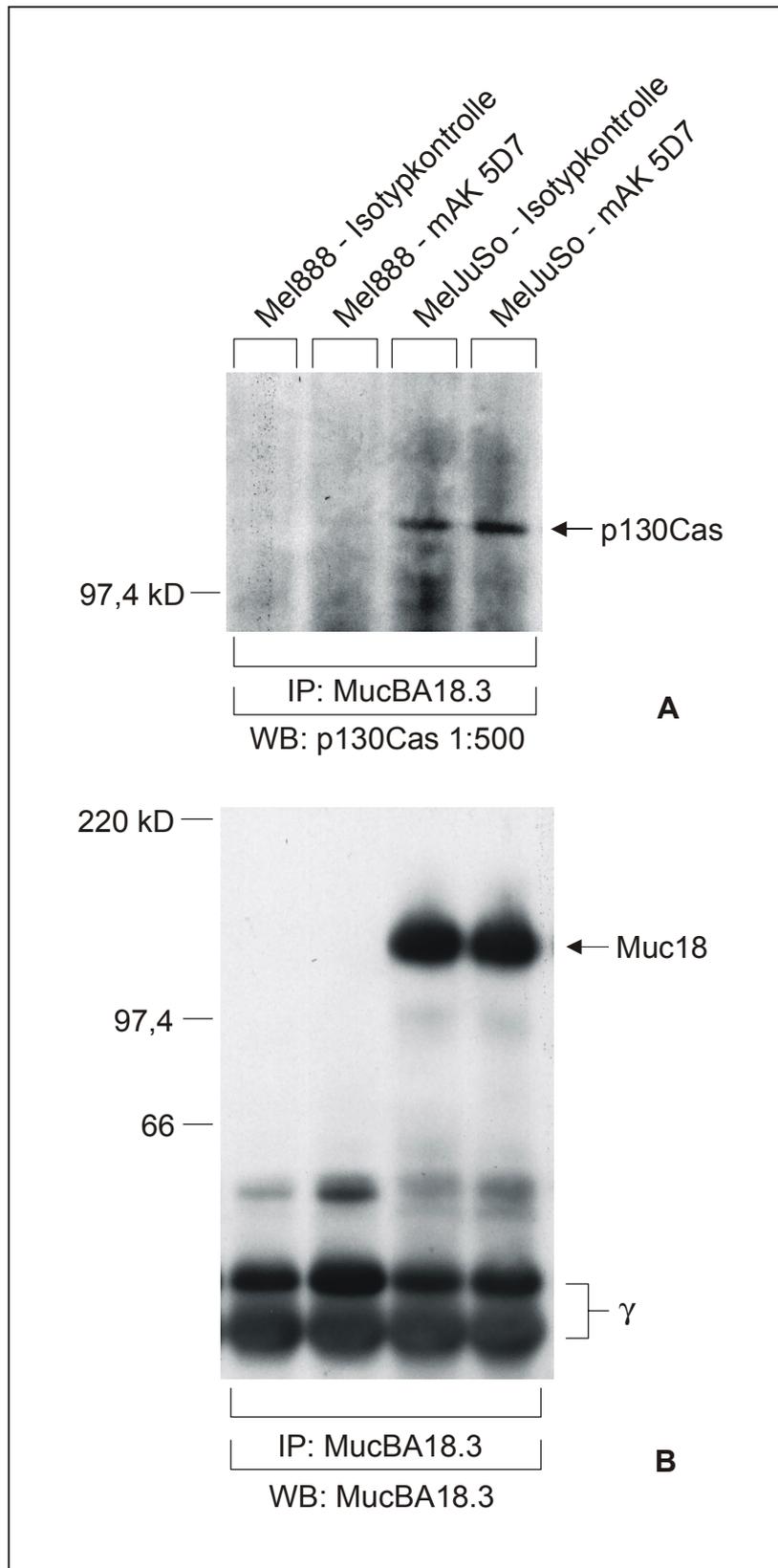


Abb. 17: Western Blot:

A: Koimmunpräzipitate von p130Cas mit Muc18 von nicht-stimulierten und stimulierten Zelllysaten

B: Entfernung der Detektions-AK von A, erneute Färbung gegen Muc18 [γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Eindeutig kann bei der Muc18-positiven Zelllinie MelJuSo eine von der Stimulation unabhängige Assoziation von p130Cas an Muc18 beobachtet werden (Abb. 17A). Eine weitere Spezifitäts-Kontrolle erhält man durch „strippen“ des ersten Blots und Inkubation mit α -Muc18-Antikörper (Abb. 17B). Nur die Spuren aus Abb. 17B, die Muc18-Präzipitat tragen, zeigen in Abb. 17A auch p130Cas. Somit wird p130Cas spezifisch von Muc18 mitpräzipitiert. Außerdem sind auch die schweren Ketten des Präzipitationsantikörpers MucBA18.3 zu erkennen, die etwa vergleichbar stark sind, d. h. es wurde auch gleich viel Präzipitat auf jede Spur aufgetragen.

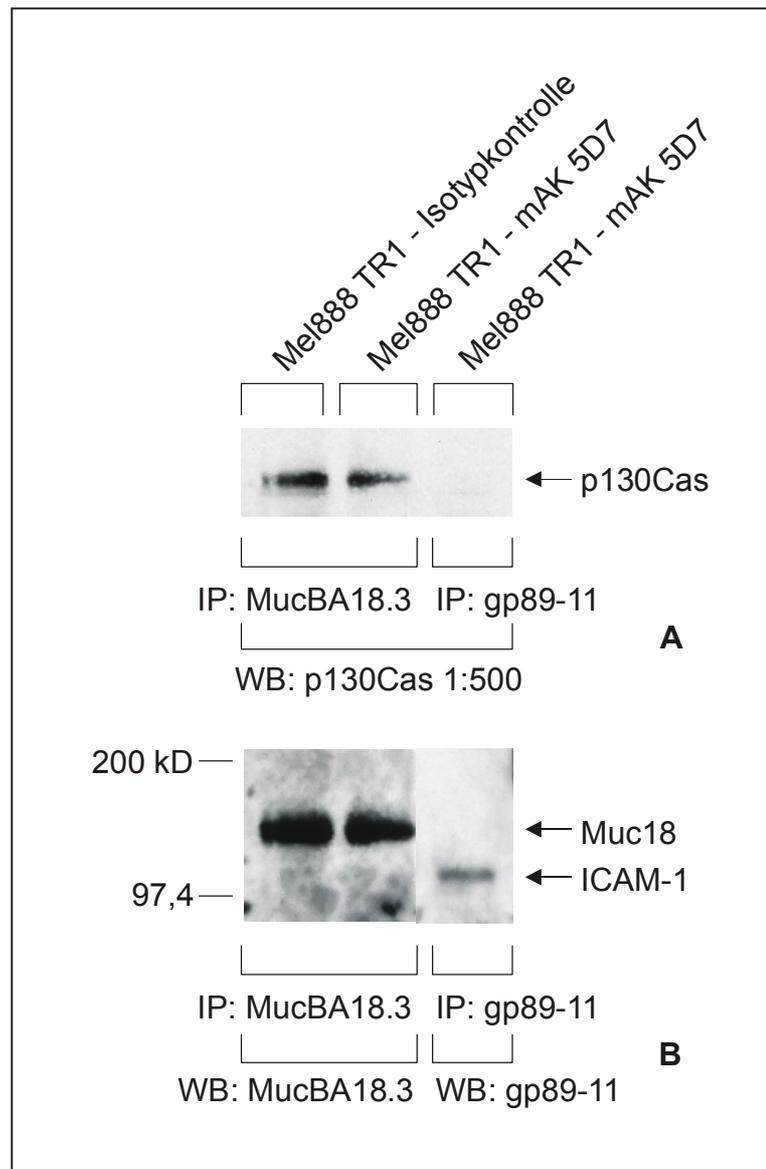


Abb. 18: Western Blot:

A: Koimmunpräzipitation von p130Cas mit Muc18 und ICAM-1
 B: Entfernung der Detektions-AK von A und Kontroll-Inkubation mit α -Muc18-AK und α -ICAM-1-AK (gp89-11).

Als weitere Kontrolle der Koimmunpräzipitation sieht man in Abb. 18 einen Western Blot, bei dem Muc18-stimulierte Zellen mit Antikörper gegen ein anderes Zelloberflächenprotein, ICAM-1, präzipitiert wurden. Die Zelllinie Mel888 TR1 liefert nur im Immunpräzipitat von Muc18 das Signalweg-Adapterprotein p130Cas, nicht im Immunpräzipitat von ICAM-1. Das bedeutet wiederum, dass p130Cas spezifisch mit dem Zelloberflächenprotein Muc18 mitpräzipitiert wird.

Auch in einem anderen Zelltypus, dem Karzinom, findet man p130Cas im Koimmunpräzipitat unabhängig von der Stimulation von Muc18 (nicht gezeigt). Dazu wurde die Muc18-positive Karzinomzelllinie HeLa benützt. Dies bedeutet, sowohl Melanom als auch Karzinom benutzen das gleiche Signalwegprotein.

Wie vorher schon erwähnt, spielt die Wahl des Detergenzes im Lysepuffer bei der Koimmunpräzipitation eine sehr wichtige Rolle. Wie entscheidend sich das Bild verändern kann, zeigt Abb. 19. Lyse mit Brij-96, welches ebenfalls wie NP-40 1%ig verwendet wurde, zeigt keinerlei p130Cas-Signal mehr auf dem Western Blot, obwohl wie im unteren Teil der Abbildung zu sehen ist, genügend Muc18 präzipitiert wurde. NP-40 zerstört den Protein-Komplex um Muc18 offensichtlich nicht so stark wie Brij-96.

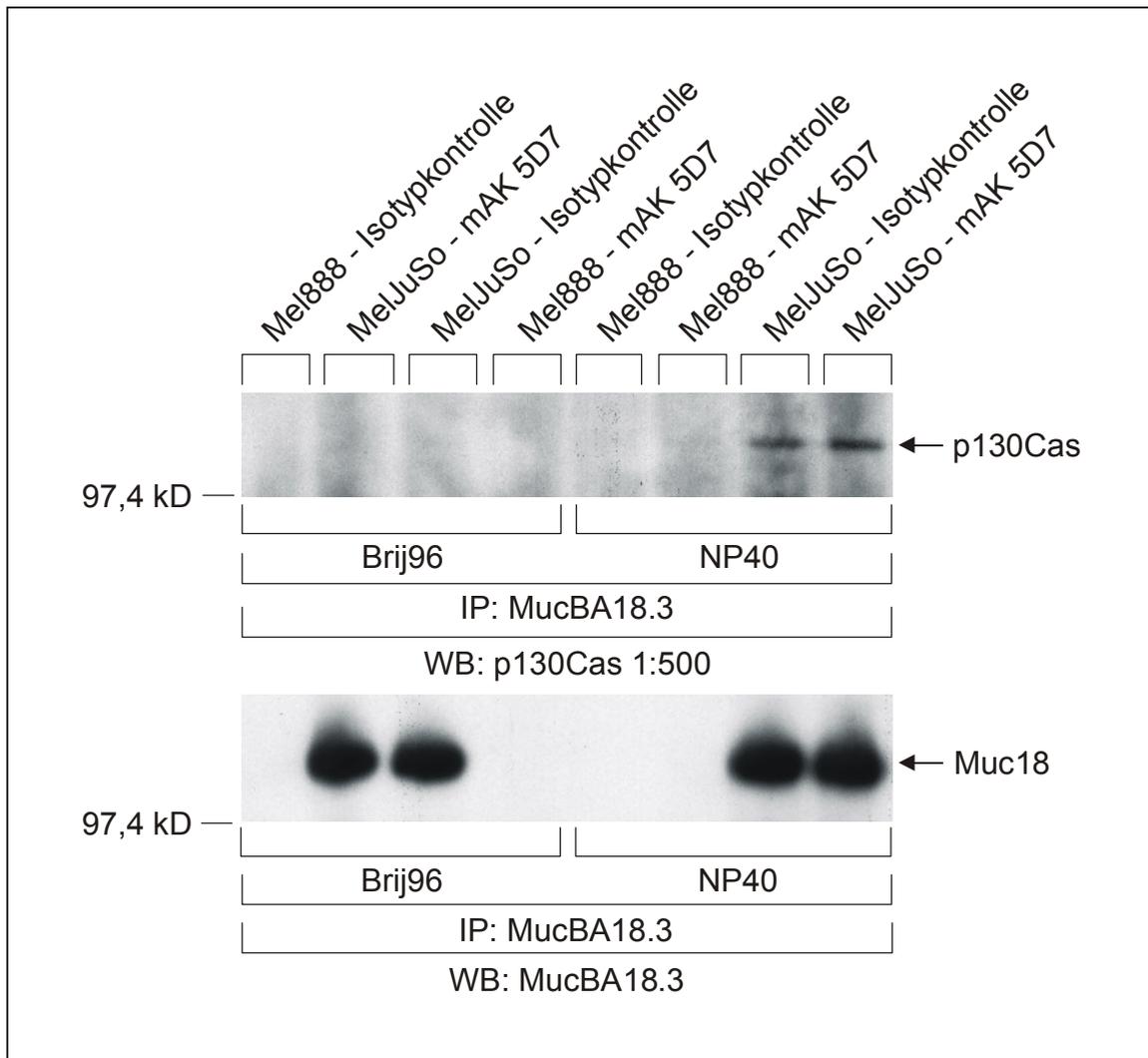


Abb. 19: Western Blot: Abhängigkeit der Koimmunpräzipitation von p130Cas vom Detergenz: Immunpräzipitat von Muc18 mit α -p130Cas (oben) und mit α -Muc18 (unten) gefärbt.

Eine weitere Tatsache, welche den Erfolg der Koimmunpräzipitation maßgeblich beeinflusst, ist die Wahl des Präzipitationsantikörpers. Je nach Bindungsstelle können die assoziierten Proteine unterschiedlich gut koimmunpräzipitiert werden:

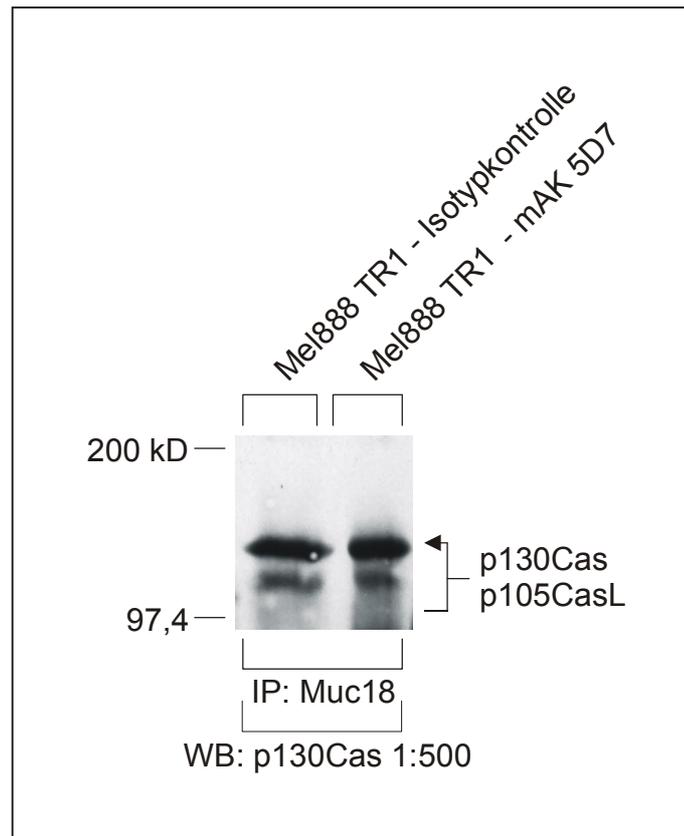


Abb. 20: Western Blot: Muc18 als Präzipitationsantikörper zur Koimmunpräzipitation von p130Cas

Auch von mAK Muc18 wird p130Cas vergleichbar gut kopräzipitiert. Hier erkennt man, dass p105CasL ebenfalls mit Muc18 präzipitiert werden kann (Abb. 20). Wiederum ist die Präzipitation unabhängig von der Stimulation.

5.5.2 Versuch der Koimmunpräzipitation von fak nach Muc18-Stimulation

Es wurde auch versucht, fak, welches nach Muc18-Stimulation in Mel888 TR1 nicht phosphoryliert wird (vgl. 5.4.2.2), im Komplex mit Muc18 zu finden (Abb. 21). Doch auch hier konnte keine Wechselwirkung von fak zu Muc18 festgestellt werden. Hierzu wurden die Zelllinien mit 5D7 oder Isotypkontrolle beladen, mit Kreuzvernetzungsantikörper G α MIg für 30 min behandelt und lysiert. Nach Präzipitation gegen Muc18 fand eine Inkubation mit α -fak-AK statt. Parallel zu diesem Versuch erfolgte ein Ansatz mit p130Cas, der das vorher gezeigte Bild (5.5.1) lieferte; die Versuchsbedingungen waren also in Ordnung. Wie man sieht, bleiben die beiden linken Spuren im Bereich von 125 kD leer.

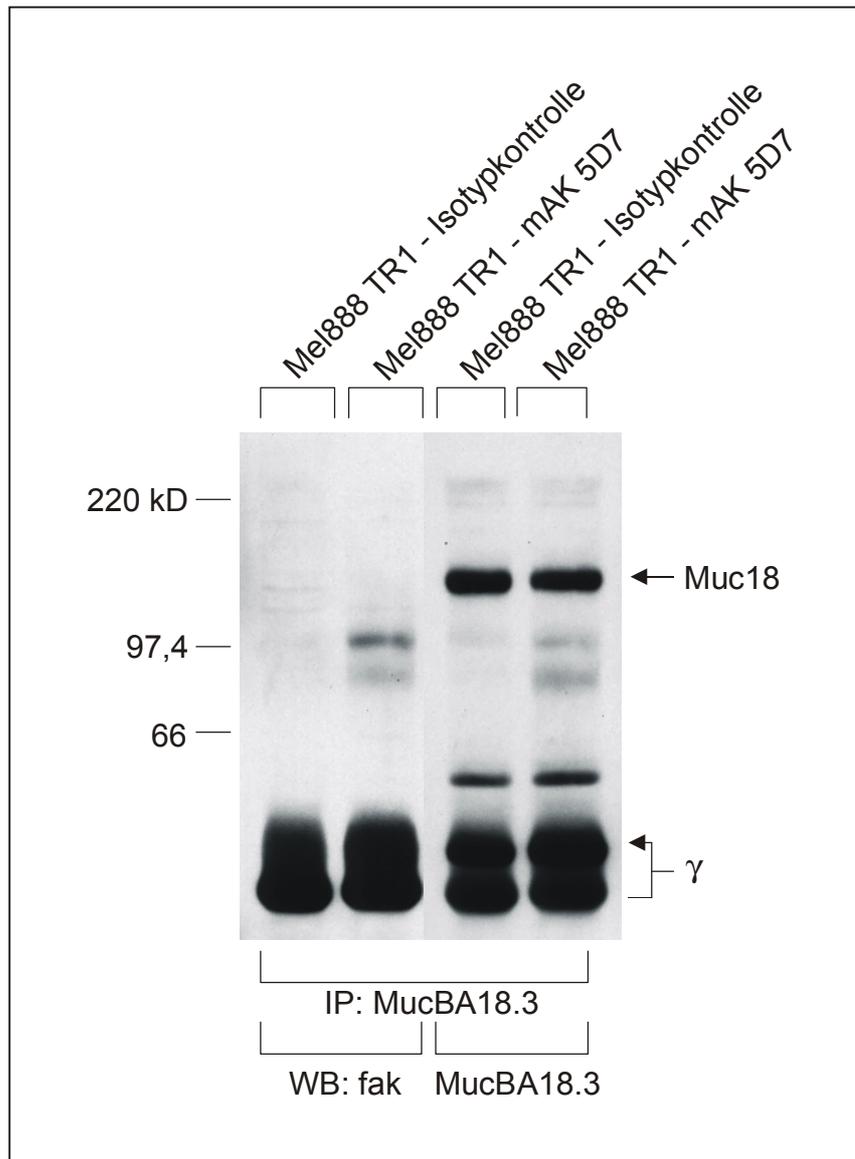


Abb. 21: Western Blot: Versuch der Koimmunpräzipitation von fak mit Muc18 nach 30 min Kreuzvernetzung.
 [γ: schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Offensichtlich wird fak unter diesen gewählten Versuchsbedingungen nicht mitpräzipitiert.

5.5.3 Versuch der Koimmunpräzipitation von fyn nach Muc18-Stimulation

Fyn, eine vorher schon beschriebene Src-PTK, wurde auch daraufhin untersucht, ob diese mit Muc18 interagiert. In Abb. 22 sieht man auf den beiden linken Spuren präzipitiertes fyn (theoretisch 59 kD), welches zuerst mit Mäuse-Antikörper gefällt und schließlich mit

Kaninchen-Antikörper geblottet wurde, um zu vermeiden, dass das Signal von der schweren Kette des Mausantikörpers (50 kD) überlagert wird. Dementsprechend findet man auf den beiden mittleren Spuren, die ebenfalls mit fyn (r) geblottet wurden, keine schwere Kette des Präzipitationsantikörpers.

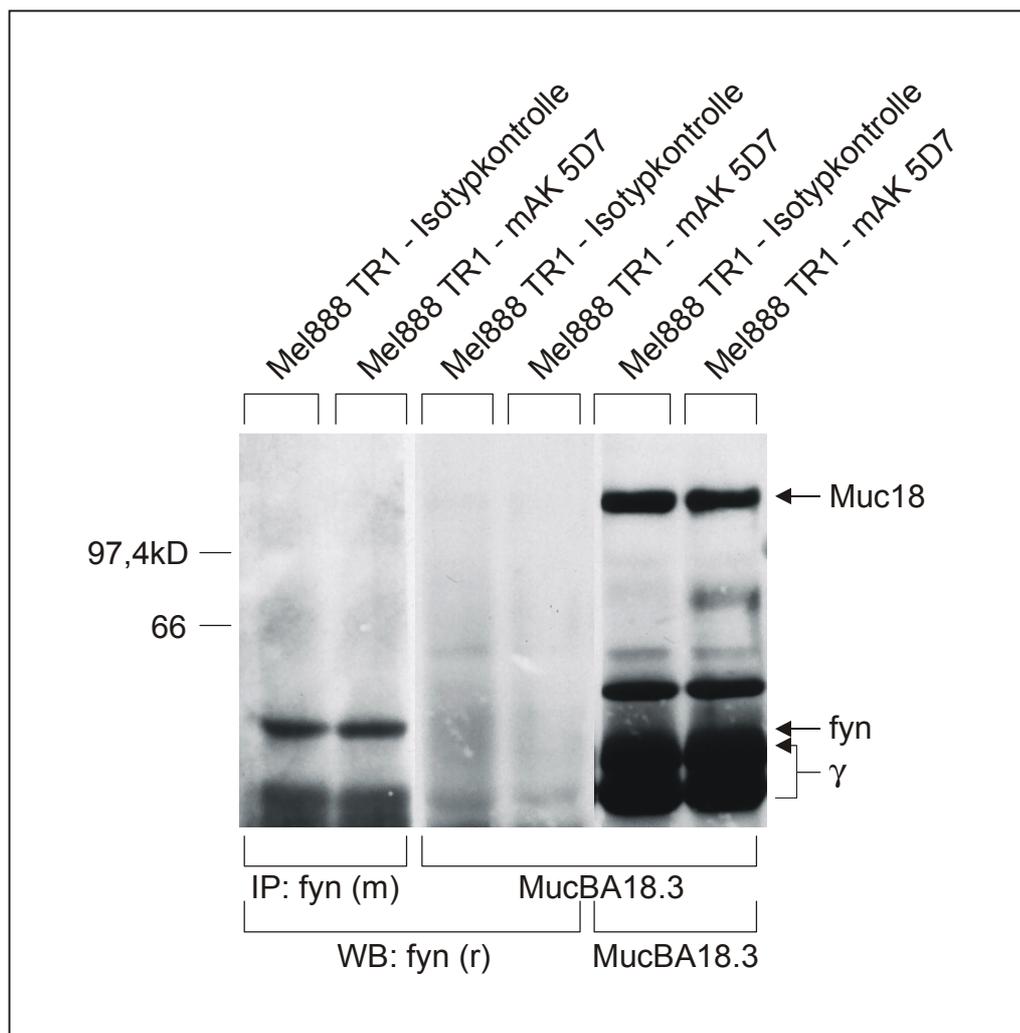


Abb. 22: Western Blot: Versuch der Koimmunpräzipitation von fyn mit Muc18:
Spuren 1, 2: Immunpräzipitate von fyn; Spuren 3-6: Immunpräzipitate von Muc18
gegen fyn (Spuren 3, 4) gefärbt und danach erneut gegen Muc18 (Spuren 5, 6) inkubiert.
[γ: schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Muc18 und fyn sind ausreichend vorhanden, wie die beiden rechten und die zwei linken Spuren zeigen, aber es wird weder in der nicht-stimulierten noch in der stimulierten Probe fyn im Koimmunpräzipitat gefunden, wie man bei den beiden mittleren Spuren sieht.

5.5.4 Versuch der Koimmunpräzipitation von Paxillin nach Muc18-Stimulation

Paxillin ist ein weiterer potentieller Partner von Muc18. Wie vorher schon gezeigt assoziiert p130Cas mit Muc18. Da p130Cas eine SH3-Domäne besitzt, und Paxillin davon gebunden werden kann (Thomas und Brugge, 1997), ist es möglich, dass auch Paxillin an der Signalübermittlung von Muc18 teilnimmt. In Abb. 23 ist der Versuch der Koimmunpräzipitation von Paxillin mit Muc18 gezeigt. Wie jedoch zu sehen ist, wird in keiner der gewählten Zelllinien, Melanomen und einem Karzinom, Paxillin mitpräzipitiert. Als Positivkontrolle dient die Auftragung von Zelllysat, welches die Laufweite von Paxillin zeigt.

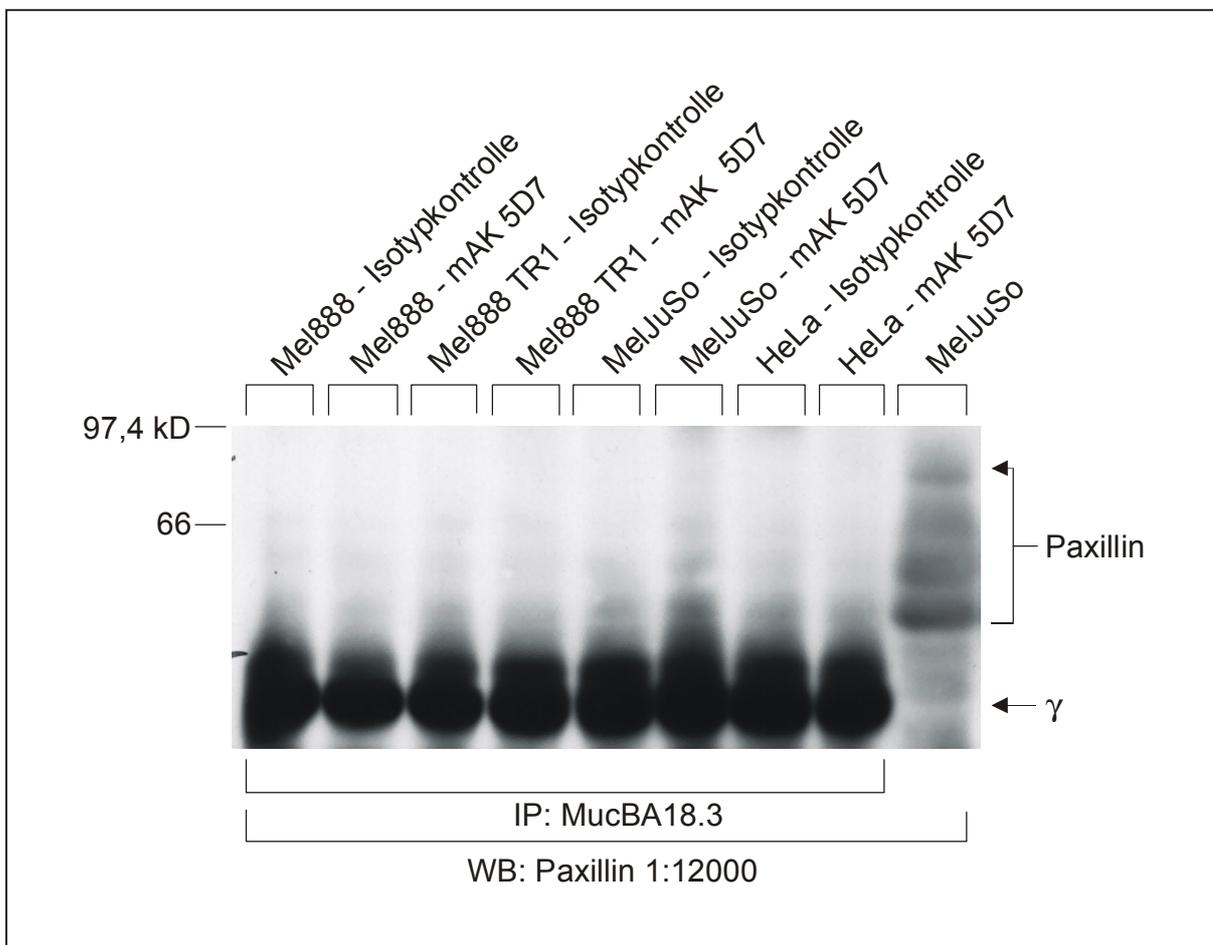


Abb. 23: Western Blot: Versuch der Koimmunpräzipitation von Paxillin mit Muc18:

Immunpräzipitate von Muc18 aus verschiedenen Zelllinien mit α -Paxillin-AK gefärbt.

[γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

Als weitere Auftragskontrolle sieht man die schwere Kette des Präzipitationsantikörpers, hier mit γ bezeichnet.

5.5.5 Koimmunpräzipitation von nck mit Muc18

Nck, ein Adapterprotein, welches mit p130Cas assoziieren kann (vgl. Integrinsignalweg 6.1), sollte als nächstes untersucht werden. In den beiden linken Spuren von Abb. 24 wurde nck aus Mel888 TR1 präzipitiert, um dessen normale Laufweite (theoretisch 47 kD) zu ermitteln. Die beiden rechten Spuren zeigen das Muc18-Immupräzipitat gefärbt mit dem vorher erwähnten fyn-Antikörper, wobei in Höhe von nck keine Banden zu finden sind. Dies ist also eine Spezifitätskontrolle für den nck-Antikörper. Die beiden mittleren Spuren liefern für nicht-stimulierte und stimulierte Mel888 TR1-Zellen eine Koimmunpräzipitation von nck und Muc18. Nach Strippen des Blots und Inkubation mit α -Muc18-AK wurden Muc18-Banden erhalten, welche den Erfolg der Immunpräzipitation dokumentieren (nicht gezeigt). Tatsächlich ist also nck mit Muc18 assoziiert:

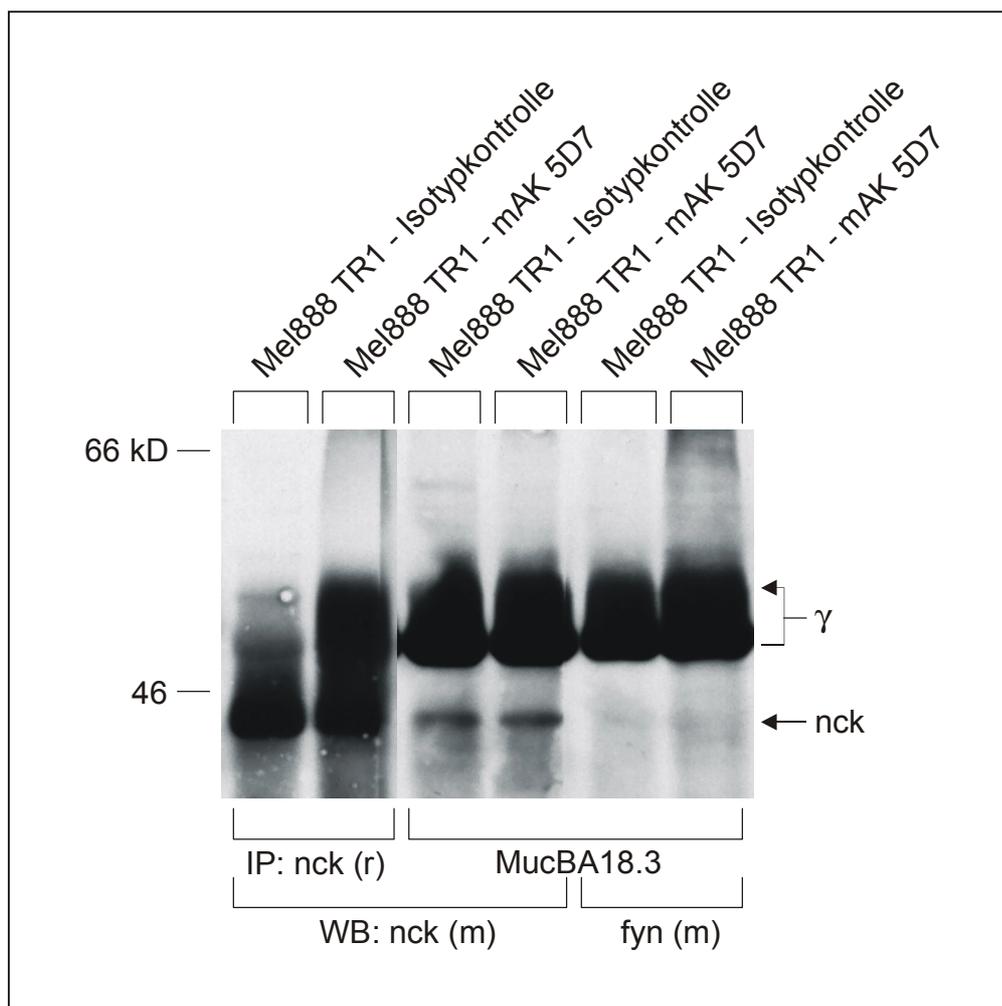


Abb. 24: Western Blot: Koimmunpräzipitation von nck mit Muc18: Immunpräzipitate von nck (Spuren 1, 2) und Muc18 (Spuren 3-6), wobei Spuren 3 und 4 mit nck(m) und Spuren 5 und 6 zur Spezifitäts-Kontrolle mit fyn(m) gefärbt wurden.

Genau wie bei p130Cas findet man also eine Assoziation, die unabhängig von der Stimulation von Muc18 ist. Dass tatsächlich Muc18 vorliegt, über das nck präzipitiert wurde, zeigt Abb. 25. Hier wurden die beiden Spuren mit Isotypkontrolle stimulierter Zellen aus dem gleichen Ansatz auf das Gel aufgetragen, genau wie die beiden Spuren mit 5D7-Stimulation, d. h. wenn Muc18 präzipitiert wird, kommt nck mit. Die nicht weiter aufgetrennte Bande über der schweren Kette γ auf den beiden linken Spuren ist ein Protein, welches gelegentlich in der Präzipitation von Muc18 auftaucht, da es aus einer Kreuzreaktivität des Antikörpers MucBA18.3 stammt.

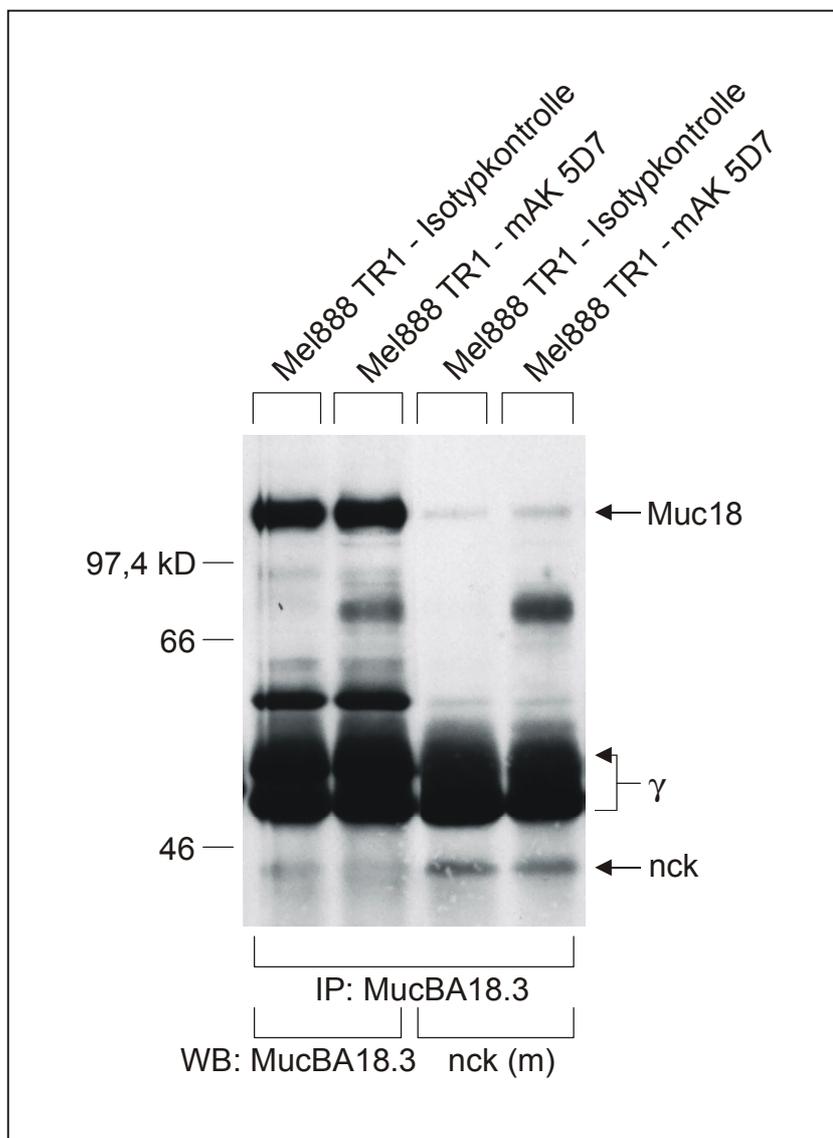


Abb. 25: Western Blot: Koimmunpräzipitation von nck mit Muc18:
Immunpräzipitate von Muc18 mit α -nck-AK bzw. α -Muc18-AK
gefärbt. [γ : schwere Kette des Präzipitationsantikörpers]

5.6 Zusammenfassung der Versuche zu Phosphorylierung und Koimmunpräzipitation

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass von den getesteten Signalwegproteinen bei diesen Bedingungen pCas130/p105CasL und neck in verschiedenen Zelllinien Muc18-spezifisch mitpräzipitiert werden können. Die Wechselwirkung ist dabei von der Muc18-Kreuzvernetzung unabhängig.

Nach Kreuzvernetzung von Muc18 werden mehrere neu phosphorylierte Proteine im Zelllysat detektiert. Von diesen Molekülen sind bis jetzt nur p130Cas/p105CasL identifiziert.

Fak, fyn und Paxillin dagegen werden nicht in Abhängigkeit von Muc18 phosphoryliert und auch nicht mit Muc18 koimmunpräzipitiert.

5.7 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Kreuzvernetzung von Muc18

Eine weitere Möglichkeit Signalpartner eines Zelloberflächenmoleküles zu ermitteln, ist die Suche nach im Zellkern aktivierten Proteinen. Bei diesen sehr weit stromabwärts im Signalweg gelegenen Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Um die beteiligten Proteine zu identifizieren, bedient man sich einer Methode aus der Promotoranalyse. In die zu testenden Zellen werden Reporterkonstrukte mit verschiedenen responsiven Elementen transfiziert, welche vor ein Reporterogen, in diesem Falle die Luziferase, kloniert sind. Kreuzvernetzt man nun mit α -Muc18-Antikörper und einem 2. Antikörper (GoMIg), so werden zunächst bestimmte Proteine im Zytosol phosphoryliert und dann vermutlich das Signal in den Zellkern weitergegeben. Falls dann genau der Faktor aktiviert wird, für den das passende Reporterkonstrukt in den Zellen vorliegt, ist der Weg geschlossen und die Luziferase wird abgelesen. Dies bedeutet, dass die Luziferase-Expression bei α -Muc18-Kreuzvernetzung im Vergleich zum Isotypkontroll-Antikörper verstärkt wird, wenn ein kommunizierendes Plasmid in den transfizierten Zellen vorliegt. Wenn ein Konstrukt transfiziert wurde, welches kein mit Muc18 wechselwirkendes Element trägt, dann erhält man keinen Unterschied in der Luziferase-Expression nach Stimulation mit α -Muc18-Antikörper bzw. Isotypkontrollantikörper. Als Positivkontrolle dient eine Behandlung der Zellen mit PMA, welches die Proteinkinase C kurzschließt und so sehr viele Transkriptionsfaktoren aktiviert. Auf diese Weise wurden zahlreiche Konstrukte mit responsiven Elementen getestet.

5.7.1 cAMP-responsives Element (CRE)

Nach Transfektion eines Konstrukts mit einem in vier Tandem-Wiederholungen enthaltenen CRE-Element vor einem schwachen Promotor, erhält man nach Kreuzvernetzung von Mel888 TR1 mit mAK 5D7 eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Luziferase-Expression gegenüber dem Isotypkontroll-AK (mehrmals wiederholt). Dies ist exemplarisch in Abb. 26 gezeigt. Wählt man dagegen die Muc18-negative Zelllinie Mel888 zur Stimulation, so erfolgt kein Anstieg. Dies dient zusammen mit der Isotypkontrolle 141-11 als Spezifitätskontrolle, d. h. als Beweis, dass tatsächlich über Muc18 aktiviert wurde. Die beiden PMA-Werte zeigen ebenfalls eine Erhöhung, und das Kontrollplasmid ohne Insert, pCIS-CK, zeigte bei Muc18-Kreuzvernetzung keinen Anstieg.

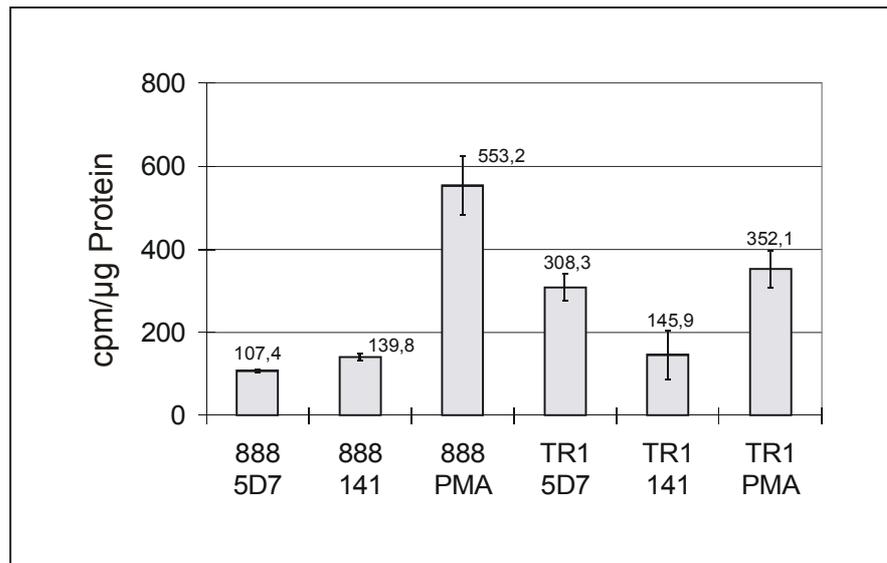


Abb. 26: Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Mel888 (*Muc18*-negativ) und Mel888 TR1 (*Muc18*-positiv) mit pCRE-Luc und Kreuzvernetzung mit mAK 5D7, 141-11 (Isotypkontrolle) und α MIg oder Stimulation mit PMA. Die Messwerte in cpm (counts per minute)/ μ g Protein wurden in unabhängig transfizierten Triplikaten nach 24 h Stimulation ermittelt. Der zugehörige Vektor ohne Insert, pCIS-CK, zeigte keine Reaktion auf Kreuzvernetzung von *Muc18* (nicht gezeigt).

Da also mit der Transfektion von pCRE-Luc bei der *Muc18*-positiven Zelllinie eine verstärkte Luziferase-Expression nach Stimulation mit 5D7 erhalten wurde, kann man davon ausgehen, dass *Muc18* möglicherweise tatsächlich stromabwärts ein CRE-bindendes Protein aktiviert.

5.7.2 pIC277 Δ AP2, ein Konstrukt aus dem ICAM-1-Promotor

Als nächstes wurde ein Konstrukt (Abb. 27) aus dem ICAM-1-Promotor, welches u. a. zwei potentielle NF- κ B- und AP1-, sowie SP1-responsive Elemente enthält, transfiziert. Sowohl für den α -*Muc18*-Antikörper 5D7, als auch für mAK *Muc18* konnte ein Anstieg der Luziferase-Expression bei der *Muc18*-positiven Zelllinie Mel888 TR1 beobachtet werden. Diese Erhöhung lag stets bei etwa 2–3-fachem Wert. Auch MelJuSo, eine natürlich *Muc18*-exprimierende Zelllinie zeigt das gleiche Ergebnis (nicht gezeigt). Die beiden Isotypkontrollantikörper 141-11 und UPC10 liefern den Grundwert der Lichtemission für unstimulierte Zellen. Außerdem zeigen die PMA-Werte (Abb. 27: oben: Mel888 51,8; Mel888 TR1 146,3; unten: Mel888 36,1; Mel888 TR1 39,8 cpm/ μ g Protein) den Erfolg der Transfektion an. Für Mel888 erhält man wiederum keinen Anstieg der Luziferase-Expression, was auf ein *Muc18*-spezifisches Signal hindeutet.

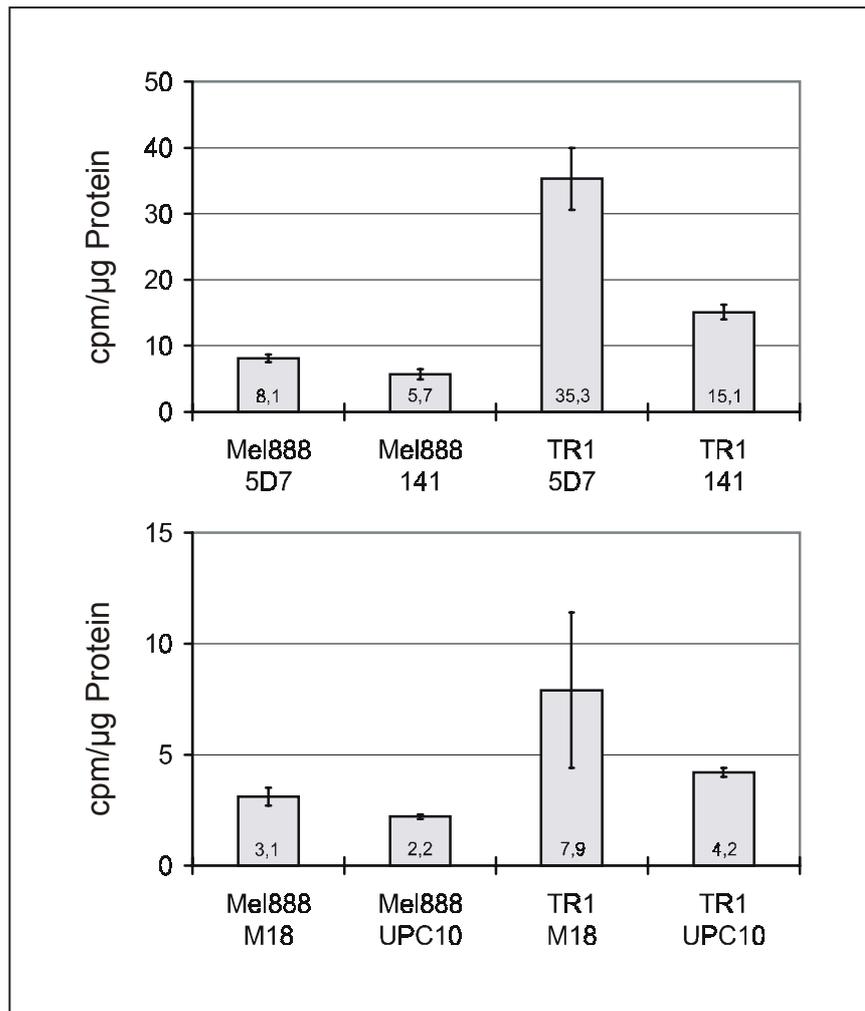


Abb. 27: Luziferase-Aktivität der Zelllinien Mel888 und Mel888 TR1 nach Transfektion von pIC277ΔAP2 und 24h Kreuzvernetzung mit den α -Muc18-AK 5D7 und Muc18, sowie den Isotypkontroll-AK 141-11 und UPC10 und 2. AK G α Mlg.

Im Plasmid pIC277ΔAP2 scheint also ein responsives Element vorhanden zu sein, welches mit Muc18-aktivierten Signalpartnern wechselwirken kann.

Anschließend wurden weitere Kontrollen zur Stimulation von Zellen im Luziferase-Assay mit verschiedenen anderen Antikörpern gegen Zelloberflächenproteine durchgeführt.

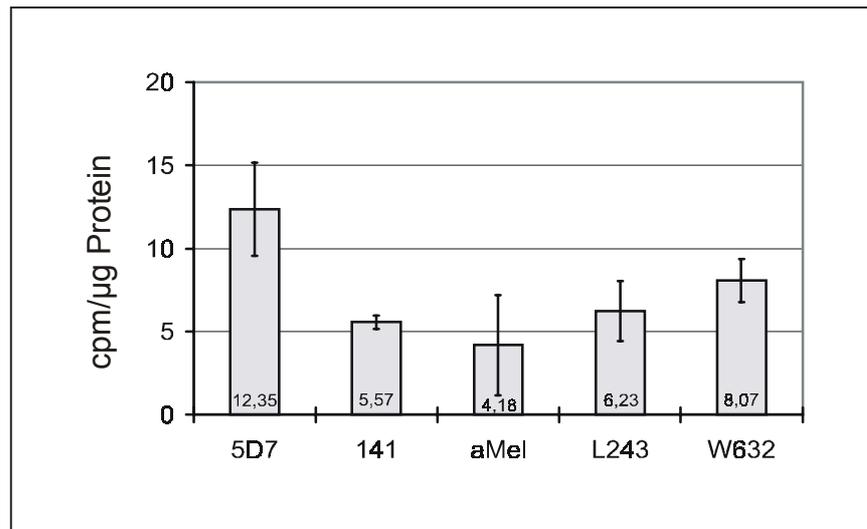


Abb. 28: Luziferase-Aktivität: Austesten verschiedener Kreuzvernetzungsantikörper nach Transfektion von pIC277 Δ AP2 in Mel888 TR1.

Wie in Abb. 28 zu sehen ist, zeigte die Kreuzvernetzung mit α -Melanom-Antikörper (gegen Proteoglykan) und L243 (HLA Klasse II) Luziferase-Aktivität ähnlich zur Isotypkontrolle von 5D7. Die Kreuzvernetzung von W6/32 (HLA Klasse I) stimuliert das ICAM-Promotor-Konstrukt deutlich. Dies ist nicht verwunderlich, da Signalübermittlung über Klasse I-Proteine bereits bekannt ist. Wie schon zuvor gesehen, verdoppelt 5D7 in etwa den Luziferase-Wert von 141-11. Der Messwert für die Stimulation mit PMA betrug hier 138 cpm/ μ g Protein (nicht gezeigt). Wie also zu sehen ist, führt die Kreuzvernetzung von Oberflächenproteinen nicht per se zu einer Verstärkung der Luziferase-Expression.

5.7.3 Ermittlung des responsiven Elements aus dem ICAM-1-Promotor

Wie in Kapitel 5.7.2 gezeigt, erhält man nach Transfektion von pIC277 Δ AP2 eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität bei Muc18-Stimulation. Darum wurde als nächstes versucht, genauer festzustellen, welches Element aus dem Promotor dafür verantwortlich ist. Zuerst wurden weitere Luziferase-Assays durchgeführt, wobei sukzessiv verkürzte Konstrukte verwendet wurden. Daraus wurde bereits ein Hinweis auf das beteiligte responsive Element erhalten. Weitere Versuche mit Deletionskonstrukten und einem mutierten Konstrukt lieferten noch deutlichere Hinweise. Insgesamt wurden folgende Teile des ICAM-1-Promoters benützt (Abb. 29). Die Transfektion von pIC277 und pIC189 in Mel888 TR1 zeigte bei Muc18-

Kreuzvernetzung einen jeweils 2-fachen Anstieg der Luziferase-Expression, bei pIC135 nur 1,1-fach. Das Konstrukt pIC277 Δ SMA lieferte einen 1,6-fach erhöhten Wert, pIC277 Δ AP2 ließ die Expression um das 2,2-fache ansteigen und pIC277 Δ AP2NF κ BMut nur 1,2-fach.

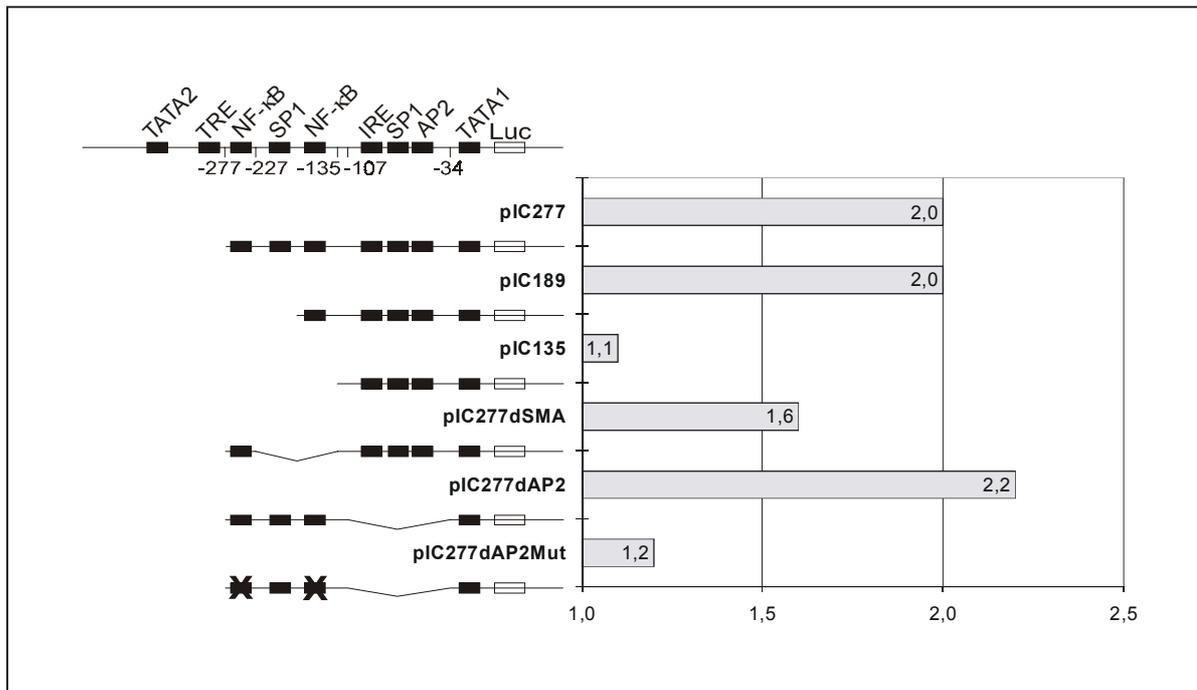


Abb. 29: Konstrukte des ICAM-1-Promotors, die zur Ermittlung eines mit Muc18 korrespondierenden responsiven Elements benützt wurden, mit den entsprechenden durchschnittlichen Anstiegswerten cpm/ μ g Protein (5D7):cpm/ μ g Protein (141-11) in der Zelllinie Mel888 TR1. Zur Ermittlung des Anstiegs der Luziferase-Expression wurden mehrere voneinander unabhängig ermittelte Messwerte benutzt.

Wie aus den Abb. 29 zu sehen ist, kann eine im Vergleich zur Isotypkontrolle gesteigerte Luziferase-Aktivität für die Konstrukte pIC277, pIC189, pIC277 Δ SMA und pIC277 Δ AP2 beobachtet werden. Für pIC135 und pIC277 Δ AP2NF κ BMut dagegen liegt das Niveau der Luziferase-Expression auf dem der Isotypkontrolle. Dies bedeutet, dass im Bereich zwischen -277 und -135 des ICAM-1-Promotors eine Sequenz liegen muss, die von einem Muc18-vermittelten Signalpartner erkannt wird. Die Aktivität geht verloren, wenn die beiden potentiell NF- κ B-responsiven Elemente mutiert werden (GGAGCAGCCC zu CTAGCAGCCC und TGGAAATTCC zu TCTGAATTCC). Dies ist ein Hinweis auf eine wahrscheinliche Beteiligung des NF- κ B-responsiven Elements am Signalweg von Muc18. Im

Folgenden sei noch die Sequenz dargestellt, um die Lage der NF- κ B-responsiven Elemente zu verdeutlichen:

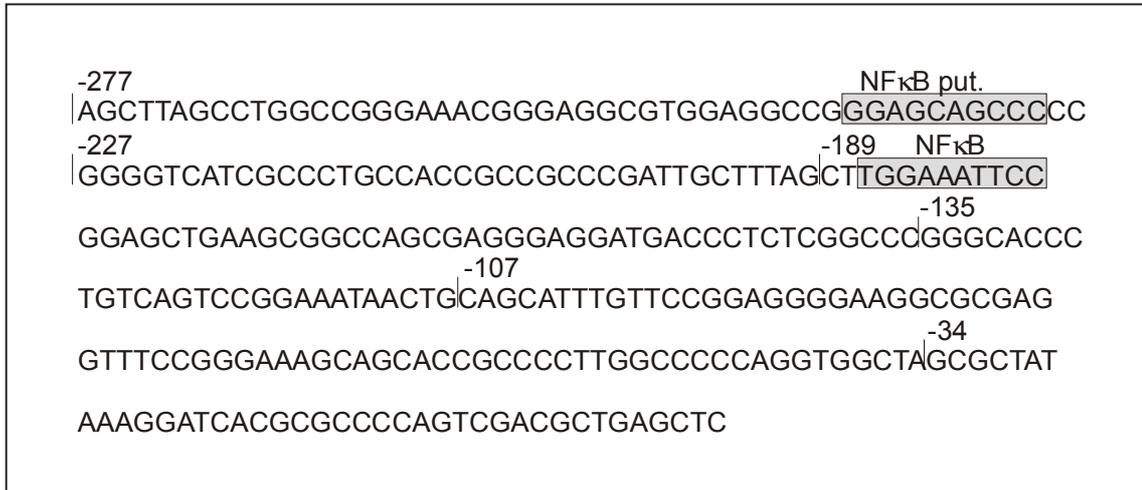


Abb. 30: Sequenz der Konstrukte aus dem ICAM-1-Promotor mit den NF κ B-Elementen

5.7.4 Weitere getestete Konstrukte

Um mögliche andere Interaktionspartner von Muc18 zu identifizieren, wurden weitere Konstrukte im Luziferase-Assay getestet. Plasmide, die keinen Anstieg der Luziferase-Expression bei Behandlung mit 5D7 zeigten, waren u. a. pAP1-Luc und p53-Luc. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass AP1 und p53 am Muc18-Signalweg beteiligt sind. Außerdem zeigte auch ein STAT3-Konstrukt kein positives Ergebnis, d. h. auch dieses nimmt anscheinend nicht teil. Auch für EGR-1 konnte keine Wechselwirkung nachgewiesen werden, da pEGR-1 keine erhöhte Luziferase-Expression nach Stimulation der Zellen zeigte.

6. Diskussion

Muc18/MCAM/CD146 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (Lehmann et al. , 1989) und ist verwandt mit anderen Zelladhäsionsmolekülen dieser Familie, wie BEN/SC1/DM-GRASP/ALCAM und Gicerin/HEMCAM (Vainio et al. , 1996; Pourquie et al., 1992). Es enthält fünf immunglobulin-artige Domänen, eine Transmembranregion und einen zytoplasmatischen Rest von 63 Aminosäuren mit 5 potentiellen Phosphorylierungsstellen an Serin und Threonin, sowie einen Tyrosinrest an Position 641. Außerdem liegen neun potentielle N-Glykosylierungsstellen vor. Das Molekulargewicht von 113 kD beträgt nach Verdau der Glykosylreste 65 kD (Lehmann et al. , 1989), das bedeutet, Muc18 ist hochgradig glykosyliert. Muc18 vermittelt Zelladhäsion unabhängig von Kationen, welche aber Temperatur-abhängig ist. Außerdem ist die Adhäsion durch Muc18 homotypisch und heterophil (Johnson et al. , 1997; Shih et al. , 1997); das bedeutet, Muc18 reagiert mit einem, allerdings noch nicht identifizierten, Liganden.

Da für andere Zelladhäsionsmoleküle bekannt ist, dass sie ein Initiator von Signalwegen sind, konnte auch für Muc18 eine mögliche Beteiligung an der Signalübermittlung postuliert werden. Es fällt auf, dass der zytoplasmatische Schwanz von Muc18 zu 92% identisch mit dem murinen Muc18 ist, also hoch konserviert, obwohl das gesamte Protein nur 75% Identität besitzt. Trotz Vermittlung von Adhäsion durch den extrazellulären Teil deutet die hohe Konservierung des zytoplasmatischen Restes auf eine wichtige Funktion hin, nämlich die der Signalübermittlung.

Zelladhäsionsmoleküle dienen nicht nur zum Erhalt von zellulären Verbänden und der Organstruktur, sondern können auch Signale von außen nach innen in die Zelle geben. Ein Beispiel hierfür sind die Integrine (Schlaepfer und Hunter, 1998). Wenn man vermutet, dass ein Zelladhäsionsmolekül an einer Signalinitiation beteiligt ist, kann man dies durch Ligand-Bindung untersuchen oder durch Imitation der Bindung mit einem Antikörper gegen den Rezeptor. Dies wurde z. B. gezeigt für L-Selektin, das bei Bindung an den entsprechenden Antikörper sowohl Adhäsion als auch Signalübermittlung auslöst (Steeber et al. , 1997). Es ist

bereits bekannt, dass Muc18 einen Liganden besitzt (Johnson et al. , 1997). Da man aber noch nicht weiß, um welches Molekül es sich handelt, muss man Antikörper zur Ermittlung des Signalweges benutzen. Die verwendeten Antikörper sind monoklonal und werden mit einem zweiten, gegen den ersten gerichteten, Antikörper kreuzvernetzt. Dadurch werden die meisten Rezeptoren aktiviert, da dies der natürlichen Situation, der Bindung des Liganden, vergleichbar ist. So können dann direkt im Signalkomplex vorliegende oder weiter stromabwärts gelegene Moleküle identifiziert werden. Wie von Levine et al. (1996) gezeigt, gehen zahlreiche Proteine in T-Zellen bei Aktivierung mit den verschiedensten Antikörpern gegen Oberflächenproteine eine Tyrosinphosphorylierung ein und manche Antikörper führen auch zum Calcium-Einstrom in das Zytosol. Dies bedeutet, eine Imitation von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ist mittels Antikörpern möglich.

Um mögliche Signalwege in Gang zu setzen, wurde dazu Muc18 mit monoklonalen α -Muc18-Antikörpern kreuzvernetzt. Diese mussten vorher ausgesucht werden. Aus Adhäsionsassays waren drei mAK bekannt, welche die Adhäsion verstärken. Dies sind MAd 5D7, 1B4 und 6A8. Western Blots zeigten, dass die mAK Muc18, MucBA18.3, MucBA18.4 und 1B4 das native Muc18 und die mAK Muc18, MucBA18.3, MucBA18.4 und 5D7 das denaturierte Muc18 gut erkennen (Abb. 3). Deshalb wurden für die im folgenden ausgeführten Versuche zur Kreuzvernetzung 5D7, 1B4 und Muc18 ausgesucht. Zur Immunpräzipitation kann man neben MucBA18.3 auch Muc18 benutzen. Ein Problem hierbei war, dass der α -Muc18-Kreuzvernetzungsantikörper extrazytoplasmatisch an Muc18 bindet und anschließend bei Immun- bzw. Koimmunpräzipitationsversuchen bei Benutzung des ebenfalls extrazytoplasmatisch bindenden Muc18 ein Konflikt vermutet wurde. Auch die Verwendung von MucBA18.3 zur Präzipitation barg die Gefahr der Zerstörung des potentiellen intrazytoplasmatischen Signalkomplexes. Als Blotting-AK eignet sich in jedem Falle MucBA18.3 am besten.

Ein Zeichen für Signalübermittlung ist Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol. Der in der Zelle normalerweise niedrig gehaltene Calcium-Gehalt steigt sprunghaft an, wenn über eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung entstandenes Inositol-1,4,5-triphosphat ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) an die entsprechenden Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum bindet (Berridge et al. , 1998). Das Calcium im Zytosol beeinflusst nun eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle. Bei vielen Rezeptoren, wie z. B. dem T-Zell-Rezeptor, führt die Kreuzvernetzung zum Calcium-

Einstrom. Im Falle von Muc18 konnte kein Calcium-Einstrom gemessen werden, obwohl eine Vielzahl an mAKs, sowie auch verschiedene Zelltypen getestet wurden.

Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Es ist möglich, dass Muc18 tatsächlich keinen Calcium-Einstrom verursachen kann, d. h. Muc18 schaltet zwar Signalwege an, aber es ist kein stromabwärts gelegener Signalpartner wie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ dabei, der eine Quervernetzung der Signalkaskade zu Calcium-abhängigen Wegen verursacht. Eine andere Möglichkeit ist, dass die benutzten α -Muc18-Kreuzvernetzungsantikörper 5D7, 1B4, 6A8, Muc18, MucBA18.3 und MucBA18.4 nicht in der Lage sind, den Signalweg komplett in Gang zu setzen. Dies gilt auf jeden Fall für MucBA18.3, der hier nur als zusätzliche Kontrolle benützt wurde, da er intrazytoplasmatisch an Muc18 bindet und somit von außen eine intakte Zelle überhaupt nicht aktivieren kann. Die α -Muc18-Antikörper, die extrazellulär binden, initiieren ein Signal (s. 5.3.2). Ein Kreuzvernetzungsantikörper muss, wenn er einen Signalweg über seinen Rezeptor aktivieren soll, den Liganden imitieren. Dabei ist offensichtlich, dass die Fähigkeit zu einer solchen dreidimensionalen Anordnung von der Bindungsstelle des Antikörpers abhängt. Daher ist nicht jeder Antikörper geeignet, den Signalweg vollständig zu initiieren, da vielleicht ein Teil der Interaktionen im Zellinneren durch die dreidimensionale Anordnung von Rezeptor und Antikörper noch möglich ist, andere aber nicht. Antikörper können Tyrosinphosphorylierung anregen, ohne jedoch Calcium-Einstrom zu verursachen, wohingegen umgekehrt Calcium-Einstrom ohne Detektion von Phosphorylierung nicht möglich ist (Levine et al., 1996). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Calcium-Einstrom könnte auch sein, dass dieser so rasch erfolgt, dass eine Verfolgung desselben nicht möglich ist. Der Zugabe des Antikörpers während der Messung erfolgt manuell, dies verursacht eine Limitation der Zusatzgeschwindigkeit. Dagegen spricht aber der Erfolg bei der Kreuzvernetzung von CD3 auf T-Zellen.

6.1 Partielle Identifizierung des Muc18-Signalweges

Wenn ein Ligand auf seinen zugehörigen Rezeptor trifft, induziert er einen Signalweg. Die Konformation des Rezeptors kann sich dabei ändern, er multimerisiert eventuell und es werden im Zellinneren andere Proteine rekrutiert, die mit dem zytoplasmatischen Teil des Transmembranproteins in Wechselwirkung treten. Dies ist der Beginn einer Signalkaskade, die bis in den Zellkern wirken kann. Diese Situation kann mit Antikörpern gegen den Rezeptor imitiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Kreuzvernetzung von β_2 -Integrinen, welche ebenfalls wie Muc18 Zelladhäsionsmoleküle sind, auf Neutrophilen, welche zum Erscheinen einer Reihe neu phosphorylierter Proteine führt (Zheng et al. , 1996).

Bei der Kreuzvernetzung von Muc18 wurden auf verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen α -Muc18-Antikörpern tatsächlich mehrere neu phosphorylierte Proteine mittels Western Blot detektiert. Eines lag dabei im Bereich um 50 kD, eine Ansammlung von mehreren Banden bei 70-90 kD; außerdem tauchten noch höhermolekulare Phosphorproteine um 128 bzw. 146 kD auf.

Das bedeutet, Muc18 ist tatsächlich der Initiator einer Signalkette und es treten nach Kreuzvernetzung andere Proteine in einem Signalkomplex mit Muc18 in Kontakt.

Da man nun wusste, dass Muc18 wirklich am Anfang eines Signalwegs steht, war der nächste Schritt der Versuch, diese stromabwärts gelegenen Signalpartner zu identifizieren. Für andere Zelladhäsionsmoleküle, wie z. B. die Integrine, ist dieser Bereich der Signalkette schon teilweise aufgeklärt. In Abb. 31 ist der Integrinsignalweg schematisch dargestellt:

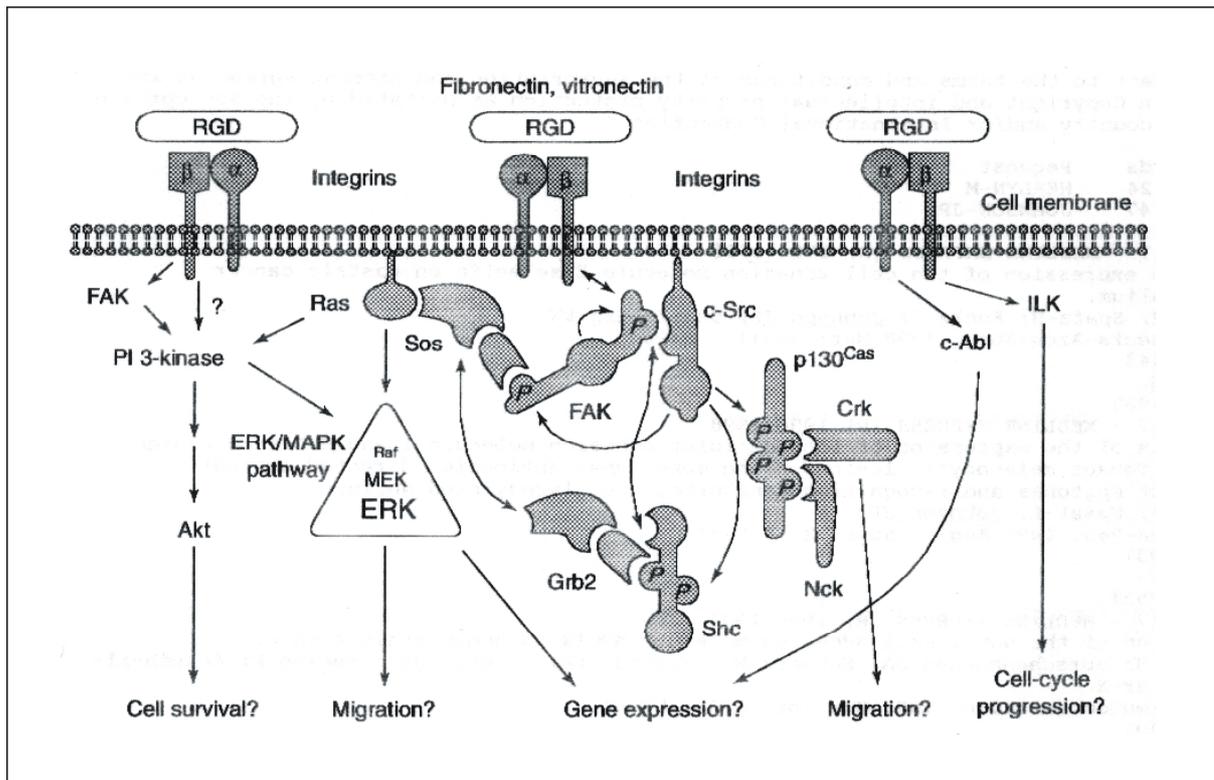


Abb. 31: Modell von Integrin-Signalwegen (Schlaepfer und Hunter, 1998)

Die zentrale Rolle im Integrinsignalweg nimmt fak („focal adhesion kinase“) ein, welche in den sog. „fokalen Kontakten“ („focal adhesions“) vorkommt. Dies sind die Stellen, an denen die Integrine nach Bindung an die extrazelluläre Matrix über Adapterproteine mit den Aktinfilamenten assoziieren. Das Signal wird von fak an eine Reihe von Adapterproteinen weitergeleitet. Zunächst fällt die Beteiligung von src-Tyrosinkinase-assoziierten Proteinen auf, wie z. B. p130Cas, crk und nck. Wird das Integrin durch Liganden wie Fibronectin oder Vitronectin stimuliert, so geht fak eine Autophosphorylierung an Tyr397 ein. Dort kann nun die SH2-Domäne von c-src binden und die src-Familie-Proteintyrosinkinasen (src-PTKs) rekrutieren. Dies führt zu verstärkter Phosphorylierung von fak an anderen Stellen, wie z. B. Tyr925. Sind nun fak und src-PTKs aktiviert, kann das auch shc-Tyrosinphosphorylierung unterstützen, was wiederum zur Bindung von Grb2 an shc an Tyr317 führt. Die Bindung von Grb2 unterstützt die Translokation des GDP-GTP-Austauschproteins sos an die Plasmamembran und führt zu verstärktem GTP-Austausch an ras. Die Aktivierung der ERK Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade ist ein Ziel von GTP-gebundenem ras. Die Assoziation von src-PTKs mit fak führt auch zur Bindung und Tyrosinphosphorylierung von p130Cas. Crk und nck binden an p130Cas, was zur verstärkten Zellmigration durch die

Aktivierung von Signalwegen wie rac-GTPase oder der JNK-MAP-Kinase-Kaskade führen könnte. Weitere Integrin-stimulierte Wege beinhalten die c-Abl PTK und die ILK Protein-Serin/Threoninkinase, welche sowohl Genexpression als auch Zellzyklusprogression beeinflussen könnten.

Die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen spielt in der Regulation von vielen biologischen Vorgängen, wie z. B. Zellproliferation, Migration, Differentiation und Überleben, eine entscheidende Rolle (Thomas und Brugge, 1997). Die Proteintyrosinkinase, die diese Aufgaben ausführen, gehören zu verschiedenen Familien. Ebenfalls gibt es zahlreiche Rezeptoren, welche die verschiedenen Wege aktivieren. Zusätzlich wird die Aufklärung der Signalwege durch die zahlreichen Querverbindungen kompliziert. Eine bekannte Familie von zytoplasmatischen Tyrosinkinase, die mit einer großen Zahl von verschiedenen Rezeptoren kommunizieren können, ist die src-Proteintyrosinkinase-Familie (src-PTKs). Src selbst wurde zuerst als das transformierende Protein (v-src) des oncogenen Retrovirus Rous-Sarcoma-Virus (RSV) identifiziert (Brugge und Erikson, 1977; Purchio et al. , 1978). v-src ist eine mutierte Variante des zellulären Proteins, welches ubiquitär exprimiert und hochkonserviert während der Evolution ist (Stehelin et al. , 1976; Brown and Cooper, 1996). Src besitzt Proteintyrosinkinaseaktivität. Auf der Suche nach verwandten Proteinkinasen fand man weitere Proteine mit strukturellen Ähnlichkeiten, sowie signifikanter Sequenzhomologie mit src: fyn, yes, yrk, blk, fgr, hck, lck, lyn, frk/rak und iyk/bsk (Cance et al. , 1994; Lee et al., 1994; Thuveson et al. , 1995; Oberg-Welsh und Welsh, 1995; Brown and Cooper, 1996). Alle diese Enzyme regulieren viele zelluläre Vorgänge, wie Zellproliferation, Differentiation, Überleben, Adhäsion und Migration. Dieses breite Spektrum an Aktivitäten ergibt sich aus der Fähigkeit mit vielen verschiedenen Rezeptorklassen zu koppeln. Src-PTKs sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 52 bis 62 kD und besitzen sechs charakteristische Regionen. Neben der src-Homologie-Domäne (SH) 4, eine „unique region“, eine SH3-Domäne und eine SH2-Domäne, sowie eine katalytische Domäne und einen kurzen negativ regulatorischen Schwanz. Die SH4-Domäne enthält Signale für die Lipidmodifikation von src-PTKs, was dazu dient, die PTKs in den Zellmembranen zu verankern. Die SH3-Domäne bindet an kurze Prolin-reiche Sequenzen (P-X-X-P). Hier interagieren z. B. p68Sam, p85 Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI-3-K) und Paxillin. SH2-Domänen dagegen binden an kurze Aminosäuresequenzen mit Phosphotyrosin. Die Spezifität hängt dabei von den 3-5 folgenden Aminosäuren ab. Die Src-PTKs bevorzugen hierbei ein Leucin an der Position +3. Mit der

SH2-Domäne interagieren Proteine wie fak („focal adhesion kinase“), p130Cas („crk-associated substrate“), p85 PI 3-K und p68Sam.

Um zu testen, ob auch bei Muc18 Proteine aus dem Integrinsignalweg an der Signalkette beteiligt sind, wurden p130Cas/p105casL, Paxillin, fak und nck, und die src-Proteintyrosinkinase fyn auf ihren Phosphorylierungsstatus nach Muc18-Kreuzvernetzung untersucht, sowie auf deren direkte oder indirekte Assoziation mit Muc18. Wie in den Abb. 14-16 zu erkennen ist, konnte für p130Cas (130 kD) und p105CasL (105 kD), ein kreuzreagierendes Protein des Antikörpers, eine Tyrosinphosphorylierung nach Muc18-Kreuzvernetzung detektiert werden. Fak (125 kD) und fyn (59 kD) zeigten keine Phosphorylierung und nck (47 kD) konnte nicht detektiert werden, da die schwere Kette des α -Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10 mit nck überlappte. Muc18 wurde ebenfalls daraufhin untersucht, ob es selbst phosphoryliert wird. Die Abb. 8A und 8B zeigen jedoch, dass es weder nicht kreuzvernetzt noch kreuzvernetzt phosphoryliert ist, obwohl es an Position 641 intrazytoplasmatisch einen Tyrosinrest besitzt, der eine Phosphorylierung ermöglichen würde. Hierbei ist zu beachten, dass der zur Detektion benützte α -pTyr-AK zur Bindung des Phosphotyrosins stets eine flankierende Aminosäure-Erkennungssequenz um das pTyr benötigt. Es können also falsch negative Ergebnisse vorkommen, wenn eine Tyrosinphosphorylierung vorliegt, aber die umliegende Sequenz nicht vom Antikörper erkannt wird. Da bei der Signalübermittlung die Signalpartner für eine gewisse Zeit in direkten oder indirekten Kontakt treten, also miteinander in einer nicht-chemischen Wechselwirkung sind, ist es bei geeigneten Versuchsbedingungen möglich, diese biochemische Kommunikation mittels Koimmunpräzipitation zu detektieren. Das bedeutet, man präzipitiert nach der Aktivierung des Rezeptors das entsprechende Signalwegmolekül und färbt im Western Blot gegen ein anderes Signalprotein, welches vermutlich mit dem ersten in Kontakt steht. Wenn die Proteine tatsächlich kommunizieren, kann man den jeweiligen Partner finden. Dies wurde z. B. gezeigt für p130Cas, welches in Rattenembryofibroblasten bei Integrin-vermittelter Adhäsion mit crk direkt assoziiert ist (Vuori et al. , 1996). Im Falle von Muc18 wurden mittels Koimmunpräzipitation p130Cas/p105CasL und nck unabhängig von der Kreuzvernetzung von Muc18 in Assoziation mit Muc18 gefunden; fak, fyn und Paxillin wurden nicht kopräzipitiert (Abb. 17-25). Dabei muss man aber auch bedenken, dass positive Ergebnisse bei der Koimmunpräzipitation als richtig betrachtet werden können, aber negative Ergebnisse ein Artefakt der

Versuchsbedingungen sein können, also falsch negativ. Die Koimmunpräzipitation ist stark vom verwendeten Detergenz abhängig, d. h. man kann ein Protein nur dann mit präzipitieren, wenn dieses den Signalkomplex stabilisiert. Außerdem kann ein eventuell vorhandener größerer Proteinkomplex, der mehrere Signalpartner für eine gewisse Zeit vereint, während eines Detektionsschrittes zerfallen, so dass immer nur bestimmte Proteine ermittelt werden können.

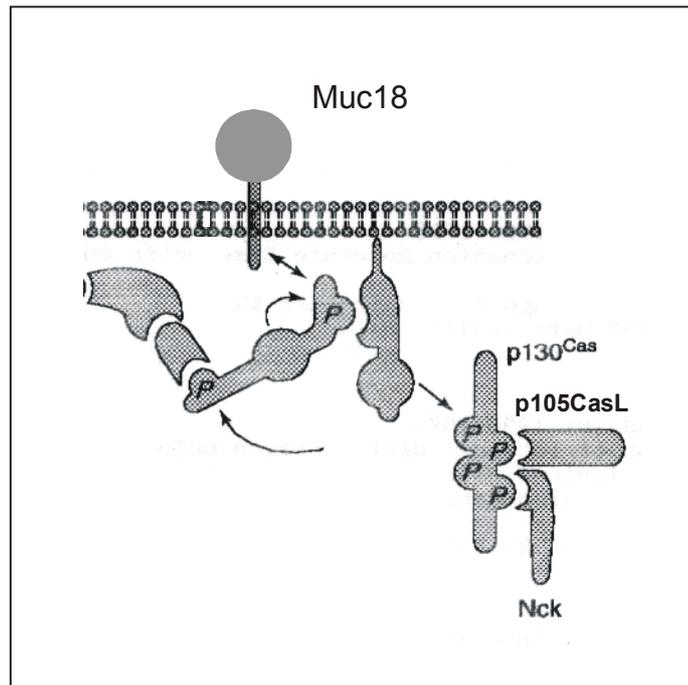


Abb. 32: Graphische Darstellung des um Muc18 ermittelten Signalkomplexes.

Offensichtlich treten also p130Cas und p105CasL im Signalkomplex von Muc18 auf. p130Cas ist ein sehr interessantes Signalwegprotein. Es wurde ursprünglich als ein hochgradig Tyrosin-phosphoryliertes Protein identifiziert, welches während der Transformation durch die Onkogene v-src und v-crk auftritt (Kanner et al. , 1991; Matsuda et al. , 1990). Man findet es in den sog. „Focal Adhesions“ und es assoziiert mit phosphoryliertem fak in vivo (Harte et al. , 1996), wobei die SH3-Domäne an eine prolinreiche Sequenz in fak an dessen C-Terminus bindet. Wie vorher schon erwähnt, kann p130Cas mit der SH2-Domäne von src-PTKs interagieren, was es als typisches Adapterprotein auszeichnet. P105CasL ist ein p130Cas sehr ähnliches „docking protein“, da es eine SH3-Domäne gefolgt von 13 Tyr-X-X-P-Motiven enthält, an die SH3-Domänen

binden können. Sowohl p105CasL als auch p130Cas können fak über ihre SH3-Domänen binden (Kanda et al. , 1997). Muc18 ist im natürlich Muc18-exprimierenden Melanom, im Muc18-transfizierten Melanom und im Karzinom mit p130Cas/p105CasL assoziiert, wie durch Koimmunpräzipitation ermittelt werden konnte. Die Kreuzvernetzung hat darauf keinen Einfluss. Aber nach Muc18-Kreuzvernetzung liegen p130Cas/p105CasL phosphoryliert vor. Anscheinend sind p130Cas/p105CasL dauerhaft mit Muc18 in Kontakt, werden aber nur bei dessen Kreuzvernetzung phosphoryliert. Dies ist ungewöhnlich, da z. B. im Integrin-Signalweg p130Cas erst nach Aktivierung über fak rekrutiert wird (Schlaepfer und Hunter, 1998). Vielleicht befinden sich die getesteten Melanomzelllinien in einer Art dauernder Aktivierung, da sie Muc18-Ligand-tragende Zellen sind und so ebenfalls aktiviert sein können. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass p130Cas auch in der Karzinomzelllinie HeLa über Muc18 unabhängig von dessen Kreuzvernetzung präzipitiert werden konnte; und Karzinomzellen sind Ligand-negativ. Wie die Wechselwirkung mit Muc18 tatsächlich erfolgt, bleibt jedoch unklar. Muc18 besitzt weder eine SH2-Akzeptorstelle noch eine SH3-Konsensussequenz. Damit ist der Kontakt mit p130Cas/p105CasL wahrscheinlich indirekt. Es müssen noch andere Moleküle im Signalkomplex vorliegen, welche die Kommunikation zwischen Muc18 und p130Cas/p105CasL ermöglichen.

Das Adapterprotein nck konnte im Falle der Muc18-Kreuzvernetzung mit den gewählten Versuchsbedingungen nicht detektiert werden, da der α -Phosphotyrosinantikörper 4G10 bzw. der zur Detektion verwendete 2. Antikörper R α MIgG+IgM-POX auch die schwere Kette des Präzipitationsantikörpers gegen nck erkennen. Damit kann über eine Phosphorylierung von nck durch Muc18 nicht diskutiert werden. Dagegen wird nck wie p130Cas/p105CasL unabhängig von der Muc18-Kreuzvernetzung mit Muc18 präzipitiert. Nck besitzt eine SH2- und drei SH3-Domänen, die sowohl eine simultane Bindung von mehreren Signalpartnern ermöglichen, als auch eine höhere Bindungsstärke eines Partners mit mehreren Akzeptorstellen. Wie p130Cas ist nck ein Adapterprotein. Weiterhin ist bekannt, dass es über seine SH2-Domäne direkt an aktivierten EGF-R und PDGF-R bindet und in die Aktivierung von ras- und rho-Signalwegen involviert ist (McCarty, 1998). Die Bindung von nck an p130Cas ist bereits aus dem Integrin-Signalweg bekannt. So scheint es auch hier durchaus vernünftig, dass nck stromabwärts von p130Cas im Muc18-Signalweg vorkommt. Aber es ist auch möglich, dass die Assoziation von nck mit Muc18 über andere, unbekannte Vermittler-Proteine stattfindet, da nck als Adapterprotein zahlreiche Möglichkeiten zur Wechselwirkung hat. Somit ist nun eine weitere Komponente des Muc18-Signalwegs identifiziert.

Fak wurde in Melanom- und Karzinomzelllinien nach Muc18-Kreuzvernetzung als nicht phosphoryliert und nicht assoziiert detektiert. Es tritt anscheinend nicht als Signalwegmolekül im Muc18-Signalweg auf. Betrachtet man jedoch den Integrinsignalweg, so liegt fak stromaufwärts von p130Cas; wenn dieses also phosphoryliert ist, so sollte auch von fak eine Tyrosinphosphorylierung und eine Interaktion erwartet werden. Dass dies nicht der Fall ist, kann verschiedene Gründe haben. Wie man in Abb. 15 sieht, besitzt Mel888 TR1, die getestete Melanomzelllinie, und auch andere verwendete Zelllinien wie MelJuSo (nicht gezeigt), relativ wenig fak, d. h. es könnte sein, dass die Menge an phosphoryliertem bzw. gebundenem fak nicht ausreichend ist zur deutlich sichtbaren Detektion. Der Versuch, einfach die Menge an fak durch Auftragen von mehr Präzipitat zu erhöhen, scheiterte daran, dass auf dem Western Blot dann so viele unspezifische Banden auftauchen, die eine Auswertung desselben unmöglich machen. Eine weitere Möglichkeit für das fehlende pfak-Signal könnte sein, dass Muc18 mit einem anderen, noch nicht identifizierten, Signalpartner kommuniziert, der mit p130Cas wechselwirken kann und nicht wie die Integrine fak als erste Kontaktstelle benützt. Bei den Integrinen ist aber auch bekannt, dass fak nicht unbedingt erforderlich für eine Tyrosinphosphorylierung von p130Cas ist, wie in fak^{-/-} Mäusefibroblasten gezeigt wurde (Vuori et al. , 1996). Eventuell übernimmt ein anderes, unbekanntes Protein die Rolle von fak als Mittler zwischen Muc18 und p130Cas/p105CasL.

Auch fyn, eine in vielen Signalwegen vorkommende src-Tyrosinkinase, wurde als nicht phosphoryliert durch Muc18-Kreuzvernetzung detektiert. Man vermutet zunächst, dass es tatsächlich nicht im Signalweg von Muc18 vorkommt, was so natürlich nicht eindeutig auszuschließen ist, da es mit anderen Versuchsbedingungen eventuell doch detektiert werden könnte. Es könnte aber auch sein, dass der Antikörper gegen Phosphotyrosin 4G10 pfyn nicht erkennt. Es bleibt also hier nur zu sagen, dass pfyn mit diesen Versuchsbedingungen nach Muc18-Kreuzvernetzung nicht detektiert werden kann und auch die Koimmunpräzipitation von fyn und Paxillin bleibt ohne Erfolg. Man könnte sich vorstellen, dass fyn über SH2-Domänen mit p130Cas interagiert und Paxillin über die SH3-Domäne von p130Cas gebunden wird. Dies konnte jedoch mit den getesteten Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden.

Für Endothelzellen wurde von Anfosso et al. (1998) ein anderes Bild aufgezeigt. Auch die Aktivierung von Endothelzellen liefert eine Reihe von neu phosphorylierten Proteinen im Zellysate nach Muc18-Kreuzvernetzung. Muc18 selbst wird auch in diesem Fall nicht

phosphoryliert. Allerdings stellte man hier eine Tyrosinphosphorylierung von fak und dessen Assoziation mit Paxillin fest. Muc18 ist nicht direkt mit fak, aber in Abhängigkeit von der Kreuzvernetzung mit fyn assoziiert. Bei Melanomzellen waren weder fak noch fyn assoziiert. Man stellt fest, dass unterschiedliche Interaktionspartner im Muc18-Signalweg bei Melanom- und Endothelzellen detektiert werden. Neben der Möglichkeit, dass in den verschiedenen Zelltypen tatsächlich variierte Signalwege vorkommen, kann es aber auch sein, dass nur die Komponenten des gleichen Signalwegs experimentell verschieden gut identifizierbar sind. Es wurden z. B. unterschiedliche Kreuzvernetzungsantikörper benützt. Wie vorher schon erwähnt, hängt die Aktivierung des Signalwegs stark vom Liganden-imitierenden Antikörper ab (Levine et al. , 1996; Steeber et al. , 1997). Diese beiden Antikörper erkennen sehr wahrscheinlich unterschiedliche Epitope. Vielleicht wird fak durch die für die Melanomzellen verwendeten Antikörper stromabwärts nicht oder nur unzureichend phosphoryliert, so dass eine Detektion nicht möglich ist. Dies könnte ein Grund für eine teilweise Instabilisierung des Signalkomplexes in den getesteten Melanomzellen sein, woraufhin fyn und Paxillin nicht detektiert wurden. Wie schon erwähnt, ist die Stabilität des Signalkomplexes sehr wichtig für die Koimmunpräzipitation und die Ergebnisse können falsch negativ sein. Bei den Endothelzellen wurden p130Cas/p105CasL und nck nicht untersucht, also kann man für diese Moleküle die Unterschiede im Signalweg nicht diskutieren. Insgesamt kann man keinen Widerspruch zwischen den gefundenen Resultaten für Melanom- bzw. Endothelzellen feststellen, da trotz vergleichbaren Versuchsansätzen die Unterschiede so wichtige Komponenten wie den Kreuzvernetzungsantikörper betreffen. Auch sind die beteiligten Proteine nur einzeln benannt und noch keine Zusammenhänge in einer Signalkette bestätigt. Als ein wichtiger Punkt festzuhalten ist aber, dass der Muc18-Signalweg in jedem Fall einem Integrin-ähnlichen Weg gleicht, mit Beteiligung von src-Proteintyrosinkinasen und den bekannten assoziierten Adapterproteinen. Für das Melanom konnte aber im Gegensatz zum Endothel noch keine beteiligte Kinase identifiziert werden.

6.2 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Muc18

Um weiter stromabwärts gelegene Signalpartner eines Oberflächenmoleküls zu finden, wurde eine Methode aus der Promotor-Analyse gewählt. Transient in eine Melanomzelllinie transfizierte Konstrukte, die Wiederholungen von Transkriptionsfaktor-responsiven Elementen tragen, können so darüber Aufschluss geben, welche Interaktionspartner den

Signalweg im Zellkern fortsetzen. Für Muc18 wurden ein CRE („cAMP responsive element“-)Konstrukt, sowie AP1-, p53-, STAT3- und EGR-1-responsive Konstrukte getestet. Außerdem bot der ICAM-1-Promotor die Möglichkeit der Identifizierung von NF- κ B als wahrscheinlichem Interaktionspartner.

Die Kreuzvernetzung von Muc18 führt wahrscheinlich zur Aktivierung des CRE-responsiven Elements und zur Aktivierung des ICAM-1-Promotors. Die Stimulation über Muc18 ist echt, da erstens nicht alle untersuchten Oberflächenmoleküle auf eine Kreuzvernetzung von Muc18 reagieren und zweitens die Isotypkontrollen einen niedrigeren Wert der Luziferase-Aktivität aufweisen. Die Deletionskonstrukte und das mutierte Konstrukt des ICAM-1-Promotors weisen darauf hin, dass die beiden NF- κ B-responsiven Elemente für die Reaktion des ICAM-1-Promotors verantwortlich sind. Wichtig ist auch, dass man CRE und NF- κ B-responsive Elemente in vielen Promotoren findet, so z. B. CRE im Promotor von Muc18 selbst. Damit kann man vermuten, dass eine Stimulation von Muc18 zu veränderter Genexpression führt. Deshalb sollte nach Muc18-Kreuzvernetzung eine Zunahme an mRNS der jeweiligen Zielgene zu finden sein. Wie schon für β_2 -Integrine gezeigt, wobei die Kreuzvernetzung von LFA-1 zur Hochregulierung der ICAM-1-Expression führt (Yamada et al. , 1997), kann man sich auch bei Muc18 diese Möglichkeit für einen „cross talk“ zwischen Zelladhäsionsmolekülen vorstellen.

6.3 Der Signalkomplex um Muc18

Aus den diskutierten Ergebnissen zur Identifizierung von Interaktionspartnern kann man nun versuchen, ein Modell für den Muc18-Signalweg zu erstellen. Die Signalkaskade, die von Muc18 ausgelöst wird, kann jetzt zumindest punktuell benannt werden. Nach Muc18-Kreuzvernetzung kann keine Tyrosinphosphorylierung von Muc18 selbst detektiert werden. Es scheint mit p130Cas/p105CasL assoziiert zu sein, wobei beide Adapterproteine nach Aktivierung phosphoryliert werden. Die Bindung zwischen Muc18 und p130Cas muss indirekt sein, da Muc18 keine Akzeptorstelle für SH2-Domänen besitzt und auch keine Konsensus-Sequenz für eine SH3-Bindung. Außerdem liegt nck im Signalkomplex vor. Muc18-Kreuzvernetzung rekrutiert weiter stromabwärts wahrscheinlich NF- κ B bzw. wirkt auf CRE ein.

7. Literaturverzeichnis

Anfosso, F. , Bardin, N. , Francès, V. , Vivier, E. , Camion-Jau, L. , Sampol, J. , and Dignat-George, F. (1998). Activation of human endothelial cells via S-Endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125Fak. *J. Biol. Chem.* 273, 26852-26856.

Ausubel, F. M. , Brent, R. , Kingston, R. E. , Moore, D. D. , Sudman, J. G. , Smith, J. A. , and Struhl, K. (eds.) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. .

Axelsson, L. , Hellberg, C. , Melander, F. , Smith, D. , Zheng, L. , and Anderson, T. (2000). Clustering of beta (2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase. *Exp. Cell Res.* 256(1), 257-263.

Bardin, N. , Frances, V. , Lesaule, G. , Horschowski, N. , George, F. , and Sampol, J. (1996). Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21, 210-216.

Benchimol, S. , Fuks, A. , Jothy, S. , Beauchemin, N. , Shirota, K. , and Stanners, C. D. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57, 327-334.

Berridge, M. J. , Bootman, M. D. , and Lipp, P. (1998). Calcium – a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.

Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* 172, 902-908.

Brown, M. T. , and Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochem. Biophys. Acta* 1287(2-3), 121-49.

Brugge, J. S. , and Erikson, R. L. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 269, 346.

Cance, W. G. , Craven, R. J. , Bergman, M. , Xu, L. , Alitalo, K. , and Liu, E. T. (1994). Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 5(12), 1347-1355.

Clark, W. H. , Elder, D. E. , Guerry, D. , Epstein, M. N. , Greene, M. H. , and van Horn, M. A. (1984). Study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathol.* 15, 1147-1165.

Cunningham, B. A. , Hemperly, J. J. , Murray, B. A. , Prediger, E. A. , Brackenbury, R. , and Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structures, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.

Daniel, S. , Nagel, G. , Johnson, J. P. , Lobo, F. M. , Hirn, M. , Jantscheff, P. , Kuroki, M. , von Kleist, S. , and Grunert, F. (1993). Determination of the specification of monoclonal antibodies recognizing members of the CEA family using a panel of transfectants. *Int. J. Cancer* 55, 303-310.

De Wet, J. R. , Wood, K. V. , DeLuca, M. , Helinski, D. R. , and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7(2), 725-737.

Diamond, M. S. , Staunton, D. E. , De Fougerolles, A. R. , Stacker, S. A. , Garcia-Aguillar, J., Hibbs, M. L. , and Springer, T. A. (1990). ICAM (CD54) – a counter receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111, 3129-3139.

Diamond, M. S. , Staunton, D. E. , Marlin, S. D. , and Springer, T. A. (1991). Binding of the intergrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65, 961-971.

- Dustin, M. L. , Singer, K. H. , Tuck, D. T. , and Springer, T. A. (1988). Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon γ and is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J. Exp. Med.* 167, 1323-1340.
- Dustin, M. L. , and Springer, T. A. (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann. Rev. Immunol.* 9, 27-66.
- Etienne, S. , Adamson, P. , Greenwood, J. , Strosberg, A. D. , Cazaubon, S. , and Couraud, P.-O. (1998). ICAM-1 signaling pathway associated with rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J. Immunol.* 161, 5755-5761.
- Filshie, R. J. A. , Zannettino, A. C. W. , Makrynika, V. , Gronthos, S. , Henniker, A. J. , Bendall, L. J. , Gottlieb, D. , Simmons, P. J. , and Bradstock, K. F. (1998). Muc18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of haematological malignancies. *Leukemia* 12, 414-421.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res.* 14, 327-339.
- Greene, M. H. , Clark, W. H. , Tucker, M. A. , Elder, D. E. , Kraemer, K. H. , Guerry, D. , Witmer, W. K. , Thompson, J. , Matozzo, I. , and Fraser, M. C. (1985). Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma: The familial dysplastic nevus syndrome. *N. Engl. J. Med.* 312, 91-94.
- Hanahan, D. , and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1), 57-70.
- Harlow, E. , and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. .
- Harte, M. T. , Hildebrand, J. D. , Burnham, M. R. , Bouton, A. H. , and Parsons, J. T. (1996). p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 13649-13655.

Herlyn, M. , Clark, W. H. , Rodeck, U. , Mancianti, M. L. , Jambrosic, J. , and Koprowski, H. (1987). Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab. Invest.* 56, 461-467.

Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.

Johnson, J. P. , Stade, B. G. , Hupke, U. , Holzmann, B. , and Riethmüller, G. (1988). The melanoma progression-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule, ICAM-1. *Immunobiol.* 178, 275-284.

Johnson, J. P. , Bar-Eli, M. , Jansen, B. , and Markhof, E. (1997). Melanoma progression-associated glycoprotein Muc18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int. J. Cancer* 73, 769-774.

Kanda, H. , Mimura, T. , Morino, N. , Hamasaki, K. , Nakamoto, T. , Hirai, H. , Morimoto, C., Yazaki, Y. , and Nojima, Y. (1997). Ligation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of p105CasL, a member of the p130Cas-related docking protein family, and its subsequent binding to the Src homology 2 domain of c-Crk. *Eur. J. Immunol.* 27, 2113-2117.

Kanner, S. B. , Reynolds, A. B. , Wang, H. C. , Vines, R. R. , and Parsons, J. T. (1991). The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO J.* 10(7), 1689-1698.

Kishimoto, T. , Goyert, S. , Kikutani, H. , Mason, D. , Miyasaka, M. , Moretta, L. , Ohno, T. , Okumura, K. , Shaw, S. , Springer, T. A. , Sugamura, K. , Sugawara, H. , von dem Borne, A. E. , and Zola, H. (1997). CD antigens 1996. *Blood* 89(10), 3502.

Koh, K. H. (1991). Cutaneous Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 171-182.

Laemmli, U. K. (1970). Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, J. , Wang, Z. Y. , Luoh, S. M. , Wood, W. I. , and Scadden, D. T. (1994). Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase-encoding gene. *Gene* 138, 247-51.

Lehmann, J. M. , Holzmann, B. , Breitbart, E. W. , Schmiegelow, P. , Riethmüller, G. , and Johnson, J. P. (1987). Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res.* 47, 841-845.

Lehmann, J. M. , Riethmüller, G. , and Johnson, J. P. (1989). Muc18, a marker of tumor progression in human melanoma shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9891-9895.

Levine, B. L. , Ueda, Y. , Faith, A. , and June, C. H. (1996). Signal transduction properties of the T cell activation monoclonal antibody panel: ubiquitous increase in cellular substrate tyrosine phosphorylation in the absence of detectable calcium mobilization. *Tissue Antigens* 48, 319-324.

Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. , and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Marlin, S. D. , and Springer, T. A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell* 51, 813-819.

Matsuda, M. , Mayer, B. J. , Fukui, Y. , and Hanafusa H. (1990). Binding of transforming protein, p47 gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248, 1537-1539.

McCarty, J. H. (1998). The nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events. *Bioessays* 11, 913-921.

Oberg-Welsh, C. , and Welsh, M. (1995). Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution. *Gene* 152(2), 239-42.

Pickl, W. F. , Majdic, O. , Fischer, G. F. , Petzelbauer, P. , Fae, I. , Waclavicek, M. , Stöckl, J., Scheinecker, C. , Vidicki, T. , Aschauer, H. , Johnson , J. P. , and Knapp, W. (1997). Muc18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 2107-2115.

Po, J. L. , Mazer, B. , and Jensen, G. S. (1995). The L-selectin antibody FMC46 mediates rapid, transient increase in intracellular calcium in human peripheral blood mononuclear cells and Daudi lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217(3), 1145-1150.

Pourquie, O. , Corbel, C. , Le Caer, J-P. , Rossier, J. , and LeDouarin, N. M. (1992). BEN, a surface molecule of the immunoglobulin superfamily expressed in variety of developing systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5261-5265.

Purchio, A. F. , Erikson, E. , Brugge, J. S. , and Erikson, R. L. (1978). Identification of a polypeptide encoded by the Avian sarcoma virus src gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1567.

Rice, G. E. , and Bevilacqua, M. P. (1989). An inducible endothelial glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246, 1303-1306.

Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. .

Schlaepfer, D. D. , and Hunter, T. (1998). Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Cell Biology* 8, 151-157.

Schlagbauer-Wadl, H. , Jansen, B. , Müller, M. , Polterauer, P. , Wolff, K. , Eichler, H.-G. , Pehamberger, H. , Konak, E. , and Johnson, J. P. (1999). Influence of Muc18/MCAM/CD146 expression on human melanoma growth and metastasis in scid mice. *Int. J. Cancer* 81, 951-955.

Sers, C. , Riethmüller, G. , and Johnson, J. P. (1994). Muc18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Res.* 54, 5689-5694.

Sharp, B. M. , Shahabi, N. A. , Heagy, W. , McAllen, K. , Bell, M. , Huntoon, C. , and McKean, D. J. (1996). Dual signal transduction through delta opioid receptors in a transfected human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8294-8299.

Shih, I. M. , Elder, D. E. , Speicher, D. , Johnson, J. P. , and Herlyn, M. (1994). Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen. *Cancer Res.* 54, 2514-2520.

Shih, I. M. , Speicher, D. , Hsu, M. Y. , Levine, E. , and Herlyn, M. (1997). Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic MelCAM/ligand interactions. *Cancer Res.* 57, 3835-3840.

Steeber, D. A. , Engel, P. , Miller, A. S. , Sheetz, M. P. , and Tedder, T. F. (1997). Ligation of L-Selectin through conserved regions within the Lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J. Immunol.* 159, 952-963.

Stehelin, D. , Varmus, H. , Bishop, J. , and Vogt, P. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-73.

Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell. Biol.* 75, 993-1001.

Thomas, S. M. , and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.

Thuveson, M. , Albrecht, D. , Zurcher, G. , Andres, A. C. , and Ziemiecki, A. (1995). Iyk, a novel intracellular protein tyrosine kinase differentially expressed in the mouse mammary gland and intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 582-89.

Towbin, H. , Staehelin, T. , and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.

- Vainio, O. , Dunon, D. , Aissi, F. , Dangy, J. P. , McNagny, K. M. , and Imhof, B. A. (1996). HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit⁺ hemopoietic precursors. *J. Cell Biol.* 13, 1655-1668.
- Vuori, K. , Hirai, H. , Aizawa, S. , and Ruoslahti, E. (1996). Induction of p130Cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2606-2613.
- Waldmann, V. , Bock, M. , Jäckel, A. , Deichmann, M. , Dockendorff, K. , and Näher, H. (1999). Pathogenese des malignen Melanoms. *Hautarzt* 50, 398-405.
- Waldmann, V. , and Rabes, H. (1996). What's new in ras genes? Physiological role of ras genes in signal transduction and significance of ras gene activation in tumorigenesis. *Pathol. Res. Pract.* 192, 883-891.
- Wedi, B. , Elsner, J. , Czech, W. , Butterfield, J. H. , and Kapp, A. (1996). Modulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on the human mast-cell line (HMC)-1 by inflammatory mediators. *Allergy* 51, 676-684.
- Xie, S. , Luca, M. , Huang, S. , Gutman, M. , Reich, R. , Johnson, J. P. , and Bar-Eli, M. (1997). Expression of MCAM/Muc18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 57, 2295-2303.
- Yamada, A. , Hara, A. , Inoue, M. , Kamizono, S. , Higuchi, T. , and Itoh, K. (1997). Beta 2-integrin-mediated signal up-regulates counterreceptor ICAM-1 expression on human monocytic cell line THP-1 through tyrosine phosphorylation. *Cell Immunol.* 178(1), 9-16.
- Zheng, L. , Sjölander, A. , Eckerdal, J. , and Andersson, T. (1996). Antibody-induced engagement of β_2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21^{ras} through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8431-8436.

Zubiaur, M. , Izquierdo, M. , Terhorst, C. , Malavasi, F. , and Sancho, J. (1997). CD38 ligation results in activation of the Raf-1/Mitogen-Activated Protein Kinase and the CD3- ζ / ζ -associated Protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes. *J. Immunol.* 159, 193-205.

Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
AA	Aminosäure
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungsantigene („Cluster of Differentiation“)
cDNS	zu mRNA komplementäre DNS („Complementary Desoxyribonucleic Acid“)
cpm	Anzahl der Impulse pro Minute („counts per minute“)
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät („Fluorescence-Activated Cell Sorter“)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
G	Guanin
G α MIg	Ziege-anti-Maus-Immunglobulin
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
kD	Kilodalton
L-Glu	L-Glutamin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
M18	Muc18
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNS	Boten („messenger“) Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
nd	nicht durchführt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PαRIg	Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
RαMIg	Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
T	Thymin
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Tyrosinkinase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	enzymatische Einheit Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
w/v	Gewicht pro Gesamtvolumen
w/w	Gewicht pro Gesamtgewicht
z. B.	zum Beispiel

Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	A, C, G, T

Aminosäuren :

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

Publikationen

Johnson, J. P. , Bar-Eli, M. , Jansen, B. , and Markhof, E. (1997). Melanoma progression-associated glycoprotein Muc18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int. J. Cancer* 73, 769-774.

Schlagbauer-Wadl, H. , Jansen, B. , Müller, M. , Polterauer, P. , Wolff, K. , Eichler, H.-G. , Pehamberger, H. , Konak, E. , and Johnson, J. P. (1999). Influence of Muc18/MCAM/CD146 expression on human melanoma growth and metastasis in scid mice. *Int. J. Cancer* 81, 951-955.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Edith Konak, geb. Markhof
Geburtsdatum: 29.07.1971
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1977 – 1983 Grund- und Hauptschule an der Blumenauer Strasse, München
1983 – 1987 Anne-Frank-Realschule, München
1987 – 1990 Max-Planck-Gymnasium, München

Studium

1990 – 1993 Studium der Chemie an der Technischen Universität München,
Abschluss: Vordiplom
1993 – 1996 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München, Abschluss: Dipl. – Chemikerin
11/1995 Chemie-Diplom-Hauptprüfung
01/1996 – 07/1996 Diplomarbeit in Biochemie am Institut für Immunologie,
LMU München, Labor Prof. Dr. J. Johnson
Thema: „Die Expression und die biochemischen Eigenschaften
des Zelladhäsionsmoleküls Muc18 in funktionell verschiedenen
cDNA-Transfektanden, sowie in Zellen unterschiedlicher
Herkunft“
09/1996 – 07/2000 Doktorarbeit in Biochemie am Institut für Immunologie,
LMU München, Labor Prof. Dr. J. Johnson
Thema: „Identifikation von Signalweginteraktionspartnern des
Zelladhäsionsmoleküls Muc18/MCAM/CD146“