

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III-Grosshadern,  
der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann**

**Rolle der Src-Kinasen in den Signaltransduktionswegen  
von Interleukin-6 und  
Erythropoetin**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades des Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von  
Carola Neumann-Meyer**

**aus  
Kettwig/Ruhr**

**Jahr  
2003**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Hallek**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Siess  
Prof. Dr. H.-G Klobeck  
Prof. Dr. H.D. Rupprecht**

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c.K. Peter**

**Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2003**

# INHALTSVERZEICHNIS

Danksagungen

Abkürzungen

<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 Interleukin-6</b>	1
1.1.1 Interleukine	1
1.1.2 Interleukin-6: ein pleiotropes Zytokin	2
1.1.2.1 Synonym und Vorkommen	2
1.1.2.2 Das IL-6 Gen und die Regulation seiner Expression	3
1.1.3 Der Interleukin-6 Rezeptor	4
1.1.3.1 Die Zytokinrezeptoren	4
1.1.3.2 Struktur und Aufbau des IL-6 Rezeptors	4
1.1.3.3 Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ermöglichen die Signaltransduktion des Interleukin-6 Rezeptors	7
1.1.4 Interleukin-6 und seine pathophysiologische Bedeutung	8
1.1.5 Interleukin-6 und das multiple Myelom	9
1.1.5.1 Definition des multiplen Myeloms	9
1.1.5.2 Die Biologie normaler und maligner Plasmazellen	9
1.1.5.3 Karyotypische Anomalien	11
1.1.5.4 Translokationen	11
1.1.5.5 Genetische Ereignisse führen zu Wachstumsfaktor unabhängiger Proliferation und negativer Regulation der Apoptose von Myelomzellen	12
1.1.6 Die Bedeutung von Interleukin-6 für das multiple Myelom	14
1.1.6.1 Die Tumorzellen des multiplen Myeloms	14
1.1.6.2 IL-6: parakriner oder autokriner Wachstumsfaktor des multiplen Myeloms	15
1.1.6.3 IL-6 ist der Hauptwachstumsfaktor für plasmablastische Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	15
1.1.6.4 Die Rolle des Knochenmarkstromas in der Pathogenese des multiplen Myeloms	16
1.1.6.5 Weitere Wachstumsfaktoren im multiplen Myelom	18
1.1.6.6 Interleukin-6 als ein Prognosefaktor des multiplen Myeloms	20
<b>1.2 Die Rolle von Erythropoetin</b>	21
1.2.1 Die physiologische Bedeutung von Erythropoetin	21
1.2.1.1 Synonym und Vorkommen	21
1.2.1.2 Das Erythropoetin-Gen und die Regulation seiner Expression	22
1.2.2 Die Wirkung von Erythropoetin	24
1.2.2.1 Epo spielt keine Rolle in der frühen Erythropoese	24
1.2.2.2 Die Rolle von Tyrosinphosphorylierung in der Erythropoese	26

1.2.3	Struktur und Aufbau des Erythropoetinrezeptors	27
1.2.3.1	Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen ermöglichen die Signaltransduktion des Erythropoetin-Rezeptors	28
<b>1.3</b>	<b>Die Übermittlung von Signalen in der Zelle</b>	<b>30</b>
1.3.1	Onkogene und Tumorsuppressorgene	30
1.3.1.1	Onkogene	30
1.3.1.2	Tumorsuppressorgene	31
1.3.2	Wie Proteine kommunizieren	32
1.3.2.1	Zelloberflächenrezeptoren	32
1.3.2.2	Proteinmodule	33
1.3.3	Die Familie der Zytokinrezeptoren	36
1.3.3.1	Zytokinrezeptoren ohne eigene Kinasedomäne	36
1.3.4	Die Familie der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen	37
1.3.4.1	Die Src-Kinasen und die Csk-Kinase	37
1.3.4.1.1	Die Primärstruktur der Familie der Src-Kinasen	37
1.3.4.1.2	Die Regulation der Aktivität von Src-Kinasen	38
1.3.4.1.3	Die Assoziation von Src-Kinasen mit Zelloberflächen-Rezeptoren	39
1.3.4.1.4	Die Substrate der Src-Kinasen	40
1.3.4.1.5	Die Csk Familie der inhibierenden Tyrosinkinasen	40
1.3.4.2	Die Janus-Kinasen	41
1.3.4.3	Die FAK Kinase	41
1.3.4.4	Die Syk Kinase	42
1.3.5	Der Ras-Signalweg	42
1.3.5.1	Ras aktivierende Proteine	42
1.3.5.2	Durch Ras aktivierte Signalwege	45
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>46</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>48</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellen und Zellkultur</b>	<b>48</b>
<b>2.2</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>50</b>
2.2.1	Zellstimulation	50
2.2.2	Puffer und Lösungen	50
2.2.3	Westernblot Analyse/SDS-PAGE	50
2.2.4	Immunpräzipitation und Immunoblotting	54
<b>2.3</b>	<b>Zellstimulation, Zellyse und Nachweis der Tyrosinphosphorylierung und Proteinexpression durch Immunoblotting (SDS-PAGE)</b>	<b>55</b>
2.3.1	Zellstimulation	55
2.3.2	Zellyse	56



2.3.3	Westernblotanalyse/SDS-PAGE/Alkalische Phosphatase	56
2.3.4	Westernblotanalyse/ECL (Enhanced Chemoluminescence) Methode	57
<b>2.4</b>	<b>Immunkomplex Kinase Assay</b>	<b>57</b>
2.4.1	Radioaktives Labeling der Proben	57
2.4.2	Enolase als spezifisches Substrat für die Src-Kinasen	58
<b>2.5</b>	<b>Immun-Ko-Präzipitation</b>	<b>58</b>
2.5.1	Immunpräzipitation	58
2.5.2	Doppel-Immunpräzipitation in Immunkomplex Kinase Assay	59
2.5.3	Doppel-Immunpräzipitation für Immunoblotting	59
2.5.4	Peptid-Ansätze	59
<b>2.6</b>	<b>Messung von Zellproliferation</b>	<b>60</b>
2.6.1	( <sup>3</sup> H) Thymidineinbau	60
2.6.2	MTT-Assay	60
.		
<b>2.7</b>	<b>Lyn-Oligonukleotide</b>	<b>61</b>
<b>2.8</b>	<b>RNase Protektions Assay</b>	<b>61</b>
2.8.1	Aufreinigung von Ribonukleinsäure	61
2.8.2	Subklonierung der unique domain von Lyn in einen Polymerase bindenden Vektor	62
2.8.3	Erstellung der Riboprobe	63
2.8.3.1	Linearisierung des pSP72 Vektor	63
2.8.3.2	Erstellung einer P <sup>32</sup> -UTP markierten Antisense-RNA	63
2.8.4	Hybridisierung der RNA	64
2.8.5	Verdau der einzelsträngigen RNA	64
2.8.6	β-Globin Riboprobe	65
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Signaltransduktion des Interleukin-6 Rezeptors im multiplen Myelom</b>	<b>66</b>
3.1.1	IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung mehrerer zytosolischer Proteine in zwei B-Zelllinien: Hybridom B-9 und LP-1	66
3.1.2	Vier Myelomzelllinien exprimieren die Untereinheiten des IL-6 Rezeptors: IL-6R $\alpha$ und gp130	67
3.1.3	Die Tyrosinphosphorylierung nach IL-6 Stimulation ist zeit- und Stimulationsabhängig	67
3.1.3.1	Zeitkinetik	67
3.1.3.2	Konzentrationskinetik	68
3.1.4	Der Tyrosinphosphataseinhibitor Natrium Orthovanadat verstärkt den	

proliferativen Effekt von IL-6 auf die Myelomzelllinie B-9	68
3.1.4.1 Proliferation der B-9 Zellen	69
3.1.4.2 Proliferation der OPM-2, U266 und LP-1 Zelllinie	69
3.1.5 IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Mitgliedern der Src-Familie Hck, Fyn und Lyn	70
3.1.5.1 Nachweis der Kinaseaktivität nach IL-6 Stimulation in B-9 Zellen	70
3.1.5.2 Die Tyrosinphosphorylierung der Src-kinasen ist induziert durch IL-6 in B-9 Zellen	71
3.1.6 Die Assoziation der Src-Kinasen p53,56Lyn und p59Fyn mit dem IL-6R- $\alpha$ /gp130 Komplex ist fraglich	71
3.1.7 IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung von Shc in den zwei B-Zelllinien LP-1 und B-9	72
3.1.8 Die Tyrosinphosphorylierung von Shc nach IL-6 Stimulation ist zeit-und konzentrationsabhängig	73
3.1.8.1 Zeitkinetik	74
3.1.8.2 Konzentrationskinetik	74
3.1.9 IL-6 induziert die Komplexbildung von Shc mit Grb2 in LP-1-Zellen	74
3.1.10 IL-6 induziert die Komplexbildung von Shc/Grb2 mit den Src-Kinasen p56/53 und p59Fyn in LP-1 Zellen	76
3.1.10.1Aktivierbarkeit der Src-Kinasen durch IL-6	76
3.1.10.2Nachweis der Komplexbildung mit der ECL	77
3.1.10.3Nachweis der Komplexbildung mit Ko-Präzipitationsexperimenten im Kinase-assay	78
<b>3.2 Signaltransduktion des Erythropoetinrezeptors</b>	79
3.2.1 Epo stimuliert Tyrosinphosphorylierung zeitabhängig in UT-7 –Zellen	79
3.2.2 Epo aktiviert die Kinaseaktivität von Jak2, Lyn, Lck und Hck	80
3.2.3 Lyn assoziiert mit tyrosinphosphorylierten Proteinen nach Epo-Stimulation	81
3.2.4 Vergleich von SDS-und NP-40-Dissoziations-Puffer in der Komplexbildung von EpoR und Lyn in einer Doppel-Immunpräzipitation	82
3.2.5 Komplexbildung von Lyn und EpoR in einer Doppel-Immunpräzipitation	84
3.2.6 Lyn und Jak2 ko-präzipitieren mit dem EpoR unabhängig von Epo-Stimulation	85
3.2.7 Epo aktiviert nicht die Kinaseaktivität von Lyn in der Ba/F3 Zelllinie transfiziert mit der EpoR Mutante 286	87
3.2.7.1 Epo stimuliert Lyn Kinaseaktivität in Ba/F3/C5 Zelllinie	88
3.2.7.2 Epo aktiviert nicht die Kinaseaktivität von Lyn in der Ba/F3/EpoR 286 Zelllinie	89
3.2.8 Lyn kopräzipitiert mit der EpoR Mutante 416 aber nicht mit der EpoR Mutante 286	89
3.2.9 Der Effekt von Lyn auf Epo-abhängiges Zellwachstum	92
3.2.10 Die Rolle von Lyn in der Differenzierung der erythrozytären Blutzellreihe	93

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	95
<b>4.1</b>	<b>Methodische Aspekte</b>	95
4.1.1	Das Verwenden von immortalisierten Zelllinien	95
4.1.2	Heterogenität in der Zellpopulation	95
4.1.3	Autokrines oder parakrines Wachstum von Myelomzellen	96
4.1.4	Darstellung von Proteinen durch Immunoblotten	97
4.1.5	Darstellung von Proteinkomplexen	98
4.1.6	Nachweis der Kinaseaktivität von Tyrosinkinasen	99
4.1.7	Nachweis der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine	100
4.1.8	Nachweis von Genexpression durch Untersuchung von RNA	102
<b>4.2</b>	<b>IL-6 und Epo induzieren Phosphorylierung, Aktivierung und Interaktionen von Proteinen im Ras-Signalweg</b>	103
4.2.1	Der Shc-Grb2-Komplex verbindet Wachstumsfaktorrezeptoren mit dem Ras-Signalweg	103
4.2.1.1	Aktivierung des Shc-Grb2-Komplexes	103
4.2.1.2	Koppelung von Shc-Grb2 mit Wachstumsfaktorrezeptoren	104
4.2.1.3	Der Shc-Grb2-Komplex in weiteren Signalwegen	106
<b>4.3</b>	<b>IL-6 und Epo aktivieren Tyrosinkinasen und-Phosphatasen</b>	107
4.3.1	Durch IL-6 aktivierte Tyrosinkinasen und-Phosphatasen	107
4.3.2	Durch Epo aktivierte Tyrosinkinasen und-Phosphatasen	108
4.3.3	Aktivierung der Src-Kinasen durch IL-6 und Epo	110
<b>4.4</b>	<b>Die Funktion der Src-Kinasen</b>	111
4.4.1	Regulation der Src-Kinasen: inter-oder intramolekular?	111
4.4.2	Die Rolle von Src-Kinasen untersucht in Gen Knockout Modellen	114
4.4.3	Die Rolle der Src-Kinasen in Signaltransduktionswegen	115
4.4.4	Kinasen assoziieren mit dem IL-6 - und Eporezeptor	120
4.4.5	Potentielle Bindungsdomänen des IL-6-und Eporezeptors	124
<b>4.5</b>	<b>Schlussgedanken</b>	127
4.5.1	Die Rolle von Src in malignen Erkrankungen	127
4.5.2	Tyrosinkinase-Hemmer als potentielle Therapiechancen in malignen Erkrankungen	128
4.5.3	Zusammenfassung	129
<b>5</b>	<b>Referenzen</b>	131
<b>6</b>	<b>Lebenslauf</b>	156
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	159

## Danksagungen

Danksagen möchte ich hiermit vor allem meiner Familie, meinem Mann, Jörg Meyer und meinen Eltern Carola und Wolfgang Neumann, für ihre grenzenlose Unterstützung, Geduld und Ermutigungen diese Arbeit zu erstellen und zu Ende zu bringen.

Darüber hinaus möchte ich es nicht versäumen meinem Doktorvater und Mentor, Prof. Dr. Michael Hallek, zu danken, dessen Ideengut diese Arbeit initiierte und mit zahllosen Diskussionen bereicherte.

Dank gebührt auch meinen ehemaligen Kollegen in Dr. Halleks Labor, Frau Dr. Susanne Danhauser-Riedl und Dr. Markus Warmuth, für Diskussionen, technische Hilfe und den Spass, den wir oft hatten.

Auch möchte ich Prof. Dr. Frank Bunn und Dr. Mark Showers herzlich für die Gelegenheit und Grosszügigkeit danken, die Ideen in ihrem Labor weiter zu entwickeln und mit kritischen Diskussionen und technischer Hilfestellung zu begleiten. Ganz besonders möchte ich hier Dr. Mark Showers für seine Unterstützung und Hilfe danken, die den zweiten Teil dieser Arbeit ermöglichten.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Dwayne Barber und Dr. Martin Carroll für ihre kritischen Blickwinkel und ihre technische Hilfestellung bedanken.

# Abkürzungen

ACTH: Adrenocorticotropes Hormon	PLC $\gamma$ : phospholipase c gamma
AMP: Adenosin-5-Monophosphat	PRL: Prolaktin
APRF: acute phase reponse factor	SCF: stem cell factor
AS: Aminosäure	SHPTP1/2: SH2 containing protein tyrosine phosphatase
BFUe: erythroid burst forming unit	Sos: son of sevenless
BSA: bovine serume albumine	STAT: signal transducer and activation of transcription
c-DNA: circular desoxyribonucleic acid	TGF- $\beta$ -2: transforming growth factor beta 2
CFU: colony formig unit	TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha
CFUe: erythroid colony forming unit	ZR(n): Zytokinrezeptoren
CNTF: ciliary neurotropic factor	
C-Terminus: carboxy terminus	
EGF: epidermal growth factor	
Epo: Erythropoetin	
EpoR: Erythropoetinrezeptor	
ERK1/2: extra cellular regulated kinase 1/2	
ES: embryonic stemcell	
FCS: fetale calf serum	
FGF: fibroblast growth factor	
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor	
GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor	
Grb2: growth factor receptor bound protein 2	
HGF: humane growth factor	
I-K-B: I kappa B	
IL-x: Interleukin-x	
IL-xR: Interleukin-x Rezeptor	
Jak: Januskinasen	
kb: KiloBasen	
kDa: KiloDaltons	
INF: interferone	
LIF: Leukaemia inhibitory factor	
MAPK: mitogen activated protein kinase	
MAPKK: mitogen activated protein kinase kinase	
M-CSF: macrophage colony stimulating factor	
m-RNA: messenger ribonucleid acid	
MT: middle T antigen	
NF-K-B: Nuclear factor Kappa B	
NGF: nerve growth factor	
NRTKn: Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	
N-Terminus: amino terminus	
pRb: Retinoblastom protein	
OSM: Oncostatin M	
PDGF: Platelet derived Growth Factor	
PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase	

# 1 EINLEITUNG

Wachstumsfaktoren sind von Zellen sezernierte relativ niedermolekulare Proteine. In der Regel wirken diese Faktoren spezifisch auf bestimmte Zell- und Gewebetypen, die einen entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Die meisten Faktoren weisen sowohl stimulierende wie auch inhibierende Eigenschaften auf und wirken in vielen Fällen sowohl synergistisch als auch antagonistisch zusammen. Von besonderem klinischen Interesse ist die durch Wachstumsfaktoren gesteuerte Proliferation von Tumor-Zellen. Hier bietet sich die Möglichkeit das Wachstumsgeschehen entweder durch Reduzierung der Gewebe- und Plasmaspiegel, durch Zufuhr oder Neutralisieren von Wachstumsfaktoren, oder durch Blocken der entsprechenden Rezeptoren therapeutisch zu beeinflussen. Zu den Wachstumsfaktoren gehören Zytokine wie Interferone, hämatopoetische Kolonie stimulierende Faktoren, Plateled Derived Growth Factor (PDGF), Erythropoetin und die grosse Gruppe der Interleukine, um nur einige Beispiele zu nennen.

## 1.1 Interleukin-6

### 1.1.1 Interleukine

Interleukine sind strukturell und funktionell unterschiedlich lösliche Proteine und Peptide, die hauptsächlich von Leukozyten sezerniert werden und der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellpopulationen dienen. Sie gehören zur grossen Gruppe der Zytokine und bis heute konnten 26 verschiedene Interleukine mit ihren Rezeptoren charakterisiert werden. Interleukine sind an unterschiedlichen Prozessen der Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zell-Zell-Interaktion beteiligt. Eine Definition von Interleukinen, die allein auf der Basis ihrer Funktionen beruht, ist problematisch. Interleukine besitzen ein pleiotropes Aktivitätsspektrum und wirken dadurch untereinander redundant. Unterschiedlichen Zelltypen produzieren verschiedene Interleukine. Es können aber auch gleiche Interleukine von verschiedenen Zelltypen produziert werden. Ein Interleukin kann unterschiedliche Zelltypen aktivieren und dabei unterschiedliche biologische Wirkungen ausüben. Die Expression der Interleukine ist streng reguliert, d.h. die Faktoren werden meist nur kurzfristig als Antwort auf physiologische Stimuli synthetisiert und freigesetzt. Einige Interleukine beeinflussen in autoregulatorischer Weise ihre eigene Synthese oder die Synthese der entsprechenden Rezeptoren und können selbst auch die Synthese anderer Interleukine modulieren.

## 1.1.2 Interleukin-6: ein pleiotropes Zytokin

### 1.1.2.1 Synonyme und Vorkommen

Interleukin-6 ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Aufgrund seiner verschiedenen physiologischen Aufgaben ist es unter vielen Synonymen bekannt geworden, wie  $\beta$ 2-interferon, B-cell stimulating factor 2 (B-SF2), B-cell differentiation factor (BCDF), hybridoma/ plasmocytoma growth factor (HPGF oder IL-HP1), hybridoma growth factor (HGF), hepatocyte stimulating factor (HSF), cytolytic differentiation factor for T-Lymphocytes (CDF), cytotoxic T cell differentiation factor, haematopoetic CSF 309, HECS (human endothelial culture supernatant),  $\text{INF}\beta$ 2 (Interferon $\beta$ 2), interleukin-hybridoma/plasmocytoma-1 (IL-HP1), macrophage-granulocyte inducing protein 2, macrophage-granulocyte inducer (MGI-2A), myeloma growth factor (Myeloma GF), plasmocytoma growth factor (PCT-GF) oder thymocyte growth factor (THCGF) [1-4].

IL-6 wird von unterschiedlichen Zellen produziert: Natural-Killer-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, Stromazellen des Knochenmarks und des Endometriums, glatten Muskelzellen, Keratinozyten, Myxomzellen des Herzmuskels, Zellen von Cervix- und Blasenkarzinomen, Glioblastomzellen, Osteosarkomzellen, Zellen der myeloischen und chronischen Leukämie, Lymphomzellen, Sternberg-Reed Zellen und Myelomzellen [4, 5].

Interleukin-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin. Humanes IL-6 ist aktiv in Affen, Ratten und Mäusen. Murines IL-6 dagegen ist im Menschen unwirksam. Humanes IL-6 beeinflusst die antigenspezifische Immunantwort und entzündliche Reaktionen. Als physiologischer Hauptmediator der Akute-Phase-Reaktion induziert es in den Leberzellen zusammen mit IL-1 die Produktion von Akute-Phase-Proteinen [1, 6]. IL-6 stimuliert wie auch IL-1 die ACTH-Synthese. Die so gebildeten Glucocorticoide inhibieren wiederum die Produktion von IL-6, IL-1 und TNF *in vivo*, so dass zwischen Immunsystem und neuroendokrinen Funktionen eine Art negativer Feedback-Schleife existiert [7]. IL-6 wirkt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als Differenzierungsfaktor für B-Zellen und als Aktivierungsfaktor für T-Zellen. In Zusammenarbeit mit IL-2 induziert IL-6 die Differenzierung von reifen und unreifen T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen [8]. IL-6 induziert ebenfalls die Proliferation von Thymozyten und spielt eine Rolle bei der Entwicklung der thymusständigen T-Zellen. Darüber hinaus ist es auch für die abschliessende Reifung der B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen verantwortlich, was die vorausgehende Aktivierung der Zellen mit IL-4 voraussetzt. IL-6 kann die Antikörpersekretion von B-Zellen steigern, im Falle von IgG1 sogar um ein 120-400-faches [9]. IL-6 induziert auch die Expression von IL-2 und seines Rezeptors und unterstützt darüber hinaus zusammen mit IL-3 *in vitro* die Proliferation von multipotenten zu hämatopoetischen Progenitorzellen [10]. Es induziert die Reifung von Megakaryozyten [11] und sogar die Proliferation von Thrombozyten *in vivo* [12]. IL-6 ist der Hauptwachstumsfaktor vieler

humaner Myelome [13] und aktiviert Osteoklasten, was osteolytische Läsionen zur Folge hat [14]. Das Zytokin spielt auch eine Rolle in der Differenzierung von neuralem Gewebe (PC 12 Zellen) [15] und letztlich beim Wachstum von Keratinocyten [5, 16, 17].

#### 1.1.2.2 Das IL-6 Gen und die Regulation seiner Expression

IL-6 ist ein 184 Aminosäure langes Protein, das an den Positionen 73 und 172 glykolisiert ist. Das Protein wird als 212 Aminosäuren langes Vorläuferprotein gebildet [18]. Von Monozyten werden mindestens fünf verschiedene molekulare Formen von IL-6 sezerniert. Sie haben eine Molekularmasse zwischen 21,5 und 28 kDa und unterscheiden sich hauptsächlich durch posttranslationale Veränderungen wie Glykosilierung und Phosphorylierung. Aus unterschiedlichen Zellen isoliertes IL-6 zeigt eine gewisse Mikroheterogenität am N-Terminus. Im Plasma existiert eine 42-45 kDa Form, die wahrscheinlich mit einem Trägerprotein komplexiert ist. Murines und humanes IL-6 zeigen eine Ähnlichkeit von 65% auf DNA- und 42% auf Proteinebene [4]. Das Gen für humanes IL-6 enthält 5 Exons, ist ca. 5 kb lang und ist auf Chromosom 7p21-p14 lokalisiert. Die Nukleotidsequenzen des IL-6-Gens und des für den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor (G-CSF) kodierenden Gens zeigen Ähnlichkeiten, die möglicherweise auf eine evolutionäre Verwandtschaft der beiden Gene schliessen lässt.

Das IL-6-Gen enthält zahlreiche regulatorische Elemente, die die IL-6-Expression durch verschiedene Stimuli ermöglichen. So enthält die Promoterregion des IL-6-Genes mehrere *in cis* agierende Elemente, die der Kontrolle der Transkription dienen und wahrscheinlich durch zyklisches AMP (c-AMP), Prostaglandine und auch Lipopolysaccharide moduliert werden. Beginnend in der 5'-Region befinden sich in der Promoterregion (Abb.1.1.2.2.) zwei Elemente des Glukokortiod-Rezeptor "glucocorticoid receptor response elements" (GRE) und eine Bindungsstelle für den Transkriptionfaktor AP-1. Diesen Sequenzen folgt eine Region, die der Bindungsstelle im *c-fos* Gen sehr ähnelt und als "serum response element" (SRE) bezeichnet wird. Das SRE enthält ein "multi response element" (MRE), die NF-IL-6 Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Transkriptionsfaktoren der *ets*-Familie. Das NF-IL-6 Protein wird von dem intronlosen NF-IL-6 Gen kodiert und in niedriger Konzentration ubiquitär expremiert. Es wird aber in einem drastisch erhöhten Spiegel nach Induktion mit Lipopolysaccharide, IL-1, TNF oder IL-6 gefunden. Von dem NF-IL-6-Protein ist bekannt, dass es an *in cis* agierende Bindungsstellen in Genen bindet, welche in Hepatozyten Akute-Phase-Proteine kodieren. Über die Promoterregion verteilt befinden sich mehrere Bindungsstellen für c-AMP, welche "cyclic AMP responsive element" (CRE) genannt werden und ein klassisches Beispiel für die c-AMP regulierte Transkription darstellten. Das "c-AMP responsive element binding protein" (CREB), welches wie AP-1 in der Promoterregion mehrerer Zytokingene gefunden wurde, wird nach Phosphorylierung durch die c-AMP abhängige Protein Kinase A aktiviert und bindet dann innerhalb des MRE, um die Genexpression zu aktivieren [19]. Die Rolle des "glucocorticoid receptor response elements" (GRE) in der Promoteregion des IL-6-



Gens scheint in der negativen Regulation der IL-6 Expression zu liegen. Ray et al. konnten zeigen, dass der aktivierte Glukocorticoidrezeptor an die "glucocorticoid receptor response elements" (GRE), die TATA-Box und dem Initiatormotiv des IL-6-Promoters bindet und dadurch die IL-6 Expression unterdrücken kann [20]. Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass Glukocorticoide auch die Translation und DNA Bindung von NF- $\kappa$ -B verhindern indem sie I-K-B induzieren und NF- $\kappa$ -B im Zytoplasma zurückhalten [21]. Die IL-6-Gen-Promoterregion enthält auch eine NF- $\kappa$ -B-Sequenz, gefolgt von einer TATA-Box und dem Initiatormotiv. Die NF- $\kappa$ -B-Bindungsstelle kommt, wie auch die NF-IL-6 Bindungsstelle in vielen Promoterregionen von Genen vor, die eine Rolle in Entzündungs- und Immunreaktionen spielen. NF- $\kappa$ -B gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die aus vier weiteren Mitgliedern besteht und eine zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen spielt. NF- $\kappa$ -B kann von einer Reihe von Faktoren aktiviert werden, wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , PDGF, LPS, Oxidativer Stress, Viren und virale Produkte. [22]. NF- $\kappa$ -B interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF-IL-6, AP-1 und SP-1 um synergistisch Transkription zu aktivieren [23].

IL-6 wirkt darüber hinaus unterdrückend auf die Expression von den negativen Akute-Phase-Proteinen wie Albumin durch die Unterdrückung eines weiteren Transkriptionsfaktors, C/EBP [24]. Interessanterweise gehören beide Faktoren, NF-IL-6 und C/EBP zur gleichen Familie von Transkriptionsfaktoren und teilen eine Konsensussequenz, sind aber auf sehr unterschiedliche Weise wirksam [25].

### **1.1.3 Der Interleukin-6 Rezeptor**

#### 1.1.3.1 Die Zytokinrezeptoren

Von den bis heute bekannten Zytokinrezeptoren (ZRn) besitzen die meisten keine eigene Kinasedomäne und somit keine eigene enzymatische Aktivität. Charakteristisch für die ZRn ist, dass sie nach der Bindung des spezifischen Liganden die Übertragung des Signals durch Rezeptor-assoziierte Moleküle wie zytosolische oder membranständige Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NRTKn) übermitteln. Diese werden durch stimulierte Rezeptoren aktiviert und ersetzen die fehlende Kinaseaktivität, indem sie den Rezeptor und andere Signalmoleküle phosphorylieren. Wie schon erwähnt, zeichnen sich Zytokine durch Pleiotropie und Redundanz aus, was sich in der Aktivierung gleicher oder unterschiedlicher Signalkaskaden widerspiegelt.

#### 1.1.3.2 Struktur und Aufbau des IL-6 Rezeptor (Abb.1.1.3.2)

Der IL-6 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten (siehe dazu auch Abb.1.1.3.2) und besitzt wie die meisten Zytokinrezeptoren keine eigene enzymatische kinaseähnliche Domäne. Er gehört zusammen mit Rezeptoren für IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-8, Epo, PRL, IL-12, OSM, LIF und G-CSF zur Klasse I der ZR. Die  $\alpha$ -Kette, IL-6R wurde 1988

von Yamasaki et al. kloniert, besteht aus 449 Aminosäuren und wird aus einem 468 Aminosäuren langen Vorläuferpeptid gebildet [26]. Der eigentliche IL-6R ist ein stark glykolysiertes Protein von 80Kda, wird auch gp80 genannt und liegt zum grössten Teil extrazellulär. gp80 zeigt grosse Ähnlichkeit mit den Rezeptoren von M-CSF, PDGF und IL-1 in ihrer 'immunoglobulin-like sequence domain', den konservierten Cysteinresten und dem WSXWS Motiv im N-terminalen, extrazellulären Teil. Nach Bindung von IL-6 an gp80 assoziiert dieser Komplex an ein transmembranäres Glykoprotein, gp130, das auch als  $\beta$ -Kette des IL-6 Rezeptors bezeichnet wird. Gp130 ist ein 918 Aminosäuren enthaltendes und somit ein 130 kDa schweres Protein, wobei 277 AS intrazellulär liegen. Gp130 wurde 1990 von Hibi et al. kloniert [27]. Der grösste Anteil von gp130, 597 Aminosäuren, liegt also extrazellulär und beinhaltet drei Fibronectin-Module, von denen zwei, jeweils ca. 100 Aminosäuren lang, Teil der IL-6 bindenden Region, "cytokine binding region" (CBR) angehören [27]. Zur CBR gehören weiter eine konservierte prolinreiche und cysteinreiche Region und das WSXWS-Motiv [28]. N-terminal von der CBR liegt ein Immunglobulin ähnliches Motiv, "immunoglobulin (Ig)-like module", welches für die Signalübertragung von gp130 essentiell ist [29].

Nachdem IL-6 an die  $\alpha$ -Kette mit einer Affinität von  $10^9$  mol/L gebunden hat, assoziiert dieser Komplex mit der  $\beta$ -Kette mit einer Affinität von  $10^{11}$  mol/L [27]. Über die eigentliche Komplexformation von Ligand,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette gibt es noch kein einheitliches Modell. Man weiss, dass der aktivierte Rezeptorkomplex in Form eines Hexamers vorliegt, bestehend aus drei Homodimeren: IL-6,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette [30]. Man vermutet, dass gp130 nach Bindung des Komplexes IL-6/gp80 mit einem weiteren gp130 Molekül ein durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer bildet um aktiv Signale zu stimulieren [31]. Es herrscht jedoch noch Unklarheit darüber in welcher Abfolge die Formation des hexamerischen Rezeptorkomplex [30] entsteht. Eine Hypothese schlägt die Oligomerisierung von jeweils zwei IL-6 [32] und zwei IL-6R [33] Molekülen vor, welche mit einem gp 130 Homodimer interagieren [31]. Die andere Hypothese unterstützt die Idee, dass der aktivierte Rezeptorkomplex aus zwei Trimeren besteht, wobei ein Trimer von jeweils aus einem IL-6, IL-6R und gp130 Molekül gebildet wird. Gezeigt wurde dies mit Hilfe von "Surface Plasmon Resonance Detection" bei der einer der zu untersuchenden Bindungspartner auf einer Membran immobilisiert wird um die Assoziation/Dissoziation etwaiger in Lösung befindlicher Partner zu untersuchen [34]. Hier sei erwähnt, dass die  $\alpha$ -Kette auch als Agonist in lösliche Form (sIL-R6) existiert und nach Bindung von IL-6 die  $\beta$ -Kette, gp130 aktivieren kann [35]. Horsten et al. konnten durch Mutagenese-Experimente Bindungsstellen von IL-6 an den IL-6-R durch gp130 identifizieren [36]. In einer weiteren Studie halfen Erkenntnisse durch die kristalline Struktur des Wachstumshormon-Rezeptorkomplexes, welche dem IL-6-R-Komplexes sehr ähnelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden spezifische Aminosäuren von IL-6, IL-6-R und gp130 mutiert und somit die Berührungspunkte von IL-6 mit IL-6-R und gp130 identifiziert [37, 38].

gp130 ist die eigentliche signaltransduzierende Untereinheit des IL-6 Rezeptors. Sein zytoplasmatischer Anteil ist durch bestimmte in allen Zytokinrezeptoren vorkommende Regionen charakterisiert: Box1,2 und 3 (siehe dazu 1.1.3.3.) [39, 40]. An Box 1 und 2 assoziiert je ein Mitglied der **Janus Kinasen** Familie (Jak2), eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase. Jak2 bindet an den IL-6-Rezeptor konstitutiv und phosphoryliert sowohl den Rezeptor als auch zelluläre Proteine [41, 42]. Darüber hinaus wird noch eine Box3 beschrieben, die einen von Jak2 phosphorylierten Tyrosinrest enthält. Dieser Tyrosinrest ist Teil einer Konsensussequenz YXXQ, welche für Aktivatoren der Signaltransduktion und Transkription Stat3/APRF essentiell ist [43]. Vier der sechs zytoplasmatischen Tyrosinreste von gp130 liegen innerhalb dieser Konsensussequenz. Zwei von diesen Vieren sind in die Aktivierung von Stat1 und Stat3 Proteinen eingebunden [44], siehe dazu auch 1.1.3.3.

Interessanterweise hat IL-6 ein positives Feedback auf seine Rezeptorexpression. Nach IL-6 Stimulation von Monozyten, Epithelzellen oder Hepatomzellen kann *in vitro* eine Steigerung der Expression von gp130 m-RNA gefunden werden [45]. Gleiches war auch *in vivo* demonstrierbar. Nach Gabe von IL-6 konnte eine Steigerung der gp130 m-RNA in Mäusen nachgewiesen werden [46].

Kürzlich gelang es auch mehr Klarheit über die Bindungsstelle von IL-6 mit gp80 zu bringen. Kalai et al. zeigten, dass die  $\alpha$ -Kette aufgrund ihrer Struktur in zwei Domänen unterteilt werden kann, welche die Autoren „hematopoietin-receptor module“ I und II nennen. Diese Domänen liegen C-terminal der „(Ig)-like domain“ (Abb.1.1.3.2) [47]. In jeder der identifizierten Domäne gibt es eine sich wiederholende Aminosäuresequenz (SSFT), die auch in humanen Rezeptoren für das Wachstumshormon, der  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors und in der murine  $\beta$ -Kette des IL-3 Rezeptors gefunden werden kann. Im Falle der IL-6-R- $\alpha$ -Kette (gp80) wiederholt sich diese SSFT-Sequenz in beiden Domänen und ist für die Liganden Bindung und die Kontaktaufnahme mit gp130 notwendig [48]. gp130 ist auch in andere Rezeptorsysteme involviert, da es auch die gemeinsame  $\beta$ -Kette für die Rezeptoren von IL-11, LIF, CNTF und OSM darstellt. Nach Ligandbindung kommt es zu Heterodimerisation von gp130 und einem gp130 verwandten Protein: die LIFR oder OSM  $\beta$ -Kette. Für OSM und LIF scheint die Bildung eines Heterodimers ausreichend für Signaltransduktion zu sein, auch sind ihre Rezeptoren in den meisten Geweben expremiert, was dazu führt, dass sie zum Teil gleiche signaltransduzierende Moleküle benutzen. CNTF benötigt eine CNTF-R- $\alpha$ -Kette, seine Expression ist auf Neurone und Neuroglia reduziert. Obwohl hier unterschiedliche Zytokine die gleiche  $\beta$ -Untereinheit teilen, zeigen sie wenig Redundanz in ihren Aufgaben und Wirkungsfeldern [4, 27, 31], was wahrscheinlich auf ihre unterschiedliche Rezeptorexpression zurückzuführen ist [49].

### 1.1.3.3 Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ermöglichen die Signaltransduktion des Interleukin-6 Rezeptors

Wie erwähnt verfügt der IL-6 Rezeptor über keine eigene Kinasedomäne und ist somit auf die Aktivität assoziierender Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (NRTK) angewiesen, welche Tyrosinreste phosphorylieren und somit die Signalübertragung initiieren. Für den IL-6 Rezeptor konnte eine Familie von NRTKn, die **Janus-Kinasen** identifiziert werden. Einige Mitglieder dieser Familie (Jak1, Jak2 und Tyk-2) assoziieren konstitutiv mit der Rezeptoruntereinheit gp130. Sie phosphorylieren nach IL-6 Stimulation gp130 [41]. Die Janus-Kinasen assoziieren mit vielen Zytokin-Rezeptoren. Wie auch im Falle von gp130 brauchen sie eine spezifische Bindungssequenz, Box1/Box2 (Abb.1.1.3.2), welche hoch konserviert und reich an Serin- und Prolinresten ist. Box1 und 2 sind proximal der Zellmembran angeordnet. Hibi et al. konnten zeigen, dass 61 Aminosäuren von gp 130 proximal der Zellmembran ausreichend sind, um durch IL-6 Zellproliferation zu stimulieren [27]. In dieser Sequenz finden sich Box1 und 2, welche unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen haben. Bestimmte Prolinreste in Box1 sind wichtig für eine hohe Affinität der Bindung der NRTKn an Rezeptoren, im Gegensatz zu Box 2, welche wiederum wichtig für die Kinaseaktivität der Janus-Kinasen ist [50]. Die Aktivierung der Janus-Kinasen nach Ligandbindung und Assoziation mit der  $\beta$ -Kette der obengenannten Rezeptorsystemen startet eine Signalkaskade, die kurz Jak-STAT-Signalweg genannt wird [41]. STAT (**s**ignal **t**ransducer and **a**ctivation of **t**ranscription) Proteine werden von den Janus-Kinasen an einem Tyrosinrest transphosphoryliert [51], formen anschliessend Homo- oder Heterodimere und binden nach Translokation in den Zellkern [52] an die Promotoren der Interferon kodierenden Gene, welche sie aktivieren [53]. Soweit sind 6 Mitglieder der STAT-Familie in Säugetierzellen gefunden worden. Die Familie wächst mit der Entdeckung von STATs im Genom von Drosophila. Der Jak-STAT-Signalweg wurde zunächst für die Interferon-regulierte Genexpression definiert. Bald stellte sich heraus, dass neben den Interferonen auch Zytokine wie IL-6, IL-3 oder GM-CSF STATs aktivieren und somit ihre Bindung an spezifische DNA-Sequenzen vermitteln [54]. Interleukin-6 aktiviert Stat3 und Stat1 nach Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste an gp130. Für beide Stats konnten Bindungsmotive an gp130 gefunden werden, die folgende Eigenschaften aufweisen: die Bindungsstellen sind charakterisiert durch einen phosphorylierten Tyrosinrest (Y) an Position 1 und einen Glutaminrest an Position Y+3. Zwei der fünf Bindungsmotive an gp130 weisen einen Prolinrest an Position Y+2 auf und alle besitzen eine platzsparende Aminosäure wie Serin oder Glycin an Position Y-1 [43, 44]. An diese Bindungsmotive binden die STATs mittels bestimmter Interaktionsmodule (SH2-Domänen), die später (1.3.2.2) detaillierter dargestellt werden. Über diese Bindungsmotive definieren die STAT Proteine ihre Spezifität. Zwischen den Mitgliedern der Jak- und STAT-Familie besteht keine spezifische Interaktion: verschiedene Janus-Kinase aktivieren ebenso verschieden STATs.

#### 1.1.4 Interleukin-6 und seine pathophysiologische Bedeutung

Die Dysregulation der Interleukin-6-Expression spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Eine exzessive Überproduktion von IL-6 kann bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen beobachtet werden.

Im Falle der rheumatoiden Arthritis werden proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-1 und TNF $\alpha$  in hoher Serumkonzentration gefunden; die Serumspiegel korrelieren mit der Schwere der Krankheit. Die Zytokine stimulieren die Leukozyteninfiltration und ihre Sekretion proteolytischer Enzyme über Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen, wie C-reaktives Protein, Serum Amyloid A, sowie Aktivierung von IL-8. Die gegenseitige Aktivierung der oben genannten Proteine führt zur Stimulation von Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten, was zur nachfolgenden Entzündung mit progressiver Zerstörung der Gelenke und anderen systematischen Symptomen der rheumatoiden Arthritis führt [55].

IL-6 hat auch einen proliferativen Effekt auf Tumorzellen des Angioblastisches Lymphoms, welcher aber nach Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 inhibiert werden kann [56].

Neben dem Angioblastisches Lymphom spielt IL-6 auch eine grosse Rolle in der Pathogenese des Castleman-Syndroms, bei dem die lokalisierte Form von der aggressiven multizentrischen Form unterschieden werden kann. Der Morbus Castleman gehört zu den lymphoproliferativen Krankheiten mit entzündlicher Reaktion und einer Hyperreaktionen der B-Lymphozyten. Im Mittelpunkt der Pathogenese dieser Krankheit steht die Dysregulation der IL-6-Produktion, welche zum grössten Teil in den Keim-Zentren der peripheren Lymphknoten stattfindet und dessen Serumkonzentration direkt mit der Schwere der klinischen Manifestation und Prognose korreliert. Hier kann das Fortschreiten der Krankheit durch Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 gehemmt werden [57].

IL-6 spielt auch eine grosse Rolle in der Pathogenese der Akute-Phase-Reaktion. Charakteristisch für diese Reaktion ist zum einen ihr klinisches Erscheinungsbild und zum anderen die Produktion der Akute-Phase-Proteine, welche in zwei Klassen eingeteilt werden. IL-6 und andere dem IL-6 ähnliche Moleküle wie LIF, IL-11, OSM, CNTF und CT-1 (Cardiotropin-1) induzieren die Produktion von Akute-Phase-Proteinen des Typ 2 wie Fibrinogen, Haptoglobin,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin,  $\alpha$ 1-Antitrypsin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin. Die Produktion von IL-6 und anderen Faktoren wird induziert durch Endotoxine, Sauerstoffradikale, Wachstumsfaktoren und Änderungen des Redoxstatus des Zellmilieus, was wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ -B und der Expression von IL-6 führt. Akute-Phase-Proteinen des Typ 1, wie Serum-Amyloid A, C-reaktives Protein, Komplementfaktor C3, Haptoglobin der Ratte und  $\alpha$ 1-Azides Glycoprotein werden durch IL-1 und andere dem IL-1 ähnlichen Moleküle wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  induziert [58]. IL-6 und dem IL-6 ähnliche Moleküle wirken synergistisch mit IL-1 und dem IL-1 ähnlichen Molekülen in der Induktion der Typ 1 Akute-

Phase-Proteinen. IL-1 und IL-1 ähnliche Moleküle induzieren aber nicht Akute-Phase-Proteine des Typ 2, vielmehr hemmen sie die Produktion der Akute-Phase-Proteine des Typ 2 [58].

IL-6 ist sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* der essentielle Wachstumsfaktor für Überleben und Proliferation von Tumorzellen des multiplen Myeloms, welche Rezeptoren für das Zytokin auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [13, 59]. Die durch IL-6 ausgelöste Proliferation der Myelomzellen ist durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmbar [14, 60]. Darüber hinaus hemmt IL-6 die spontane und sowie die durch Dexamethason induzierte Apoptose der Myelomzellen, was zum grossen Problem der „Multidrug Resistance“ in der Therapie dieser Krankheit verschlimmernd beiträgt [61].

Neben den hier aufgeführten Krankheitsbildern spielt IL-6 eine Rolle in der Pathogenese von AIDS (Autoimmun-deficiency-syndrom), Kaposi Sarkom, Mesangium-Glomerulonephritis, Osteoporose und Psoriasis [62]. Da IL-6 eine zentrale Rolle in der Pathogenese mehrerer Krankheiten, wie das multiplen Myeloms zu spielen scheint, wächst das Interesse an den biochemischen und physiologischen Wirkungen des Zytokins, um neue potentielle therapeutische Ansätze zu entwickeln.

### **1.1.5 Interleukin-6 und das multiple Myelom**

#### 1.1.5.1 Definition des multiplen Myeloms

Das multiple Myelom (MM) ist ein monoklonaler B-Lymphozyten-Tumor mit diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks durch maligne transformierte Plasmazellen. Diese B-Zellen produzieren monoklonale Immunglobuline einer Klasse G, A, D oder E und/oder Bruchstücke dieser Immunglobuline: schwere H-Ketten (IgH) oder leichte L-Ketten (IgL) in monomerer oder oligomerer Form = Bence-Jones-Proteine. Diese Proteine tragen wie jedes Immunglobulinmolekül in ihrem variablen Teil eine individuelle idiotypische Konfiguration und erscheinen als Paraproteine im Serum und/oder Urin. Anhand des individuellen Idiotyps ist es möglich, Zellen aus der frühen Entwicklungsreihe des malignen B-Lymphozytenklons im zirkulierenden Blut zu identifizieren [63]. Das multiple Myelom ist für 1% der durch Neoplasien verursachten Todesfälle in der westlichen Hemisphäre verantwortlich. Die Ursache der Erkrankung ist bis heute nicht genau bekannt [64].

#### 1.1.5.2 Die Biologie normaler und maligner Plasmazellen

Die Reifung von Plasmazellen Gesunder findet vor allem im Knochenmark statt. Bis dato weiss man nur wenig von der normalen Plasmazelldifferenzierung, da es nicht allzu viele Antikörper gibt, die spezifisch Plasmazellen erkennen. Hinzu kommt, dass das Plasmazellkompartiment im Knochenmark normalerweise sehr klein, unter 0,25% ist. Stimulation von reifen B-Lymphozyten durch Antigene führt zur Proliferation und Differenzierung dieser

Zellen zu Memory B-Zellen und Plasmablasten. Der Plasmablast differenziert zur sogenannten kurzlebigen Plasmazelle, welche im Lymphknoten verbleibt und, wenn nicht durch Antigen Kontakt stimuliert, nach circa 3 Tagen abstirbt. Die produzierten und sezernierten Antikörper dieser Plasmazellen gehören meist der IgM-Klasse an. Plasmablasten können aber auch, nach Aktivierung durch Antigene oder von T-Lymphozyten sezernierten Zytokinen, im Keimzentrum des Lymphknotens zur Hypermutation ihrer Gene für die schweren und leichten Ketten stimuliert werden. Diesen Vorgang nennt man somatische Hypermutation. Dadurch wechselt die Produktion von Immunglobulinen der Klasse M zur Klasse G oder A und ist somit für den Reifeprozess der wachsenden Antikörperaffinität verantwortlich. Die somatische Hypermutationsrate wird auf  $10^3$  pro Basenpaar in der V-Genregion geschätzt, was  $10^3$  bis  $10^4$  mal höher ist als die spontane Mutationsrate in Säugetiergenen. Plasmazellen, welche nicht an Antigene binden, sterben ab. Die Hypermutation wird durch Antigen-Stimulation initiiert und führt zur Produktion von schweren Ketten der Klassen  $\gamma$ ,  $\alpha$ , und  $\epsilon$  ("Heavy Chain Class Switching") durch Rekombination in der (rekombinierten) VDJ-Region mit einer *down-stream* liegenden C-Region, welche für die verschiedenen Schwere-Kette-Klassen kodiert. Diese reifen Plasmazellen wandern dann zum Knochenmark, um mit den dortigen Stromazellen Kontakt aufzunehmen und durch Zytokine wie IL-6 und den Kontakt mit Adhäsionsmolekülen zu lang lebenden Plasmazellen mit einer Überlebenszeit von ca. 30 Tagen zu differenzieren [65, 66]. Ein kleiner Anteil der langlebenden Plasmazellen im Knochenmark, weniger als 1% der mononukleären Zellen, produzieren den grössten Anteil des IgG und IgA im Serum. Die tägliche Antikörperproduktion dieser Zellen beträgt ca. 1 ng pro Zelle. Diese ausdifferenzierten Plasmazellen teilen sich nicht mehr und exprimieren phänotypisch vor allem CD38, Syndecan-1, CD56 und kaum detektierbar CD19 [67].

Myelomzellen dagegen sind blastisch erscheinende Plasmazellen, lokalisieren im Knochenmark mit Stromazellen, und sind phänotypisch charakterisiert durch Oberflächenmoleküle wie CD38, Syndecan-1 und CD56. Die genetische Charakterisierung multipler Myelomzellen zeigte, dass die Rekombination der schweren Ig-Kette in der hypervariablen Region patientenspezifisch ohne intraklonale Variationen stattfindet. Deletionen in dieser Region schliessen eine Rekombination mit nachfolgender Genvielfalt aus und scheinen ein für das multiple Myelom typisches Phänomen zu sein [65, 66]. Anhand dieser Charakterisierung wird nun angenommen, dass klonogene Myelomzellen von B-Zellen von dem Post-germinalen Stadium im Lymphknoten oder von einer plasmablastischen Zelle abstammen, welche beide die Rekombination der schweren Kette auf ihrem Weg zur B-Zell Differenzierung vollzogen haben [68]. Durch die Adhäsion der Myelomzellen mit den Stromazellen wird die Expression von IL-6 durch die Stromazellen induziert. Die Stromazellen des Knochenmarks scheinen eine wesentliche Rolle in der parakrinen IL-6-Produktion zu spielen, was zu den exzessiven Serumspiegel des Zytokins führt. Myelomzellen sind lang lebende Plasmazellen mit einem geringen Labeling Index (LI = 1-2%). Die rekombinierten Gene der Immunglobuline zeigen exzessive, somatische Hypermutation ähnlich wie die langlebenden Plasmazellen nach Antigenstimulation. Die Antikörperproduktion der Myelomzellen ist um einiges geringer und

bewegt sich bei den meisten Patienten im Pictogramm Bereich pro Zelle pro Tag. Die somatische Mutation der Immunglobulingene dieser Zellen geben Hinweis auf den Ursprung dieser Zellen und es scheint, dass 1.) die Vorläuferzellen durch Antigene stimuliert werden und entweder B-Memory-Zellen oder migrierende Plasmazellen sind und 2.) das onkogene Ereignis wahrscheinlich nach der Differenzierung zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle oder unabhängig davon stattfindet [65, 67].

#### 1.1.5.3 Karyotypische Anomalien

Karyotypische Anomalien in Myelomzellen werden in 30-50% der Fälle gefunden. Dabei hängt die Häufigkeit und das Ausmass von Stadium, Prognose und Therapieerfolg ab. Chromosomenanomalien finden sich in bis zu 20% in Stadium I der Krankheit und bis zu 60% in Stadium III. Bei Auftreten extramedullärer Tumoren finden sich karyotypische Anomalien bis zu 80%. Als charakteristische numerische Anomalie finden sich eine Monosomie 13 und Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15 und 19. Strukturelle Abnormitäten betreffen meist Chromosom 1 ohne dabei einen spezifisch Locus zu betreffen. (Der 14q32 (IgH, Heavy-Chain-Locus) Locus ist in 20-40% der Fälle, der 11q13 (bcl-1 Locus) Locus in ca. 20% der Fälle betroffen.) In fast allen Patienten finden sich Myelomzellen aneuploid, wobei die Zellen häufiger hyperploid als hypoploid sind, und die Chromosomen meistens numerische und strukturelle Abnormitäten aufweisen [65, 67].

#### 1.1.5.4 Translokationen

Wie wir heute wissen entstehen B-Lymphome oft durch Aktivierung eines Onkogenes ausgelöst durch Translokationen, welche meist den IgH-Lokus (14q32.3) oder weniger häufig die Loci für die Leichten Ketten IgL (2q12, kappa oder 22q11) betreffen. Die Translokation 14q32 findet sich in 20-40% der Myelom Patienten, wobei die Zahl bei extramedullärer Erkrankung noch höher ist. In 30% dieser Translokationen ist das Partner-Lokus 11q13, welche für die Gene Bcl-1 und Cyclin D1 kodieren, was eine Inaktivierung des Tumorsupprimierenden Retinoblastom-Proteins Rb durch Überexpression von Cyclin D1 zur Folge haben kann. 25% der Translokationen des IgH-Lokus betreffen das telomerische Ende von Chromosom 4, was wiederum zur Dysregulation des Onkogenes FGFR3 (Fibroblasten Growth Faktor 3) führt. Die restlichen 50% der Fälle involvieren verschiedene Translokationspartner, die noch nicht systematisch eingeteilt werden können. Unter anderem finden sich Translokationen, welche das Proto-Onkogen c-myc (8q24) oder das Anti-Apoptose Gen Bcl-2 (18q21) betreffen. Alle weiteren, identifizierten Translokationen konnten bisher nur einmalig in den untersuchten Tumoren nachgewiesen werden, wie z.B. 1p13, 1q21, 3p11, 7q11, 12q24, 16q23 und 21q22 [65].



### 1.1.5.5 Genetische Ereignisse führen zu Wachstumsfaktor unabhängiger Proliferation und negative Regulation der Apoptose der Myelomzellen

Chromosomale Aberrationen der Myelomzellen nehmen mit Progression der Erkrankung zu, was die Myelomzellen zunehmend in die Lage versetzt, unabhängig vom Knochenmarkstroma zu proliferieren.

#### p21Ras

Die humane p21ras Proto-Onkogen Familie besteht aus Ha-, Ki- und N-ras, welche ein 21 kDa schweres Protein kodieren. Die onkogene Form von p21ras konnte bisher in vielen humanen Tumoren mit verschiedener Häufigkeit nachgewiesen werden: 0% beim Phäochromozytomen, bis zu 50% bei colorektalen Tumoren und sogar zu 90% bei Karzinomen des endokrinen Pankreas [69]. Das Auftreten von Mutationen der Ras-Gen-Familie in Myelompatienten wächst mit Dauer der Erkrankung. Mutationen von N- und Ki-ras finden sich kaum bei solitären Plasmozytomen oder Monoklonalen Gammopathien, treten aber zu 9-30% im multiplen Myelom auf. Dort vor allem in terminalen Stadien oder bei Patienten mit Plasmazelleukämie (63.6-70% der Fälle). Dabei finden sich Mutationen im 61. Kodon von N-ras häufiger als im 12., 13. oder in K-ras [70]. Darüber hinaus finden sich Beispiele für die Bedeutung der Ras-Gen-Familie in verschiedenen Myelomzelllinien. Überexpression von H- oder N-ras in immortalisierten B-Lymphoblasten führt zu maligner Transformation und plasmazytoider Differenzierung dieser Zellen. Auch können IL-6 abhängig wachsende Myelomzelllinien, wie z.B. die Zelllinie ANBL6, durch Transfektion einer konstitutiv aktivierten Form von N-ras zu IL-6 unabhängigen Wachstum transformiert werden. Diese konstitutiv aktivierte Form von N-ras entsteht durch den Austausch von Glutamin mit Arginin im Kodon 61 und führt auch zu einer Abnahme der Apoptose von Zellen nach Entzug von IL-6 [65].

#### Bcl-2

Bcl-2 ist ein Membranprotein, welches mit der äusseren Membran der Mitochondrien und des Zellkerns und dem endoplasmatischen Retikulum verbunden ist und Apoptose reguliert. Überexpression von Bcl-2 in Tumorzellen resultiert in Resistenz dieser Zellen zu Chemotherapeutika und blockiert Apoptose. Zur Bcl-2 Familie gehören eine Reihe von Proteinen mit unterschiedlichen Aufgaben in der Regulation von Apoptose. Als negative Regulatoren der Apoptose kennt man Bcl-XL, Mc1-1, NR-13, A1, Bcl-W und als Positivregulatoren gelten Bax, Bcl-XS, Bak und Bad. Bcl-2 formt entweder aktivierende oder inaktivierende Heterodimere mit diesen Proteinen der Bcl-2 Familie. In B-Zell Neoplasien finden sich zu mehr als 80% Translokationen des Typs t(14;18) welche eine Überexpression von Bcl-2 zur Folge haben. Diese Translokation wurde aber nur bis zu 15% im multiplen Myelom nachgewiesen, obwohl eine Überexpression von Bcl-2 in den meisten Myelomzelllinien nachgewiesen werden kann. Man vermutet, dass hohe Zellkonzentrationen von Bcl-2 für eine

Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose (ausgelöst durch Dexamethason, IL-6-Entzug, Stauroporine oder andere Substanzen) verantwortlich ist [65].

### p53

p53 gilt als ein Tumorsuppressorgen, welches die Transkription bestimmter Gene aktiviert oder inhibiert. Überexpression von Wildtyp p53 in Tumorzellen resultiert in einem Verharren des Zellzykluses in der G1 Phase und nachfolgender Apoptose. Die Rolle von p53 im Zellzyklus ist bis heute besser definiert als seine Rolle in der Apoptose. p53 induziert die Transkription von p21<sup>WAF1/CIP1/Sdi1</sup>, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinasen CDK 2,3,4 und 6, was den Zellzyklus hindert in die Mitose einzutreten und in G1 verharren lässt. Dies führt dann zur Apoptose. p53 scheint einen regulierenden Einfluss auf die Bcl-2 Familie auszuüben. Im Bcl-2 Gen konnte ein die Bcl-2 Expression negativ regulierendes Bindungsmotiv für p53 identifiziert werden. Im multiplen Myelom finden sich p53 Mutationen gehäuft im terminalen Stadium: 5% beim inaktiven Myelom aber dann zu 20-40% in der akuten Plasmazelleukämie.

### Retinoblastom (Rb)-Gen

Das Retinoblastomgen gehört wie auch p53 zur Familie der Tumorsuppressor-Gene und spielt eine Rolle in der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung (siehe dazu auch 1.3.1.). pRb ist ein phosphoryliertes, nukleäres Protein, welches den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus durch Suppression der E2F übermittelten Transaktivierung verschiedener an der DNA Synthese beteiligten Gene wie *c-myc*, *b-myc*, *cdc-2*, Dihydrofolat Reduktase und Thymidinkinase vermittelt. Die pRb Funktion ist reguliert durch Phosphorylierung. Schwach oder unphosphoryliertes pRb ist aktiviert und bindet an E2F und induziert somit ein Verharren des Zellzykluses in der G1-Phase. Phosphoryliertes pRb dagegen kann nicht an E2F binden und der Zellzyklus schreitet in die S-Phase fort [71]. Mutationen des Retinoblastom-Genes konnten bis heute in 70% der Myelom-Patienten und bis zu 80% in Myelomzelllinien gefunden werden. Das Protein wird meist in seiner inaktiven phosphorylierten Form überexprimiert gefunden.

### P16<sup>INK4A</sup>

P16<sup>INK4A</sup> bindet an Cyclin D-CDK4 und CyclinD-CDK6 und inhibiert so die Progression von der G1 Phase in die S-Phase. Verlust des Proteins hat anti-apoptotische Auswirkungen im Zellzyklus. Tasake et al. konnten nachweisen, dass das p16-Gen in Myelom Zelllinien (U-266, RPMI8226) komplett methyliert war und in einer weiteren Myelomzelllinie (IM-9) zum Teil, was in beiden Fällen zu keiner oder schwachen Expression des Proteins führte [72].

### MDM2

MDM2 (murine double minute 2) Protein unterstützt durch Aktivierung von E2F-1 und durch Suppression von p53 die Progression von der G1-Phase in die S-Phase. Teoh et al. zeigten,

dass MDM2 im Knochenmark in Myelomzellen im Gegensatz zu den mononukleären Zellen expremiert ist. Expression von MDM2 wurde daraufhin durch Antisense-Oligonukleotide unterbunden, was in den Myelomzellen zum Verharren der Zellen in G1 mit nachfolgender Apoptose führte [73].

## **1.1.6 Die Bedeutung von Interleukin-6 für das multiple Myelom**

### 1.1.6.1 Die Tumorzellen des multiplen Myeloms

Der Differenzierungs- und Proliferationsprozess der gesunden B-Lymphozyten zu einer Immunglobulinproduzierenden Plasmazelle ist zum grössten Teil noch unklar (siehe dazu auch 1.1.5.2.). Man weiss, dass sogenannte plasmablastische Zellen als Vorläuferzellen unter IL-6, IL-5, IL-3 und GM-CSF proliferieren und unter IL-6, IL-4 und IL-3 weiter differenzieren [74-77]. Die Proliferation und Differenzierung von Myelomzellen ist, wie die der B-Lymphozyten, von Zytokinen (Wachstumsfaktoren) abhängig, die sowohl intramedullär von Stromazellen als auch extramedullär z.B. von T-Lymphozyten produziert werden. IL-6 ist, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* der Hauptwachstumsfaktor für das multiple Myelom [14, 59]. Es bindet dabei an den IL-6 Rezeptor der Myelomzellen [78]. Bei physiologischer Expression des IL-6 Rezeptors finden sich  $10^2$ - $10^3$  Rezeptoren per Zelle von aktivierten B-Lymphozyten, ruhender T-Lymphozyten und verschiedener Hepatom- und Myelomzelllinien. Auf Myelomzelllinien wie U-266 können bis zu  $1-2 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle gefunden werden [62]. Die durch IL-6 ausgelöste Proliferation der Myelomzellen ist durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmbar [14, 60].

Zytologische Studien, die Heterogenität der Tumormasse des Plasmazell-Kompartimentes untersuchten [79] fanden heraus, dass bei Patienten mit inaktiver, stabiler Erkrankung plasmazytische Zellen (PcC) vorherrschen, die als Immunglobulinproduzierende Myelomzellen reif, entdifferenziert und nicht mehr zur Mitose fähig sind. Bei Patienten im aktiven Stadium der Krankheit finden sich neben PcC auch Plasmablastische Zellen (PbC), deren Anteil im Endstadium der Krankheit zunimmt. Die PbC verfügen über ein hohes proliferatives Potential und können nur in Abhängigkeit von IL-6 proliferieren, dessen Plasmakonzentration linear mit dem Krankheitsverlauf ansteigt [80, 81].

IL-6 stimuliert darüber hinaus auch die Aktivität der Osteoklasten, was durch die zahlreichen osteolytischen Defekte mit nachfolgender Hyperkalzämien deutlich wird. Unterstützt wird die Osteolyse durch das Knochenmarksstroma, welches seinerseits TNF und IL-1 sezerniert und dadurch die Osteoblasten zur IL-6 Produktion stimuliert [60, 82].

### 1.1.6.2 IL-6: parakriner oder autokriner Wachstumsfaktor im multiplen Myelom ?

Ob die IL-6-Produktion vermehrt autokrin oder parakrin stattfindet ist immer noch sehr umstritten, wobei die Mehrzahl der Berichte die Hypothese der vorherrschend parakrine Produktion unterstützen. Die autokrine Theorie wird aber durch zwei wesentliche Punkte gestützt: 1.) IL-6 konnte im Zellüberstand von Myelomzellen nachgewiesen werden und 2.) das Wachstum von Myelomzellen konnte durch Gabe von monoklonalen Antikörper gegen IL-6 oder IL-6-Antisense Oligonukleotide gehemmt werden [59, 83]. Zum ersten Punkt ist zu bemerken, dass bei diesen Experimenten keine reinen Zellisolate verwendet wurden und dass die entdeckte autokrin produzierte IL-6-Menge verschwindend gering war verglichen mit parakrin gemessenen Mengen. In einer anderen Studie wurde nach aufwendigen Sortverfahren unter  $10^6$  Myelomzellen eine autokrin produzierende Zelle gefunden, und es wurde postuliert, dass unreife Myelomzellen IL-6 autokrin als Differenzierung -und Proliferationsfaktor produzieren [84]. Bedenkt man aber, dass die sezernierte IL-6-Menge eines einzigen Osteoklasten 10pg IL-6 in 24 Stunden beträgt, was der produzierten IL-6-Menge von  $2 \times 10^5$  Myelomzellen entspricht [85], wird verständlich, dass Kontaminationen mit Osteoklasten oder anderen IL-6 sezernierenden Zellen solche Ergebnisse verfälschen können. Ein weiteres Argument, das sowohl die autokrine als auch parakrine Produktion unterstützt, ist die Tatsache, dass exogenes IL-6 zu endogener IL-6-Produktion führen kann. Dies geschieht durch die Aktivierung nukleärer Faktoren wie NF-IL-6 [86]. Bis dato ist nur eine einzige autokrine Zelllinie beschrieben worden: die U266-Zelllinie, welche ursprünglich als IL-6 abhängige Zelllinie beschrieben wurde und durch Mutationen *in vitro* autonom, d.h. IL-6 unabhängig wachsend und somit autokrin in der IL-6-Produktion wurde [87]. Darüber hinaus lassen sich keine Hinweise auf eine fehlregulierte IL-6-Gen-Expression in Myelomzellen in der Literatur finden.

Vieles spricht dagegen für ein Überwiegen der Parakrinen Produktion: 1. Von Patienten mit extramedullärer Proliferation können reproduzierbar Myelomzelllinien isoliert werden, welche abhängig von exogenem IL-6 wachsen; 2. In Myelompatienten findet sich ein hoher Spiegel an IL-6 mRNA, welche vor allem von monozytären und myeloischen Zellen exprimiert wird und nicht von isolierten Myelomzellen; und 3. Stromazellen des Knochenmarks von Myelom Patienten produzieren eine höhere Menge an IL-6 nachdem sie mit Myelomzellen in Kontakt kommen, als Stromazellen Gesunder. Wobei das Knochenmark von Myelom Patienten auch eine höhere Anzahl von Osteoklasten besitzt als das Knochenmark Gesunder [85, 88]. Darüber hinaus können Stromazellen von Myelom Patienten das Wachstum muriner zytokinabhängiger Zellen besser unterstützen als Stromazellen von Gesunden [85].

### 1.1.6.3 IL-6 ist der Hauptwachstumsfaktor für plasmablastische Zellen *in vitro* und *in vivo*

Klein et al. demonstrierten, dass bei Myelompatienten des fulminanten Stadiums die höchsten IL-6-Spiegel in frisch isolierten Zellen des KM-Stromas gefunden werden können [13]. Bestätigt wurde dies von Portier et al. durch Messungen der IL-6mRNA [89]. Klein et al.

konnten darüber hinaus zeigen, dass isolierte Zellen aus dem Knochenmark multipler Myelom Patienten in 50% der Fälle nach einigen Tagen in Kultur spontan proliferierten. Bei gleichen Patienten konnten proliferierende Myelomzellen auch *in vivo* nachgewiesen werden. Bei diesen Patienten war der vorherrschende Zelltyp plasmablastisch. Bei Patienten deren isolierte Myelomzellen nicht spontan *in vivo* proliferierten, handelte es sich um Patienten mit inaktiver Krankheit bei denen *in vivo* vor allem plasmazytische Zellen nachgewiesen werden, die zur Mitose nicht mehr fähig waren [13]. Die Bedeutung von IL-6 als Hauptwachstumsfaktor für das multiple Myelom wird, wie schon erwähnt, dadurch unterstützt, dass IL-6 abhängigen Myelomzellen reproduzierbar aus Patienten mit extramedullärer Krankheit isoliert werden können. Diese Zelllinien besitzen einen plasmablastischen Phänotyp mit zugehöriger Zytologie. Zu Zeiten, als rekombinantes IL-6 noch nicht erhaltbar war, war es fast unmöglich diesen Phänotyp in Kultur zu halten und die meisten isolierten Zelllinien aus dieser Zeit waren IL-6 unabhängig. IL-6 abhängige Zelllinien können nur von Patienten des terminalen Stadiums mit extramedullären Myelomzellproliferation isoliert werden [90].

IL-6 ist der Hauptwachstumsfaktor des multiplen Myeloms *in vivo*. Klein et al. versuchten deswegen herauszufinden ob die Gabe von monoklonalen IL-6 Antikörpern Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben würde. Zehn Myelompatienten im terminalen Stadium wurden mit monoklonalen Anti-IL-6 Antikörpern täglich intravenös für 4-60 Tage behandelt. Die Höhe der Dosis wurde an eine *in vitro* inhibitorisch wirkende Dosis angeglichen. Bei drei der zehn behandelten Patienten schritt nach einer Woche Behandlung der Krankheitsverlauf rapide fort, obwohl zwei der Patienten eine Proliferationshemmung der plasmablastischen Zellen von 80-90% entwickelten. Von den verbleibenden sieben Patienten zeigten drei eine komplette Hemmung der Produktion von C-reaktiven Protein, was mit einer Reduktion der Tumormasse von 30-50% verbunden war. Die vier Patienten, welche keine Normalisierung von C-reaktiven Protein zeigten, entwickelten eine rapide Verschlechterung des Myeloms. Die Gabe der Anti-IL-6 Antikörper bewirkte einen Rückgang des Fiebers in allen der behandelten Patienten, in sieben Patienten Verschlechterung der Thrombozytopenie und führte bei dreien zu milder Verschlechterung der Neutropenie [85].

#### 1.1.6.4 Die Rolle des Knochenmarkstromas in der Pathogenese des multiplen Myeloms

Es wird angenommen, dass die malignen B-Zellen des multiplen Myeloms im peripheren Blut die Vorläuferzellen der malignen Knochenmarkszellen darstellen. Zirkulierende Plasmazellen finden sich selten im multiplen Myelom und sind assoziiert mit fortschreitender Plasmazelleukämie, welche sich in einigen der Patienten entwickelt. Es ist deshalb von grosser Notwendigkeit das Zusammenspiel von Myelomzellen mit Oberflächenmatrixproteinen und Knochenmarkstromazellen zu verstehen, da diese Interaktionen für Tumorzellokalisation und Tumorwachstum im Knochenmark verantwortlich sind. Normale Plasmazellen exprimieren eine Reihe von Oberflächenantigenen wie CD9, CD10 (CALLA), CD19 (B4), CD20 (B1), CD23, CD40, Klasse II MHC Proteine und membranäre Immunglobuline [66]. Frühe lymphoplasmazytoide Plasmazellen exprimieren darüber hinaus CD38, CD22, CD35, IgE

Oberflächenrezeptoren und intrazytoplasmatische Immunglobuline (Leichte Ketten). Subpopulationen reiferer Plasmazellen dagegen zeigen ein sehr heterogenes Bild von Oberflächenrezeptoren. So finden sich auf diesen Zellen frühe B-Zell Antigene wie CD19, CD20 und CD10 neben myeloischen Antigenen wie CD13, CD33, HLA-DR, CD45 und Adhäsionsmoleküle wie CD11b und CD11a. Myelomzellen folgen diesem Oberflächenexpressionsmuster und exprimieren z.B. klonabhängig Oberflächenmoleküle typisch für frühe B-Zell Reifungsstufen wie CD10, CD34, CD38, CD19, CD20 und CD24. Myelomzellen exprimieren eine Reihe von Adhäsionsmolekülen auf die im Einzelnen nicht eingegangen werden kann. Die Adhäsion von normalen B-Zellen oder Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen wird vor allem durch VLA-4 (Very Late Antigen) für B-Zellen und durch VCAM-1 (Vascular-Cellular-Adhesion-Molecule) für Myelomzellen vermittelt. Knochenmarksstroma besteht zum Großteil aus Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen. Sowohl die Adhäsion von B-Zellen als auch die von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen stimuliert die gesteigerte Sekretion von IL-6 durch die Stromazellen. Die Wirkung von IL-6 ist aber unterschiedlich für beide Zelltypen. In B-Zellen führt sie zu Differenzierung der Zellen und in Myelomzellen induziert sie Proliferation und blockiert Apoptose. Adhäsion von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen kann partiell durch Antikörper gegen  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine geblockt werden, was daraufhinweist, dass Interaktionen zwischen VLA-4 und VCAM-1/Fibronektin und zwischen LFA-1 und ICAM-1 eine Rolle in der Bindung von Myelomzellen an das Knochenmarkstroma spielen. Darüber hinaus ist interessant, dass Myelomzellen keine Adhäsionsmoleküle exprimieren, welche an Kollagen oder Laminin binden, wie VLA-2 und VLA-6. Dafür exprimieren Myelomzellen im Gegensatz zu Plasmazellen NCAM und LFA-3 (CD58). Plasmazelleukämiezellen hingegen verlieren NCAM, was auf den Verlust dieses Antigenes mit dem Fortschreiten der Krankheit hinweisen könnte. NCAM scheint die Interaktion der Zellen untereinander zu vermitteln. Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen Oberflächenmolekülen ermöglicht die Kommunikation der Myelomzellen mit dem Knochenmark [65, 68]. In einem murinen Knochenmarks Metastasenmodell war die Expression von CD44, VLA-4 und ICAM-1 notwendig, damit die Myelomzelllinie B9/BM1 an Stromazellen adhären konnten. Darüber hinaus triggert Adhärenz von Myelomzellen an Stromazellen die IL-6-Sekretion dieser Zellen. Partielles Blockieren der Zellkontakte zwischen Stromazellen und Myelomzellen durch Integrin  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Antikörper führte zu einer signifikant niedrigeren IL-6-Produktion der adhären Knochenmarkszellen [91]. Dies wurde auch durch eine weitere Studie bestätigt in der gezeigt wurde, dass eine Bindung von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen die Induktion des IL-6-Genes induziert, was durch NF- $\kappa$ B Bindung an den IL-6-Promoter gezeigt werden konnte [92]. Darüber hinaus führt die Stimulation von CD40 durch den CD40-Liganden zur Sekretion von IL-6 in Knochenmarkstromazellen (parakrine IL-6 Produktion) und in Myelomzellen (autokrine IL-6 Produktion). Zell Kommunikation, die durch CD40 vermittelt, existiert für B-Zellen, welche CD40 exprimieren und T-Zellen, welche CD40 Ligand exprimieren. CD40 ist ein Oberflächenmolekül der Pro-B-Zellen oder einer Reihe von Tumorzellen des Non Hodgkin Lymphoms, der akuten lymphatischen Leukämie, der chronischen lymphatischen Leukämie, der

B-Zell Haarleukämie und des multiplen Myeloms [93]. Die Herkunft von CD40 Ligand im Knochenmark ist nicht bekannt, da der CD40 Ligand von peripheren T-Zellen expremiert wird. Es ist aber nicht bekannt ob der Ligand von Stromazellen des Knochenmarkes expremiert wird. Interessanterweise findet sich auch parakrine IL-6-Sekretion ausserhalb des Knochenmarks. Nach Separierung von peripheren Blutzellen in T-Zell- und nicht-T-Zellkompartimente konnten hohe IL-6-Spiegel sowohl in der monozytenreichen nicht-T-Zellfraktion als auch in der T-Zellpopulation gemessen werden. Hierbei war in einer Studie die IL-6-Sekretion von Phytohemagglutinin stimulierten T-Lymphozyten höher in T-Zellen von Myelompatienten als in Gesunden, was auf einen myelomspezifisches Signalereignis in den T-Zellen durch Oberflächenmoleküle wie z.B. CD40 hinweisen könnte [94, 95].

#### 1.6.2.5 Weitere Wachstumsfaktoren im multiplen Myelom

#### ***Stimulierende Wachstumsfaktoren im multiplen Myelom***

##### CNTF, IL-11, LIF und OSM

Die  $\beta$ -Kette des IL-6-Rezeptors wird wie oben schon erwähnt von vier weiteren Zytokinen benutzt, CNTF, IL-11, LIF und OSM. Zhang et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass diese Zytokine die Proliferation von zwei IL-6 abhängig wachsenden Zelllinien (von Patienten isolierten Myelomzellen) stimulierten, indem sie Signale über die IL-6- $\beta$ -Kette (gp130) transferierten. Diese Myelomzellen expremierten gp190 des LIF-Rezeptors. Offensichtlich führte die Stimulation der Myelomzellen mit diesen Zytokinen nicht zu Änderungen der Morphologie der Zellen [96]. OSM scheint darüber hinaus autokrin von Myelomzellen produziert zu werden. Westendorf and al. behandelten zwei Myelomzelllinien mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 und gp130. Die Proliferation der KP-6 Zelllinie war nicht inhibierbar durch Anti-IL-6-Antikörper im Gegensatz zu dem Effekt der Anti-gp130 Antikörpern. Daraufhin wurden die Zellen mit Anti-OSM Antikörpern inkubiert, worauf ein anti-proliferativer Effekt gefunden werden konnte, was auf eine autokrine OSM Produktion dieser Myelomzelllinien hinweist [97]. Die autokrine Schleife der OSM Produktion und Stimulation proliferativer Signale durch OSM in Myelomzellen kann wahrscheinlich auch durch IL-10 induziert werden. IL-10 induziert die Expression des LIF-Rezeptorkomplexes, über welchen dann OSM proliferative Signale in die Zelle transferieren kann. Gu et al. konnten dies für etablierte und von Patienten isolierte Myelomzellen zeigen, welche ohne IL-10 keinen LIF Rezeptorkomplex expremierten [98].

##### G-CSF

Der G-CSF-Rezeptor besteht aus einem Dimer (zwei gp130 Einheiten), welches grosse Ähnlichkeiten mit der  $\beta$ -Kette des IL-6-Rezeptors aufweist. Die Signaltransduktionswege von G-CSF sind ähnlich derer von IL-6; erwähnt sei hier vor allem die Induktion von NF- $\kappa$ B durch sowohl IL-6 als auch durch G-CSF. G-CSF ist ein potenter Proliferationsfaktor für

Myelomzellen *in vitro* und in Myelompatienten *in vivo*. Dieser Effekt kann jedoch durch Behandlung der Zellen mit Anti-IL-6 und Anti-IL6R Antikörper vermindert werden, was auf eine Vermittlerrolle von IL-6 hinweist. Das G-CSF-Gen wird in Myelomzellen *in vivo* expremiert und das Zytokin findet sich erhöht im Serum von Myelompatienten [85].

### INF- $\alpha$

Bevor IL-6 als der Hauptwachstumsfaktor für das multiple Myelom entdeckt wurde galt INF- $\alpha$  als der wichtigste Wachstumsfaktor dieser Krankheit. In einer Studie stimuliert INF- $\alpha$  das Wachstum von Myelomzellen in 16-30% neu diagnostizierter Fälle und in 50% behandelter Fälle. Proliferation von Myelomzellen geschieht durch die Induktion der IL-6-Expression in diesen Zellen durch INF- $\alpha$ . Isolierte Zelllinien können in Kultur nach Behandlung mit INF- $\alpha$  zu autokrinen IL-6 produzierenden Zelllinien werden. Trotz des proliferativen Effektes auf Myelomzellen wurde INF- $\alpha$  in der Therapie verwendet, da es die Plateauphase der mit Chemotherapie behandelten Myelompatienten verlängert. Dieser Effekt kann aber auf einen inhibitorischen Effekt des Zytokins auf die vorherrschende monoklonale Zellpopulation zurückgeführt werden, da es die autokrine IL-6-Produktion dieser Zellen vorantreibt und somit das Voranschreiten in ein Rezidiv maskiert wird [85].

### IL-10

IL-10 gilt als wichtiger Differenzierungsfaktor von B-Zellen in Immunglobulin sezernierende Zellen. Seine Rolle als Zytokin im multiplen Myelom ist aber noch unklar. IL-10 fördert die spontane Proliferation von frisch isolierten Myelomzellen aus dem Knochenmark und einiger IL-6 abhängiger Myelomzelllinien. Dieser Effekt scheint unabhängig von IL-6 zu sein und führt auch nicht zu Differenzierung der Plasmablasten. Darüber hinaus ist der IL-10 Spiegel in Myelompatienten, wenn überhaupt anfärbar, geringer als 1pg/ml im Serum [85].

### Andere Faktoren

Das Knochenmarkstroma sezerniert auch IL-1 und TNF $\alpha$  und stimuliert somit Osteoblasten IL-6 zu sezernieren, welches dann Osteoklasten aktiviert und somit zu osteolytischen Defekten und Hyperkalziämien führt [60, 82]. Darüber hinaus ist IL-1 $\beta$  ein weitere potentieller Wachstumsfaktor für multiple Myelom Zellen. Die Expression von IL-1 $\beta$  findet in myeloische und polymorphonukleäre Knochenmarkstromazellen statt und führt zur Induktion der IL-6-Expression. Die IL-6-Gen-Expression wird aktiviert durch einen Signalweg, welcher Prostaglandin E2 als Signalmolekül benutzt und durch Cyclooxygenasehemmer wie Indometacin hemmbar ist [99]. Neben den bereits genannten Wachstumsfaktoren finden sich noch weitere Wachstumsfaktoren mit additiver IL-6-Wirkung: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3 und IL-5. Dabei wirken GM-CSF, IL-3 und IL-5 gemeinsam mit IL-6 stimulierend auf die Proliferation der Myelomzellen [60]. Dieser Synergismus ist wahrscheinlich durch die sich gleichende  $\beta$ -Untereinheit der jeweiligen Rezeptoren begründet [100].



Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mindestens acht Zytokine Wachstumsfaktoren für das multiple Myelom *in vitro* darstellen. Dazu gehören die gp130 aktivierenden Zytokine LIF, OSM, CNTF und IL-11 und die Aktivierung der gp130 verwandten Rezeptorketten des G-CSF Rezeptors, IFN- $\alpha$  und IL-10. Die Redundanz dieser Zytokine liegt höchstwahrscheinlich darin begründet, dass die aktivierten Signalwege sich sehr ähneln oder zum Teil identisch sind. Darüber hinaus muss hervorgehoben werden, dass die Konzentration von biologisch aktiven IL-6 *in vivo* und *in vitro* 500-5000 fach höher ist als andere Wachstumsfaktoren im multiplen Myelom.

### ***Inhibitorisch wirkende Zytokine im multiplen Myelom***

Einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Myelomzellen wird durch IFN- $\gamma$  erreicht. IFN- $\gamma$  nimmt keinen Einfluss auf die endogene IL-6-Produktion sondern führt zu einer Runterregulierung von gp80 des IL-6-Rezeptors auf Myelomzellen. Portier et al. berichteten von einer Abnahme der gp80mRNA bis zu 90% in humanen Myelom Zelllinien [101]. Auch IFN- $\beta$  zeigt inhibitorischen Effekt auf die Proliferation multipler Myelom Zellen. Die Myelomzelllinie U266 wurde mit IFN- $\beta$  inkubiert bevor sie mit IL-6 stimuliert wurden. Die Prestimulation mit IFN- $\beta$  führte zu einer Beeinträchtigung der durch IL-6 induzierten Signaltransduktion. Die Tyrosinphosphorylierung von gp130, Jak2 und nachfolgende Bindung von Syp, Shc und Aktivierung von Ras schienen beeinträchtigt. Hierbei konnte aber als Ursache diesen Effektes die verminderte Expression des IL-6 Rezeptorkomplexes nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da der Proteingehalt von gp130 nur semiquantitativ durch eine Immunpräzipitation überprüft wurde. Der so gemessene gp130 Gehalt in den Zellen schien durch die IFN- $\beta$  Behandlung nicht beeinflusst zu sein [102].

#### 1.1.6.6 Interleukin-6 als ein Prognosefaktor des multiplen Myeloms

In verschiedenen klinischen Verlaufstudien konnte gezeigt werden, dass Myelompatienten mit ansteigendem IL-6-Spiegel im Krankheitsverlauf eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen [103, 104]. In einer Studie konnte mit einem sensitiven "sandwich-type-enzyme-linked-immunoabsorbent-assay" (ELISA) ein erhöhter IL-6 Spiegel in 42% der Patienten gefunden werden. Dieser erhöhter Serumspiegel war assoziiert mit einer deutlich verminderten 3-Jahresüberlebensrate [105]. Der Zytokinspiegel korreliert nicht linear mit der löslichen Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R). In einer weiteren finnischen Studie folgten Pulkki et al. 207 Myelompatienten verschiedener Krankheitsstadien und konnten keinen signifikanten Anstieg des sIL-6R,  $\alpha$ -1-Antitrypsin (s.AAT),  $\beta$ -2-mikrogobulin (s.B2m) und Thymidinkinase (TK) im Krankheitsverlauf finden, wohl aber eine Aussage über die Prognose der Patienten nach Einbezug aller weiteren gemessenen Parameter machen. Die Serumspiegel von sIL-6R, IL6, s.AAT, s.B2m und TK waren signifikant höher bei Patienten, die innerhalb von 3 Jahren verstarben [106].

Da IL-6 die Synthese von C-reaktivem-Protein (s.CRP) induziert, korreliert der CRP-Spiegel somit mit der IL-6 Plasmakonzentration. Darüber hinaus haben noch Serum-Kalzium, Serum-Kreatinin, durchschnittliche Anzahl der Plasmazellen im Knochenmark und das Patientenalter prognostischen Wert [107]. Zu den aussagekräftigsten Prognosefaktoren jedoch gehören CRP und s.B2m [108].

## 1.2 Die Rolle von Erythropoetin

### 1.2.1 Die physiologische Bedeutung von Erythropoetin

#### 1.2.1.1 Synonyme und Vorkommen

Erythropoetin (Epo) ist ein Hormon und ganz im Gegensatz zum oben beschriebenen Interleukin-6 existiert für Epo keine endlos lange Liste der Synonyme, was in der geringen Pleiotropie dieses Wachstumsfaktors begründet liegt. Man bezeichnete früher Epo auch ESF (erythropoiesis stimulating factor) oder Haematopoietin [109].

Schon 1882 wurde vermutet, dass Hypoxie der Stimulus für ein Ansteigen der roten Blutzellmasse sein müsse. 1906 sprach man von der Existenz eines humoralen Faktors, der für dieses Phänomen verantwortlich sei, brauchte aber weitere 40 Jahre um einen Faktor zu isolieren, welcher Erythropoetin genannt wurde [110].

Epo wird pränatal hauptsächlich in der Leber gebildet; postnatal ist die Niere der Hauptbildungsort. 20-50% der Epo-m-RNA stammt bei Nagetieren aus der Leber, beim Menschen ist der hepatische Anteil der m-RNA noch unklar, verdeutlicht vor allem durch die Tatsache, dass bei dem Grossteil anämischer Patienten mit chronischen Nierenversagen der Erythropoetinspiegel im Serum zu niedrig ist um, durch andere Bildungstätten, wie die Leber kompensiert werden zu können [111]. Unklarheit herrscht auch über die pränatale und postnatale Regulation der Epo-Produktion in der Leber bzw. welche Einflüsse das Umschalten von hepatischer zu renaler Bildung veranlassen. Weitere Epo-Produktion konnte darüber hinaus noch in Makrophagen [112], und ektopisch in Tumoren wie dem cerebellären Hämangioblastom [113, 114], in Nierenzellkarzinomen [115, 116] und in Hepatomen [117] gefunden werden. Im Gegensatz zum Menschen konnte bei Ratten neben Niere und Leber erythropoietische m-RNA auch in Milz und Lunge nachgewiesen werden [111, 118].

Uneinigkeit herrscht auch über den Erythropoetin produzierenden Zelltyp in der Niere. Durch immunohistochemische und *in situ* Hybridisierung wurden die peritubulären Endothelzellen [119] und Fibroblasten [120] des Nierengewebes als Produktionsort von Epo identifiziert. Maxwell et al. dagegen halten ausschliesslich tubuläre Zellen dafür verantwortlich [121]. In

der Leber wird es hauptsächlich in den zentrilobulären Zellen produziert, wie durch *in situ* Hybridisierung in Nagetieren nachgewiesen werden konnte [122, 123].

#### 1.2.1.2 Das Erythropoetin-Gen und die Regulation seiner Expression

Das Epo-Gen wurde auf dem humanen Chromosom 7q11 lokalisiert, ist ungefähr 3000bp lang und enthält 5 Exone und 4 Introne. Die Sequenzen von humanem und murinem Epo gleichen sich zu mehr als 80%. Den höchsten Grad der Ähnlichkeit findet sich im ersten Intron und in der nicht-translatierten Sequenz des 3'-Endes, was auf regulatorische Funktion dieser konservierten Sequenzen hinweisen könnte. Nach Abtrennung eines 27 Aminosäuren langen N-terminalen Peptides und einem C-terminalen Arginin, kodiert das Gen für ein 165 Aminosäuren langes Protein. Das errechnete molekulare Gewicht von Epo beträgt 18236 Dalton, wird aber fast verdoppelt zu 30400 Daltons durch die für die Löslichkeit des Proteins nötige Glykolisierung.

Epo ist ein saures Protein, das relativ hitze- und pH stabil ist. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,5. Die Glykosylreste sind N-Glykosidisch an den Positionen Asn24, Asn36, Asn83 und O-Glykosidisch an Ser126 gebunden. Es existieren mehrere unterschiedlich glykolisierte Isoformen. Das Protein trägt ebenfalls eine Sialylgruppe und weist zwei Disulfidbrücken auf (Positionen 7/161; 29/33). Sein Kohlenhydratanteil bestimmt sein pharmakologisches Verhalten: nicht glykolisiertes Epo zeigt eine extrem verkürzte Halbwertszeit und ist *in vivo* wirkungslos, da die Sialylgruppe und Glykolisierung das Protein von einem rapiden Abbau in der Leber schützen. Deglykolisiertes Epo interagiert jedoch mit den Rezeptoren der Zielzellen und zeigt *in vitro* sogar eine erhöhte biologische Aktivität [124].

Die Kontrolle der Epo-Produktion unterliegt mehr oder weniger dem Sauerstoffgehalt des Blutes. Die Blutkonzentration des Gesunden beträgt ungefähr 15 U/L, während beim chronisch anämischen Patienten der Spiegel bis zu 10000 U/L erreichen kann. Die Epo-Synthese wird stimuliert durch Sinken des O<sub>2</sub>-Partialdruckes oder gesteigerter Affinität für O<sub>2</sub> im Blut. Der O<sub>2</sub> Gehalt von Frischblut ist höher als von gelagerten Blut, was nach Transfusion zu entsprechender Epo-Stimulation führt. Auch ist in azidotischen Patienten die Epo Produktion durch die gesunkene Affinität der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämoglobin gesteigert. All dies führte zu der Annahme, dass eine Art O<sub>2</sub>-Sensor existiert, welcher die Epo-Produktion steuert [110]. Epo bindet dann an Rezeptoren erythropoietischer Progenitorzellen und verhindert durch Aktivierung bestimmter Signalwege deren Apoptose [125], wodurch diese Zellen proliferieren und differenzieren können. Es wird auch vermutet, dass eine negative Rückkoppelung existiert, sodass nach Vermehrung der roten Blutzellmasse, der hypoxischen Zustand reduziert wird und die positive Regulation für Epo-Produktion erlischt [126].

Die Regulation der Epo-Expression wird durch Bindung von Proteinen an Enhancer Sequenzen im Epo-Gen geregelt (Abb.1.2.1.2). Der Enhancer im 3'-Ende befindet sich sowohl im humanen wie auch im murinen Gen 120 Basenpaare nach der Polyadenylationssequenz, ist 40 Basenpaare lang und wird auch "cis-acting element" genannt. Dieser Enhancer reagiert auf Hypoxie, wie in Reporter-genexperimenten mit einer 14 fachen Steigerung der Genexpression gezeigt wurde [127, 128]. Im Falle des Epo-Genes verstärkt dieses Element die Genexpression bis zu 100 fach. Die Hauptanteile des Enhancers bestehen aus drei Abschnitten: ein 5'-Ende, an welches HIF-1 bindet (siehe unten), ein mittlerer Teil, welcher für die hypoxische Epo Induktion und für HIF-1 regulierte Gene wichtig ist und ein Teil im 3'-Ende, welcher zwei HRE (repeat hexanucleotide hormone response elements = nukleäre Rezeptorbindungsstellen) enthält, an welche HNF-4 (siehe unten) bindet. Nukleäre-Rezeptor-Bindungsstellen binden zum Beispiel Hormone wie Steroide oder Thyroxin. Im Falle des Epo-Genes binden an diese nukleäre Rezeptorbindungsstelle 3 Proteine, von denen HNF-4 (Hepatic nuclear factor-4) am interessantesten schien, da seine Expression auf Epo exprimierendes Gewebe begrenzt scheint [126, 129]. Das 5'-Ende des Enhancerteils ist ein 13-mer und sowohl im Mausgenom wie auch im humanen Genom vorhanden. Er besitzt für sich alleine nur ein schwaches Induktionspotential und wird durch gezielte Mutagenese funktionslos. Semenza et al. konnten den Faktor isolieren, welche an den Enhancerteil im 5'-Ende bindet: HIF-1 (hypoxia inducible factor) [128]. HIF-1 ist ein 120 kDa schweres Protein und wurde zuerst im Zellextrakt hypoxischer Hepatomzellen nachgewiesen. Nach und nach gelang es auch den Faktor in weiteren hypoxischen Zelltypen nachzuweisen [130]. HIF-1 bindet spezifisch die Enhancer-Sequenz des Epo-Genes. Eine HIF-1 Bindungsstelle wurde interessanterweise auch noch in weiteren Genen gefunden, welche Enzyme der Glykolyse exprimieren und durch Hypoxie induziert werden. Dazu gehören zum Beispiel die Phosphoglycerate-Kinase1 und Enolase1 des Menschen und die Laktatdehydrogenase1 der Maus [131]. Der mittlere Anteil des Enhancers enthält eine weniger konservierte repetitive CA-Sequenz, welche auch nach Mutation die Geninduktion negativ beeinflusst. Der Promoter des Epo-Genes besitzt kein sehr starkes Induktionspotential und enthält keine TATA oder CAAT Sequenz [129]; heute weiss man, dass er unter anderem von den gleichen Faktoren aktiviert wird, die auch an den Enhancer binden. Enhancer und Promoter tragen äquivalent zu dem Expressionspotential von Erythropoetin-Genes bei [126]. Das KIE (kidney inducible element) scheint wichtig für die spezifische Expression von Epo in der Niere zu sein wie durch Experimente an Transgenen Mäusen gezeigt werden konnte [129].

Eine negative Regulation der Epo-Produktion findet sich durch den Einfluss einiger inflammatorisch wirksamer Zytokine wie  $IL-1\alpha$  und  $\beta$  sowie  $TNF\alpha$ . Schwächere Negativregulatoren sind  $INF-\alpha$  und  $-\beta$ ,  $IL-3$ ,  $IL-6$ ,  $INF-\gamma$  und  $TGF-\beta-2$  scheinen keinen Einfluss auf die Epo-Expression zu haben [132]. Die Negativregulation der Epo-Expression findet wohl über Bindung von Faktoren an das NRE (Abb.1.2.1.2) (negativ response element) statt [110].

### 1.2.2 Die Wirkung von Erythropoetin

Erythropoetin ist der Hauptwachstumsfaktor für die Entwicklung der roten Blutzellreihe. Die roten Blutzellen entstammen, wie auch alle anderen Blutzellen von pluripotenten Stammzellen, sogenannte Progenitorzellen. Durch synergistisch und überlappenden Einfluss verschiedener Zytokine wie z.B. IL-1, IL-3 und IL-6 und Wachstumsfaktoren wie SCF und G-CSF entwickeln sich aus den Progenitorzellen die unterschiedlichen Vorstufen der Blutzellreihen. Die primitivste rote Vorstufe, welche im Knochenmark oder im peripheren Blut gefunden werden kann, ist die sogenannte *erythroid burst forming unit* (BFUe), welche sich unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-3 zur *erythroid colony forming unit* (CFUe) differenzieren kann. Im Gegensatz zur BFUe spricht die CFUe schon auf geringste Dosen Epo an und differenziert innerhalb weniger Tage zum Proerythroblasten, welcher wiederum unter Epo-Einfluss weiter über mehrere Reifungsstufen zum kernlosen Erythrozyten differenziert. Epo bindet seinen Rezeptor an der Oberfläche roter Progenitorzellen und induziert somit ihre Differenzierung. Ein Proerythroblast differenziert in einem Zeitrahmen von ungefähr 4 Tagen mit 3-4 Zellteilungen zum Normoblasten, dessen Zellkern mehr und mehr pyknotisch wird, um völlig aus der Zelle entfernt zu werden. Die verbleibende rote Blutzelle wird Retikulozyten genannt und enthält (Poly)ribosomen und RNA. Während dieser Differenzierung steigt der Globin-m-RNA Gehalt der Zelle und somit die Bildung von Hämoglobin an [133].

#### 1.2.2.1 Epo spielt keine Rolle in der frühen Erythropoese

Wie oben beschrieben, spricht man von Erythropoese wenn sich primitive multipotente hämatopoetische Stammzellen zu BFUe und CFUe fortentwickeln. Danach differenzieren sie in Normoblasten, Erythroblasten, Retikulozyten und ultimativ zum ausgereiften Erythrozyt, welcher das sauerstofftragende Pigment Hämoglobin trägt. Hämoglobin besteht aus vier Häm-Molekülen verbunden mit vier Globin-Ketten und wird in den BFUe synthetisiert. Mit grossem Interesse wird gefragt wann und wo die erythrozytären Vorläuferzellen zum ersten mal in Erscheinung treten und von woher sie kommen. Man weiss heute, dass die Erythropoese im Menschen im Yolksack in der 3-4 embryonalen Woche durch Formen von riesigen Megaloblasten beginnt, welche das fötale Hämoglobin tragen. In der 11-12 Woche beginnt die Erythropoese dann im Knochenmark und bei Geburt auch in der Leber [134]. Um zu untersuchen in welchem Stadium der Erythropoese die Genexpression von Epo beginnt, untersuchten Schmitt et al. die Genexpression hematopoietischer Wachstumsfaktoren in murinen embryonalen Stammzellen. Diese Zellen wurden aus Blastozysten isoliert und besaßen die Fähigkeit sich in die verschiedenen Gewebsarten zu differenzieren. Die Gruppe fand, dass die Genexpression der hematopoietischen Wachstumsfaktoren sehr koordiniert geschieht. Interessanterweise konnten sie die Expression des Genes für Epo als auch für den Rezeptor in der noch undifferenzierten Zellpopulation finden [135]. Bei dieser frühen Expression liegt es nahe, dass die beiden Gene eine dementsprechende wichtige Rolle

spielen könnten. Null Mutationen des Epo-Genes und auch des Epo-Rezeptorgenes führt zum Tod des Embryos am 13. Tag durch Ausbleiben der Erythropoiese der Leber, da keine Kolonisierung durch hämatopoetische Stammzellen in der Leber stattfand. Auch war die Erythropoiese im Yolksack um das 5-10 Fache vermindert. Überraschend war an diesem Ergebnis, dass die Erythropoiese im Stadium der Bildung von BFUe und CFUe durch andere Wachstumsfaktoren, wahrscheinlich GM-CSF, IL-3 oder SCF, völlig kompensiert werden kann und die essentielle Rolle von Epo erst in den reiferen Entwicklungsstadien der Erythropoiese nötig ist. Zum anderen war auch interessant, dass trotz Behandlung der heterozygoten Mäusemütter mit Epo, die Erythropoiese der Embryos nicht gesteuert werden konnte, da das Hormon nicht die Plazentaschranke passierte. Die Wissenschaftler begründeten das Ausbleiben der Erythropoiese in der Leber, im Gegensatz zur 5-10 fachen Reduktion im Yolksack damit, dass die Erythropoiese in der fötalen Leber sich von der im Yolksack auf mehrere Arten unterscheidet. Zum einen findet die Reifung der roten Blutzellen im Yolksack synchroner statt als in der Leber und scheint zum Teil unabhängig von Epo stattzufinden. Zellen der Yolksack Erythropoiese bilden nukleierte Zellen, welche fötales Hämoglobin produzieren, im Gegensatz zu Leber Erythrozyten, welche kernlos sind und adultes Hämoglobin bilden [136].

Zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass die originale Stammzelle vom Yolksack, "primitive erythropoiesis" genannt, in die Leber reist und dort die Kolonisierung beginnt um die "definitive erythropoiesis" zu initiieren. Heute weiss man aber, dass eine andere Region, die AGM (aorta-gonad-mesonephros) Region der eigentliche Ursprungsort der originalen Stammzelle ist. Die AGM Region findet sich dorsal der Aorta, dem genitalen Hügel und den Pronephronen. Die Expansion der CFU von der AGM ist bei weitem bedeutender in "Aussenden" der hämatopoetischen Stammzellen als der Yolksack [137].

Auch wird angenommen, dass die Zellen der "primitive" und der "definitive erythropoiesis" höchstwahrscheinlich von verschiedenen Vorläuferzellen abstammen. Gezeigt wurde dies durch Experimenten an murinen embryonalen Stammzellen, welche mit OP9-Stromazellen kultiviert wurden um die Entwicklung der Erythropoiese zu verfolgen. Ab Tag 6 der Inkubation konnte eine erythropoetische Zellpopulation identifiziert werden, die der "primitive erythropoiesis" glich (grosse Nuclei in adhätierenden Zellen), was auch durch Bestimmung des Globulins (fötales und adultes) bestätigt werden konnte. Diese Zellpopulation verminderte sich in den folgenden Tagen und eine zweite Population konnte am Tag 14 entdeckt werden, welche den Zellen der "definitive erythropoiesis" entsprach (kleine Nuclei mit adultem Globulin in nicht adhätierenden Zellen). Beide Zellpopulationen wurden an Tag 3 der Zellkultur nicht nebeneinander vorgefunden, ganz im Gegensatz zu Tag 4 und später. Die Autoren schlossen daraus, dass die "primitive" und "definitive erythropoiesis" von zwei verschiedenen Vorläuferzellen abstammt und nicht wie vorher angenommen von "primitive" zu "definitive erythropoiesis" differenzieren [138]. Die Entwicklung der "definitive erythropoiesis" hängt vollkommen, im Gegensatz zu der "primitive erythropoiesis", von SCF ab. SCF ist auch

essentiell für die Entwicklung der myeloischen Zellreihe am Tag 14, was durch Blocken des SCF Rezeptors, c-Kit, gezeigt wurde. Epo m-RNA konnte weder in der primitiven noch in der definitiven Kultur nachgewiesen werden, was die Daten der Nullmutationen von den Genen für Epo und dem Epo-Rezeptors bestätigte [138]. Epo ist demnach nicht für die frühen Reifungstufen der Erythropoese nötig. Die Differenzierung der "definitve erythropoiesis" benötigt mehr Zeit als die der "primitve erythropoiesis". Dies wird durch die These unterstützt, dass die definitive Population von sogenannten "non-committed multipotential" hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammt und die primitive Population direkt von "committed" Vorläuferzellen. Nakano et al. postulierten, dass die Entscheidung ob eine Vorläuferzelle sich zum primitiven oder definitiven Progenitor differenziert wohl höchst wahrscheinlich von einem intrazellulären Differenzierungsprogramm abhängt, da in ihrem Modell beide Populationen in der gleichen Umgebung *in vitro* wuchsen und somit den gleichen Einflüsse von aussen ausgesetzt waren [138].

#### 1.2.2.2 Die Rolle von Tyrosinphosphorylierung in der Erythropoiese

Die Verfügbarkeit der c-DNA des EpoR [139] machte es möglich die Signaltransduktion des Rezeptors und seine Bedeutung besser zu verstehen. Zellen, die den EpoR exogen exprimieren, können eine grössere Anzahl (10 000-20 000) an Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren als endogen exprimierte Rezeptoren (50-1000). Höhere Rezeptorzahlen machen es natürlich einfacher intrazelluläre Ereignisse nach Stimulation dieser Zellen mit Epo nachzuweisen. Die meisten der anfangs mit EpoR c-DNA transfizierten verwendeten Zellsysteme waren myeloischer Abstammung, was verglichen mit erythropoiden Vorläuferzellen einen Unterschied in ihren Signalwegen machen kann und wurden deswegen mit Skepsis betrachtet. Um so erfreulicher war es, dass diese Art der Experimente in EpoR endogen exprimierenden Zelllinien wiederholt und somit bestätigt werden konnten [140]. Wie schon erwähnt spielt Epo erst später in der Erythropoiese eine Rolle und es stellt sich wie bei der IL-6-Signaltransduktion die Frage welche Signale vermitteln Differenzierung und welche Proliferation? Oder sind die dafür benötigten Signalwege getrennt oder überlappend?

Die Erythropoiese in Entwicklung von BFUe und CFUe scheint unabhängig von Epo stattzufinden. Epo scheint vor allem eine Rolle in der Kolonisierung der fötalen Leber zu spielen, wie durch homozygoten Nullmutationen von EpoR und Epo gezeigt worden ist. Die Rolle der Entwicklung von BFUe und CFUe scheint vor allem dem SCF und seinem Rezeptor zu zukommen, da nach Mutationen des Rezeptors das Formen von CFUe in der Leber stark vermindert ist. Wu et al. konnten darüber hinaus demonstrieren, dass die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit mit dem EpoR in der erweiterten Box2 assoziiert und den Rezeptor an Tyrosinresten nach Stimulation mit SCF phosphoryliert um weitere Reifungs- und Proliferationssignale zu übermitteln. Gezeigt wurde dies in der von Epo-abhängig wachsenden HCD57 Zelllinie, welche von einer murinen erythropoiden Vorläuferzelle stammt. Die durch Epo induzierte Proliferation dieser Zelllinie konnte auch durch SCF erreicht werden unter der Voraussetzung, dass der EpoR exprimiert wurde. Diese lässt eine Bindung von SCF an

den EpoR vermuten [141]. Zwei Jahre später wurde von der gleichen Gruppe die Signalübermittlung durch Tyrosinphosphorylierung des EpoR in grösserem Detail beschrieben. Die Gruppe konstruierte eine Rezeptormutante welche alle Tyrosinreste, bis auf den C-terminalsten, Y479, welcher die Bindungsstelle für PI3K darstellt, zu Phenylalanin mutiert hatte. Diese Mutante transfizierten sie in die fötale Leber von EpoR <sup>-/-</sup> Mäusen davon ausgehend, dass die Leber erythroide Vorläuferzellen enthält. Die Aktivierung von der Tyrosinkinase PI3K führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase MAPK unabhängig von Shc/Grb2 oder Stat5 und führte in diesem System zur Differenzierung und Proliferation dieser Zellen. Das Stattfinden von Differenzierung und Proliferation wurde durch Bildung von CFUe definiert. Transfektion einer EpoR-Mutante in der alle Tyrosinreste zu Phenylalanin mutiert wurden, führte nicht zur Differenzierung und Proliferation [142]. Stat5 wurde auch als wichtiger Faktor in Vermittlung von Differenzierungssignalen durch Epo bestätigt. Iwatsuki et al. identifizierten die beiden Tyrosinreste am EpoR welche in die Bindung von Stat5 an EpoR involviert sind: Y343 und Y401 (siehe dazu auch Abb.1.2.2). Einer der beiden Tyrosinreste ist absolut nötig um das von Stat5 favorisierte Zielgen *cis* zu induzieren und Differenzierung zu vermitteln, was durch Messung der Hämoglobinsynthese bestimmt werden konnte. Die Hämoglobinsynthese in Stat5 <sup>-/-</sup> Zellen sank um 5%, was ein Hinweis auf die Rolle von STAT5 in erythroiden Differenzierung sein könnte, siehe dazu auch 1.2.2.1 [143].

### 1.2.3 Struktur und Aufbau des Erythropoetinrezeptors (Abb.1.2.3)

Der Erythropoetinrezeptor gehört wie der IL-6 Rezeptor zur grossen Familie der Hämatopoetischen-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren und wurde 1989 von D´Andrea et al kloniert. Die Gruppe transfizierte eine MEL-c-DNA Bibliothek (Murine Erythroleukemia) in Cos-Zellen und untersuchte diese Zellen dann auf Bindung von Radio-Jod-gebundenem Epo (<sup>125</sup>I-Epo). Die so identifizierte EpoR-c-DNA kodiert für ein Protein von 507 Aminosäuren und besteht, nach Abspalten einer 24 AS langen hydrophoben Sequenz am N-terminalen Ende, aus einem 223 AS langen extra- und einem 236 AS langen intrazytoplasmatischen Anteil [139]. Die extrazelluläre Domäne enthält das in der hämatopoetischen Wachstumsfaktorfamilie konservierte WSXWS Motiv. Deletion dieser Region im G-CSF Rezeptors resultiert in stark reduzierter Ligand-Bindungsaffinität. Ähnliches findet sich auch nach Punktmutationen des Motivs im Falle des IL-2R, der dem EpoR strukturell am ähnlichsten ist [144]. Das WSXWS-Motiv des EpoR scheint wichtig für Internalisierung des Rezeptors nach Ligand Bindung zu sein [145]. In einer anderen Studie wurden Deletionen, Insertionen oder Mutationen des WSXWS Motifs durchgeführt, welche zur Konsequenz hatten, dass der Rezeptor im Endoplasmatische Retikulum festgehalten wurde und somit nicht durch den Golgi Apparat prozessiert und auf der Zelloberfläche expremiert werden konnte [146]. Neben dem WSXWS-Motiv sind sowohl in der Rezeptorfamilie der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie auch im EpoR vier Cysteinreste konserviert, wobei der EpoR noch einen fünften besitzt.



Mutationen dieser Cysteine zu Serin resultierte in der Unfähigkeit des EpoR aus dem Endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche zu wandern und Epo zu binden. Dabei wird die biologische Aktivität des Rezeptors nicht bei der Mutation des fünften Cysteins beeinflusst [147].

Konstitutive Aktivierung des EpoR findet sich wenn Arginin 129 durch ein Cystein ersetzt wird. Diese Rezeptormutante zeigte onkogenes Potential *in vivo*, was auf seine durch Disulfidbrücken verbundene Oligomerbildung in Abwesenheit des Liganden zurückzuführen ist. Interessanterweise war dies nicht der Fall, wenn Arginin 129 durch Serin, Glutamat oder Prolin ersetzt wird [148].

Der zytoplasmatische Teil des EpoR besteht aus 236 AS und zeigt Homologie mit der Sequenz der IL-2R  $\beta$ -Kette. Wie auch gp130 (siehe oben) besitzt der EpoR keine eigene katalytische Domäne und verfügt über die zellmembrannahen Bindungsdomänen Box1, 2 und 3. Eine Reihe von C-terminalen Rezeptor Deletionsmutanten wurden von verschiedenen Gruppen produziert, um die für die Mitogenese essentielle(n) Bindungsdomäne(n) zu identifizieren. Bemerkenswerterweise stimmen die meisten Berichte darüberein, dass Erythropoetinrezeptoren mitogene Signale durch die 372 N-terminalen AS in der zytoplasmatischen Kette übermitteln. Kürzere Trunkationsmutanten sind unfähig, proliferative Signale zu übermitteln [149, 150].

Nach wie vor herrscht Unklarheit darüber, ob der EpoR wie die meisten hämatopoetischen Wachstumsfaktor Rezeptoren eine zweite Untereinheit besitzt. In Experimenten, in welchen die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Epo Rezeptoren gemessen wurde, konnte in verschiedenen Studien zwei Spezies von rezeptorverknüpften Komplexen gefunden werden. Ein Komplex lag um die 135-145kDa, der andere um die 120-130 kDa. Mehr Klarheit über den Rezeptor, wurde durch Bindungs Experimente bei Verwendung von C-terminalen Rezeptor Deletionsmutanten geschaffen. Diese rezeptorverknüpften Komplexe änderten ihre Grösse abhängig von der Mutante, was zur Annahme führte, dass je nach Komplex ein oder zwei Epo Moleküle an der 72 kDa schweren Rezeptoruntereinheit anknüpfen. In dieser Studie wurde aber auch ein Komplex gefunden, dessen Gewicht nicht mit der Assoziation von C-terminalen Rezeptor Deletionsmutanten wechselte und somit kein EpoR enthalten konnte. Dieser Komplex bindet also Epo an der Zelloberfläche, hat nach Abzug von Epo ein Gewicht von ca. 95 kDa, wird in hämatopoetischen Zellen expremiert und konnte nicht in Cos-Zellen gefunden werden und scheint nicht an Tyrosinresten phosphoryliert zu sein [144]. Bis dato ist es nicht gelungen die zweite Untereinheit des EpoR zu klonieren.

#### 1.2.3.1 NRTKn ermöglichen Signaltransduktion des Erythropoetinrezeptors

Epo-Stimulation von Zellen, welche EpoR endogen oder nach Transfektion expremieren resultiert in rapiden Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen und dem Rezeptor [151]. Wie die meisten Wachstumsfaktorrezeptoren besitzt auch der EpoR keine eigene

intrinsische Aktivität um Signale von der Zellmembran zum Zellkern zu transduzieren. 1993 konnten Witthuhn et al. eine durch Epo-Stimulation aktivierte Kinase *in vitro* identifizieren, welche zur Familie der Janus-Kinasen gehört: Jak2. Darüber hinaus konnten sie mit Hilfe von EpoR-Deletions- und Punktmutationen demonstrieren, dass Tyrosinphosphorylierung von Jak2 und Aktivierung der Kinaseaktivität mit der Mitogenese in Zusammenhang steht. Deletion von 146 AS im distalen C-Terminus von EpoR inaktiviert den Rezeptor für die Induktion von Tyrosinphosphorylierung, Genexpression und Mitose. Diese Mutante zeigt keine Aktivierung von Jak2. Deletion von 20 AS (280-301), 16 AS proximal vor Box2 und die ersten 4 AS von Box2, erbrachte das gleiche Resultat wie für die erst genannte Mutante. In einer weiteren Mutante wurde der konservierte Tryptophanrest 282 zu Arginin ausgetauscht. Auch diese Mutation inaktiviert die biologische Aktivität nach Epo-Stimulation völlig und zeigte keine Kinaseaktivität für Jak2. Daneben machte die Gruppe eine weitere interessante Beobachtung mit einer weiteren Trunktationsmutante, bei welcher 108 AS des distalen C-Terminus deletiert wurden. Diese Mutante zeigte Jak2-Kinase Aktivierung nach Epo-Stimulation, welche aber stärker war als im Wildtyp, was darauf hinwies, dass in diesem zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors ein Bindungsmotiv für ein Jak2 negativ regulierendes Enzym liegt [152]. Diese Vermutung bestätigte sich auch später. In diesem Teil des Rezeptors liegt ein Tyrosinrest (Tyrosin 429), der im phosphorylierten Zustand eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der Phosphatase SHPTP1 darstellt. SHPTP1 reguliert die Aktivität von Jak2 durch Dephosphorylierung von Jak2 [153]. Die Bindungsstelle für Jak konnte identifiziert werden, welche die oben beschriebene 20 AS im Bereich von Box 2 und Box 1 benötigt [50, 152]. Tanner et al. zeigten auch, dass Box 1 essentiell für Bindung und Aktivierung der Kinaseaktivität von Jak2 durch Epo ist [50]. Im Gegensatz zu IL-6 aktiviert Epo ausschliesslich Jak2 und kein anderes Mitglied der Janus-Kinase Familie [154].

Durch die Aktivierung der Janus-Kinasen durch Epo werden ebenfalls Mitglieder der STAT Familie aktiviert. Anfangs glaubte man, dass Epo nur ein STAT Mitglied aktiviert: Stat5, welches an ein Palindrom mit der Sequenz TTCXXX GAA bindet, eine Sequenz des  $\beta$ -Casein Promoter ( $\beta$ -CAP). Kirito et al. konnten aber beweisen, dass Epo neben Stat5 auch Stat3 und Stat1 $\alpha$  in der megakaryozytären Zelllinie UT-7 aktiviert [155]. Die Gruppe konnte durch "Electromobility Shift Assay" (EMSA) demonstrieren, dass GM-CSF, IL-3 und Epo die Homodimerbildung von Stat3 und Stat1 $\alpha$  und die Heterodimerbildung von Stat1 $\alpha$  und Stat3 mit Bindung an die SIE (*sis*-inducible elements) von *c-fos* induzieren. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die drei Zytokine die Bindung von Stat5 an  $\beta$ -CAP übermitteln [155]. Die biologische Bedeutung der STAT Familie ist zum Teil noch unklar. Für Stat1 $\alpha$  nimmt man an dass es aktivierend auf den Zellzyklus wirkt indem es an die Promoterregion von p21<sup>WAF1</sup> bindet, ein Protein welches Cyclin abhängigen Kinasen inhibiert und den Zellzyklus in einer humanen Leukämie Zelllinie vorantreibt [155], siehe dazu auch 1.1.5.5 und 1.3.4.2.

## 1.3 Die Übermittlung von Signalen in der Zelle

Unter Signalübermittlung in der Zelle versteht man den Vorgang der Übertragung von extrazellulären Signalen durch die lipidreiche Plasmamembran in den intrazellulären Bereich bis zum Kern. Dies gelingt mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren und unzähligen Molekülen, meist Proteinen, welche als Kette das Stimulationssignal zum Zellkern übermitteln. Proteine fungieren zum Beispiel als "second messenger" Proteine, funktionelle Zielproteine, GTP-bindende Proteine, Adapterproteine oder als Enzyme, um Signale zu übermitteln. Bindung von Liganden an Rezeptoren kann zur Interaktion des Rezeptors mit zytosolischen Proteinen, Aktivierung rezeptoreigener Kinasen oder Bindung von G-Proteinen zur Folge haben. Ligandenbindung kann auch zur Aufnahme von Ionen, Internalisierung des Liganden in das Zytosol oder wie im Falle der Steroidhormone zur endozytotische Aufnahme von Ligand und Rezeptor führen.

### 1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

#### 1.3.1.1 Onkogene

Onkogene wurden ursprünglich als von Viren übertragende Gene verstanden, die nach Aufnahme in die Zielzelle zu deren Transformation führte. Von den meisten viralen Onkogenen kennt man das zelluläre Gegenstück, welches eine Rolle in der physiologischen Zellfunktion spielt, wie Proliferation und Differenzierung. Die zellulären Gene werden Proto-Onkogene genannt und kodieren Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, membranassoziierte Proteine, Moleküle der intrazellulären Signalvermittlung oder nukleäre Transkriptionsfaktoren. Auftreten eines Onkogenes geschieht entweder durch die Übertragung eines viralen Proto-Onkogenes oder durch Aktivierung in einer anderen Weise. Dies führt dann zum Verlust einer sonst regulierten Funktion dieses Genes, zur Expression eines in diesem Zelltyp vorher nicht exprimierten Genes oder zur einer Überexpression eines Genes. Eine Fehlregulation bzw. strukturelle Veränderung dieser Proteine hat unkontrollierte Wachstums- und Differenzierungsprozesse zur Folge, die auch als Teilschritte der Tumorentwicklung aufgefasst werden können. Zu den ersten entdeckten Onkogenen zählen die aus der Tumorigenese stammenden viralen Onkogene wie z.B. das *v-src*-Gen des *Rous Sarcoma Virus*, das *v-abl* des *Abelson Murine Leukemia Virus*, das *v-Ha-ras* des *Harvey Murine Sarcoma Virus*, das *v-Ki-ras* des *Kirsten Murine Sarcoma Virus* etc., welche als zelluläre Proto-Onkogene durch das Präfix *c* gekennzeichnet werden. Es wird angenommen, dass das *c-onc*-Gen während einer retroviralen Infektion im viralen Genom aufgenommen und zum *v-onc* wurde, wobei im Vergleich zwischen viralen und korrespondierender zellulärer genetischer Sequenz deutlich wird, dass das virale Gen der m-RNA des *c-onc* und nicht seiner genomischen Sequenz gleicht. Bis dato sind ca. 25 retrovirale Onkogene identifiziert worden, wobei auch ein *c-onc* mitunter in mehreren Viren repräsentiert sein kann; zum Beispiel der Affenvirus SSV und der PI Stamm des *Felin Virus FeSV* tragen beide das *v-sis*. Einige Viren enthalten auch verwandte

virale Onkogene; wie zum Beispiel die Stämme *Harvey* und *Kirsten* des *MuSV*, von leicht unterschiedlichen *v-ras*-Genen [156].

Unterschiede im genetischen Code zwischen *v-onc* und *c-onc* lassen in den meisten Fällen auf die für die Regulation wichtigen Elemente in Genen schliessen, die durch Punktmutationen (wie im Falle von *ras*) oder durch Deletion des C- oder N-terminalen Endes oder durch Fusion an virale Gene (wie im Fall von *gag*) oder durch Austausch einer Sequenz (wie im Falle von *src*, bei dem die 19 C-terminalen AS im *v-src* durch 12 AS ersetzt wurden) verloren gegangen sind [156].

Onkogene können je nach Funktion eingeteilt werden. Im Falle der Wachstumsfaktoren weiss man heute noch nicht, wie die Funktion des Onkogenes mit der des Proto-Onkogenes verbunden ist. Wachstumsfaktorrezeptoren hingegen sind besser untersucht. In allen hier aufgeführten Rezeptoren (Proto-Onkogene) wie *c-erbB*, *erbB2*, *c-fms* und *c-kit* handelt es sich um transmembranäre Tyrosinkinase, welche nach Ligandbindung aktiviert werden und das Signal durch Tyrosinphosphorylierung weitere Proteinen vermitteln. Weiter finden sich membranassoziierte, zytosolische und nukleäre Proteine als Proto-Onkogene. Von den G-protein/Signaltransduktions Proto-Onkogenen ist *c-ras* das wohl best untersuchte. Es gehört zur Klasse der GTP-bindenden Proteine (siehe unten). Zur Gruppe, der intrazellulären Tyrosinkinase gehören die Proto-Onkogene wie *c-Src*, *c-Abl* und *c-Fps* auf welche später noch im Detail eingegangen werden wird. Eine andere Gruppe von zytosolischen enzymatischen Proto-Onkogenen stellen die Serin/Threonin-Kinase dar, welche als Zielproteine an deren Serin und Threoninresten phosphorylieren. Zu diese Gruppe gehören *c-raf* und *c-mos* auf welche auch später noch im Detail eingegangen werden wird. Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren der Proto-Onkogene ist relativ gross und gut untersucht. Zu ihr zählen Proteine wie *c-myc*, *c-myb*, *c-fos*, *c-jun*, *c-rel* und *c-erb* [156].

#### 1.3.1.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene wurden in den meisten Fällen durch Deletionen oder andere inaktivierende Mutationen gefunden, welche tumorigen sind. Mehr als 10 Tumorsuppressorgene sind bis heute bekannt, von denen das Retinoblastomgen neben p53 am besten charakterisiert ist.

#### Das Retinoblastomgen:RB

RB interagiert mit einer Reihe anderer Proteinen, z.B. SV40T Antigen, Adenovirus E1A oder humane Papilloma Virus E7. Man nimmt an, dass diese Proteine durch ihre Interaktion mit RB seine Funktion inhibieren. Die physiologische Funktion von RB liegt in seinem Einfluss auf den Zellzyklus. In ruhenden Zellen (G0/G1) ist RB nicht phosphoryliert und supprimiert die G1 spezifische E2F übermittelte Transaktivierung der an der DNA Synthese beteiligten Gene wie *c-myc*, *b-myc*, *cdc.2*, Dihydrofolat Reduktase und Thymidinkinase. Unphosphoryliertes RB verhindert das Fortschreiten von G1- in die S-Phase. RB wird während des Zellzyklus von

Cyclin-CDK Komplexen vor allem gegen Ende von G1 phosphoryliert und der Zellzyklus schreitet somit voran. Überexpression von RB führt zur Suppression der Zellproliferation. Onkogenprodukte wie E1A, HPV E7 (humaner Papillom Virus E7) und SV40T (Simian Virus Protein) binden nur an die unphosphorylierte Form von RB und verhindern die Interaktion von RB und E2F. Neben E2F binden auch Cycline an die unphosphorylierte Form von *RB* und blockieren so die Transition von G1- in die S-Phase. Diese Blockade kann durch die Phosphorylierung von RB aufgehoben werden. Die genaue Aufgabe von RB im Zellzyklus ist noch nicht bekannt, aber es wird angenommen, dass es eine Kontroll-Funktion im Zellzyklus hat. Der homozygote Verlust des Rb-Genes führt zum Retinoblastom, ein Tumor im Kindesalter. Der Tumor entwickelt sich nach Vererbung oder sporadisch nach somatischer Mutation. *RB* ist darüber hinaus auch in der Pathogenese anderer Tumorformen beteiligt: wie z.B. beim multiplen Myelom, (siehe dazu 1.1.5.5), Osteosarkom und Bronchialkarzinom [156].

### p53

p53 ist ein nukleäres Phosphoprotein und wurde in SV40 transformierten Zellen entdeckt, wo es mit dem T-Antigen assoziiert. Interessanterweise scheint nur der p53 Wildtyp fähig zu sein mit dem large T Antigen des SV40 Virus zu assoziieren. In vielen transformierten Zellen findet sich eine gesteigerte p53 Expression, wodurch die Funktion des Wildtypes durch die mutierte Form verdrängt wird. Es wird angenommen, dass p53 als Tetramer aktiv ist. Die zelluläre Antwort auf genotoxische Substanzen ist unter anderem die gesteigerte Expression von p53 und die Stabilisierung seines eher instabilen Komplexes, was eine Verlängerung seiner Halbwertszeit von 10-30 Minuten auf mehrere Stunden zur Folge hat [156]. Die gesteigerte Aktivität von p53 führt zur Induktion von p21<sup>CIP1/WAF1/SDI1</sup>, welches die Cyclin abhängigen Kinasen inhibiert, die wiederum RB phosphorylieren und somit den Zellzyklus in G1 vorantreiben. Die Folge ist Suppression der Transition von G1 in die S Phase. Heute weiss man, dass der Funktionsverlust von p53 Teil der Pathogenese unzähliger maligner Tumore ist, wie z.B. beim multiplen Myelom (siehe dazu 1.1.5.5) oder beim Colonkarzinom. Der autosomale Verlust führt zum Li-Fraumeni. Diese Patienten leiden an malignen Tumoren in einer Vielzahl von Geweben[157].

## **1.3.2 Wie Proteine kommunizieren**

### 1.3.2.1 Zelloberflächenrezeptoren

Die Regulation von Zellwachstum wird durch eine komplexe Anordnung genauest koordinierter Signalwege durch Zelloberflächenrezeptoren gesteuert. Heute unterscheidet man vier Typen von Zelloberflächenrezeptoren, welche mit den wasserlöslichen Liganden interagieren. Ligandenbindung induziert bei einem Teil der Rezeptoren Formation von second-messengers, bei anderen nicht.

1. G-Protein assoziierte Rezeptoren: Ligandenbindung stimuliert ein G-Protein, welches daraufhin Enzymkaskaden oder Ionenkanäle aktiviert. Beispiele sind die Rezeptoren für Epinephrin, Serotonin und Glukagon.
2. Ionenkanalrezeptoren: hier ändert die Bindung des Liganden die Konformation des Rezeptors, wodurch das Membranpotential verändert wird. Beispiel hierfür ist der Rezeptor für Azetylcholin.
3. Rezeptoren ohne eigene Protein-Tyrosinkinase: Ligandbindung führt bei diesen Rezeptoren zu Dimerisierung mit nachfolgender Interaktion und/oder Aktivierung zytosolischer Tyrosinkinasen. Für diesen Rezeptortyp finden sich viele Beispiele, wie die oben erwähnten Rezeptoren für Interleukine, Interferone oder Epo.
4. Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität: Ligandbindung führt bei diesen Rezeptoren zu Aktivierung von Guanylat Zyklase Aktivität (z.B. Atrialer Naturetischer Faktor), Protein Phosphataseaktivität (z.B. Leukozyten CD45 Protein), Serin/Threonin Kinase Aktivität (z.B. Transforming Growth Factor  $\beta$ ) oder Tyrosinkinaseaktivität (z.B. Insulin, PDGF, EGF) in der zytosolischen Domäne. Auch hier kommt es in den meisten Fällen zur Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Schaffung von weiteren Bindungsstellen für Signalmoleküle durch Phosphorylierung von Aminosäure-Resten im Rezeptor durch die intrinsische Kinaseaktivität und/oder Autophosphorylierung der Kinasedomäne. Diese sogenannten Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphorylieren neben dem Rezeptor wie auch die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zytosolische Proteine [158].

Diese durch Oberflächerezeptoren aktivierten Signalwege regulieren Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Meist werden die Signale von den Rezeptoren durch Proteinkinasen zum Zellkern vermittelt. Proteinkinase übertragen Phosphatgruppen zu bestimmten AS Resten. Die alkoholische Gruppe von Serin und Threonin sowie die phenolische Gruppe von Tyrosin stellen die Hauptphosphorylierungsstellen für die meisten dieser Kinasen dar. Abhängig von ihrer Phosphorylierungsspezifität werden die Kinasen in bestimmte Gruppen unterteilt: Serin/Threoninkinasen, Tyrosinkinasen und Serin/Threonin-Tyrosinkinasen. Das Zusammenspiel dieser Kinasen ist komplex und involviert neben Phosphorylierung und Dephosphorylierung (durch Phosphatasen) die Kommunikation von Proteinen durch spezifische Proteinmodule.

#### 1.3.2.2 Proteinmodule

Zu den heute best untersuchten Proteinmodulen gehören die Src-Homologie-2 (SH2), Phosphotyrosinbindungsdomäne (PTB), Src-Homologie-3 (SH3) und Pleckstrin Homologie (PH). Diese Sequenzen können sich unabhängig von den sie umgebenden AS-Sequenzen in kompakte Tertiärstrukturen falten. SH2- und PTB-Domänen erkennen an Tyrosinresten phosphorylierte Peptide und sind, so wird angenommen, ausschliesslich in Signalwege der Tyrosinkinasen involviert. PH-Domänen binden an Phospholipide und auch spezifische

Proteine. Die Rolle von SH3-Domänen hingegen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen vor allem als Module in der Regulation von Proteinen. Proteine besitzen meist mehrere verschiedene Module um ihre Aufgabe im Prozess der Signalübermittlung wie Substraterkennung, enzymatische Aktivität oder subzelluläre Lokalisation zu erfüllen.

### SH2 und PTB Domänen

Die SH2-Domänen bestehen aus ca. 100 AS in Tertiärstruktur und kontrollieren Signalwege des Phospholipidmetabolismus, Tyrosinphosphorylierung und Dephosphorylierung, Aktivierung von Ras ähnlichen GTPasen, Genexpression, Proteininteraktionen und zytoskeletale Architektur. *In vivo* binden Proteine mit SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste von aktivierten Rezeptoren oder zytoplasmatischen Phosphoproteinen. SH2-Domäne binden mit einer Affinität ( $K_d$ ) von 10-100nM an Phosphopeptide, welche den Phosphotyrosinrest umgebende optimale Erkennungssequenz besitzen. An alle anderen Phosphopeptide, welche nicht von der optimalen Erkennungssequenz flankiert werden bindet das Modul mit einer 1000-fach niedrigeren Affinität. Unphosphorylierte Peptide binden mit extrem niedriger Affinität. Der Grossteil der Bindungsenergie stammt von der Erkennung des Phosphotyrosinrestes, kann aber durch die benachbarten AS um 3 Zehnerpotenzen gesteigert werden. Die SH2-Domäne bindende AS-Sequenz besteht zum grössten Teil aus basischen AS, welche durchaus variieren können. Eine AS, Arginin, scheint essentiell für die Interaktion mit der SH2-Domäne zu sein, da sie Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffmolekülen des Phosphatrestes bildet. Die SH2-Domänen der Src-Tyrosinkinasen ist besonders gut charakterisiert. Sie kontaktieren bestimmte Sequenzen welche von der 3. AS dem Tyrosinrest folgend bestimmt werden: sie bevorzugen hydrophile AS an Position +1 und +2 und einen hydrophobe AS an Position +3, die sie in einer kleinen hydrophoben Tasche ihrerseits unterbringen. Die SH2-Domäne der Src-Kinase bindet demnach in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten an ein Bindungsmotiv pTyr-Glu-Glu-Ile [159].

Die PTB-Domäne wurde ursprünglich in dem Protein Shc dem Insulinrezeptor Substrate IRS-1 als neuartige Bindungssequenz für phosphorylierte Tyrosinreste gefunden. Das Modul hat eine Länge von über 200 AS und hat nur geringe Ähnlichkeit mit SH2-Domänen. PTB erkennt Motive mit der Konsensussequenz Asn-Pro-X-pTyr. Die physiologische Bedeutung dieser Domäne ist noch unklar [159].

### SH3-Domäne

Eine SH3-Domäne besteht aus ca. 60 AS und wird in Proteinen gefunden, welche in Signalwegen der Tyrosinkinasen involviert sind. SH3-Domänen binden mit einer Dissoziationskonstanten von ca. 5-100  $\mu$ M an prolinreiche Sequenzen, welche ca. aus 10 AS bestehen. SH3 bindende Peptide formen eine links gedrehte Polyproline Typ II (PPII) Helix, mit 3 AS per Drehung. Der Peptidligand hat demnach drei Windungen, wobei eine zur Stabilisierung der Helix und die anderen zwei an die SH3-Domäne binden. Der Kern des

Liganden scheint die Konsensussequenz X-P-p-X-P zu beinhalten, wobei X meist ein aliphatischer Rest einer AS ist und die beiden Proline absolut essentiell für ein Erreichen einer hohen Bindungsenergie sind. Der das AS-Gerüst stabilisierende Rest p ist meist auch ein Prolin. Jedes der beiden XP Paare interagiert mit einer konservierten hydrophoben Tasche der SH3-Domäne und trägt hauptsächlich zur Bindungsenergie bei. Die dritte Bindungstasche der SH3-Domäne ist variabler, scheint aber bevorzugt an Arginin im Bindungspeptid zu binden. Im Falle der SH3-Domäne von Src geht die dritte Bindungstasche eine Ionenbindung mit einem Aspartat ein. Die SH3-Bindungspeptide sind fast symmetrisch und können interssanterweise in jeder Orientierung an die Domäne binden und werden demnach in zwei Klassen unterteilt. Klasse I folgt der Orientierung Amino -zu Carboxy Terminus und Klasse II umgekehrt. Das bedeutet im Falle der Klasse II Liganden für die c-Src SH3-Domäne liegt das Arginin, welches mit der dritten Tasche interagiert, im C-Terminus des Bindungspeptid und nicht im N-Terminus. Beispiele für physiologisch wichtige Klasse II Liganden sind die Ras Nukleotid Austausch Faktoren mSos1 und mSos2, welche mit ihren prolinreichen Sequenzen an die SH3-Domäne von Grb-2 binden (siehe unten) [159].

Die SH3-Domäne in c-Src ist ein kompaktes aus 5  $\beta$ -Strängen bestehendes Modul, in welchem der Ligand bindende Oberfläche von je einer AS-Schleife flankiert wird. Die sogenannte RT-Schleife (RT-Loop, benannt nach den jeweiligen randständigen AS Arginin und Threonin) verbindet den ersten und den zweiten  $\beta$ -Strang miteinander und erscheint in der viralen Form von Src mutiert. Die zweite Schleife n-Src verbindet den zweiten  $\beta$ -Strang mit dem dritten und findet sich vor allem in der neuronalen Form von Src. Die SH3-Domäne von c-Src bietet aber vor allem eine weitere Besonderheit, welche nach Kristallisierung des inaktiven Proteins demonstriert werden konnte. Das Modul bindet intramolekular an die Verbindungssequenz zwischen SH2- und Kinasedomäne, welche eine PPII Helix formt, aber nicht die dafür für essentiell angesehenen Prolinreste in der bekannten Anordnung enthält. Diese Bindungssequenz bindet in der charakteristischen Klasse II Orientierung, enthält aber nur einen Prolinrest, welcher in der ersten Tasche bindet. An der Position der in der zweiten Tasche bindende AS ist ein Glutamin anstatt eines zweiten Prolins, welches mit seiner langen polaren Seitenkette mit der zweiten Tasche kein Interchelat bilden kann und somit von der herkömmlichen PPII Helix abweicht, siehe dazu auch 1.3.4.1 und 4.4.1 [160].

### PH-Domänen

PH-Domänen werden in einer Vielzahl von Proteinen gefunden wie Serin/Threoninkinasen, Tyrosinkinasen und deren Substrate, Isoformen der Phospholipase C, Regulatoren von GTPasen, GTPase Dyamin, und zytoskeletalen Proteinen. Die Struktur dieser Domäne scheint konserviert zu sein und besteht aus zwei Antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix.



### 1.3.3 Die Familie der Zytokinrezeptoren

#### 1.3.3.1 Zytokinrezeptoren ohne eigene Kinasedomäne

Die Zytokinsuperfamilie beinhaltet die Mediatoren der Zellkommunikation wie Interleukine, Interferone und die Blutzell-Kolonien stimulierende Faktoren. Die Zytokine zeigen funktionelle Redundanz und Pleiotropie. Die meisten Rezeptoren der Zytokinsuperfamilie besitzen keine intrinsische Protein-Tyrosinkinaseaktivität, wobei die Stimulation der Rezeptoren durch Ligandbindung zu Phosphorylierung der Rezeptoren und intrazellulärer Proteine führt, wie Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche somit in die Nähe des Rezeptors rekrutiert werden, um die Signalkaskade zu induzieren [161]. Die Familie der Zytokinrezeptoren ohne eigene Kinasedomäne kann basierend auf ihre strukturellen Unterschiede in der extrazellulären Domäne grob in vier Untergruppen unterteilt werden, auf welche aus Platzgründen nicht im Detail eingegangen werden kann. Der Epo- und IL-6-Rezeptor gehören beide zu Gruppe I, wobei der IL-6-Rezeptor noch eine zusätzliche Immunglobulinähnliche Domäne am N-terminale extrazellulären Ende besitzt. Für die Übermittlung von Signalen durch diese Rezeptoren sind drei Eigenschaften charakteristisch: 1.) der C-terminale Anteil der Rezeptoren besteht in der Regel aus 10-100 AS, besitzt aber keine Region mit katalytischer Aktivität. Proximal der Zellmembran befinden sich drei konservierte Motive, Box1,2 und eventuell eine Box3, welche wichtige Bindungsdomänen für Signalmoleküle darstellen (siehe IL-6 und Epo Rezeptor). 2.) die meisten dieser Zytokinrezeptoren bestehen aus mehr als zwei Untereinheiten, obwohl einige auch als Monomere agieren. 3.) eine der Rezeptoruntereinheiten wird oft von anderen Zytokinrezeptoren geteilt. Zur Gruppe I der Zytokinrezeptoren gehört auch der IL-2 Rezeptor. So werden z.B. zwei der drei IL-2-Rezeptoruntereinheiten von anderen Rezeptoren geteilt, seine  $\beta$ -Kette ist Teil des IL-15R und seine  $\gamma$ -Kette Teil der Rezeptoren von IL-4, IL-7 und IL-9 [162]. Der IL-2-Rezeptor gehört zu den best charakterisierten Rezeptorsystemen der Gruppe I-Rezeptoren. Das IL-2-Rezeptorsystem besteht aus drei Untereinheiten:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette. Um die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten in Bezug auf Proliferations-signale zu untersuchen wurde die murine IL-3 abhängige Zelllinie BaF/B03, eine Pro-B-Zelllinie, untersucht. BaF-B03 Zellen exprimieren endogen die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kette, aber nicht die  $\beta$ -Kette des IL-2R. Interessanterweise konnte Zellproliferation in diesen Zellen durch IL-2 Stimulation erst durch Transfektion der  $\beta$ -Kette-c-DNA erreicht werden. Um die für die Übermittlung von Proliferationssignalen essentielle Region in dieser Untereinheit zu identifizieren, wurden verschiedene Deletionsmutanten der  $\beta$ -Kette in diese Zellen transfiziert. Als kritische Region wurde eine der Zellmembran nahe Region identifiziert, welche reich an Serin ist und daher S-Region benannt wurde. Eine Deletionsmutante der S-Region kann aber noch IL-2 binden, einen Komplex mit der  $\alpha$ -Kette bilden und internalisiert werden [163]. Die S-Region beinhaltet sowohl eine Box-1 als auch eine Box-2 Region, welche mit den Janus-Kinasen interagieren [164, 165] und für die Übermittlung von Proliferationssignalen essentiell sind [51, 166]. Neben den Janus-Kinasen konnten noch weitere NRTK gefunden werden, die mit dem IL-2-Rezeptor assoziieren. Drei

Mitglieder der Familie der Src-Kinasen Lck, Lyn und Fyn interagieren mit der  $\beta$ -Kette des IL-2R. Lck interagiert ligandunabhängig mit einer Region distal der S-Region der  $\beta$ -Kette des IL-2R und wird darüber hinaus nach IL-2 Bindung aktiviert [167]. Lck bindet mit seinem N-terminalen Teil an eine Region, welche reich an sauren AS ist und deswegen auch "acidic" oder kurz A-Region genannt wird [168]. Unklar ist die Bedeutung dieser Interaktion, da Deletion der A-Region in der  $\beta$ -Kette das IL-2 abhängige Wachstum in der pro B-Zelllinie BAF B03 nicht beeinträchtigt [169].

### **1.3.4 Die Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen**

#### 1.3.4.1 Die Src-Kinasen und die Csk-Kinase

##### **1.3.4.1.1 Die Primärstruktur der Familie der Src-Kinasen**

Das *v-Src* Onkoprotein war eine der ersten Tyrosinkinase, welche im Detail untersucht wurden. Seitdem zählt man zu der Src-Familie 9 Mitglieder: Src, Lyn, Fyn, Lck, Fgr, Yes, Hck, Blk und Yrk. Ihre Expression ist ubiquitär (Src, Yes, Fyn und Yrk) oder ist auf wenige Zellarten wie die Expression von Fgr, Fyn Lck, Hck, Blk und Lyn in hämatopoetischen Zellen beschränkt. Die Struktur der Src-Kinasen ist innerhalb der Familie hoch konserviert. Am C-terminalen Ende findet sich die "Src-like-homology 4" (SH4-Domäne) welche aus einer Konsensussequenz für die Bindung an die gesättigte Fettsäure Myristat (Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr), und in manchen Src-Kinasen eine Konsensussequenz für die Bindung an die Fettsäure Palmitat (myr-Gly-Cys) für eine Verankerung in die Zellwand besteht [170]. Die Verankerung in der Zellwand ist essentiell für ihre Kinaseaktivität, so verliert z.B. die Myristilationmutante von *v-src* ihre transformierende Eigenschaft [171]. Nach der SH4-Domäne folgt die sogenannte "unique domain" bestehend aus 50-80 AS, welche die Heterologie in der Sequenz bildet und somit für jedes Familienmitglied speziell ist. Man nimmt an, dass diese Region für die spezifische Interaktion mit Regulatoren und Substraten verantwortlich ist [172]. Speziell gezeigt werden konnte dies im Falle von Lck, welches durch seine "unique domain" mit CD4 und CD8 des T-Zell Rezeptors assoziiert [173]. Der "unique domain" folgen weiter die sogenannte SH3-Domäne, welche bevorzugt mit prolinreichen Sequenzen interagiert, eine SH2-Domäne, welche bevorzugt mit an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen interagiert und eine katalytische Region, SH1-Domäne, welche ATP bindet und Phosphogruppen transferiert (Lysin 273 in Lck) [172].

Einige der Src-Kinasen kodieren für mehr als ein Proteinprodukt. So wird das *fyn*-gen durch Splice-Varianten von Exon 7 für zwei unterschiedliche Kinasen transkribiert. Das Transkript *fynB* wird vor allem in Hirngewebe gefunden, und *fynT* hingegen meist in hämatologischen Zellen. Beide unterscheiden sich in einem 50 AS langen Abschnitt am Ende der SH2- und Beginn der Kinase-Domäne. Im Falle von Lyn entstehen zwei Isoformen p53 und p56, durch

Verwendung unterschiedlicher Spliceformen. Die beiden Isoformen unterscheiden sich durch 21 AS in ihrer "unique domain" und werden normalerweise im gleichen Zelltyp expremiert. Auch für Hck finden sich zwei Isoformen, was auf zwei unterschiedliche Startsignale in der Translation zurückzuführen ist. Die längere Form von Hck p59 wird an einem CUG-Kodon (Leucin) initiiert, die kürzere Form p56 Hck an dem konventionellen AUG-Kodon (Methionin). Unter den Isoformen finden sich keine grossen Unterschiede in ihrer funktionellen Wirkung, mehr ein quantitativer, wie z.B. für die beiden Fyn-Isoformen, von denen die p59fynT eine ausgeprägtere Fähigkeit hat die Antigen Antwort zu unterstützen als p59fynB. Dieser Wirkungsunterschied ist auf die unterschiedliche katalytische Domäne zurückzuführen [172].

#### **1.3.4.1.2 Die Regulation der Aktivität von Src-Kinasen**

In der Regulation der katalytischen Aktivität der Src-Kinasen sind mehrere Teile des Enzymes involviert. Lange wurde angenommen, dass der Grossteil der Regulation nur intramolekular zwischen dem C-terminalen Tyrosinrest (Tyrosin 505 in Lck) und der SH2-Domäne stattfindet. Der C-terminale Tyrosinrest interagiert hierbei, wenn phosphoryliert mit der SH2-Domäne desselben Moleküles. Es wurde angenommen, das dadurch die Kinasedomäne "verschlossen" wird und somit für ATP-Moleküle oder andere Substrate nicht mehr zugänglich ist. Phosphoryliert wird dieser Tyrosinrest nicht durch Autophosphorylierung, sondern durch eine weitere Kinase Csk oder C-terminale Src-Kinase, die später noch im Detail beschrieben werden wird.

Seit die Röntgenkristallstruktur der Src-Kinasen c-Src und c-Hck im Jahre 1997 veröffentlicht wurde, hat sich das Verständnis ihrer Regulation erweitert. Beide wurden zusammen mit, die Src-Kinasen negativ regulierende Kinase, Csk kristallisiert, um beide Src-Kinasen in ihrem inaktiven Zustand festzuhalten. Zum einen fand man überraschenderweise, dass die Interaktion des C-Terminus mit der SH2-Domäne eher einen hemmenden räumlichen Einfluss auf die Kinasedomäne hat, da sie, wenn gebunden an den phosphorylierten C-terminalen Tyrosinrest, von der katalytischen Domäne weit entfernt lokalisiert ist, nämlich an ihrem Rücken. Sie hemmt dadurch weder Substratbindung noch die aktive Seite der Kinase-Domäne. Somit hat die SH2-Domäne einen stabilisierenden Einfluss auf einen weiteren intramolekularen Kontakt zwischen der SH3-Domäne mit der sogenannten Linkerregion. Die Linkerregion verbindet die SH2-Domäne mit der Kinasedomäne und enthält kein klassisches prolinreiches Bindungsmotiv, formt aber trotzdem eine Polyprolintyp II-Helix (im Falle von Hck Pro244-Trp254), welche an die hydrophobe Oberfläche der SH3-Domäne andockt. Die SH3-Domäne besteht aus 5  $\beta$ -Faltblättern (A-E).  $\beta$ -Faltblatt A wird mit  $\beta$ -Faltblatt B durch die sogenannte RT-Schleife verbunden,  $\beta$ -B und  $\beta$ -C durch die n-Src-Schleife. Beide Schleifen flankieren die Linkerregion und andere Moleküle, die mit der SH3-Domäne interagieren. Ihnen kommt deswegen eine Substrat selektierende Rolle zu.

Die katalytische Domäne besteht grob aus zwei Abschnitten, einem N-terminalen, der auch kurz N-Lobe genannt wird (im Falle von Hck AS 267-342) und einem C-terminalen Teil oder

auch C-Lobe (AS 343-519). Der N-Lobe enthält die glyzinreiche Sequenz, welche mit der Phosphatgruppe des Nukleotides interagiert. Der C-Lobe enthält neben der Substratbindungsstelle, eine Bindungsstelle für metallische Ionen, für die Phosphatgruppe des ATP's. Darüber hinaus enthält es noch einen Tyrosinrest, welche durch Autophosphorylierung die katalytische Aktivität unterstützt, in der Röntgenkristallstruktur aber nicht phosphoryliert war [174].

Darüber hinaus führt Mutation des C-terminale Tyrosins zu Phenylalanin zu konstanter Aktivierung der Kinase mit Verlust der Regulation [175, 176]. Die Regulation der katalytischen Aktivität der SH-1 Domäne hängt von der SH3-Domäne ab [174]. Es wurde gezeigt, dass HIV-1 NEF die Linkerregion von der Bindung mit der SH3-Domäne verdrängt, was zur Auffaltung des Enzymes mit nachfolgender Aktivierung führt. Die Aktivierung findet zum einen durch Autophosphorylierung der Kinasedomäne und zum anderen durch Wegmanövrieren des C-terminalen Tyrosinrestes von der SH2-Domäne statt. Stärkere Aktivierung wird erreicht durch vorhergehendes Dephosphorylieren des C-terminalen Tyrosinrestes, was die Konformation bezüglich der Zugänglichkeit der SH3- und der Kinase-Domäne günstiger gestaltet. Nach Bindung von HIF-NEF wird neben der SH3- auch die SH2-Domäne von der Kinase-Domäne weggedreht und somit zugänglicher für Phosphate, was, wie schon erwähnt, zur Autophosphorylierung des Tyrosinrestes und Aktivierung der Kinase führt [177]. Darüber hinaus weiss man, dass die Mutationen in der SH3-Domäne, welche zur Aktivierung der Kinase führen, in der hydrophoben Seite (Y90, Y92, W118, Y131, P133, Y136) liegen [178]. Die SH3-Domäne wird somit zur eine die Kinaseaktivität regulierende Domäne.

#### **1.3.4.1.3 Die Assoziation von Src-Kinasen mit Zelloberflächen-Rezeptoren**

Viele Assoziationen von Src-Kinasen mit Rezeptoren sind bekannt. Z.B. assoziiert Lck nicht nur mit CD4 und CD8 sondern auch mit CD2, CD28, CD5 und CD45. Lck assoziiert auch mit der  $\beta$ -Kette des IL-2R in der sauren Region des Rezeptors (siehe dazu auch 1.3.3.1.). IL-2 stimuliert die Kinaseaktivität von Lck und führt zur Phosphorylierung eines Serins an Position 59. Überraschenderweise wird die Signaltransduktion durch den IL-2R in Lck K/O Zellen nicht unterbrochen, was zur Annahme führte, dass andere Src-Kinasen die Aufgabe von Lck in diesem Zellsystem übernehmen. Auch finden sich nur ungefähr 3-5% des exprimierten Lck an den IL-2-Rezeptor gebunden, was darauf hinweist, dass der Grossteil des Enzyms eine Reihe anderer Aufgaben in der Zelle zu erfüllen hat [168]. FynT assoziiert in T-Lymphozyten stimulations-unabhängig mit dem Prolaktinrezeptor und wird durch Prolaktin aktiviert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ungefähr nur 10% des in der Zelle exprimierten Fyn mit dem Prolaktinrezeptor assoziieren [179]. Weitere Beispiele sind die Assoziation von p59Hck und p56Lyn mit Fc $\gamma$ RII, ein Rezeptor der IgG-Familie mit geringer Bindungsaffinität. Die Stimulation führt zur Aktivierung der beiden Src-Kinasen mit nachfolgender Phosphorylierung des Rezeptors [180]. Lyn assoziiert auch mit einem weiteren Rezeptor dieser Familie: der Fc $\gamma$ RI-Rezeptor für IgE. Stimulation des Rezeptors führt zu Tyrosinphosphorylierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -

Kette durch Lyn. Die Assoziation der beiden Moleküle wurde in dieser Studie im “Yeast-two-hybrid System” untersucht. Die “unique domain” von Lyn assoziiert mit dem C-terminale Anteil der  $\beta$ -Kette des Rezeptors [181]. Darüber hinaus assoziiert p53/p56Lyn stimulationsunabhängig mit der  $\beta$ -Untereinheit des GM-CSF Rezeptors [182].

#### 1.3.4.1.3. Substrate der Src-Kinasen

Die NRTK Syk (siehe dazu auch 1.3.4.4) scheint ein wichtiges Substrat der Src-Kinasen in B-Zellen nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors zu sein. Durch Ko-Transfektionsexperimente in Lyn  $-/-$  Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Syk nach Stimulation des Rezeptors durch Lyn, Fyn, Blk und Lck verstärkt wird [183]. Weitere Src-Substrate sind p95Vav und p46-52Shc. Vav ist ein Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor der *Rho* Familie. Die Tyrosinphosphorylierung von Shc führt zur Bindung von Grb2 (siehe 1.3.5.1.) mit nachfolgender Bindung an mSOS, welches ein Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor für die Ras-Familie ist (siehe unten mehr). Weitere Substrate sind die Protein-Tyrosinphosphatasen CD45 und PTP-1C, GTPase aktivierendes Protein GAP von p21ras, ein GAP assoziiertes Protein p62, CD5, CD6, CD22 und ein weiteres Onkogenprodukt c-Cbl. Der Effekt der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine durch die Src-Kinasen ist in vielen Fällen noch ungeklärt [172].

#### 1.3.4.1.4. Die Csk Familie der inhibierenden Tyrosinkinasen

Zur Familie der C-terminalen Src-Kinasen (Csk) zählt man heute zwei Mitglieder Csk und Ntk, welche zueinander homolog sind und in allen Geweben expremiert werden. p50Csk wurde zuerst in neonatalen cerebralen Geweben als eine p60Src phosphorylierende Kinase gefunden. Auch werden Fyn, Lyn, Lck und Fgr von Csk phosphoryliert und somit reguliert. Ntk phosphoryliert das C-terminale Tyrosin in Lck. Die Struktur der Csk-Familie gleicht der von Src-Kinasen bis auf das Fehlen eines C-terminale Tyrosins, einer Myristylierungsdomäne und eines Tyrosinrestes für Autophosphorylierung in der Kinasedomäne. Das *ntk*-Gen kodiert für zwei Polypeptide: p52ntk und p56ntk. P52ntk ist P50csk sehr ähnlich. p56ntk besitzt zusätzlich 40 AS am N-Terminus und kodiert von einem sonst nicht transkribierten Exon [172].

Die Aufgabe von Csk ist die Negativregulation der Src-Kinasen durch Phosphorylierung ihres C-terminalen Tyrosins mit nachfolgender intramolekularer Konformationsänderung des Enzyms. Ihre wichtige Rolle als Regulatoren der Src-Kinasen wurde in vielen Studien bestätigt. Der homozygote Csk-Gen-Knockout ist nach dem 9-12 Gestationstag durch Entwicklungsdefekte des Neuralrohrs nicht mehr lebensfähig. Darüber hinaus findet sich eine konstitutive Aktivierung der Src-Kinasen Src, Fyn und Lyn in Csk-Knockout-Zellen [184, 185]. Durch Überexpression von Csk in T-Lymphozyten kann die T-Zell-Rezeptor-induzierte Tyrosinphosphorylierung und Lymphokin-Sekretion (durch Hemmung der Src-Kinasen) gehemmt werden. Dem kann durch gleichzeitige Überexpression von Fyn entgegen gewirkt werden [186]. In B-Lymphozyten von Csk  $-/-$  Mäusen ist Lyn konstitutiv aktiviert [187].

Neben den Src-Kinasen hat Csk noch weitere Substrate wie z.B. die Phosphatase CD45, eine weitere NRTK, FAK (siehe unten) und das Adhäsionsmolekül Paxillin [172].

#### 1.3.4.2 Die Janus-Kinasen

Die Familie der Janus-Kinasen (Jak oder "just another kinase") besteht aus vier Mitgliedern, Jak1,2,3 und Tyk2. Die Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine C-terminale Kinaseregion und eine sogenannte Pseudokinaseregion, welche die für katalytische Aktivität nötigen AS vermissen lässt. Janus-Kinasen enthalten weder eine transmembranäre, noch eine SH2- oder SH3-Domäne. Unter den vier Familienmitgliedern existieren fünf hoch konservierte Sequenzen N-terminal der Kinase und der Pseudokinasedomäne. Ihre Funktion ist noch unklar. Mit Ausnahme von Jak3, was ausschliesslich in myeloischen und lymphatischen Zellen expremiert wird, werden die Janus-Kinasen ubiquitär expremiert. Alle Zytokine aktivieren eine oder mehrere Janus-Kinasen. In allen bisher untersuchten Rezeptorsystemen führt Ligandstimulation zur Phosphorylierung einer konservierten Peptidsequenz K(D/E)YY, welche essentiell für die Kinaseaktivität der Janus-Kinasen ist. In Zytokinrezeptoren assoziiert der zellmembrannaher Teil, welcher Box1 und Box 2 enthält (siehe auch 1.1.3.3 und 1.2.2.1) mit den Janus-Kinasen. Gleiches konnte auch durch Ko-Expressionsexperimente in Säugetier- oder Insektenzellen durch Ko-Immünpräzipitationen *in vivo* für die Rezeptoren des Wachstumshormons (GH=growth hormon), Prolaktin, G-CSF und EpoR gezeigt werden. Jak2 scheint ligandenunabhängig direkt mit diesen Rezeptoren mit schwacher Affinität zu assoziieren; die Affinität steigt nach Ligandbindung deutlich an [50, 51]. Die Aktivierung der Janus Kinasen führt auch hier zur Aktivierung und Rekrutierung der STAT Proteine an den Rezeptorkomplex. Sechs STAT Proteine sind bisher bekannt. Sie besitzen eine SH2, eine SH3-Domäne und einen konservierten C-terminalen Tyrosinrest, welcher auch eine Rolle in ihrer Bindung an DNA spielt. Es wird angenommen, dass sie mit ihrer SH2-Domäne an Tyrosinreste rekrutierenden Rezeptorsystemen binden [54], siehe dazu auch 1.2.2.1.

#### 1.3.4.3 Die FAK Kinase

Die Focal Adhesion-Kinase (FAK) Kinase ist ein 125Kda schweres, ubiquitäres Protein. Das Enzym enthält eine Tyrosinkinase-Domäne, besitzt aber keine SH2, SH3 oder Membran lokalisierende Domäne. In Fibroblasten findet sich FAK zusammen mit Integrinrezeptoren an der in der Zelladhäsion beteiligten Membranbereichen und wird durch den Zellkontakt aktiviert, was sie zu NRTK der Integrinrezeptoren macht. FAK wird somit zum Vermittler zwischen den Integrinen und dem Ras-Signalweg [188]. FAK assoziiert mit Src und ist ein Substrat von Src [189]. Darüber hinaus assoziiert FAK mit Jak2 nach Stimulation von Zellen mit Wachstumshormon (GH). FAK wird von Jak2 tyrosinphosphoryliert und aktiviert. Die Bedeutung dieser Interaktion ist bis heute noch unklar, da sie keinen Einfluss auf die Aktivierung von Stat5 durch GH hat [190].

#### 1.3.4.4 Die Syk Kinase

Die Proteinfamilie der Syk Kinasen besteht aus zwei Mitgliedern, Syk und Zap-70. Beide Enzyme zeigen grosse strukturelle Ähnlichkeit und unterscheiden sich von anderen Tyrosinkinase durch zwei SH2-Domänen, die der katalytischen Domäne vorausgeschaltet sind. Die Aufgaben beider wurden am besten in B- und T-Zellen charakterisiert, wo sie durch Assoziation mit den Rezeptoren der Zellmembran nahe lokalisiert sind, aber überraschenderweise nicht durch Myristylierung in der Zellmembran verankert sind. Syk und Zap-70 binden dabei an ein bestimmtes Motiv welches durch Aneinanderreihung von Tyrosin- und Leuzinresten charakterisiert ist und den Namen "immune-receptor tyrosine based activation motif" oder kurz ITAM trägt, siehe dazu auch 4.4.5. Die Tyrosinreste in ITAM werden nach Rezeptorstimulation durch Mitglieder der Src-Kinasen phosphoryliert bevor Syk und Zap-70 assoziieren [191]. Syk und Zap-70 assoziieren direkt mit Mitgliedern der Src-Kinasen. Im Detail charakterisiert wurde dies für Syk und seine Interaktion mit Lyn, Fyn und Lck [192]. Syk bindet durch zwei Tyrosinreste Y518/519, welche durch Autophosphorylierung phosphoryliert werden und die katalytische Aktivität von Syk verstärken, an die SH2-Domäne der Src-Kinasen und vermittelt so Signale in der Zelle die zur Phosphorylierung weiterer Proteine führt [193].

#### **1.3.5 Der Ras-Signalweg (Abb.1.3.5)**

*ras*-Gene spielen eine zentrale Rolle in der physiologischen und pathologischen Regulation der Zellproliferation. 1984 fanden Kataoka et al., dass die *ras*-Gene eine essentielle Rolle im Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* spielen. Ein Jahr später konnten Toda et al. demonstrieren, dass *ras* auch ein essentieller Faktor für die Differenzierung von Hefe ist [194]. Später untersuchte man die Aufgabe der *ras*-Gene in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* und fand, dass sie in diesen Organismen essentiell für die embryonale Entwicklung und Differenzierung sind [195, 196]. Dieser Befund bestätigte sich auch später in Gen-Knockout Experimenten in Mäusen für ein Mitglied der Ras Familie *K-ras*. Homozygote Knockouts sind zwischen Tag 12.5 und 15.5 aufgrund starker cerebralen Entwicklungsstörungen nicht lebensfähig [197]. Interessanterweise, zeigen Gen-Knockout Mäuse von *H-ras* und *N-ras* keinerlei Abnormalitäten in ihrer Entwicklung und Organbefund [198]. Mikroinjektion von *ras*-Antikörpern in kultivierte Säugetierzellen zeigte, dass *ras* für die mitogene Antwort der Zellen auf Wachstumsfaktoren und für die Transformation durch viele Onkogene verantwortlich ist [199].

##### 1.3.5.1 Ras aktivierende Proteine

Zur Ras-Familie in Eukaryonten gehören die Gene *H-ras*, *K-ras* und *N-ras*. Sie kodieren funktionell und strukturell sehr ähnliche (188-189 AS lange) Proteine mit einem Gewicht von 21

kDa, die an der Innenseite der Zellmembran mit ihrem C-terminalen Teil verankert sind. Die Verankerung geschieht ähnlich wie bei den Src-Kinasen über Bindungsstellen für Fettsäuren, im Falle der Ras Familie Farnesyl mit Palmitat oder basischen Aminosäuren. **Ras**-Proteine binden Guanin-Nukleotide in einer Sequenz deren Abschnitte auch anderen G-Proteinen hoch konserviert sind und besitzen GTP'ase Aktivität. Sie werden deshalb zur Gruppe der regulatorischen G-Proteine gerechnet. Externe Wachstums- und Differenzierungssignale stimulieren die Umwandlung der Ras-Proteine von einer inaktiven, GDP-gebundenen in eine aktive, GTP-bindende Form. Der GTP/GDP Austausch und die hydrolytische GTP Aktivität der Ras eigenen intrinsischen GTP'ase Aktivität ist nicht sehr stark und wird deswegen von zwei regulatorisch wirkenden Proteingruppen unterstützt, siehe dazu auch Abb.1.3.5, [200]:

1.) die GTP'ase-aktivierende Proteine (**GAPs**): man kennt drei humane GAPs, eine p100-GAP welches nur in Plazentazellen expremiert wird, p120-GAP, welches in allen humanen Gewebearten expremiert wird [201] und Neurofibromin, ein Produkt der Neurofibromatosis, Typ 1(NF1) Tumor Suppressor Gene [202]. Sie gelten als Negativregulatoren von *ras* da sie dephosphoryliert aktiviert sind und die schwache, *ras*-eigene GTP-Hydrolyse, Hydrolyse von Ras-Guanin-Triphosphat zu Ras-Guanin-Diphosphat, um das 10000 fache steigern können [203, 204];

2.) Eine Aktivitätsteigerung von *ras* findet durch Ras-Guanin Nukleotid-Austausch-Faktoren: RasGRF/mCDC25 und SOS1/2 statt [200]. Sos, ein 180 kDa schweres Protein wurde in der Photorezeptor Zelle R7 der Retina der *Drosophila* als interagierendes Protein zwischen der RTK "Sevenless" und dem Ras-1 Protein entdeckt: Daher auch der Name "Son of Sevenless" oder Sos [196, 205], dessen Proteinprodukt homolog zu CDC25, einem Guanin-Austausch Faktor für Ras in *Saccharomyces cerevisiae* ist [200]. Es katalysiert den Austausch von Ras-gebundenem GDP mit GTP und beschleunigt so die Aktivierung des *ras*-Proteines. Die Wirkung von Sos scheint von seiner Lokalisation in der Zelle abhängig zu sein. Aronheim et al. zeigten, dass Sos mit seinem prolinreichen C-terminalen Ende an die SH3-Domäne des Adapterproteins **Grb2** bindet [206] und dieser Proteinkomplex an die Plasmamembran transloziert, um dort den Nukleotidaustausch an Ras durch Sos zu initiieren. Diese Translokation wurde im Detail für den EGF-Rezeptor beschrieben, der nach Bindung von EGF phosphoryliert wird, einen Komplex mit Grb2 und Sos bildet und somit die Translokation dieses Komplexes an die Plasmamembran (zu Ras) initiiert [207, 208]. Sos-Proteine, die durch genetische Manipulationen zusätzliche Myristilationsdomänen von v-Src oder Palmitations-oder Farnestylationsseiten von Ha-ras erhalten haben, können Zellen konstitutiv aktivieren [209]. Aber Sos bindet nicht nur durch Grb2 an Rezeptoren. Nach Stimulation des Insulinrezeptors heftet sich der Sos-Grb2-Komplex indirekt, d.h. über ein tyrosinphosphoryliertes Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS-1) erst an das Protein Shc (s.u.) und danach an den Insulinrezeptor mit nachfolgender Aktivierung von Ras [210, 211]. Man kennt zwei humane Formen von Sos: Sos1 und 2, welche beide durch ihre C-terminale, prolinreiche Sequenz mit der SH3-Domäne von Grb2 assoziieren. Interessanterweise unterscheiden sich



beide Proteine in ihrer Bindungsaffinität an Grb2 *in vivo* und *in vitro*. Somit hat Sos2 aufgrund einer 16AS langen Sequenz in dem prolinreichen C-terminalen Teil eine höhere Bindungsaffinität an Grb2 als Sos1 [212]. Dagegen scheint aber Sos1 die grössere biologische Aktivität zu besitzen, da die Halbwertszeit von Sos2 durch Proteindegradierung durch Ubiquitin stark verkürzt wird. Ubiquitin ist ein aus 76 AS bestehendes Protein, welches kovalent an Lysin in Proteinen gebunden deren Degradierung vorantreibt [213].

**Grb2** wurde als Adapterprotein von Rezeptor-Tyrosinkinasen zum Ras-Signalweg als erstes in *Caenorhabditis elegans* identifiziert und Sem-5 genannt. Es handelt sich um ein 25 kDa schweres Adapterprotein mit einer SH2-Domäne, die von zwei SH3-Domänen benachbart wird. Kurz darauf wurde das Protein in Säugetierzellen durch Hybridisierung von humanen und Nagetier c-DNA-Bibliothek mit der Sem-5 Sequenz kloniert und Ash genannt (Abundant Src homology) [214]. Zur gleichen Zeit versuchten Lowenstein et al. durch die Strategie "cloning of receptor targets" (CORT) in einer Phagen-Protein-Bibliothek auf die Interaktion von Proteinen mit dem EGF-Rezeptor zu untersuchen und fanden eine Sequenz, die homolog zu Ash war. Sie nannten sie "Growth Factor Receptor bound Protein 2" (Grb2) [215]. Sem5 und Grb2/Ash sind zu 60% homolog auf AS-Ebene. Grb2 bindet an eine Reihe von Rezeptoren und Proteinen. Durch Peptidblocking Studien konnte auch Grb2 bevorzugtes SH2-Bindungsmotiv als YXNX charakterisiert werden, siehe Abb.1.3.5 [216]. Man weiss seit kurzem welche Konsequenzen der genetische Verlust von Grb2 hat. Cheng et al. untersuchten im Mausmodell den Verlust des Proteines durch "Gen Knock out" Strategien. Der Verlust dieses Genes führt sehr früh in der embryonalen Entwicklung zu einem Block in der Differenzierung des Endoderms um den 7. embryonalen Tag. Darüber hinaus konnte die Gruppe den Verlust von Grb2 durch ein Fusionprotein, bestehend aus einer C-terminalen Deletion von Sos (prolinreiche Teil, welcher mit Grb2 SH3-Domäne assoziiert) und der SH2-Domäne von Grb2, ersetzen. So konnten murine homozygote Grb2<sup>-/-</sup> embryonale Stammzellen ihre Fähigkeit endodermal zu differenzieren zurückgewinnen, nachdem sie mit dem Sos-Grb2-SH2 Fusions-Konstrukt transfiziert worden waren. Grb2 ist essentiell in der Koppelung von Tyrosinkinasen an Sos und folgende Signalwege in der Entwicklung den Endoderms. Interessant hierbei ist, dass aber die Organisation von Epiblast und Mesoderm durch die Fusion der beiden Proteine in  $\Delta$ -Grb2 Zellen nicht ersetzt werden kann, was auf die Bedeutung anderer Signalmoleküle hinweist, welche Grb2 oder Sos als komplett exprimiertes Protein benötigen. Zusätzlich untersuchte die Gruppe auch noch die Rolle von Grb2 in der Signalübermittlung von Polyomavirus Middle-T-Antigen. Weibliche Grb2<sup>+/-</sup> Mäuse, welche aus einer Kreuzung mit weiblichen Grb2<sup>-/-</sup> mit männlichen transgenen Middle-T-Antigen tragende Mäuse stammten, und zeigten ein um 50% reduziertes Auftreten von Mammakarzinom verglichen mit dem weiblichen Wildtyp Mäusen, welche aus einer Kreuzung von weiblichen Grb2<sup>+/+</sup> mit männlichen transgenen Middle-T-Antigen tragenden Mäusen stammten [217]

Ein weiteres Adapterprotein im Ras/Signalweg ist **Shc**. Drei Shc Isoformen sind bekannt: p46Shc, p54Shc und p66Shc. Sie bestehen jeweils aus einer C-terminalen SH2-Domäne, einem angrenzenden glyzin- und prolinreichen Motiv, mit einer Homologieregionen zu  $\alpha$ -1 Kollagen (CH1 oder "collagen homology domain") und einer N-terminale phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) [218, 219]. Wie oben erwähnt, induzieren viele Wachstumsfaktoren und Hormonen wie Insulin, EGF, NGF, GM-CSF, M-CSF, PDGF, Epo, IL-6, IL-5, IL-3, IL-2, und auch die Rezeptorkomplexe des B- und T-Zell-Rezeptors die Tyrosinphosphorylierung von Shc. Es fungiert als Zielprotein für Bindungspartner wie Rezeptoren, Grb2 und andere Proteine [203, 220-234]. Seine Tyrosinphosphorylierung ist Voraussetzung für die Assoziation mit Grb2 durch dessen SH2-Domäne. Dieser Komplex interagiert dann, wie oben erwähnt, mit dem Ras-Nukleotid-Austausch-Faktor Sos und wird zu Ras an die Zellmembran katapultiert [206, 207, 209-212].

Überexpression von **Shc** in Fibroblasten führt zur Transformation dieser Zellen. Dafür ist die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes (Tyr317) in Shc nötig, damit die Grb2 SH2-Domäne binden kann. Shc-Phosphorylierung findet sich auch in durch *v-src*, *v-fps* und *Polyoma virus middle T-antigen* (PyMT) transformierten Zellen, was seine Rolle im Ras-Signalweg und als Vermittler in Zelltransformation bestätigt [235, 236].

Die Bedeutung von **Shc** in der Übermittlung von Signalen von Polyoma Middle-T-Antigen (MT) wurde von Dilworth et al. in Fibroblasten gezeigt. Mit MT transfizierte Fibroblasten zeigten Aktivierung von Mitgliedern der Src-Kinasen: Src, Yes oder Fyn. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass so aktiviertes p60Src MT an den Tyrosinresten 250 und 315 phosphoryliert wird. Beide Tyrosinreste verlieren, wenn sie zu Phenylalanin mutiert werden, die Fähigkeit zur Zelltransformation. Die MT-Y250F-Mutante fällt durch eine verminderte Bindungsfähigkeit von Shc auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass Shc an MT bindet und in die Übermittlung von Transformationssignalen in diesen Zellen beteiligt ist [236]. Auch im Mammakarzinom konnte von Webster et al. die Rolle von Shc in der Tumorgenese demonstriert werden. Die Gruppe zeigte, dass eine Mutante von MT, die eigentliche Bindungsseite von Shc nicht mehr enthielt und trotzdem Mammakarzinome und Lungenmetastasen induzierte. Nach genauerer Untersuchung der MT Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Bindungsseite von Shc *in vivo* rekonstituiert worden war [237].

#### 1.3.5.2 Durch Ras aktivierte Signalwege

Der Ras-Signalweg ist mittlerweile sehr intensiv untersucht worden. Aus Platzgründen kann hier nur auf einige wichtige Moleküle eingegangen werden. Eine bekannte Substratgruppe der Ras-Proteine sind die Raf-Kinasen, Serin/Threonin Kinasen von 70-75 kDa. Die Raf-Familie besteht aus drei Mitgliedern: **Raf-1**, A-Raf und B-Raf. Alle drei besitzen konservierte strukturelle Domänen: CR1 (conserved region 1), CR2 und CR3. Über CR1 und CR2 im N-terminalen Teil des Polypeptides kann durch Deletion/Mutation in diesem Bereich die Kinaseaktivität in CR3 (C-terminaler Teil) reguliert werden [238]. **Raf-1** wird von dem *c-raf-1*

Gen kodiert, einem Homolog zum *v-raf* Onkogen. Durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, FGF, Insulin, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4 oder durch Onkogene wie *v-fms*, *v-sis*, *v-src*, *H-ras*, *PyMT* oder das *v-abl* wird die Kinase phosphoryliert und aktiviert [225, 239]. **Raf-1** interagiert direkt durch seine CR1-Region im N-terminalen Teil mit GTP-gebundenem aktivem Ras und hemmt gleichzeitig die Ras-GAP Aktivität [238, 240, 241]. Durch die Interaktion mit Ras und die damit verbundene Translokation zur Plasmamembran wird Raf-1 aktiviert und die MAP-Kinasen (MAP oder Mitogen aktivierte Kinase) MEK1 und MEK2 nach direkter Assoziation mit Raf-1 phosphoryliert [200, 242]. MEKs sind Mitglieder der Familie der **Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs** oder **ERKs** 'extracellular-signal-regulated kinases). Sie phosphorylieren nach Aktivierung Threonin und Tyrosin (TEY Motive) in zwei weiteren MAPKs: ERK1 und 2 (p42<sup>MAPK</sup>=ERK2; p44<sup>MAPK</sup>=ERK1). Eine Dephosphorylierung dieser Tyrosin- oder Threoninreste in der p42<sup>MAPK</sup> durch die Protein-Tyrosinphosphatase CD45 oder die Serin/Threoninphosphatase PP-2A inaktiviert die Kinase [243].

Nach ihrer Aktivierung wandern die **MAPKs** weiter in den Zellkern um dort Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren. Von den nukleären Zielen der MAPK ist am genauesten **ELK-1**, ein 'tenary complex factor' (TCF), bekannt. **ELK-1** wird durch die MAPK phosphoryliert und bindet und aktiviert zusammen mit dem serum-response-factor (SRF) das serum-response-element (SRE) des *c-fos* Promoters (*c-fos*=primary-response-gene [244, 245]. Das SRE ist ein Motiv in den Promoterregionen von vielen Zytokin-Genen und Genen deren Expression durch Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Das SRE ist massgeblich dafür verantwortlich, dass die Expression der betreffenden Gene durch äussere Stimuli moduliert werden kann [246, 247].

Die MAPKs phosphorylieren und aktivieren noch weitere Transkriptionsfaktoren wie *c-myc*, *c-jun*, p62<sup>TCF</sup> (ein SRF assoziiertes Protein) und NF-IL-6 [248, 249]. Zu den weiteren Substraten der MAPK zählen das myelin-basic-protein (MBP), die ribosomale S6 Kinase (pp90<sup>rsk</sup>), die auch Transkriptionsfaktoren wie *c-fos* und *c-jun* phosphoryliert, die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Raf-1 und der EGF-Rezeptor [242, 250-253].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben führt der Ras-Signalweg nach Stimulation durch Hämatopoetische Wachstumsfaktoren oder transformierende Onkogene über Tyrosinphosphorylierung zellulärer und membranständiger Proteine zu kontrollierter oder unkontrollierter Zellproliferation.

Fragestellung der Arbeit war, intrazelluläre Mechanismen der Zytoline IL-6 und Epo für die Zellteilung und Differenzierung besser zu verstehen.

- 1) Induziert IL-6 in multiplen Myelomzellen Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine?
- 2) Hat die IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung in multiplen Myelomzellen eine Bedeutung für die Proliferation der Zellen und gibt es einen Zusammenhang zwischen der durch IL-6 ausgelösten Tyrosinphosphorylierung und einer biologischen Aktivität durch IL-6?
- 3) Gehören die durch IL-6-Stimulation phosphorylierten Proteine zur Ras-Signalkaskade?
- 4) Werden die Src-Kinasen durch IL-6 aktiviert und assoziieren die Src-Kinasen mit dem IL-6 Rezeptor?
- 5) Gehören die durch Epo-Stimulation phosphorylierten Proteine zur Ras-Signalkaskade?
- 6) Werden die Src-Kinasen durch Epo aktiviert und assoziieren die Src-Kinasen mit dem Epo Rezeptor?
- 7) Spielen die durch Epo aktivierten Src-Kinasen eine Rolle in der Proliferation oder Differenzierung in der Epo Signalkaskade?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellen und Zellkultur

Die humanen B-Zell Linien **OPM-2**, **LP-1**, **U266** wurden über die Deutsche Kollektion von Mikroorganismen und Zell Kultur, Braunschweig, Deutschland, bezogen. Die humane, IL-6 abhängige multiple Myelom Zelllinie B-9 erhielten wir von Dr. K. Anderson, Dana Faber Cancer Institute, Boston, USA. Die Zelllinien **OPM-2** und **U266** wurden in RPMI-1640 Kulturmedium, zusätzlich angereichert mit 10% fötalen Kälberserum (FCS), 1% (50Units/ml) Penicillin, 1% (50µg/ml) Streptomycin und 1% (4mM) L-Glutamin, kultiviert.

Die Zelllinien **LP-1** und **B-9** wurden in ISCOVE'S Kulturmedium, welches ebenso mit 20% Fötalen Kälberserum (FCS), 1% Penicillin, 1% Streptomycin und 1%L-Glutamin angereichert war, kultiviert. Das B-9-Zellmedium wurde zusätzlich noch mit 2%  $\beta$ -Mercaptoäthanol und 10 ng/ml IL-6 versetzt. Alle Zellkulturprodukte stammten bis auf  $\beta$ -Mercaptoäthanol (Sigma Aldrich Chemie, München, Deutschland) von der Firma GIBCO (Paisley, Schottland).

Die **Ba/F3** Zelllinie ist eine murine lymphozytäre Progenitorzelllinie, die in RPMI-1640 Medium, zusätzlich angereichert mit 10% fötalen Kälberserum (FCS), 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% L-Glutamin und 1pM murines rekombinantes IL-3, (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wächst.

**Ba/F3 EpoR C5** erhielten wir von Jackie Damen und Gerald Krystal (Terryfox Laboratory, British Columbia, Kanada). Diese Zellen exprimieren durchschnittlich 7000 Rezeptoren pro Zelle und wachsen unter den für die Ba/F3 Zellen beschriebenen Bedingungen.

**Ba/F3 EpoR Mutanten** Zellen, welche die C-terminalen Deletionsmutanten des EpoR exprimieren, erhielten wir von Dr. Alan D'Andrea (Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA) und Dr. Mark Showers (Dept. for Hematology and Oncology, Brigham and Womens Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Ba/F3 Zellen wurden per Elektroporation mit EpoR c-DNA transfiziert und in Medium ohne IL-3 für Epo-abhängiges Wachstum selektioniert. Die Zellen wurden anschliessend in RPMI-1640 Medium mit 10% fötalen Kälberserum (FCS), 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% L-Glutamin und 1U/ml humanen rekombinanten Epo (Johnson and Johnson, Raritan, NJ, USA) angereichert. Epo-abhängige Zellen enthielten durchschnittlich 1110 Rezeptoren pro Zelle mit einer Bindungsaffinität für Epo von 0.2nM. Bei den C-terminalen Deletionsmutanten handelt es sich um EpoR 467 (AS 1-467), EpoR 440 (AS 1-440), EpoR 416 (AS 1-416) und EpoR 286 (AS 1-286). Der Wildtyp EpoR besteht aus 507 AS. Wie in Abb.2.1 zu erkennen ist enthält EpoR 286 keine der Tyrosinreste des Rezeptors und weder Box1 noch Box2. EpoR 416 dagegen enthält Tyrosin 343 und 401 und Box1,2; EpoR 440 enthält die vier proximalen Tyrosinreste

343, 401, 429 und 431 und Box1,2; EpoR 467 enthält alle Tyrosinreste ausser dem C-terminalen 479 und Box1,2. Die Zellen exprimierten Rezeptoren in einer Dichte von 900-1100 Rezeptoren pro Zelle, nachgewiesen per Scatchard Analyse Plot [254], siehe dazu auch unten. Das pXM-EpoR Konstrukt mit dem Ba/F3 Zellen transfiziert wurden, stammt aus der DNA Bibliothek einer murinen Erythroleukämie Zelllinie, aus welcher ursprünglich der murine Erythropoetinrezeptor kloniert wurde [139].

**Klon 22 Ba/F3 EpoR** Zellen erhielten wir von Dr. Martin Carroll, Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA. Diese Zellen wurden ursprünglich retroviral mit einem Vektor infiziert, welcher für den EpoR kodiert und in entsprechenden Selektionsmedium gehalten. Parentale Ba/F3 Zellen exprimieren kein  $\beta$ -Globin, ein Marker für erythroide Differenzierung. Mit EpoR transfizierte Ba/F3 Zellen, welche monatelang in Epo enthaltendem Medium wachsen, können dagegen  $\beta$ -Globin exprimieren. Um vollkommen sicher zustellen, dass die  $\beta$ -Globinexpression *de novo* und somit abhängig von der Expression des EpoR geschieht und kein klonales Artefakt ist, wurden zu diesem Zweck Ba/F3 Zellen mit EpoR infiziert und in einem IL-3 und Selektionsmarker (G418) enthaltenden Medium gehalten. B-Globinexpression wurde per RNA Protektionsassay nach 6 tägiger Epo-Stimulation gemessen. Zellen wachsen in oben beschriebenen Medium [255].

**HCD-57** Zellen wachsen Epo-abhängig und stammen von einer murinen Erythroleukämie und wachsen in DMEM Medium (GIBCO, Life Technologies, Rockville, MD, USA), 30% fötalen Kälberserum und 1U/ml rekombinantes murines Epo. Diese Zellen exprimieren ungefähr 800 Rezeptoren pro Zelle und binden Epo mit einer Affinität von 0.4 nM. Diese Zellen bekamen wir von Dr. Hankins (Rockville, MD, USA).

**UT-7-Zellen** wachsen Epo-abhängig und stammen von einer humanen megakaryoblastischen Leukämie. Die Zellen wachsen in IMDM Medium angereichert mit 10% fötalen Kälberserum und 1U/ml humanes Epo. Diese Zellen exprimieren ungefähr 950 Rezeptoren pro Zelle mit einer Bindungsaffinität für Epo von 0.4 nM. Die Zellen erhielten wir von Dr. Komatsu (Universität von Jichi, Medical School, Japan).

Kultivierung der Zellen: 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

Rezeptorbindungsaffinitätsstudien und Bestimmung der Rezeptorzahl per Zelle wurde durch Epo gebunden an I<sup>125</sup> von den jeweiligen Laboratorien bestimmt, von denen die Zelllinien zur Verfügung gestellt wurden (Scatchard Plot Analyse) [254]. Mit einer vorgegebenen Anzahl von Zellen, welche mit einer bestimmten Menge an radioaktiv gebundenem Epo und ungebundenem Epo inkubiert werden, kann zum eine die Anzahl gebundener Epomoleküle und zum anderen ihre Bindungsaffinität bestimmt werden.

## 2.2 Reagenzien

Alle Reagenzien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma (Aldrich Chemie, München, Deutschland) oder Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

### 2.2.1 Zellstimulation:

**IL-6:** gereinigtes rekombinantes humanes IL-6 von Dr. L. Färber (Sandoz AG, Nürnberg, Deutschland).

**IL-3:** gereinigtes rekombinantes murines IL-3 von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

**Epo:** gereinigtes rekombinantes humanes Epo von Dr. Linda Joliffe, Dr. Linda Mulcahy (Johnson and Johnson, Raritan, NJ, USA).

**PBS** (Phosphate-buffered saline), pH 7,3 :

137mM NaCl

2,7 mM KCL

4,3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Bovine serum albumin:** BSA; fraction V

### 2.2.2 Puffer und Lösungen:

**Lysis-Puffer:**

	<u>Endkonzentration</u>
Tris 1M pH 8,0	20mM
NaCl 1M	137mM
Glycerol 100%	10%
NP-40 oder Brij96	1%
EDTA 0,5M	10mM

NaF	5mM
Destilliertes H <sub>2</sub> O	

**Lyse-Puffer mit Inhibitoren:**

PMSF 0,1 M	1mM
Aprotinin	0,15 U/ml
NaOrthovanadate	2mM
Leupeptin 5mM	0,1mM
Lysis-Puffer	

**Bestimmung der Proteinkonzentration:**

Bio-Rad Protein Assay von der Firma Bio-Rad, Rockville Center, New York, USA. Der Assay basiert auf einer Farbänderung der 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnten Farblösung Coomassie-Brilliant-Blau nach Reaktion mit basischen und saurer aromatischen Aminosäuren. 2 µl Zellyse wurden mit 1000µl 1:5 verdünnter Farblösung gemischt und mit der Optischen Dichte ( $\lambda=595$ ) im Spekto-Photometer gemessen. Um den aktuellen Proteingehalt der Zellysate zu messen wurde eine Proteingehalt-Standardkurve erstellt. Proben wurden mit Standardkurve verglichen und Lysate entsprechend dem Verwendungszweck verwendet. Für Proben mit Zellysaten wurden 200µg Protein (entspricht ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) und für Immunpräzipitationen 500-700µg Protein (entsprechen ca.  $2,5-3 \times 10^6$  Zellen) verwendet.

**Protein-Lade-Puffer:**

	<u>Endkonzentration</u>
β-Mercaptoäthanol	2%
Tris 1M pH 6,8	125mM
10% SDS	2%
Glycerol 100%	20%



Bromphenol Blau	1%
Destilliertes H <sub>2</sub> O	

### 2.2.3 Westernblot Analyse / SDS-PAGE:

#### Separating-Gel:

	<u>7,5%</u>	<u>10%</u>
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	24,9%	33,2%
4xTris Cl / SDS pH 8,8	24,9%	24,9%
Destilliertes H <sub>2</sub> O	49,8%	41,5%
Temed	0,07%	0,07%
Ammoniumpersulfat	0,33%	0,33%

#### Stacking-Gel:

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	13,1%
4xTris Cl / SDS pH 6,8	25,1%
Destilliertes H <sub>2</sub> O	61,2%
Temed	0,1%
Ammoniumsulfat 10%	0,5%

#### 5xElektrophorese-Puffer:

	<u>Endkonzentration</u>
Tris Base	1,51%
Glycin	7,2%
SDS	0,5%

Destilliertes H<sub>2</sub>O

**Transfer-Puffer:**

Tris Base	0,3%
Glycin	1,44%
Methanol	0,02%
Destilliertes H <sub>2</sub> O	

**10xTBS (Tris-Puffer):**

Tris 1M pH8,0	100mM
NaCl 5M	1,5M
dH <sub>2</sub> O	

**Membran-Blocking-Lösung:**

- 1 % BSA gelöst in 1xTBS
- 5% Trockenmilch gelöst in 1xTBS

**Membran-Stripping-Puffer:**

	<u>Endkonzentration</u>
Tris-HCl pH6,7	62,5mM
SDS	2%
β-Mercaptoäthanol	100mM
Destilliertes H <sub>2</sub> O	

## 2.2.4 Immunpräzipitation und Immunoblotting:

Der monoklonale **Anti-Phosphotyrosin Antikörper 4G10**, wurde durch Immunogenisierung mit Phosphotyramin hergestellt. Er ist spezifisch für tyrosinphosphorylierte Proteine und zeigt keine Kreuzreaktionen mit Phosphothreonin-, Phosphohistidin- oder Tyrosinsulfatresten (Brian J. Druker, Portland, Oregon, USA). Die polyklonalen Kaninchen Antikörper **44 (Anti-Lyn)**, **N-16 (Anti-Src)**, **2101 (Anti-Lck)**, **3 (Anti-c-Yes)**, **FYN3 (Anti-Fyn)**, **N-47 (Anti-c-Fgr)**, **K-23 (Anti-Bik)**, **N-30 (Anti-Hck)** und die monoklonalen Maus Antikörper **c-23 (Anti-Grb2)**, **H-6 (Anti-Lyn)** wurden über die Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA) bezogen. Der polyklonale Kaninchen Antikörper **C-20 (Anti-Shc)**, die polyklonalen Kaninchen **Jak1** und **Jak2** Antikörper wurden von Upstate Biotechnology Inc., (UBI, Lake Placid, New York, USA) benutzt. Die polyklonalen Kaninchen Antikörper gegen den **C-terminalen** und **N-terminalen** Teil des **Erythropoetinrezeptors** erhielten wir von Alan D'Andrea (Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Der polyklonale Kaninchen Antikörper gegen den **C-terminalen** Teil des **Erythropoetinrezeptor M20** wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology (California, USA) bezogen. Die polyklonalen Kaninchen **Jak1** und **Jak2** Antikörper wurden von Upstate Biotechnology Inc., (UBI, Lake Placid, New York, USA) bezogen. Spezifische Peptide für folgende Antikörper wurden verwendet: **Hck-Peptide** bindet AS 8-37 von Hck, **Fyn-Peptide** bindet AS 20-48 von Fyn, **Lyn-Peptide** bindet AS 44-63, **Lck-Peptide** bindet AS 476-505, **Shc-Peptide** bindet AS 454-473 von Shc (Santa Cruz Biotechnology oder UBI). Der an Alkalischer Phosphatase konjugierter Immunoblotting-Antikörper ist ein Anti-Maus IgG oder Anti-Kaninchen IgG Antikörper und wurde von Bio-Rad (Rockville Center, New York, USA) erworben. Die Immunoblotting-Antikörper für die ECL-Methode (s.u.) ist an Meerettich-Peroxidase konjugiert und ist ein Anti-Maus IgG oder Anti-Kaninchen IgG Antikörper und wurde von Amersham (Braunschweig, Deutschland) oder NEN (Life Science Products, Boston, MA, USA) bezogen. Radionukleotide:  $(^{32}\text{P})_{\gamma}$  ATP 3000mCi/ml wurden von Amersham (Braunschweig, Deutschland) oder NEN (Life Science Products, Boston, MA, USA) erworben. Alle Antikörper wurden mit ihrer spezifischen Verdünnung in TBS mit 5% BSA und 0,02 Na-Azid gelöst. ProteinG-Bind und ProteinA-Bind-Plus-Sepharose-Beads wurden von der Firma Pharmacia (LKB, Biotechnology, Uppsala, Schweden) erworben.

### Immunpräzipitations-Wasch-Puffer:

	<i>Endkonzentration</i>
Tris Base pH 8,0	50mM
NaCl	50mM
Brij 96	0,1%

PMSF 0,1M	1mM
Aprotinin	0,15 U/ml
NaOrthovanadate	5mM

**Kinase-Puffer:**

Tris pH7,4	50mM
MnCl <sub>2</sub>	10mM

**Immunpräzipitations-Dissoziations-Puffer:**

Tris-HCl pH7,4	10mM
NP-40	1 %
Na-desoxycholat	0,1%
SDS	0,1%
NaCl	0,15%
EDTA	1mM
Aprotinin	10mg/ml

## **2.3 Zellstimulation, Zellyse und Nachweis der Tyrosinphosphorylierung und Proteinexpression durch Immunoblotting (SDS-PAGE)**

### **2.3.1 Zellstimulation:**

Vor der Stimulation mit entsprechenden Wachstumsfaktoren wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und in ihrem jeweiligen Medium ohne FCS und Wachstumsfaktor aber mit 1% BSA (Hungermedium) für 16-18 Stunden gehalten, um das Signal der Tyrosinphosphorylierung, nach anschliessender Stimulation mit jeweiligen Wachstumsfaktoren zu verstärken. Anschliessend wurden die Zellen

in frisches Hungermedium überführt und mit entsprechenden Wachstumsfaktoren stimuliert: 100ng/ml IL-6, 50 oder 100 U/ml Epo oder 50pM IL-3 für die gewünschte Zeit bei 37°C.

### **2.3.2 Zellyse:**

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss daran bei 4°C mit Lysis-Puffer, ( $5 \times 10^6$  Zellen = 50µl Lysis-Puffer) versetzt und für ca. 25 Minuten alle 5 Minuten gemischt. Die Lyse wurde gestoppt durch Zentrifugation des Lysates bei 14,000 x g. Der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde bei 4°C zur Weiterverarbeitung aufbewahrt, das Pellet verworfen. Im Anschluss daran wurde die Proteinmenge mit dem Biorad Protein Assay bestimmt.

### **2.3.3 Westernblot Analyse / SDS-PAGE/Alkalische Phosphatase:**

Bevor die Proben ins Gel geladen wurden, wurde Protein-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 dazugegeben. Die Proben wurden dann für 10 Minuten auf 100°C erhitzt um Proteindenaturierung zu erreichen. Proteine wurden per SDS PAGE aufgetrennt und durch elektrischen Transfer auf eine Immobilon P Transfermembran (Millipor Corporation, Bedford, Massachusettes, USA) übertragen. Dieser Membrantyp muss in Methanol angefeuchtet werden bevor er im Proteintransfer weiterverarbeitet werden kann. Der Proteintransfer geschieht im elektrischen Feld. Da die Proteine durch im Ladepuffer und Gel enthaltenden SDS negativ geladen werden, wandern sie im elektrischen Feld zur positiven Anode. Der Proteintransfer wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran in 1xTBS Lösung versetzt mit 1% BSA oder 5% Trockenmilchpulver für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert um die Protein-freie Fläche auf der Membran mit Protein zu beschichten, welches nicht mit den immunoblottenden Antikörper reagiert. Danach folgten zwei Waschgänge mit 1xTBS jeweils 5 Minuten bevor das Immunoblotten mit dem ersten Antikörper im Falle von 4G10 mit einer Verdünnung von 1:2500, zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C Grad Celsius begann. Nach Entfernen des ersten Antikörpers wurde der Blot viermal mit 1xTBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Um die durch den ersten Antikörper entdeckten Proteine sichtbar zu machen, inkubierte der Blot für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:2500 mit einem zweiten mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Anschliessend wurde der Blot dreimal mit 1xTBS für jeweils 10 Minuten gewaschen und dann mit Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und Chromo-0-4 Chloro-3 Indolphosphat (BCIP; Firma Bio-Rad) entwickelt .

### **2.3.4 Westernblot Analyse / ECL (Enhanced Chemoluminescence) Methode:**

Nach dem Transfer wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 1xTBS/ 5% Magermilchpulver oder 1xTBS/ 1% BSA (wenn der nachfolgende Antikörper 4G10 war), geblockt. Danach inkubierte die Membran, nach zweimaligen Waschen mit TBS, über Nacht bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper: Anti-Grb2 oder Anti-Shc wurden in einer Verdünnung von 1:500 benutzt. Vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in 1xTBS gewaschen. Die zweiten Antikörper (Verdünnung 1:1000 bis 1:2500) sind mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, welche beim Entwickeln durch Zugabe von Peracid, Luminol und Enhancer in die oxidierte Form übergeht und energiereiches Licht produziert, wodurch ein Film belichtet werden kann. Vor Zugabe der Entwicklersubstanzen wurde der Blot noch dreimal mit 1xTBS für 15, 5, 5 Minuten gewaschen. Im Gegensatz zu den mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern, kann der Antikörperkomplex aus "erstem und zweitem" Antikörper bestehend von den membrangebundenen Proteinen durch Spaltung der intermolekularen Disulfidbrücken getrennt werden. Dafür wurde die Membran in einer  $\beta$ -Mercaptoäthanol-Lösung (0.7%) bei 70°C für 1 Stunde inkubiert. Dieser Vorgang wird auch Strippen der Membran genannt. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal mit 1xTBS für 5 Minuten gewaschen, mit 5% Magermilchpulver geblockt für (1,5 Stunden bei Raumtemperatur) und mit einem neuen ersten Antikörper (s.o.) inkubiert.

## **2.4 Immunkomplex Kinase Assay**

### **2.4.1 Radioaktives Labeling der Proben:**

IP's wurden wie unter 2.5.1. beschrieben zubereitet. Nach viermaligen Waschen in Immunpräzipitations-Wasch-Puffer wurden sie im letzten Waschgang mit Kinase-Puffer gewaschen. Danach wurden die Proben mit Kinase-Puffer und 1 $\mu$ l (<sup>32</sup>P)- $\gamma$ ATP versetzt und für 15 oder 20 Minuten inkubiert. Das Abbrechen der Reaktion geschah durch die Zugabe von Protein-Lade-Puffer und anschliessendem Erhitzen der Proben auf 100°C für 5 Minuten. Proteine wurden in SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde im Anschluss unter Vakuum bei 80°C für eine Stunde getrocknet. Inkorporation der Radionukleotide wurde per Autoradiographie sichtbar gemacht, d.h. das getrocknete Gel und der zu belichtende Film wirkten bei -20°C aufeinander ein; die radioaktive Strahlung des inkorporierten Isotops belichtete den Film, der danach entwickelt werden konnte.

## 2.4.2 Enolase als spezifisches Substrat für die Src-Kinasen:

Enolase und Laktatdehydrogenase sind in Zellen, welche durch Rous-Sarkom-Virus transformiert sind, spezifisch an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Die Enzyme werden auch aufgereinigt *in vitro* an dem gleichen Tyrosinrest phosphoryliert, wenn sie mit dem retroviralen transformierenden Protein inkubiert werden. Enolase (Boehringer Mannheim, Boehringer Mannheim Cooperation, Biochemical Products, Indianapolis, USA) wurde mit 50mM Essigsäure für 5 Minuten bei 30°C inkubiert um eine Konformationsänderung des Enzymes zu erreichen und den Tyrosinrest für die Kinase zugänglicher zu machen [256]. Enolase wurde dann als exogenes Substrat zu den Labeling Reaktionen der Immunpräzipitationen der Src -Kinasen dazu gegeben.

## 2.5 Immun-Ko-Präzipitation

Um intrazelluläre Proteinassoziationen sichtbar zu machen, wurden Ko-Präzipitationsexperimente [257] angewandt. Die Zellen wurden stimuliert und wie oben beschrieben lysiert.

### 2.5.1 Immunpräzipitation:

Zur Herstellung von Immunpräzipitationen (IP) wurden folgende Antikörpern benutzt: Mitglieder der Src-Familie, 4G10, Grb2, Shc und Mitglieder der Janus-Kinasen Jak (siehe auch Reagenzien). Je nach Antikörper wurden Protein Sepharose-Beads der Klasse G- oder A verwendet. Sepharose-Beads binden an die F<sub>C</sub>-Region von Säugetier-IgG's und dienen zum Beschweren des Protein-Antikörper-Komplexes. Die Beads wurden vor dem Gebrauch zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Verdünnen der Beads mit Immunpräzipitation-Wasch-Puffer 1:1 wurden sie mit 250-300 µl (=500-700µg Proteinmenge) Zellysate (s.o.) versetzt um die Zellysate bei 4°C für 1,5 Stunden von unspezifischen Bindungsstellen weitgehend zu befreien. Dieser Vorgang wird auch Vorklären genannt. Nach Zentrifugation wurden die vorgeklärten Lysate, zu neuen, jeweils zweimal mit Immunpräzipitations-Wasch-Puffer gereinigten, Beads und dem entsprechenden Antikörper 5µg/Ansatz gegeben. Die IP's inkubierten 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wurden sie sechsmal mit Wasch-Puffer gewaschen und per SDS-PAGE mit anschliessendem Immunoblotting analysiert.

In einigen Experimenten wurde nach ersten Abzentrifugieren der Immunpräzipitation der Überstand als Qualitätskontrolle der IP mit auf das Gel geladen und als "Sup" (Überstand, in engl. Supernatant) gekennzeichnet. So konnte überprüft werden ob das zu präzipitierende Protein auch an den Antikörper gebunden wurde.

### **2.5.2 Doppel-Immunpräzipitation im Immunkomplex Kinase Assay:**

Eine erste Immunpräzipitation im dreifachen Ansatz ( $7.5 \times 10^7$  Zellen und  $15 \mu\text{g}$  Antikörper per IP) für Anti-Shc C-20, Protein A-Beads und Zellysat von stimulierten und unstimulierten Zellen wurde angesetzt und einem Immunkomplex Kinase Assay unterzogen wie oben beschrieben. Um die Proteinkomplexe wieder zu trennen wurde die IP nach zweimaligem Waschen mit Wasch-Puffer mit einem Protein-Dissoziation-Puffer gemischt und für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach Zentrifugieren der Proben wurde  $1/4$  des Überstandes aus der dreifach angesetzten Anti-Shc IP bei  $4^\circ\text{C}$  bis zum Laden des Gels aufgehoben. Der restliche Überstand wurde für neue IP's verwandt ( $7,5 \mu\text{g}$  Antikörper per IP) und 1:10 mit Wasch-Puffer verdünnt. Im Anschluss daran wurden gewaschene Protein A-Beads und jeweils  $5 \mu\text{g}$  von Anti-Fyn und Anti-Hck Antikörper hinzugefügt und bei  $4^\circ\text{C}$  für 4 Stunden inkubiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie beim Immunkomplex Kinase Assay (s.o.).

### **2.5.3 Doppel-Immunpräzipitation für Immunoblotting:**

Zellyse und Immunpräzipitationen erfolgten wie oben beschrieben ( $9 \times 10^7$  Zellen und  $15 \mu\text{g}$  Antikörper per IP). Vorgereinigte Zellysate wurden mit dem jeweiligen Antikörper und Protein A-Beads für 4 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. IP wurden 4x mit Wasch-Puffer gewaschen. IP wurden mit Protein-Dissoziation-Puffer für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Hälfte des Überstandes wurde 1:1 mit Protein-Lade-Puffer gemischt und für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Die zweite Hälfte des Überstandes wurde mit Wasch-Puffer verdünnt und mit dem zweiten Antikörper ( $7,5 \mu\text{g}$  Antikörper per IP) und Protein A Beads für 4 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert, 4x mit Wasch-Puffer gewaschen, 1:1 mit Protein-Lade-Puffer gemischt und für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Proteine wurden per SDS PAGE aufgetrennt und immunogeblottet.

### **2.5.4 Peptid-Ansätze:**

Für jeden Antikörper wurde eine Spezifitätstestung mit dem korrespondierenden Peptid durchgeführt. Dafür wurden z.B.  $5 \mu\text{g}$  Antikörper mit der zehnfachen Menge Peptid für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend nach Zugabe der gewöhnlichen Menge Zellysat einer Immunpräzipitation unterzogen (s.o.).



## 2.6 Messung von Zellproliferation

### 2.6.1 (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau:

Zur Messung der Zellproliferation wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau in die Zell-DNA in Abhängigkeit von der IL-6 Konzentration im Wachstumsmedium gemessen. Die Zellen wurden in dreifachen Ansätzen in flache Mikrotiterplatten (96 wells/Platte)  $0,5 \times 10^4$  ausgesät und für 72 Stunden in Medium mit verschiedenen IL-6 Konzentration mit oder ohne  $\text{NaVO}_4$  in einer Konzentration von  $0,8 \mu\text{mol/l}$  (NaOrthovanadate, ein Tyrosinphosphatasehemmer) bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten. In den letzten 4 Stunden der Zellkultur wurde zu den Zellen (<sup>3</sup>H)Thymidin zugegeben ( $0,5 \mu\text{Ci/Well}$ ). Der Thymidineinbau wurde mit einem "liquid-scintillation-analyzer" (Canberra-Packard, Frankfurt/Main, Germany) in "counts per minute" (cpm) gemessen. LP-1, OPM-2 und U266 Zellen wurden 72 Stunden in Medium mit verschiedenen IL-6 Konzentrationen ohne  $\text{NaVO}_4$  in flache Mikrotiterplatten ausgesät. Zugabe und Messung des Thymidineinbaus wurde vollzogen wie oben beschrieben.

### 2.6.2 MTT-Assay:

Die Zellen wurden dafür 3x in PBS gewaschen.  $200 \mu\text{l}$  von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml wurden in dreifachen Ansatz in 96 Well Platten eingesät. Zellen wurden in ihrem jeweilig spezifischen Medium gehalten und mit ansteigenden Zytokin Konzentrationen oder Oligodeoxynukleotid Konzentrationen behandelt. Proliferation wurde nach 48 Stunden per MTT-Assay analysiert.

MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ist ein schwach gelbes Substrat, das von lebenden Zellen verdaut und so in ein blaues Sustrat (Formazan) umgewandelt wird. Diese Umwandlung geschieht nur in der Anwesenheit von intakten Mitochondrien.

#### **Azidischer Alkohol:**

$0,04\text{N HCL}$  in 2-Propanol (Isopropanol)

#### **MTT:**

$5\text{mg/ml MTT}$  (Sigma, St. Louis, MO, USA) gelöst in PBS, steril gefiltert

Nach 48 Stunden wurden  $30 \mu\text{l}$  der MTT Lösung/Well gegeben und für 4-6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$  Inkubator inkubiert. Im Anschluss daran wurden  $100 \mu\text{l}$  Azidischer Alkohol in jedes Well gegeben und die Lichtabsorbtion (OD=optic density) bei  $595\text{nm}$  gemessen.

## 2.7 Lyn-Oligonukleotide

Drei verschiedene Phosphothiat Oligodeoxynukleotide wurden in der Biology Core Facility, Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA, hergestellt: ein 21bp langes Antisense-Oligodeoxynukleotide komplementär zur unique domain von Lyn (AS 62-68 in der humanen wie auch der murinen Form von Lyn), ein 21bp langes Sense-Oligonukleotide mit der identischen Sequenz der oben genannten unique domain von Lyn (S) und ein 21bp langes Mismatched-Oligodeoxynukleotid (MM), welches aus einem Gemisch der unique domain bildenden Nukleotiden gebildet wurde; dieses Oligodeoxynukleotid diente als Kontrolle. Die Oligodeoxynukleotide wurden vom Hersteller auf ihre Uniformität und Reinheit per HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) überprüft. Die Oligodeoxynukleotide (AS, S, MM) wurden lyophilisiert und in sterilem Wasser in einer Konzentration von 100µM aufgelöst und in Konzentrationen von 0-30µM dem Zellmedium (1U/ml Epo) zugegeben. Die Proliferation der Zellen wurde nach 48 Stunden mit dem MTT-Assay (siehe 2.8.) bestimmt. Nachfolgende Experimente wurden in der optimalen Oligodeoxynukleotide Konzentration von 15µM durchgeführt.

Lyn Antisense- Oligodeoxynukleotide (AS): 3'-CAC AAT GTC ACC TTG CTC-5'

Lyn Sense-Oligodeoxynukleotide(S): 5'-GAG GAA CAA GGT GAC ATT GTG-3'

Lyn Mismatched -Oligodeoxynukleotide (MM): 5'-TGG AAC GAC CTC CAC GAG-3'.

## 2.8. RNase Protektions Assay

### 2.8.1 Aufreinigung von Ribonukleinsäure:

#### DEPC-Wasser:

0,1% Diethylen Pyrocarbonate, gelöst in dH<sub>2</sub>O und autoklaviert

#### Isolations Puffer:

4,5M Guanidium Thiozynate

2% N-laurylsarcosine

0,5M EDTA

1M Tris-HCL, pH 7,5

0,1M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

0,2% Antifoam

DEPC-Wasser

#### **CsCl Kissen:**

5,7 mM CsCl

0,5M EDTA

DEPC-Wasser

BaF3 Zellen wurden in Isolations Puffer lysiert, dabei wurde die Menge des Puffers am Zellpellet orientiert (1:1). Im Anschluss daran wurde dieses Gemisch bei 12 000g für 10 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Ultrazentrifugenröhrchen mit 3,5 ml CsCl Kissen aufgefüllt und für jede Zelllysatsprobe zusätzlich 1.8g CsCl ausgewogen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Plastikröhrchen überführt und das ausgewogene CsCl dazugegeben. Dieses Gemisch wurde dann in das Ultrazentrifugenröhrchen überführt, welches dann versiegelt wurde und bei 50 000 rpm für 5.5 Stunden bei 20°C zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Lösung aus dem Ultrazentrifugenröhrchen abgezogen und der verbleibende Pellet mit 70% Äthanol dreimal gewaschen. RNA wurde dann mit 0,1xTE in Lösung gebracht und die Menge durch Bestimmung der OD (optic density) mit einer Wellenlänge  $\lambda=280$  bestimmt. Danach wurde die Qualität der RNA auf einem Agarosegel bestimmt, dafür wurde 1  $\mu$ g RNA geladen. Zuletzt wurde RNA repräzipitiert in 1/10 Volumen 3M NaOAc und 2,5 Volumen 100% Äthanol und bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.8.2 Subklonierung der unique domain von Lyn in einen RNA Polymerase bindenden Vektor:**

Der Vektor pSP72 beinhaltet Bindungstellen für die bakteriellen RNA Polymerasen SP6 und T7 und erlaubt somit die Generierung von sense- oder antisense RNA und wurde vom Promega (Madison, WI, USA), erworben. Die Lyn Sequenz (kodierend für die Aminosäuren 85-170) wurde durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) hergestellt. Die dafür nötige Lyn c-DNA wurde von SM. Anderson, University Colorado, USA in dem pLJ Vektor bereitgestellt. Um ein Klonieren in den Vektor zu ermöglichen wurden die jeweiligen Enden der Sequenz mit

Restriktionsseiten für Restriktionsendonukleasen versehen: BamHI am 5' und eine KpnI Bindungsstelle am 3' Ende. Das PCR-Produkt wurde dann zwischen die Bindungssequenzen der RNA Polymerasen SP6 und T7 in 5' zu 3' Richtung kloniert.

PCR Primer:

Primer 1: 5' GGATCC AA CAA GAA AGG AGA AAA GAT GAA GTT C 3'

Primer 2: 5' GGTACC AA GAC AGA AAG AGA GAA GCT TCC CT 3'

## **2.8.3 Erstellung der Ribo-probe (Antisense-RNA, P<sup>32</sup>-UTP eingebaut):**

### 2.8.3.1 Linearisierung des pSP72 Vektor

12µg des pSP72 Vektor, in welchen die Lyn Sequenz kloniert wurde, wurde mit dem Restriktionsenzym ACCI(20 Units) (NEB, Beverly, MA, USA) geschnitten um die nachfolgende Polymerasereaktion vor dem SP6 Bindungsstelle zu beenden. Nach 2 Stunden Inkubation wurden zusätzlich 20 Units hinzugefügt um einen kompletten Verdau des Vektors sicherzustellen. Dies wurde auch durch ein 2% Agarosegel bestätigt auf welches 1/24 des Gemisches geladen wurde.

### 2.8.3.2 Erstellen einer P<sup>32</sup>-UTP markierten Antisense-RNA:

#### **Ansatz der RNA Polymerase Reaktion:**

4µl 5xTranskriptionspuffer (BRL Gibco, Life Technologies, Rockville, ML, USA)

2µl DTT (Sigma, St. Louis, MO, USA)

4µl ATP, CTP, GTP (jedes 3,3mM; Promega, Madison, WI, USA)

1µl RNase-Inhibitor (40U/ml; Promega, Madison, WI, USA )

5µl P<sup>32</sup>-UTP (800Ci/mmol; Amersham NEN, Life Science Products, Boston, MA, USA)

1µg pSP72-Lyn-unique domain

1µl T7 RNA Polymerase (20000U/ml; New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

Dieses Gemisch wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wurde die überestliche DNA mit DNase verdaut. Dazu wurden 10 Units von RQ1 DNase von Promega (Madison, WI, USA) der Reaktion zugegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert.

Die Ribo-probe wurde dann durch Phenol-Extraktion aufgereinigt. Das Phenol wurde dafür mit 1M Tris-HCL, pH 8, 1:1 gesättigt und mit Chloroform: Amylalkohol 24:1 versetzt. Die Ribo-probe wurde dafür mit 200µl DEPC Wasser verdünnt, zweimal mit Phenol und einmal mit dem Chloroform/Amylalkohol-gemisch extrahiert. Die Ribo-Probe wurde dann mit 3M Natrium Azetat (1/10 Volumen) und 100% Ethanol (2.5 Volumen) ausgefällt.

#### **2.8.4 Hybridisierung der RNA:**

##### **10x Hybridisierungspuffer:**

200mM Pipes (Stocklösung: 1M in DEPC Wasser, steril gefiltert)

2M NaCl (Stocklösung: 2.5M in DEPC Wasser, autoklaviert)

5mM EDTA (Stocklösung: 0,5M pH8, in DEPC Wasser, autoklaviert)

20µg in 75%Ethanol ausgefällte RNA (siehe 2.9.1.) wurde mit der ausgefällten Riboprobe und 10µg tRNA gemischt und nach Zentrifugation im Vakuum getrocknet. Danach wurden 12µl Hybridisierungspuffer und 18µl Formamide zugegeben und durch Vortexen gut gemischt. Das RNA-gemisch wurde im Anschluss daran bei 90°C denaturiert und dann bei 42°C über Nacht hybridisiert.

#### **2.8.5 Verdau der einzelsträngigen RNA:**

##### **Verdauungs-Puffer:**

10mM Tris-HCL pH7,5 (Stocklösung: 1M)

5mM EDTA pH8,2 (Stocklösung: 0.5M)

0,2 LiCl (Stocklösung: 1M)

In 6ml Verdauungs-Puffer wurden 3ml RNase T1 (2000U/µl, BRL Gibco, Life Technologies, Rockville, ML, USA) und 24µl RNase A (10mg/ml, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) gegeben. Hybridisierte RNA wurde auf Raumtemperatur gekühlt und mit 300µl des Verdauungs-Puffer gemischt, bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert und dann mit 5µl Proteinase K (10mg/ml), 10µl 20%igen SDS und 2ml tRNA (10mg/ml) gemischt. RNA-Gemisch wurde daraufhin in Phenol-Chloroform extrahiert, in EtOH ausgefällt und getrocknet (siehe oben).

##### **Lade-Puffer:**

10 ml Formamide (Fisher Scientific Chemicals, Houston, Texas, USA)

200ml 0,5 M EDTA

5mg Bromphenol

5mg Xylene Cyanol

6ml Lade-Puffer wurde per Probe dazu gegeben.

**Polyacrylamide-Gel:**

6g Urea

0,6ml 10xTBE

mit H<sub>2</sub>O zu 5,2 ml auffüllen und bei 68°C auflösen, abkühlen lassen

0,75ml 40% Acrylamid

60µl 10% Ammonium Persulfat

6µl Temed

**Gel-Puffer:**

1xTBE

Proben wurden 2 min auf 96°C erhitzt und auf das Gel geladen. Im Anschluss daran wurde Gel im Vakuum getrocknet. Banden wurden per Autoradiographie sichtbar gemacht.

**2.8.6 β-Globin Ribo-probe:**

Den die β-Globin enthaltende Sequenz (SP6) Vektor wurde uns von Dr. Martin Carroll (Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Riboprobe wurde wie unter 2.8.3. beschrieben hergestellt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Signaltransduktion des Interleukin-6 Rezeptors im multiplen Myelom

#### 3.1.1 IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung mehrerer zytosolischer Proteine in zwei B-Zelllinien: Hybridom B-9 und LP-1

Um die Frage zu beantworten, ob durch IL-6 die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine in Myelomzellen stimuliert wird, wurden vier humane Myelomzelllinien B-9, LP-1, OPM-2 und U266 (siehe dazu auch 2.1) untersucht. Von den genannten Zelllinien wächst die B-9-Zelllinie nur in Anwesenheit von IL-6 (10ng/ml) im Nährmedium (IL-6-abhängig.) Alle Zelllinien wurden für 18 Stunden in Hungermedium (jeweiliges Wachstumsmedium bei welchem fötales FCS durch BSA ersetzt wurde; siehe dazu auch Material und Methoden 2.3.1.) gehalten. Die Zellen wurden anschliessend mit PBS einmal gewaschen und in frischem Hungermedium mit IL-6 (100ng/ml) für 3 und 10 Minuten stimuliert. Nach der Zellyse wurden die Proteine ( $2.5 \times 10^6$  Zellen/Probe, genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Biorad Proteinassay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) im 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dann folgten über Nacht der Proteintransfer, Blocken in 1% BSA und das Immunoblotten mit dem Antikörper gegen Phosphotyrosinreste, 4G10, (siehe dazu Methoden 2.3.2. und 2.3.3.). Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal in TBS gewaschen und mit einem weiten Antikörper, welcher mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um Proteine zu identifizieren wurde die Membran mit dem Substrat der Alkalischen Phosphatase, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und Chromo-0-4 Chloro-3 Indolphosphat (BCIP) bedeckt. Diese Farbreaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Intensität durch Waschen der Membran mit H<sub>2</sub>O gestoppt.

Wie in Abb.3.1.1 zu sehen ist, induzierte IL-6 (100ng/ml) in den Zelllinien B-9 und LP-1 nach 3 und 10 Minuten eine schnelle und transiente Tyrosinphosphorylierung mehrerer zellulärer Proteine. Die stärker tyrosinphosphorylierten Banden entsprechen Proteinen mit einem Molekulargewicht von ungefähr 45; 65; 70; 80; 135; 150; 185 und 190 kDa; die schwächer tyrosinphosphorylierten Banden entsprechen Proteinen mit einem Molekulargewicht von ungefähr 90; 95; 160; 170 und 195 kDa. Obwohl in den Zelllinien OPM-2 und U266 keine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine nach IL-6 Stimulation festgestellt werden konnte, finden sich phosphorylierte Proteine, die den oben genannten Gewichten entsprechen. Wir untersuchten daraufhin ob die "Unstimulierbarkeit" dieser Zellen auf eine schwächere Rezeptorexpression zurückzuführen sei.

### **3.1.2 Vier Myelomzelllinien exprimieren die Untereinheiten des IL-6 Rezeptors: IL-6R $\alpha$ und gp130**

Um zu klären, ob die durch IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung auch wirklich auf durch den Rezeptor übermittelte Signaltransduktion zurückzuführen ist, wurden die Zellen auf Rezeptorexpression überprüft. Die Zellen wurden vor der Stimulation für 18 Stunden gehungert, 3 Minuten mit 100ng/ml IL-6 stimuliert und lysiert wie oben beschrieben. Nach der Proteinanalyse ( $2.5 \times 10^6$  Zellen/Probe, genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Biorad Proteinassay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) per 7,5%igen SDS-PAGE, Proteintransfer, anschliessendem Immunoblotten gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-6-Rezeptors (Anti-IL-6R $\alpha$ -Antikörper 29:100) und gegen gp130 (Anti-gp130 GPZ-35), wurden die Proteine durch Alkalische Phosphatase und das Substrat (NBT und BCIP) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass alle gezeigten Zelllinien (Abb.3.1.2) sowohl IL-6R (unterer Abschnitt) als auch die gp130 (oberer Abschnitt) exprimieren. Die B-9 und LP-1 Zelllinie zeigten darüber hinaus eine deutlich stärkere Rezeptorexpression als die OPM-2 und U266 Zellen, was wohl auf eine geringere Rezeptorzahl pro Zelle in diesen Zelllinien zurückgeführt werden kann.

Dieses Ergebnis könnte die "Unstimulierbarkeit" der U266- und der OPM-2-Zelllinie aufgrund mangelnder Rezeptorexpression erklären. Somit könnte die verstärkte Tyrosinphosphorylierung in diesen Zellen, durch IL-6 unabhängige Aktivität von Tyrosinkinasen erklärt werden, welche in den beiden Zelllinien unter den gewählten Bedingungen konstitutiv Tyrosinreste auto- und transphosphorylieren. Ob die Rezeptorexpression in diesen Zellen durch IL-6 zeitabhängig beeinflusst wird, wurde nicht untersucht. Die geladene Proteinmenge wurde in diesem Experiment nicht durch Anfärbung von anderen Proteinen, wie Tubulin, überprüft. Die Proteinmenge wurde aber, wie oben beschrieben, überprüft und darüber hinaus konnte dieses Ergebnis durch Wiederholung bestätigt werden.

### **3.1.3 Die Tyrosinphosphorylierung nach IL-6 Stimulation ist zeit- und konzentrationsabhängig**

Um die Effekte von IL-6 auf die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine in den B-9-Zellen besser zu charakterisieren, wurden die Zellen für bestimmte Zeitintervalle mit IL-6 (100ng/ml) und mit verschiedenen IL-6 Konzentrationen für 3 Minuten stimuliert.

#### **3.1.3.1 Zeitkinetik:**

B-9 Zellen wurden für 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und nach Einsetzen in frisches Hungermedium für 0; 1; 3; 10; 30 und 60 Minuten mit IL-6 (100ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden anschliessend lysiert und Proteine ( $2.5 \times 10^6$  Zellen/Probe, genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Biorad Proteinassay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) in



7,5%igen SDS-PAGE analysiert. Nach dem Proteintransfer und Blocken wurde der Blot mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 und dem mit Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper inkubiert. Wie im linken Abschnitt der Abb.3.1.3 zu sehen ist, zeigten sich maximale Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine nach 30 Minuten Stimulation vor allem in den Bereichen um 70; 80 und 120 kDa. In den Bereichen um 50 und 110 kDa scheint die Tyrosinphosphorylierung sich nicht zu ändern, was auf konstitutiv phosphorylierte Proteinreste hinweist. Die Tyrosinphosphorylierung nach 60 Minuten scheint der Tyrosinphosphorylierung nach einminütiger Stimulation gleich zu kommen.

#### 3.1.3.2 Konzentrationskinetik:

Die Zellen wurden mit verschiedenen IL-6-Konzentrationen (Abb.3.1.3. rechter Abschnitt) behandelt um den Einfluss der zur Stimulation verwendeten IL-6-Menge auf die Tyrosinphosphorylierung zu überprüfen. B-9-Zellen wurden dafür 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und nach Einsetzen in frisches Hungermedium mit 0; 0,1; 1,0; 10 und 100 ng IL-6/ml für 3 Minuten stimuliert. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Proteine ( $2.5 \times 10^6$  Zellen/Probe, genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Biorad Proteinassay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) im 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer und Blocken in 1% BSA wurde der Blot mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 und dem mit Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper inkubiert. Auch hier (Abb.3.1.3. linker Abschnitt) fielen zwei Banden im Bereich 70 und 80 kDa durch ihre Zunahme in der Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation auf. Sie waren nach einer IL-6 Mindestkonzentration von 0,1 ng/ml erkennbar und zeigten eine maximale Tyrosinphosphorylierung bei einer IL-6-Konzentration von 100 ng/ml. Konstitutiv phosphorylierte Banden zeigten sich wieder im Bereich der 50, 60, 110 und 120 kDa, was auf eine IL-6 unabhängige Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine hinweist.

#### **3.1.4 Der Tyrosinphosphataseinhibitor Natrium-Orthovanadat verstärkt den proliferativen Effekt von IL-6 auf die Myelomzelllinie B-9**

Wie oben gezeigt, induziert IL-6 die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine in Myelomzellen. Um die Bedeutung dieser Phosphorylierung auf das Zellwachstum zu untermauern, wurde die Proliferation von B-9-Zellen in Zusammenhang mit Stimulation der Zellen durch IL-6 unter Zugabe eines Tyrosinphosphataseinhibitors (Natrium-Orthovanadat,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) untersucht. Durch Hemmung der Phosphatasen erwarteten wir einen gesteigerten Effekt der Tyrosinkinasen und somit eventuell eine messbar gesteigerte Proliferation der B-9-Zellen. Die Proliferation wurde durch Messung des Thymidineinbaus in die Zell-DNA (wie unter 2.6.1. als Proliferations-Assay im Methodikteil beschrieben) bei unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen gemessen.

#### 3.1.4.1 Proliferation der B-9 Zellen

Die IL-6-abhängige B-9-Zelllinie wurde mit einer Zellzahl von  $0.5 \times 10^4$ /well in dreifachen Ansatz in 96-well-Platten ausgesät und für 72 Stunden in Medium mit verschiedenen IL-6 Konzentrationen (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 ng/ml) jeweils mit und ohne  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $0,8 \mu\text{mol/l}$ ) gehalten. Die B-9-Zellen zeigen (Abb.3.1.4 A) bei einer IL-6 Konzentration von 0,01ng/ml eine gesteigerte Zellproliferation, welche ihre maximalen Werte allerdings erst bei 10 ng/ml IL-6 erreichte. Zellen, denen zusätzlich zum IL-6 Medium der Tyrosinphosphataseinhibitor ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) hinzugefügt worden war, zeigten jedoch signifikant höhere proliferative Effekte in der durch IL-6 ausgelösten Proliferation.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  hatte keinen proliferativen Effekt, aber bei einer suboptimalen IL-6 Konzentration von 0,01 ng/ml steigerte sich durch Zugabe von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  der ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbau der B-9 Zellen von 2777 (+/- 1061 cpm) (Mittelwert +/- SEM) auf 6460 (+/-359) cpm ( $P < 0,01$ ). Bei einer IL-6-Konzentration von 0,1 ng/ml fiel dieser  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  Effekt etwas geringer aus und war statistisch nicht signifikant: von 6294 (+/-523 cpm) zeigte sich eine Steigerung auf 7995 +/-1266 cpm. Maximale Proliferationseffekte durch IL-6 in den Konzentrationen von 1-100 ng/ml konnten durch  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  nicht signifikant gesteigert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine höchstwahrscheinlich mit der Proliferation der B-9-Zellen in Zusammenhang steht.

#### 3.1.4.2 Proliferation der OPM-2, U266 und LP-1 Zellen

Im Gegensatz zur B-9 Zelllinie zeigten die Myelomzelllinien OPM-2, U266 und LP-1 nach der Durchführung von Proliferationsassays unter gleichen Versuchsbedingungen (aber ohne  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) nur geringe Zellproliferation unter IL-6 Zugabe. Wie in Abb.3.1.4.B (oberer Abschnitt) zu erkennen ist, schienen die Zellen im Allgemeinen nach drei Tagen Inkubationszeit mit hohen IL-6 Konzentrationen (10ng/ml und 100ng/ml) eher schwach zu proliferieren. LP-1- Zellen proliferierten am stärksten unter 100ngIL-6/ml, 32.4% verglichen mit U266-Zellen, 22.3% und OPM-2 Zellen 20.3% bei 10ngIL/6-ml (Abb.3.1.4.B unterer Abschnitt). Der eher schwache ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbau in den OPM-2 und U266 Zellen, trotz IL-6, könnte aber mit der mangelnden „Stimulierbarkeit“ dieser Zellen durch IL-6 (siehe Experiment 3.1.2) in Zusammenhang stehen. Die Tyrosinphosphorylierung von OPM-2 und U-266-Zellen scheint durch die Zugabe von IL-6 nicht mehr induzierbar zu sein, darüber hinaus zeigten beide Zelllinien auch eine verminderte IL-6 Rezeptor Expression, verglichen mit den B-9 Zellen. Der höhere Gehalt an eingebautem Thymidin in diesen Zellen, könnte einen höheren Gehalt an Chromatin widerspiegeln. Hyperploidie kann häufig in malignen Zellen gefunden werden. Der ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbau von LP-1 Zellen scheint etwas stärker zu sein, was auch wiederum die vorher gezeigten Ergebnisse untersützt. LP-1 Zellen zeigen IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung und haben eine der B-9 ähnliche Rezeptor Expression. Man muss jedoch festhalten, dass in den hier gezeigten Experimenten

(Abb.3.1.4.B) die Proliferationsteigerung mit ansteigenden IL-6 Konzentrationen nicht statistisch signifikant waren.

### **3.1.5 IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Mitgliedern der Src-Familie Hck, Fyn und Lyn**

Die Rolle der Janus-Kinasen als NRTKs in Verbindung mit der gp130 Untereinheit des IL-6-Rezeptors, als Rezeptor assoziierte Kinasen, ist seit einiger Zeit bekannt [41, 42, 258]. Auch sind wie unter 1.3.4.1. beschrieben die Src-Kinasen als NRTK in einigen Rezeptorsystemen beschrieben worden. Ihre Rolle im IL-6-Rezeptorsystem war vor Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Es stellte sich die Frage ob die Src-Kinasen eine Rolle als NRTK in Myelomzellen spielen [51]. Da die Src-Kinasen von einigen Mitgliedern der HGFs aktiviert werden [168, 259-261] untersuchten wir, ob sie durch IL-6 in multiple Myelom-Zellen aktiviert werden können.

#### 3.1.5.1 Nachweis der Kinaseaktivität nach IL-6 Stimulation in B-9 Zellen

B-9-Zellen wurden 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und in frisches Hungermedium eingesetzt. Im Anschluss daran wurden die Zellen 5 Minuten mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und lysiert ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1). Danach wurden Immunpräzipitate mit Antikörpern (5µg/IP) gegen sieben Mitglieder der Src Familie: Fyn, Lyn, Hck, Lck, Yes, Fgr und Src angefertigt. Die aufgereinigten Proteinkomplexe wurden einem Kinase Assay mit ( $^{32}\text{P}$ )- $\gamma$ -ATP Labeling für 15 Minuten unterzogen. Die IP's wurden im 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Reaktionen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die hier gezeigten Resultate konnten durch zweimaliges Wiederholen bestätigt werden.

In Abb.3.1.5.A sind in der mit IL-6 stimulierten Probe stark phosphorylierte Banden im Molekulargewichtsbereich von 56kDa für Lyn (p56Lyn), 56 und 59kDa für Hck (p56/59 Hck) und 59kDa für Fyn (p59Fyn) zu identifizieren, welche den bekannten Molekulargewichten dieser Kinasen entsprechen. Es war uns nicht möglich, auch nach wiederholten Versuchen, die Proteine der Kinasen Lck und Yes (Abb.3.1.5.A) durch Antikörper zu präzipitieren. Es wurde daraufhin nicht untersucht ob die beiden Kinasen in diesen Zellen expremiert werden oder ob das Scheitern der IP methodische Ursachen hat. Das Protein der Src-Kinase Fgr konnte als Phosphoprotein präzipitiert werden, zeigte aber keine Aktivierungssteigerung nach Stimulation mit IL-6 (Abb.3.1.5.A). Der Antikörper gegen die Kinase Src präzipitierte ein Protein mit dem Gewicht von 55kDa, das keine Zunahme in der Phosphorylierung nach IL-6 Stimulation zeigte (Abb.3.1.5.A). Da das bekannte Molekulargewicht von Src bei 60kDa liegt, handelte es sich bei dem präzipitierten Protein möglicherweise um eine Kreuzreaktion des Antikörpers N-16 mit einem noch nicht identifizierten Protein. Interessanterweise war die Aktivitätssteigerung durch

IL-6 Stimulation am deutlichsten in der mit dem Anti-Hck Antikörper präzipitierten Probe zu erkennen. Die Lyn und Fyn Kinase zeigten nur schwache Aktivitätssteigerung durch IL-6, was auf eine wichtige Rolle von Hck in der IL-6 Signaltransduktion hinweisen könnte. Jedoch zeigten die Präzipitate von Fyn und Lyn neben den präzipitierten Kinasen noch weitere kopräzipitierte Phosphoproteine mit Molekulargewichten von 61, 68 und 130kDa in der Anti-Fyn-IP und 60 und 70 kDa in der Anti-Lyn-IP (Abb.3.1.5.A), was im Falle von Fyn auf eine Ko-Präzipitation mit gp130 oder einem anderen Protein mit dem Molekulargewicht um die 130 kDa, wie Mitglieder der Janus-Kinasen-Familie, hinweisen könnte.

#### 3.1.5.2 Die Tyrosinphosphorylierung der Src-Kinasen ist induzierbar durch IL-6 in B-9-Zellen

Wie in 1.3.4.1 beschrieben wurde, befinden sich die Src-Kinasen unabhängig von ihrem Aktivitätszustand in einem phosphorylierten "Dauerzustand", entweder durch Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes, des Tyrosinrestes in der Kinasedomäne oder eines anderen Tyrosinrestes. Dies macht den Nachweis stimulationsabhängiger Tyrosinphosphorylierung von Src-Kinasen sehr schwierig. Um eine Zunahme der Kinaseaktivität durch Tyrosinphosphorylierung durch IL-6 zu demonstrieren wurden die Kinasen Lyn, Fyn und Hck in B-9-Zellen nach 18 stündigen Zellhungern, mit PBS gewaschen, in frisches Hungermedium gesetzt und für 3 Minuten mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert, lysiert ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) und präzipitiert (5µg Antikörper/IP). Diese aufgereinigten Proteinkomplexe wurden daraufhin mittels 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper gegen Phosphotyrosin (4G10) und dem mit Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper im Immunoblot dargestellt. In der Abb.3.1.5.B zeigten die Kinasen p56Lyn, P56/59Hck eine leichte Zunahme der Tyrosinphosphorylierung nach IL-6 Stimulation. Für die Kinasen p53/56 Lyn und p59Fyn konnte die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung nach IL-6-Stimulation nur sehr schwach dargestellt werden, was möglicherweise auf den oben erwähnten Aktivitätszustand der Kinase hinweisen könnte. Darüber hinaus scheint der basale Phosphorylierungs Gehalt von Lyn in diesen Zellen stark vermindert zu sein, was auf eine Kinase im inaktiven Zustand hinweisen könnte und dass IL-6 nicht die Lyn Aktivität zu kontrollieren scheint.

#### **3.1.6 Die Assoziation der Src-Kinasen p56Lyn und p59Fyn mit dem IL-6R-α/gp130 Komplex ist fraglich**

Trotz der schwachen Aktivierung von p53/56Lyn und p59Fyn durch IL-6 fragten wir, ob die kopräzipitierenden Proteine im Kinase Assay, Proteine des IL-6 Rezeptorkomplexes sein könnten. Deswegen wurden Anti-Lyn und Anti-Fyn Immunpräzipitate, wie oben beschrieben, hergestellt ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5µg Antikörper/IP) und im 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Um eine

mögliche Assoziation der Kinasen Lyn und Fyn mit dem IL-6-Rezeptor nachzuweisen wurden die Immunoblots mit den jeweiligen Antikörpern gegen die  $\alpha$ -Kette (IL-6R- $\alpha$ ) ,  $\beta$ -Kette (gp130) und mit 4G10 gegen Tyrosinreste im Bereich der Kinasen inkubiert. Für die Erkennung der Proteine wurde die Membran mit dem mit Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper und anschliessend mit dessen Substrat inkubiert. Die Überstände der Präzipitate wurden als interne Kontrolle mit in das Gel geladen.

In Abb.3.1.6. (mittlerer Abschnitt) konnte in den IP's von Lyn und Fyn eine fast nicht zu erkennende Anfärbung der Banden im Molekulargewichtsbereich von 80 kDa ( $\alpha$ -Kette) und eine schwer erkennbare Bande im Bereich von 130 kDa ( $\beta$ -Kette) (oberer Abschnitt) identifiziert werden. Die 130 kDa schwere Bande schien in beiden IP's erkennbar zu sein, liess aber keinen eindeutige Aussage zu. Die Bande fand sich auch verstärkt in den Überständen der Präzipitate. Die Immunpräzipitate beider Kinasen wurden durch Anfärbung mit dem 4G10 Antikörper bestätigt (Abb.3.1.6. unterer Abschnitt). Die Immunoblots wurden, um schwache assoziierende Proteine besser sichtbar zumachen länger in Entwicklerlösung gehalten. Diese Behandlung erhöht das Signal der gesamten Membran und nicht nur der gesuchten Bande, deswegen erscheinen die IP's mit starkem Hintergrundsignal. Die Anfärbung von Nativlysat wäre als Kontrolle der gesuchten Banden hilfreich gewesen.

Die hier gefundenen Ergebnisse sprechen entweder für eine nicht vorhandene Assoziation des IL-6-Rezeptors mit den Src-Kinasen Lyn und Fyn oder für eine mindere Qualität der Antikörper. Die Assoziation konnte auch nach mehrmaligen Wiederholen (insgesamt vier mal) mit unterschiedlichen Detergenzien (NP-40, Brij96) im Lyse-Puffer für die Zellyse und verschiedenen Salzkonzentrationen für NaCl und NaF in dem Immunpräzipitations-Wasch-Puffer in der B-9- und LP-1-Zelllinie nicht gezeigt werden, woraus man schliessen kann, dass eine Assoziation dieser beiden Src-Kinasen mit den IL-6-Rezeptoruntereinheiten nicht sehr stark ist oder die verwendeten Antikörper ungeeignet waren.

### **3.1.7 IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung von Shc in den zwei B-Zelllinien LP-1 und B-9**

IL-6 induziert die Aktivierung von p21ras durch einen Mechanismus, der noch nicht vollständig verstanden ist [262]. Wie in der Einleitung beschrieben ist, assoziiert Grb-2 mit Shc um dann die Translokation von Sos an die Zellmembran zu unterstützen und den Ras-Signalweg zu aktivieren [263]. Daher stellten sich mehrere Fragen: Findet die Assoziation der Src-Kinase-Familie mit dem IL-6-Rezeptor eventuell durch Hilfe von Adapterproteinen wie Shc und Grb2 statt? Wenn diese Adapterproteine exprimiert werden assoziieren sie nach IL-6-Stimulation mit den Src-Kinasen und mit dem IL-6 Rezeptor? Um diese Fragen zu beantworten, untersuchten wir zuerst die Expression von Shc in der Zelllinie LP-1. Dafür wurden die Zellen 18 Stunden in Hungermedium gesetzt, mit PBS gewaschen und im frischen Hungermedium mit

IL-6 für 5 Minuten stimuliert (100 ng/ml). Nach der Zellyse ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) wurde mit Anti-Shc Antikörper C-20 immunpräzipitiert ( $5 \mu\text{g}$  Antikörper/IP). Die IP, der IP-Überstand und Zellysat wurden im 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 geblottet. Für die Anfärbung der Proteine wurde die Membran mit dem Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper und anschliessend mit dessen Substrat inkubiert. Wie in Abb.3.1.7.A (rechter Teil) zu erkennen, werden die zwei Isoformen p52 und p66 Shc nach IL-6-Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese zwei Isoformen p52 und p66 Shc sind im Gegensatz dazu in der unstimulierten Probe nur sehr schwach phosphoryliert. Wegen des Mitwanderns der schweren Ketten des C-20 IgG-Antikörpers, welche mit einem Gewicht um die 50kDa im SDS-Gel laufen, wurde eine genaue Betrachtung der Tyrosinphosphorylierung in der Bande p52 Shc erschwert; der Effekt konnte besser in der Bande p66 Shc demonstriert werden. Vergleicht man Nativlysate mit dem Überstand der IP, fällt die Depletion der beiden phosphorylierten Banden im Nativlysate auf. Durch die IP konnte der grösste Anteil der Shc-Isoformen präzipitiert werden (Abb.3.1.7. linker und mittlerer Teil).

Um die Expression und Tyrosinphosphorylierung von Shc durch IL-6 in einer weiteren Myelomzelllinie zu überprüfen, wurden neben LP-1- auch B-9-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 18 Stunden in Hungermedium gehalten, mit PBS gewaschen und in frischem Hungermedium mit 100ng/ml IL-6 stimuliert. Nach anschliessender Zellyse ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) wurde das Lysat mit dem 4G10-Antikörper präzipitiert ( $5 \mu\text{g}$  Antikörper/IP). Die IP's wurden im 10%igen SDS-PAGE analysiert. Durch anschliessende Inkubation der Membran mit dem Shc-Antikörper konnte eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Shc-Isoformen durch IL-6 gefunden werden. Wie in Abb.3.1.7.B erkennbar werden p52 und p66 Shc in der B-9-Zelllinie und, wie schon gezeigt, auch in der LP-1-Zelllinie exprimiert. In beiden Zelllinien werden die Isoformen p52 und p66 Shc an Tyrosinresten phosphoryliert. Darüber hinaus wird durch die IL-6-Stimulation Tyrosinphosphorylierung gesteigert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Shc-Isoformen p66 und p52 durch IL-6-Stimulation in den beiden Myelomzelllinien B-9 und LP-1 vermehrt an Tyrosinresten phosphoryliert werden.

### **3.1.8 Die Tyrosinphosphorylierung von Shc nach IL-6 Stimulation ist Zeit- und Konzentrationsabhängig**

Um die Effekte von IL-6 auf die Tyrosinphosphorylierung von p52 Shc und p66 Shc besser charakterisieren zu können, wurden die Zusammenhänge in Experimenten mit unterschiedlichen Stimulationszeiten und IL-6 Konzentrationen untersucht.

#### 3.1.8.1 Zeitkinetik:

LP-1 Zellen wurden 18 Stunden in Hungermedium gehalten, mit PBS gewaschen und in frischem Hungermedium 60; 30; 10; 3 und 1 Minute mit IL-6 (100 ng/ml) stimuliert. Die Proteine wurden nach Zellyse ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) mit dem Anti-Shc-Antikörper C-20 präzipitiert (5 $\mu$ g Antikörper/IP) und im 10%igen SDS-PAGE analysiert. Phosphorylierte Tyrosinreste wurden durch Immunoblotten mit dem 4G10 Antikörper und anschliessender Inkubation mit dem mit Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper detektiert. Minimale IL-6-Effekte auf die Tyrosinphosphorylierung der Shc-Isoformen konnten schon nach 1 Minute und maximale Effekte nach 30 Minuten Stimulationszeit mit IL-6 entdeckt werden, wobei diese im Fall von p66 Shc bis 60 Minuten leicht abzunehmen schienen (Abb.3.1.8. linker Abschnitt).

#### 3.1.8.2 Konzentrationskinetik:

Um die für die Tyrosinphosphorylierung von Shc nötige IL-6-Konzentration zu untersuchen, wurden die Zellen nach üblicher Aufbereitung mit 100; 10; 1 und 0,1ng/ml IL-6 für 5 Minuten stimuliert. Die Zellysate ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) wurden nach Präzipitation (5 $\mu$ g Antikörper/IP) im 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immunoblotten mit 4G10 konnte eine minimale Tyrosinphosphorylierung von p52 Shc und p66 Shc nach 1 ng/ml und eine maximale Tyrosinphosphorylierung nach 100 ng/ml IL-6 erreicht werden (Abb.3.1.8. rechter Abschnitt).

In beiden Experimenten erschwerten komigrierende Banden der schweren Ketten des C-20 IgG Antikörpers (ca. 50 kDa) eine deutliche Erkennung von p52 Shc. Trotzdem konnte demonstriert werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von Shc in den Myelomzellen B-9 und LP-1 durch IL-6 stimuliert wird. Diese Phosphorylierung ist sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Diese Experimente wurden zweimal wiederholt und Ergebnisse konnten somit bestätigt werden.

### **3.1.9 IL-6 induziert die Komplexbildung von Shc mit Grb2 in LP-1 Zellen**

Nun stellte sich die Frage, ob Shc mit Grb2 nach Tyrosinphosphorylierung von Shc assoziiert, um die Translokation von Sos1 an die Zellmembran und die Aktivierung von Ras zu ermöglichen [204]. Um die Komplexbildung zwischen Shc und Grb2 zu demonstrieren, wurden von LP-1 Zellen Immunpräzipitate mit Antikörpern für Shc (C-20) und für Grb2 (c-23) hergestellt. Die Zellen wurden dafür 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und in frischem Hungermedium mit 100 ng/ml IL-6 für 5 Minuten stimuliert. Die präzipitierten Proteine ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5 $\mu$ g Antikörper/IP) wurden neben IP-Überständen und stimulierten Nativlysate im 10%igen SDS-PAGE analysiert. Nach dem Proteintransfer wurde der Blot zuerst mit dem

Anti-Grb2-Antikörper geblottet (unterer Abschnitt der Abb.3.1.9 A). Für dieses Experiment wurde zum ersten Mal die ECL Methode als Detektionsmedium verwendet, siehe dazu auch 2.3.4.. Bei dieser Methode ist der zweite Antikörper mit Meerrettich Peroxidase konjugiert. Ein spezifisches Substrat wird durch das Enzym luminisierend und Proteine können somit durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Diese Methode wurde auch in allen folgenden Westernblotexperimenten verwendet. Nach Entwicklung der Membran wurde diese sofort mit Stripping-Puffer behandelt (siehe dazu unter Methoden 2.3.5). Die Grb2-Antikörperbindung wurde somit gelöst, um die Proteine für einen neuen Antikörper zugänglich zu machen. Die Membran wurde im Anschluss daran mit dem Antikörper gegen Shc geblottet (siehe unterer Abschnitt der Abb.3.1.9.A).

Ausgehend von der Shc-IP mit Anti-Shc-Blot (Abb.3.1.9.A, rechts oben ) fällt auf, dass die präzipitierte Proteinmenge in stimulierter und unstimulierter Probe gleich zu sein scheint. Obwohl komigrierende schweren Ketten des Shc-IP-Antikörpers eine Abschätzung der Proteinmenge in der Shc-IP unmöglich machen, wird die Effizienz der Shc-IP im Vergleich mit dem Überstand der IP deutlich, indem nur eine schwache Bande zu entdecken ist. Ähnliches gilt auch für die Grb2-IP mit Anti-Grb2 Blot (Abb.3.1.9.B, links unten). Auch hier ist nahezu kein Unterschied in der Proteinmenge zwischen stimulierter und nicht stimulierter Probe und eine deutliche Depletion des Proteins in den Überständen der IPs zu entdecken. In der Grb2-IP fällt ein Protein in beiden Proben auf, welches höchstwahrscheinlich durch ein Kreuzreagieren von Grb2 mit dem Shc Antikörper zustande kommt oder eine Kreuzreaktion der leichten Ketten des präzipitierenden Grb2 Antikörpers mit dem ersten oder zweiten blottenden Antikörper bedeutet. In beiden IPs, Anti-Shc und Anti-Grb2, wird die Spezifität der IP durch die Anfärbung der jeweiligen Proteine im Zellysat bestätigt (Abb.3.1.9.A und B, linker Teil).

Die Komplexbildung zwischen p52Shc, p66Shc und Grb2 konnte jeweils in beiden IP-Paaren nachgewiesen werden. Ausgehend von der Shc-IP gelang neben der Präzipitation von Shc auch die Aufreinigung von p25-Grb2. Grb2 konnte nur in der mit 100 ng/ml IL-6 stimulierten Probe (Abb.3.1.9.B, rechts unten) ko-präzipitiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Komplexbildung von der durch IL-6 induzierten Tyrosinphosphorylierung von Shc abhängig ist (siehe dazu auch 1.3.5.1). Ähnliches wird in der Grb2-IP mit anschließendem Shc-Blot bestätigt (Abb.3.1.9.A, links). In der mit IL-6 stimulierten Probe fällt eine Bande in der Grb2-IP auf, die der Höhe von p66Shc entspricht. Höchstwahrscheinlich wird die andere Isoform p52Shc durch komigrierende IgG Banden verdeckt, denn betrachtet man den Überstand dieser Grb2-IP kann eine Depletion der beiden Shc-Isoformen in der stimulierten Probe und besonders von p52Shc, verglichen mit dem Nativlysate, gefunden werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Shc und Grb2 in den beiden Myelomzelllinien LP-1 und B-9 nach der Stimulation mit IL-6 miteinander assoziieren.



### 3.1.10 IL-6 induziert die Komplexbildung von Shc/Grb2 mit den Src-Kinasen p56/59 Hck und p59 Fyn in LP-1-Zellen

Der Mechanismus der Aktivierung des Ras-Signalweges durch Zytokinrezeptoren (ZR) ohne eigene Kinaseaktivität ist bis heute weitgehend ungeklärt. Als NRTKn, die nach Ligandbindung das Signal durch Phosphorylierung weiterer Substrate in die Zelle weitergeben, kommen die Familie der Janus-Kinasen [41, 42, 258] und die Familie der Src-Kinasen [260, 264] in Betracht. Wenn die Src-Kinasen durch IL-6 Stimulation aktivierbar sind, stellt sich die Frage, ob sie eventuell als NRTK mit dem IL-6-Rezeptor über die Adapterproteine Shc und Grb2 in Verbindung stehen und somit mit diesen Proteinen einen Komplex bilden.

#### 3.1.10.1 Aktivierbarkeit der Src-Kinasen durch IL-6:

Da die Kinase Lyn, Fyn und Hck in der B-9-Zelllinie nach IL-6-Stimulation aktiviert werden, wurde dies auch für die LP-1-Zelllinie untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht ob die Shc-Proteine den Src-Kinasen als Substrat dienen könnten. Zu diesem Zweck wurden Zellysate mit Antikörpern gegen Lyn, Fyn, Hck und Shc präzipitiert und einer Kinasereaktion unterzogen. Die Zellen wurden dafür 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und in frischen Hungermedium 5 Minuten mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert. Nach Zellyse ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) wurden die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert ( $5 \mu\text{g}$  Antikörper/IP) und die aufgereinigten Proteine mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. Anschliessend wurden sie einer Kinasereaktion unterzogen (siehe dazu 2.6. unter Methoden) und im 10%igen SDS-PAGE analysiert. Die Aktivität der aufgereinigten Proteine wurde per Autoradiographie sichtbar gemacht.

Auch in den LP-1 Zellen war eine deutliche Aktivierung der Src-Kinasen Lyn, Fyn und Hck nach 100 ng/ml IL-6 Stimulation erkennbar (Abb.3.1.10.A), wobei die Aktivierung von p59Fyn in dieser Zelllinie am deutlichsten zu sein scheint. P53/56Lyn und p59Hck scheinen in diesen Zellen durch IL-6 eher schwächer aktiviert zu werden. In der Lyn-IP wurden neben den beiden Isoformen p53 und p56 Lyn auch Proteine mit einem Gewicht von ca. 65 kDa präzipitiert, welche keine gesteigerte Phosphorylierung nach IL-6-Stimulation zeigten. Im Anti-Fyn-Präzipitat fanden sich neben p59Fyn eine Proteinbande im Bereich von 68 kDa, die nach IL-6-Stimulation stärker phosphoryliert schien. In der Anti-Hck-IP konnten neben p59Hck Proteine mit einem Gewicht um die ca. 52 kDa und 64 kDa präzipitiert werden. Die Proteine im Bereich von 64 kDa schienen durch IL-6-Stimulation stärker phosphoryliert zu sein. In der Shc-IP wurde eine Proteinbande um die ca. 66kDa aufgereinigt, welche nach IL-6 Stimulation vermehrt  $^{32}\text{P}$  gebunden hatte. Diese Bande scheint in der Fyn und Hck IP zu komigrieren, was darauf hinweisen könnte, dass die 66kDa-Isoform von Shc ein Substrat von den Src-Kinasen ist. Das präzipitierte Protein um 52 kDa zeigte dagegen keine so deutliche Zunahme der Phosphorylierung durch IL-6-Stimulation. Auffallend ist, dass Banden um die 52 und 66 kDa auch in den IP's von Hck und Fyn aber nicht in der IP mit Lyn präzipitiert werden konnten.

Dies liess vermuten, dass beiden Kinasen in einem Komplex mit den Shc-Proteinen p52 und p66 stehen. Ob diese Komplexbildung direkt durch Shc oder indirekt durch voehergehende Bindung von Grb2 entsteht ist unklar.

### 3.1.10.2 Nachweis der Komplexbildung mit der ECL-Methode:

Um diese Vermutung einer Komplexbildung zwischen Shc/Grb2 und p56/59Hck und p59Fyn zu erhärten, wurde eine der Src-Kinasen als aufgereinigtes Protein neben einer Shc-IP in 10%igen SDS-PAGE analysiert und mit dem Antikörper zuerst gegen Shc und danach gegen Grb2 immunoblottet. Dafür wurden die LP-1-Zellen für 18 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und in frischen Hungermedium für 5 Minuten mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) und die Proteine mit Antikörpern gegen Hck, Fyn und Shc präzipitiert (5µg Antikörper/IP).

Abb.3.1.10.B zeigt in der Hck-IP (nach IL-6-Stimulation) eine Bande in Höhe von p66Shc (nach Blotten der Membran mit dem Anti-Shc-Antikörper) und eine Bande in Höhe von p25Grb2 (nach Blotten mit dem Anti-Grb2-Antikörper), was für eine Komplexbildung von Hck mit Shc und Grb2 spricht. Diese Assoziation scheint von der Stimulation der Zellen mit IL-6 abhängig zu sein, da in den unstimulierten Proben die Anfärbung von Shc und Grb2 schwächer ist als in den mit IL-6 stimulierten Proben. Die Erkennung von p52 Shc in der Anti-Shc- und in der Anti-Hck-IP ist auch hier wahrscheinlich durch die schweren Ketten des IgG des präzipitierenden Antikörpers maskiert.

In Abb.3.1.10.C ist die Ko-Präzipitation von Fyn und Shc in den Fyn-IP's fast nicht zu erkennen, da die schweren Ketten des IgG des präzipitierenden Antikörpers komigrieren und das Signal der mit p59Fyn ko-präzipitierten Shc Proteine durch Bindung des Shc Antikörpers beim Blotten überdeckten. Darüber hinaus ist dieser Blot ein wenig zu lange entwickelt, was die Maskierung von p52 Shc noch verstärkt. Deutlichere Unterschiede dagegen konnte mit dem Blotten der Fyn und Shc IP's mit Anti-Grb2 erreicht werden. In den mit IL-6 stimulierten Proben beider IP's ist eine deutliche Anfärbung der Grb2-Proteine zu erkennen. Fyn und Shc scheinen in LP-1-Zellen mit Grb2 zu assoziieren.

In den beiden letzten gezeigten Experimenten scheint die Menge der mit den Src-Kinasen assoziierenden Shc-Proteine eher klein zu sein. Dies wird deutlich zum einen durch die schwach angefärbte Shc-Bande in der Hck- und in der Fyn-IP und zum anderen durch die nicht sichtbare Depletion der Shc-Proteine in den Überständen der Hck- und Fyn-IP. Das gleiche gilt auch für den Nachweis der Ko-Präzipitation von Grb2 mit Hck und Fyn, wobei hier die ko-präzipitierenden Grb2-Proteine ein stärkeres Signal bieten.

Diese Resulte konnten durch mehrmaliges Wiederholen des Experimentes bestätigt werden. Jedoch wären hier Kontrolexperimente hilfreich, wie z.B. eine Überprüfung der geladenen Proteinmenge durch Anfärbung von Tubulin, eine Grb2 IP parallel zu den beiden gezeigten

IPs oder eine Anfärbung der jeweiligen immunpräzipitierten Src-Kinase in der Shc-IP. Weitere Experimente in Zellen, welche ein Protein des Komplexes nicht exprimieren wäre eine gute Negativkontrolle. Jedoch konnten diese Resulte durch mehrmaliges Wiederholen bestätigt werden, was zumindest einen deutlichen Hinweis auf die Möglichkeit gibt, dass die Src-Kinasen Hck und Fyn mit Shc und mit Grb2 im Komplex vorliegen, welcher vermehrt durch IL-6-Stimulation entsteht. Der genaue Aufbau dieses Komplexes ist jedoch noch unklar.

### 3.1.10.3 Nachweis der Komplexbildung mit Ko-Präzipitationsexperimenten im Kinase-Assay

Um diese Ergebnisse noch weiter zu untermauern, wurden die Ko-Präzipitationsreaktionen im Kinase-Assay untersucht. Hier wurde in einer ersten IP ein Kinase-Assay vollzogen. Diese Proteinkomplexe werden anschliessend durch Behandlung mit einem Detergenzgemisch wieder getrennt und dann einer zweiten IP mit dem Antikörper gegen das Komplexprotein unterzogen. Nach Hungern, Stimulation und Zellyse (wie oben beschrieben) wurde eine Shc-IP im dreifachen Mengenansatz ( $7.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1;  $15 \mu\text{g}$  Antikörper/IP) für 4 Stunden inkubiert. Gleichzeitig wurde als Kontrolle eine IP aus Zellysat, Shc-Antikörper und dem spezifischen Peptid gegen Shc angesetzt, um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen. Das Peptid, das in der zehnfachen Menge des Antikörpers zugegeben wird, blockt die Bindung des Proteins an den Antikörper und verhindert so eine Komplexbildung. Unspezifische Proteinbindungen durch den Antikörper können so ausgeschlossen werden. Die erste IP wurde mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP markiert, mit Waschpuffer gewaschen und nach Zugabe des Dissoziations-Puffer (1% SDS) für 5 Minuten  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Danach wurde ein einfacher Mengenansatz und der Peptidansatz abgenommen und mit Lade-Puffer für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Nachdem der restliche Überstand der IP 1:10 mit Waschpuffer verdünnt worden war, wurde daraus eine zweite IP ( $7.5 \mu\text{g}$  Antikörper/IP) mit den Antikörpern gegen Hck, Fyn und mit den entsprechenden Peptiden angesetzt.

Wie in Abb.3.1.10.D linker Teil, **I. IP**, zu sehen ist, präzipitierte der Antikörper gegen Shc zwei Proteine mit dem Gewicht von 52 und 66 kDa, welche, vor allem p66, nach IL-6-Stimulation eine Steigerung der Phosphorylierung zeigten und durch das Blocken des Antikörpers mit dem spezifische Shc-Peptid fast völlig verschwanden. In der **II. IP**, mittlere und rechter Teil der Abb.3.1.10.D, gelang die Aufreinigung von p56/59Hck und p59Fyn aus dem Proteinkomplex, der zuerst durch den Shc-Antikörper aufgereinigt und anschliessend durch Zugabe von Detergenz wieder gelöst worden war. Beide Kinasen zeigten wieder eine Aktivitätssteigerung nach IL-6-Stimulation. Auch konnten die IP's von Hck und Fyn durch Zugabe von spezifischen Peptide gehemmt werden, was die Spezifität der benutzten Antikörper und der präzipitierten Proteine bestätigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Src-Kinase p56/59Hck und p59Fyn wahrscheinlich mit p52 Shc und/oder p66 Shc assoziieren und nach IL-6-Stimulation ( $100 \text{ ng/ml}$ ) aktiviert werden. Die Assoziation scheint durch IL-6 verstärkt zu werden. Um diese

Annahme zu bestätigen sind natürlich noch weitere Experimente nötig, wie oben schon zum Teil aufgelistet wurde.

## **3.2 Die Signaltransduktion des Erythropoetinrezeptors**

Erythropoetin ist, wie schon unter 1.2.1 beschrieben, ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor der roten Blutzellreihe. Um die Aktivierung der Src-Kinasen und ihre Rolle als NRTK in einem anderen Wachstumsfaktorsystem zu untersuchen, wählten wir das Epo-System, um zu analysieren ob die Src-Kinasen auch eine Rolle in der erythrozytären Blutzellreihe spielen und ob sie für den Epo-Rezeptor als NRTK agieren.

### **3.2.1 Epo stimuliert Tyrosinphosphorylierung zeitabhängig in UT-7-Zellen**

Wie oben beschrieben, induziert Epo die Phosphorylierung zellulärer Proteine und des zytoplasmatischen Teiles des Epo Rezeptors und vermittelt so mitogene Signale in der Zelle [265, 266]. Um dies in UT-7-Zellen (siehe dazu auch 2.1) zu bestätigen wurden die Zellen in ansteigenden Zeitintervallen mit Epo stimuliert und die Phosphorylierung von Tyrosinresten mit dem 4G10 Antikörper detektiert. UT-7-Zellen wurden dafür 16 Stunden in Hungermedium gehalten und für 0,5; 1; 5; 10; 30 und 60 Minuten mit 50 ng/ml Epo stimuliert. Die Zellstimulation wurde daraufhin durch Waschen mit PBS abgebrochen. Die Zellysate ( $5 \times 10^6$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1) wurden per 7.5% SDS PAGE aufgetrennt. Anschliessend wurde das Gel per Elektrotransfer auf eine Membran transferiert und in 1% BSA bei Raumtemperatur für 4 Stunden geblockt. Daraufhin wurde der Blot kurz in TBS gewaschen und mit dem 4G10 Antikörper bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert, 4 mal mit TBS für jeweils 10 Minuten gewaschen und mit dem Antimaus-IgG-Antikörper (Meerrettich Peroxidase gebunden) bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Der Blot wurde daraufhin mit der ECL Methode, die unter 2.5.1 beschrieben wurde, entwickelt.

In Abb.3.2.1.A ist zu erkennen, dass die Tyrosinphosphorylierung der Zellproteine nach 0,5 Minuten Epo Stimulation in den Banden mit einem Gewicht um die 70-80, 90-100, 130 und 140 kDa deutlich angestiegen. Die Tyrosinphosphorylierung scheint mit andauernder Stimulation wieder abzunehmen, was am deutlichsten vor allem in den Bereichen 90 und 130 kDa sichtbar ist. Die Tyrosinphosphorylierung scheint unabhängig von Epo-Stimulation im Bereich um die 55 bis 60 kDa zu sein, was auf Tyrosinreste hinweisen könnte, die konstitutiv phosphoryliert sind, wie z.B. die der Src-Kinasen.

In einigen dieser Banden erwartet man die Phosphorylierung bekannter Protein zu entdecken, wie z.B. im Bereich um die 80 kDa, die des Epo-Rezeptors, im Bereich 130 kDa die von Jak2 oder im Bereich 53/56 kDa, die von Lyn. Von EpoR und Jak2 ist bekannt, dass sie durch Epo-

Stimulation phosphoryliert werden [265]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Jak2 mit dem EpoR assoziiert [152].

Um diese Banden zu identifizieren wurde der Blot gestrippt und erneut in 5% Milchpulver geblockt. Die Membran wurde dann mit Antikörpern gegen Jak2, EpoR und Lyn inkubiert. Die Proteine wurden mit der ECL-Methode sichtbar gemacht. In Abb.3.2.1.B oberer Abschnitt erkennt man die Jak2 Bande, welche in allen Proben in gleicher Menge detektiert werden kann. Vergleicht man in dem Phosphotyrosin-Blot (Abb.3.2.1.A) eine Bande in der Höhe von p130Jak2, fällt auf, dass deren Tyrosinphosphorylierung nach 30 Minuten Stimulation abnimmt. Dies wurde auch von Klingmüller and al. beschrieben [153]. Betrachtet man in Abb.3.2.1.B mittlerer Abschnitt den Epo-Rezeptor, fällt auf, dass ab 30 Sekunden Stimulation eine zweite Bande des Rezeptors erscheint, welche nach 10-30 Minuten Stimulation schwächer erscheint. Es handelt sich wahrscheinlich hier um die phosphorylierte Form des Rezeptors, deren Phosphorylierung nach 30 Minuten wieder abzunehmen scheint. Eine Bande in diesem Bereich 70-75 kDa kann auch im Phosphotyrosin-Blot entdeckt werden. Ihre Tyrosinphosphorylierung scheint nach 10-30 Minuten Stimulation schwächer zu werden. Der untere Blot in Abb.3.2.1.B repräsentiert die Banden der beiden Lyn Isoformen (p53 und p56), welche im Phosphotyrosin-Blot konstitutiv phosphoryliert scheinen (siehe dazu auch 3.1.5. Aktivierung der Src-Kinasen durch IL-6).

### **3.2.2 Epo aktiviert die Kinaseaktivität von Jak2, Lyn, Lck und Hck**

Um die Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase in einem Kinaseassay durch Epo zu testen, wurde die Proteinexpression von Lck, Hck, Fyn und Abl in dieser Zelllinie getestet. Auch diese Proteine werden in UT-7 Zellen exprimiert (Daten werden hier nicht gezeigt). Für den Kinaseassay wurden UT-7-Zellen nach 16 Stunden Hungern in frisches Hungermedium gegeben und für 5 Minuten mit 50 ng/ml Epo stimuliert und im Anschluss daran lysiert. Die Proteine wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Mitglieder der Src-Familie: Fyn, Lyn, Hck, und Lck, sowie Jak2 und Abl präzipitiert ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5 $\mu$ g Antikörper/IP). Danach wurden die aufgereinigten Protein-Antikörperkomplexe im Kinase Assay für 20 Minuten einem  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP Labeling unterzogen, zu welcher säurebehandelte Enolase als Src-Kinasen-Substrat dazugegeben wurde (siehe auch Methoden 2.4.). Die Immunpräzipitate wurden per 7,5%igen SDS-PAGE analysiert und per Autoradiographie sichtbar gemacht. Experimente wurden zweimal wiederholt. Ergebnisse waren vergleichbar.

In Abb.3.2.2.B (linker Abschnitt) kann in der Lyn-IP eine schwache Zunahme der Phosphorylierung durch Epo sowohl der beiden Isoformen von Lyn (p53 und p56) als auch der Enolase p50 erkannt werden. In diesen Zellen scheint die Transphosphorylierung von Lyn hoch und durch Epo-Stimulation nur leicht steigerbar zu sein. P120 ist nur durch EGF und

PDGF aktivierbar [267], Abb.3.2.2.B (mittlerer Abschnitt) und diene somit als Negativkontrolle. Auch ist die Transphosphorylierung von Enolase durch p56Lck (3.2.2.B, linker Abschnitt) nach Epo-Stimulation eher schwächer. Lck wird vor allem in lymphatischen Gewebe expremiert und spielt dort eine wichtige Rolle im IL-2- und T-Zell-Rezeptorsystem [167, 168].

Abb.3.2.2.A zeigt einen Kinase-Assay für Fyn, Jak2 und Hck, mit Zugabe von Enolase in den Kinase-Reaktionen von Fyn und Hck. In beiden Fyn-IPs sind stark phosphorylierte Banden im Molekulargewichtsbereich von 59kDa zu erkennen, was auf eine starke Eigen- und Transphosphorylierung der Fyn-Kinase in dieser Zelllinie hinweist und die Aktivierung von Fyn durch Epo fraglich macht. Die Eigenphosphorylierung von p56/59 Hck scheint durch Epo zuzunehmen, im Gegensatz zur Transphosphorylierung des Substrates Enolase. In zwei weiteren Experimenten fanden wir die Kinaseaktivität von Hck aktivierbar durch IL-6. Eine deutliche Aktivierung der Kinaseaktivität durch Epo findet sich für Jak2 (p130 Jak2). Dies wurde auch von Klingmüller and al. beschrieben [153]. In dem Bereich um die 80 kDa finden sich vor allem in der Jak2-IP in der mit Epo-stimulierten Probe phosphorylierte Banden, welche den Epo-Rezeptor oder andere mit Jak2 oder dem EpoR assoziierte Proteine mit diesem Gewicht widerspiegeln könnten. Die Transphosphorylierung von Enolase in der Jak2 IP könnte durchaus von ko-assoziierte Src-Kinasen vermittelt werden, da Enolase kein Substrat für Jak2 ist. Jedoch war die Transphosphorylierung von Enolase durch Jak2 in folgenden Experimenten eher fraglich und somit bleibt diese Hypothese unbeantwortet und bräuchte weitere abklärende Experimente.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass Epo, wie schon von Witthuhn et al. demonstriert wurde [152], die Kinaseaktivität von Jak2 aktiviert und somit als eine gute Positivkontrolle dient. Ausserdem aktiviert Epo die Kinaseaktivität der Src-Kinasen Lyn, Lck, und Hck. Fyn scheint nicht von Epo in den UT-7 Zellen aktiviert zu werden.

### **3.2.3 Lyn assoziiert mit tyrosinphosphorylierten Proteinen nach Epo-Stimulation**

Um weiter die Rolle der Src-Kinasen in Zusammenhang mit dem Epo-Rezeptor zu untersuchen fragten wir, ob tyrosinphosphorylierte Proteine mit den Src-Kinasen im 70-75 kDa Bereich (Kda Bereich des Epo Rezeptors) assoziieren. Wir untersuchten, ob die Kinasen Lyn, Lck, Hck mit tyrosinphosphorylierten Proteinen im Bereich 70-75 kDa präzipitieren und fanden, dass nur Lyn, und sehr schwach Lck und Hck eventuell mit tyrosinphosphorylierten Proteinen assoziieren (nur Lyn Daten werden hier gezeigt). UT-7-Zellen wurden 16 Stunden gehungert, mit 50 U/ml Epo für 3 Minuten stimuliert, mit PBS gewaschen und lysiert. Zellysate ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5µg Antikörper/IP) wurden im Anschluss daran mit polyklonalen Antikörper gegen Lyn und EpoR (N-terminal) präzipitiert. Immunpräzipitate wurden gewaschen und im 7.5%SDS PAGE aufgetrennt. Nach Elektrotransfer wurde die Membran bei Raumtemperatur in 1% BSA

geblockt und danach mit dem 4G10 Antikörper geblottet. Nach Inkubation mit dem Meerrettich Peroxidase gebundenen Antimäus-IgG-Antikörper wurden Proteine per ECL Methode detektiert. Wie in Abb.3.2.3.A zu erkennen, präzipitiert Lyn mit Proteinen, welche in gleicher Höhe wie der EpoR (70-75 kDa) wandern, was darauf hinweisen könnte, dass Lyn eventuell mit dem Epo Rezeptor assoziiert. Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass sowohl der Rezeptor als auch die Kinasen mit anderen Proteinen dieser Gewichtsklasse assoziieren, was sich wahrscheinlich in der starken phosphorylierten Bande der EpoR-IP und der ebenso stark phosphorylierten Bande im Überstand beider IPs widerspiegelt.

Um weiter die Spezifität der Interaktion zwischen EpoR und Lyn zu untersuchen wurde das selbe Experiment in der murinen Leukämie-Zelllinie HCD-57 (Abb.3.2.2.B) wiederholt. Um die Spezifität des Lyn-Antikörpers zu überprüfen, wurde versucht die IP mit einem Peptid, welche das präzipitierende Epitop des Lyn-Antikörper blockt, zu blockieren. In der mit dem Peptid geblockten Lyn-IP kann keine Assoziation von Lyn mit Proteinen der Gewichtsklasse 70-75 kDa (auch selbst nach extensiver Filmexposition der Membran) entdeckt werden. Auch in der murinen HCD-57-Zelllinie scheint Lyn mit Proteinen zu assoziieren, welche in der Höhe des EpoR wandern.

Beide Membranen, mit dem UT-7- und dem HCD-57-Experimenten, wurden gestrippt und mit einem Antikörper gegen den EpoR inkubiert. In beiden Fällen konnte wegen zu starken Hintergrundsignal des blottenden Antikörpers der EpoR nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse werden hier nicht gezeigt. Deswegen versuchten wir die Assoziation mit Hilfe einer Doppel-IP zu untersuchen.

### **3.2.4 Vergleich von SDS- und NP-40-Dissoziations-Puffer in der Komplexbildung von EpoR und Lyn in einer Doppel-Immünpräzipitation**

Um die Komplexbildung zwischen Lyn und EpoR in einer anderen Weise untersuchen zu können wurden Doppel-Immünpräzipitationen angefertigt (siehe auch dazu 2.5.3.). Dabei wurden die denaturierenden Detergenzien SDS und NP-40 für die Trennung der Proteinkomplexe in der ersten IP mit nachfolgender Präzipitation in einer zweiten IP verglichen, um eventuell die Detektion des EpoR zu verbessern. UT-7-Zellen wurden nach Hungern, Stimulation und Zellyse mit Antikörpern gegen EpoR (N-terminal) für 4 Stunden inkubiert (dreifacher Versuchsansatz:  $9 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1;  $15 \mu\text{g}$  Antikörper für erste IP). Diese erste IP wurde gewaschen und nach Zugabe des Protein-Dissoziations-Puffer (1% SDS oder NP-40) für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Danach wurde die Hälfte des Überstandes abgenommen und mit Sample-Puffer 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Nachdem der restliche Überstand der IP 1:10 mit Wasch-Puffer verdünnt worden war, wurde daraus eine zweite IP mit einem polyklonalen Antikörpern gegen den Lyn angesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Die IP wurden

gewaschen und mit Lade-Puffer für 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Erste und zweite IP wurden dann per 7.5% SDS PAGE analysiert. Die Membran wurde nach Elektrotransfer in 1% BSA geblockt und mit 4G10 Antikörper und nachfolgendem Meerrettich-Peroxidase Antimaus-IgG-Antikörper geblottet. Proteine wurden per ECL detektiert. Die Membran wurde im Anschluss daran gestrippt, in Milchpulver geblockt und mit Antikörper gegen Lyn und EpoR geblottet und per ECL detektiert.

Wie in Abb.3.2.4 zu erkennen, ist der Gehalt von Tyrosinphosphorylierung in den ersten IP in der mit SDS dissoziierten EpoR-IP besser detektierbarer als in der mit NP-40 dissoziierten IP. Das könnte darauf hinweisen, dass die Dissoziation durch SDS Epitope für Antikörper besser zugänglich macht, was gut möglich ist, da SDS zur völligen Denaturierung der Proteine führt und somit Epitope zugänglicher werden (siehe dazu auch 4.1.5). Darüber hinaus scheint auch in der mit SDS behandelten EpoR-IP die ko-präzipitierende Bande in Höhe von Jak2 erkennbar zu sein. Im Anschluss daran wurde die Membran gestrippt und mit Antikörpern gegen Lyn und EpoR geblottet um die durch den Anti-Phosphotyrosin-Antikörper angefärbten ko-präzipitierten Proteine zu bestätigen. Darüber hinaus waren wir auch interessiert, ob die Wahl des Detergenzes Einfluss auf die Effizienz der zweiten IP hat. Die Menge der präzipitierten Lyn Proteine (Abb.3.2.4 unterer Abschnitt) scheint in den zweiten IP zwischen NP-40 und SDS behandelten IP nicht zu variieren. Beide Lyn Isoformen scheinen für den Lyn Antikörper gut zugänglich zu sein. Betrachtet man die mit dem EpoR geblottete Membran (Abb. 3.2.4. oberer Abschnitt) fällt auf, dass in der mit NP-40 behandelten EpoR-IP die Detektion der unphosphorylierten EpoR-Form in der mit Epo-stimulierten Probe deutlicher nachweisbar ist als die phosphorylierte Form. Ganz im Gegensatz zur mit SDS behandelten EpoR-IP, in welcher in der mit Epo behandelten Probe die phosphorylierte Bande des EpoR über der unphosphorylierten Bande deutlich zu erkennen ist, was wieder auf den stärker denaturierenden Effekt von SDS und die somit bessere Zugänglichkeit des Antikörpers zurückgeführt werden kann. In der zweiten Anti-Lyn-IP, in der mit SDS behandelten Probe, scheint die ko-präzipitierende EpoR-Bande schwächer anfärbbar zu sein als in der NP-40 behandelten IP, was natürlich heissen kann, dass eine geringere Proteinmenge geladen wurde. Diese Möglichkeit wurde nicht durch eine Anfärbung von z.B. Tubulin ausgeschlossen. Jedoch wurde dieses Ergebniss auch in nachfolgenden Experimenten bestätigt und lässt sich vielleicht durch den Unterschied der Detergenzien und ihren Einfluss auf Proteindenaturierung erklären.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Dissoziation einer EpoR-IP mit SDS einen günstigeren Einfluss auf die nachfolgende Anfärbung des Antikörpers für den EpoR hat, zumindest in der ersten IP und eher keinen Unterschied für die Anfärbung von Lyn macht. Wir entschlossen uns deshalb folgende Doppel-Immunpräzipitation mit SDS als Dissoziations-Puffer anzufertigen.



### 3.2.5 Weiterer Nachweis der Komplexbildung von EpoR und Lyn

Da nur ein kleiner Anteil von EpoR-Molekülen mit Lyn zu assoziieren scheint, versuchten wir die Doppel-Immunpräzipitation zu verbessern und als erstes Lyn zu präzipitieren, da SDS Lyn Proteine dem präzipitierenden Antikörper zugänglicher zu machen scheint. Darüber hinaus wollten wir die Assoziation von EpoR und Lyn weiter spezifizieren, indem wir die Reihenfolge der verwendeten Antikörper ändern. UT-7-Zellen wurden nach Hungern, Stimulation und Zellyse mit dem polyklonalen Antikörper gegen Lyn für 4 Stunden inkubiert ( $9 \times 10^7$  Zellen für erste IP; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1;  $15 \mu\text{g}$  Antikörper für erste IP). Diese erste IP wurde gewaschen und nach Zugabe des Dissoziations-Puffer (1% SDS) für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Danach wurde die Hälfte des Überstandes abgenommen und mit Lade-Puffer 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Nachdem der restliche Überstand der IP 1:10 mit Wasch-Puffer verdünnt worden war, wurde daraus eine zweite IP mit dem Antikörper gegen den EpoR N-terminal) angesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. IP wurden gewaschen mit Sample Puffer für 5 Minuten auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt. Erste und zweite IP wurden dann per 7.5% SDS PAGE analysiert. Membran wurde nach Elektrotransfer in 1% BSA geblockt und mit dem 4G10 Antikörper und nachfolgendem Antimaus-IgG-Antikörper geblottet. Proteine wurden per ECL sichtbar gemacht. Die Membran wurde im Anschluss daran gestrippt, in Milchpulver geblockt und mit Antikörper gegen Lyn und EpoR geblottet und per ECL detektiert. Zur weiteren Kontrolle wurde auch mit Epo-stimuliertes und unstimuliertes Zellysat geladen.

In Abb.3.2.5. mittlerer Abschnitt kann in der ersten Lyn-IP die tyrosinphosphorylierte Bande (um die 72 kDa), welche auch in vorhergehenden Experimenten angefärbt werden konnte, entdeckt werden. Eine Bande in gleicher Höhe erscheint auch in der zweiten EpoR-IP, welche ja aus dem Protein-Präzipitat der ersten Lyn-IP resultiert. Wird die Doppel-IP mit dem Antikörper gegen Lyn geblottet fällt auf, dass der Antikörper auch in der zweiten EpoR-IP Lyn Proteine bindet. Die beiden Lyn Isoformen werden auch im Zellysat angefärbt (Abb.3.2.5. unterer Abschnitt).

Auch gelang die Darstellung der EpoR-Banden in beiden IP's. In der ersten Anti-Lyn-IP und in der zweiten EpoR IP wird durch den 4G10 Antikörper eine Bande in Höhe des EpoR in der mit Epo-stimulierten Probe erkannt (Abb.3.2.5. mittlerer Abschnitt). Wie auch in 3.2.4. gelingt die Darstellung des EpoR in stimulierter und unstimulierter Probe (Abb.3.2.5 oberer Abschnitt), wobei in diesem Experiment die Darstellung der phosphorylierten EpoR Form in der EpoR-IP nicht sehr gut gelingt. Die Detektion der Lyn Proteine in der zweiten IP (Abb.3.2.5. unterer Abschnitt) gelingt nur schwach, was wiederum auf die Behandlung durch das Detergenz und die damit veränderte Zugänglichkeit von Epitopen erklärt werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der EpoR höchstwahrscheinlich mit Lyn einen Komplex bildet. Diese Interaktion ist unabhängig von der Stimulation der Zellen mit Epo. Ob diese Verbindung direkt oder indirekt, d.h. mit Hilfe eines Adapterproteins stattfindet, kann

durch diese Methodik nicht eindeutig geklärt werden. Die Darstellung dieses Komplexes durch Doppel-Immunpräzipitation kann durch die Reihenfolge der für die Präzipitation verwendeten Antikörper optimiert werden: erste IP mit Anti-EpoR und zweite IP mit Anti-Lyn.

Alternative Experimente um die Frage der Ko-präzipitation abzuklären sind von Nöten. Beide Proteine als GST-Fusionsproteine zu exprimieren wäre möglich, doch bietet sich dabei nur schwer die Möglichkeit, die Assoziation im Rahmen von Epo Stimulation zu untersuchen. Auch wäre Überexpressionsmodelle beider Proteine eine Möglichkeit, um die Schwierigkeit zu überwinden, dass nur wahrscheinlich eine sehr geringe Menge von Lyn mit dem EpoR assoziiert.

### **3.2.6 Lyn und Jak2 ko-präzipitieren mit dem EpoR unabhängig von Epo-Stimulation**

Nun wollten wir die Phosphorylierung von Jak2 und Lyn nach Stimulation der Zellen mit Epo untersuchen. Dazu wurden UT-7-Zellen für 0,5; 1; 5; 10; 30 und 60 Minuten mit Epo stimuliert und für jeden Stimulationzeitpunkt je zwei Immunpräzipitate mit entweder polyklonalen Antikörper gegen Lyn oder Jak2 hergestellt. Ein kompletter Satz IP's wurde danach einem Kinase Assay unterzogen, um zu untersuchen ob die Kinaseaktivität von Jak2 und Lyn von der Stimulationszeit mit Epo-abhängt oder per Western Blotting auf Ko-Präzipitationen untersucht.

Für den Kinase Assay wurden IP's gewaschen und 20 Minuten mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert um die Kinaseaktivität zu testen (siehe dazu 2.4.). Die IP's wurden im Anschluss daran mit Sample-Puffer 1:1 gemischt, erhitzt und per 7.5% SDS PAGE aufgetrennt. Nach Trocknen des Geles im Vakuum wurden phosphorylierte Proteine per Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie in Abb.3.2.6 A zu erkennen, werden beide Kinasen bereits nach einer halben Minute aktiviert. In diesem Experiment scheint die Kinaseaktivität von Jak2 nach 30 Minuten nur schwach abzunehmen und vielmehr gleichen sich die Phosphorylierungsintensität von 60 Minuten und 10 Minuten. Die Lyn Kinase Aktivität dagegen scheint auch nach längerer Stimulationszeit nicht wesentlich an Intensität zu gewinnen (erkennbar an der Intensität der transphosphorylierten Enolase bei 50 kDa). In beiden zeitabhängigen Stimulationsexperimenten erwarteten wir phosphorylierte ko-präzipierende Substrate beider Kinase zu erkennen, vor allem in Höhe des EpoR um die 70-75 kDa. Um diese Banden nachzuweisen wurde der Film für längere Zeit (36 Stunden) durch das Gel belichtet. Auf dem Film waren daraufhin schwache Banden in Höhe des EpoR nur sehr schwer erkennbar, da mit längerer Exposition auch die Intensität des Hintergrundes des Geles auf dem Film stark ansteigt und eine eindeutige Identifizierung einzelner Banden schwierig wird, (Daten hier nicht gezeigt).

Leichter fällt der Nachweis von ko-präzipitierten Proteinen nach Immunoblotten der Membran mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper, da dieser Antikörper sehr sensitiv Tyrosinreste detektieren

kann. Die IP's wurden dafür im 7.5% Gel aufgetrennt und mit dem oben erwähnten Antikörper für Tyrosinreste, und nach Strippen des Blottes, mit Antikörper gegen Jak2, EpoR und Lyn geblottet. Proteine wurden per ECL Methode sichtbar gemacht. Im Phosphotyrosin-Blot (Abb.3.2.6.B) erkennt man deutlich den Stimulationseffekt durch Epo auf die Tyrosinphosphorylierung von Jak2, welche nach 30 Sekunden sehr intensiv ansteigt und erst nach 60 Minuten wieder langsam abzunehmen scheint. Mit der schwach abnehmenden Phosphorylierung von Jak2 um die 60 Minuten scheint sich auch die Tyrosinphosphorylierung der ko-präzipitierenden Proteinen in Höhe des EpoR 70-75 kDa zu vermindern. Nicht dagegen die ko-präzipitierenden Banden, welche in Höhe der 56 und 53 kDa Isoformen von Lyn komigrieren, was eventuell auf eine Komplexbildung von Jak2 und Lyn hinweisen könnte. Bei der Bande um 50 kDa, die in allen Jak2 IP's erscheint, handelt es sich wahrscheinlich um die schwere Kette des Jak2-Antikörpers, welche von dem blottenden Antikörper detektiert wird. Weitere ko-präzipitierende Banden finden sich in Höhe 90; 140 kDa und höher.

Lyn ist, wie schon vorher beschrieben, auch im "unaktiven" Zustand an Tyrosinresten phosphoryliert. Bestätigt wurde dies durch den Nachweis der Phosphorylierung von Lyn durch Epo, welche sich durch die Stimulation der Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle nicht zu ändern scheint. Die Tyrosinphosphorylierung von Lyn scheint auch nicht nach 60 Minuten Stimulation (Abb.3.2.6.B) abzunehmen. Ko-präzipitierende Banden finden sich nur schwach in Höhe von 60; 70 und zwischen 75-80 kDa, welche mit dem Ko-präzipitat der Jak2-IP komigrieren. Die Anfärbung der Bande in Höhe des EpoR ist auch wie in vorhergehenden Experimenten eher schwach und reflektiert wahrscheinlich den geringen Anteil der mit dem EpoR assoziierenden Lyn Proteinen. Weitere tyrosinphosphorylierte ko-präzipitierende Proteine finden sich in Höhe 100; 120 und 135 kDa.

Dieser Blot wurde nun mit Stripping-Lösung behandelt um den Anti-Phosphotyrosin-Antikörper zu dissoziieren. Im Anschluss daran wurde die Membran mit Antikörper gegen Jak2, EpoR und Lyn inkubiert um zum einen Ko-Präzipitationen zu entdecken und zum anderen Proteinmengen semiquantitativ in den jeweiligen IP zu vergleichen. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass gefundene Ergebnisse nicht auf unterschiedlich geladene Proteinmengen zurückzuführen sind. In Abb.3.2.6.C linker oberer Abschnitt, scheint die Menge der Jak2 Proteine sich nicht auffällig in den einzelnen IP zu unterscheiden, bis auf die unstimulierte Probe, in der die Proteinmenge etwas vermehrt scheint. Diese Probe zeigt aber keine Anfärbung in Phosphotyrosin-Blot. Auch in den Lyn-IP's weisen die geladenen Proteinmengen keine grossen Unterschiede auf (Abb.3.2.6. rechts unten). Der Anti-Jak2-Antikörper bindet nicht an ko-präzipitierende Jak2 Proteine in den Lyn IPs, was darauf hindeutet, dass keine Komplexbildung zwischen Lyn und Jak2 besteht oder eine bestehende Assoziation eher schwach ist oder die Sensitivität dieses Antikörpers limitiert ist (3.2.6.C rechter oberer Abschnitt). Gleiches gilt auch für die Anfärbung der Jak2-IP's mit dem Anti-Lyn-Antikörper. Beide Lyn-Isoformen scheinen nicht in den Jak2-IP's detektierbar zu sein (Abb.3.2.6.C unterer Abschnitt).

Die Darstellung des ko-präzipitierenden EpoR ist, wie auch in vorhergehenden Ko-Präzipitationsexperimenten, durch Blotten der Membran mit dem entsprechenden Antikörper ein Problem (Abb.3.2.6.C mittlerer Abschnitt). Vergleicht man die Intensität der ko-präzipitierten tyrosinphosphorylierten Bande der Jak2-IP um die 70-75 kDa mit der durch den EpoR-Antikörper detektierten Bande in der Höhe, wird die Sensitivitätsabnahme des blottenden EpoR-Antikörpers verglichen mit dem 4G10-Antikörper deutlich. Trotz dieser technischen Schwierigkeiten gelingt es in den Jak2-IP's ko-präzipitierende EpoR-Formen darzustellen: die phosphorylierte Form 3.2.6.C mittlerer Abschnitt, obere Bande und die unphosphorylierte Form, Abb.3.2.6.C mittlerer Abschnitt untere Bande. In der unstimulierten Probe scheint der Rezeptor in einer anderen Form vorzuliegen, was auf eine unterschiedliche Proteinkonformation und somit unterschiedliches Wanderungsverhalten im Gel hinweisen könnte. Vergleicht man nun die tyrosinphosphorylierte ko-präzipitierende EpoR-Bande zwischen Jak2 und Lyn wird klar, dass die Sensitivität des EpoR Antikörpers um ein weiteres verringert wird. Wahrscheinlich geschieht dies durch die verminderte Anzahl der mit dem EpoR interagierender Lyn-Moleküle, verglichen mit einer grösseren Anzahl von Jak2 Molekülen, die mit dem Rezeptor interagieren. In den Lyn-IP's scheint deswegen in diesem Experiment nur die unphosphorylierte Form des Rezeptors angefärbt werden zu können (Abb. 3.2.6.C mittlerer rechter Abschnitt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der EpoR mit Jak2 und höchstwahrscheinlich mit Lyn ko-präzipitiert. Der Nachweis der Ko-Präzipitation von Lyn mit dem EpoR ist technisch mit dieser Methodik schwierig. Die Komplexbildung der Proteine scheint von der Stimulationszeit mit Epo unabhängig zu sein. Der Aktivitätslevel der Kinasen dagegen scheint von der Stimulationszeit mit Epo abzuhängen. So scheint auch der Grad der Tyrosinphosphorylierung von EpoR von der Stimulationszeit von Jak2 abhängig zu sein. Ganz im Gegensatz zu Lyn, wo die Stimulationszeit mit Epo keinen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung und Assoziation des EpoR zu haben scheint. Dieses Experiment wurde noch ein weiteres Mal mit gleichem Resultat wiederholt.

### **3.2.7 Epo aktiviert nicht die Kinaseaktivität von Lyn in der Ba/F3 Zelllinie transfiziert mit der EpoR Mutante 286**

Wenn Lyn nun (indirekt oder direkt) mit dem EpoR assoziiert, waren wir interessiert zu klären welche Domäne des EpoR mit Lyn interagiert. Dafür wurden Ba/F3 Zellen verwendet, die mit C-terminale Deletionsmutanten des EpoR transfiziert worden waren, um Lyn Kinaseaktivität und Ko-Präzipitation zu untersuchen. Bei den C-terminalen Deletionsmutanten handelt es sich um EpoR 467 (AS 1-467), EpoR 416 (AS 1-416) und EpoR 286 (AS 1-286), Wildtyp EpoR (AS 1-507) (siehe dazu auch Abb.3.2.8.D). Wie in Abb.3.2.8.D zu erkennen ist enthält EpoR 286 keine der Tyrosinreste des Rezeptors und nicht Box1 oder Box2. EpoR 416 dagegen

enthält Tyrosin 343, 401, und Box1 und Box2. EpoR 467 enthält alle Tyrosinreste ausser dem C-terminalen Rest 479 und Box1 und Box2.

### 3.2.7.1 Epo stimuliert Lyn Kinase Aktivität in Ba/F3/C5 Zelllinie

Bevor diese Rezeptormutanten für Ko-Präzipitation mit Lyn getestet werden konnten, musste überprüft werden ob Lyn auch durch Epo in der Ba/F3/C5 Zelllinie, eine Ba/F3 Zelllinie mit EpoR Wildtyp transfiziert (siehe Abb.2.1.2 und 3.2.8.E), aktiviert werden konnte. Da diese Zellen Rezeptoren für IL-3 exprimieren, wurden Zellen auch mit diesem Zytokin stimuliert und die jeweiligen Ergebnisse als Positiv oder Negativkontrolle gewertet: Jak2, was durch IL-3 und Epo stimulierbar ist, Jak1, was nur durch IL-3 stimulierbar ist und Abl, was durch keines der beiden Zytokine stimulierbar ist. IL-3 reguliert sowohl die Kinaseaktivität von Lyn in myeloischen Zellen, wie von Torigoe et al. beschrieben worden ist [261, 268], als auch die Kinaseaktivität von Jak1 und Jak2 [51, 166, 269].

Für dieses Experiment wurden die Zellen 16 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen, in frischem Hungermedium mit IL-3 (50pM/ml) und Epo (50ng/ml) für 5 Minuten stimuliert, mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben lysiert. Lysate ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5 $\mu$ g Antikörper/IP) wurden dann mit jeweiligen polyklonalen Antikörper präzipitiert und 20 Minuten mit ( $^{32}$ P)- $\gamma$ -ATP und Enolase inkubiert um die Kinaseaktivität der jeweiligen Kinasen zu untersuchen. Die IP's wurden danach per 7.5% SDS PAGE aufgetrennt und phosphorylierte Proteine per Autoradiographie sichtbar gemacht.

Wie in Abb.3.2.7A linker Abschnitt zu erkennen ist, aktiviert IL-3 wie erwartet die Kinasen Jak1 (p130), Jak2 (p130) und Lyn (p53, p56). Die Aktivierung von Lyn Proteinen durch IL-3 scheint stärker als durch Epo, was wahrscheinlich die geringe Menge der mit dem EpoR assoziierten Lyn Proteinen widerspiegelt. Weder Epo noch IL-3 scheinen die Kinaseaktivität von Abl zu aktivieren. Wie erwartet aktiviert IL-3 auch Jak1, im Gegensatz zu Epo, das Jak1 nicht aktivieren kann. Epo stimuliert aber, wie schon in vorhergehenden Experimenten gezeigt, die Kinaseaktivität von Jak2 und Lyn, was an der Auto- und Transphosphorylierung von Lyn selber und dem Substrat Enolase zu erkennen ist (Abb.3.2.7.A rechter Abschnitt). In diesem Experiment scheint auch die Transphosphorylierung von Enolase eher schwach, verglichen mit der Trans- oder Autophosphorylierung der Lyn-Kinase. Nach Wiederholen dieses Experimentes war die Transphosphorylierung von Enolase durch Lyn stärker, aber in diesen Experimenten war nicht die IL-3 Kontrollen eingeschlossen. Eine bessere Transphosphorylierung von Enolase durch Lyn kann in den folgenden Experimenten gefunden werden.

### 3.2.7.2 Epo aktiviert nicht die Kinaseaktivität von Lyn in Ba/F3/EpoR 286 Zelllinie

Nun waren wir daran interessiert, ob die C-terminale Deletionsmutanten eine Aktivierung der Lyn-Kinase vermitteln können. Dafür wurden die jeweiligen Ba/F3 Zellen 16 Stunden gehungert und mit Epo (50ng/ml) und im Falle von EpoR 286 zusätzlich mit IL-3 (50pM/ml) für 5 Minuten stimuliert, in PBS gewaschen und mit Anti-Lyn Antikörper präzipitiert ( $2.5 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5 $\mu$ g Antikörper/IP). Die IP's wurden im Anschluss daran 20 Minuten mit ( $^{32}$ P)- $\gamma$ -ATP inkubiert und im 7.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphorylierte Proteine wurden per Autoradiographie sichtbar gemacht.

Wie in Abb.3.2.7.B. zu erkennen ist wird die Aktivierung der Lyn Kinaseaktivität von EpoR Wildtyp, EpoR 467 und EpoR 416 vermittelt, was an einer Zunahme der Phosphorylierung der beiden Isoformen p53/p56 von Lyn und von dem Substrat Enolase (p50) nach Stimulation mit Epo erkennbar ist. Keine Aktivierung von Lyn durch Epo findet sich in den Ba/F3 Zellen, welche die Trunktionsmutante EpoR 286 exprimieren. In diesen Zellen findet aber eine Aktivierung von Lyn durch IL-3 statt. Dieses Resultat konnte durch Wiederholen des Experimentes bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der EpoR Lyn Kinase Aktivität vermittelt und die Region des EpoR welche die Aktivierungssignale von Lyn transduziert, sich wahrscheinlich im Bereich der AS 416 in Richtung N-Terminus des EpoR befindet. Der zytoplasmatische Anteil dieser Region enthält wie beschrieben Box1, Box2 und die zwei N-terminalen Tyrosinreste Y343 und Y401.

### **3.2.8 Lyn ko-präzipitiert mit der EpoR 414 Mutante aber nicht mit der EpoR 268 Mutante**

Durch Ko-Präzipitationsexperimente mit Zelllinien, welche trunkierte EpoR Mutanten exprimieren, wurde versucht die Eingrenzung der Bindungsseite von Lyn mit dem Epo-Rezeptor zu untersuchen. Die dafür nötigen Experimente wurden wie folgt geplant:

1. IP mit dem Anti-EpoR Antikörper, welcher Bindungsdomänen im N-Terminus des Rezeptors, auch in den C-terminalen Deletionsmutanten, erkennen sollte. Für dieses Experiment bezogen wir noch eine zusätzliche EpoR Mutante mit ein: 440 (AS 1-440, siehe dazu auch 3.2.8.E). Danach folgte Immunoblotten dieser IP mit EpoR Antikörper, der Epitope im N-terminalen Anteil des Rezeptors erkennt oder Immunoblotten mit einem monoklonalen Anti-Lyn Antikörper. Die 286 Mutante wurde als Negativkontrolle zusätzlich noch mit einem den C-terminalen Teil des EpoR erkennenden Antikörper präzipitiert, siehe dazu auch Abb.3.2.8.E., in welcher die verwendeten Mutanten beschrieben werden.

2. IP dem Anti-Lyn Antikörper in den jeweiligen Zelllinien mit nachfolgenden Immunoblotten mit dem EpoR Antikörper (N-terminal) oder dem monoklonalen Anti-Lyn (H-6) Antikörper.

Ba/F3 EpoR Mutanten wurden dafür 16 Stunden gehungert, mit Epo 50 ng/ml stimuliert und lysiert. Zellysate ( $3 \times 10^7$  Zellen per Probe; Proteingehalt wurde im Biorad Assay bestimmt; siehe dazu auch 2.2.1; 5 µg Antikörper/IP) wurden mit dem polyklonalen Anti-Lyn (44) und dem polyklonalen Anti-EpoR Antikörper (m20), welcher ein Epitop im N-Terminus des EpoR erkennt, präzipitiert. Zellysat der 268 EpoR Zelllinie wurde, wie oben erwähnt, zusätzlich mit einem Antikörper, der Epitope im C-Terminus des EpoR erkennt, präzipitiert. Alle hier gezeigten IPs wurden wie schon beschrieben mit Waschpuffer gewaschen und mit Lade-Puffer 1:1 gemischt, für 5 Minuten auf 100°C erhitzt und per 7.5% SDS PAGE aufgetrennt. Die Membranen wurden jeweils mit dem monoklonalen Anti-EpoR (m-20), der Epitope im N-Terminus des EpoR erkennt, oder dem monoklonalen Anti-Lyn Antikörper (H-6) inkubiert und per ECL entwickelt.

### **EpoR Mutante 467**

Wie in Abb.3.2.8.A zu erkennen ist, erkennt der Anti-EpoR (N-terminal) den um 40 AS trunkierten Rezeptor auch in dem mit Lyn präzipitierten Zellysaten (linker Abschnitt), Interessanterweise scheint Lyn stärker mit der phosphorylierten Form dieser Rezeptormutante (obere Bande des Doublets um die 66 Kda) zu binden. Bestätigt wurde dies durch Strippen der Membran mit nachfolgender Inkubation mit dem anti-Phosphotyrosin (4G10) Antikörper. Wie in Abb.3.2.8.A, rechter Blot, mit Epo-stimulierte EpoR IP, zu erkennen ist, handelt es sich bei der oberen Bande der Doppelbande um die phosphorylierte Form des Rezeptors. Es ist unklar warum Lyn hier mit der phosphorylierten Form stärker zu assoziieren scheint. Es könnte sein, dass der Verlust von 40AS die Konformation des Rezeptors in einer Weise ändert, welche die Bindung von Lyn, eventuell durch seine SH2 Domäne an Tyrosinreste des Rezeptors erlaubt.

### **EpoR Mutante 440**

Auch in den EpoR 440 assoziiert Lyn mit den EpoR. Aber, wie in Abb.3.2.8.B, (linker Abschnitt, Lyn IP), zu erkennen ist, ist die Anfärbung des EpoR durch den N-terminalen EpoR Antikörper, in diesem Lynpräzipitat nicht möglich. Diese Darstellung gelingt besser nach Strippen der Membran und Inkubation derselben mit einem monoklonalen Anti-Lyn Antikörper. Dieser Antikörper färbt beide Lyn Isoformen an, sowohl in der Lyn IP als auch etwas schwächer in der EpoR (N-terminal) IP, (Abb.3.2.8.B. unterer Abschnitt). Der Vorteil von der Verwendung eines monoklonalen Antikörpers zum Anfärben der Proteine liegt darin, dass der Wirtsorganismus (Maus) die Kreuzreaktion des zweiten blottenden Antikörpers (Anti-Maus und nicht Anti-Kaninchen) mit dem immunopräzipitierenden Antikörper (Wirt = Kaninchen) verringert.

## **EpoR Mutante 416**

Das Molekulargewicht dieser EpoR Mutante liegt bei ca. 55 Kda, was ein Problem in der Auftrennung und Detektion im Westernblot darstellt, da die Lyn Isoformen ähnlich in ihrem Gewicht sind: 53 und 56 Kda und die schwere Immunglobulinkette des präzipitierenden Antikörpers in dieser Gewichtsklasse liegen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen besteht in der Verwendung von Antikörpern aus dem Serum verschiedener Säugetiere. In den hier gezeigten Experimenten wurden die EpoR IP mit einem polyklonalen Antikörper, gewonnen aus Kaninchenserum, hergestellt. Der blottende Antikörper ist in diesem Falle ein monoklonaler Anti-EpoR Antikörper, der aus Mausserum gewonnen wurde. Somit kann der zweite, mit HRP gekoppelte Antikörper murine Proteine detektieren und nicht mit der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers reagieren. Wie in Abb.3.2.8.C zu erkennen ist scheint Lyn mit der EpoR Mutante 414 zu präzipitieren, betrachtet man die stärkere Filmexposition dieser Membran, Abb.3.2.8.C., rechter Abschnitt. Wird jedoch diese Membran gestrippt und mit einem monoklonale Lyn Antikörper inkubiert, fällt es schwer die Lyn Isoformen in der EpoR IP anzufärben, Abb.3.2.8 C, (unterer Abschnitt, EpoR IP).

## **EpoR 286 Mutante**

Diese Mutante dient als Negativkontrolle, da der zytoplasmatische Teil bis auf wenige AS trunziert ist und nicht mit einem C-terminalen EpoR Antikörper, sondern nur mit einem N-terminale EpoR Antikörper präzipitiert werden kann. Wie in Abb. 3.2.8 D zu sehen ist, kann die 286 Mutante mit dem N-terminalen EpoR Antikörper präzipitiert werden (rechter Abschnitt). Als Postivkontrolle wurde Lysat der 440 EpoR Mutante verwendet, welches mit dem N-terminalen EpoR Antikörper präzipitiert wurde. Wie im mittleren Abschnitt zu erkennen ist, präzipitiert dieser N-terminalen EpoR Antikörper die 440 Mutante (59 Kda) des EpoR. Die 286 Mutante wurde auch mit dem N-terminalen EpoR Antikörper präzipitiert, Abb. 3.2.8.D., rechter Abschnitt, und wird durch den blottenden EpoR Antikörper um die 35kDa detektiert. Diese Membran wurde nun gestrippt und mit dem monoklonalen Lyn Antikörper inkubiert. Wie in Abb. 3.2.8.D., unterer Abschnitt zu erkennen ist, kann Lyn nicht in der mit dem C-terminalen EpoR Antikörper präzipitierten 286 Mutante angefärbt werden. Jedoch kann Lyn in der mit dem N-terminalen EpoR präzipitierten 440 Mutante angefärbt werden. Vor allem in der unstimulierten Probe scheint man die beiden Isoformen zu erkennen. Ob Lyn auch in der mit N-terminalen EpoR präzipitierten 286 Mutante entdeckt werden kann, ist fraglich. Die sichtbare Bande kann auch eine unspezifische Reaktion des blottenden Antikörpers mit der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers sein, Abb. 3.2.8.D., (unterer, rechter Abschnitt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Untersuchung der Lyn Bindungsseite mit dem EpoR durch Verwendung trunzierter EpoR Mutanten in den hier gezeigten Experimenten höchst problematisch ist. Dies gilt vor allem in den hier gezeigten Ergebnissen mit den Mutanten 440,416 und 286. Eindeutige Interpretationen dieser Resultate, trotz Wiederholung des Experimentes, sind leider nicht möglich und es stellt sich die Frage, durch



welche andere Techniken diese Hypothese besser behandelt werden könnte. Dies wird im Detail unter 4.4.5 diskutiert.

### **3.2.9. Der Effekt von Lyn auf Epo-abhängiges Zellwachstum**

Lyn scheint demnach ein Molekül in der durch Epo-stimulierten Signaltransduktion zu sein. Um seine Rolle im Epo Signalweg zu untersuchen, versuchten wir seine Rolle in der durch Epo-stimulierten Zellproliferation zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden Oligodeoxynucleotide in Antisense synthetisiert, welche an die Sequenz der unique domain (in beiden Splicing Varianten von Lyn) binden und die Translation in das Protein verhindern [270]. Die unique domain ist spezifisch für jedes Mitglied der Src-Kinase Familie, wie unter 1.3.4.1. besprochen [172]. Als Kontrolle wurden Oligodeoxynucleotide auch als Sense und Mismatch synthetisiert, die die Translation in Lyn Proteine erlauben. In 3.2.10 wird gezeigt, dass die Lyn Antisense Oligodeoxynucleotide die Lyn Expression blockieren.

Um den Effekt von Lyn auf die Proliferation von Zellen zu untersuchen, musste zuerst die optimale Konzentration von Lyn Oligodeoxynucleotiden bestimmt werden. Dafür wurden Ba/F3-EpoR Zellen dreimal in PBS gewaschen und in einer Zellzahl von  $0,5 \times 10^4$ /Well in einer 96 Well Platte ausgesäht. Das Wachstumsmedium enthielt Epo in einer Konzentration von 1U/ml und Antisense, Sense Oligodeoxynucleotide in aufsteigenden Konzentrationen von 0-30 $\mu$ M. Oligo-Konzentrationen wurden jeweils in Triplikaten getestet. Nach 48 h wurde in jedes Well 30 $\mu$ l MTT Lösung und danach 100 $\mu$ l azidischer Alkohol pipettiert und der Assay wie unter 2.6.2 beschrieben ausgeführt.

Wie in Abb.3.2.9.A zu erkennen ist, scheint ein sichtbarer antiproliferativer Effekt durch die Antisense Oligodeoxynucleotide in einer Konzentration von 15-30 $\mu$ M erreicht zu werden. Im Vergleich zu den unbehandelten (offene Quadrate) oder den mit Sense Oligodeoxynucleotiden behandelten Zellen (offene Kreise), verringerte sich das Wachstum der mit Antisense behandelten Zellen (offene Raute) um ca.7% bei einer Konzentration von 10-15 $\mu$ M, und um ca. 13% bei einer Konzentration von 15-30 $\mu$ M Oligodeoxynucleotide. Die Auswirkung auf einen Verlust des Lyn Proteins auf das Zellwachstum scheint demnach nicht sehr wichtig zu sein. Um diese Tatsache jedoch genauer zu untersuchen, wurden Zellen nun mit einer Antisense Konzentration von 15 $\mu$ M und aufsteigender Wachstumsfaktor Konzentrationen behandelt.

Für dieses Experiment wurden Ba/F3 mit IL-3 und Ba/F3-EpoR mit Epo verglichen. Die Zellen wurden wie im vorher gehenden Experiment dreimal mit PBS gewaschen und in einer Zellzahl von  $0,5 \times 10^4$ /Well in einer 96 Well Platte ausgesäht. Oligodeoxynucleotide und Wachstumsfaktoren wurden jeweils in Triplikaten verglichen und nach 48 Stunden im MTT-Assay gemessen.

Wie in Abb. 3.2.9.B zu erkennen ist scheint der Verlust von Lyn keinen starken Einfluss auf das Wachstumsverhalten der IL-3 abhängigen Ba/F3 Zellen zu haben. Diese Zellen wachsen exponentiell in einer Konzentration von 1pM IL-3. Antisense behandelte Zellen (offene Raute) scheinen bei IL-3 Konzentrationen von 0,1 bis <1pM kaum weniger zu wachsen als mit Sense behandelte (offene Kreise) oder unbehandelte (offene Quadrate) Zellen. Bei einer IL-3 Konzentrationen höher als 1pM scheint der antiproliferative Effekt durch den Verlust von Lyn stärker zur Geltung zu kommen, aber auch hier ist der Unterschied zu unbehandelten Zellen nur maximal um die 17%.

Ähnliches findet sich auch für die Ba/F3-EpoR Zellen inkubiert mit aufsteigenden Epo Konzentrationen (Abb. 3.2.9.C). In einem Bereich von 0,5 bis 10 Epo (U/ml) scheint sich ein schwacher antiproliferativer Effekt durch den Verlust von Lyn (offene Raute) verglichen mit Sense behandelten Zellen (offene Kreise) und unbehandelte Zellen (offene Quadrate) zu zeigen. Aber auch hier ist der Unterschied, verglichen mit den unbehandelten Zellen, 22% bei 1U/ml und 27% bei 10U/ml Epo Konzentration. Wesentlich geringere Unterschiede finden sich bei Vergleich der Zelldichte von Antisense und Sense behandelter Zellen: um die 13%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lyn eher eine unwichtige Rolle in der proliferativen Signaltransduktion von Epo spielt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Lyn in die proliferative Antwort von IL-3 und Epo involviert zu sein scheint, aber wahrscheinlich keine bedeutende Rolle spielt, da der Verlust des Proteins keinen durchgreifenden antiproliferativen Effekt zu haben scheint.

### **3.2.10 Die Rolle von Lyn in der Differenzierung der erythrozytären Blutzellreihe**

Um nun zu untersuchen ob Lyn eine Rolle in der Differenzierung von Erythrozyten spielen könnte, wurde auch die Translation in Lyn Proteine durch Behandlung der Zellen mit Oligodeoxynukleotiden inhibiert und die Differenzierungsfähigkeit der Zellen anhand der  $\beta$ -Globin Expression überprüft. Für diesen Zweck wurden Zellen verwendet, Klon 22 Ba/F3-EpoR, welche nach Stimulation mit Epo  $\beta$ -Globin exprimieren. Diese Zellen können aber nur limitiert erythrozytär differenzieren. Die hier verwendeten Zellen exprimieren stabil transfizierten muriner Epo Rezeptor, da sie in einem Selektiv Medium für EpoR Expression gehalten werden (siehe dazu auch 2.1.). Nach der Infektion mit EpoR DNA proliferieren sie ohne die Zugabe von Epo in IL-3 enthaltenden Zellmedium. Die Zugabe von Epo erlaubt somit die Messung der *de novo*  $\beta$ -Globin Expression.

Um nachzuweisen, dass Epo in der Tat die  $\beta$ -Globin Expression in Ba/F3-EpoR Klon22 Zellen stimuliert, wurde zuerst RNA von Zellen gewonnen, welche für 6 Tage in Epo (1U/ml) [255], oder IL-3 (1pM) gehalten wurden. 20 $\mu$ g RNA wurden mit einer  $\beta$ -Globin Riboprobe über Nacht hybridisiert und nach Verdau mit RNase per Polyacrylamidgel und Autoradiographie analysiert, siehe dazu auch 2.9.. Wie in Abb.3.2.10.A (oberer Abschnitt) zu

erkennen ist wird durch IL-3 kein  $\beta$ -Globin Transkript hergestellt (Probe 3+4). Ganz im Gegensatz zur Stimulation der Zellen mit Epo (Probe 1+2), hier kann die  $\beta$ -Globin Riboprobe  $\beta$ -Globin Transkripte binden. Somit kann Epo, aber nicht IL-3, die *de novo*  $\beta$ -Globin Expression induzieren. Um zu testen ob Stimulation der Zellen mit Epo oder IL-3 Einfluss auf die Lyn Expression hat, wurde die RNA von dem soeben beschriebenen Experiment auch mit der Lyn Riboprobe hybridisiert. Wie in Abb.3.2.10.A (unterer Abschnitt) zu erkennen ist, scheint die Lyn Expression unbeeinflusst von Epo (Probe 1+2) oder IL-3 (Probe 3+4) Stimulation zu sein, da unstimulierte Zellen (Probe 5+6) ein fast gleich starkes Expressionsmuster zeigen.

Um nun zu untersuchen ob Lyn in dem Epo Differenzierungs Signalweg involviert ist wurde das gleiche Experiment wiederholt. Zusätzlich wurden aber die Zellen ab Tag 4 mit 15 $\mu$ M Oligodeoxynukleotide (Antisense, Sense, Mismatched) oder ohne Oligodeoxynukleotide inkubiert. Am Tag 6 wurde dann RNA zubereitet wie unter 2.9 beschrieben. Danach wurden dann jeweils 20 $\mu$ g RNA mit der  $\beta$ -Globin-Riboprobe über Nacht hybridisiert und nach Verdau mit RNase per Polyacrylamidgel und Autoradiographie analysiert, siehe dazu auch 2.9. Wie in Abb.3.2.10.B zu erkennen ist, findet sich in der mit Lyn-Antisense inkubierten Zellen eine deutlich verringerte  $\beta$ -Globin Expression (Probe 1) als in den Zellen, welche mit Lyn-Sense oder Lyn-Mismatched (Probe 2+3) oder ohne Oligodeoxynukleotiden (Probe 4) inkubiert wurden. Um in diesem Experiment auch die Wirksamkeit der Lyn Oligodeoxynukleotide zu testen, wurde gleiche RNA mit der Lyn Riboprobe hybridisiert. Im unteren Abschnitt von Abb.3.2.10.B wird deutlich, dass die Lyn-Antisense Oligodeoxynukleotide die Transkription von Lyn RNA verhindert (Probe 1). Ganz im Gegensatz zu den Zellen, welche mit Sense (Probe 2) und mit Mismatched (Probe 3) inkubiert wurden, hier wird Lyn RNA hybridisiert.

Um den Effekt von Antisense Lyn Oligodeoxynukleotide auf die *de novo*  $\beta$ -Globin Expression zu bestätigen, wurde RNA von drei unabhängigen Experimenten, wie oben beschrieben, gewonnen und mit Riboproben für  $\beta$ -Globin und Lyn inkubiert. In allen drei Experimenten konnte gezeigt werden, dass ohne Translation der Lyn Proteine kein  $\beta$ -Globin expremiert wird Abb.3.2.10.C, (oberer Abschnitt, Probe 4-6). Ganz im Gegensatz zu Zellen welche nicht mit Lyn Antisense Oligodeoxynukleotide behandelt wurden, hier findet  $\beta$ -Globin Expression nach Stimulation der Zellen mit Epo statt Abb.3.2.10.C, (oberer Abschnitt, Probe 1-3). Um zu kontrollieren ob die Lyn Antisense Oligodeoxynukleotide auch wirklich die Translation von Lyn Proteinen in diesem Experiment verhindert haben, wurde gleiche RNA mit der Lyn Riboprobe hybridisiert. Wie in Abb.3.2.10.C zu erkennen ist (Probe 4-6) lässt sich in den mit Lyn Antisense behandelten Zellen kein Lyn Transkript detektieren

Zusammenfassend kann hiermit festgehalten werden, dass Lyn eine Rolle in der frühen erythrozytären Differenzierung zu spielen scheint, was anhand von  $\beta$ -Globin Expression gezeigt werden konnte: die Expression von  $\beta$ -Globin scheint von der Expression von Lyn abhängig zu sein. Dieser Differenzierungsschritt ist wahrscheinlich durch Epo induzierbar. Hier gezeigten Ergebnisse konnten durch Wiederholung bestätigt werden.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Das Verwenden von immortalisierten Zelllinien

Das wissenschaftliche Arbeiten mit Zelllinien muss unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte bewertet werden. Die hier verwendeten Zelllinien sind immortalisiert. Die Immortalisierung von Zellen ist noch nicht vollständig verstanden. Man weiss aber, dass mehrere Mutationen und genetische Alterationen im zellulären Genom nötig sind, welche zu zellulärer Seneszenz und Immortalisierung führen. Immortalisierung erfolgt durch spontane oder induzierte Aktivierung von Onkogenen (z.B. T-Antigen von SV40 und Poyloma Viren), das E1A Onkoprotein einiger Adenoviren, das Onkoprotein der humanen Papilloma Viren 16 und 18 und durch retrovirale Genprodukte und ihre aktivierte zelluläre Homologe (*v-* oder *c-myc*, *v-* oder *c-fos*). Diese Mutationen führen zu Verlust von Apoptose und meist zu Wachstumsfaktorunabhängigkeit. So müssen die in Experimenten beobachteten Verhaltensweisen der Zelllinien unter Vorbehalt betrachtet werden, da die durch Immortalisierung und Seneszenz verursachten onkogenetischen Einflüsse Auswirkungen z.B. auf die Analyse von Kinaseaktivität oder Proteininteraktionen haben könnten. Es ist deswegen ratsam Experimente, wie die hier gezeigten, in mehreren verschiedenen Zelllinien zu wiederholen um die gefundenen Ergebnisse so zu bestätigen. Eine andere Möglichkeit bietet auch das Verwenden von nicht immortalisierten sogenannten "primären" Zellen. Dies sind Zellen, welche nach nur kurzer Zeit nach Isolierung in Experimenten verwendet werden. Dieses Verfahren kann umständlich und arbeitsaufwendig sein, da frisch isolierte humane Zellen schwierig in Kultur zu halten sind und spätestens nach 30-40 Zellteilungen unbrauchbar werden, da der grösste Anteil der zellulären Population dem selektiven Überlebensdruck nicht standhalten kann und abstirbt und nur eine kleine Population eventuell seneszierend und immortalisiert werden [271].

#### 4.1.2 Heterogenität in der Zellpopulation

Im Falle multipler Myelom Zellen ist Heterogenität der Zellpopulationen ein weiteres Problem. Die aus multiplen Myelom Patienten isolierten Zellpopulationen entstammen zwar einem definierten Krankheitsstadium, meist dem terminalen Stadium. Das schliesst aber die Heterogenität dieser Zellpopulation, was ihre Reifungsstufen anbelangt, nicht aus. Es ist deswegen durchaus denkbar, dass diese Zellen in vergleichenden Versuchen unterschiedlich reagieren. Heterogenität findet sich auch in Zelllinien, wie die UT-7 Zelllinie. Diese Zelllinie ist eine megakaryozytären Ursprungs und konnte von einem Patienten mit akuter myeloischer

Leukämie isoliert werden. Nach Isolation wuchsen die Zellen entweder abhängig von der Stimulation mit IL-3, GM-CSF oder Epo [272]. Die HCD-57 Zelllinie dagegen wurde aus einer murinen Erythroleukämie isoliert. Auch diese Zelllinie wächst abhängig von Epo [273]. Die Ba/F3 Zellen wurden ursprünglich als B-Lymphozytäre Progenitor Zelle isoliert, deren IL-3 abhängiges Wachstum durch Transfektion der Zellen mit *v-abl* aufgehoben wurde [274].

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist auch die Kontamination von Zellen. Weniger durch Bakterien oder andere Mikroorganismen als durch das Verschleppen von Zellen in andere Zellkulturen. Kontaminationen solcher Art verändern natürlich auch den ursprünglichen Phänotyp der Zelllinien.

#### **4.1.3 Autokrines oder Parakrines Wachstum von multiplen Myelomzellen**

Nach wie vor herrscht Uneinigkeit darüber ob das Wachstum der Myelomzellen vorwiegend von autokriner oder parakriner IL-6 Produktion abhängt. In Experimenten mit multiplen Myelom Zelllinien in denen keine Zunahme von Tyrosinphosphorylierung oder Proliferation nach IL-6 Stimulation gemessen werden kann, könnte die Ursache für die "Unstimulierbarkeit" der Zelllinien, in diesem Fall OPM-2 und U266, auf ihre autokrine Produktion von Interleukin-6 zurückgeführt werden. Von der U266-Zelllinie ist bekannt, dass sie autokrin IL-6 produziert (s.u.), was eine Erklärung für ihre konstitutive Tyrosinphosphorylierung nach IL-6 Stimulation (Abb.3.1.1.) und ihr Verhalten im Proliferationsassay (Abb.3.2.4.A) darstellen würde. Die U266-Zelllinie ist eine IgE-produzierende Myelomzelllinie, welche ursprünglich von N.K. Nilsson beschrieben wurde (Universität Uppsala, Uppsala, Schweden) [87]. In dieser Zelllinie konnte auch eine verminderte Expression der IL-6-Rezeptoruntereinheiten gefunden werden. Schwabe et al. zeigten in Flow-Cytometrischen Untersuchungen in U266-Zellen nach 24-stündiger IL-6-Behandlung eine um ca. 20% geringere Expression von gp130 und eine 4-5 fache höhere Expression von gp80 [275]. Diese durch IL-6 induzierte verminderte Expression könnte zusammen mit der autokrinen IL-6-Produktion der U266 eine Erklärung für die im Proliferationsassay (Abb.3.2.4A) gezeigte geringer scheinende Proliferation im Vergleich zu der B-9-Zelllinie erklären. Von der B-9-Zelllinie ist bekannt, dass sie über keine autokrine IL-6-Produktion verfügt. Vielmehr wird diese Zelllinie als Standard für Bioassays zur IL-6-Messung verwandt in denen gilt, dass 1pg/ml humanes IL-6 die halbmaximale Proliferation in den B-9 Zellen induziert [276]. Die OPM-2-Zelllinie konnte zusammen mit der OPM-1-Zelllinie von einer 56 jährigen Patientin im terminalen Stadium isoliert werden. Beide Zellen wurden auf ihre Unterschiede in phänotypische Oberflächenmarker und karyotypische Veränderungen hin untersucht, mit dem Ergebnis, dass sie Unterschiede in exprimierten Oberflächenmolekülen boten und sehr stark in chromosomalen Abnormitäten divergierten [277]. Die LP-1 Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut einer Patientin mit IgG $\lambda$  Myelom isoliert. Anhand ihrer Oberflächenmarker konnte sie als unreife IgG $\lambda$  produzierende Plasmazelle mit einer gesteigerten *c-myc* Expression identifiziert werden [278].

Es wäre interessant gewesen zu untersuchen, ob die Rezeptorexpression der hier verwendeten Myelom Zelllinien durch IL-6 reguliert wird. Eine durch IL-6 induzierte gesteigerte Rezeptorexpression ist jedoch für die U266 oder die OPM-2 Zelllinie fraglich, da dies eventuell auch mehr durch IL-6 Rezeptor transferierte Signaltransduktion bedeuten würde, und beide Zelllinien schon einen hohen basalen Level an Tyrosinphosphorylierung zeigen (siehe dazu auch 3.1.1 und 3.1.2). Vielleicht wäre auch eine Rezeptor Runterregulierung in den B-9 oder LP-1 Zellen durch hohe und langandauernde IL-6 Konzentrationen, im Sinne von IL-6 unabhängiges Wachstum, denkbar.

Die hier repräsentierte Heterogenität der Zelllinien in Bezug auf Herkunft, Abhängigkeit im Wachstum von Wachstumsfaktoren, Differenzierungsstatus oder sonstiges ist keine Seltenheit in dieser Art von gezeigten Experimenten. Somit konnten die hier gezeigten Resultate durch Verwendung verschiedener Zelllinien mehrfach bestätigt werden.

#### **4.1.4 Darstellung von Proteinen durch Immunoblotten**

Eindimensionale Gel Elektrophorese ist ein sehr gutes analytisches Instrument um komplexe Proteingemische zu charakterisieren. Die ionische Ladung der Proteine wird durch die Bindung an SDS, das sowohl in den verwendeten Puffern als auch im polymerisierten Acrylamidgel selber vorhanden ist, negativ. Dadurch können die Proteine im elektrischen Feld bezüglich ihrer Ladung wandern und je nach molekularem Gewicht aufgetrennt werden. Theoretisch kann, abhängig von der Auftrennung des Geles, je eine Bande ein Protein repräsentieren. Die Auftrennung ist aber nicht in allen Bereichen des Geles optimal. Da eine bestimmte Acrylamidkonzentration auch nur einen bestimmten Molekulargewichtsbereich günstig auftrennt. Ein Problem, das sich sehr in der Darstellung der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen darstellte, vor allem im Bereich von 50-60 kDa (Src-Kinasen), im Bereich um die 130kDa (gp130 und Janus-Kinasen) und im Bereich 70-75kDa (EpoR). Im Bereich des EpoR migrieren neben dem Rezeptor die Phosphatase p65 SHPTP1 und die Tyrosinkinase p72Syk, um nur einige der bekannten Proteine zu nennen. Deswegen ist die Kontrollanfärbung durch Antikörper des jeweiligen Proteines unerlässlich. Die Spezifität der kommerziell erwerblichen Antikörper ist meist überprüfbar. Durch das Blocken der Antikörper bindenden Sequenz durch ein Peptid ist es möglich unspezifische Bindungen des geblockten Antikörpers anzufärben. Wir haben in den meisten Fällen die Spezifität der Antikörper in Immunpräzipitationen überprüft. All die verwendeten durch Peptid blockbaren Antikörper, wie z.B. der Anti-Shc, Anti-Fyn oder Anti-Hck Antikörper in Abb.3.1.10.D zeigten hohe Spezifität und keine unspezifischen Bindungen. Nun war diese Überprüfung der Spezifität leider nicht für alle Antikörper möglich, wie z.B. für den EpoR erkennenden C- und N-terminalen Antikörper. In diesem Fall versuchten wir die Spezifität zu überprüfen indem immunpräzipitierender und blottender Antikörper, welcher jeweils verschiedene Epitope des EpoR erkannten (Abb.3.2.8A-D), verwendet wurden. Die verwendeten EpoR Antikörper

waren, wie auch der  $\alpha$ -IL-6R und gp130 Antikörper von nicht sehr guter Qualität. Trotz Verwendung verschiedener Puffer gelang es im Falle des IL-6-Rezeptors die Ko-Präzipitation mit den Src-Kinasen kaum und im Falle des EpoR nur bedingt zu demonstrieren. Die Qualität der EpoR-Antikörper, in Anfärbung der ko-präzipitierenden Rezeptorbande in der Lyn-IP schien besser zu sein war aber auch wie der IL-6-Rezeptor Antikörper von hoher Hintergrundbindung begleitet, siehe 3.2.8.A-D. Mittlerweile sind bessere Antikörper zumindest für den IL-6-Rezeptor erwerblich. Mit Hilfe dieser neueren Antikörpern gelang auch die Darstellung der Assoziation zwischen IL-6-Rezeptor und den Src-Kinasen Lyn und Hck zu demonstrieren [279]. Für die Darstellung der Ko-Präzipitation des EpoR mit den Src-Kinasen kommt wahrscheinlich noch erschwerend hinzu, dass nur eine sehr geringe Menge der Kinasen-Moleküle mit dem Rezeptor assoziiert, wie auch im IL-2 Rezeptorsystem gezeigt wurde. Nur 1% der exprimierten Lck-Moleküle assoziieren in T-Lymphozyten mit dem IL-2-Rezeptor [168]. Um die Schwierigkeiten mit den verwendeten Epo-Antikörpern zu überkommen versuchten wir die Assoziation zwischen EpoR und Src-Kinasen durch Doppel-Immunpräzipitationen darzustellen. Diese Methode basiert darauf, dass ein durch einen Antikörper präzipitiertes Protein mit weiteren Proteinen einen Komplex bildet, welcher dann durch ein Detergenziengemisch wieder getrennt wird. Dieses dissoziierte Proteingemisch nun mit einem zweiten Antikörper inkubiert um ein an dem Komplex beteiligtes Protein zu präzipitieren. Diese Methode bietet einige Vorteile gegenüber einer einfachen IP. Zum Beispiel können ko-präzipitierende Proteine, welche ähnliche Molekulargewichte haben durch eine zweite IP wiederholt aufgereinigt und somit besser darstellbar werden. Auch durch das Binden des zweiten Antikörpers oder durch die Behandlung der IP mit dissoziierenden Detergenziengemischen scheint in manchen Fällen die Konformation des Proteins dahingehend geändert zu werden, dass die Bindung des blottenden Antikörpers, durch Aufaltung mehrerer Epitope, erleichtert wird. Dies scheint der Fall in Abb.3.2.4 zu sein. Der blottende Lyn-Antikörper scheint in der zweiten IP mehr Lyn-Proteine zu erkennen als in der ersten IP, was höchstwahrscheinlich nicht an einer grösseren Menge präzipitierter Lyn-Proteine liegt sondern an der verbesserte Bindung des blottenden Antikörpers.

#### **4.1.5 Darstellung von Proteinkomplexen**

Die Darstellung von Proteinkomplexen ist generell problematisch. Die Wahl des Detergenzes scheint eine Rolle zu spielen. Detergenzien drängen sich zwischen die bipolare Lipidschicht der Zellmembran oder zwischen Proteine in Proteinkomplexen. Man unterscheidet non-ionische (mildere) von ionischen (mehr aggressiveren) Detergenzien. Beide Gruppen wirken durch die hydrophobische Kette ihres Moleküles und unterscheiden sich in ihrem "Kopfteil" der geladen oder ungeladen ist. Non-ionische Detergenzien wie NP-40 oder Brij96 wirken nicht denaturierend und entfalten Proteine indem sich der hydrophobische Teil in das Protein drängt. Aufgrund ihrer Ladungsfreiheit ist ihre Wirkungskraft limitiert und sie zerstören in der Regel nicht das aktive Zentrum des Proteins. Non-ionische Detergenzien eignen sich deshalb gut für

Proteindissoziationen, denen ein funktioneller Assay nachfolgt, wie in der Doppel-IP des Kinase-Assays in Abb.3.1.10.D. Hier musste sichergestellt werden, dass die Enzyme ihre Kinaseaktivität nicht durch die Dissoziation verlieren würden. Die Menge der dissoziierten Proteine ist aber in einer Dissoziation basierend auf SDS, ein ionisches Detergenz, höher. Die Wirkungsweise der ionischen Detergenzien gleicht denen der non-ionischen Detergenzien. Ihre Wirkungsstärke ist aber aufgrund ihrer Ladung grösser, hat aber auch Denaturierung des Proteins zur Folge. Nachfolgende funktionale Assays werden so problematisch, da meist das aktive Zentrum des Enzymes irreversibel entfaltet und somit gestört wird [280]. Da der Doppel-Immunpräzipitation der EpoR-Assoziationsexperimente kein funktionaler Assay folgte, wurden diese Komplexe mit dem aggressiveren ionischen Detergenz SDS dissoziiert. Dadurch konnte zum einen eine grössere Menge in der zweiten IP präzipitiert werden, verglichen mit der NP-40 dissoziierten IP, zum anderen schien auch die SDS denaturierten Epitope für den zweiten Antikörper zugänglicher zu sein, da die durch Immunoblotten detektierten Banden in der ersten SDS-Doppel-IP stärker angefärbt waren als in der zweiten (Abb.3.2.4).

#### 4.1.6 Nachweis der Kinaseaktivität von Tyrosinkinassen

Die spezifische Aktivität von Tyrosinkinassen ist im Allgemeinen, verglichen mit der von Serin/Threoninkinassen sehr niedrig: 1/100stel von der Aktivität von Serin/Threoninkinassen. Die Kinaseaktivität kann entweder durch Messungen der Substratphosphorylierung durch Transfer einer Phosphorylgruppe von ATP oder GTP an einen Hydroxylrest eines Proteins oder Peptides oder durch Messen der Autophosphorylierung des Enzymes selber durch Transfer einer Phosphatgruppe von ATP oder GTP an einen eigenen Hydroxylrest gemessen werden. Die enzymatische Messungen von Tyrosinkinaseaktivität *in vitro* beinhaltet das Enzym, eventuell ein Substrat,  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP und bivalente Kationen wie Magnesium oder Mangan. Das Aktivieren der Kinaseaktivität ist individuell verschieden für jede Kinase, was Temperatur, Labelingzeit, Labelingmenge von radioaktiven und nicht radioaktiven ATP anbelangt [281]. Der Nachweis der Kinaseaktivität der Src-Kinasen in multiplen Myelomzellen beinhaltete kein spezifisches Substrat und somit wurde Autophosphorylierung und Transphosphorylierung im Komplex vorkommender Proteine gezeigt. Im diesem Falle schien der Nachweis der Auto- und Transphosphorylierung ohne Beigabe eines spezifischen Substrates nach IL-6 Stimulation für Hck und Fyn deutlicher nachweisbar zu sein als für Lyn, (Abb.3.1.5 und 3.1.10). Jedoch ist die Anwesenheit eines spezifischen Substrates von Nöten um genauere Aussagen über die Transphosphorylierungsaktivität der Kinase zu machen. Wir versuchten deshalb die durch Epo stimulierte Kinasenaktivität mit Hilfe eines Substrates, Enolase zu messen, (Abb.3.2.2A-D und 3.2.6.A). Auch hängt die durch Wachstumsfaktor stimulierte Kinaseaktivität von dem getesteten Zellsystem ab. So scheint z.B. die Lyn Kinaseaktivität in Ba/F3 Zellen deutlicher (Abb.3.2.7) nachweisbar zu sein, als UT-7 Zellen (Abb.3.2.2). Der Nachweis der Aktivierung von Kinaseaktivität hängt auch stark von der Aufreinigung des Proteins ab. Da in den hier gezeigten Experimenten Immunkomplex-



Kinase-Assays gezeigt werden, welche durch dem Zellysat beigefügten Antikörper gewonnen werden, wird klar, dass diese Aufreinigung Moleküle beinhalten kann, welche die Kinaseaktivität und Autophosphorylierung beeinflussen. Im Falle der Src-Kinasen könnten dies z.B. Peptide oder Proteine sein, welche die Zugänglichkeit der Kinasedomäne behindern, wie z.B. eine den C-terminalen Tyrosinrest phosphorylierende Kinase oder eine den autophosphorylierten Tyrosinrest in der Kinasedomäne dephosphorylierendes Enzym. Viele Möglichkeiten sind denkbar und müssen in die Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden. Um diesem Problem der "Kontamination" halbwegs aus dem Weg zu gehen werden Kinasen zu diesem Zwecke spezieller und aufwendiger aufgereinigt, wie z.B. durch Sepharosesäulen und Ähnliches. Eine weitere Möglichkeit um die Spezifität zu erhöhen, bieten spezifische Kinase-Inhibitoren oder die Verwendung hoch spezifischer Substrate. Moleküle dieser Art beinhalten oft Sequenzen die der Autophosphorylierungsseite entstammen und bieten somit ein ideales Phosphorylierungsziel, was hervorragend als Kontrolle der Kinaseaktivität verwendet werden kann. Hoch spezifische Src-Kinasen Inhibitoren waren zum Zeitpunkt der Experimente, bis auf Herbimycin A, noch nicht kommerziell erhältlich. Bei der Verwendung von Herbimycin A muss aber berücksichtigt werden, dass die Substanz auch andere Kinasen, wie z.B. die Phospholipase C [282] hemmen kann. Darüber hinaus ist die Spezifität dieser Inhibitoren auch von ihrer Konzentration abhängig. So ist z.B. die  $IC_{50}$  (nötige Konzentration um 50% der Tyrosinphosphorylierung der Kinase zu inhibieren) des Bcr-Abl inhibitors STI571 für Bcr-Abl 0,25 $\mu$ M. Die  $IC_{50}$  für PDGF-R ist jedoch mit 0,3 $\mu$ M sehr ähnlich, was das Problem der Spezifität unterstreicht [283]. Würden die hier gezeigten Experimente heute wiederholt werden, wäre die Verwendung von Src-Kinase Inhibitoren (z.B. PP1 und PP2), wie auch von Schaeffer et al. durch die Hemmung der IL-6 induzierten Hck Aktivität durch PP1 und PP2 gezeigt wurde [284], ein notwendiges Kontrollexperiment.

#### **4.1.7 Nachweis der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine**

Viele Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, G-CSF, GM-CSF und Erythropoetin (Epo) induzieren nach Stimulation die Tyrosinphosphorylierung bestimmter zellulärer Proteine und somit die Proliferation dieser Zellen. Der Zusammenhang zwischen Tyrosinphosphorylierung und Zellproliferation kann u.a. durch sechs Punkte verdeutlicht werden:

- 1.) Onkogene, die für bestimmte Tyrosinkinase kodieren, können die Anwesenheit von Zytokinen für die Proliferation in zytokinabhängigen Zellen unnötig werden lassen, d.h. Onko-Proteine übernehmen die durch Zytokin induzierten Signale [285, 286],
- 2.) Zytokinkonzentrationen, die eine optimale Zellproliferation gewährleisten, korrelieren mit denen für eine optimale Tyrosinphosphorylierung nötigen Zytokinkonzentrationen [287]

- 3.) Nodiumorthovanadate,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , ein Tyrosinphosphatase-Hemmer steigert die zytokinvermittelte Tyrosinphosphorylierung und Zellproliferation [288, 289],
- 4.) Überexpression von Tyrosinphosphatasen, wie z.B. HCP (Hämatopoetische Zellphosphatase) hemmt die IL-3 induzierte Zellproliferation durch Dephosphorylierung des IL-3 Rezeptors [290],
- 5.) Inhibitoren von Tyrosinkinase hemmen die proliferative Antwort und Akkumulation von ras-GTP in Zellen, deren Ras Aktivität und somit Proliferation durch IL-3 und GM-CSF stimuliert wird [291] und
- 6.) Rezeptoren, wie der Epo Rezeptor, verlieren nach Trunkation eines C-terminalen Teiles die Fähigkeit mitogene Signale und Tyrosinphosphorylierung nach Epo-Stimulation zu übermitteln [151].

Tyrosinphosphorylierung spielt eine bedeutende Rolle in der Übermittlung von proliferativen Signalen. Das Wechselspiel zwischen Tyrosinkinase und Tyrosinphosphatasen scheint dabei eine bedeutende Rolle zu spielen. Dies wird deutlich bei der Betrachtung der stetig wachsenden Zahl der entdeckten Gene, die diese Enzyme kodieren. Mittlerweile sind in humanen Genomen mehr als 2000 Gene für Tyrosinkinase und mehr als 1000 Gene für Tyrosinphosphatasen bekannt.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ist ein Phosphatasehemmer und hemmt neben Rezeptor-Tyrosin- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinphosphatasen auch Phosphatasen, die speziell im Zellzyklus wirksam sind [292].

Wir versuchten in den Experimenten, gezeigt in Abb.3.1.4, durch IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung und Zellproliferation zu untersuchen. Dafür wurden B-9 Zellen mit unterschiedlichen IL-6 Konzentrationen inkubiert und zusätzlich mit dem Tyrosinphosphatasehemmer,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , inkubiert. Nach 72 Stunden Inkubation fanden wir, dass durch Hemmung von Tyrosinphosphatasen die Proliferation der Zellen gesteigert werden konnte, was höchstwahrscheinlich auf die gesteigerte Tyrosinphosphorylierung im Zellsystem zurückgeführt werden kann (Abb.3.1.4.A). Die Wirkung von Phosphatasen darf aber nicht als konstitutive Gegenregulation der Kinasen verstanden werden. Vielmehr werden Phosphatasen nur unter bestimmten Voraussetzungen in der Zelle aktiv und wirken dann weit über ihren basalen Aktivitätslevel hinaus. Ein Beispiel: die Phosphatase SH-PTP1 wird erst nach Stimulation des Erythropoetinrezeptors aktiv und dephosphoryliert Jak2, nach Bindung durch seine SH2-Domäne an den EpoR. Daraufhin vermindert sich die Autophosphorylierung von Jak2 und proliferative Signale werden unterbrochen [153]. Es ist anzunehmen, dass die Regulation der Phosphatasen individuell ist und auch diese Enzyme im sensiblen Netzwerk der Zytokin induzierten Signaltransduktion mehreren Regulationsmechanismen unterlegen sind. Die Zunahme der B-9 Zellproliferation unter  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  war am deutlichsten für die Zellsuspension mit einer für Wachstum suboptimalen IL-6 Konzentration, Abb.3.1.4.A. Höhere IL-6 Konzentrationen führen zu stärke Tyrosinphosphorylierung in diesen Zellen

(Abb.3.1.3). Eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung durch Hemmung der Tyrosinphosphatasen durch  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  wurde in dem Experiment von 3.1.4, z.B. durch Western Blotting, nicht bestätigt. Dies kann aber angenommen werden, da eine Zunahme der B-9 Zellproliferation unter  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  am deutlichsten für die Zellsuspension mit einer für Wachstum suboptimalen IL-6 Konzentration war (0,01ngIL-6/ml), Abb.3.1.4.A. Dies könnte bedeuten, dass die durch Phosphatasehemmung intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung vergleichbar ist mit einer Tyrosinphosphorylierung, die mit für die Proliferation optimale IL-6 Konzentrationen in der Zelle erzielt wird (10ngIL-6/ml Medium). Ob Stimulation der Zellen mit höheren IL-6 Konzentrationen unter der Zugabe von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zu vermehrter intrazellulärer Tyrosinphosphorylierung führt, wurde hier leider nicht gezeigt. Wenn dies der Fall wäre, könnte der mangelnde ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbau der Zellen unter solchen Bedingungen durch einen toxischen Effekt, ausgelöst durch unphysiologisch hohe Proliferationsstimuli, erklärt werden. Zum einen wäre hier natürlich die Zellzahl von lebenden und toten Zellen hilfreich, was man einfach durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau erreicht werden könnte. Geringer ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbau wäre dann eventuell durch gesteigerten Zelltod erklärbar.

Strenggenommen darf die Menge des ( $^3\text{H}$ )Thymidineinbaus nicht als alleiniger Proliferationsparameter gesehen werden, da z.B. auch Zellen, die sich nicht teilen, ( $^3\text{H}$ )Thymidin einbauen. Darüber hinaus konkurriert an Tritium ( $^3\text{H}$ ), „heisses“ Thymidin mit „kaltem“, ungebundenem Thymidin von sterbenden Zellen, um den Einbau in replizierende DNA. Deswegen wäre es ratsam Proliferationsmessungen durch Zellzählung von lebenden Zellen und Messung von abgestorbenen Zellen, zu unterstützen.

Darüberhinaus wäre es auch interessant gewesen zu zeigen, ob die durch IL-6 und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  induzierte Proliferationssteigerung durch Zugabe eines Src Kinaseinhibitors, z.B. PP1 oder PP2, gehemmt werden kann. Schäffer et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass durch IL-6 induzierte Proliferation durch Src-Kinase Inhibitoren, hemmbar ist und konnten so die Verbindung zwischen IL-6 induzierten Src-Kinasen und Proliferation in Myelomzellen herstellen [284].

#### **4.1.8 Nachweis von Genexpression durch Untersuchung von RNA**

Will man über die molekulare Anatomie hinaus die Funktion von Genen untersuchen, so benötigt man Informationen über die Art und Menge der gebildeten RNA in bestimmten Geweben. Dies gelingt durch Analyse von aufgereinigter, gesamter zellulärer oder poly(A) RNA aus dem gewünschten Gewebe, mit anschließender Auftrennung in einem Polyacrylamid-oder Agarosegel und Fixierung der RNA auf einer mechanisch stabilen Membran. Das zu untersuchende Transkript wird dann durch Hybridisierung sichtbar gemacht. Hybridisierung wird durch Bindung eines komplementären Makromoleküls an RNA erreicht, um das Vorhandensein einer gesuchten Sequenz oder Expression eines Genes zu bestätigen. Diese Methode wird auch Northernblotting genannt. Eine Alternative zu eben beschriebener

Methode findet man in dem RNase-Protektionsassay, bei welchem die RNA vor der Auftrennung im Gel mit der gesuchten komplementären Sequenz hybridisiert wird, welche mit Radionuklidmarkierten markiert wurde. Im Anschluss daran wird die ungebundene RNA mit RNase (Ribonuklease) verdaut. Da die hybridisierte RNA jedoch vor dem Verdau geschützt ist, wird in Theorie nur ungebundene oder durch unspezifische Hybridisierung gebundene RNA verdaut. Um RNA quantitativ nachzuweisen, z.B. im Sinne von Expressionsmustern nach Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren (siehe 3.2.10), ist der RNase-Protektionsassay dem Northernblot überlegen, da wie oben erwähnt, nur die Bindung von exakt komplementärer Probe vor dem Verdau von RNase schützt und somit das Ausmass von unspezifischen Bindungen auf ein Minimum begrenzt wird.

Die Schwierigkeit im Arbeiten mit RNA liegt ganz klar in der Gefahr der Kontamination der RNA-Probe mit RNase, welche RNA rapide degradiert. RNase ist zum einem extrem hitzestabil und zum anderen überall in einem Labor zu finden. Darüber hinaus benötigen RNasen keine Kofaktoren um aktiv zu werden, ganz im Gegensatz zu DNAsen (Desoxyribonukleasen), für die Metallionen essentiell sind um aktiviert zu werden. Aus diesen Gründen ist es notwendig Lösungen zu autoklavieren, Laborhandschuhe zu tragen (um vor bakteriellen RNasen zu schützen). Darüber hinaus empfiehlt sich der Gebrauch von DEPC-Wasser (DiethylenePyrocarbonate), welches durch Autoklavieren zu  $\text{CO}_2$  und Äthanol wird und somit RNasen zerstört.

Trotz all dieser Schwierigkeiten ist der Nachweis von Genexpression durch RNA Analyse genauer als durch Proteinanalyse. Der quantitative Nachweis von Genexpression durch Anfärbung von Proteinen durch Westernblotting ist ungenauer, 1.) die Separation in einem Polyacrylamidgel limitiert ist und somit eine klare Mengenbestimmung nur semiquantitativ sein kann; 2.) unspezifische Bindungen des verwendeten Antikörpers sind ein Problem, vor allem wenn der Antikörper polyklonaler Natur ist.

## **4.2 IL-6 und Epo induzieren Phosphorylierung, Aktivierung und Interaktionen von Proteinen im Ras-Signalweg**

### **4.2.1 Der Shc-Grb2-Komplex verbindet Wachstumsfaktorrezeptoren mit dem Ras-Signalweg**

#### 4.2.1.1 Aktivierung des Shc-Grb2-Komplexes

Shc ist als Adapterprotein an der Übertragung von Signalen im Ras-Signalweg beteiligt, siehe dazu auch 1.3.5.1. Nach Komplexbildung mit Grb2 binden die Proteine entweder an Rezeptoren oder direkt an Sos. Sos kann somit zu Ras an die Zellmembran wandern und den Ras-Signalweg weiter aktivieren. Die Interaktion zwischen Grb2 und Sos scheint von der Bindung von Shc an Grb2 abzuhängen. Ravichandran et al. untersuchten dies im T-Zell-

Rezeptor-System. Sie blockierten durch korrespondierende Phosphopeptide den Tyr-317 Rest an Shc (für die Bindung mit Grb2 verantwortlich) und konnten feststellen, dass dadurch keine Assoziation mehr zwischen Grb2 und Sos stattfand. Darüber hinaus gelang es ihnen durch Injektion von phosphorylierten Shc in nicht aktivierte T-Zellen die Assoziation von Grb2 und Sos zu steigern. Dadurch wird die Bedeutung der durch die Phosphorylierung von Shc kontrollierten Assoziation von Grb2 und Sos in Bezug auf eine Aktivierung des Ras-Signalweges deutlich [293].

IL-6 induziert die Tyrosinphosphorylierung von p52Shc und p66Shc in zwei der untersuchten Myelomzelllinien (B-9- und LP-1-Zellen) wie in Abb.3.1.7.B gezeigt werden konnte. Spezifiziert wurde dieses Ergebnis durch die Demonstration von Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit dieser Tyrosinphosphorylierung von IL-6 (Abb.3.1.8. A und B). Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von p52Shc durch IL-6 gelang kürzlich auch durch Kumar et al. in der AF-10-Zelllinie. Darüber hinaus konnte die Gruppe auch die durch IL-6-Stimulation induzierte Assoziation von Shc und Grb2 mit nachfolgender Bindung an gp130 demonstrieren [225]. In einer weiteren Studie gelang es Boulton et al. durch die Stimulation der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 des CNTF-, LIF-, IL-6- und OSM-Rezeptors nach IL-6-Stimulation eine Reihe von tyrosinphosphorylierten Proteinen zu identifizieren. Unter diesen Proteinen befanden sich auch p46Shc und p52Shc [294]. Welche Rolle die Aktivierung einzelner Shc Isoformen spielt ist bis heute nicht vollkommen geklärt.

Wir konnten hier demonstrieren, dass die Assoziation von Shc und Grb2 von der Stimulation des IL-6 Rezeptors beeinflusst wird. Der Aktivierung von Shc durch IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung (Abb.3.1.7.A), folgte die Assoziation mit Grb2 (Abb.3.1.9.A). Eine deutliche Zunahme dieser Assoziation geschieht nach Stimulation der Zellen mit IL-6, da höchstwahrscheinlich die daraus resultierende gesteigerte Tyrosinphosphorylierung von Shc Grb2 Proteinen die Möglichkeit bietet durch ihre SH2-Domäne an Shc binden zu können und somit den IL-6 Rezeptor an den Ras-Signalweg zu koppeln, siehe Abb.3.1.9.A, linker Abschnitt.

Die Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung von Shc durch Stimulation von Zellen mit Epo ist durch viele Gruppen bestätigt worden [229, 295-297]. Miura et al. zeigten in 32D-Zellen, dass die Stimulation der Zellen mit Epo zur Tyrosinphosphorylierung einer Reihe von zellulären Proteinen führte einschliesslich der beiden Isoformen p46Shc und p52Shc. Die Gruppe demonstrierte auch die Epo-abhängige Assoziation von Shc mit Grb2 [297].

#### 4.2.1.2 Koppelung von Shc-Grb2 mit Wachstumsfaktorrezeptoren

Die Komplexbildung des EGF-Rezeptors mit Grb2 und Sos ist abhängig von der Stimulation des EGF-Rezeptors. Buday et al. demonstrierten dies zum einen durch Ko-Immunpräzipitationsversuche in denen sie zeigten, dass die Assoziation der genannten Proteine von der durch EGF induzierten Tyrosinphosphorylierung in der Zelle abhängt.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Hemmung der Komplexbildung durch ein Peptid, welches den Tyrosinrest 1068 am EGF Rezeptor blockiert [203]. Y1068 ist ein Tyrosinrest in der Rezeptor-Tyrosinkinase, welcher nach EGF Stimulation autophosphoryliert wird und für die Kinaseaktivität, zusammen mit zwei weiteren C-terminalen Tyrosinresten im EGF Rezeptor wichtig ist [298].

Dieses Ergebnis wirft natürlich weitere Fragen auf. Wie ist die Verbindung von dem Komplex Shc-Grb-Sos zum IL-6 Rezeptor? Sind in der Verbindung zum Rezeptor noch weitere Proteine beteiligt? Wenn ja, sind diese Bindungspartner nur für die Übermittlung proliferativer Signale verantwortlich? Welche der Adapterproteine binden an den Rezeptor? Für eine Reihe von Rezeptorsystemen sind diese Fragen zum Teil schon in grösserem Detail beantwortet worden. Ein dabei wichtiger Punkt ist vor allem, dass der IL-6- und auch der Epo-Rezeptor nicht wie der EGF Rezeptor über eine eigene Kinasedomäne verfügt. Das kann, muss aber nicht einen Unterschied machen, bedenkt man, dass die Bindung eines Adapterproteins unabhängig von phosphorylierten Tyrosinresten stattfinden kann. So gibt es für Grb2 Beispiele der direkten Assoziation mit Rezeptoren die, wie im Falle des EGF-Rezeptors, eine Kinasedomäne besitzen oder wie im Falle des G-CSF-Rezeptors, keine Kinasedomäne besitzen. Grb2 bindet direkt durch seine SH2-Domäne an zwei Tyrosinreste des EGF-Rezeptors, der oben erwähnte Y1068 und an einen weiteren Y1086. Grb2 bindet aber auch indirekt über Shc an den EGF Rezeptor. Shc assoziiert durch seine SH2-Domäne an den Y1148, welcher eine Rolle in der Kinaseaktivität des EGF Rezeptors spielt und autophosphoryliert wird [298, 299]. Unklar bleibt, warum ein Adapterprotein mehrere Male an einen Rezeptor bindet. Vielleicht erfüllt jede Assoziation eine eigene Aufgabe.

Grb2 bindet auch direkt an den G-CSF Rezeptor. Nach Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden konnten Ward et al. zeigen, dass sowohl Grb2, Shc und SH-PTP2 mit ihrer SH2-Domäne direkt an den Rezeptor und Grb2 indirekt über Shc an den Rezeptor binden [300]. Interessanterweise entspricht dieses Ergebnis nicht den vorausgesagten potentiellen Bindungsmotiven der SH2-Domänen von Grb2 und Shc. Voraussagungen dieser Art werden durch Testen von Phosphopeptid Datenbanken gemacht, in denen die Affinität verschiedener Peptide bestimmt werden und somit bevorzugte Bindungsmotive vorausgesagt werden können. Songyang et al. bestätigten so das Bindungsmotiv von Grb2 mit Shc und dem EGF Rezeptor und voraussagten die Assoziation von Grb2 mit dem Insulinrezeptor, IGF-1 Rezeptor, IL-7R um nur einige Beispiele zu nennen [301]. Sowohl der IL-6 Rezeptor, wie auch der Epo Rezeptor bieten keine der so gefundenen Bindungsmotive. Trotzdem gibt es Hinweise, dass Shc direkt an Tyrosinrest 401 mit dem Epo-Rezeptor assoziiert, der mit dem Motiv Y<sup>T</sup>IL dem vorausgesagten Motiv Y(I/E/Y)XL zumindest in zwei AS gleicht [297, 302]. Datenbanken wie diese unterscheiden sich aber auch in der Auswahl ihrer Bindungsmotive. So legen sich solche Experimente nicht ausschliesslich auf ein Bindungsmotiv fest, sondern weisen eher auf mehrere potentielle Bindungsmotive hin. Potentielle Bindungsmotive existieren auch für die SH2-Domäne von Shc. Einige Beispiele haben sich schon

experimentell nachweisen lassen, wie die Assoziation von Shc und dem Proteinprodukt des MT [236], siehe dazu auch 1.3.5.1.

Es bleibt also noch völlig offen, ob Shc oder Grb2 direkt an den IL-6-Rezeptor binden. Hinweise auf die Verbindung des Komplexes zum Ras-Signalweg gibt es aber wie schon erwähnt einige.

He et al. konnten die Assoziation von der Shc-SH2-Domäne mit Jak2 abhängig von der Stimulation mit Epo demonstrieren. Darüber hinaus konnte die Gruppe keine Aktivierung von Shc durch eine C-terminale EpoR Deletionsmutante zeigen, welche keine zytoplasmatischen Tyrosinreste, aber noch die Jak2 Assoziationsseite enthält [296]. Die Assoziation von Shc und Jak2 scheint somit abhängig von der Shc Aktivierung durch den phosphorylierten EpoR zu sein. Shc könnte so die Verbindung zwischen den Janus-Kinasen und dem Ras-Signalweg sein. Interessanterweise wurde Ähnliches auch für das IL-6-Rezeptorsystem beschrieben, wobei hier die Assoziation von Jak2 und Shc anderer Natur war. Giordano et al. konnten zeigen, dass Shc mit seiner SH2-Domäne gp130 bindet und darüber hinaus durch seinen C-terminale Teil mit Jak2 assoziiert. Beide Interaktionen sind abhängig von der Stimulation mit IL-6. In diesem Zellsystem konnte aber auch die Assoziation von Shc mit Grb2 gezeigt werden, was die Janus-Kinasen wiederum mit dem Ras-Signalweg in Verbindung bringen würde [303]. Die von Giordano et al. demonstrierte direkte Bindung von Shc an gp130 unterstützt die These, dass Fyn oder Hck mit dem IL-6 Rezeptor assoziieren könnte. Diese Assoziation könnte sehr wohl indirekter Natur sein über Shc, da Shc und Grb2 mit den Src-Kinasen Hck und Fyn in Verbindung zu stehen scheinen (Abb.3.1.10.A-D).

#### 4.2.1.3 Der Shc-Grb2-Komplex in weiteren Signalwegen

So koppelt Grb2 Wachstumsfaktorrezeptoren zum Ras Weg. Für Grb2 gibt es aber noch weitere Beispiele, in denen das Protein mit anderen Enzymen assoziiert, deren klare Verbindung zum Ras Weg noch nicht eindeutig ist. So konnten Wang et al. im Yeast-Two-Hybrid-System die Assoziation von Grb2 mit der p85 Untereinheit von PI3K nachweisen, ohne dabei diese Verbindung spezifisch für ein Rezeptorsystem zu definieren [304]. Im gleichen Jahr fanden Fukazawa et al. dass, die Interaktion von Grb2 mit PI3K auch im T-Zell Rezeptorsystem stattfindet. Dieser Proteinkomplex besteht aus Grb2, PI3K, dem Onkogenprodukt *c-cbl* und der Src-Kinase Fyn und ist vermehrt nach TCR Stimulation vorzufinden [305]. Die Bedeutung dieser Interaktion ist noch unklar. Hinweise jedoch gibt es für eine, von MAPK unabhängige, Signalübermittlung von Proliferationssignalen über PI3K durch IGF-I Stimulation. Dufourney et al. versuchten proliferative Signale in Zellen eines Mammakarzinoms stimuliert mit IGF-I durch Zugabe eines spezifischen MAPK-Inhibitors zu inhibieren. Sowohl die durch IGF-I ausgelöste Rb-Hyperphosphorylierung, als auch die Cyclin D1-Synthese, DNA-Synthese und das Fortschreiten des Zellzyklus konnten erst durch einen spezifischen Inhibitor der PI3K gehemmt werden, was die Rolle von PI3K in Vermittlung von proliferativen Signalen unabhängig von MAPK, verstärkt [306]. Jedoch finden sich viele

Studien, in welchen MAP-Kinasen proliferative Signale in *ras*- und *src* transformierten Zellen übermitteln. In der Studie von Cowley et al. wurde demonstriert, dass MAPKK1 (MEK1) Mutanten, welche die Kinase inaktivieren, in *ras*- und *src* transformierten Zellen die Transformation der Zellen durch Inhibition der DNA-Synthese aufhalten [307]. Es scheint demnach, dass proliferative Signale von verschiedenen Signalwegen übermittelt werden, welche durch bestimmte Signalmoleküle, wie z.B. Shc oder Grb2 vernetzt sind.

### **4.3 IL-6 und Epo aktivieren Tyrosinkinasen und -Phosphatasen**

Die Aktivierung von Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine und Rezeptoruntereinheiten durch Wachstumsfaktoren konnte in vielen Studien nachgewiesen werden [31, 42, 162, 165, 168, 183, 258, 261, 268, 308-313].

#### **4.3.1 Durch IL-6 aktivierte Tyrosinkinasen und -Phosphatasen**

Auch IL-6 aktiviert eine Reihe von Tyrosinkinasen und -Phosphatasen. Zu den best charakterisierten in der Signaltransduktion von gp130, gehören die Mitglieder der Janus-Kinasen [41, 42, 294]. Stahl et al. fanden, dass Jak1 und Jak2 in der U226- und in EW-1-Zelllinie konstitutiv mit gp130 und der  $\beta$ -Kette des LIF Rezeptors assoziieren und durch CNTF, OSM, LIF und IL-6 aktivierbar sind [41]. Boulton et al. versuchten mehrere durch CNTF, OSM, LIF und IL-6 tyrosinphosphorylierte Proteine zu identifizieren. Neben Aktivierung der Janus-Kinasen fanden sie auch eine Aktivierung von PLC $\gamma$ , von der katalytischen Untereinheit von PI3K (p110), SH-PTP2 und den MAP-Kinasen ERK1 and 2 [294]. Wie unter 4.2.1.3 aufgeführt wurde, ist PI3K in der Übermittlung von Transformationssignalen in Mammakarzinom-Zellen involviert. Darüber hinaus fanden Chang et al., dass das Genom des Avian Sarkoma Virus, ein Retrovirus, welches Hämangiosarkom in Hühnern induziert, für die katalytische Untereinheit p110 der PI3K kodiert. Durch *v-pi3k* transformierte Hühner Fibroblasten zeigten eine höhere Aktivität in Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat, Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat und Aktivierung von Akt [314]. Akt ist ein Proto-Onkogen, welches das Anti-Apoptose Bcl2-Familienmitglied BAD phosphoryliert [315]. PLC ist eine Phosphodiesterase, welche Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat zu Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat und Diacylglycerol umwandelt. Diese beiden "second messenger" aktivieren daraufhin die Serin/Threonin spezifische Proteinkinase C und steigern die intrazelluläre Kalzium Konzentration [316]. PLC $\gamma$  scheint von PI3K reguliert zu werden [317]. Die in Abb.3.1.1. gezeigte Zunahme der tyrosinphosphorylierten Proteine durch IL-6 stimulierten Myelomzellen, zeigen durchaus Molekulargewichte die ähnlich den hier aufgeführten Proteinen sind. Die tyrosinphosphorylierte Bande um 130 kDa könnten die Janus-Kinasen, gp130 und die etwas schwerere PLC $\gamma$  enthalten. Die Banden um 65-70 kDa



könnten der Phosphatase SH-PTP2 (Syp) entsprechen. Diese Phosphatase assoziiert mit den Janus-Kinasen, Grb2, PI3K und Mitgliedern der Src-Kinasen, welche sie am C-terminalen Ende dephosphoryliert und somit zu deren Aktivierung beitragen [318-320]. Kim et al. konnten zeigen, dass SH-PTP2 an den zweiten zytoplasmatische Tyrosinrest in gp130 bindet und Darüber hinaus die Aktivität der assoziierenden Janus-Kinasen negativ reguliert, was auch die DNA Bindungsaktivität von Stat1 und Stat3 beeinflusst [321]. Weitere tyrosinphosphorylierte Banden im Molekularbereich 65 oder 80 kDa in Abb.3.1.1. könnten der durch IL-6 induzierte Tyrosinphosphorylierung von p66 Tec und p77 Btk entsprechen. Beide Kinasen sind wichtig für die Hämatopoese. Die Btk Tyrosinkinase wurde als das Genprodukt der X-Chromosom vererbten Agammaglobulinämie (XLA) und der humanen X-Chromosom vererbten Immundefizienz (XID) identifiziert. Die Tec-Tyrosinkinase wird während der Hämatopoese expremiert. Beide Kinasen assoziieren unabhängig von der Stimulation durch IL-6 mit gp130 [322].

IL-6 und OSM stimulieren auch die Aktivität der MAP-Kinasen. IL-6 stimuliert konzentrationsabhängig die Aktivierung von ERK1 und 2 in der B-Zelllinie AF-10 und ERK-2 in der B-Zelllinie SKW6.4 [323]. OSM, aber nicht IL-6 oder LIF, stimulierte in einer Kaposi Sarkom Zelllinie ERK-2. Die Proliferation und Aktivierung dieser Zellen durch OSM konnte durch Inhibitoren von ERK-2 negativ beeinflusst werden, was auf eine Rolle der MAPK in Übermittlung von proliferativen Signalen in diesen Zellen hinweist [324]. Auch sind tyrosinphosphorylierte Banden in Höhe 45 kDa in der mit IL-6 stimulierten B-9 und LP-1 (Abb.3.1.1) zu erkennen, welche darauf hinweisen könnte, dass IL-6 auch in diesen Zelllinien die Tyrosinphosphorylierung der MAPK induziert.

#### **4.3.2 Durch Epo aktivierte Tyrosinkinasen und -Phosphatasen**

Für den Epo-Rezeptor gilt wie auch für den IL-6-Rezeptor, dass die Janus-Kinasen die best charakterisiertesten NRTK sind. Wie oben erwähnt assoziiert Jak2 mit dem EpoR. Diese Assoziation ist unabhängig von der Epo-Bindung an den Rezeptor [325]. Die Assoziation und Aktivierung von Jak2 durch Epo benötigt Box1 und Regionen von Box2 des EpoR [50, 154]. SH-PTP1 assoziiert nach Epo-Stimulation durch seine SH2-Domäne an Tyrosinreste 429 des EpoR und führt zur Dephosphorylierung von Jak2. Darüber hinaus fanden Klingmüller et al., dass in 32D-Zellen, welche mit einer EpoR-Mutante (Y429A,Y431A), die SH-PTP1-Bindung verhindert, hypersensitiv auf Epo reagieren. Die Zellen brauchten weniger Epo per ml um die gleiche Proliferationsrate zu erreichen als Zellen, die mit dem Wildtyp Rezeptor transfiziert waren. Dies wies daraufhin, dass SH-PTP1 Aufgaben in der Regulation der Proliferation hat [153]. SH-PTP1 scheint die Hämoglobinproduktion in SKT6-Zellen negativ zu beeinflussen. Durch Hemmung der SH-PTP1-Expression durch Anti-Sense Oligonukleotide war die Hämoglobinexpression in diesen Zellen vermehrt. Darüber hinaus zeigte die Gruppe, dass Überexpression dieser Phosphatase zu verminderten Hb-

Expression und Stat5 Aktivierung führt [326]. Als weitere Phosphatase assoziiert auch SH-PTP2 (Syp) durch seine SH2-Domäne an den gleichen Tyrosinrest wie SH-PTP1 mit dem EpoR und wird *in vitro* durch Jak2 Epo-abhängig am C-terminalen Ende tyrosinphosphoryliert [327]. Die Aufgabe von SH-PTP2 ist von Shi et al. in "Gen Knockout" Studien untersucht worden. Diese Resultate sind interessant, da die Phosphatase abhängig vom Signalweg unterschiedliche Aufgaben zu haben scheint. So war die Aktivierung der ERK-Familie in diesen SH-PTP2-/- Zellen nach IGF- oder PDGF-Stimulation stark beeinträchtigt oder sogar gehemmt. Die MAPK-Aktivierung durch Jun-Kinasen in diesen Zellen war jedoch, verglichen mit dem Wildtyp, nach Behandlung der Zellen mit Hitzeschock vermehrt. Diese Phosphatase scheint also abhängig vom Signalweg unterschiedliche mitogene Aufgaben zu erfüllen [328]. Die genaue Aufgabe von Jak2 im Epo-System ist noch unklar. Durch Anti-sense Oligonukleotide gegen Jak2 konnten Bittdorf et al. in HCD57-Zellen zeigen, dass sich die DNA-Bindung von Stat5 und auch die Aktivierung der MAPK-Aktivität reduzierte [329]. Ergebnisse dieser Art deuten daraufhin, wie vernetzt die zellulären Signalwege sind. Jak2 steht am Anfang einiger Signalwege und wird wahrscheinlich je nach Bedarf für den einen oder anderen benutzt. Ein Beispiel für dieses "Doppelleben" stellt auch die oben beschriebene Phosphatase SH-PTP2 dar.

In Abb.3.2.1.A wird die Tyrosinphosphorylierung der UT-7-Zellen durch Epo-Stimulation gezeigt. Unter der grossen Anzahl von phosphorylierten Proteinen finden sich Banden im Bereich der genannten Enzyme. Im Bereich 130 kDa befindet sich wahrscheinlich Jak2, wie durch Blotten mit einem Anti-Jak2 Antikörper in 3.1.2.B gezeigt wird. Im Bereich um die 65-75 kDa, finden sich der Epo Rezeptor, was durch Blotten mit Anti-EpoR Antikörper in Abb.3.2.2.B mittlerer Abschnitt gezeigt wurde. In dem gleichen Molekularbereich migrieren auch wahrscheinlich p65 SH-PTP1, p64 SH-PTP2 und p72 Syk. Die Banden um die 90 kDa könnten eventuell die tyrosinphosphorylierten p92-95 STAT5 repräsentieren.

Wie auch IL-6, aktiviert Epo Kinasen wie PI3K, PLC $\gamma$ , Fps/Fes. Wobei für PI3K auch die Assoziation mit dem Rezeptor beschrieben worden ist [330-332]. Die Aktivierung von PLC $\gamma$  durch Epo wurde in UT-7 gezeigt, was daraufhin weisen könnte, dass die tyrosinphosphorylierte Bande in 3.2.1 um die 135-140 kDa PLC $\gamma$  enthält. Die Aktivierung wurde durch Anhäufung von Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat in dieser Zelllinie nach Epo-Stimulation bestätigt [316]. Epo stimuliert so die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat und mobilisiert so Kalzium aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma.

Epo stimuliert wie oben erwähnt die MAP-Kinasen. Gezeigt wurde dies unter anderem von Miura et al.. In dieser Studie wurde eine Epo Rezeptormutante verwendet, welche die letzten 108 AS vermisst und trotzdem mitogene Signale vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die letzten 108 AS im C-terminalen Teil des EpoR für die Phosphorylierung von Shc und Aktivierung von MAPK nötig zu sind, da beide Proteine deutlich verminderte

Tyrosinphosphorylierung zeigten [297]. In der Abb.3.2.1 sind vor allem in dem Molekularbereich der MAPK (40-60 kDa) die Banden von konstitutiv phosphorylierten Proteinen überlagert, welche wahrscheinlich zu Mitgliedern der Src-Kinasen gehören, was für p53/56 Lyn in Abb.3.2.1.B durch das Blotting der Membran mit dem Anti-Lyn Antikörper gezeigt werden konnte. Die beiden Isoformen entsprechen den konstitutiv an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen in diesem Bereich (Abb.3.2.1.A).

### **4.3.3 Aktivierung der Src-Kinasen durch IL-6 und Epo**

Die Rolle der Src-Kinasen als Rezeptorassoziiierende Kinasen ist intensiv untersucht worden. Lyn, Fyn, Blk, Lck, Hck, Yes, Fgr und Src spielen eine wichtige Rolle in den Signalen der B-Zell-, T-Zell und Fc-Rezeptoren. Sie vermitteln Signale wie Aktivierung, Degranulation, Zytotoxizität und Phagozytose. Darüber hinaus ist ihre Aktivierung, in manchen Fällen auch Rezeptorassoziation durch Zytokine wie IL-2, IL-3, CSF, GM-CSF, PDGF und LIF bekannt [168, 182, 259, 260, 268, 313, 333].

Durch die hier gezeigten Ergebnisse lassen sich zwei weitere Zytokine in die Gruppe der die Src-Kinasen stimulierende HGF's einreihen: IL-6 und Epo. IL-6 stimuliert die Tyrosinphosphorylierung (Abb.3.1.5.B) und Aktivierung (Abb.3.1.5.A und 3.1.11.A) von den Src-Kinasen Fyn, Hck und schwächer Lyn, in den Myelomzellen B-9 und LP-1. Epo aktiviert die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fyn in der UT-7 Zelllinie (Abb.3.2.2.A und B) und Lyn in der Ba/F3/C5 Zelllinie (3.2.7.A).

Während diese Arbeit entstand, wurden die hier gezeigten Ergebnisse zum Teil von anderen Gruppen bestätigt. So konnten Ernst et al. die Aktivierung von p56 und p59 Hck durch die gp130 Einheit des LIFR nach LIF-Stimulation in murinen embryonalen Stammzellen zeigen [260]. Darüber hinaus demonstrierte die Gruppe auch die Assoziation von Hck mit gp130, siehe dazu 4.4.4. Auch in dieser Arbeit gelang, wie in Abb.3.1.5.A und 3.1.11.A zu sehen ist, die Aktivierung beider Isoformen der Kinase durch IL-6. Schieven et al. fanden, dass in humanen Endothelzellen OSM die Aktivität von der Src-Kinase p62Yes stark, von p59Fyn etwas und gar nicht von p56Lyn induziert. Dieses Aktivierungsmuster konnte durch einen Tyrosinkinaseinhibitor Herbimycin A geblockt werden [334]. Vier Jahre später demonstrierten dann Fuhrer et al., dass Mitglieder der Src-Kinasen durch IL-11 und somit gp130 aktiviert werden. p62Yes und p60Src zeigten Aktivierung nach IL-11-Stimulation im Gegensatz zu p59Fyn, was auch in den murinen 3T3-L1 Präadipozyten exprimiert wurde aber nicht aktiviert wurde. Darüber hinaus führte die Aktivierung von p62Yes zu einer Assoziation der Kinase mit PI3K und deren Aktivierung. Die Bedeutung dieser Interaktion wurde in dieser Arbeit nicht untersucht [335].

Nachdem unsere Experimente für die Aktivierung der Src-Kinasen durch Epo abgeschlossen waren, bestätigten Tilbrook et al., dass Lyn durch Epo aktiviert wird. Darüber hinaus bestätigte die Gruppe die Assoziation des EpoR mit Lyn im Yeast-Two-Hybrid-System und fanden eine Bedeutung von Lyn in der Differenzierung erythroider Zellen. Auch dieses Ergebnis wurde parallel zu unserer Arbeit gefunden [336], auf was ich später noch eingehen werde.

## 4.4. Die Funktion der Src-Kinasen

### 4.4.1 Regulation der Src-Kinasen: inter- oder intramolekular?

Die Regulation der Src-Kinasen ist ausführlich unter 1.3.4.1.2 beschrieben worden. Durch Strukturdaten, gewonnen durch Kristallisation der Kinasen Hck und Src und die SH3-Domäne von Hck mit HIV-1 Nef, ist viel neue Information über die Regulation der Kinasen zugänglich geworden [174, 177, 337]. Dennoch ist unklar welche genauen Mechanismen nach Stimulation eines Zytokinrezeptors stattfinden um die Src-Kinasen zu aktivieren. Viele Fragen bleiben noch offen, z.B.: wie wird die Kinase-Domäne zugänglicher gemacht? Wird erst das C-terminale Phosphat durch eine Phosphatase entfernt um sich dann von der SH2-Domäne zu entfernen? Oder ist *in vivo* dieser Vorgang unterstützt von einem mit der SH2-Domäne in Konkurrenz tretendes Protein? Welche Proteine treten mit der SH3-Domäne in Konkurrenz um den Öffnungsprozess voranzutreiben? Wenn es dafür Bindungspartner mit unterschiedlicher Affinität gibt, ist die Auswahl dieser abhängig vom Signalweg? Wovon hängt die Autophosphorylierung in der Kinasedomäne ab?

Für das PDGF Rezeptorsystem hat sich ein Modell entwickelt, indem postuliert wird, dass nach Phosphorylierung des Rezeptors durch seine eigene Kinasedomäne, die SH2-Domäne von Src, Fyn und Yes binden kann [338]. Die Kinasedomäne wird dann wahrscheinlich durch Loslösung des C-terminalen Restes geöffnet. Ob dieser Rest aber noch phosphoryliert ist und durch die Öffnung des Enzymes einer Phosphatase erst zugänglicher wird oder erst nach Dephosphorylierung durch eine Phosphatase sich von der SH2-Domäne löst, liegt noch im Unklaren. Wie die Src-Kinasen im Detail reguliert werden versuchten Bagrodia et al. herauszufinden indem sie untersuchten wie wichtig die Lokalisation durch die Myristyldomäne von p60Src ist. Die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes Y527 ist in mitogenen Zellen vermindert, was bedeutet, dass die Kinase aktiv ist. In einer nicht-myristylierten Src-Mutante ist diese mitogenspezifische Dephosphorylierung von Y527 und die Kinaseaktivität inhibiert, was darauf hinweist, dass die Lokalisation der Kinasen in ihrer Regulation eine wichtige Rolle spielt [339].

Eine weitere Studie befasste sich mit der Frage ob Mitglieder der Src-Kinasen sich untereinander in ihrer Regulation unterscheiden. Rivero-Lezcano et al. verwendeten zu diesem

Zweck SH2- und SH3-Deletionsmutanten und SH2-Punktmutanten von Fyn und Fgr. Die Punktmutationen der SH2-Domäne wurden nach Daten von Src-Mutationen nachvollzogen. Eine Punktmutation zielte auf ein Tryptophan, welches mutiert zu Glutamat die Transformationsaktivität von Src-Y527F stark vermindert. Als zweite AS wurde ein Histidin zu Arginin oder Leuzin mutiert. Dieses Histidin spielt anscheinend eine grosse Rolle in Erhaltung der Konformation der SH2-Domäne, da diese Mutante die Fähigkeit von Wildtyp Src oder Src Y527F zur Koloniebildung und Wachstum in Softagar vermindert. Die Fyn-Mutanten reagierten in diesen Experimenten ähnlich wie die Src-Mutante. Die Tryptophanmutation führte zu einer 10-fachen Steigerung der Fokus-Bildung verglichen mit Wildtyp Fyn. Fgr dagegen, zeigte durch keine der Mutationen gesteigerte Transformationsfähigkeit. Die Deletion der SH3-Domäne in Fyn hatte einen dramatischen Effekt in Steigerung der Fokus-Formation (21 fach) und Wachstum in Softagar (12 fach) verglichen zum Wildtyp. Deletion der SH3-Domäne steigerte in Fyn die Transformationaktivität um ein Vielfaches. [340]. Diese Daten unterstützten die Individualität der Src-Kinasen und nicht ihre Redundanz. Fgr und Fyn können in gleichen Zellen expremiert gefunden werden, scheinen aber verschiedene Aufgaben in der Zelle zu erfüllen.

Die Regulation der Src-Kinasen ist auch von dem Status ihrer Phosphorylierung abhängig, und wird durch Auto- und Transphosphorylierung von anderen Kinasen oder Dephosphorylierung durch Phosphatasen beeinflusst (siehe dazu auch 1.3.4.1.2). SH-PTP1 und 2 scheinen beide in die Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes der Src-Kinasen involviert zu sein und führen so zu ihrer Aktivierung [320, 341]. Somani et al. konnten zeigen, dass c-Src und SH-PTP1, abhängig von der IL-2 induzierten Tyrosinphosphorylierung durch eine der SH2-Domänen von SH-PTP1 miteinander interagieren. Sie fanden ausserdem, dass von der totalen Proteinmenge in der Zelle nur ein geringer Anteil von Src mit der Phosphatase assoziiert vorliegt. Darüber hinaus zeigten sie, dass die Phosphatase den C-terminalen Tyrosinrest von Src dephosphoryliert und Src somit aktiviert [341]. Lorenz et al. demonstrierten den Effekt von SH-PTP1 fast noch eindrucksvoller. In ihrem System verwendeten sie Zellen der *motheaten (me/me)* Maus, in welchen das SH-PTP1-Gen homozygot deletiert wurde und untersuchten in diesen Zellen die Signaltransduktion des TCR-Systems. Sie konnten zeigen, dass Thymozyten dieser Mäuse nach TCR-Stimulation 3-5 fach hyperproliferieren und an Tyrosinresten, verglichen mit Stimulation der Zellen durch IL-2, hyperphosphoryliert sind. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Lck Kinase ,verglichen zu normalen Thymozyten, gesteigert war und demonstrierten somit die positive Regulation von Lck durch SH-PTP1 [342]. Leider versuchte die Gruppe nicht den genetischen Verlust von SH-PTP1 in diesen Zellen zu rekonstituieren um die Ergebnisse mit denen der normalen Thymozyten zu vergleichen. Src assoziiert darüber hinaus auch mit SH-PTP2, welche dann den C-terminalen Tyrosinrest von Src dephosphoryliert. Darüber hinaus konnte die Gruppe demonstrieren, dass eine Src-Mutante (Y527F) SH-PTP2 phosphoryliert. Beide Proteine scheinen sich somit gegenseitig zu regulieren [320]. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den durch IL-6 und

Epo-Stimulierten Zellen (Abb.3.1.1, 3.2.1 und 3.2.3.A) Banden in dieser Höhe erscheinen und beide Phosphatasen in Verbindung mit den Rezeptoren für Epo und IL-6 assoziiert sind. Darüber hinaus spielen diese Phosphatasen eine Rolle in der Regulation der Janus-Kinasen und den Src-Kinasen und sind somit nahe dem Rezeptor und nahe mit dem Rezeptor interagierenden Proteinen. Die gesteigerte Proliferation (Abb. 3.4.1), in den mit dem Phosphatasehemmer  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorbehandelten und mit IL-6 stimulierten Myelomzelllinie B-9, könnte demnach an der Hemmung dieser Phosphatasen liegen, die sonst die Mitogenese negativ regulieren. Ein weiteres Beispiel sei noch kurz erwähnt, um die Rolle von SH-PTP1 in der Zellproliferation zu bestätigen. Migone et al. fanden, dass in mit HTLV-I infizierten T-Zellen die SH-PTP1 Expression verringert ist und dies mit dem IL-2 unabhängigen Zellwachstum korreliert. In diesen Zellen konnte auch eine konstitutive Aktivierung der Janus-Kinasen gefunden werden [343].

In B-Zellen findet sich noch eine weitere Phosphatase, welche Lyn am C-terminalen Tyrosinrestes dephosphoryliert und aktiviert: CD45, ein 'leukocyte common Antigen'. CD45 gehört zur Familie der transmembranären Protein-Tyrosinphosphatasen und hat ein Molekulargewicht zwischen 180-240 kDa. Sie stellen mit 90% die grösste Gruppe der membrangebundenen Tyrosinphosphatasen in Lymphozyten dar [344]. Yanagi et al. zeigten, dass in B-Zellen, welche nicht CD45 exprimieren, die Lyn Kinase hyperphosphoryliert und seine Aktivität nach B-Zell Rezeptor Aktivierung stark vermindert war [345].

So werden offensichtlich eine Reihe von Phosphatasen in verschiedenen Rezeptorsystemen aktiviert, welche wiederum die Src-Kinasen durch Dephosphorylierung aktivieren. Die Auswahl der jeweiligen Phosphatase scheint abhängig von Zell- und Rezeptorsystem zu sein.

Die negative Regulation der Src-Kinasen wurde unter 1.3.4.1.2 schon erwähnt. 1991 gelang Nada et al. eine Src-Kinasen negativ regulierende Protein Kinase zu klonieren: die 50kDa schwere Protein 'c-src-kinase' oder **Csk**, welche p60 Src an Y527 phosphoryliert und somit inaktiviert [346]. Csk phosphoryliert auch die C-terminalen Tyrosinreste von Fyn, Lyn, Lck und Fgr [172]. Interessanterweise fand Sun et al., dass die Phosphorylierung vom C-terminalen Tyrosinrest an Src durch Csk von zwei Dingen abhängt: das stöchiometrischen Verhältnis der Enzyme von 1:1 und dem zeitlichen Ablauf der Interaktion der beiden Proteine. Die Gruppe inkubierte Src und Yes mit  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  um beide Kinasen zu autophosphorylieren und somit die Kinasenaktivität zu initiieren und zeigten, dass aktives Src und Yes nicht durch Csk phosphoryliert werden konnten. Dies wurde erst möglich gemacht durch Inkubation des aktiven Src und Yes mit der Tyrosin-Phosphatase1B, welche, wie Sun et al. herausfanden Src und Yes an ihren autophosphorylierten Tyrosinresten dephosphorylieren und somit zugänglich machen für Csk [347]. Die Regulation der Src-Kinasen ist demnach ein komplexer Ablauf von Geschehnissen, welche die Aktivierung einer Reihe von Enzymen involviert. In

wie weit IL-6 oder Epo Csk, SH-PTP1 und 2, Tyrosinphosphatase1B, CD-45 oder andere Src-Kinasen regulierende Enzyme aktiviert und reguliert ist noch weitgehend unbekannt.

#### **4.4.2 Die Rolle von Src-Kinasen untersucht in Gen Knockout Modellen**

Im Gegensatz zu humanen Geweben werden im murinen Gewebe nur 8 Src-Kinasen expremiert. Die Kinase Yrk wurde soweit nur in Hühnergewebe gefunden. Src, Fyn, Yes und Lyn werden ubiquitär in der Maus expremiert, wobei die Expression in hematopoetischen und neuralem Gewebe am stärksten zu finden ist. Diese vier Kinasen werden schon früh in der embryonalen Entwicklung gefunden, wobei vor allem Src seine höchsten Expressionsspiegel in der neuronalen Entwicklungsphase zeigt. In myeloischen Zellen finden sich vor allem Hck, Fgr und Lyn, in T-Lymphozyten vor allem Lck und Fyn und in B-Lymphozyten vor allem Lyn, Blk, Fyn und Fgr. Auch finden sich die Kinasen in einer sogenannten subzellulären Lokalisation, verankert in der Zellmembran mit Hilfe ihrer Myristilationsseite.

Die erste Src-Kinase, welche in einem Knockout Modell untersucht wurde war Src. Der Phänotyp dieses Modells war eher überraschend, da man nicht die dominante Rolle von Src in Osteoklasten vermutete. Mäuse, welche homozygot das Src Allel verloren hatten, starben ungefähr 3-4 Wochen nach der Geburt an Osteopetrosis, verursacht durch fehlfunktionierende Osteoklasten. Dieser Phänotyp konnte noch verstärkt werden in einem Doppel Knockout Modell mit dem Verlust von Src und Hck, was die redundante Funktion innerhalb der Familie bestätigt [348].

Wie oben erwähnt findet sich ein starkes Expressionsmuster von Src während der neuronalen Entwicklungszeit. Umso überraschender war es festzustellen, dass nach Verlust von Src kein neuronaler Phänotyp im Vordergrund steht, was wieder einmal auf die Redundanz innerhalb der Familie hinweist. Neuronale Defizite finden sich aber nach dem Verlust von Fyn. Diese Tiere zeigen eine Unterentwicklung des Hippokampus, welche wahrscheinlich für ihr verschlechtertes Lernverhalten und Erinnerungsvermögen verantwortlich ist. Interessanterweise findet sich in diesen Mäusen eine stärkere Expression von Src, wahrscheinlich ein Versuch um für den Verlust von Fyn zu kompensieren [348].

Eine grosse Rolle scheinen die Src-Kinasen in lymphoiden Gewebe zu spielen, sowohl in der Zellproliferation als auch in der Zelldifferenzierung. T-Zellen expremieren Lck und Fyn und B-Zellen expremieren Lyn, Blk, Fyn, Hck und Fgr. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass durch die Koexpression anderer Familienmitglieder der Verlust einer Kinase zum Teil kompensiert werden kann. Das best untersuchteste Gen Knockout Modell der Src-Kinasen ist Lck. Der Verlust von Lck führt zu einer Reduzierung des Thymus auf 1/10 seiner normalen Grösse. Dies liegt vor allem an einem Differenzierungsblock der T-Zellen in dem die Zellen unfähig scheinen von dem doppel positiven Stadium (jede Zelle positiv für CD4 und CD8 Oberflächen Antigen) in ein einzel positives Stadium (jede Zelle entweder positiv für CD4 oder CD8) überzugehen.

Jedoch finden sich ausserhalb des Thymus vereinzelt positive T-Lymphozyten, welche jedoch eine fehlerhafte Funktion in der antiviralen Abwehrreaktion, in der Abstossungsreaktion von Hauttransplantaten und Tumorzellen Transplantaten zeigen. Auch scheint die Proliferation der T-Zellen in Lck-Knockout Mäusen sehr verschlechtert zu sein. So schlägt die Stimulation des T-Zell Rezeptors (TCR) durch monoklonale Antikörper, welche eine Komplexbildung mit dem TCR und CD3 initiieren, fehl. Lck spielt somit eine wichtige Rolle in sowohl T-Zell Differenzierung als auch in T-Zell Proliferation [349].

Lyn scheint dagegen eine ebenso wichtige Rolle in der B-Zell Proliferation und Differenzierung zu spielen. Der Verlust von Lyn führt zu einer Reduktion der peripheren B-Zellen um 50%-65%, jedoch scheint die Anzahl der B-Zellen im Knochenmark nicht verringert. Die peripheren B-Zellen reagieren fast nicht auf proliferative Signale, besitzen jedoch eine normale Abwehrreaktion nach der Stimulation mit Antigenen. Im Alter von 3-4 Monaten entwickeln die Mäuse eine Lymphadenopathie und Splenomegalie. Dies geht einher mit der Produktion von vielen immunoblastischen B-Zellen und Plasma-Zellen, welche primär IgM sezernieren und vor allem in Lymphknoten und der Milz gefunden werden. Wegen der abnorm hohen IgM Spiegel entwickeln die Tiere nach einer Weile Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel Glomerulonephritis [348].

Hck und Fgr scheinen eine wichtige Rolle in Neutrophilen weissen Blutzellen zu spielen. Nach dem Verlust von beiden Kinasen (in einem Doppel Knockout Modell) zeigen die Neutrophilen Blutzellen grosse Schwierigkeiten zu adhären und sich auszubreiten. Dies führt zum Beispiel dazu, dass diese Zellen im septischen Schock nicht adäquat entzündetes Gewebe penetrieren können [350]. Darüber hinaus sind solche Tiere gegenüber dem Pathogen *Listeria monocytogenes* immundefizient. Auch Lyn scheint eine Rolle in weissen Blutzellen zu spielen. So findet man keine Fc $\epsilon$ RI vermittelte anaphylaktische Reaktion in Mastzellen von Lyn Knockout Mäusen. Fyn spielt eine Rolle in der Differenzierung von Keratinozyten, was in abnormaler Morphologie und verminderter Proliferation von Keratinozyten in Fyn-/- Mäusen resultiert [348].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aufgaben der einzelnen Src-Kinasen von Zellsystem zu Zellsystem verschieden zu sein scheint. Auch scheint es, dass die einzelnen Familienmitglieder redundante Aufgaben erfüllen.

#### **4.4.3 Die Rolle der Src -Kinasen in Signaltransduktionswegen**

Wie schon mehrfach erwähnt stehen die Src-Kinasen mit verschiedenen Rezeptoren in Verbindung und sind in deren Signalwege verwoben. Leider kann ich in dieser Arbeit nicht im Detail auf alle diese Wege eingehen und werde deshalb nur einige wichtige beschreiben. Ihre Hauptaufgabe scheint in Zelladhäsion, Zellmotilität, Proliferation und Differenzierung zu liegen.



Src-Kinasen finden sich verankert in Zellmembranen wie Plasma- und Endosomale Membranen. Für all diese wichtigen Aufgaben der Src-Kinasen existieren viele detaillierte Studien.

#### Die Rolle der Src-Kinasen in Zelladhäsion

In den 80 iger Jahren wurden die ersten Substrate von Src in Zellen gefunden, welche mit dem Rous Sarcoma Virus infiziert worden waren. Tom Parson et al. verwendeten für diesen Zweck Anti-Phosphotyrosine Antikörper und konnten durch Immunpräzipitationen FAK (Focal adhesion kinase) und Cas (Crk-and Src associated substrate) identifizieren. Dies war der erste Hinweis, dass Src in die Signalwege der Integrine verwickelt ist [351]. Src assoziiert demnach mit der Tyrosinkinase FAK, Cas und Paxillin. Auch assoziiert Fyn mit FAK und man nimmt an, dass die Bindung der beiden Src-Kinasen zu Phosphorylierung eines Tyrosinrestes, Y397, an FAK führt was wiederum die Bindung von Grb2 und p130 Cas ermöglicht. Auch bindet PI3K an FAK und gleichzeitig die SH3 Domäne von Src. All diese Verbindungen sind Teil des Integrinkomplexes um Zell zu Zell Interaktionen zu ermöglichen [352]. Src-/- Fibroblasten haben grosse Schwierigkeiten auf einer Fibronectin Oberfläche zu wachsen, können aber auf Kollagen proliferieren. Die Adhäsionsfunktion von Src ist abhängig von intakten SH2 und SH3 Domänen, braucht aber nicht die katalytische Aktivität von Src, sprich die Kinasedomäne [353].

#### Die Rolle der Src-Kinasen in Zellmotilität

Zellmotilität ist an Vorgängen wie Wundheilung, Homing von Lymphozyten, Metastasierung und anderen Vorgängen beteiligt. V-Src induziert die Migration von PC12 Pheochromozytomzellen nach Gabe von PMA. Auch ist die Motilität von Src -/- Fibroblasten im Gegensatz zu Wildtypzellen vermindert. Motilität in diesen Zellen braucht die intakte Kinasedomäne von Src. Lck und auch CD4 sind wichtig für die Migration von T-Lymphozyten durch LCF (Lymphocyte Chemoattractant Factor). Die Kinasefunktion von Lck ist dafür aber nicht essentiell. Neben Src scheinen auch MAPK und FAK in Zellmotilität eine grosse Rolle zu spielen. Src bindet hierbei an FAK (Y397) [352].

#### Die Rolle der Src-Kinasen in Zellproliferation

Für die Rolle von Src in DNA Replikation gibt es sich widersprechende Daten. In einer Studie wurde Src durch Mutationen konstitutiv aktiviert und man fand, dass diese Aktivierung nicht Rezeptor induzierte DNA Synthese ersetzen konnte und seine Rolle wohl eher in einem Netzwerk von zellulären Vorgängen liegt [352]. In einer anderen Studie wurde DNA Synthese durch die Injektion von neutralisierende Antikörper oder durch Transfektion einer Kinasesinaktiven Mutante inhibiert. In beiden Fällen wurde die Zellproliferation durch EGF, PDGF induziert und durch CSF-1 gehemmt, was auf eine essentielle Rolle dieser Kinasen in DNA Synthese hinweist [354]. Gleiches gilt auch für Src-/- Fibroblasten. Expression von Src-

Kinasen mit entweder deletierter oder inaktiver Kinasedomäne können nach PDGF Stimulation keine DNA bilden [355]. Darüber hinaus scheint DNA Synthese durch Src, Fyn oder Fgr im PDGF System unabhängig vom Ras-Signalweg zu sein. Das Fos-Gen wird als das Zielgen des Ras-Signalweges gesehen und *myc* wird in einem separaten Weg durch Src, Fyn und Fgr im PDGF Signalsystem aktiviert. Courtneige et al. gelang es zu zeigen, dass mit insuffizienter *myc*-Funktion die Zellen nicht in die S-Phase des Zellzykluses eintreten und dass nach Gabe von Src-blockierenden Antikörpern die Induktion der *myc*-mRNA gehemmt werden konnte [356]. Ähnliches wurde auch von Chiariello et al. demonstriert. In ihrer Studie zeigten sie, dass Src absolut für die nukleare Expression von c-*myc* und somit für DNA Replikation, nach Stimulation von Zellen mit PDGF, nötig ist. Die Stimulation der *myc* Expression durch PDGF ist darüber hinaus unabhängig von Ras oder MAPK Signalwegen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich eine Rolle von Src in der Zell Proliferation durch PDGF, welche unabhängig von Ras ist [357]. Ganz anders scheint auch die Aufgabe von Lck zu sein. Gupta et al. konnten zeigen, dass in einer Jurkat-Zelllinie, welche kein Lck exprimiert, weder die Stimulation des T-Zell Rezeptors noch die Stimulation von CD3 zur Aktivierung der MAPK führte. Dieser Effekt konnte kompensiert werden durch Wiedereinführung von Lck in diese Zellen. In Lck exprimierenden Jurkat-Zellen konnte interessanterweise keine Shc Phosphorylierung mit nachfolgender Assoziation mit Grb2 induziert werden. Dagegen fand die Gruppe, dass ein anderer Guanin Nukleotid Austausch Faktor durch T-Zell-Rezeptor und CD3 Stimulation aktiviert wird: p95Vav, welches mit Lck assoziiert [358]. Interessanterweise konnte diese Gruppe in den Lck<sup>-/-</sup> Jurkat-Zellen eine Aktivierung von *jun/fos* durch Stimulation von CD2 und die Expression des IL-2-Gens demonstrieren. Dieser Signalweg involviert die Tyrosinkinase Pyk2 und Jun-Kinasen [359].

Die Rolle von Lyn im Zell Zyklus wurde von Scheuermann et al. in der B-Lymphom Zelllinie BCL<sub>1</sub> untersucht. Membranäre Immunglobuline (mIg), wie z.B. IgM stimulieren die Kinaseaktivität von Lyn, Fyn, Blk and Lck und führen unter anderem zu einer Komplexbildung mit CD19. Die physiologische Rolle dieser Aktivierung und Komplexbildung konnte noch nicht vollkommen geklärt werden. Man weiss aber, dass die Bindung von mIg in unreifen B-Zellen mit Zell Zyklus Stop, Apoptosis, klonalen Anergismus und klonalen Eliminierung führt; reife B-Zellen reagieren mit proliferativen Signalen. Im B-Zell Lymphom überführt die Bindung von mIg die Zellen in ein dormantes Stadium, in welchem die Zellen über lange Zeiten hinweg verharren. Scheuermann et al. konnten in der Zelllinie BCL<sub>1</sub> zeigen, dass nach der Behandlung der Zellen mit Antisense Lyn und anschliessender Stimulation mit mIg die Zellen absterben, aber nicht in einen Wachstumsstop verfallen. Darüber hinaus untersuchte die Gruppe auch die Komplexbildung von Lyn mit CD19 und fand, dass der antiproliferative Effekt von Lyn in B-Lymphom Zellen durch CD19 vermittelt wird. Diese Ergebnisse könnten die Daten des mangelnden proliferativen Effektes von Lyn in der Proliferation der BaF3 Zellen unterstützen, wie in Abb. 3.2.9.B zu erkennen ist. Hier resultiert der Mangel von Lyn in einer Hemmung der Proliferation um ca. 20-30% in BaF3-EpoR Zellen nach Epo-Stimulation. Es stellte sich die Frage ob die Aufgabe von Lyn eher in der Vermittlung von Differenzierungsignalen liegt und

die Zelle zu diesem Zweck im Zell Zyklus verharren lässt, damit die Differenzierungsmaschinerie wirken kann [360]. Der antiproliferative Effekt von Lyn scheint daran begründet zu sein, dass es die Cdk2 (Cyclin dependent kinase2) durch Phosphorylierung von Cdk2 an Tyr15 inhibiert [361]. Ist dieser Tyrosinrest phosphoryliert binden Proteine wie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> an Cdk2 und können den Komplex CyclinD1, 2 oder 3/Cdk2 dissoziieren und somit den Zell Zyklus in der G1 Phase zum Verharren bringen. Wang et al. haben die Rolle von Lyn im Zell Zyklus noch weiter untersucht. Sie fanden, dass in die promyelozytische Zelllinie HL-60, welche mit 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 (1,25D3) behandelt wurden und in der G1/S Phase des Zell Zyklus verharren. Dieser Zell Zyklus Halt kann aber durch die Depletion von Lyn durch Antisense Oligodeoxynukleotide wieder rückgängig gemacht werden, da die Zellen dadurch wieder in die S-Phase des Zell Zykluses eintreten. Lyn scheint also am Verharren der Zellen in der G1/S Phase beteiligt zu sein. Ob diese Zellen nach der Behandlung von (1,25D3) oder Antisense Lyn Oligodeoxynukleotide weiter differenzierten wurde leider nicht untersucht. Die Gruppe zeigte aber, dass die Zellen durch ebengenannten Substanzen in einem Verlauf von zwei Tagen nicht entdifferenzierten [362].

#### Die Rolle der Src-Kinasen in Zelldifferenzierung

Lyn scheint eine wichtige Rolle in der Differenzierung von eosinophilen Granulozyten zu spielen. Es bindet zusammen mit Jak2 die Rezeptoren für IL-5, GM-CSF und IL-3. Auch werden beide Kinasen durch diese Zytokine aktiviert. Die Aufgabe von Lyn, Jak2 und Syk in diesen Zellen ist zum Teil noch unklar. Man weiss jedoch, dass sie eine grosse Rolle in der antiapoptiven Aktivität von IL-5 spielen. Auch sind sie wichtig in der eosinophilen Differenzierung von Stammzellen, scheinen aber keine Rolle in der eosinophilen Degranulation zu spielen oder die Expression von Adhensionsmolekülen zu beeinflussen. Adachi et al. konnten demonstrieren, dass durch die Inhibierung der Lyn Bindung an die gemeinsame  $\beta$ -Untereinheit des GM-CSF- und IL-5-Rezeptors zur Blockierung der Differenzierung von eosinophilen Stammzellen und zu ihrer gesteigerten Apoptose führte. Interessanterweise bewirkte die Hemmung von Lyn auch einen Rückgang in der Entzündungsreaktion der Atemwege in einem murinen Asthmodell. Die Hemmung von Lyn schien keinen Einfluss auf die Histaminausschüttung oder die Proliferation von B- und T-Zellen zu haben [363]. Es wäre nun interessant zu untersuchen ob der mangelnde Effekt der Lyn Antisense Oligodeoxynukleotide auf Epo-abhängiges Wachstum in BaF3/EpoR Zellen zum Teil auch durch einen apoptotischen Effekt durch die Inhibierung von Lyn erklärt werden könnte.

Neben dieser Arbeit untersuchten auch Tilbrook et al. die Rolle von Lyn in dem Signalweg von Erythropoetin. Die Gruppe analysierte zu diesem Zweck eine erythroleukämische Zelllinie J2E, welche im Zuge der erythroiden Entwicklung im proerythroblasten-basophilen Stadium immortalisierte. Diese Zellen sind in ihrer Proliferation und Differenzierungsfähigkeit durch Epo stimulierbar. Von dieser Zelllinie existiert ein Subklon, J2E-NR, welcher seine Fähigkeit zu differenzieren fast verloren hat. In diesem Klon fand man die Menge der transkribierten Lyn

RNA verringert. Darüber hinaus transfizierte die Gruppe J2E Zellen mit einer Kinase inaktiven Lyn Mutante, in welcher der Tyrosinrest 397 zu Phenylalanin mutiert wurde, JR397 Zellen. Diese Zelllinie zeigte nach Epo-Stimulation eine um 25%ige reduzierte Proliferation und eine um fast 80%ige reduzierte Differenzierungsfähigkeit. Bestätigt wurde dieses Ergebnis noch mit Nachweis von  $\beta$ -Globin, GATA-1 und EKLF Transkription und Expression. Alle drei Gene sind essentiell in der Bildung von Hämoglobin beteiligt und waren in ihrer Genexpression in der JR397 Zelllinie verringert [364]. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von 3.2.10. Hier konnte in Abb. 3.2.10.B gezeigt werden, dass nach Inhibierung der Lyn Transkription durch Oligodeoxynukleotide die  $\beta$ -Globin Expression fast vollkommen unterbunden werden konnte. Die Tatsache, dass in der J2E-NR Zelllinie noch Differenzierung zu sehen ist, liegt wohl daran, dass neben der überexprimierten kinaseinaktiven Form von Lyn auch noch der Lyn Wildtyp in diesen Zellen expremiert wird. Im Gegensatz zu den Ba/F3-EpoR Zellen, in welchen die Lyn Expression fast vollkommen unterbunden werden konnte ,Abb.3.2.10.B, (unterer Abschnitt). Tilbrook et al. untersuchten darüber hinaus auch potentielle Bindungsseiten von Lyn am EpoR. Darauf wird unter 4.4 im Detail eingegangen. Tilbrook et al. versuchten auch die Frage zu beantworten in welcher Stufe der erythroiden Entwicklung Lyn eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden murine fötale Leberzellen mit zwei Lyn Wildtypkonstrukten retroviral infiziert und die Formation von CFU-E und BFU-E analysiert. Die Gruppe fand, dass die Bildung von BFU-E unabhängig von der Expression ektopischen Lys zu sein scheint, ganz im Gegensatz zu der Formation von CFU-E, deren Anzahl sich fast verdoppelten nach ektopischer Lyn Expression verglichen zu der Infektion der Zellen mit dem Kontrollkonstrukt (Vektor ohne Lyn). Dabei wurden die Zellen als positiv gezählt, in welchen die Hämoglobinbildung durch Benzidinanfärbung nachgewiesen werden konnte. Dieses Experiment muss mit Vorsicht betrachtet werden. Zum einen zeigte die Analyse der Epo und EpoR Knockout Mäusen, dass die Bildung von CFU-E und BFU-E unabhängig von Epo zu sein scheint und wohl eher durch SCF, IL-3 und GM-CSF vermittelt wird [136] und die Frage sich stellt welche Bedeutung dieses Ergebnis für die Aktivierbarkeit von Lyn durch Epo hat. Zum anderen werden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten zwei verschiedene retrovirale Lyn Konstrukte in die fötalen Leberzellen infiziert und diese Ergebnisse miteinander verglichen. Die Bildung von BFU Kolonien, mit oder ohne Hemoglobin, scheinen für beide retrovirale Konstrukte unabhängig für Lyn zu sein. Die Bildung von CFU Kolonien scheint für das pRUF-R-Lyn Konstrukt durch die Expression von Lyn verstärkt zu sein, vorallem für Hemoglobin haltige Zellen. Expression von Lyn durch das pMSCV-M-Lyn Konstrukt führte zu einer vermehrten Anzahl von CFU Kolonien, aber keinen deutlicher Unterschied zwischen hemoglobinhaltigen oder hemoglobinlosen Zellen. Die Rolle von Lyn in der Differenzierung in der frühen Reifungsstufe der roten Blutzellreihe muss demnach noch intensiver untersucht werden.

Die mögliche Rolle von Lyn in der durch Epo vermittelten Differenzierung der roten Blutzellreihe könnte in der Verbindung von Lyn und Stat5 liegen. Wie unter 1.2.2.2 schon erwähnt ist die Hämoglobinbildung in Stat5  $-/-$  ES Zellen um 5% reduziert. Diese Zahl erscheint klein. Es ist

aber durchaus möglich, dass der Verlust von STAT5 durch Raufregulierung anderer Gene kompensiert wird [143]. Im ersten Bericht über den Phänotyp von Stat5 <sup>-/-</sup> Mäusen gibt es keinen Hinweis auf unnormale Entwicklung der roten Blutzellreihe in diesen Tieren [365]. Erst kürzlich wurde diesen Mäuse mehr im Detail auf ihre Blutbildung hin untersucht und es konnte von Socolovsky et al. demonstriert werden, dass erwachsene Mäuse, welche beide Isoformen (Stat5a und 5b) missen, trotz normalen Hämatokrit- und Hämoglobinspiegeln, nach akutem Stressen des roten Blutsystemes durch freie Radikale, die Fähigkeit zur Kompensation verloren hatten. Der grösste Teil der adulten Tiere war darüber hinaus auch anämisch, trotz kompensatorischer extramedullärerer Blutbildung. Diese Anämie konnte durch einen Differenzierungsblock in frühen Erythroblasten erklärt werden. Darüber hinaus korrelierte der Schweregrad der Anämie mit einer verringerten Expression von Bcl-2 und einer gesteigerten Apoptoserate in frühen Erythroblasten [366].

Chin et al. konnten in einer anderen Studie zeigen, dass Lyn in COS7 Zellen die Tyrosinphosphorylierung von Stat5 an Y694 induziert. Dieser Tyrosinrest ist verantwortlich für die Dimerbildung von Stat5 und somit auch für die Aktivierung von Stat5 (DNA-Bindungskapazität). Durch Koexpressionsexperimenten konnte die Gruppe demonstrieren, dass die Phosphorylierung von Stat5 durch Lyn unabhängig von der Stimulation der Zellen mit Epo war. Lyn verstärkte auch die DNA-Bindungskapazität in 32D/EpoR-WT Zellen, was in einem Reporteragen Assay in zwei verschiedenen Zellsystemen demonstriert werden konnte. Darüber hinaus konnte die Gruppe auch demonstrieren, dass die SH2 Domäne von Lyn Jak2 bindet, Lyn mit EpoR assoziiert und Tyrosinreste am EpoR phosphoryliert [367]. Auf die Assoziation von Lyn und EpoR wird unter 4.4.4 und 4.4.5 eingegangen werden.

#### **4.4.4 Src-Kinasen assoziieren mit dem IL-6- und Epo-Rezeptor**

Die Janus-Kinasen sind sowohl für den IL-6- als auch für den Epo-Rezeptor in grösserem Detail untersucht worden. gp130 assoziiert als 'shared subunit' mit drei Mitgliedern der Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk. Die Janus-Kinasen binden dabei, wie unter 1.3.4.2. im Detail beschrieben wurde an die proximale Region von Zytokinrezeptoren [41, 42, 51]. Diese Region wird als Box1, Box2 oder als prolinreiche Region bezeichnet und ist unverzichtbar für die Funktion der Rezeptoren [50, 368]. Die für die Aktivierung der MAPK durch IL-6 essentielle Bindungsstelle an gp130 ist charakterisiert worden und befindet sich im Bereich der AS109-133 [39]. Diese Region wurde nach Untersuchung und Vergleich der LIFR- und G-CSF-Rezeptorsysteme Box3 benannt, da diese Region essentiell für die Übermittlung von proliferativen Signalen in G-CSFR/LIFR-Rezeptorsystem war [369]. Stahl et al. zeigten, dass SH-PTP2 an den Tyrosinrest 118 des IL-6 Rezeptors bindet, welcher sich in der Box3 befindet [43]. SH-PTP2 könnte somit zusammen mit der MAPK in die Übermittlung von Proliferationssignalen im IL-6 Rezeptorsystem verwickelt sein. Dies wurde von Schiemann et al. untersucht. Sie mutierten den Tyrosinrest 118 zu Phenylalanin und untersuchten den Effekt

dieser Mutation auf die MAPK-Aktivität, welche um 50-60% verringert vorgefunden wurde [39]. Dieser Befund wies daraufhin, dass SH-PTP2 in die Aktivierung von MAPK verwickelt ist, aber nicht essentiell dafür ist.

Neben den Janus-Kinasen binden noch Btk und Tec an die gp130 Untereinheit. Beide Kinasen binden stimulationsunabhängig an gp130, werden aber durch IL-6 aktiviert. Btk-Tyrosinkinase wurde, wie oben erwähnt, als das Genprodukt der X-Chromosom vererbten Agammaglobulinämie (XLA) und der humanen X-Chromosom vererbten Immundefizienz (XID) identifiziert und spielen demnach eine Rolle in der Lymphopoese. Die Tec-Tyrosinkinase wird während der Hämatopoese expremiert. Ob diese Interaktion direkt oder indirekt geschieht oder welche Teile der Proteine mit gp130 assoziieren ist noch unklar [322]. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass die Interaktion indirekt über die Src-Kinasen geschieht, da gezeigt worden ist, dass Btk mit den SH3-Domänen von Fyn, Lyn und Hck interagiert [370]. Das gleiche könnte auch für Tec möglich sein, da auch der N-terminale Teil von Tec an Lyn bindet. Diese Assoziation ist unabhängig von der Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor [371]. Auch für die Tyrosinkinase Fes konnte eine Assoziation mit gp130 nachgewiesen werden, welche unabhängig von der IL-6-Bindung an den Rezeptor ist. Die Kinase wird durch IL-6 aktiviert [372].

Leider war in dieser Arbeit die Darstellung einer Assoziation zwischen den Src-Kinasen und dem IL-6-Rezeptor wegen den schon erwähnten technischen Schwierigkeiten, fast nicht möglich. Die hier gezeigte Assoziation zwischen den Src-Kinasen und dem IL-6 Rezeptor konnte nur ansatzweise für die Src-Kinase Fyn und gp80 gezeigt werden (Abb.3.1.6) und wurde aber später wie oben schon erwähnt für Fyn und Hck bestätigt [279]. Wegen methodischen Probleme konnte hier keine definitive Aussage gemacht werden ob es eine Assoziation von Fyn (oder anderer Src-Kinasen) mit gp130 gibt. Hinweis auf eine Assoziation ist die stark phosphorylierte Bande in der Höhe um 130 kDa in der Anti-Fyn IP des *in vitro* Kinase-Assay der B-9-Zellen (Abb.3.1.5.A). Diese Bande könnte gp130 oder auch ein Mitglied der Janus-Kinase Jak2 (130kDa) repräsentieren. Fyn scheint mit Jak2 im Komplex vorzuliegen, was von Wang et al. gezeigt werden konnte. Die Gruppe konnte eine Komplexbildung von Fyn, Grb2 und Jak2 in der Zell Linie 3T3L1 nach Stimulation mit IL-11 und nachfolgender Phosphorylierung von gp130 nachweisen [373].

Die Assoziation von Hck an gp130 wird auch durch die Ergebnisse von Ernst et al. gestützt. Dieser Gruppe gelang es nachzuweisen, dass in embryonalen Stammzellen Hck funktional und biochemisch mit der LIF/IL-6-Rezeptor 'shared subunit' gp130 assoziiert. Werden diese Zellen mit LIF stimuliert zeigt die Kinase eine deutliche Aktivitätssteigerung. Genaue Bindungsstellen wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine indirekte Bindung der Kinase an die  $\alpha$ -Kette des LIF Rezeptors und in Komigrationsexperimenten die indirekte Bindung von Hck an gp130 gezeigt. Diese Beobachtung könnte eventuell die Bande um 80 kDa in der Fyn IP in Abb.3.1.6 erklären,

welche die  $\alpha$ -Kette des Rezeptors darstellen könnte [260]. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Schaeffer et al.. Hier wurden eine Vielfalt von C-terminalen Deletionsmutanten der zytoplasmatischen Region von gp130 konstruiert und durch GST Fusionen die Assoziation mit Hck untersucht. Interessanterweise konnte die Gruppe zeigen, dass Hck distal des Box3 Motivs bindet, in einer Region (AS 771-811), welche aufgrund ihrer AS Zusammensetzung, analog zur IL-2 $\beta$  Rezeptor Kette, auch saure Region genannt werden kann. Deletion dieser Region führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation von Ba/F3 und 7TD-1 Zellen. Hck scheint ein wichtiger Transmitter von Proliferationssignalen in diesen Zellsystemen zu sein. Behandlung der Zellen mit dem Src-Kinase Hemmer PP2 führte bis zu fünf facher Reduktion der durch Wachstumsfaktor ausgelöster Proliferation in Zellen, welche gp130 und Hck ko-exprimieren. Mangelnde Reduktion von proliferativen Signalen durch PP2 findet sich in Zellen, welche die gp130 Deletionsmutante (bindet nicht Hck) und Hck ko-exprimieren [284]. Hck spielt demnach eine Rolle in der Vermittlung von Proliferationssignalen im IL-6 Rezeptorsystem und somit wahrscheinlich im multiplen Myelom.

Wie schon erwähnt ist die Assoziation von p56Lck mit der  $\beta$ -Kette des IL-2-Rezeptors intensiv untersucht worden. Stimulation von T-Lymphozyten mit IL-2 führt zur Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Proteine und der Aktivierung der Kinaseaktivität von p56Lck. Lck bindet an die "saure" Region der  $\beta$ -Kette. Ob diese Region für die Übermittlung proliferativer Signale nötig ist, wurde indirekt in Lck-/- T-Lymphozyten nach IL-2-Stimulation untersucht, wo das Proliferationsignal unverändert transduziert wurde.

Das wies daraufhin, dass entweder andere Src-Kinase in der Zelle redundant wirken, d.h. die Aufgabe von Lck übernehmen oder Lck nicht für die mitogene Signaltransduktion von Nöten ist [168, 374]. Es wurde ausserdem gezeigt, dass in der Zelle expremiertes Lck nur zu ca. 1% mit dem IL-2-Rezeptor assoziiert und nach Aktivierung c-fos und c-jun aktiviert [168, 375]. Neben Lck assoziieren auch Lyn und Fyn mit dem IL-2 Rezeptor, was sehr interessant ist, da auch wir zeigen konnte, dass Lyn mit dem EpoR, unabhängig von der Rezeptorstimulation, assoziiert ist (Abb. 3.2.3.A, Abb.3.2.4, Abb.3.2.5). Darüber hinaus zeigt der EpoR streckenweise Ähnlichkeiten mit dem IL-2-Rezeptor [144]. Vergleicht man die "saure" Region des IL-2-Rezeptors mit der korrespondierenden Sequenz des EpoR ist die Ähnlichkeit vor allem in dem proximalen Teil der Region zu finden. Dieser Abschnitt enthält keinen Tyrosinrest. Dies unterstützt die hier gezeigten Daten dahingehend, dass die Interaktion der Src-Kinasen mit dem EpoR unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors scheint und somit wahrscheinlich nicht durch Bindung der SH2-Domäne des Src-Kinasen vermittelt wird. Auch die Tatsache, dass die EpoR-Trunkationsmutante 416, welche die "saure" Region des EpoR enthält, Lyn Kinaseaktivität vermittelt (Abb.3.2.8) unterstützt die Möglichkeit, dass die Interaktion der Src-Kinasen mit dem EpoR in dieser Region liegen könnte. Wie für den IL-2-Rezeptor so ist auch für den EpoR eine Region identifiziert worden, welche essentiell für die Vermittlung von mitogenen Signalen ist [144]. Diese Region wird im IL-2-Rezeptor serinreiche Region genannt und enthält Box1 und 2, welche die Interaktionseite für die Janus-

Kinasen darstellt. EpoR-Trunkationsmutanten, welche nicht mehr die SH-PTP1 Interaktionseite enthalten (Y429), zeigen wie schon erwähnt einen hyperphosphorylierten Status von Jak2. Interessanterweise wird über diese Mutanten trotz ihrer Vermittlung von Proliferationsignalen, MAPK nicht aktiviert, was zur Hypothese führte, dass Proliferation in EpoR-System unabhängig von der MAPK-Aktivierung geschieht [149]. Damen et al. versuchten dem auf den Grund zu gehen, da Raf1 sehr wohl von denselben Rezeptormutanten aktiviert wird und darüber hinaus Raf1 Anti-sense-Oligonukleotide die Proliferation hemmen [376]. Die Gruppe fand, dass in Medium ohne FCS (fötales Kälberserum) die Proliferation (mit der Rezeptormutante transfizierten Zellen) in der Tat vermindert ist, verglichen mit dem Wildtyp-Rezeptor transfizierte Zellen. Darüber hinaus benutzte die Gruppe den MAPK-Inhibitor PD98059 um die Rolle der MAPK in der Proliferation der Zellen zu testen und fanden, dass nach Hemmung der MAPK-Aktivität die Signalübermittlung für Proliferation vermindert ist [140].

Der Signalweg für die Aktivierung der MAPK scheint also umstritten zu sein. Wenn die Aktivierung der MAPK, wie oben erwähnt, nicht über Jak2 geschieht, könnte dies über eine andere Tyrosinkinase wie die Src-Kinasen stattfinden. Für dieses Szenario gäbe es einige Möglichkeiten. MAPK könnte direkt mit einer Src-Kinase assoziieren und aktiviert sein. Dies zu zeigen gelang Taieb et al. in B-Lymphozyten mit Lck. Darüber hinaus konnte die Gruppe zeigen, dass Lck und MAPK nicht in der G1-Phase des Zellzykluses interagieren sondern in der S-Phase, was daraufhin weist, dass Lck in der durch IL-2 induzierten DNA-Synthese in B-Zellen direkt mit der MAPK involviert ist [377].

Eine weitere interessante Überlegung ist die Rolle der Phosphatasen SH-PTP1 und 2 und ihre positive Regulation der Src-Kinasen, mit denen sie assoziieren. Beide Phosphatasen interagieren mit dem EpoR durch Bindung an den phosphorylierten Tyrosinrest Y429 [140]. SH-PTP1 reguliert darüber hinaus negativ die Kinase Aktivität von Jak2 [153]. Für SH-PTP2 konnte von Tauchi et al. gezeigt werden, dass sie abhängig von Epo-Stimulation mit dem Rezeptor assoziiert und mitogene Signale übermittelt. Darüber hinaus wird die Phosphatase von Jak2 phosphoryliert und assoziiert mit Grb2 *in vitro* [327, 378]. Die Src-Kinasen könnten somit durch Phosphatasen mit dem Epo Rezeptor assoziieren. Dagegen spricht, dass die Interaktion der Phosphatasen mit dem Epo-Rezeptor abhängig ist von der Stimulation mit Epo und wir zeigen konnten, dass die Interaktion der Src-Kinasen mit dem EpoR unabhängig von der Epo-Stimulation zu sein scheint. Gezeigt wurde dies in Abb.3.2.4 und 3.2.5. In der zweiten IP der Doppel-Immunpräzipitation assoziiert der EpoR mit der Kinase Lyn auch in der unstimulierten Probe. Lyn scheint demnach nicht an einen Tyrosinrest des Rezeptors zu assoziieren, da es auch an die unphosphorylierte Form des EpoR bindet Abb.3.2.4 und 3.2.5, jeweils obere Abschnitte. Auch bestünde die Möglichkeit, dass die Src-Kinasen über die Adapterproteine Grb2 oder Shc oder durch PI3K an den Rezeptor binden. Auch PI3K assoziiert mit Mitgliedern der Src-Kinasen-Familie [257]. Aber auch hier gilt gleiches Argument,



da auch diese Interaktionen von der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors abhängig zu sein scheinen [140, 330].

#### 4.4.5 Potentielle Bindungsdomänen des Epo-und IL-6-Rezeptors

Wie nun unter 4.4.4 dargestellt ist die Assoziationsseite von gp130 und Hck als saure Region C-terminal der Box3 identifiziert worden [284]. Es stellt sich nun die Frage in welchem Bereich des Rezeptors Lyn mit dem EpoR interagiert. Aufgrund der hier gezeigte Daten, Abb.3.2.8, kann dieser Punkt nur mit Vorsicht diskutiert werden. Die meisten Interaktionen der Src-Kinasen mit Rezeptoren ohne eigene Kinaseaktivität, scheinen unabhängig von der Stimulation dieser Rezeptoren zu sein. Auch wurden in der Vergangenheit die Interaktionseiten weder in den Src-Kinasen noch in den assoziierenden Rezeptoren im Detail untersucht [179, 182, 260, 261, 268]. Es gibt mittlerweile einige Beispiele, in denen die Interaktionseiten der Src-Kinasen mit Zytokinrezeptoren identifiziert werden konnte. Zum Beispiel können Lck und auch Lyn durch ihre „unique“ Domäne mit Rezeptoren assoziieren. Lck bindet durch seine „unique domain“ an eine serinreichen Sequenz von CD4 [379]. Auch Lyn bindet durch seine „unique domain“ an die  $\beta$ -Kette des IgE Rezeptors [181]. Jedoch weisen weder CD4 noch der IgE-Rezeptor sequentielle Ähnlichkeiten mit dem EpoR auf. Es wäre aber denkbar, dass Lyn durch seine „unique“ Domäne mit dem EpoR assoziiert. Eine solche Verbindung wäre wahrscheinlich auch von der Stimulation des Rezeptors durch Epo unabhängig. Wie würden Lyn dann aktiviert werden? Folgendes Szenario wäre denkbar: die Aktivierung des EpoR führt zur Bindung der Grb2-SH2-Domäne an den Rezeptor. Somit wird die Grb2-SH3-Domäne frei um mit der Lyn-Linkerregion um die Interaktion mit der Lyn-SH3-Domäne zu konkurrieren. Die Lyn-Kinasedomäne würde somit zugänglicher und aktivierbar werden. Ähnliches ist auch denkbar für PI3K, da die SH3-Domäne von Lyn und Fyn an die p85 Untereinheit von PI3K binden. Somit wird PI3K aktiviert [380], und auch die Konformation der Src-Kinasen geöffnet. Wobei die Öffnung der Src-Kinasen durch Entfernung der Linker-Region von der SH3-Domäne nicht alleine für die Aktivierung der Kinasen verantwortlich ist, wie unter 1.3.4.1.2. im Detail besprochen wurde. Die Src-Kinasen scheinen auch durch ihre SH3-Domäne an Rezeptoren zu binden. So bindet Lck z.B. durch seine SH3-Domäne an CD2 und ist nicht konstitutiv aktiviert. Interessanterweise bindet Lck anscheinend mehr als einmal an prolinreiche Sequenzen in CD2, was durch blockierende Peptide gezeigt werden konnte [381]. Durch Peptid-Bindungstudien versuchten Alexandropoulos et al. bevorzugte SH3-Bindungssequenzen für Src zu identifizieren und fanden, dass Sequenzen die Proline an erster, vierter und siebter Stelle haben, PxxPxxP, bevorzugte Bindungspartner der Src-SH3-Domäne sind [382]. Interessanterweise lassen sich im IL-6- und im Epo-Rezeptor solche prolinreiche Sequenzen finden und weisen daraufhin, dass die Interaktion der Src-Kinasen mit dem Epo- und dem IL-6-Rezeptor durch die SH3-Domäne der Src-Kinasen stattfinden könnte. Src-Kinasen binden aber auch durch ihre SH2-Domäne an Rezeptoren. Im Detail konnte dies

für den T-Zell-Rezeptor beschrieben werden, mit welchem Lck und Fyn assoziieren. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus mindestens acht Untereinheiten, wovon alle sich wiederholende Bindungsmotive aufweisen, die sogenannten 'Immunoreceptor tyrosine-based activation **motiv**' kurz **ITAM** genannt werden. Diese Motive werden nach Stimulation sofort tyrosinphosphoryliert und bieten Bindungsstellen für SH2-Domänen enthaltende Proteine wie p56Lck, p59Fyn oder Zap70 (eine erst kürzlich identifizierte NRTK). ITAMs bestehen aus einer xxYxxLx(6-8)YxxL-Sequenz und es ist bis heute fraglich wie wichtig der Abstand zwischen den beiden YxxL Motiven sein muss um SH2-Domänen binden zu können [172]. Weder der IL-6- noch der Epo-Rezeptor bieten ein reines ITAM-Motiv. Wobei der EpoR eine xYxxL(24)YxYL enthält und wie schon erwähnt, ist es fraglich, ob diese Sequenz wie im T-Zell-Rezeptorsystem für die Bindung von Src-Kinasen verantwortlich sein kann oder ob der Abstand zwischen den YxxL Motive zu weit ist. Auch lässt sich in der IL-6R Sequenz nicht die bevorzugte SH2-Bindungsstelle YxxL der Src-Kinasen [301] finden. Wenn die YXXL Motife im EpoR für eine Assoziation verantwortlich sind, wäre es jedoch denkbar, dass eine Interaktion mit der SH2-Domäne der Src-Kinasen eine zweite Epo-abhängige Interaktion darstellen könnte um die Kinasedomäne der Kinasen so zugänglicher zu machen. Songyang et al. fanden, dass die Src-SH2-Domäne auch an Motive bindet, die die Sequenz YxxG oder YxxL tragen. Davon finden sich einige in gp130. Diese These wird durch die Daten in 3.1.10 unterstützt. Hier wird gezeigt, dass die Komplexbildung von Shc, Grb2 mit Fyn, Hck abhängig von der IL-6 Stimulation der Zellen ist. Diese Assoziation scheint von der Phosphorylierung von Tyrosinresten und sogar von der Kinaseaktivität von Fyn und Hck abzuhängen, was durch die gesteigerte Aktivität der beiden Enzyme im Kinase-Assay der Doppel-Immunpräzipitation deutlich wird (Abb.3.1.10). Die komigierende p66Shc Isoform könnte also durchaus Substrat von Fyn und Hck sein und phosphoryliert werden. Die Assoziation könnte dann durch die SH2-Domäne der Src-Kinasen stattfinden. Hier sei erwähnt, dass die Assoziation von Hck und Fyn an gp130, von der gleichen Gruppe gezeigt werden konnte, in der diese Arbeit entstanden ist, nachdem diese Doktorarbeit bereits abgeschlossen war [289]. In der Studie von Schaeffer et al. wurde die saure Region von gp130 als Interaktionseite mit Hck identifiziert, welche wohl unabhängig von der Stimulation mit IL-6 stattfindet [284]. Diese Studie untersuchte nicht ob andere Tyrosinreste des IL-6 Rezeptors noch an der Interaktion und der Übertragung von Proliferationssignalen beteiligt ist. Darüber hinaus wäre es auch interessant zu wissen, ob die Hemmung von Hck durch PP1 oder PP2 die Assoziation an gp130 beeinflusst, in anderen Worten, ist die Verbindung von Hck und gp130 abhängig von der Kinaseaktivität von Hck?

Die Frage ob Tyrosinreste des EpoR an der Assoziation von Lyn und EpoR beteiligt sind wurde in einer eleganten Studie von Chin et al. demonstriert. Diese Studie untersuchte nur einen kleinen Teil von EpoR Mutanten, analysierte aber darüber hinaus die EpoR Bindungsseite von Lyn. Die Gruppe fand zum einen, dass Lyn wohl mit den proximalen 91 AS des EpoR interagiert. Dafür wurden die Rezeptormutanten und Lyn in COS-7 Zellen überexprimiert und durch Immunpräzipitationsstudien untersucht. Die verwendeten

Rezeptormutanten waren eine Deletionsmutante (AS280-301), mit Verlust der Jak2 Bindungsseite, und zwei C-terminale Deletionsmutanten, EpoR375 und EpoR338. Alle drei Mutanten assoziieren mit Lyn. Wenn man davon ausgeht, dass Expression dieser Mutanten in Cos-Zellen nicht zur Phosphorylierung des Rezeptors und somit nicht zur Bindung der SH2 Domäne von Lyn an den C-terminalen Tyrosinresten führt (siehe unten), liegt die Bindungsseite von Lyn unter Umständen in den proximalen 32AS des EpoR und würde unsere Bindungsdaten mit der EpoR286 Mutante in Abb.3.2.8.D unterstützen. In Abb. 3.2.8.A-D konnte leider keine Zunahme der Assoziation nach Stimulation entdeckt werden, was zum einen auf die wahrscheinlich kleine Menge Lyn, die mit dem EpoR assoziiert, zurückzuführen ist. Ähnliches findet sich auch im IL-2 Rezeptorsystem. Auch hier bindet nur 1% des zellulären Lck an die  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors [168]. Überexpression von den zu untersuchenden Bindungspartnern kann helfen solche Effekte besser zu demonstrieren, jedoch kann durch Western Blotting nur begrenzt eine quantitative Aussagen gemacht werden. Die Tatsache, dass die EpoR 286 Mutante nicht die Aktivierung von Lyn Kinase nach Epo-Stimulation in Ba/F3 Zellen vermitteln kann, Abb.3.2.7.B, könnte dadurch erklärt werden, dass diese C-terminale Deletionsmutante Lyn noch schwach binden kann, aber nicht die Aktivierung von Lyn vermitteln kann. Chin et al. untersuchten leider nicht die Aktivierbarkeit von Lyn mit ihren EpoR Mutanten. Zum Zweiten zeigte die Gruppe in Phosphopeptid Assays, dass die SH2 Domäne von Lyn mit den zwei C-terminalsten Tyrosinresten im EpoR (Y467, Y479) assoziiert, und diese Assoziation Epo-abhängig ist. Darüber hinaus demonstrierte die Gruppe, dass die Kinase Domäne von Lyn stimulationsunabhängig und die SH2 Domäne stimulationsabhängig mit dem EpoR interagiert. Diese Experimente wurden mit GST-Lyn Fragmenten (GST-unique+SH3 domain, GST-SH2 und GST-kinase domaine) ausgeführt, welche zuerst mit 32D Zellysat gemischt, anschliessend mit Glutathione-Sepharose Beads aufgereinigt und durch Western Blotting analysiert wurden. Das „Fischen“ von Proteinen durch assoziierende GST-Bindungspartner, wirft die Frage auf, ob die gefundene Interaktion von direkter oder indirekter Natur ist. So ist es durchaus möglich, dass, wie oben schon erwähnt, Lyn die beiden C-terminalen Tyrosinreste durch ein Adapterprotein wie z.B. Grb2 bindet und somit die Grb2 SH3 Domäne mit der Lyn eigenen SH3 Domäne konkurriert und Lyn somit aktiviert wird. Auch wäre es interessant zu untersuchen ob die SH2 Domäne von Lyn mit der SH2 Domäne von p85 PI3K in der Bindung des Tyrosinrestes Y479 [140] konkurriert. Wie oben schon erwähnt, führt die Bindung der SH3 Domäne von Lyn zur Aktivierung von PI3K [380]. Um zu verstehen, wie all diese Proteinmechanismen letztendlich in Zusammenhang stehen und welche Rolle redundante Proteine und ihre Mechanismen spielen, wird noch etliche Untersuchungen benötigen.

## 4.5 Schlussgedanken

### 4.5.1 Die Rolle von Src in malignen Erkrankungen

Die Rolle von überaktiven Src ist in der Vergangenheit sowohl *in vitro* (in Tumorzelllinien) als auch *in vivo* (in Mausmodellen) untersucht worden. Src wurde auf seine Bedeutung in Tumorentstehung, Tumorprogression, in der Rolle der Kinaseaktivität und der Verlust von Src durch Antisense Experimente hin untersucht.

So konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von Src in Zelllinien von Mammakarzinomen 4-20 fach höher ist als in Zelllinien von normalen Gewebe. In manchen Fällen ging dies auch mit erhöhten Proteinspiegeln einher. Die erhöhte Kinaseaktivität scheint von einer erhöhten Phosphatasenaktivität abzuhängen, was zu Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes und somit zur Aktivierung von Src führt. Die Rolle von Src im *in vivo* Modell wurde in Transgenen Mäusen untersucht, welche das virale Polyoma MiddleT Antigen unter der Kontrolle des MMTV (murine mammary tumor virus) Promoters exprimieren. Hier konnte gezeigt werden, dass Src zum einen höhere Aktivität hat und zum anderen eine wichtige Rolle in der Metastasierung der induzierten Karzinomen spielt.

Die Rolle von Src in Kolonkarzinomen scheint ähnlich zu sein. So ist seine Aktivität in malignen Polypen höher als in benignen. Auch scheint die Kinaseaktivität mit dem Ausmass der Dysplasie zu korrelieren. Darüber hinaus scheint seine Kinaseaktivität auch höher in den Metastasen als im Primärtumor zu sein. Auch ist die Kinaseaktivität unterschiedlich in verschiedenen Differenzierungsgraden. So wird sie höher je differenzierter das maligne Gewebe ist.

Src scheint darüberhinaus auch eine Rolle in Karzinomen des Pankreas, der Lunge, des Ösophagus und des Magens zu spielen, um nur einige Beispiele zu nennen.

Es ist immer noch unklar welcher Mechanismus dem onkogenen Potential von Src zu Grunde liegt. Überexpression von Src führt nur zur milden Transformation von Zellen. Und darüber hinaus konnten keine eindeutigen Src Mutanten aus humanem Gewebe isoliert werden, welche sein onkogenes Potential erklären würden. Bis auf eine kleine Anzahl von Kolonkarzinomen, welche eine aktivierende Mutation im C-terminalen Tyrosinrest tragen. So stellt sich die Frage wie Src in Tumoren aktiviert wird. Eine Möglichkeit besteht in der Assoziation von Src mit Zelloberflächenrezeptoren wie EGFR oder HGFR, welche für malignes Wachstum in manchen Tumorarten verantwortlich sind. Eine andere Möglichkeit besteht in der ungenügenden Expression der Src negativ regulierenden Kinase Csk oder eine Überexpression der Src positiv regulierender Phosphatasen. Für beide Szenarien gibt es vereinzelte Hinweise. Darüber hinaus wird es höchstwahrscheinlich noch eine Vielzahl anderer Src regulierender Proteine geben, welche das onkogene Potential von Src unterstützen.

Das metastatische Potential von Src scheint in seiner Aktivierbarkeit durch Zelloberflächenrezeptoren wie EGFR, HER/*neu*, FGFR und Integrinen zu liegen. Zu den Zielproteinen von Src gehören z.B.  $\beta$ -Catenin, Cadherin, PI3K, Ras oder AnnexinII. Transkription dieser Gene kann dann zur Gewebsinvasion maligner Zellen, Angiogenese, Adhesion, Migration und Zellüberleben führen [383].

All diese Ergebnisse machen Src zu einem interessanten Kandidaten für eine neue Gruppe von Therapeutika: Tyrosinkinase-Hemmer. Bis dato gibt es leider noch kein potentiell Therapeutikum, welches Src abhängiges Tumorstadium verhindert. Viele Tyrosinkinaseinhibitoren, wie PP1 und PP2 (siehe 4.5.2) werden dahingehend untersucht, und neue Kinaseinhibitoren werden entwickelt werden.

#### **4.5.2 Tyrosinkinase-Hemmer als potentielle Therapie von malignen Erkrankungen**

Seit ca. 20 Jahren ist nun bekannt, dass Tumorzellen aus dem Tierreich oft die genetische Information für Tyrosin Kinasen tragen. Seit dieser Zeit wird überlegt ob Therapeutika, welche solche Enzyme inhibieren, nicht von Nutzen sein könnten. Ein grosses Problem war und ist immer noch die Toxizität solcher Substanzen. Herbimycin und Staurosporin gehörten zu den ersten Substanzen, welche in kultivierten Tumor Zelllinien getestet wurden und einen klaren antiproliferativen Effekt zeigten. Die Substanzen wurden aber nie im grösseren Rahmen weiter getestet, da ihre Spezifität sehr limitiert ist.

Die neue Generation von Kinase Inhibitoren besteht aus Molekülen, welche spezifisch die Kinasedomäne der gezielten Enzyme binden und somit ihre Aktivität hemmen. Die zur Zeit bekannteste und am besten charakterisierteste Substanz ist STI571 (CGP571148). Dieses Molekül bindet die Kinase Domäne von der Tyrosinkinase Abl in ihrem unphosphorylierten Zustand und verhindert somit weitere Bindung von ATP und Aktivierung. Abl ist Teil der Fusionprotein Kinase Bcr-Abl, welche aus der Translokation (9;22) hervorgeht und hauptverantwortlich für das Entstehen der chronisch myeloischen Leukämie (CML) ist. STI571 wurde von Novartis Pharmaceuticals entwickelt und hemmt dosisabhängig auch andere Kinasen wie c-Kit und PDGFR, hat aber z.B. keinen Effekt auf die Src-Kinasen. In vorklinischen Studien inhibierte STI571 die Proliferation von Bcr-Abl transformierten Zellen und zeigte jedoch keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum gesunder Zellen. Patienten-Studien zeigten grosse Effekte von STI572 in Patienten, welche sich in der chronischen Phase der CML befanden bei minimaler Toxizität. Der Effekt von STI571 scheint jedoch limitiert zu sein, so ist seine Wirksamkeit in der Blastenkrise der CML begrenzt, da in mehr als 50% der Fälle die Proliferation von Blasten nicht inhibiert werden konnte. Darüber hinaus werden mehr und mehr Mutationen in Bcr-Abl positiven Patienten gefunden, welche zur Resistenz gegen STI571 führen.

Neben STI571 ist noch eine weitere Substanz von grossem Interesse. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper, welcher Her2/neu, ein Mitglied der EGF Rezeptorfamilie, neutralisiert. Das Gen für Her2/neu ist in ca. 30% der Mammakarzinome amplifiziert und dient als prognostischer Marker. Verwendung von Herceptin, ein monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Her2/neu führte in ca.15% von Patientinnen, welche Her2/neu exprimierten, zu verlängerten Überleben in Kombination mit Chemotherapeutika, verglichen mit Patientinnen, welche nur mit Chemotherapeutika behandelt wurden [384].

Die Zukunft der Tumorentherapie scheint in der Entwicklung von Molekülen zu liegen, welche spezifisch Enzyme hemmen, die die „treibende“ Kraft der malignen Erkrankung sind. Kombinationstherapien werden wahrscheinlich von Nöten sein um Resistenzen möglichst lange herauszuzögern, darüber hinaus werden Substanzen gebraucht werden, welche die, z.B. durch STI571 zytostatischen Zellen zum Absterben bringen, um den Patienten eine lebenslange Therapie zu ersparen.

Für die Familie der Src-Kinasen sind auch Inhibitoren gefunden worden, welche ähnlich wie STI571 in der Kinasedomäne der Enzyme binden. Zu den zwei bekanntesten Substanzen gehören PP1 (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine) und PP2 (4-amino-5-(chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine). Diese Substanzen wurden von Pfizer Central Research entwickelt und hemmen Src-Kinasen wie Lck, Fyn [385] und Hck [284]. PP1 und PP2 inhibieren die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten und zeigten keine Nebenwirkungen wie z.B. Herbimycin A, welches mit Sulfhydrylgruppen anderer Proteine reagiert. PP1 und PP2 inhibieren auch andere Kinasen wie ZAP-70, Jak2 und EGFR. Dafür sind aber bedeutend höhere Dosen nötig. Wie in dieser Arbeit demonstriert, scheinen die Src-kinasen, vor allem Hck eine zentrale Rolle in der Proliferation von Myelomzellen zu spielen. PP1 und PP2 könnten somit eine neue Therapiemöglichkeit für das multiple Myelom darzustellen, für das bis dato keine Heilungsmöglichkeit existiert.

#### **4.6.2 Zusammenfassung**

Wir zeigten in dieser Arbeit, dass Mitglieder der Src-Kinasen Familie durch IL-6 und Epo aktiviert werden und mit deren Rezeptoren, vor allem dem EpoR, assoziieren. Darüber hinaus scheint die Src-Kinase Lyn eine Rolle in der erythrozytären Differenzierung zu spielen.

IL-6 spielt eine dominierende Rolle in der Proliferation von multiplen Myelomzellen. Wir konnten zeigen, dass die durch IL-6 induzierte Proliferation von multiplen Myelomzellen hauptsächlich durch Tyrosinphosphorylierung vermittelt wird und, dass IL-6 die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fyn aktiviert. Darüber hinaus konnten wir demonstrieren, dass IL-6 die Tyrosinphosphorylierung von Shc und die Assoziation von Shc und Grb2 induziert, was auf eine Aktivierung des Ras-Signalweges durch IL-6 hinweist. Die Verbindung der Src-Kinasen mit dem Ras-Signalweg versuchten wir durch eine Assoziation von Shc und Grb2 mit Hck und

Fyn demonstrieren. Diese Verbindung konnte deutlich durch IL-6 Stimulation vermehrt werden. Darüber hinaus ist Shc wahrscheinlich ein Substrat von Hck und Fyn. Die Src-Kinasen könnten somit eine potentielle Zielgruppe für Therapieansätze im multiplen Myelom werden.

Wir untersuchten die Rolle der Src-Kinasen im Epo Rezeptorsystem. Auch hier scheint Tyrosinphosphorylierung ein wichtiger Mechanismus der Epo Signaltransduktion zu sein. Wir zeigten eine Aktivierung von Lyn, Hck und Fyn durch Epo. Darüber hinaus assoziiert Lyn, wie auch Jak2, mit dem EpoR unabhängig von der Epo-Stimulation. Jedoch war die Phosphorylierung von Jak2 durch Epo stimulationsabhängig und rapide (nach 30 Sekunden), und schien erst nach 60 Minuten abzunehmen. Zusätzliche Tyrosinphosphorylierung von Lyn durch Epo Stimulation konnte nicht gefunden werden, da die Src-Kinasen sich, wie schon beschrieben, in einem phosphorylierten Dauerzustand befinden. Wir analysierten welcher Teil des EpoR für die Aktivierung von Lyn verantwortlich ist. Für diese Experimente wurden EpoR C-terminale Deletionsmutanten verwendet. Wir konnten demonstrieren, dass AS Y343 und Y401 des EpoRs nötig sind, um Lyn durch Epo zu aktivieren. Darüber hinaus versuchten wir durch Ko-präzipitationsexperimente mit EpoR-Mutanten, die Assoziationsseite von Lyn am EpoR zu identifizieren und konnten wegen grosser technischer Schwierigkeiten kaum zeigen, dass Lyn wahrscheinlich mit der Mutante 286 assoziiert, welche noch 38 zytoplasmatische AS enthält. Auch zeigten wir, dass mangelnde Expression von Lyn nur einen geringen Einfluss auf die durch Epo vermittelte Zellproliferation hat. Vielmehr scheint Lyn eine bedeutende Rolle in der Differenzierung der erythrozytären Blutzellreihe zu spielen, da mit Hilfe von Oligodesoxynukleotiden gezeigt werden konnte, dass die durch Epo induzierte  $\beta$ -Globin Expression von der Expression von Lyn abhängt.

In dieser Arbeit konnte somit die Rolle der Src-Kinasen in zwei verschiedenen Zelloberflächenrezeptor Systemen definiert werden. Die Arbeit zeigt, dass Src-Kinasen für die Steuerung der Zellteilung und Zelldifferenzierung in hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielen.

## 5 Referenzen

1. Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Landsorp and H. Baumann, *Interferon-beta-2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.* Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1987. **84**: p. 7251-7255.
2. Andus, T., T. Geiger, T. Hirano and e. al, *Recombinant human B-cell stimulatory factor (BSF2/IFNbeta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin m-RNA levels in Fao-9 cells.* FEBS Lett., 1987. **221**: p. 18-22.
3. Shabo, Y., J. Lotem, M. Rubinstein and e. al, *The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6.* Blood, 1988. **72**: p. 2070-2073.
4. Ibelgauts, H., *IL-6.* Dictionary of Cytokines, 1995. **Editiones Roche , Basel, Switzerland.**
5. Bauer, J. and F. Herrmann, *Interleukin-6 in clinical medicine.* Ann Hematol, 1991. **62**: p. 203-210.
6. Castell, J.V., M.J. Gómez-Léchon, M. David and e. al, *Acute phase response of human hepatocytes: regulation of acute phase proteinsynthesis by Interleukin-6.* Hepatology, 1990. **12**: p. 1179-1186.
7. Hermus, A.R.M.M. and C.G.J. Sweep, *Cytokines and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1990. **37**(6): p. 867-871.
8. VanSnick, J., *Interlekin-6: an overview.* Annu.Rev.Immunol., 1990. **8**: p. 253-278.
9. Hirano, T., T. Taga, K. Yaasukawa, K. Nakajima, N. Nakano, F. Takatsuki, M. Shimuzu, A. Murashima, S. Tsunasawa and F. Sakiyama, *Human B-cell differentiation factor defined by an antipeptide antibody and its possible role in autoantibody production.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987. **84**: p. 228-231.
10. Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi and M. Nakamura, *Synergistic Effect of IL-3 and IL-6 on Highly Enriched Murine Hemopoetic Progenitors.* Experimental Hematology, 1992. **20**: p. 546-551.
11. Ishibashi, T., H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese and S.A. Burstein, *Human Interleukin-6 is a direct promotor for maturation of megacaryocyten in vitro.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989. **86**: p. 5953-5957.
12. Asano, S., A. Okano, K. Ozawa, T. Nakahata, T. Ishibashi, K. Koike, H. Kimura, Y. Tanioka, A. Shibuya and T. Hirano, *In vivo effects of human interleukin-6 in primates:stimulated production of platelets.* Blood, 1990. **75**: p. 1602-1605.
13. Klein, B., X.-G. Zhang, J. Content, F. Houssiau, L. Aarden, M. Piechaczyk and R. Bataille, *Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6.* Blood, 1989. **73**: p. 517-526.
14. Klein, B., X.G. Zhang, M. Jourdan, M. Portie and R. Bataille, *Interleukin-6 is a Major Myeloma Cell Growth Factor In Vitro and in Vivo Especially in Patients with Terminal Disease.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 1990. **166**: p. 237-244.
15. Satoh, T., S. Nakamura, T. Taga, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto and Y. Kaziro, *Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor/ Interleukin-6.* Mol Cell Biol, 1988. **8**: p. 3546-3549.



16. Garman, R., K. Jacobs, S. Clark and D. Raulet, *B-cell stimulatory factor 2(beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T-cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. **84**: p. 7629-7633.
17. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. Blood, 1989. **74**: p. 1-10.
18. Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama and A. Iwamatsu, *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B-Lymphocytes to produce Immunoglobulin*. Nature, 1986. **324**: p. 73-76.
19. Gonzales, G.A. and M.R. Montminy, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine133*. Cell, 1989. **59**: p. 675-680.
20. Ray, A., K.S. LaForge and P.B. Sehgal, *On the Mechanism for Efficient Repression of the Interleukin-6 Promotor by Glucocorticoids: Enhancer, TATA Box, and RNA Start Site (Inr Motif) Occlusion*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11): p. 5736-5745.
21. Scheinman, R.I., P.C. Cogswell, A.K. Lofquist and A.S. Baldwin, *Role of transcriptional activation I-kappa B alpha in mediation of immunosuppression of glucocorticoids*. Science (Wash. DC), 1995. **270**: p. 283-286.
22. Bauerle, P. and T. Henkel, *Function and Activation of NF-kappaB in the immune system*. Ann Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-179.
23. Baldwin, A.S., *The NF-kappaB and IkappaB proteins: new discoveries and insights*. Ann Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-681.
24. Issiki, H., S. Akira, T. Sugita, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Pawlowski, S. Suematsu and T. Kishimoto, *Reciprocal expression of NF-IL6 and C/EBP in hepatocytes: possible involvement of NF-IL6 in acute phase protein expression*. New Biol., 1991. **3**: p. 63-70.
25. Akira, S., H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajamija, T. Hirano and T. Kishimoto, *A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family*. EMBO, 1990. **9**: p. 1897-1906.
26. Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto, *Cloning and expression of the interleukin-6 (BSF-2/IFNbeta2) receptor*. Science, 1988. **241**(4867): p. 825-828.
27. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto, *Molecular Cloning and Expression of an IL-6 Signaltransducer, gp130*. Cell, 1990. **63**: p. 1149-1157.
28. Cosman, D., *The hematopoietin receptor superfamily*. Cytokine, 1993. **5**: p. 95-106.
29. Hammacher, A., R.T. Richardson, J.E. Layton, D.K. Smith, L.J.L. Angus, D.J. Hilton, N.A. Nicola, J. Wijdenes and R.J. Simpson, *The Immunglobulin-like Module of gp130 Is Required for Signaling by Interleukin-6, but Not by Leukemia Inhibitory Factor*. Journ. Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 22701-22707.
30. Ward, L.D., G.J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R.L. Moritz and R.J. Simpson, *High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of Interleukin-6, Interleukin-6 receptor, and gp130*. J.Biol.Chem., 1994. **269**: p. 23286-23289.
31. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga and T. Kishimoto, *IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase*. Science, 1993. **260**: p. 1808-1812.

32. D'Alessandro, F., O. Colamonichi and R. Nordon, *Direct association of interleukin-6 with a 130-kDa component of the interleukin-6 receptor system*. J.Biol.Chem., 1991. **268**: p. 2149-2153.
33. Stoyan, T., U. Michaelis, H. Schooltink, M. VanDam, R. Rudolph, P.C. Heinrich and S. Rose-John, *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol., 1993. **216**: p. 239-245.
34. Ward, L.D., A. Hammacher, G.J. Howlett, J.M. Matthews, L. Fabri, R.L. Moritz, E.C. Nice, J. Weinstock and R.J. Simpson, *Influence of Interleukin-6 (IL-6) Dimerization on Formation of the High Affinity Hexameric IL-6 Receptor Complex*. J.Biol.Chem., 1996. **271**: p. 20138-20144.
35. Yasukawa, K., T. Saito, T. Fukunaga, Y. Sekimori, Y. Koishihara, H. Fukui, Y. Oshugi, T. Matsuda, H. Yawata, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto, *Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells*. J. Biochem., 1990. **108**: p. 673-676.
36. Horsten, U., G. Müller-Newen, C. Gerhartz, A. Wollmer, J. Wijdenes, P.C. Heinrich and J. Grötzinger, *Molecular Modeling-guided Mutagenesis of the Extrazellular Part of gp130 leads to the Identification of contact sites in the Interleukin-6 (IL-6)IL-6 receptor gp130 Complex*. Journ. of Biol. Chem., 1997. **272**: p. 23748-23757.
37. Savino, R., L. Ciapponi, A. Lahm, A. Demartis, A. Cabibbo, C. Toniatti, P. Delmastro, S. Altamura and G. Ciliberto, EMBO J, 1994. **13**: p. 5863-5870.
38. Ehlers, M., J. Grötzinger, F.D. deHon, J. Müllberg, J.P.J. Brakenhoff, J. Liu, A. Wollmer and S. Rose-John, J.Immunology, 1994. **153**: p. 1744-1753.
39. Schiemann, W., J. Bartoe and N. Nathanson, *Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$ - and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 16631-16636.
40. Murakmai, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga and T. Kishimoto, *Critical cytoplasmic region of the interleukin-6 signaltransducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. **88**: p. 11349-11353.
41. Stahl, N., T. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinnen, G. Barbieri, S. Pellegrini, J.N. Ihle and G.D. Yancopoulos, *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6  $\beta$  receptor components*. Science, 1994. **263**: p. 92-95.
42. Lütticken, C., U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A.G. Harpur, A.F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, G. Barbieri, S. Pellegrini, M. Sendtner, P.C. Heinrich and F. Horn, *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. Science, 1994. **263**: p. 89-92.
43. Stahl, N., T. Farruggella, T. Boulton, Z. Zhong, J. Darnell jr. and G. Yancopoulos, *Choice of STATs and Other Substrates Specified by Modular Tyrosine-based Motifs in Cytokine Receptors*. Science, 1995. **267**: p. 1349-1353.
44. Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemman, C. Landgraf, J. Schneider- Mergener, F. Horn, P. Heinrich and L. Graeve, *Differential activation of acute phase reponse factor-STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 12991-13007.
45. Schoester, M., P.C. Heinrich and L. Graeve, *Regulation of the interleukin-6 receptor expression in human monocytes--a re-examination*. FEBS Lett., 1994. **345**: p. 131-134.

46. Saito, M., K. Yoshida, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 transducer, gp130*. J.Immunol., 1992. **297**: p. 4066-4071.
47. Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto, *Structure-function analysis of human IL-6 receptor-dissociation of amino acid residues required for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130*. EMBO J., 1993. **12**: p. 1705-1712.
48. Kalai, M., F.A. Montero-Julian, J. Grotzinger, A. Wollmer, D. Morelle, J. Brochier, S. Rose-John, P.C. Heinrich, H. Brailly and J. Content, *Participation of two Ser-Ser-Phe-Tyr repeats in interleukin-6 (IL-6) binding sites of the human IL-6 receptor*. Eur J Biochem., 1996. **238**: p. 714-723.
49. Simpson, R.J., D.K. Hammacher, D.K. Smith, J.M. Matthews and L.D. Ward, *Interleukin-6: Structure-function relationships*. Protein Science, 1997. **6**: p. 929-955.
50. Tanner, J.W., W. Chen, R.L. Young, G.D. Longmore and A.S. Shaw, *The Conserved Box 1 Motif of Cytokine Receptors Is Required for Association with JAK Kinases*. J Biol Chem., 1995. **270**: p. 6523-6530.
51. Ihle, J.N., B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, K. Yamamoto, W.E. Thierfelder, B. Kreider and O. Silvennoinen, *Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**: p. 222-227.
52. Schindler, C., K. Shuai, V. Prezioso and J. Darnell jr., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. Science, 1992. **257**: p. 809-813.
53. Schindler, C., X. Fu, T. Improtta, R. Aebersold and J. Darnell jr., *Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 7836-7839.
54. Ihle, J., *STATs: Signal transducers and activators of transcription*. Cell, 1996. **84**: p. 331-334.
55. Batolato, R. and J. Oppenheim, *Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis*. Semin Arthritis Rheum, 1996. **26**: p. 526-538.
56. Shinizu, S., T. Hirano, R. Yoshioka, S. Sugai, T. Matsuda, T. Taga, T. Kishimoto and S. Konda, *Interleukin-6 (B-cell stimulatory factor)-dependent growth of a Lennert's lymphoma-derived T-cell line (KT-3)*. Blood, 1988. **72**: p. 1826-1828.
57. Screpanti, I., P. Musiani, D. Bellavia, M. Capelletti, F. Aiello, M. Maroder, L. Frati, A. Modesti, A. Gulino and V. Poli, *Inactivation of the IL-6 Gene Prevents Development of Multicentric Castleman's disease in C/EBPbeta-deficient mice*. J. Exp. Med., 1996(184): p. 1561-1566.
58. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. Journ. of Path., 1997. **181**: p. 257-266.
59. Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka, A. Kuramoto and T. Kishimoto, *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma*. Nature, 1988. **332**: p. 83-85.
60. Klein, B. and R. Bataille, *Cytokine network in human multiple myeloma*. Hematol. Oncol. Clin. North Am., 1992. **6**: p. 273-284.
61. Hardin, J., S. MacLeod and I. Grigorieva, *Interleukin-6 prevents dexamethason induced mzeloma cell death*. Blood, 1994. **84**: p. 3063-3070.

62. Simpson, R., A. Hammacher, D. Smith, J. Matthews and L. Ward, *Interleukin-6: Structure-function relationships*. Protein Science, 1997. **6**: p. 929-955.
63. Schedel, I., D. Peest, K. Stunkel, M. Fricke, G. Eckert and H. Deicher, *Idiotypic-bearing peripheral blood lymphocytes in human multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinaemia*. Scand J of Immunol, 1980. **11**: p. 437-444.
64. Riedel, D. and L. Pottern, *The epidemiology of multiple myeloma*. Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**: p. 225-247.
65. Hallek, M., P. Bergsagel and K. Anderson, *Multiple Myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process*. Blood, 1998. **91**: p. 3-21.
66. Abbas, A., A. Lichtman and J. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. 1994: p. 66-94, 188-203.
67. Bataille, R. and J. Harousseau, *Multiple Myeloma*. N Engl J of Med, 1997. **336**: p. 1657-1664.
68. Vidriales, M. and K. Anderson, *Adhesion of multiple myeloma cells to the bone marrow microenvironment: implications for future therapeutic strategies*. Mol Med Today, 1996. **10**: p. 425-431.
69. Vries, J., J. tenKate and F. Bosman, *p21ras in Carcinogenesis*. Pathol Res Pract, 1996. **192**: p. 658-668.
70. Neri, A., J.P. Murphy, L. Cro, D. Ferrero, C. Tarella, L. Baldini and R. Dalla-Favera, *Ras oncogene mutation in Multiple Myeloma*. J Exp Med, 1989. **170**: p. 1715-1725.
71. Weinberg, R., *The retinoblastoma gene and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**: p. 323-330.
72. Tasaka, T., H. Asou, R. Munker, J. Said, J. Berenson, R. Vesicio, M. Nagai, J. Tkahara and H. Koeffler, *Methylation of the p16INK4a gene in multiple myeloma*. Br J Haematol, 1998. **101**: p. 558-564.
73. Urashima, M., G. Teoh, D. Chauhan, Z. Hoshi, A. Ogata, S. Treon, R. Schlossman and K. Anderson, *Interleukin-6 overcomes p21WAF1 upregulation and G1 growth arrest by dexamethasone and interferon-gamma in multiple myeloma cells*. Blood, 1997. **90**: p. 279-89.
74. Teoh, G., M. Urashima, A. Ogata, D. Chauhan, J. DeCaprio, S. Treon, R. Schlossman and K. Anderson, *MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells*. Blood, 1997. **90**: p. 1982-92.
75. Goto, H., C. Shimazaki, E. Ashihara, K. Ohkawa and M. Nakagawa, *Effects of Interleukin-3 and Interleukin-6 on Peripheral Blood Cells from Multiple Myeloma Patients and Their Clinical Significance*. Acta Haematol, 1992. **88**: p. 129-135.
76. Goto, H., C. Shimazaki, E. Ashihara, M. Nakagawa and e. al, *Effects of Interleukin-6 on peripheral blood cells from multiple myeloma patients and their clinical significance*. Acta Haematol, 1992. **88**: p. 129-135.
77. Jelinek, D.F. and P.E. Lipsky, *The role of B-cell proliferation in the generation of immunoglobulin secreting cells in man*. J Immunol, 1983. **130**: p. 2597-2453.
78. Rabin, E., J.J. Mond, O. J. and P. W., *B-cell Stimulatory Factor 1 (BSF-1) prepares resting B-cells to enter S-Phase in Response to anti-IgM and lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1986. **164**: p. 517-531.

79. Alessandro, F., O. Colamonici and R. Nordan, *Direct association of IL-6 with a 130-kDa Component of the IL-6 Receptor System*. The Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(3): p. 2149-2153.
80. Bartl, R., B. Frisch and A. Fateh-Moghadam, *Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases*. American Journal of Clinical Pathology, 1987. **87**: p. 342.
81. Greipp, P.R., T.E. Witzig, N.J. Gonchoroff and e. al, *Immunofluorescence labeling indices in myeloma and related monoclonal gammopathies*. Mayo clinical Proceedings, 1987. **62**: p. 969.
82. Zhang, X.G., R. Bataille, J. Widjenes and B. Klein, *Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasia*. Cancer, 1992. **69**: p. 1373-1376.
83. Miyaura, C., Y. Ishimi, C.H. Jin and e. al, *Interleukin-6: its production by osteoblasts and activity to induce bone resorption*. J Bone Miner Res 4, 1989. **1**: p. 133.
84. Schwab, G., C. Siegall, A. Aarden, L. Neckers and R. Nordan, *Characterization of an Interleukin-6 mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line U266*. Blood, 1991. **77**: p. 587-593.
85. Hata, H., H. Xiao, M.T. Petrucci and e. al, *Interleukin-6 gene-expression in multiple myeloma*. Blood, 1993. **81**: p. 3357-3364.
86. Klein, B., *Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma*. Semin Hematol, 1995. **32**: p. 4-19.
87. Chen-Kiang, S., S. Hsu and Y. Hatkunam, *Nuclear signalling by interleucin-6*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**: p. 124-128.
88. Nilsson, K., H. Jernberg and M. Petterson, *IL-6 as growth factor for human myeloma cells - a short overview*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **166**: p. 3-12.
89. Gao, Y., I. Morita, N. Maruo, T. Kubota, S. Murota and T. Aso, *Expression of IL-6 receptor and gp130 in mouse bone marrow cells during osteoclast differentiation*. Bone, 1998. **22**: p. 487-493.
90. Portier, M., G. Rajzbaum, X. Zhang, M. Attal, C. Rusalen, J. Wijadenes, P. Mannoni, D. Maranchini, M. Piechaczyk, R. Bataille and e. al., *In vivo Interleukin-6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma*. Eur J Immunol, 1991. **21**: p. 1759-1762.
91. Zhang, X.G., J.P. Gaillard, N. Robillard, Z. Lu, Z. Gu, M. Jourdan, J. Boiron, R. Bataille and B. Klein, *Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma*. Blood, 1994. **83**: p. 1373-1376.
92. Billadeau, D., D. Jelinek, N. Shah, T. LeBien and B. VanNess, *Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6*. Cancer Research, 1995. **55**: p. 3640-6.
93. Uchiyama, H., B.A. Barut, A.F. Mohrbacher, D. Chauhan and K.C. Anderson, *Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion*. Blood, 1993. **82**: p. 3712-3720.
94. Chauhan, D., H. Uchizama, Y. Akbarali, M. Urashima, K. Yamamoto, T. Libermann and K. Anderson, *Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-KB*. Blood, 1996. **87**: p. 1104-1112.
95. Urashima, M., D. Chauhan, H. Uchiyama, G. Freeman and K. Anderson, *CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma*. Blood, 1995. **85**: p. 1903-1912.

96. Burger, R., J. Wendler, K. Antoni, G. Helm, J. Kalden and M. Gramatzki, *Interleukin-6 production in B-cell neoplasias and Castleman's disease: evidence for an paracrine loop*. Ann Hematol, 1994. **69**: p. 25-31.
97. Lapena, P., A. Prieto, J. Garcia-Suarez, E. Reyes, J. San Miguel and J.A.-M. Jorda, M., *Increased production of interleukin-6 by T lymphocytes from patients with multiple myeloma*. Exp Hematol, 1996. **24**: p. 26-30.
98. Zhang, X., J. Gu, Z. Lu, K. Yasukawa, G. Yancopoloulos, K. Turner, M. Shoyab, T. Taga, T. Kishimoto and R. Bataille, *Ciliary neutropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130*. J Exp Med, 1994. **179**: p. 1337-42.
99. Westendorf, J. and D. Jelinek, *Growth regulatory pathways in myeloma. Evidence for autocrine oncostatin M expression*. J Immunol, 1997. **157**: p. 3081-8.
100. Gu, Z., V. Costes, Z. Lu, X. Zhang, V. Pitard, J. Moreau, R. Bataille, J. Wijdenes, J. Rossi and B. Klein, *Interleukin-10 is a growth factor for human myeloma cells by induction of an oncostatin M autocrine loop*. Blood, 1996. **88**: p. 3972-86.
101. Lu, Z.Y., R. Bataille, P. Poubelle, M.J. Rapp, J.L. Harousseau and B. Klein, *An interleukin-1 receptor antagonist blocks the il-1 induced il-6 paracrine production through a prostaglandin E2-related mechanism in multiple myeloma*. Stem cells, 1995. **13**(suppl2): p. 28-34.
102. Miyajima, A., T. Hara and T. Kitamura, *Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**: p. 378-382.
103. Portier, M., X.G. Zhang, E. Caron, Z. Lu, R. Bataille and K. B., *Gamma-interferon in multiple myeloma: inhibition of interleukin-6 -dependent myeloma cell growth and downregulation of IL-6-receptor expression in vitro*. Blood, 1993. **11**: p. 3076-3082.
104. Berger, L. and R. Hawley, *Interferon- $\beta$  interrupts interleukin-6-dependent signaling events in myeloma cells*. Blood, 1997. **89**: p. 261-271.
105. Bataille, R., M. Jourdan, X.G. Zhang and e. al, *Serum levels of Interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflection of disease severity in plasma cell dyscrasias*. Journal of clinical investigation, 1989. **84**: p. 2004.
106. Ludwig, H., D.M. Nachbaur, E. Fritz and e. al., *Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma*. Blood, 1991. **77**: p. 2794.
107. Emile, C., J.-P. Femand and F. Danon, *Interleukin-6 Levels in Patients with Multiple Myeloma*. Br J Hematology, 1994. **86**: p. 439-440.
108. Pulki, K., T.T. Pelliniemi, A. Rajamäki, A. Tienharra, M. Laakso and R. Lahtinen, *Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in Multiple Myeloma*. Br J Hematology, 1996. **92**: p. 370-374.
109. Merlini, G., V. Perfetti, P. Gobbi and E. Ascari, *Acute phase proteins and prognosis in multiple myeloma*. Br J Hematology, 1993. **83**: p. 595-601.
110. Bataille, R., M. Boccadoro, B. Klein, B. Durie and A. Pilerie, *C-Reactives Protein and beta-2 Microglobulin Produce a simple and Powerful Myeloma Staging System*. Blood, 1992. **80**(3): p. 733-737.
111. Ibelgaufts, H., *EPO*. Lexikon Zytokine, 1992. **Medikon Verlag München**: p. 83-86.
112. Porter, L. and M. Goldberg, *Regulation of Erythropoietin production*. Exp Hematol, 1993. **21**: p. 399-404.

113. Bondurant, M. and M. Kourz, *Anemia induces accumulation of erythropoietin m-RNA in the kidney and liver*. Mol Cell Biol, 1986. **6**: p. 2731-2733.
114. Vogt, C., S. Pentz and I. Rich, *A role for macrophage in normal hemopoiesis:III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization*. Exp Hematol, 1989. **17**: p. 391-397.
115. Jeffreys, R., J. Napier and S. Reynolds, *Erythropoietin levels in the posterior fossa haemangioblastoma*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1982. **4**: p. 264-266.
116. Rosenlof, K., F. Fzhrquist and C. Gronhagen-Riska, *Erythropoietin and renin substrate in cerebellar haemangioblastoma*. Acta Med Scand, 1985. **218**: p. 481-485.
117. Murphy, G., H. Brendler and E. Mirand, *Erythropoietin release from renal cell carcinomas grown in tissue culture*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1970. **1**: p. 617-625.
118. DaSilva, J., C. Lacombe, P. Bruneval, N. Casadevall, M. Leporrier, J. Camillieri, J. Bariety, P. Tambourin and B. Varet, *Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia*. Blood, 1990. **75**: p. 577-582.
119. Okabe, T., A. Urabe, T. Kato, S. Chiba and F. Takatu, *Production of erythropoietin-like activity by human renal and hepatic carcinomas in cell culture*. Cancer, 1985. **55**: p. 1918-1923.
120. Fried, W., *The liver is a source is sorce of extrarenal erythropoietin production*. Blood, 1972. **40**: p. 671-677.
121. Koury, S. and M. Bondurant, *Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood, 1992. **77**: p. 524-527.
122. Bachmann, S., M. Le Hir and K. Eckehardt, *Co-localization of erythropoietin m-RNA and ecto-5-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**: p. 335-341.
123. Maxwell, A., T. Lappin, C. Johnston, J. Bridges and M. McGeowin, *Erythropoietin production in kidney tubular cells*. Br J Hemato, 1990. **74**: p. 535-539.
124. Koury, S., M. Bodurant, M. Koury and G. Semenza, *Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization*. Blood, 1991. **77**: p. 2497-2503.
125. Schuster, S., S. Koury, M. Bohrer, S. Salceda and J. Caro, *Cellular sites of extrarenal erythropoietin production in anaemic rats*. Br J Haematol, 1992. **81**: p. 153-159.
126. Romanowski, R. and A. Sytkowski, *The Moelcular Structure of Human Erythropoietin*. Hematology/Oncology Clinics of North America, 1994. **8**(5): p. 885-894.
127. Koury, M. and M. Bondurant, *Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells*. Sience, 1990. **248**: p. 378-381.
128. Huang, L. and H. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gen expression*. Curr Opin Hematology, 1995. **2**: p. 125-131.
129. Pugh, C., C. Tan, R. Jones and P. Ratcliff, *Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**: p. 10553-10557.

130. Semenza, G. and G. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 5447-5454.
131. Bunn, H. and R. Poyton, *Oxygen Sensing and Molecular Adaption to Hypoxia*. Physiol Rev, 1996. **76**: p. 839-885.
132. Wang, G. and G. Semenza, *General involvement of hypoxia inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 4304-4308.
133. Semenza, G., P. Roth, H. Fang and G. Wang, *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 23757-23763.
134. Jelkmann, W., *Biology of Erythropoietin*. Clin Invest, 1994. **72**: p. S3-10.
135. Bunn, H., *Pathophysiology of the Anemias*. Harrisons Principle of Internal Medicine, Thirteenth Edition, 1994: p. 1717-1721.
136. Moritz, K., G. Lim and E. Wintour, *Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis*. Am J Physiol, 1997. **273**: p. R1829-R1844.
137. Schmitt, R., E. Bruyns and H. Snodgrass, *Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression*. Genes Dev, 1991. **5**: p. 728-740.
138. Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch and H. Lodish, *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. Cell, 1995. **83**: p. 59-67.
139. Medvinsky, A. and E. Dzierzak, *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region*. Cell, 1996. **86**: p. 897-906.
140. Nakano, T., H. Kodama and T. Honjo, *In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors*. Science, 1996. **272**: p. 722-724.
141. D'Andrea, A., H. Lodish and G. Wong, *Expression Cloning of the Murine Erythropoietin Receptor*. Cell, 1989. **57**: p. 277-285.
142. Damen, J. and G. Krystal, *Early events in erythropoietin-induced signaling*. Exp Hematol, 1996. **24**: p. 1455-1459.
143. Wu, H., U. Klingmüller, P. Besmer and H. Lodish, *Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors*. Nature, 1995. **377**: p. 242-246.
144. Klingmüller, U., H. Wu, J. Hsiao, A. Toker, B. Duckworth, L. Cantley and H. Lodish, *Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 3016-3021.
145. Iwatsuka, K., T. Endo, H. Misawa, M. Yokouchi, A. Matsumoto, M. Ohtsubo, K. Mori and A. Yoshimura, *STAT5 activation correlates with erythropoietin receptor mediated erythroid differentiation of an erythroleukemia cell line*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 8149-8152.
146. Ihle, J., F. Quelle and O. Miura, *Signaltransduction through the receptor for erythropoietin*. Semin Immunol, 1993. **5**: p. 375-389.
147. Quelle, D., F. Quelle and D. Wojchowski, *Mutation oin the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 4553-4561.



148. Yoshimura, A., T. Zimmers, D. Neumann, G. Longmore, Y. Yoshimura and H. Lodish, *Mutation in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 11619-11625.
149. Zon, L., J. Moreau, J. Koo, B. Mathey-Prevot and A. D'Andrea, *The erythropoietin receptor transmembrane region is necessary for activation by the Friend spleen focus-forming virus gp-55 glycoprotein.* Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 2949-2957.
150. Longmore, G. and H. Lodish, *An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleucemia in mice: a cytokine receptor superfamily.* Cell, 1991. **67**: p. 1089-1102.
151. D'Andrea, A., A. Yoshimura, H. Youssoufian, L. Zon, J. Koo and H. Lodish, *The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains.* Mol Cell Biol, 1991. **11**: p. 1980-1987.
152. Nakamura, Y., N. Komatsu and H. Nakauchi, *A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells.* Science, 1992. **257**: p. 1138-1141.
153. Miura, O., A. D'Andrea, D. Kabat and J.N. Ihle, *Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis.* Mol Cell Biol, 1991. **11**: p. 4895-902.
154. Witthuhn, B.A., F.W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura and J.N. Ihle, *JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin.* Cell, 1993. **74**: p. 227-236.
155. Klingmüller, U., U. Lorenz, L.C. Cantley, B.G. Neel and H.F. Lodish, *Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals.* Cell, 1995. **80**: p. 729-738.
156. Ihle, J.N., *The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling.* Semin Immunol, 1995. **7**: p. 247-254.
157. Kirito, K., M. Uchida, M. Yamada, Y. Miura and N. Komatsu, *A Distinct Function of STAT Proteins in Erythropoietin Signal Transduction.* Journ. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 16507-16513.
158. Lewin, B., *Oncogenes: gene expression and cancer.* Genes V. 1995. 1181-1229.
159. Bates, S. and K. Vousden, *p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis.* Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**: p. 12-19.
160. Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsdaira and J. Darnell, *Cell to Cell Signaling: Hormones and Receptors.* Molecular Cell Biology, 1995. **Third Edition**: p. 853-922.
161. Pawson, T., *Protein modules and signalling networks.* Nature, 1995. **373**: p. 573-579.
162. Wenqing, S., S. Harrison and M. Eck, *Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src.* Nature, 1997. **385**: p. 595-601.
163. Tanaguchi, T., *Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases.* Science, 1995. **268**: p. 251-255.
164. Taniguchi, T., *Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases.* Science, 1995. **268**: p. 251-255.

165. Hatakeyama, M., H. Mori, T. Doi and T. Taniguchi, *A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization*. Cell, 1989. **59**: p. 837-845.
166. Yhu, M., J. Berry, S. Russell and W. Leonard, *Delineations of the Regions of Interleukin-2 (IL-2) Receptor beta Chain Important for Association of Jak1 and Jak3*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 10719-10725.
167. Miyazaki, T., A. Kawahara, H. Fujii, Y. Nakagawa, Y. Minami, Z. Liu, I. Oishi, O. Silvenioinen, B. Witthuhn, J. Ihle and T. Taniguchi, *Functional Activation of Jak1 and Jak3 by Selective Association with IL-2 Receptor Subunits*. Science, 1994. **266**: p. 1045-1047.
168. Ihle, J. and I. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. Trends Genet, 1995. **11**: p. 69-74.
169. Horak, I.D., R.E. Gress, P.J. Lucas, E.M. Horak, T.A. Waldmann and J.B. Bolen, *T-lymphocyte interleukin 2-dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56lck*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**: p. 1996-2000.
170. Hatakeyama, M., T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S.D. Levin, R. Perlmutter and T. Taniguchi, *Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56<sup>lck</sup>: identification of novel intermolecular association*. Science, 1991. **252**: p. 1523-1528.
171. Kono, T., Y. Minami and T. Taniguchi, *The Interleukin-2 receptor complex and signal transduction of the beta chain*. Semin Immunol, 1993. **5**: p. 299-307.
172. Resh, M., *Myristylation and Palmitoylation of Src Family Members: The Fats of the matter*. Cell, 1994: p. 411-413.
173. Schwartzberg, P., *The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase*. Oncogene, 1998. **17**: p. 1463-1468.
174. Chow, L. and A. Veillette, *The Src and Csk families of tyrosine protein kinases in hematopoietic cells*. Semin Immunol, 1995. **7**: p. 207-226.
175. Turner, J., M. Brodsky, B. Irving, S. Levin, R. Perlmutter and D. Littman, *Interaction of the unique N-terminal Region of tyrosine kinase p56Lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs*. Cell, 1990. **60**: p. 755-765.
176. Sicheri, F., I. Moarefi and J. Kuriyan, *Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck*. Nature, 1997. **385**: p. 602-609.
177. Cartwright, C., W. Eckart, S. Simon and P. Kaplan, *Cell Transformation by pp60c-Src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain*. Cell, 1987. **49**: p. 83-91.
178. Cooper, J.A. and B. Howell, *The when and how of src regulation*. Cell, 1993. **73**: p. 1051-1054.
179. Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. Lee, J. Kuriyan and T. Miller, *Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement*. Nature, 1997. **385**: p. 650-653.
180. Erpel, T., G. Superti-Furga and S. Curtneidge, *Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions*. EMBO, 1995. **14**: p. 963-975.
181. Clevenger, C. and M. Medaglia, *The Protein Tyrosine Kinase p59Fyn Is Associated with Prolactin (PRL) Receptor and Is Activated by PRL Stimulation of T-Lymphocytes*. 1994. **8**: p. 674-681.

182. Ghazizadeh, S., J. Bolen and H. Fleit, *Physical and Functional Association of Src-related Protein Tyrosine Kinases with FCgammaRII in Monocytic THP-1 cells*. J Biol Chem, 1993. **269**: p. 8878-8884.
183. Vonakis, B., H. Chen, H. Haleem-Smith and H. Metzger, *The Unique Domain as the Site on Lyn Kinase for Its Constitutive Association with the High Affinity Receptor for IgE*. Journ. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 24072-24080.
184. Li, Y., B. Shen, C. Karanes, L. Sensenbrenner and B. Chen, *Association between Lyn Protein Tyrosine Kinase (p53/56Lyn) and the  $\beta$  subunit of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Receptors in a GM-CSF-Dependent Human Megakaryocytic Leukemia Cell Line (M-07e)*. J Immunol, 1995. **154**: p. 2165-2174.
185. Kurosaki, T., M. Takata, Y. Yamanashi, T. Inazu, T. Taniguchi, T. Yamamoto and H. Yamamura, *Syk Activation by the Src-family Tyrosine Kinase in the B Cell Receptor Signaling*. J Exp Med, 1994. **179**: p. 1725-1729.
186. Nada, S., T. Yagi, H. Takeda, T. Tokunaga, H. Nakagawa, Y. Ikawa, M. Okada and S. Aizawa, *Constitutive Activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk*. Cell, 1993. **73**: p. 1125-1135.
187. Imamoto, A. and P. Soriano, *Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1117-1124.
188. Chow, L.M.L., M. Fournei, D. Davidson and A. Veillette, *Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk*. Nature, 1993. **365**: p. 156-160.
189. Hata, A., H. Sabe, T. Kurosaki, M. Takata and H. Hnafusa, *Functional Analysis of Csk in signal transduction through the B-cell antigen receptor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 7306-7313.
190. Schlaepfer, D., K. Jones and T. Hunter, *Multiple Grb2-Mediated Intergrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2571-2585.
191. Schlaepfer, D., M. Broome and T. Hunter, *Fibronectin-stimulated Signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and NCK adaptor (sic) proteins*. Mol Cell Biol, 1997. **17**: p. 1702-1713.
192. Zhu, T., E. Goh and P. Lobie, *Growth Hormone Stimulates the Tyrosine Phosphorylation of p125 Focal Adhesion Kinase (FAK) with JAK2*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 10682-10689.
193. VanOers, N. and A. Weiss, *The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling process*. Semin Immunol, 1995. **7**: p. 227-236.
194. Aoki, Y., Y. Kim, R. Stillwell, T. Kim and S. Pillai, *The SH-Domains of Src Family Kinases Associate with Syk*. J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15658-15663.
195. Couture, C., S. Williams, N. Gauthier, P. Tailor and T. Mustelin, *Role of Tyr518 and Tyr519 in the regulation of catalytic activity and substrate phosphorylation by Syk protein-tyrosine kinase*. Eur J Biochem, 1998. **246**: p. 447-451.
196. Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto and M. Wigle, *In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase*. Cell, 1985. **40**: p. 27-36.
197. Beitel, G., S. Clark and H. Horovitz, *Caenorhabditis elegans ras gene let-60 acts as a switch in the pathway of vulval induction*. Nature, 1990. **348**: p. 503-509.

198. Simon, M., D. Bowtell, S. Dodson, T. Laverty and G. Rubin, *Ras 1 and a Putative Guanine Nucleotide Exchange Factor Perform Crucial Steps in Signaling by the Sevenless Protein Tyrosine Kinase*. Cell, 1991. **67**: p. 701-716.
199. Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba and M. Katsuki, *K-Ras is essential for the development of the mouse embryo*. Oncogen, 1997. **15**: p. 1151-1159.
200. Umanoff, H., W. Edelman, A. Pellicer and R. Kucherlapati, *The murine N-ras gene is not essential for growth and development*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 1709-1713.
201. Smith, M., S. DeGudicibus and D. Stacy, *Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation*. Nature, 1986. **320**: p. 540-543.
202. Campbell, S., R. Khosravi-Far, K. Rossman, G. Clark and C. Der, *Increasing complexity of Ras signaling*. Oncogene, 1998. **17**: p. 1395-1413.
203. Haubruck, H. and F. McCormick, *Ras p21: effects and regulation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**: p. 215-229.
204. Cawthon, R., R. Weiss, G. Xu, D. Viskochil, M. Culver, J. Stevens, M. Robertson, D. Dunn, R. Gesteland, P. O`Connell and R. White, *A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: c-DNA sequence, genomic structure, and point mutations*. Cell, 1990. **62**: p. 193-201.
205. Buday, L. and J. Downward, *Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor*. Cell, 1993. **73**: p. 611-620.
206. Marshall, M.S., *The effector interactions of p21<sup>ras</sup>*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**: p. 250-254.
207. Downward, J., *The GRB2/Sem-5 adapter protein*. FEBS Lett, 1993. **338**: p. 113-117.
208. Chardin, P., J.H. Camonis, N.W. Gale, A.L. van, J. Schlessinger, M.H. Wigler and D. Bar-Sagi, *Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1338-1343.
209. Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis and J. Schlessinger, *Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 85-88.
210. Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson and D. Bowtell, *The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1*. Nature, 1993. **363**: p. 83-85.
211. Aronheim, A., D. Engelberg, L. Nanxin, N. Al-Alawi, r.J. Schlessinger and M. Karin, *Membrane Targeting of the Nucleotide Exchange Factor Sos Is Sufficient for Activating the Ras Signaling Pathway*. Cell, 1994. **78**: p. 949-961.
212. Skolnik, E.Y., A. Batzer, N. Li, C.H. Lee, E. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis and J. Schlessinger, *The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways*. Science, 1993. **260**: p. 1953-1955.
213. Baltensperger, K., L.M. Kozma, A.D. Cherniack, J.K. Klarlund, A. Chawla, U. Banerjee and M.P. Czech, *Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes*. Science, 1993. **260**: p. 1950-1952.
214. Yang, S., L. VanAelst and D. Bar-Sagi, *Differential Interactions of human Sos1 and Sos2 with Grb2*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 18212-18215.

215. Nielsen, K., A. Papageorge, W. Vass, B. Willumsen and D. Lowy, *The Ras Specific Exchange Factors Mouse Sos1 (mSos1) and mSos2 Are Regulated Differently: mSos2 Contains Ubiquitination Signals Absent in mSos1*. Mol Cell Biol, 1997. **17**: p. 7132-7138.
216. Matuoka, K., M. Shibata, A. Yamakawa and T. Takenawa, *Cloning of Ash, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH)2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 9015-9019.
217. Lowenstein, E.J., R.J. Daly, A.G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E.Y. Skolnik, D. Bar-Sagi and J. Schlessinger, *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**: p. 431-442.
218. Li, W., r. Nishimura, A. Kashishian, A. Batzer, W. Kim, J. Cooper and J. Schlessinger, *A new function for phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 509-517.
219. Cheng, A., T. Saxton, R. Sakai, S. Kulkarni, G. Mbamalu, W. Vogel, C. Tortorice, R. Cardiff, J. Cross, W. Muller and T. Pawson, *Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation*. Cell, 1998. **95**: p. 793-803.
220. Bonfini, L., E. Migliaccio, G. Pelicci, L. Lanfrancone and P. Pelicci, *Not all Shc's roads lead to Ras*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**: p. 257-261.
221. Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson and P.G. Pelicci, *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. Cell, 1992. **70**: p. 93-104.
222. Zhu, X., K. Suen, M. Barbacid, J. Bolen and J. Fargnoli, *Interleukin-2-induced tyrosine phosphorylation of Shc proteins correlates with factor-dependent T-cell proliferation*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 5518-5522.
223. Dorsch, M., H. Hock and T. Diamantstein, *Tyrosine Phosphorylation of Shc is Induced by IL-3, IL-5 and GM-CSF*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **15**: p. 562-568.
224. Liu, L., J. Damen, R. Cutler and G. Krystal, *Multiple Cytokines Stimulate the Binding of a Common 145-Kilodalton Protein to Shc at the Grb2 Recognition Site of Shc*. Mol Cell Biol, 1994. **268**: p. 6926-6935.
225. Batzer, A., D. Rotin, J. Urena, E. Skolnik and J. Schlessinger, *Hierarchy of Binding Sites for Grb2 and Shc on the Epidermal Growth Factor Receptor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 5192-5201.
226. Sasaoka, T., D. Rose, B. Jhun, A. Saltiel, B. Draznin and J. Olesfsky, *Evidence for a Functional Role of SHC Proteins in Mitogenic Signaling Induced by Insulin, Insulin-like Growth Factor-1, and Epidermal Growth Factor*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 13689-13694.
227. Kumar, G., S. Gupta, S. Wang and A. Nel, *Involvement of Janus Kinases, p52Shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade of a Growth-Responsive B-Cell Line*. J Immunol, 1994. **153**: p. 4436-4447.
228. Matsuguchi, T., R. Salgia, M. Hallek, M. Eder, B. Druker, T. Ernst and J.D. Griffin, *Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and Steel factor and is constitutively increased by p210<sup>Bcr/abl</sup>*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 5016-5021.
229. Welham, M.J., V. Duronio, K. Leslie, D. Bowtell and J.W. Schrader, *Multiple hemopoietins, with the exception of interleukin-4, induce modification of Shc and mSos1, but not their translocation*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 21165-76.

230. Tauchi, T., H.S. Boswell, D. Leibowitz and H.E. Broxmeyer, *Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to Ras-activation pathway*. J Exp Med, 1994. **179**: p. 167-175.
231. Damen, J.E., L. Liu, R.L. Cutler and G. Krystal, *Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-Kd tyrosine phosphorylated protein*. Blood, 1993. **82**: p. 2296-2303.
232. Lioubin, M.N., G.M. Myles, K. Carlberg, D. Bowtell and L.R. Rohrschneider, *Shc, Grb2, Sos1, and a 150-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein form complexes with Fms in hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 5682-5691.
233. Buday, L., S.E. Egan, P.R. Rodriguez, D.A. Cantrell and J. Downward, *A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 32-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in Ras activation in T cells*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 9019-9023.
234. Ravichandran, K.S. and S.J. Burakoff, *The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 1599-1602.
235. Pronk, G.J., J. McGlade, G. Pelicci, T. Pawson and J.L. Bos, *Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 5748-53.
236. Benjamin, C. and D. Jones, *Platelet-derived growth factor stimulates growth factor receptor binding protein-2 association with Shc in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 30911-30916.
237. McGlade, J., A. Cheng, G. Pelicci, P.G. Pelicci and T. Pawson, *Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**: p. 8869-73.
238. Dilworth, S., C. Brewster, M. Jones, L. Lanfrancone, J. Pelicci and P. Pelicci, *Transformation by polyoma virus middle T-antigen involves the binding and tyrosine phosphorylation of SHC*. Nature, 1994. **367**: p. 87-90.
239. Webster, M., J. Hutchinson, RauhMJ., S. Muthuswamy, M. Anton, C. Tortorice, R. Cardiff, F. Graham, J. Hassel and W. Muller, *Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis*. Mol. Cell.Biol., 1998. **18**: p. 2344-2359.
240. Stephens, R., G. Sithanandam, T. Copeland, D. Kaplan, U. Rapp and D. Morrison, *95-Kilodalton B-Raf Serine/Threonine Kinase: Identification of the Protein and its Major Autophosphorylation Site*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 3733-3742.
241. Kizaka-Kondoh, S., K. Sato, K. Tamura, H. Nojima and H. Okayama, *Raf-1 Protein Kinase is an Integral Component of the Oncogenic Signal Cascade Shared by Epidermal Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 5078-5086.
242. Vojtek, A., S. Hollenberg and J. Cooper, *Mammalian Ras Interacts with the Serine/Threonine Kinase Raf*. Cell, 1993. **74**: p. 205-214.
243. Zhang, X., J. Settleman, J. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. Elledge, M. Marshall, J. Bruder, U. Rapp and J. Avruch, *Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the aminoterminal regulatory domain of c-Raf-1*. Nature, 1993. **364**: p. 308-313.
244. Kyriakis, J., H. App, X. Zhang, P. Banerjee, D. Brautigan, U. Rapp and J. Avruch, *Raf activates MAP Kinase Kinase*. Nature, 1992. **358**: p. 417-421.

245. Haystead, T., P. Dent, J. Wu and C.S. Haystead, T., *Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase*. FEBS Lett, 1992. **306**: p. 17-22.
246. Janknecht, R., W. Ernst, V. Pingoud and A. Nordheim, *Activation of ternary complex factor ELK-1 by Map kinases*. EMBO J, 1993. **12**: p. 5097-5104.
247. Marais, R., J. Wynne and R. Treisman, *The SRF Accessory Protein ELK-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain*. Cell, 1993. **73**: p. 381-393.
248. Ibelgaufts, H., *SRE*. Lexikon Zytokine, 1992. **Medikon Verlag München**: p. 214.
249. Treishman, R., *The serum response element*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**: p. 423-426.
250. Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto and S. Akira, *Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 2207-2211.
251. Howe, L., S. Leever, N. Gomez, S. Nakienly, P. Cohen and C. Marshall, *Activation of the MAP kinase pathway the protein kinase raf*. Cell, 1992. **71**: p. 335-342.
252. Seth, A., F. Gonzales and R. Davis, *Signaltransduction within the nucleus by MAP-kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 24796-24804.
253. Roberts, T., *A signal chain of events*. Nature, 1992. **360**: p. 534-535.
254. Lin, L., M. Wartman, A. Lin, J. Knopf, A. Seth and R. Davis, *cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase*. Cell, 1993. **72**: p. 269-278.
255. Blenis, J., *Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 5889-5892.
256. Scatchard, G., *The attractions of proteins for small molecules and ions*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949. **51**: p. 660-672.
257. Liboi, E., M. Carrol, D. D'Andrea and B. Mathey-Prevot, *Erythropoietin receptor signals both proliferation and erythroid-specific differentiation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 11351-11355.
258. Cooper, J., F. Esch, S. Taylor and T. Hunter, *Phosphorylation Sites in Enolase and Lactate Dehydrogenase Utilized by Tyrosine Protein Kinases in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 1984. **259**: p. 7835-7841.
259. Pleiman, C., M. Clark, L. Gauen, S. Winitz, K. Coggeshall, G. Johnson, A. Shaw and J. Cambier, *Mapping of sites on the Src family protein kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C gamma2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase*. Mol Cell Biol, 1993. **13**: p. 5877-5887.
260. Narazaki, M., B. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J.N. Ihle, T. Kishimoto and T. Taga, *Activation of JAK2 kinase by the interleukin 6 signal transducer gp130*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 2285-2289.
261. Courtneidge, S.A., R. Dhand, D. Pilat, G.M. Twamley, M.D. Waterfield and M.F. Roussel, *Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor*. EMBO J, 1993. **12**: p. 943-50.
262. Ernst, M., D.P. Gearing and A.R. Dunn, *Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells*. EMBO J., 1994. **13**: p. 1574-1584.

263. Torigoe, T., R. O'Connor, D. Santoli and J.C. Reed, *Interleukin-3 regulates the activity of the LYN protein-tyrosine kinase in myeloid-committed leukemic cell lines*. Blood, 1992. **80**: p. 617-624.
264. Nakafuku, M., T. Satoh and Y. Kaziro, *Differentiation factors, including nerve growth factor, fibroblast growth factor and interleukin-6 induce accumulation of an active Ras GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 19448-54.
265. Schlessinger, J., *How receptor tyrosine kinases activate ras*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**: p. 273-275.
266. Satoh, T., Y. Minami, T. Kono, A. Kawahara, T. Taniguchi and Y. Kaziro, *Interleukin-2-induced Activation of Ras Requires Two Domains of Interleukin 2 Receptor beta Subunit, the Essential Region for Growth Stimulation and Lck-binding Domain*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 25423-25427.
267. Dusanter-Fourt, I., C. Lacombe, O. Muller, C. Billat, S. Fischer and P. Mayeux, *Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin responsive cells*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 10670-10675.
268. Damen, J., A.L.-F. Mui, P. Hughes, K. Humphries and G. Krystal, *Erythropoietin-induced tyrosine phosphorylation events in high erythropoietin receptor-expressing lymphoid cell line*. Blood, 1992. **80**: p. 1923-1932.
269. Torigoe, T., O.C. R., R. Fagard, S. Fischer, D. Santoli and J.C. Reed, *Regulation of SRC-family protein tyrosine kinases by interleukins, IL-2, and IL-3*. Leukemia, 1992. **6**: p. 94S-97S.
270. Silvenninen, O., B. Witthuhn, F. Quelle, J. Cleveland, T. Yi and J. Ihle, *Structure of the murine JAK2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 8429-8433.
271. Rider, L.G., N. Raben, L. Miller and C. Jelsema, *The cDNAs encoding two forms of the Lyn protein tyrosine kinase are expressed in rat mast cells and human myeloid cells*. Gene, 1994. **138**: p. 219-222.
272. Derventzi, A., S. Rattan and E. Gonos, *Molecular links between cellular mortality and immortality*. Anticancer Res, 1996. **16**: p. 2091-2910.
273. Komatsu, N., H. Nakauchi, A. Miwa, T. Ishihara, M. Eguchi, M. Moroi, M. Okada, Y. Sato, H. Wada and Y. Yawata, *Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating actor, interleukin-3, or erythropoietin for growth and survival*. Cancer Res, 1991. **51**: p. 341-348.
274. Ruscetti, S., N. Janesch, A. Chakraborti, S. Sawyer and W. Hankins, *Friend spleen focus-forming virus induces factor independence in an erythropoietin-dependent erythroleukemia cell line*. J Virol, 1990. **64**: p. 1057-62.
275. Mathey-Prevot, B., G. Nabel, R. Palacios and D. Baltimore, *Abelson virus abrogation of interleukin-3 dependence in a lymphoid cell line*. Mol Cell Biol, 1986. **6**: p. 4133-4135.
276. Schwabe, M., A. Brinr, M. Bosco, F. Rubboli, M. Egawa, J. Zhao, G. Princler and H. Kung, *Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 loop in IL-6 dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta-chains*. J Clin Invest, 1994. **94**: p. 2317-2325.
277. Helle, M., L. Boeije and Aarden L., *Functional discrimination between interleukin-6 and interleukin-1*. Eur J Immunol, 1988. **18**: p. 1535-1540.



278. Katagiri, S., T. Yonezawa, J. Kuyama, Y. Kanayama, K. Nishida, T. Abe, T. Tamaki, M. Ohnishi and S. Tarui, *Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma*. International Journal of Cancer, 1985. **36**: p. 241-246.
279. Pegoraro, L., F. Malavasi, G. Bellone, M. Massaia, M. Boccadoro, G. Saglio, A. Guerrasio, G. Benetton, L. Lombardi, R. Coda and G. Avanzi, *The human myeloma cell line LP-1: a versatile model in which to study early plasma cell differentiation and myc-activation*. Blood, 1989. **73**: p. 1020-1027.
280. Hallek, M., C. Neumann, M. Schäffer, S. Danhauser-Riedl, N. Bubnoff von, G. Vos de, B. Druker, K. Yasukawa, J. Griffin and B. Emmerich, *Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck and Lyn*. Exp Hematol, 1997. **25**: p. 1367-1377.
281. Volkin, D. and A. Klibanov, *Minimizing protein inactivation*, in *Protein function*, T. Creighton, Editor. 1989, IRL Press at Oxford University Press 1989: Oxford. p. 1-22.
282. Boutin, J., *Tyrosine protein kinase assays*. J Chromatogr Biomed Appl, 1996. **684**: p. 179-199.
283. Cleaveland, J.L., M. Dean, N. Rosenberg, J.Y.J. Wang and U.R. Rapp, *Tyrosine kinase oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc: conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl*. Mol Cell Biol, 1989. **9**: p. 5685-5695.
284. Pierce, J.H., P.P. Di Fiore, S.A. Aaronson, M. Potter, J. Pumphrey, A. Scott and J.N. Ihle, *Neoplastic transformation of mast cells by Abelson-MuLV: abrogation of IL-3 dependence by a nonautocrine mechanism*. Cell, 1985. **41**: p. 685-93.
285. Hallek, M., B. Druker, E.M. Lepisto, K.M. Wood, T.J. Ernst and J.D. Griffin, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Steel factor induce phosphorylation of both unique and overlapping signal transduction intermediates in a human factor dependent hematopoietic cell line*. J Cell Physiol, 1992. **153**: p. 176-186.
286. Tojo, A., M. Kasuga, A. Urabe and F. Takaku, *Vanadate can replace interleukin 3 for transient growth of factor-dependent cells*. Exp Cell Res, 1987. **171**: p. 16-23.
287. Hallek, M., C. Neumann, B.J. Druker, J.D. Griffin and B. Emmerich, *Signal transduction of interleukin-6 (IL-6) in human plasmacytoma cell lines involves activation and tyrosine phosphorylation of the src-family kinase p56lyn*. J Cell Biochem, 1994. **18B**: p. 295.
288. Yi, T., A. Mui, L.F. Krystal and J. Ihle, *Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 receptor beta-chain and down regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**: p. 7577-7586.
289. Satoh, T., Y. Uehara and Y. Kaziro, *Inhibition of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulated increase of active ras.GTP by herbimycin A, a specific inhibitor of tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 2537-41.
290. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatase: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. **80**: p. 225-236.
291. Salcini, A., J. McGlade, G. Pelicci, I. Nicoletti, T. Pawson and P. Pelicci, *Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins*. Oncogene, 1994. **9**: p. 2827-2836.
292. Gale, N., S. Kaplan, E. Lowenstein, J. Schlessinger and D. Bar-Sagi, *Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras*. Nature, 1993. **363**: p. 88-92.

293. Ravichandran, K.S., U. Lorenz, S. Shoelson and S. Burakoff, *Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with Sos*. Mol Cell Biol, 1995. **15**: p. 593-600.
294. Boulton, T., N. Stahl and G. Yancopoulos, *Ciliary neurotrophic factor, leukemia inhibitory factor, interleukin 6, oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 11648-11655.
295. Barber, D., C. Corless, K. Xia, T. Roberts and A. D'Andrea, *Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTLL-epoR cells*. Blood, 1997. **89**: p. 55-64.
296. He, T., N. Jiang, H. Zhuang and D. Wojchowski, *Erythropoietin-induced recruitment of Shc via a receptor phosphotyrosine-independent, Jak2-associated pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 11055-11061.
297. Miura, Y., O. Miura, J. Ihle and N. Aoki, *Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 29962-9.
298. Sorkin, A., C. Waters, K. Overholser and G. Carpenter, *Multiple autophosphorylation site mutations of the epidermal growth factor receptor. Analysis of kinase activity and endocytosis*. J Biol Chem, 1991. **266**: p. 8355-8362.
299. Okutani, T., Y. Okabayashi, Y. Kido, Y. Sugimoto, K. Sakaguchi, K. Matuoka, T. Takenawa and M. Kasuga, *Grb2/Ash binds directly to tyrosines 1068 and 1086 and indirectly to tyrosine 1148 of activated human epidermal growth factor receptors in intact cells*. J Biol Chem, 1998. **269**: p. 31310-31314.
300. Ward, A., J. Monkhouse, J. Hamilton and X. Csar, *Direct binding of Shc, Grb2, SHP-2 and p40 to the murine granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1448**: p. 70-76.
301. Songyang, Y., S. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratsnoffsky, R. Lechleider, B. Neel, R. Birge, J. Fajardo, M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen and L. Cantley, *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, 1993. **72**: p. 767-778.
302. Damen, J., H. Wakao, A. Miyajima, J. Krosi, R. Humphries, R. Cutler and G. Krystal, *Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation*. EMBO J, 1995. **14**: p. 5557-5568.
303. Giordano, V., G. DeFalco, R. Chiari, I. Quinto, P. Pelicci, L. Bartholomew, P. Delmastro, M. Gadina and G. Scala, *Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase*. J Immunol, 1997. **158**: p. 4097-4103.
304. Wang, J., K. Auger, L. Jarvis, Y. Shi and T. Roberts, *Direct association of Grb2 with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 12774-12780.
305. Fukazawa, T., K. Reedquist, T. Trub, S. Solthoff, G. Panchamoorthy, B. Druker, L. Cantley, S. Shoelson and H. Band, *The SH3 domain-binding T cell tyrosyl phosphoprotein p120. Demonstration of its identity with the c-cbl protooncogene product and in vivo complexes with Fyn, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 19141-19150.
306. Dufourney, B., J. Albas, H. vanTeeffelen, F. vanSchaik, B. vanderBurg, P. Steenbergh and J. Sussenbach, *Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogenic-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 31163-31171.

307. Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp and J. Marshall, *Activation of MAP Kinase Kinase Is Necessary and Sufficient for PC12 Differentiation and for Transformation of NIH 3T3 Cells*. Cell, 1994. **77**: p. 841-852.
308. Taniguchi, T. and Y. Minami, *The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview*. Cell, 1993. **73**: p. 5-8.
309. Torigoe, T., H.U. Saragovi and J.C. Reed, *Interleukin 2 regulates the activity of the lyn protein tyrosine kinase in a B-cell line*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 2674-2678.
310. Taniguchi, T., T. Kobayashi, J. Kondo, K. Takahashi, H. Nakamura, J. Suzuki, K. Nagai, T. Yamada, S. Nakamura and H. Yamamura, *Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis*. J Biol Chem, 1991. **266**: p. 15790-6.
311. Taga, T. and T. Kishimoto, *Cytokine receptors and signal transduction*. FASEB J, 1992. **6**: p. 3387-96.
312. Kishimoto, T., T. Taga and S. Akira, *Cytokine signal transduction*. Cell, 1994. **76**: p. 253-262.
313. Taichman, R., I. Merida, T. Torigoe, G. Gaulten and J. Reed, *Evidence that protein tyrosine kinase p56-Lck regulates the activity of phosphoinositol-3-kinase in interleukin-2-dependent T-cells*. J Biol Chem, 1993. **27**: p. 20031-20036.
314. Chang, H., M. Aoki, D. Fruman, K. Auger, A. Bellacosa, P. Tsichlis, L. Cantley, T. Roberts and P. Vogt, *Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI3-Kinase*. Science, 1997. **276**: p. 1848-50.
315. Porter, A. and R. Vaillancourt, *Tyrosin kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis*. Oncogene, 1998. **16**: p. 1343-1352.
316. Ren, H., N. Komatsu, R. Shimizu, K. Okada and Y. Miura, *Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C- $\gamma$ 1 in a human erythropoietin-dependent cell line*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 19633-19638.
317. Rameh, L., S. Rhee, K. Spokes, A. Kazlauskas, L. Cantley and L. Cantley, *Phosphoinositide 3-Kinase regulates phospholipase C gamma-mediated calcium signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 23750-7.
318. Yin, T., R. Shen, G. Feng and Y. Yang, *Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 1032-7.
319. Craddock, B. and M. Welham, *Interleukin-3 induces association of the protein-tyrosine phosphatase SHP2 and phosphatidylinositol 3-Kinase with a 100-kDa tyrosine-phosphorylated protein in hemopoietic cells*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 29281-9.
320. Peng, Z. and C. Cartwright, *Regulation of the Src tyrosine kinase and Syp tyrosine phosphatase by their cellular association*. Oncogene, 1995. **11**: p. 1955-1962.
321. Kim, H., T. Hawley, R. Hawley and H. Baumann, *Protein tyrosine phosphatase (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 1525-33.
322. Matsuda, T., M. Takahashi-Tezuka, T. Fukada, Y. Okuyama, Y. Fujitani, S. Tsukada, H. Mano, O. Witte and T. Hirano, *Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinase by gp130, a signaltransducer of the interleukin-6 family of cytokines*. Blood, 1995. **85**: p. 627-33.

323. Daeipour, M., G. Kumar, M.C. Amaral and A. Nel, *Recombinant IL-6 activates p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in the IL-6 responsive B cell line , AF-10*. Journal of Immunology, 1993. **150**(11): p. 4743-4753.
324. Amaral, M., S. Miles, G. Kumar and A. Nel, *Oncostatin-M stimulates tyrosine protein phosphorylation in parallel with activation of p42MAPK/ERK-2 in Kaposi cells. Evidence that this pathway is important in Kaposi cell growth*. J Clin Invest, 1993. **92**: p. 848-57.
325. Witthuhn, B., F. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura and J. Ihle, *Jak2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin*. Cell, 1993. **74**: p. 227-236.
326. Sharlow, E., R. Pacifici, J. Crouse, J. Batac, K. Todokoro and D. Wojchowski, *Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells*. Blood, 1997. **90**: p. 2175-87.
327. Tauchi, T., J. Damen, K. Toyama, G. Feng, H. Broxmeyer and G. Krystal, *Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis*. Blood, 1996. **87**: p. 4495-501.
328. Shi, Z., W. Lu and G. Feng, *The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 4904-4908.
329. Bittdorf, T., R. Jaster, B. Ludtke, B. Kamper and J. Brock, *Requirement for Jak2 in erythropoietin-induced signalling pathways*. Cell Signal, 1997. **9**: p. 85-9.
330. Damen, J., R. Cutler, H. Jiao, T. Yi and G. Krystal, *Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI3-kinase activity*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 23402-8.
331. Damen, J., A.L.-F. Mui, L. Puil, T. Pawson and G. Krystal, *Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor*. Blood, 1993. **12**: p. 3204-3210.
332. Hanazono, Y., S. Chiba, K. Sasaki, H. Mano, Y. Yazaki and H. Hirai, *Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and kinase activity of the c-fps/fes proto-oncogene product in human erythropoietin responsive cells*. Blood, 1993. **81**: p. 3193-3196.
333. Twamley, G., R. Kypta and B.C. Hall, S., *Association of Fyn with the activated platelet-derived growth factor receptor: requirements for binding and phosphorylation*. Oncogene, 1992. **7**: p. 1893-1901.
334. Schieven, G., J. Kallestad, T. Brown, J. Ledbetter and P. Linsley, *Oncostatin M induces tyrosine phosphorylation in endothelial cells and activation of p62Yes tyrosine kinase*. J Immunol, 1992. **149**: p. 1676-82.
335. Fuhrer, D. and Y. Yang, *Activation of Src-family protein tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 mouse preadipocytes by interleukin-11*. Exp Hematol, 1996. **24**: p. 195-203.
336. Tilbrook, P., E. Ingley, J. Williams, M. Hibbs and S. Klinken, *Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2 erythroid cells*. EMBO J, 1997. **16**: p. 1610-1619.
337. Lee, C., K. Saksela, U. Mirza, B. Chait and J. Kuriyan, *Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain*. Cell, 1996. **85**: p. 931-942.

338. Kypta, R., Y. Goldberg, E. Ulug and S. Courtneidge, *Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases*. Cell, 1990. **62**: p. 481-92.
339. Bagrodia, S., S. Taylor and D. Shalloway, *Myristylation Is required for Tyr-527 dephosphorylation and activation of pp60 c-Src in mitosis*. Mol Cell Biol, 1993. **13**: p. 1464-1470.
340. Rivero-Lezcano, O., A. Marcilla and K. Robbins, *Mutations in the non-catalytic domains of Fyn and Fgr tyrosine kinases reveal differences in mechanisms of their regulation*. Oncogene, 1995. **11**: p. 2675-2679.
341. Somani, A., J. Bignon, G. Mills, K. Siminovitch and D. Branch, *Src-Kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 21113-21119.
342. Lorenz, U., K. Kodimangalam, S. Burakoff and B. Neel, *Lack of SH-PTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 9624-9629.
343. Migone, T., N. Cacalano, N. Taylor, T. Waldmann and J. Johnston, *Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-Lymphotropic virus type I-transformed T-cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**: p. 3845-3850.
344. Mustelin, T. and P. Burn, *Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**: p. 215-220.
345. Yanagi, S., H. Sugawara, M. Kurosaki, H. Sabe, H. Yamamura and T. Kurasaki, *CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells*. J Biol Chem, 1996. **271**: p. 30487-30492.
346. Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J.A. Cooper and H. Nakagawa, *Cloning of a complementary DNA for a protein tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory p60<sup>c-src</sup>*. Nature, 1991. **351**: p. 69-72.
347. Sun, G., A. Sharma and R. Buddle, *Autophosphorylation of Src and Yes blocks their inactivation by Csk phosphorylation*. Oncogene, 1998. **17**: p. 1587-1595.
348. Lowell, C. and P. Soriano, *Knockouts of Src-family kinases: Stiff bones, wimpy T cells, and bad memories*. Genes Dev, 1996. **10**: p. 1845-1857.
349. Molina, T., D. Kishihara, W. Siderovski, A. Van Ewijk, E. Narendran, A. Timms, C. Wakeham, K. Paige, A. Hartmann, V. Mak and M. TW., *Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck*. nature, 1992. **357**: p. 161-164.
350. Lowell, C., L. Fumagalli and G. Berton, *Deficiency of Src family kinases p59/61 and p58c/fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions*. J Cell Biol, 1996. **133**: p. 895-910.
351. Martin, G., *The hunting of the Src*. Nature Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**: p. 467-475.
352. Thomas, S. and J. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **13**: p. 513-609.
353. Kaplan, K., J. Swedlow, D. Morgan and H. Varmus, *c-Src enhances the spreading of src -/- fibroblasts on fibronectin by a kinase independent mechanism*. Genes Dev, 1995. **9**: p. 1505-1517.
354. Twamley-Stein, G., R. Pepperkok, W. Ansorge and S. Courtneidge, *The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 7696-7700.

355. Broome, M. and T. Hunter, *Requirement for c-Src catalytic activity and the SH-3 domain in platelet derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling*. J Biol Chem, 1996. **271**: p. 16798-16809.
356. Barone, M. and S. Courtneidge, *Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src*. Nature, 1995. **378**: p. 509-511.
357. Chiariello, M., M. Marinissen and J. Gutkind, *Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases*. nature cell biol, 2001. **3**: p. 580-586.
358. Gupta, S., A. Weiss, G. Kumar, S. Wang and A. Nel, *The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1994. **25**: p. 17349-17357.
359. Sunder-Plassmann, R. and E. Reinherz, *A p56Lck-independent pathway of CD2 signaling involves Jun kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 24249-24257.
360. Bell, G., J. Fargnoli, J. Bolen, L. Kish and J. Imboden, *The SH3 domain of p56Lck binds to proline-rich in the cytoplasmic domain of CD2*. J Exp Med, 1996. **183**: p. 169-178.
361. Bell, G., J. Bolen and J. Imboden, *Association of Src-like protein tyrosine kinases with the CD2 cell surface molecule in rat lymphocytes and natural killer cells*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 5548-5554.
362. Scheuermann, R.H., E. Racila, T. Tucker, E. Yefenof, N.E. Street, E.S. Vitetta, L.J. Picker and J.W. Uhr, *Lyn tyrosine kinase signals cell cycle arrest but not apoptosis in B-lineage lymphoma cells*. Proceedings in National Academic Sciences. USA, 1994. **91**: p. 4048-4052.
363. Yuan, Z., Y. Huang, S. Kraeft, L. Chen, S. Kharbanda and D. Kufe, *Interaction of cyclin-dependent kinase 2 and the Lyn tyrosine kinase in cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine*. Oncogene, 1996. **13**: p. 939-946.
364. Wang, Q., G. Studzinski, F. Chen, F. Coffman and L. Harrison, *p53/56Lyn Antisense shifts the 1,25-Dihydroxyvitamin D3-Induced G1/S Block in HL60 Cells to S Phase*. J Cell Physiol, 2000. **183**: p. 238-246.
365. Adachi, T., S. Stafford, S. Sur and R. Alam, *A novel Lyn-binding peptide inhibitor blocks eosinophi differentiation, survival, and airway eosinophilic inflammation*. J Immunol, 1999. **163**: p. 939-946.
366. Tilbrook, P., G. Palmer, T. Bittdorf, D. McCarthz, M. Wright, K. Sarna, D. Linnekin, V. Cull, J. Williams, E. Inglez, J. Schneider-Mergener, G. Krystal and S. Klinken, *Maturation of Erythroid Cells and Erythroleukemia Development Are Affected by the Kinase Activity of Lyn*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 2453-2458.
367. Teglund, S., C. McKaz and E. Schuetz, *Stat5a and Stat5b proteins have essentiell and nonessentiell or redundant, roles in cytokine responses*. Cell, 1998. **93**: p. 841-850.
368. Socolovsky, M., H. Nam, M. Fleming, V. Haase, C. Brugnara and H. Lodish, *Ineffective erythropoiesis in Stat5a-/- 5b-/- mice due to decreased survival of early erythroblasts*. Blood, 2001. **98**: p. 3261-3273.
369. Chin, H., A. Arai, H. Wakao, R. Kamizama, N. Miyasaka and O. Miura, *Lyn physically associates with the Erythropoietin receptor nad may play a role in actvation of the Stat5 pathway*. Blood, 1998. **91**: p. 3734-3745.
370. Argetsinger, L.S., G.S. Campbell, X. Yang, B.A. Witthuhn, O. Silvennoinen, J.N. Ihle and C. Carter-Su, *Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase*. Cell, 1993. **74**: p. 237-244.

371. Baumann, H., A. Symes, M. Comeau, K. Morella, Y. Wang, D. Friend, S. Zeigler, J. Fink and D. Gearing, *Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**: p. 138-146.
372. Cheng, G., Z. Ye and D. Baltimore, *Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a src homology domain-mediated interaction*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. **91**: p. 8152-8155.
373. Mano, H., K. Sato, Y. Yazaki and H. Hirai, *Tec protein-tyrosine kinase directly associates with Lyn protein-tyrosine kinase through its N-terminal unique domain*. *Oncogene*, 1994. **9**: p. 3205-11.
374. Matsuda, T., T. Fukada, M. Takahashi-Tezuka, Y. Okuyama, Y. Fujitana, Y. Hanazono, H. Hirai and T. Hirano, *Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 11037-11039.
375. Wang, X.Y., D.K. Fuhrer, M.S. Marshall and Y.C. Yang, *Interleukin-11 induces complex formation of Grb-2, Fyn and JAK-2 in 3T3L1 cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 27999-28002.
376. Schaeffer, M., M. Schneiderbauer, S. Weidler, R. Tavares, M. Warmuth, G. DeVos and M. Hallek, *Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of hck and erk kinases*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**: p. 8068-8081.
377. Karnitz, L., S.L. Sutor, T. Torigoe, J.C. Reed, M.P. Bell, D.J. McKean, P.J. Leibson and R.T. Abraham, *Effects of p56lck deficiency on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**: p. 4521-4530.
378. Minami, Y., T. Kono, K. Yamada, N. Kobayashi, A. Kawahara, R. Perlmutter and T. Taniguchi, *Association of p56Lck with the IL-2 receptor beta-chain is critical for the IL-2 induced activation of p56Lck*. *EMBO J*, 1993. **12**: p. 759-768.
379. Carroll, M., J. Spivac, M. McMahon, N. Weich, U. Rapp and W. May, *Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation*. *J Biol Chem*, 1991. **266**: p. 14964-9.
380. Taieb, J., D. Blanchard, M. Auffredou, N. Chaouchi and A. Vazquez, *In vivo association between p56lck and MAP kinase during IL-2-mediated lymphocyte proliferation*. *J Immunol*, 1995. **155**: p. 5623-5630.
381. Cichowski, K., F. McCormick and J.S. Brugge, *p21<sup>ras</sup> GAP association with Fyn, Lyn, and Yes in thrombin-activated platelets*. *J Biol Chem*, 1992. **267**: p. 5467-5473.
382. Briggs, S., S. Bryant, R. Jove, S. Sanderson and T. Smithgall, *The Ras GTPase-activating Protein (GAP) Is an SH3 Domain-binding Protein and Substrate for the Src-related Tyrosine Kinase, Hck*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 14718-14724.
383. Tauchi, t., G. Feng, R. Shen, M. Hoatlin, G. Bagby, D. Kabat, L. Lu and H. Broxmeyer, *Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 5631-5635.
384. Shaw, A.S., K.E. Amrein, C. Hammond, D.F. Stern, B.M. Sefton and J.K. Rose, *The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain*. *Cell*, 1989. **59**: p. 627-636.
385. Pleiman, C., M. Hertz and J. Cambier, *Activation of phosphatidylinositol-3'kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit*. *Science*, 1994. **263**: p. 1609-1612.

386. Alexandropoulos, K., G. Cheng and D. Baltimore, *Proline-rich sequences that bind to src-homology 3 domains with individual specificities*. Proc Nat Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 3110-3114.
387. Irby, R. and T. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. Oncogene, 2000. **19**: p. 5636-5642.
388. Sawyers, C., *Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets*. Curr Opin Gen Dev, 2002. **12**: p. 111-115.
389. Hanke, J., J. Gardner, R. Dow, P. Changelian, W. Brissette, E. Weringer, B. Pollok and P. Connelly, *Discovery of a novel, potent, and src-family selective tyrosine kinase inhibitor*. J Biol Chem, 1996. **271**: p. 695-701.



## 6 CURRICULUM VITAE

NAME: Carola Anke Neumann-Meyer

ADRESSE: 118 Hillside Street  
Boston, MA, 02120  
USA  
617/278-6025

GEBURTSDATUM: 27-2-66

GEBURTSORT: Kettwig, an der Ruhr

FAMILIENSTAND: verheiratet, 3 Kinder

AUSBILDUNG:

1972-77:	Grundschule, Rottenburg,
1977-86:	Johannes-Nepomuk Gymnasium, Rohr;
1986:	Abitur
1987-89:	Ausbildung zur Medizinisch Technischen Assistentin, Landau i.d. Pfalz
1989-1997:	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
8/1991:	Ärztliche Vorprüfung:Physikum
8/1992:	1. Klinisches Staatsexamen
8/1995:	2. Klinisches Staatsexamen
6/1997:	3. Klinisches Staatsexamen

KLINISCHE PRAKTIKA (SUBINTERNSHIPS):

4-6/1996:	Chirurgie, Boston University, USA
7-8/1996:	Neurologie, Boston University, USA
9-10/1996:	Neurologie, TUFTS University, Boston,USA
11-12/1996:	Innere Medizin, Boston University, USA
1-2/1997:	Innere Medizin, Brown University, Rhode Island, USA

ARBEITSVERHÄLTNISSE:

3-9/1989:	Medizinisch Technische Assistentin: Kantonspital Basel, Switzerland, Abteilung für Innere Medizin/Kardiologie (Prof. Dr. med. B. Buehler, Dr. T. Scott-Burden Ph.D)
7/1997-gegenwärtig:	Postdoktoraler Forschungsassistent: Center for Blood Research/Harvard Medical School (Prof.Dr.med. Rick VanEtten, MD, Ph.D)

FÖRDERUNGEN:

9/1995-4/1996:	Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD): Biomedical Exchange Program, Prof. Dr. med. H. Stolte, Medizinische Hochschule Hannover
12/1996	American Society of Hematology (ASH): Travel Award
8/1/2001 (3Jahre)	NIH/NIEHS: NRSA; (National Research Service Award: National Institute of Health, National

Institute of Environmental Health and Safety; Fellowship number: ES11586-02)

DISSERTATION:

9/1992-2/1995;  
9/1995-4/1996:

Rolle der Src-Kinasen in den Signaltransduktionswegen von Interleukin-6 und Erythropoetin (Prof. Dr. med. B. Emmerich, Med. Klinik Innenstadt, Prof. Dr. med. Michael Hallek, Klinikum Grosshadern, München and Prof. Dr. med. F. Bunn, MD; Dr. Mark Showers, Ph.D; Dept. of Hematology/ Oncology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA)

MITGLIEDSCHAFTEN:

13/8/01

Associate Member of the American Society of Hematology (ASH)

SPRACHEN:

Deutsch und Englisch (fließend in Wort und Schrift)

## 7 PUBLIKATIONEN

### Originale Publikationen

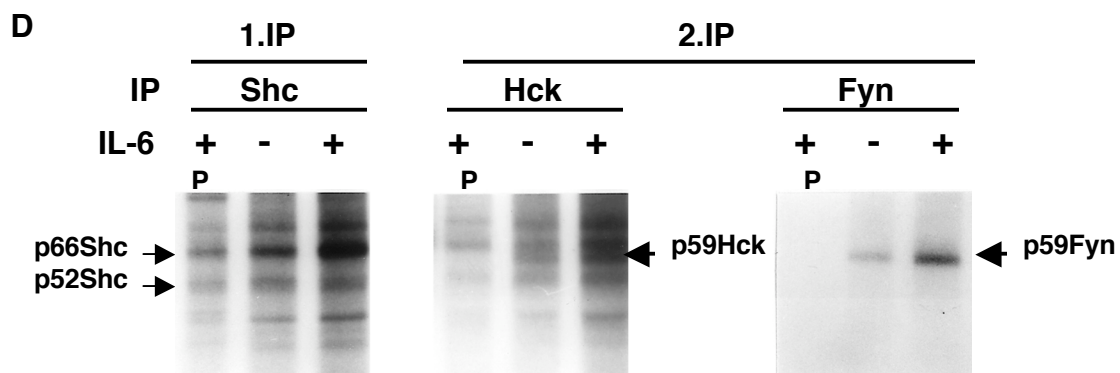
1. **Neumann C**, Zehentmeier G, Danhauser-Riedl S, Druker B, Emmerich B, Hallek M (1996) Interleukin 6 induces tyrosine phosphorylation of the ras activating protein SHC, and its complex formation with GRB2 in the multiple myeloma cell line LP-1, Eur.J.Immunology, 26:379-384,1996
2. Hallek M, **Neumann C**, Schaeffer M, Danhauser-Riedl S, von Bubnoff N, de Vos G, Druker B, Yasukawa K, Griffin J, Emmerich B (1997) Signal Transduktion of Interleukin-6 Involves Tyrosine Phosphorylation of Multiple Cytosolic Proteins And Activation Of SRC- Family Kinases Fyn, Hck, and Lyn in Multiple Myeloma Cell Lines, Exp. Hematology, 25:1367-1377
3. **Neumann C**, Ruch B, Barber D, Hallek M, Showers M (2002) Functional coupling of Src tyrosine kinases and EpoR signaling, submitted
4. **Neumann C**, Krause D.S., Abraham J., Carman V.C., Das S., Dubey, D., Bronson R.T., Fujiwara Y., Orkin S.H., Van Etten R.A. (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defense and tumor suppression, Nature, 424 (6948):561-5
5. Roumiantsev S., Krause D.S., **Neumann C.**, Dimitri C.A., Asiedu F., Cross N.C.P., Van Etten R.A. (2003) Distinct stem cell myeloproliferative/T-Lymphoma syndromes induced by ZNF198-FGFR1 and BCR-FGFR1 fusion genes from 8p11, Cancer Cell, 5 (3):287-98.  
These two authors contributed equally to the work

### Abstrakte

1. **Neumann C**, Druker B, Griffin JD, Emmerich B, Hallek M (1993) The signal transduction of Interleukin-6 (IL-6) involves tyrosine phosphorylation of at least five cytosolic phosphoproteins, Ann Hemat 67: A87

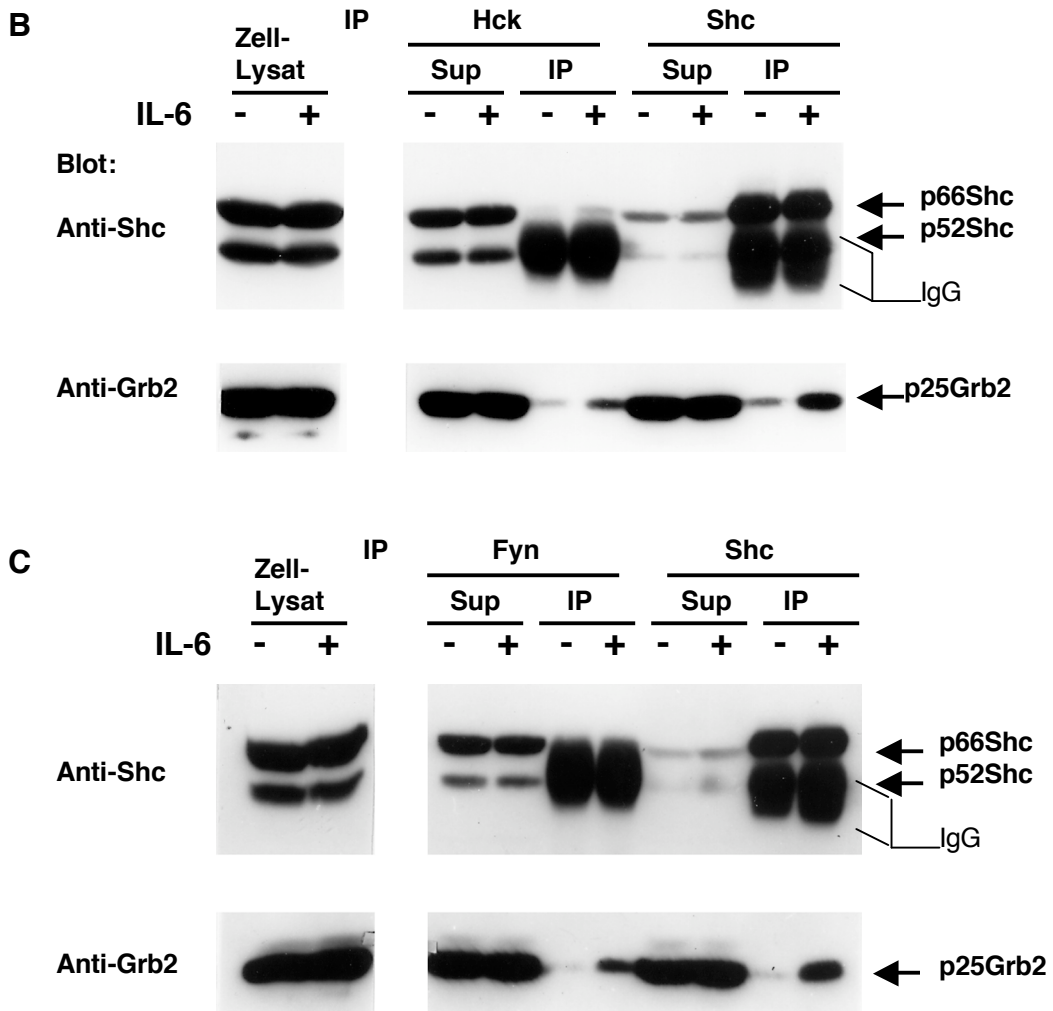
2. Hallek M, **Neumann C**, Druker B, GriffinJD, Emmerich B (1993) Interleukin-6 (IL-6) induces tyrosine phosphorylation of theSrc-family kinase p56-Lyn, Blood 82: 368a
3. Hallek M, **Neumann C**, Druker B, GriffinJD, Emmerich B (1994) Signaltransduction of Interleukin-6 (IL-6) in human plasmocytoma cell lines involves activation and tyrosine phosphorylation of the src-family kinase p56-lyn, J Cell Biochem 18B: 295
4. **Neumann C**, Emmerich B, Hallek M (1994) Interleukin-6 (IL-6), ein Wachstumsfactor fuer Plasmozytome, aktiviert eine zelluare Tyrosinekinase aus der Familie der Src-Onkoproteine, Med. Klinik 89:134
- 5.Hallek M, **Neumann C**, Zehentmeier G, Danhauser-Riedl S, Druker BJ, Emmerich B (1995) Interleukin-6 stimulates the tyrosine phosphorylation of the ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 and the Src Kinases Fyn and Hck, Blood 86:10,1
6. **Neumann C**, Ruch B, Barber D, Hallek M, Showers M (1996) Functional coupling of Src tyrosine kinases and EpoR signaling, Blood 88:10,1
7. **Neumann C**, Wen, S.-T., Van Etten, R.A.. (1998) Role of the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress, Blood 92:10,1
8. **Neumann C**, Van Etten, R.V.. (2001) Hemolytic anemia and premature death in mice lacking Pag/MSP23 a novel member of the peroxiredoxin family of antioxidant enzymes, Blood 98:11,1

## Abb. 3.1.10



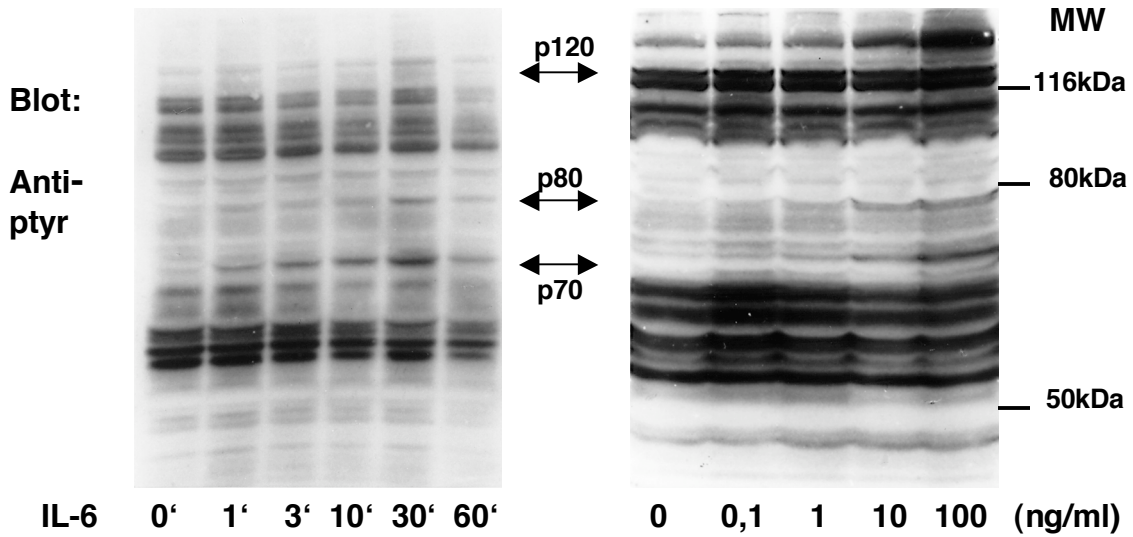
**Abb.3.1.10.D. Doppel-Immunpräzipitation zum Nachweis der Assoziation zwischen Shc mit Hck und Fyn.** LP-1-Zellen wurden mit IL-6 (100ng/ml) stimuliert und lysiert. Eine Shc-IP wurde angefertigt, welche mit p32- $\gamma$ -ATP inkubiert wurde. Nach anschließender Dissoziation wurden Proteine mit Antikörpern gegen Hck und Fyn präzipitiert. Proteine wurden per SDS-PAGE analysiert und Phosphorylierung durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Antikörperreaktionen wurden mit blockendem Peptid (P) auf Spezifität hin überprüft. Hier gezeigtes Resultat konnte durch Wiederholen des Experimentes bestätigt werden.

### Abb. 3.1.10



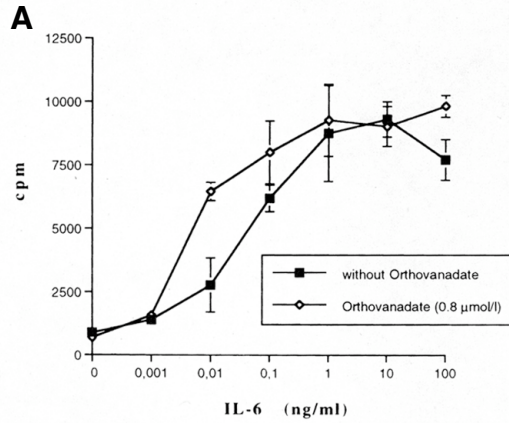
**Abb.3.1.10.B und C. Assoziation von Shc mit Hck und Fyn nach IL-6 Stimulation.** LP-1 Zellen wurden mit IL-6 (100ng/ml) für 3 Minuten stimuliert und angefertigte Immunpräzipitate im SDS-PAGE analysiert. Membranen wurden im Anschluss daran mit Anti-Shc und Anti-Grb2 Antikörpern inkubiert.

### Abb. 3.1.3

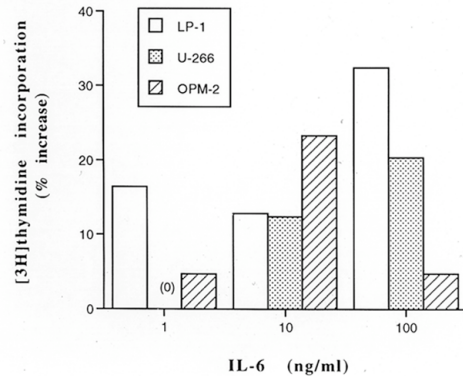
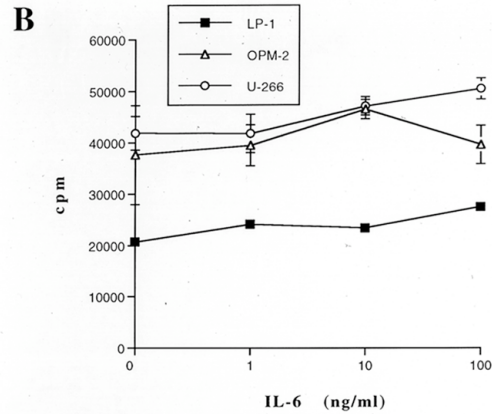


**Abb. 3.1.3. Nachweis über Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine durch IL-6 in der B-9-Zelllinie.** Zellen wurden für unterschiedliche Zeitintervalle mit 100ng/ml IL-6 oder mit ansteigenden IL-6 Konzentrationen für 3 Minuten stimuliert. Tyrosinphosphorylierung wurde durch Western-Blot und Anfärbung durch den Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) nachgewiesen. Hier gezeigte Ergebnisse, wurden durch Einmaliges Wiederholen bestätigt.

**Abb. 3.1.4**

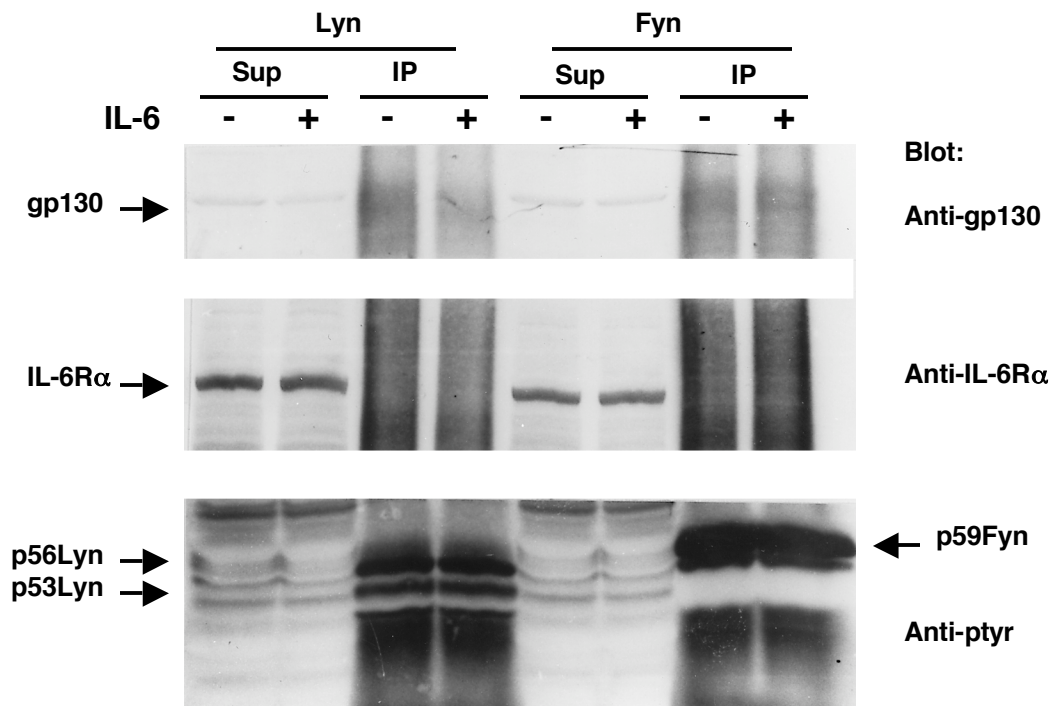


**Abb.3.1.4.A. Nachweis der gesteigerten Proliferation von B-9 Zellen durch IL-6 und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ .** Die Proliferation wurde durch ( $^3\text{H}$ )-Thymidineinbau nach Gabe ansteigender Dosen IL-6 nach 72 Stunden gemessen. Proliferation wurde auch nach Gabe des Tyrosinphosphatase Inhibitors  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  gemessen. Datenpunkte sind Durchschnittswerte +/- Standarderror von Triplikaten.



**Abb.3.1.4.B. Nachweis der gesteigerten Proliferation von OPM-2, U226 und LP-1 Zellen durch IL-6.** Die Proliferation wurde durch ( $^3\text{H}$ )-Thymidineinbau nach Gabe ansteigender Dosen IL-6 nach 72 Stunden gemessen. Datenpunkte sind Durchschnittswerte +/- Standarderror von Triplikaten. Prozente wurden errechnet wie folgt:  $[\text{cpm}(\text{IL-6ng/ml}) - \text{cpm}(0\text{ng/ml})] \times 100 / \text{cpm}(0\text{ng/ml})$ . Verwendete Werte basieren auf Durchschnittswerten von 3.1.4 oben.

**Abb. 3.1.6**



**Abb.3.1.6. Die Darstellung einer Assoziation des IL-6 Rezeptors mit den Src-Kinasen Lyn und Fyn ist technisch schwer durchführbar.** B-9-Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für 3 Minuten stimuliert. Proteine wurden mit Antikörpern gegen Lyn und Fyn aufgereinigt und per SDS-PAGE analysiert. Blot wurde mit Antikörpern gegen gp130, IL-6Rα und Phosphotyrosin (4G10) inkubiert. Hier gezeigte Ergebnisse wurden insgesamt viermal wiederholt. Einzelheiten, siehe bitte Text.



Abb.1.1.3.2

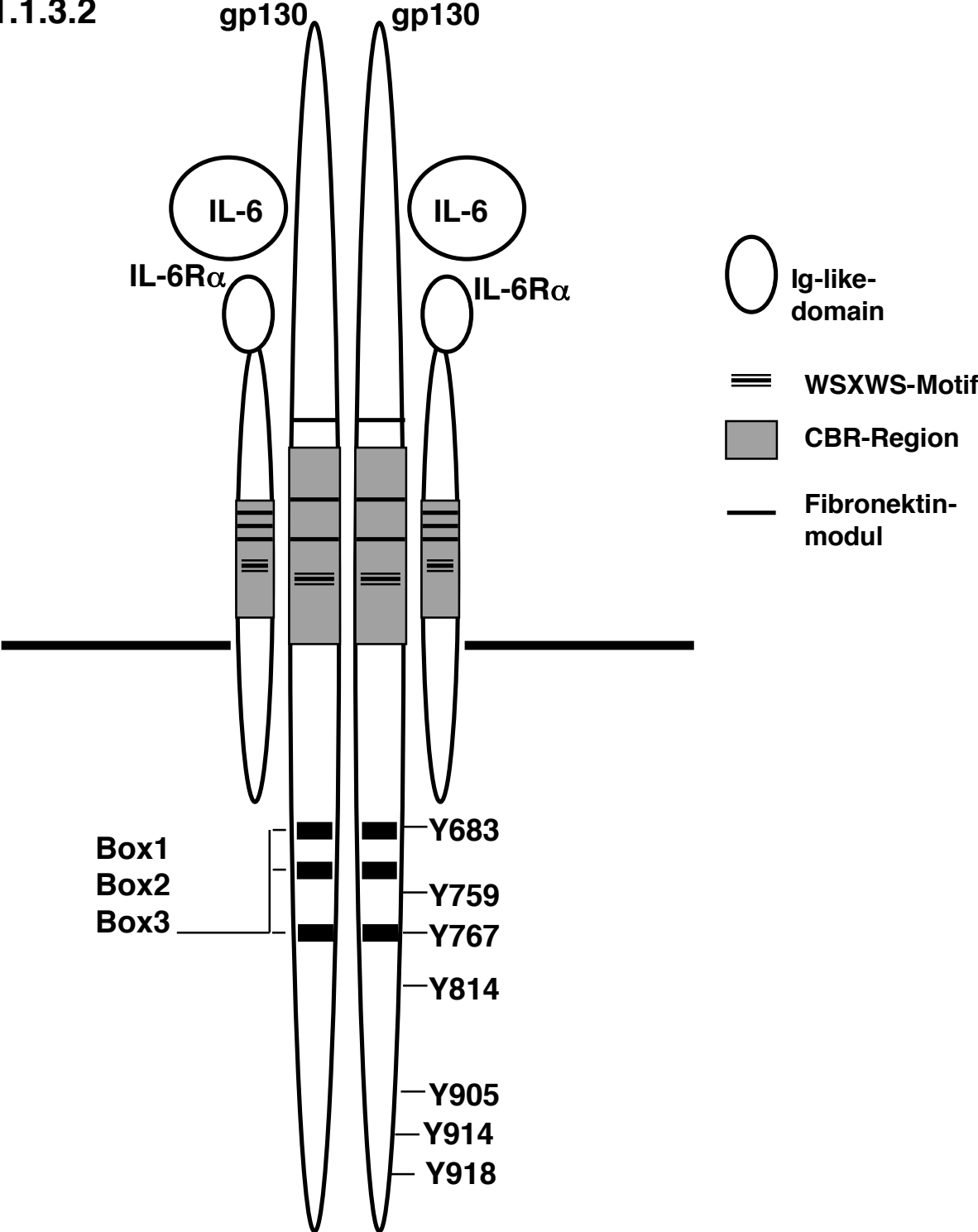
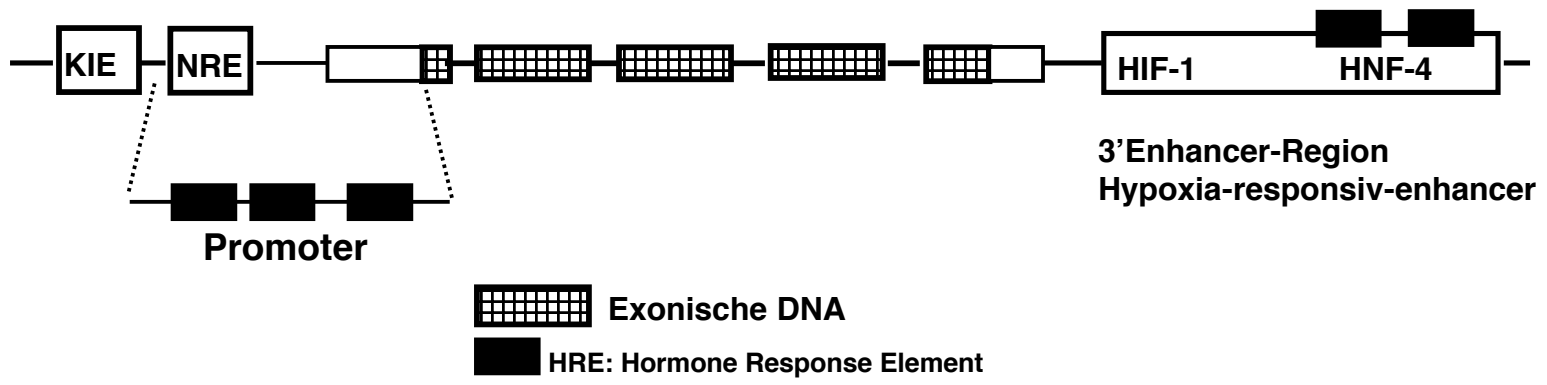


Abb.1.1.3.2 IL-6 Rezeptorkomplex



**Abb.1.2.1.2 grobe Karte des Erythropoietin-Genes**

Einzelheiten siehe Text

Abb.1.2.3

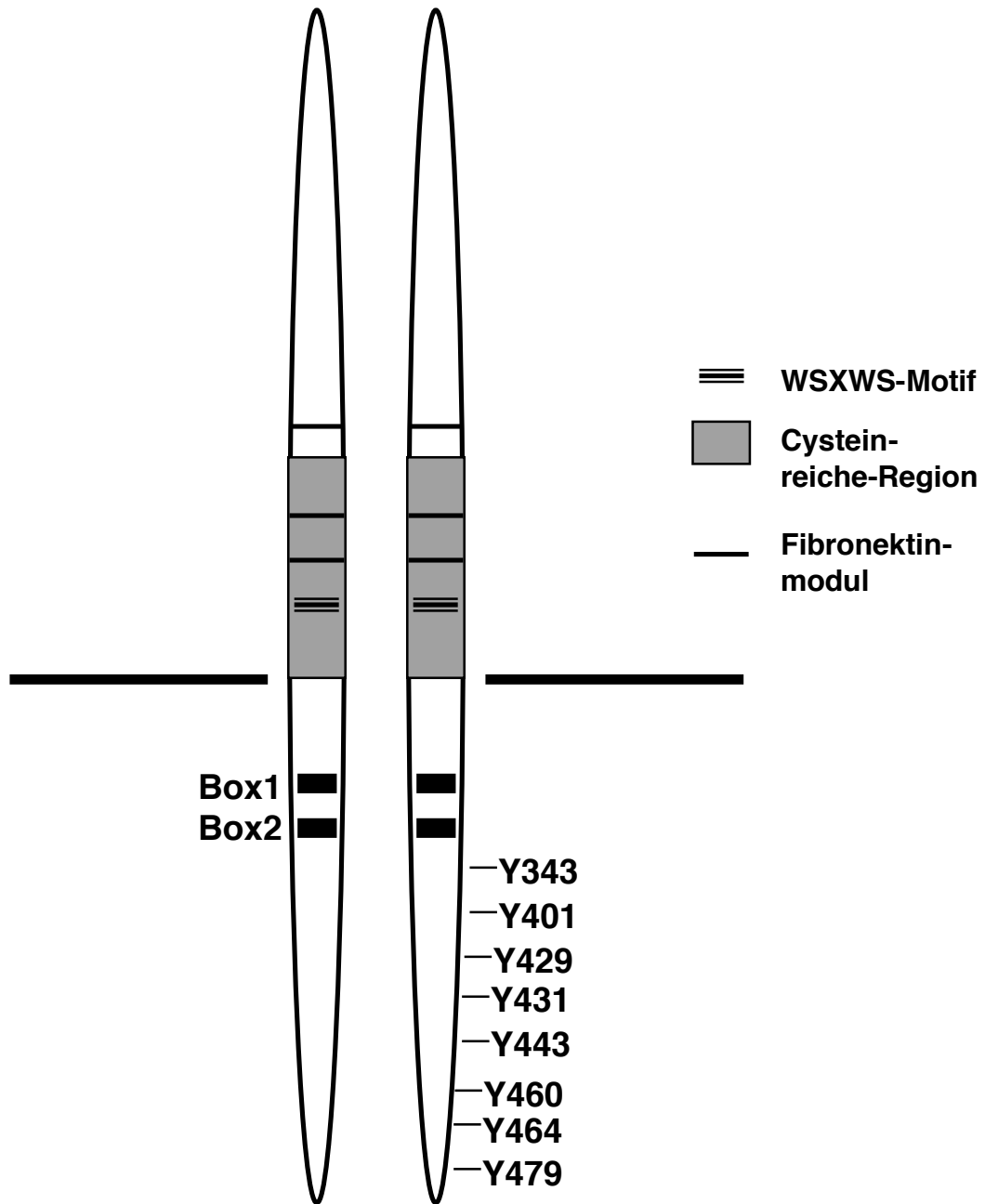


Abb. 1.2.3 Epo Rezeptorkomplex

Abb.1.2.3

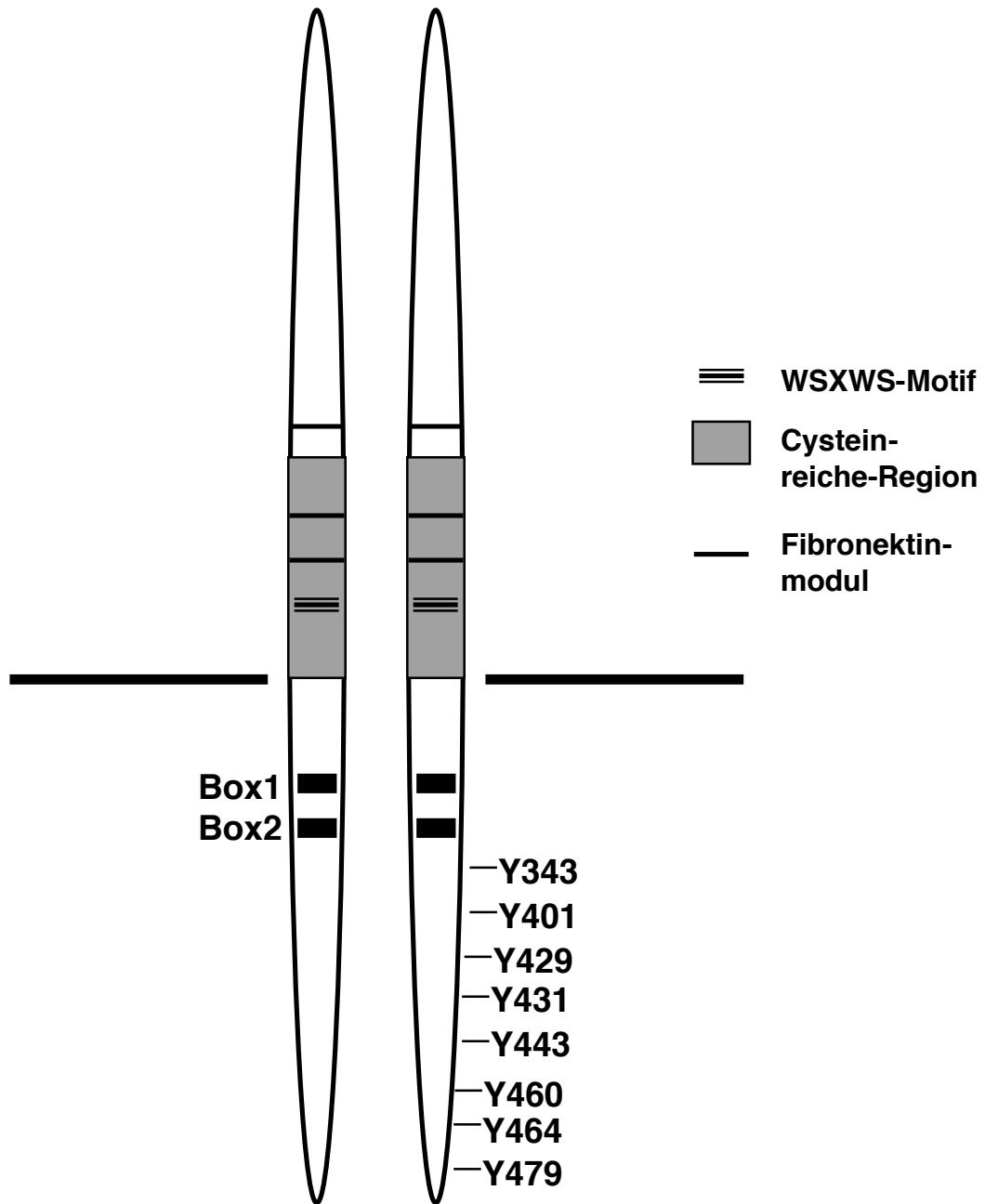
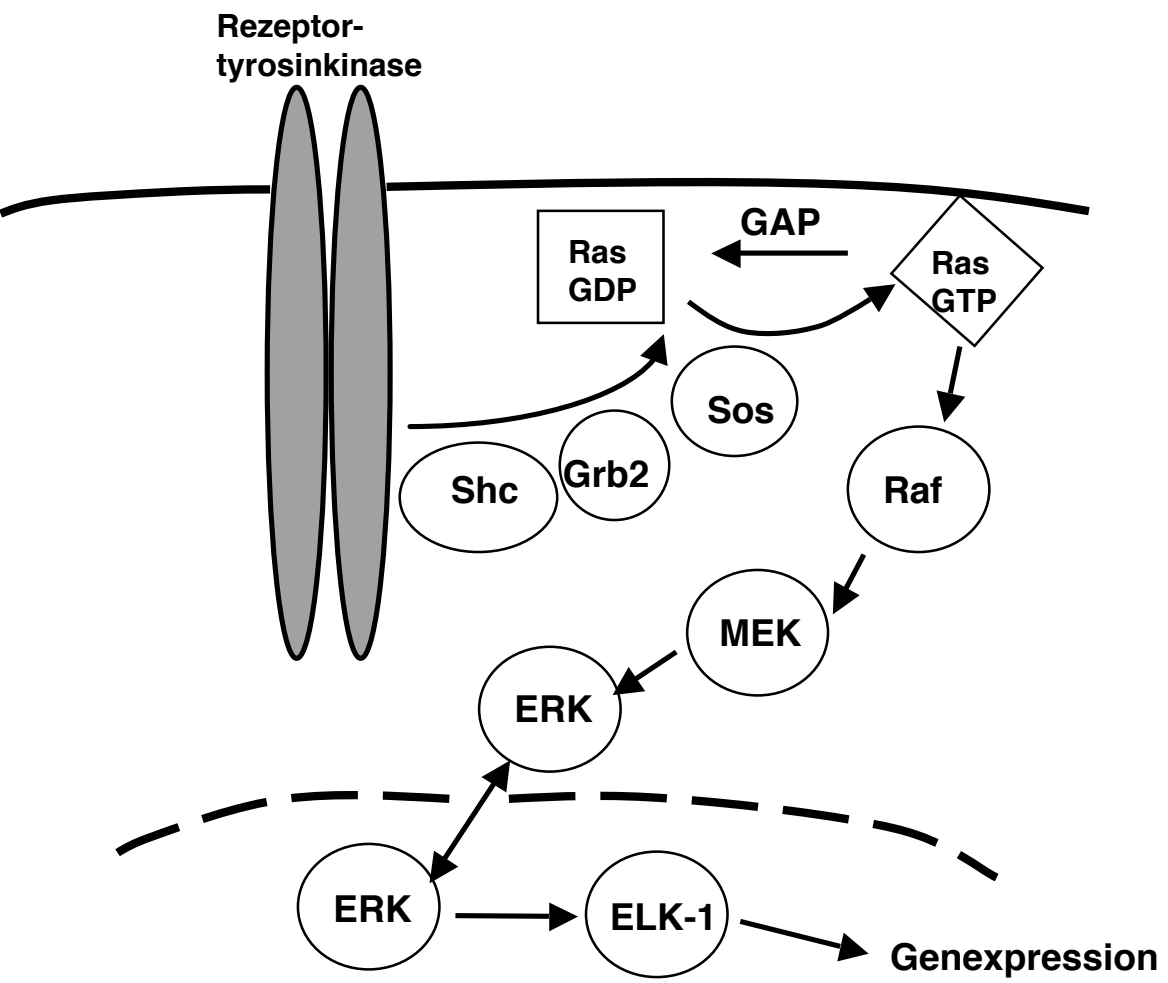


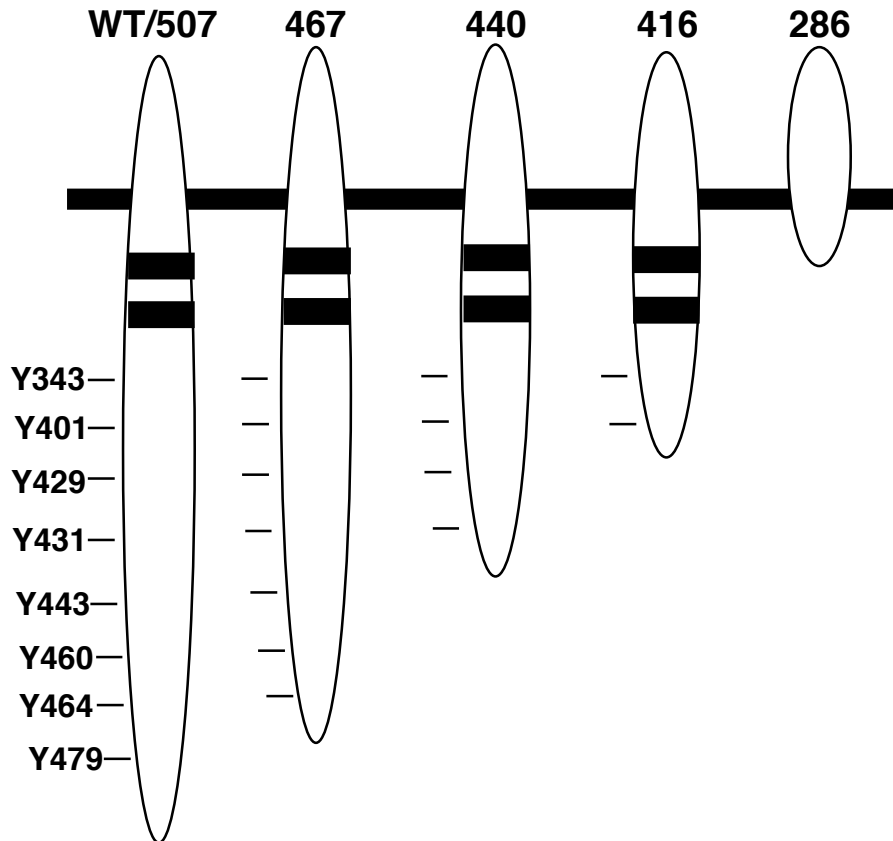
Abb. 1.2.3 Epo Rezeptorkomplex

## Abb. 1.3.5 Ras-Signalweg



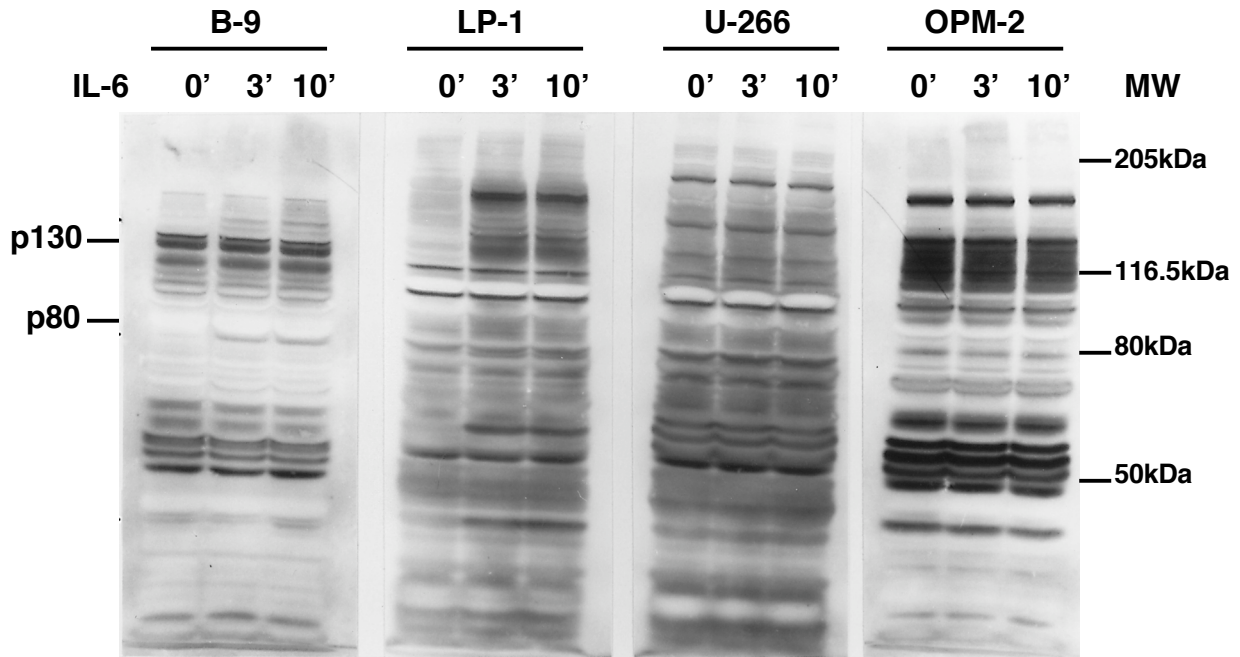
**Abb. 1.3.5** Grobe Karte des Ras-Signalweges. Die hier gezeigte Rezeptortyrosinkinase dimerisiert nach Zytokinstimulation und phosphoryliert Shc und/oder Grb2. Dies führt wiederum zur Bindung an Sos und anschließender Aktivierung von Ras. Näheres siehe Text.

**Abb. 2.1**



**Abb. 2.1. Grobes Schema der verwendeten Epo Rezeptor Mutanten.**

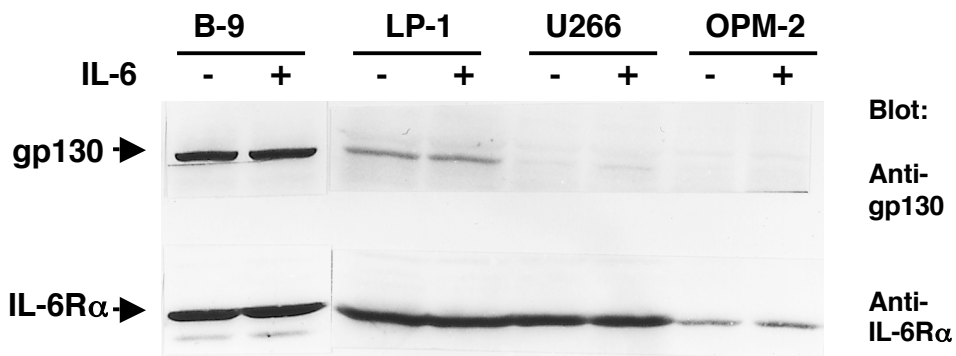
### Abb.3.1.1



Blot: Anti-ptyr

**Abb.3.1.1. Westernblot-Analyse von verschiedenen multiplen Myelom-Zelllinien.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 zu angegebenen Zeiten stimuliert. Proteine wurden im SDS-PAGE analysiert und mit dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) angefärbt. Hier gezeigte Ergebnisse, konnten durch Wiederholen bestätigt werden.

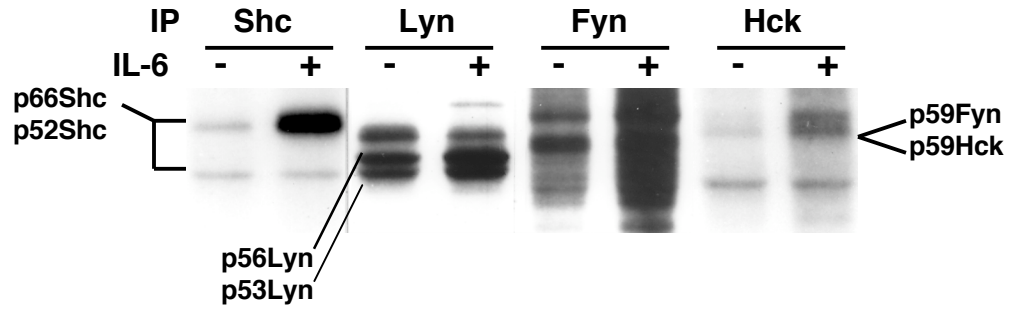
### Abb. 3.1.2



**Abb.3.1.2. Nachweis der IL-6-Rezeptor-Expression in verschiedenen multiplen Myelom Zelllinien durch Westernblot-Analyse.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für 3 Minuten stimuliert. Proteine wurden im SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen gp130 und die α-Kette des IL-6-Rezeptors angefärbt.

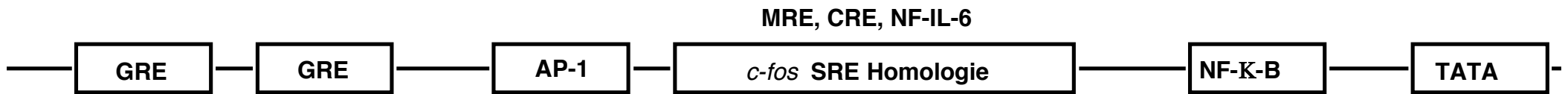
## Abb.3.1.10

A



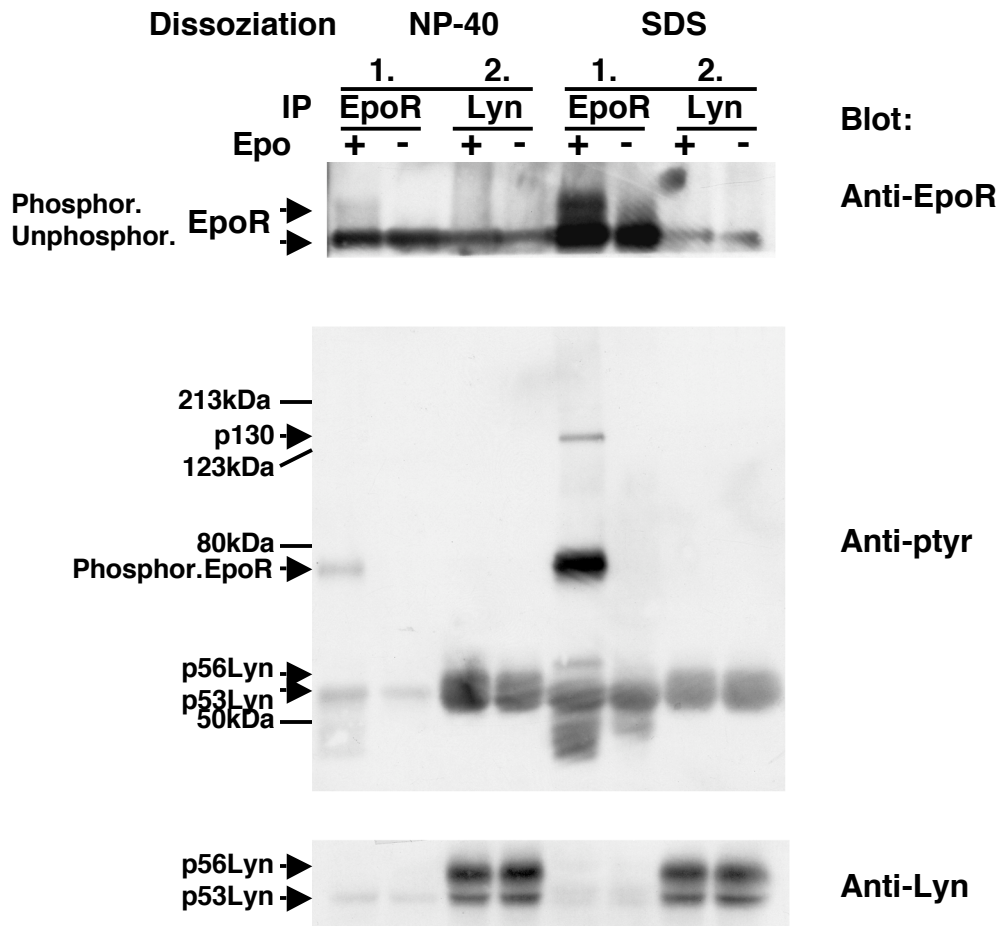
**Abb.3.1.10.A. IL-6 aktiviert die Src-Kinasen Lyn, Fyn, Hck und stimuliert die Phosphorylierung von p66Shc.** LP-1-Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 stimuliert. Immunpräzipitate wurden mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert und im SDS-PAGE analysiert. Phosphorylierung der Proteine wurde per Autoradiographie sichtbar gemacht.





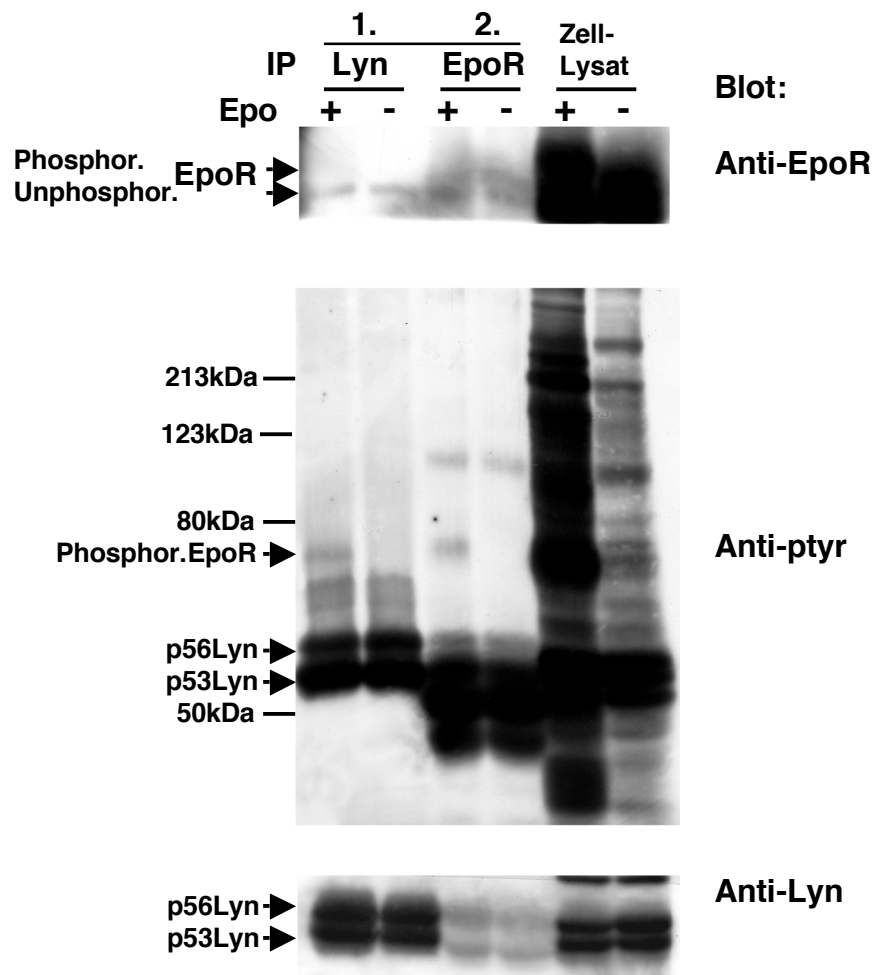
**Abb.1.1.2.2 grobe Karte der Promoterregion des IL-6 Genes**  
Einzelheiten siehe Text

**Abb. 3.2.4**



**Abb.3.2.4. SDS und NP-40 im Vergleich bei der Dissoziation von Protein-Antikörperkomplexen.** UT-7-Zellen wurden 5 Minuten mit Epo (50ng/ml) stimuliert und einer 1. Immunpräzipitation gegen den EpoR unterzogen. Der Antikörper-Protein-Komplex wurde im Anschluss daran mit NP-40 oder SDS dissoziiert und einer 2. Immunpräzipitation gegen Lyn unterzogen. Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert und mit jeweiligen Antikörpern angefärbt. Resultat wurde durch einmaliges Wiederholen bestätigt.

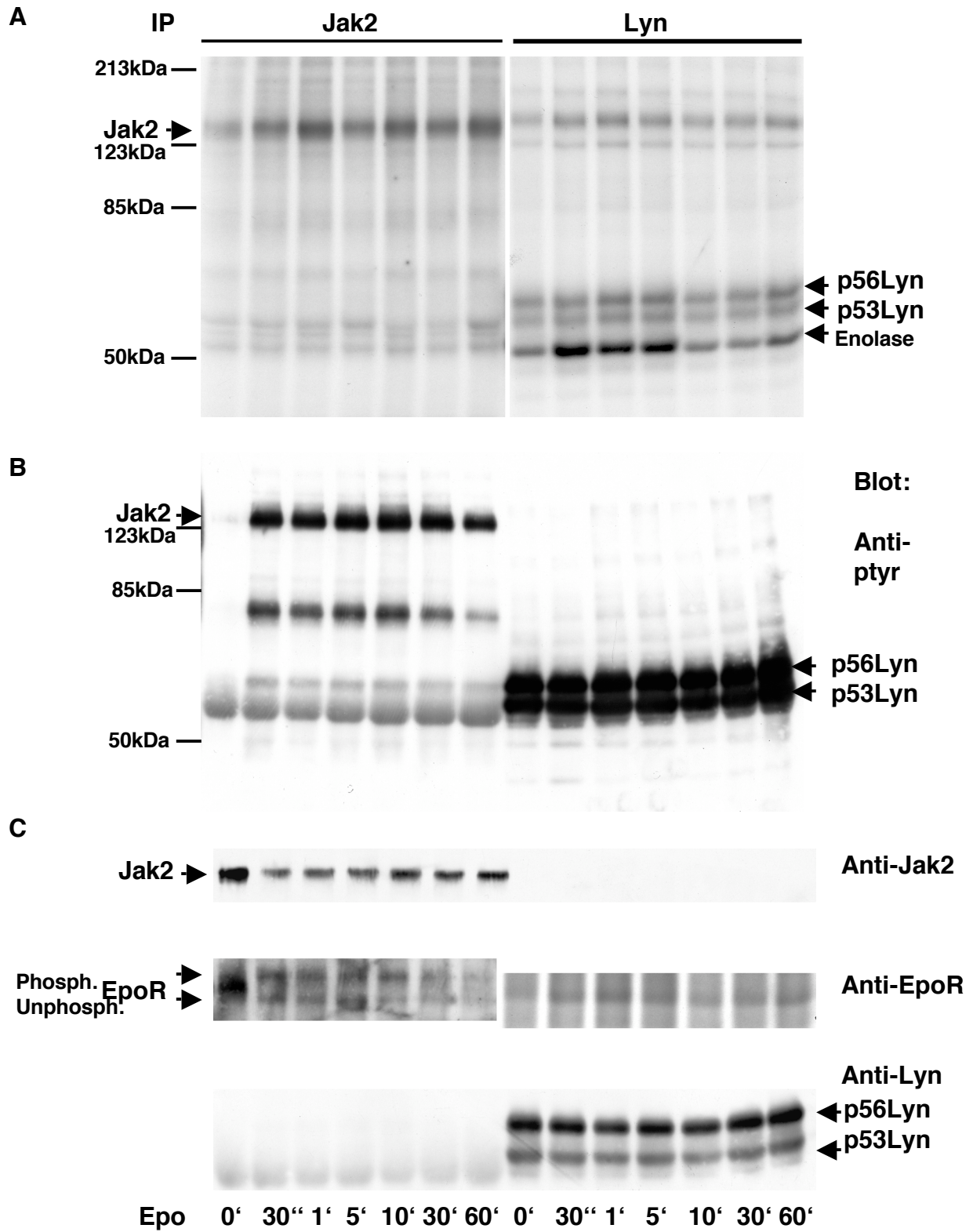
### Abb. 3.2.5



**Abb.3.2.5. Doppel-Immunpräzipitation von Lyn und EpoR.** UT-7-Zellen wurden für 5 Minuten mit 50ng/ml Epo stimuliert. 1. IP wurde mit Anti-Lyn-Antikörper angefertigt und dissoziiert. In der 2. IP wurde EpoR aufgereinigt und Proteine wurden im SDS-PAGE analysiert. Proteine wurden im Anschluss daran mit jeweiligen Antikörpern angefärbt.

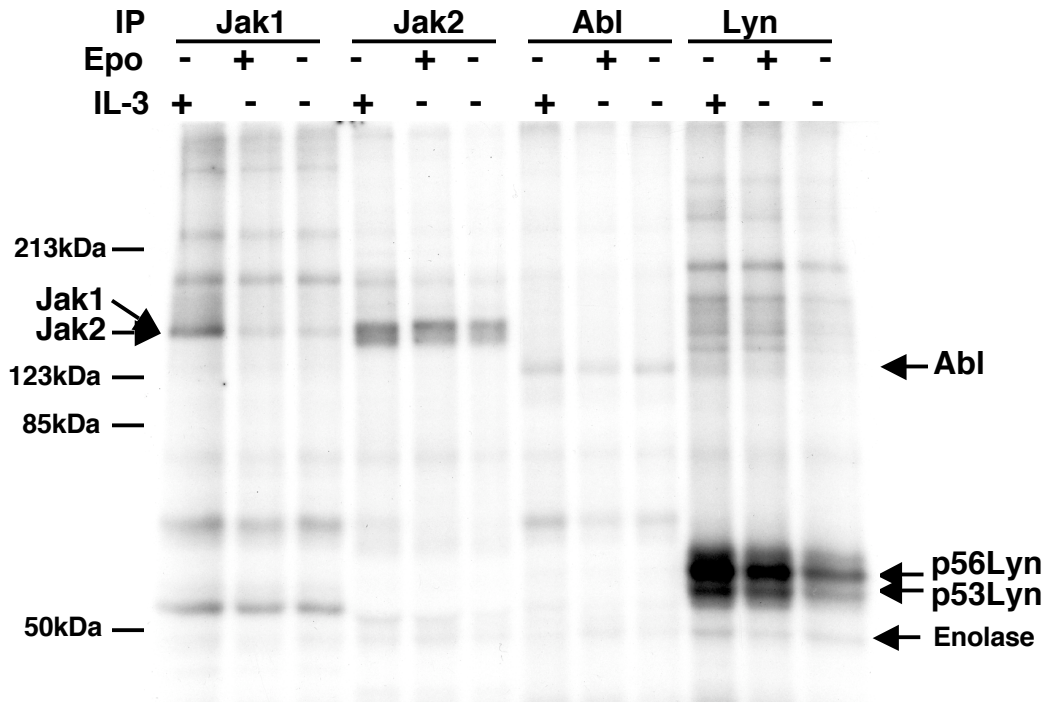
**Abb.3.2.6. Aktivierung der Kinaseaktivität von Jak2 und Lyn durch Epo Stimulation ist abhängig von der Stimulationszeit.** UT-7-Zellen wurden für ansteigende Zeitintervalle mit Epo stimuliert. Zellen wurden lysiert und Immunpräzipitationen wurden hergestellt. **A.** IP's wurden mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert und durch SDS-PAGE analysiert. Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. **B.** IP's wurden im Western Blot analysiert und Tyrosinphosphorylierung wurde mit dem Anti-Phosphotyrosine-Antikörper (4G10) angefärbt. **C.** Blot wurde gestrippt und jeweilige Abschnitte mit Antikörper gegen Jak2, EpoR und Lyn inkubiert.

**Abb. 3.2.6**



# Abb. 3.2.7

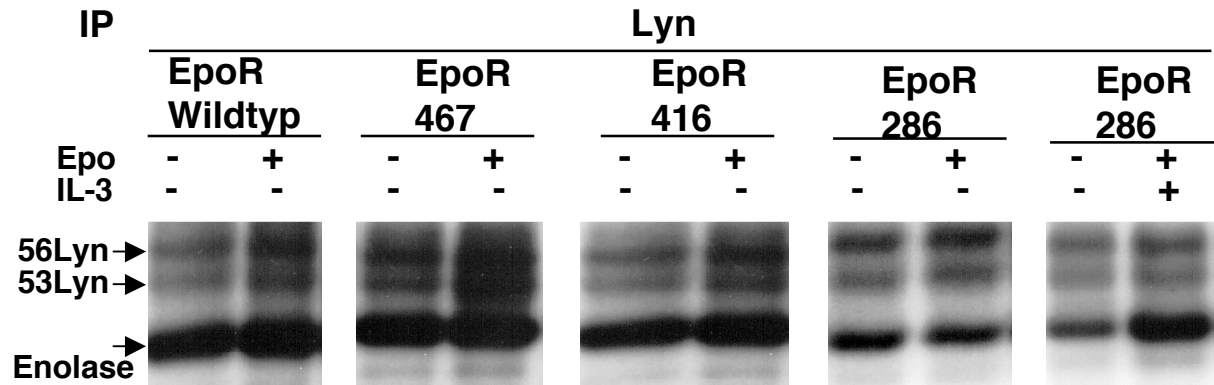
**A**



**Abb.3.2.7.A. Lyn wird auch durch Epo in Ba/F3/C4-Zellen aktiviert.** Die Zellen wurden mit 50ng/ml Epo und 50 pM IL-3 stimuliert und Proteine wurden mit entsprechenden Antikörpern aufgereinigt und anschliessend mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. Nach Analyse im SDS-PAGE wurde Phosphorylierung durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

## Abb. 3.2.7

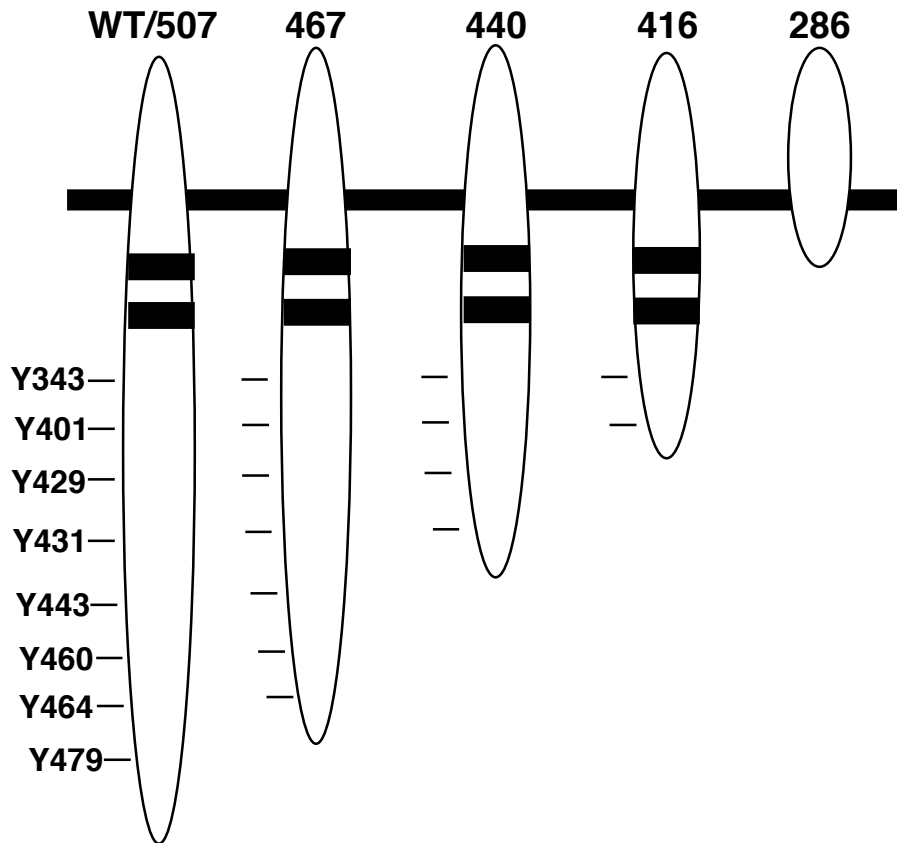
B



**Abb.3.2.7.B. Epo stimuliert nicht die Lyn Kinaseaktivität durch die EpoR 286 Mutante.** Ba/F3 EpoR Mutanten wurden mit Epo (50ng/ml) oder IL-3 (50pM/ml) stimuliert und mit  $(^{32}\text{P})$ - $\gamma$ -ATP unterzogen. Proteine wurden im Anschluss daran im SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphorylierte Proteine wurden per Autoradiographie sichtbar gemacht.

# Abb. 3.2.8

D



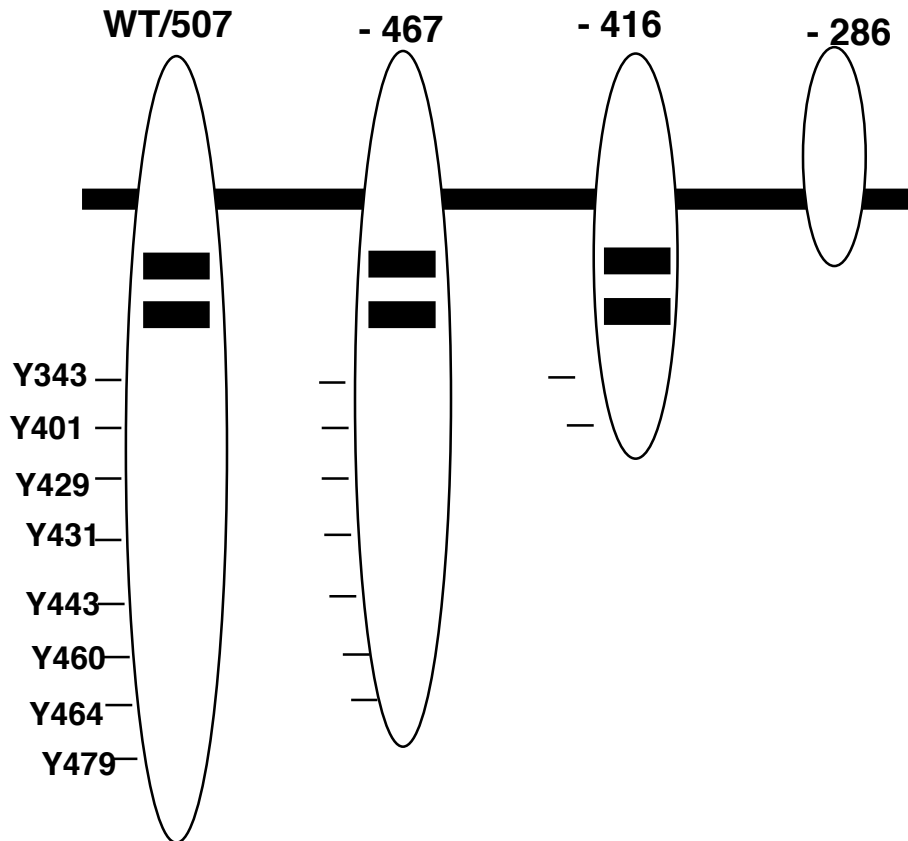
Wachstum Epo-abhängig	+	+	+	+	-
Bindung an Lyn	+	+	+	+	?
Aktivierung der Kinase durch Epo	+	+	+	+	-

Abb. 3.2.8. D. Grobes Schema der verwendeten EpoR Mutanten und das Verhalten von Lyn nach Stimulation der einzelnen Mutanten mit Epo.



# Abb. 3.2.8

E

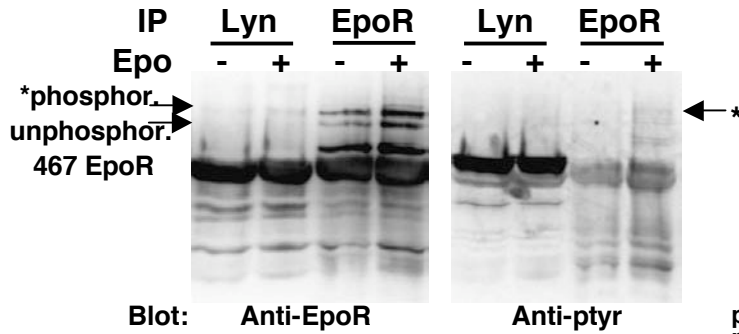


Wachstum				
Epo-abhängig Epo	+	+	+	-
Bindung an Lyn	+	+	+	?
Aktivierung der Kinase durch Epo	+	+	+	-

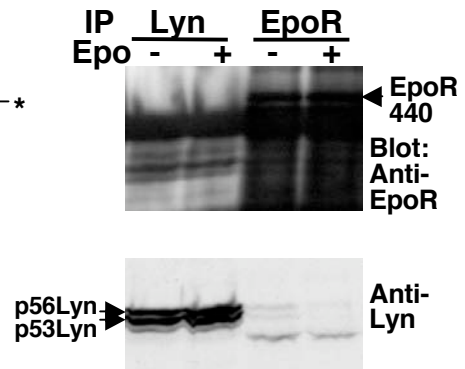
Abb. 3.2.8. E. Grobes Schema der verwendeten EpoR Mutanten und das Verhalten von Lyn nach Stimulation der einzelnen Mutanten mit Epo.

# Abb. 3.2.8

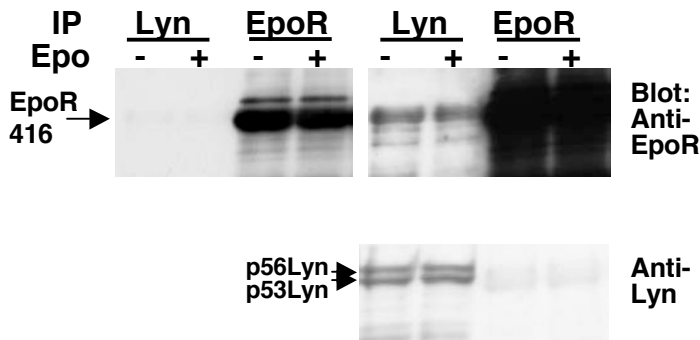
**A**



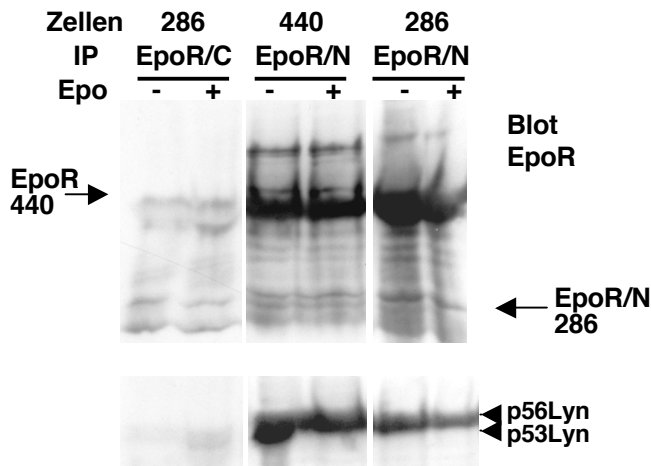
**B**



**C**

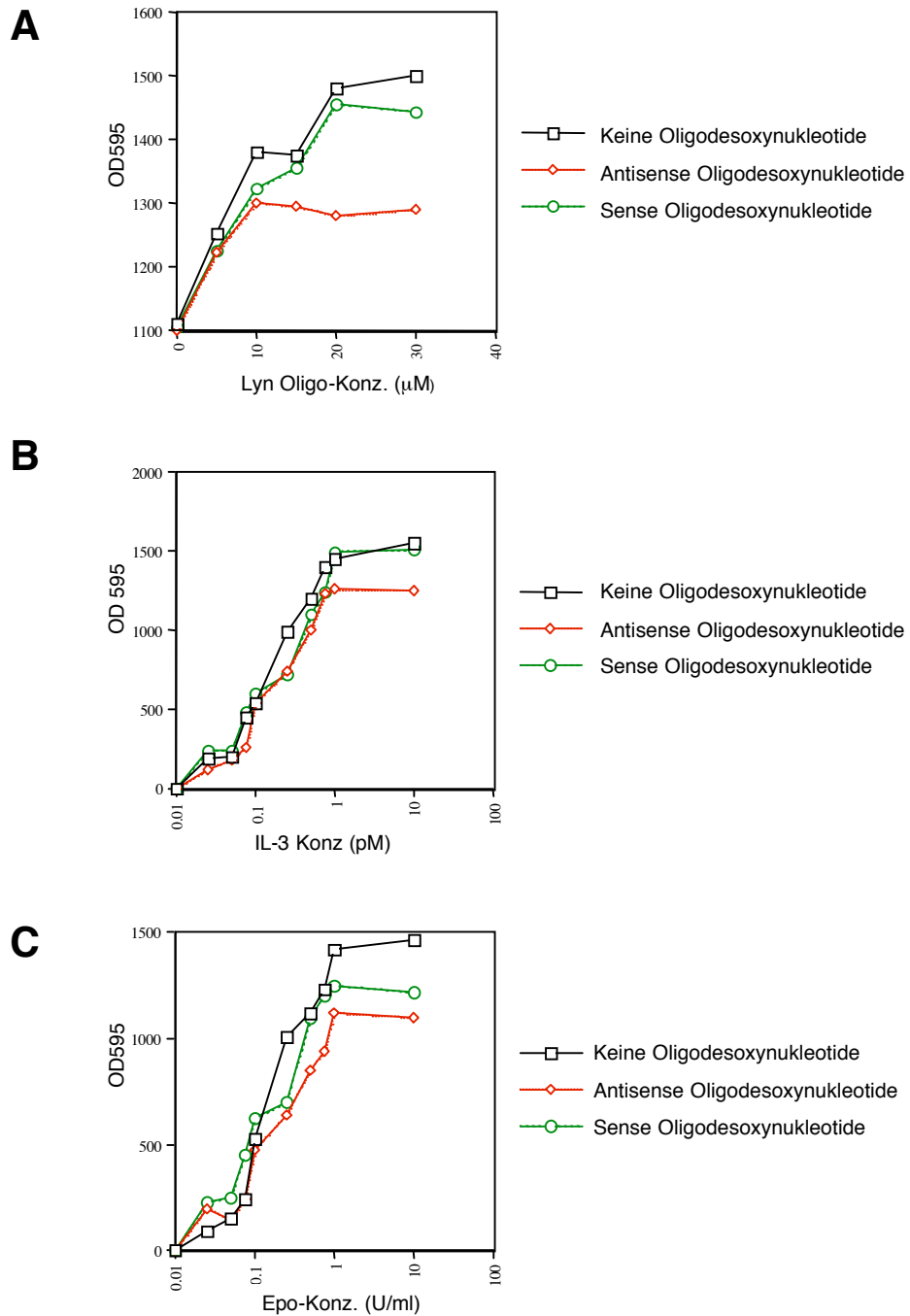


**D**



**Abb.3.2.8.A, B, C und D.** Die 286 EpoR Mutante scheint nicht mit Lyn zu assoziieren. **A, B, und C.** Ba/F3 Zellen, transfiziert mit verschiedenen EpoR Mutanten, wurden mit Epo (50ng/ml) stimuliert und mit entweder Anti-Lyn oder anti-EpoR (N-Terminal) Antikörper präzipitiert. Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Membranen wurden mit angegebenen Antikörpern inkubiert. **D.** Ba/F3 286 Zellen wurden mit Epo stimuliert und mit anti-EpoR (C-Terminal) oder (N-Terminal) präzipitiert. Ba/F3 440 Zellen wurden mit Anti-EpoR (N-Terminal) präzipitiert. Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Membran wurde dann mit angegebenen Antikörpern inkubiert.

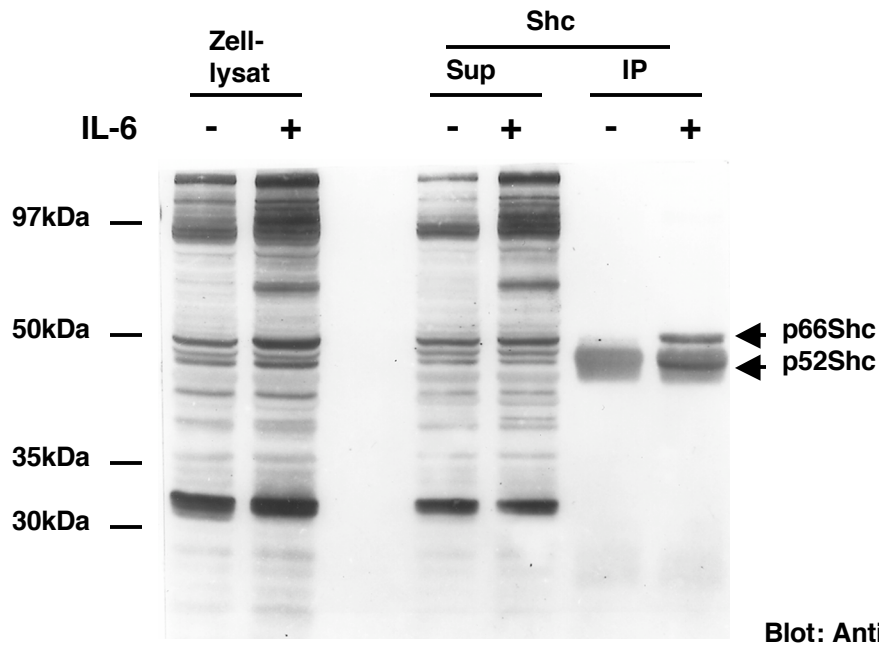
## Abb. 3.2.9



**Abb. 3.2.9 A, Lyn-Antisense Oligodesoxynukleotide beeinflussen die Proliferation von Ba/F3-EpoR Zellen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .** Zellen wurden in Triplets in 96well Platten ( $0,5 \times 10^4$ /Well) ausgesät. Zellen wurden in Epo 1U/ml und aufsteigenden Oligodesoxynukleotidkonzentrationen gehalten und nach 48h mit einem MTT Assay analysiert. **B und C, Lyn-Antisense Oligodesoxynukleotide haben einen geringen Einfluss auf die Proliferation von Ba/F3 Zellen und Ba/F3-EpoR Zellen.** Ba/F3 Zellen wurden in aufsteigenden IL-3 und Ba/F3-EpoR Zellen in aufsteigenden Epo Konzentrationen gehalten und für 48h mit 15 $\mu\text{M}$  Oligodesoxynukleotiden inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen im MTT-Assay analysiert.

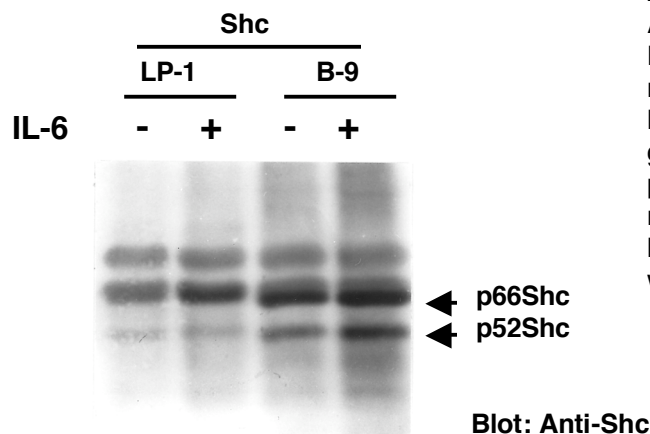
## Abb. 3.1.7

A



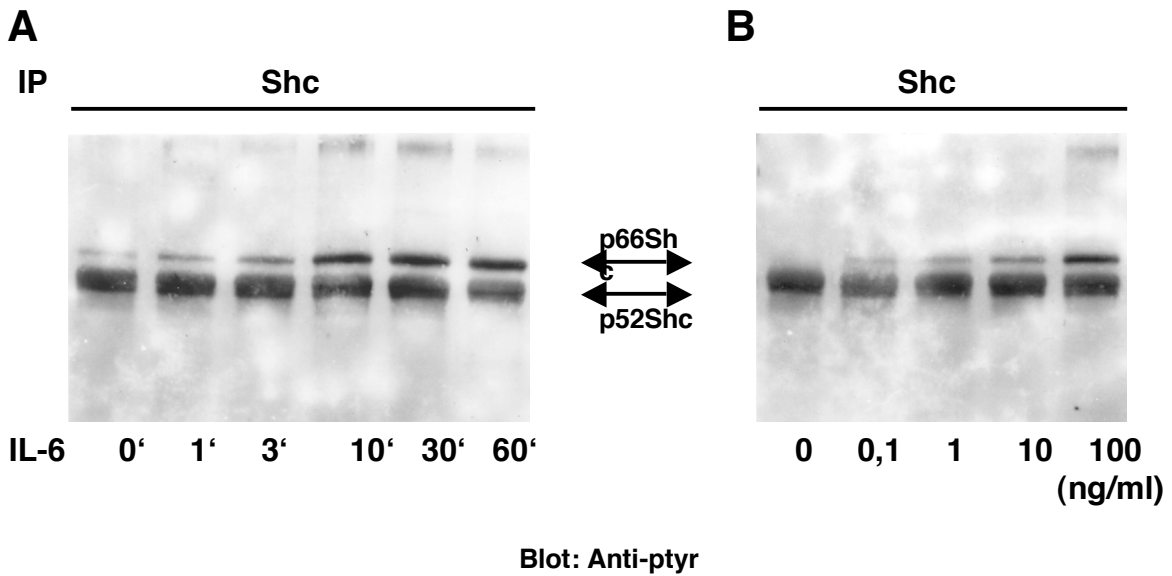
**Abb.3.1.7.A. Nachweis über die Aktivierung von Shc in LP-1-Zellen durch IL-6.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für 3 Minuten stimuliert. Proteine wurden mit Antikörper gegen Shc aufgereinigt und per SDS-PAGE analysiert. Tyrosinphosphorylierung wurde mit dem 4G10-Antikörper nachgewiesen. Hier gezeigtes Ergebnis wurde zwei weitere Male bestätigt.

B



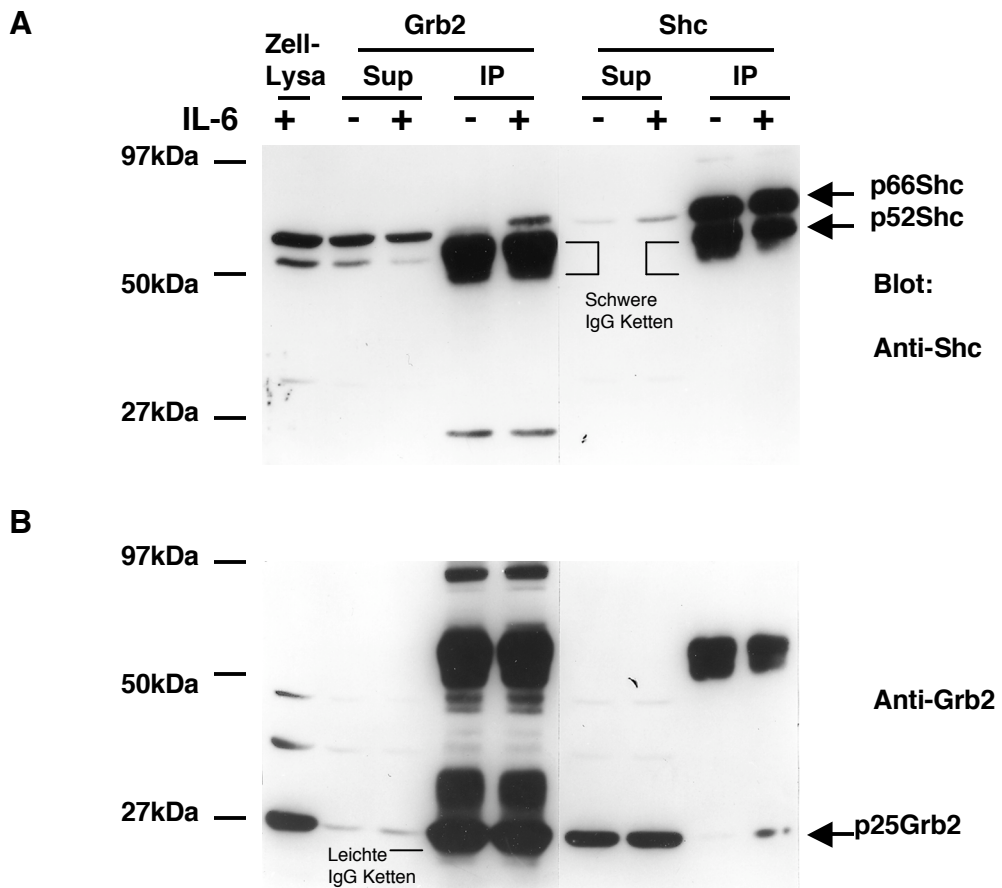
**Abb.3.1.7.B. Nachweis über die Aktivierung von Shc in B-9- und LP-1-Zellen durch IL-6.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für 3 Minuten stimuliert. Proteine wurden mit Antikörper gegen Phosphotyrosin aufgereinigt und per SDS-PAGE analysiert. Blot wurde mit Shc-Antikörper inkubiert. Resultat konnte durch Wiederholung bestätigt werden.

### Abb. 3.1.8



**Abb.3.1.8. Die Aktivierung von Shc in LP-1-Zellen ist abhängig von Zeit und Menge der IL-6 Stimulation.** LP-1-Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für ansteigende Zeitintervalle (**A**) und für 5 Minuten mit verschiedenen IL-6 Mengen (**B**) stimuliert. Shc-Aktivierung wurde nach Immunpräzipitation und Analyse im SDS-PAGE mit dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) angefärbt.

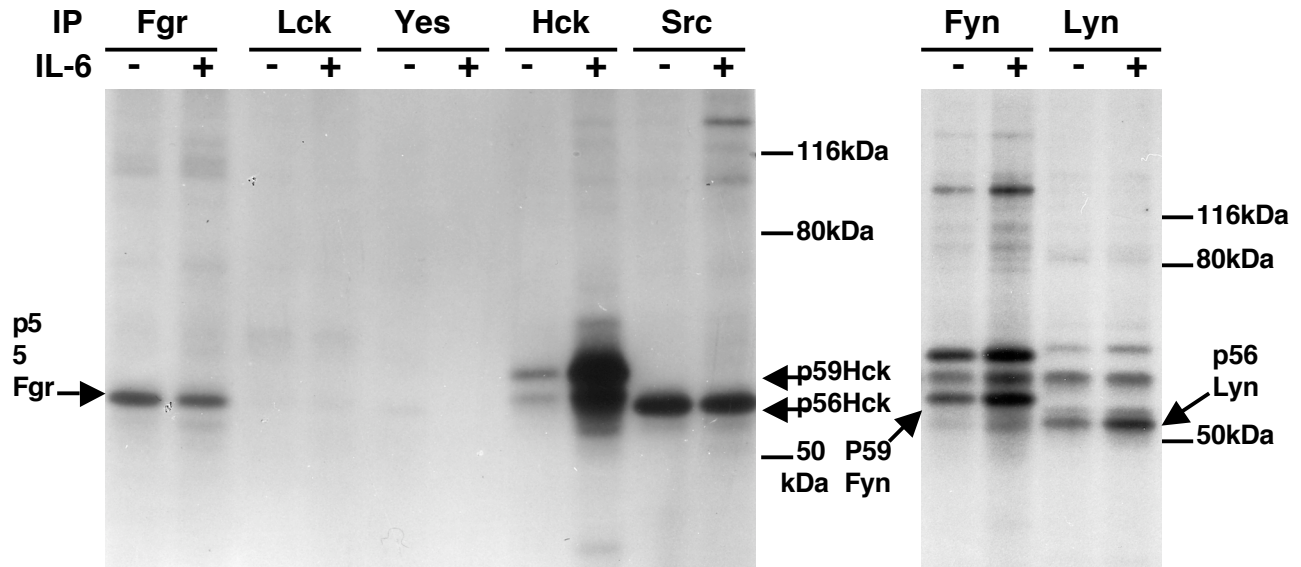
### Abb. 3.1.9



**Abb.3.1.9.A und B. Shc und Grb2 assoziieren in LP-1-Zellen nach Stimulation mit IL-6.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 stimuliert. Immunpräzipitate wurden mit Antikörpern gegen Shc und Grb2 durchgeführt. Aufgereinigte Proteine wurden im SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen Shc und Grb2 angefärbt. Hier gezeigte Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten bestätigt.

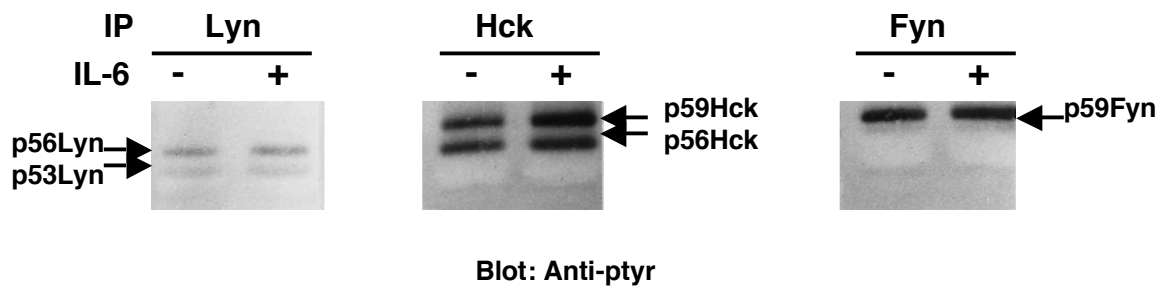
### Abb. 3.1.5

A



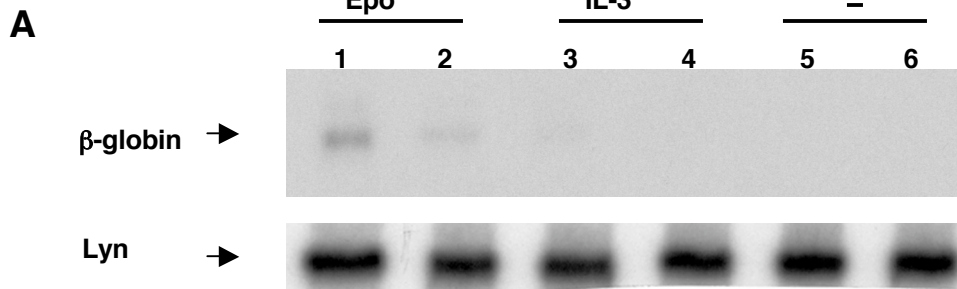
**Abb. 3.1.5.A. IL-6 stimuliert die Aktivität von Src-Kinasen in B-9-Zellen.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 für 5 Minuten stimuliert. Nach Immunpräzipitation mit jeweiligen Antikörpern wurde die Kinaseaktivität durch Zugabe von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP getestet. Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

B

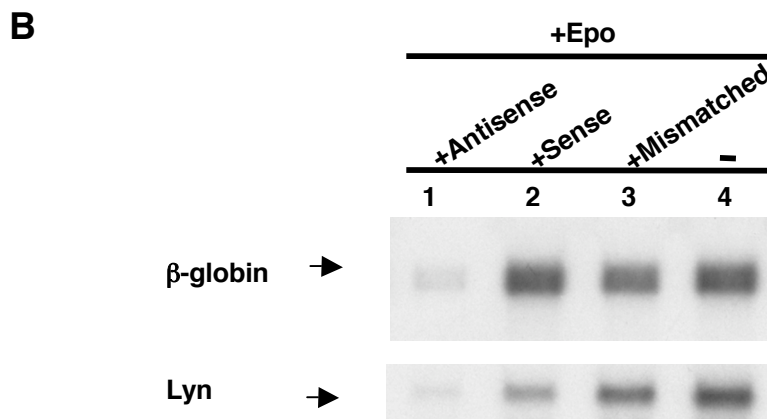


**Abb.3.1.5.B. IL-6 stimuliert schwach die Tyrosinphosphorylierung von Lyn, Hck und Fyn in B-9-Zellen.** Zellen wurden mit 100ng/ml IL-6 stimuliert und Proteine mit jeweiligen Antikörpern aufgereinigt. Nach Analyse im SDS-PAGE wurde Tyrosinphosphorylierung mit dem Antikörper 4G10 angefärbt. Hier gezeigte Ergebnisse wurden durch zwei weitere Wiederholungen bestätigt.

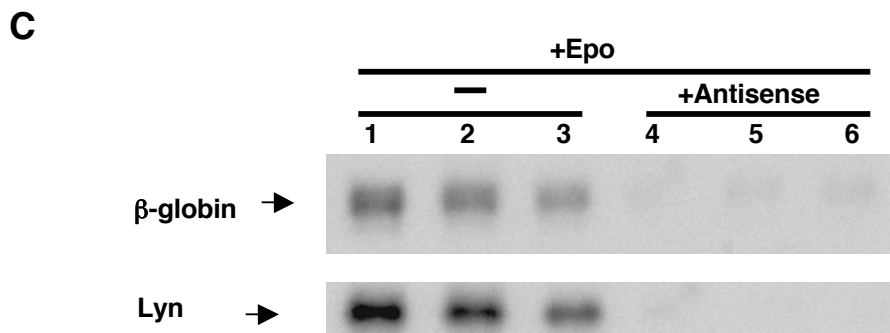
### Abb. 3.2.10



**Abb.3.2.10. A. RNA'se Protektionsassay von Ba/F3 Klon 22 Zellen RNA.** Die Zellen wurden 6 Tage in Epo (Probe 1+2), IL-3 Probe 2+4) oder kein Zytokin (Probe 5+6) gehalten. RNA wurde gewonnen und mit Riboproben gegen  $\beta$ -Globin und Lyn hybridisiert.



**Abb.3.2.10.B. RNA'se Protektionassay von Ba/F3 Klon 22 Zelle.** Zellen wurden 6 Tage mit Epo (1U/ml) inkubiert. An Tag 4 wurden entsprechende Oligodeoxynukleotide den Zellen hinzugefügt. RNA wurde zubereitet und mit Riboproben gegen  $\beta$ -Globin und Lyn hybridisiert.

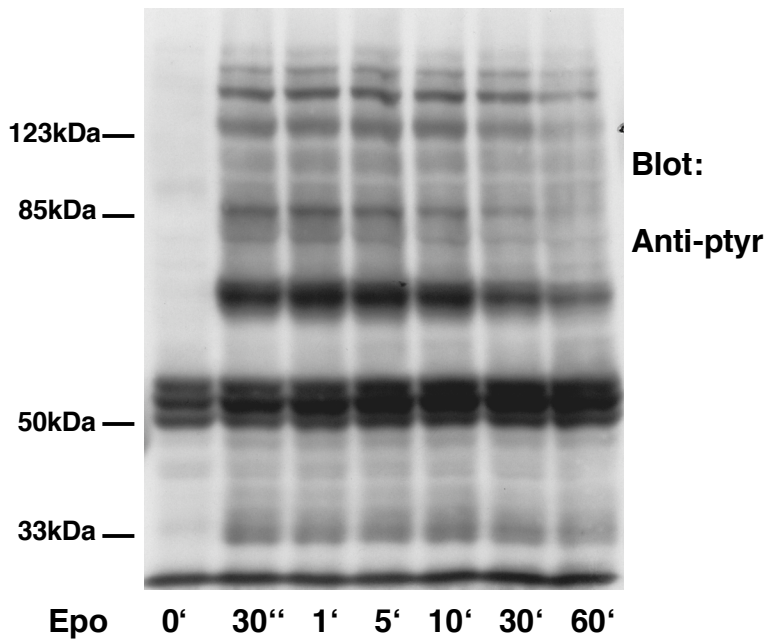


**Abb.3.2.10.C. RNA'se Protektionsassay von Ba/F3 Klon 22 Zellen.** Zellen wurden 6 Tage mit Epo (1U/ml) inkubiert und am 4. Tag wurde Lyn Antisense Oligonukleotide hinzugefügt. RNA wurde zubereitet und mit Riboproben gegen  $\beta$ -Globin und Lyn hybridisiert.



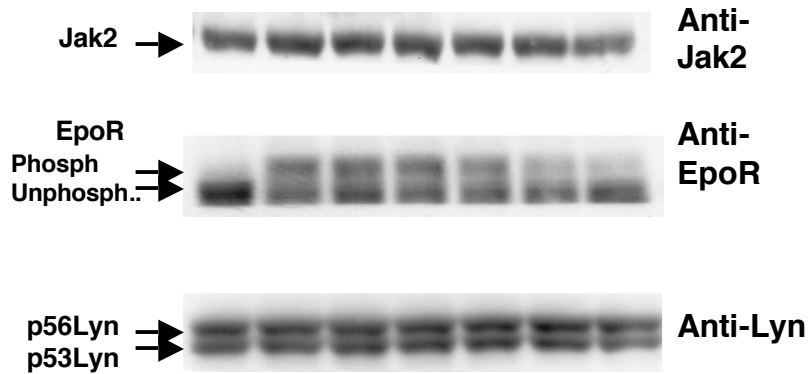
## Abb. 3.2.1

A



**Abb.3.2.1.A. Epo stimuliert zeitabhängig die Tyrosin-Phosphorylierung in UT-7 Zellen.** UT-7-Zellen wurden mit 50ng/ml Epo für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert. Proteine wurden im SDS-PAGE analysiert und mit dem Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) angefärbt.\*

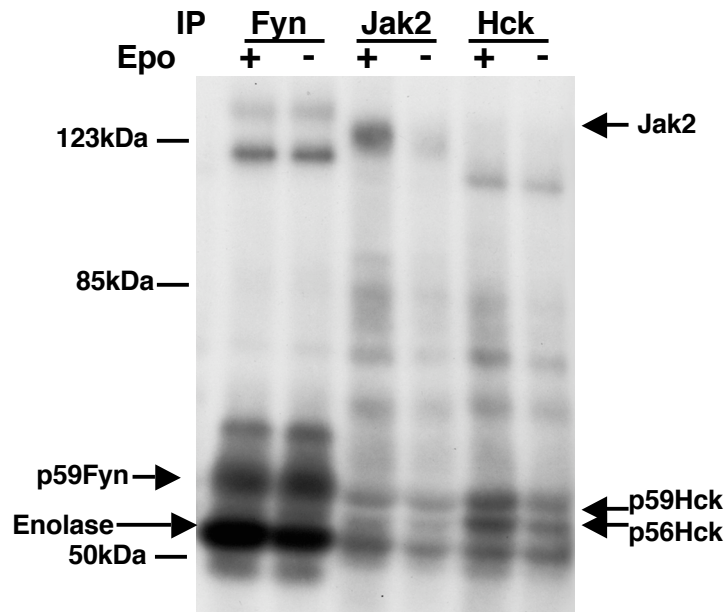
B



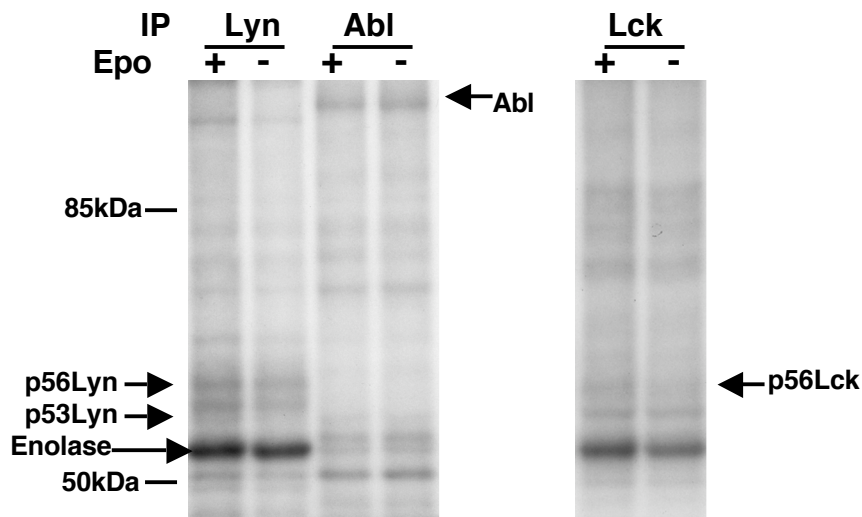
**Abb. 3.2.1.B. EpoR und Lyn werden in UT-7 Zellen exprimiert.** Die Membran von 3.2.1.A. wurde gestriipt und mit Antikörpern gegen Jak2, EpoR und Lyn inkubiert. \*Hier gezeigte Ergebnisse wurden durch Wiederholung des Experimentes bestätigt.

## Abb. 3.2.2

A



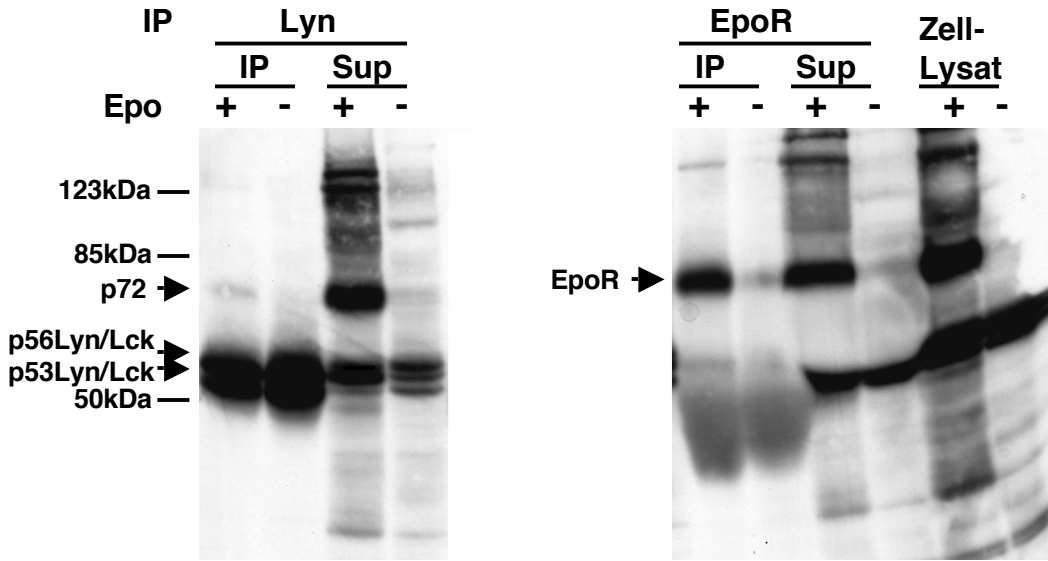
B



**Abb.3.2.2.A und B. Epo stimuliert die Kinaseaktivität von Src-Kinasen in UT-7-Zellen.**  
Zellen wurden für 5 Minuten mit 50ng/ml Epo stimuliert, mit jeweiligen Antikörpern immunpräzipitiert und mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP und dem Src-Substrat Enolase inkubiert. Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht

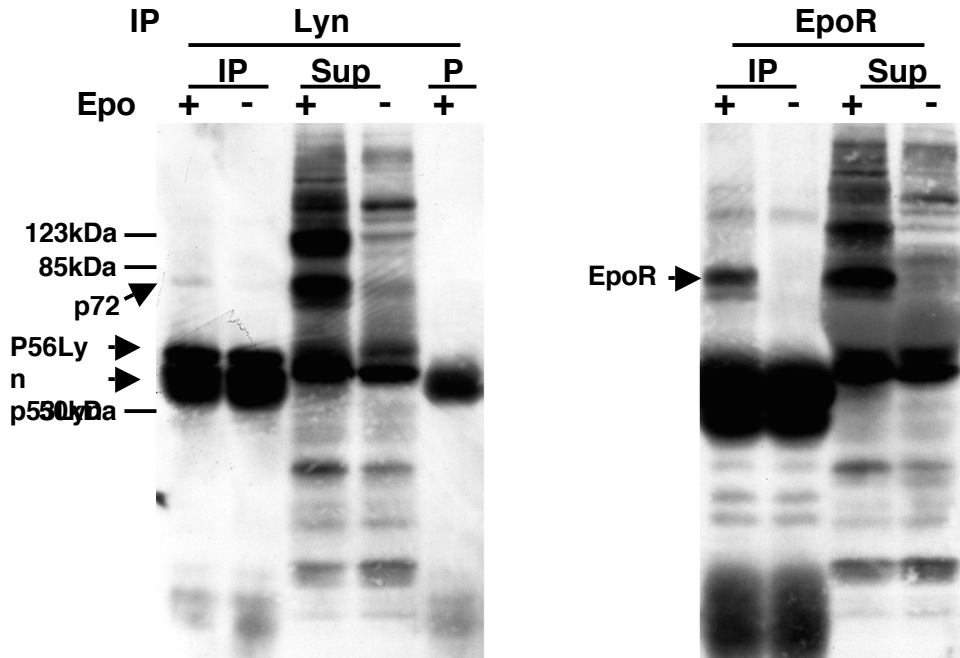
### Abb. 3.2.3

A



Blot: Anti-ptyr

B



Blot: Anti-ptyr

**Abb.3.2.3.A und B. Lyn und Lck assoziieren mit p72 nach Stimulation mit Epo in UT-7- und HCD-57 Zellen.** Zellen wurden 50ng/ml mit Epo für 3 Minuten stimuliert. Immunpräzipitate wurden im SDS-PAGE analysiert. Proteine wurden durch Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) angefärbt. Hier gezeigte Ergebnisse konnten durch zweimaliges Wiederholen bestätigt werden.