

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Leiter: Prof. Dr. Havemann; PD Dr. Wolf; Prof. Dr. Neubauer

Arbeitsgruppe: PD Dr. Schuermann

Expression von Oberflächenrezeptoren beim Bronchialkarzinom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Wimmel

aus Kassel

Marburg 1999

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 17.05.1999

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:

Prof. Dr. Kern

Referent:

PD Dr. Schuermann

Korreffferent:

PD Dr. Suske

„Du kannst es nicht mehr verstehen. Du bist der Gefangene deiner eigenen Kreatur. Aber deine Geschichte spielt sich noch in der Außenwelt ab. Ich weiß nicht wie, aber du kannst ihr noch enttrinnen. Für mich ist es etwas anderes, ich erlebe jetzt in meinem Körper, was wir als Spiel im Großen Plan gemacht haben.“

„Red keinen Unsinn, das ist eine Sache der Zellen...“

„Und was sind die Zellen? Monatelang haben wir wie fromme Rabbiner mit unseren Lippen eine andere Kombination der Lettern des Buches ausgesprochen. GCC;CGC;GCG;CGG. Was unsere Lippen sagten, das haben unsere Zellen gelernt. Was haben meine Zellen gemacht? Sie haben einen abweichenden Plan erfunden, und jetzt gehen sie ihre eigenen Wege. Meine Zellen erfinden eine Geschichte, die nicht die allgemeine ist. Meine Zellen haben inzwischen gelernt, daß man lästern kann, indem man das Heilige Buch anagrammatisiert, das Heilige und alle anderen Bücher der Welt. Und genauso machen sie es nun mit meinem Körper. Sie invertieren, transponieren, alternieren, permutieren sie kreieren neue, nie gesehene und sinnlose Zellen oder solche, deren Sinn dem richtigen Sinn zuwiderläuft. Es muß einen richtigen Sinn geben, der sich von den falschen unterscheidet, sonst stirbt man. Aber sie spielen, ungläubig, blindlings. Jacopo, solange ich noch lesen konnte in diesen Monaten, habe ich viele Wörterbücher gelesen. Ich habe Wortgeschichten studiert, um zu begreifen, was mit meinem Körper passierte. Wir Rabbiner machen das so. Hast du jemals darüber nachgedacht, daß der linguistische Terminus „Metathese“ dem onkologischen Terminus „Metastase“ ähnelt? Was ist eine Metathese? Statt Wespe sagst du Wepse, und statt Herakles kannst du auch Herkules sagen. Das ist die Temurah. Das Wörterbuch sagt die, daß Metathese Umstellung heißt, Mutation. Und Metastase heißt Umstellung, Veränderung. Wie dumm, die Wörterbücher. Die Wurzel ist dieselbe, entweder das Verb *metatithemi* oder das Verb *methistemi*. Aber *metatithemi* heißt: ich setzt um, ich verrücke, verschieb, substituiere, schaffe ein Gesetz ab, ändere den Sinn. Und *methistemi*? Genau dasselbe, ich verlagere, permutiere, transponiere, ändere die öffentliche Meinung, schnappe über und werde ver-rückt. Wir, und mit uns jeder, der einen verborgenen Sinn hinter den Buchstaben sucht, wir sind übergeschnappt und verrückt geworden. Und so haben es auch meine Zellen getan, gehorsam. Deswegen sterbe ich, Jacopo, und du weißt es.“

Umberto Eco, „Das Foucaultsche Pendel“

1	Einleitung	1
1.1	Ursprung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms	1
1.1.1	Kleinzellige Tumoren (SCLC)	2
1.1.2	Karzinoide	4
1.1.3	Nicht-kleinzellige Tumoren (NSCLC)	4
1.1.3.1	Plattenepithelkarzinome (SCC).....	5
1.1.3.2	Adenokarzinome (ADC)	6
1.1.3.3	Bronchioalveolarkarzinome, Alveolarzellkarzinome (BAC).....	6
1.1.3.4	Großzellige Karzinome	7
1.2	Die Akkumulation von DNA-Schäden führt zur Entstehung eines Tumors	7
1.3	Molekulare Mechanismen der Wachstumsregulation.....	10
1.3.1	Protein-Tyrosinkinase.....	11
1.3.2	Nicht-Rezeptortyrosinkinase	11
1.3.3	Rezeptortyrosinkinase	12
1.4	Onkogene Rezeptortyrosinkinasefamilien	14
1.4.1	EGF-Rezeptortyrosinkinase.....	14
1.4.2	Insulin-Rezeptoren	15
1.4.3	PDGF-Rezeptoren	16
1.4.4	Met -Rezeptorfamilie	17
1.4.5	Ret-Rezeptor.....	19
1.4.6	Weitere Rezeptortyrosinkinasefamilien	20
1.5	Die Axl-Rezeptortyrosinkinase Familie	20
1.5.1	Axl.....	21
1.5.1.1	Genomische Organisation des Axl-Gens	21
1.5.1.2	Struktureller Aufbau des Axl-Proteins	22
1.5.1.3	Expressionsorte von Axl	23
1.5.1.4	Zelluläre Funktionen von Axl	25
1.5.2	Tyro3	27
1.5.3	cMer.....	29
1.5.4	Gas6, das Produkt des <i>growth-arrest-specific-gene 6</i> , ist der gemeinsame Ligand der Mitglieder der Axl-Familie	30
1.5.4.1	Struktureller Aufbau, Aktivierung und Bindungseigenschaften von Gas6.....	31
1.5.4.2	Mögliche Funktionen von Gas6	32
1.5.4.3	Protein S bindet an Tyro3.....	32
1.6	Der CD44 Rezeptor	33
1.6.1	Genomische Organisation	34
1.6.2	Aufbau des CD44 Rezeptors	35
1.6.3	Funktionen des CD44 Rezeptors	36
1.6.4	Einfluß von CD44 auf das Metastasierungsverhalten von Zellen	37
1.6.5	Tumorspezifisches Auftreten von Spleißvarianten	39
1.6.5.1	Spezifisches Auftreten der epithelialen CD44-Form (CD44s)	39
1.6.5.2	Tumorassoziiertes Auftreten von CD44 v5.....	41
1.6.5.3	Bedeutung der CD44 v5/v6 für die Differenzierung von Karzinomen	41
1.6.5.4	CD44 v6 in Tumoren	42
1.6.5.5	CD44 v10 beeinflusst die Tumorzeldifferenzierung	43
1.6.5.6	Fehlerhaft gespleißte Introns	44
1.6.6	Tumorassoziiertes Verlust der CD44 Expression.....	44
1.6.7	Bedeutung von CD44 Isoformen in Lungenkarzinomen.....	46

1.6.7.1	Befunde in normaler Lunge.....	46
1.6.7.2	NSCLC.....	46
1.6.7.3	SCLC.....	47
1.7	Aufgabenstellung.....	48
2	Material und Methoden.....	49
2.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.1	Chemikalien.....	49
2.1.2	Nukleinsäuren, Nukleotide, Vektoren, Enzyme, Material für RT-PCR.....	50
2.1.3	Primer/Oligonukleotide.....	51
2.1.4	Antikörper und Materialien für Proteinnachweise.....	53
2.1.5	Zellkulturmaterial.....	53
2.1.6	Zelllinien.....	54
2.1.6.1	Non Small Cell Lung Cancer-Zelllinien.....	54
2.1.6.2	Small Cell Lung Cancer-Zelllinien.....	55
2.1.6.3	Normale humane Bronchialepithelzellen.....	55
2.1.7	Bakterienkulturmaterial.....	55
2.2	Geräte.....	55
2.2.1	Laborgeräte.....	55
2.3	Lösungen und Puffer.....	56
2.4	Methoden.....	60
2.4.1	Zellkultur.....	60
2.4.1.1	Routinekultur von Zellen.....	60
2.4.1.2	Herstellung von Zytospins und Objektträgerkulturen für die Immunhistochemie.....	60
2.4.1.3	Kultur von Primärzellen.....	60
2.4.1.4	Kryopräservierung und Lagerung von Zellen.....	61
2.4.1.5	Auftauen von Zellen.....	61
2.4.1.6	Transfektion von Zellen.....	61
2.4.1.7	Proliferationskinetiken mit einem Substratassay.....	62
2.4.2	Bakterienkultur.....	63
2.4.2.1	Transformation.....	63
2.4.2.2	Präparative Plasmidgewinnung.....	63
2.4.2.3	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen.....	64
2.4.3	Nukleinsäuretechniken.....	64
2.4.3.1	Präparation genomischer DNA.....	64
2.4.3.2	Präparation von gesamt-RNA aus Zelllinien und Geweben.....	65
2.4.3.3	mRNA Isolation.....	65
2.4.3.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	65
2.4.3.5	Reverse Transkription.....	65
2.4.3.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	66
2.4.3.7	Formulierung von Primerpaaren.....	68
2.4.3.8	Gelelektrophoresen.....	68
2.4.3.9	Silberfärbung von PAGE-Gelen.....	71
2.4.3.10	Restriktionsverdau von DNA.....	72
2.4.3.11	Ligation.....	72
2.4.3.12	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	72
2.4.3.13	Kinasierung synthetischer Oligonukleotide und Restriktionsfragmente.....	73
2.4.4	Proteinnachweis.....	74

2.4.4.1	Aufreinigung bakteriell hergestellter Proteine zur Antikörpergewinnung.....	74
2.4.4.2	Antikörperherstellung	74
2.4.4.3	Affinitätsreinigung des polyklonalen Serums	75
2.4.4.4	Herstellung von Proteinextrakten aus Zelllinien	75
2.4.4.5	Proteingewinnung aus Zellkulturüberständen	76
2.4.4.6	Proteinseparation und Konzentration von Proteinen.....	76
2.4.4.7	Protein S Clotting Test.....	76
2.4.4.8	Quantifizierung von Proteinen	77
2.4.4.9	Coomassie-Färbung von Proteingelen	78
2.4.4.10	Antikörpernachweis von Proteinen aus Zellextrakten und Zellkulturüberständen; Western-Blot.....	78
2.4.4.11	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen	79
2.4.4.12	Antikörpernachweis spezifischer Proteine an Zellen; Immunhistochemie	80
2.4.4.13	Beschichtung von Objektträgern für Gewebeschnitte.....	81
2.4.4.14	Immunhistochemischer Nachweis an kryopräservierten Gewebeschnitten	82
2.4.4.15	Nachweis an paraffineingebetteten Gewebeschnitten	82
2.4.4.16	Gegenfärbungen immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte	83
2.4.4.17	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, HE.....	84
3	Ergebnisse	85
3.1	Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasefamilien und ihrer Liganden in humanen Bronchialkarzinomzelllinien	85
3.1.1.1	Expressionsanalyse onkogener RTKs und ihrer korrespondierenden Liganden.....	85
3.1.1.2	Co-Expression onkogener Rezeptoren und ihrer korrespondierenden Liganden	89
3.2	Expression der Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie in humanen Bronchialkarzinomzelllinien.....	91
3.2.1	Alle Mitglieder der Axl-Familie sind in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert	91
3.2.2	Axl ist in Gewebe aus Lungentumoren nachweisbar	94
3.2.3	Etablierung eines polyklonalen, gegen Axl gerichteten Antikörperserums	94
3.2.4	Axl wird ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs synthetisiert.....	97
3.2.5	Eine lösliche Axl-Form ist in konditionierten Zellkulturüberständen nachweisbar	98
3.2.6	Der gemeinsame Ligand der Axl-Familie, Gas6, wird von nahezu allen Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert und sezerniert	99
3.2.7	Protein S, ein Ligand für Tyro3, wird in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert und als gerinnungsaktives Protein sezerniert.....	101
3.2.7.1	Das im Zellkulturüberstand nachgewiesene Protein S besitzt antikoagulatorische Aktivität	103
3.2.7.2	Protein S hat keinen mitogenen Effekt auf Zelllinien	105
3.2.7.3	Protein S ist <i>in situ</i> in Lungentumoren nachweisbar.....	106
3.2.8	Einfluß der Axl-RTK auf humane Bronchialkarzinomzelllinien	107
3.2.8.1	Die Axl-Kinase hat keinen direkten Einfluß auf die Morphologie transfizierter Zelllinien	108

3.2.8.2	Unerwartete EGF-abhängige Wachstumsregulation von Axl-transfizierten Zelllinien	111
3.2.8.3	Endogen exprimiertes Gas6 hat keinen Einfluß auf das Proliferationsverhalten Axl-transfizierter Zellen	117
3.2.8.4	Zusammenfassung bisheriger Befunde zur zellulären Funktion von Axl.....	117
3.3	Expression des CD44-Rezeptors in Bronchialkarzinomen.....	119
3.3.1	Der CD44-Rezeptor wird in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert	119
3.3.2	Expression des CD44 Rezeptors in Lungentumoren.....	126
3.3.2.1	CD44-Transkripte sind in der mRNA solider Lungentumoren nachweisbar.....	126
3.3.2.2	Histiotypische Expression einer CD44 Isoform (v6) in primären Lungentumoren	126
3.3.2.3	CD44-Isoform Expression korreliert nicht mit patho-klinischen Daten	134
3.3.3	CD44 Expression ist in normaler Lunge nachweisbar	135
3.3.4	Eine Veränderung im Vorkommen von CD44 und CD44v6 ist schon in Präneoplasien der Bronchialschleimhaut belegbar.....	136
4	Diskussion.....	141
4.1	Onkogene Rezeptortyrosinkinasen in Bronchialkarzinomzelllinien.....	141
4.2	Co-Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden.....	142
4.3	Die Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie in Bronchialkarzinomzelllinien	146
4.3.1	Funktion der Axl-Kinase in Bronchialkarzinomzelllinien	147
4.3.1.1	Histiotypische Expression von Axl in Bronchialkarzinomzelllinien.....	147
4.3.1.2	Axl-Expression in Lungentumorgewebe.....	148
4.3.1.3	Regulationsmechanismen der Axl RTK durch posttranskriptionale Prozessierung	149
4.3.1.4	Axl-Überexpression fördert kein adhärentes Wachstum	150
4.3.1.5	EGF/Axl--Kinase Rezeptorkonstrukt hat keinen wachstumsstimulierenden Effekt	151
4.3.1.6	Keine mitogene Wirkung von endogen exprimiertem Gas6 auf Bronchialkarzinomzellen	155
4.3.1.7	Proliferation Axl-transfizierter Zellen nach EGF Stimulation.....	157
4.3.2	Protein S-Synthese in Bronchialkarzinomzelllinien.....	161
4.3.2.1	Expression des Protein S-bindenden Rezeptors Tyro3	161
4.3.2.2	Co-Expression von Protein S und Tyro3	161
4.3.2.3	Protein S hat keine mitogene Wirkung auf Bronchialkarzinomzelllinien	163
4.3.3	Konsequenzen der Interaktionen von Gas6 und Protein S mit RTKs der Axl-Familie.....	163
4.4	CD44 Spleißvarianten als histiotypische Differenzierungsmarker des Bronchialkarzinoms	165
4.4.1	Multiple CD44 Isoformen in Bronchialkarzinomzelllinien.....	165
4.4.2	CD44 Expression in normalem Lungengewebe	166
4.4.3	CD44 Isoformen in primären Lungenkarzinomen.....	167
4.4.3.1	RNA-Expression von CD44 in Tumorgewebe	167
4.4.3.2	Histiotypische Expression von CD44v6 in NSCLC	168
4.4.3.3	Verlust von CD44 in SCLC	170

4.4.3.4	Zusammenhang der CD44 Expression mit Differenzierung und Metastasierung	171
4.4.4	Veränderungen der CD44 Expression in präneoplastischen Geweben	172
4.5	Relevanz einer histiotypischen Expression von Oberflächenrezeptoren	173
4.6	Probleme und Lösungen	175
5	Zusammenfassung	176
6	Literaturverzeichnis	178
7	Verzeichnis der Abbildungen	204
8	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	205
9	Anhang	207
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	207
9.2	Publikationen, Vorträge und Poster	208
9.3	Danksagung	209

„Wir leben in einer bemerkenswerten Zeit: Pro Jahr sterben in Deutschland rund 250.000 Menschen an Krebs. Rund 35.000 dieser Menschen waren an einem Bronchialkarzinom erkrankt, das in etwa 90% der Fälle durch Rauchen ausgelöst wurde und damit ein selbsterzeugtes Leid darstellt. Seriöse epidemiologische Berechnungen gehen davon aus, daß der Tabakkonsum mit ca. 30% zu dem allgemeinen Risiko beiträgt, an Krebs zu erkranken. Dies sind in etwa 70.000 Krebstote jährlich in Deutschland und immerhin rund 500 Passivraucher.“

(Höffken, Bamberg und Schlag 1995)

1 Einleitung

Lungenkrebs zählt zu den am häufigsten diagnostizierten Krebsformen des Menschen, gleichzeitig ist dieser Tumortyp verbunden mit der höchsten Sterblichkeitsrate. Dies gilt den Entwicklungen der letzten dreißig Jahre folgend gleichermaßen für Männer wie Frauen (Carbone 1997).

Um die Ursachen zu verstehen und eine erfolgreichere Behandlungsstrategie zu entwerfen, ist zunächst eine nähere Kenntnis fundamentaler Fragen der Tumorentstehung notwendig. Genetische Alternationen bei dieser Erkrankung und der Zusammenhang solcher Mutationen mit Veränderungen der normalen Zelldifferenzierung in der Bronchialschleimhaut sind daher Gegenstand umfassender Untersuchungen.

1.1 Ursprung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Die spezialisierten Epithelzellen des respiratorischen Trakts entstehen alle, wie generell angenommen, aus ursprünglichen, undifferenzierten Zellen des Endoderms.

In den größeren Bereichen der Luftwege besteht dieses mehrschichtige bis mehrreihig kubische Epithel aus pseudostratifizierten Zellen, mit Zilien ausgestatteten Becherzellen (Flimmerepithel), Goblet-Zellen, einigen wenigen neuroendokrinen Zellen, die dichte sekretorische Granula enthalten, und einer Reihe Basalzellen.

Der Übergang zu den einschichtigen Zellreihen der respiratorischen Bronchiolen ist gekennzeichnet durch das Fehlen von Mucin-sezernierenden Zellen, einem geringeren Anteil an mit Zilien ausgestatteten Becherzellen, und Clarazellen (Carbone 1997).

Die Alveoli (Lungenbläschen, Ort des Gasaustausches zwischen Atemluft und Blut) zeichnen sich durch das Vorkommen zweier typischer Zellen aus, den flachen Typ I Pneumozyten (Deckzellen), die mehr als 90% der Alveolaroberfläche einnehmen, und den würfelförmigen

TypII Pneumozyten (Nischenzellen), die das sogenannte *Surfactant* (monomolekulärer Phospholipidfilm) und Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*) enthalten. Während die Neubildung von *Surfactant* durch TypII Pneumozyten erfolgt, sorgen die TypI Pneumozyten für die Entfernung des *Surfactant* durch Pinocytose (Carbone 1997).

Es wird angenommen, daß Lungentumoren aus einer pluripotenten Stammzelle epithelialen Ursprungs entstehen. Sowohl Clarazellen als auch TypII Pneumozyten und Reservezellen kommen hierbei als Vorläuferzellen in Frage.

Die Tumorentwicklung selbst durchläuft mehrere histologisch definierbare prämalige Stadien, es lassen sich Hyperplasie und Metaplasie bis hin zum intraepithelialen *Carcinoma in situ* als Vorläufer-Stadium des invasiven Karzinoms beobachten (Carbone 1997).

Kommt es darüber hinaus zu invasiven Wachstum und somit zur Manifestation von Tumoren, lassen sie sich diese in zwei große Gruppen unterteilen, die sich sowohl klinisch als auch in ihrer Biologie unterscheiden. Beide Gruppen zeigen deutliche histologische Merkmale, die eine Einteilung in kleinzellige und nicht-kleinzellige Tumoren zuläßt. Häufig wird jedoch beobachtet, daß beide Formen innerhalb eines Tumors ineinander übergehen oder co-existieren. Annähernd 10% bis 20% aller Lungentumoren weisen gemischte Histiotypen auf, die zwischen den beschriebenen Morphologien liegen (Carbone 1997). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, daß alle Subtypen des Lungenkarzinoms einen gemeinsamen Ursprung haben.

Neben der Klassifikation der Lungentumoren in kleinzellige und nicht-kleinzellige Karzinome läßt sich innerhalb der letzteren Gruppe auf der Grundlage histologischer Kriterien eine weitere Einteilung in unterschiedliche Subtypen vornehmen. Man unterscheidet somit vier Haupttypen von Neoplasien der Lunge: Kleinzeller (SCLC), großzellige, undifferenzierte Karzinome (LCC), Adenokarzinome (ADC) und Plattenepithelkarzinome (SCC) (Becher 1995).

1.1.1 Kleinzellige Tumoren (SCLC)

Dieser Tumortyp stellt etwa 25% aller diagnostizierten Lungentumoren dar und tritt meistens in zentralen Bereichen der Lunge auf. Aufgrund histiotypischer Merkmale wird er als kleinzellig bezeichnet, denn die mittlere Größe eines Zellkerns beträgt nur 5,1µm, die der gesamten Tumorzelle 6,6µm (Müller und Theile; 1994).

Er zeichnet sich durch schnelles Wachstum und frühe Metastasierung aus. SCLC-Tumoren treten bereits früh als disseminierte Tumoren auf, was eine chirurgische Entfernung nicht

mehr möglich macht. SCLC-Zellen reagieren relativ sensitiv gegenüber einer Behandlung mit zytotoxischen Chemotherapeutika, ferner sind sie einer Strahlentherapie zugänglich.

SCLCs und daraus abgeleitete Zelllinien exprimieren typischerweise neuroendokrine Marker. Viele dieser sezernierten Faktoren besitzen mitogene Eigenschaften und binden an zelleigene Rezeptoren. Durch diese autokrinen bzw. parakrinen Stimulationsmechanismen sind SCLC-Zellen in der Lage, ihr eigenes Wachstum zu stimulieren (Johnson und Kelley, 1995).

Grundsätzlich werden von solchen Zellen L-dopa Decarboxylase, Chromogranin A, Synaptophysin und das neurale Zell-Adhäsionsmolekül gebildet. Diese Faktoren sind typisch für alle neuroendokrinen Zellen. Infolge dieser neuroendokrinen Differenzierung wird eine Entwicklung aus pulmonalen endokrinen Zellen angenommen (Carbone, 1997).

Einzelne Tumoren können bis zu zehn unterschiedliche Wachstumshormone produzieren. Überwiegend findet man in solchen Tumoren die Synthese von Gastrin-releasing peptide/Bombesin, Neuromedin B, Kalzitinin, Neurotensin, Arginin-Vasopressin und Corticotrophin, aber auch Insulin, Somatostatin, Glucagon, Gastrin, Substanz P und das parathyroid-ähnliche Peptid werden oft nachgewiesen (Carbone, 1997).

Davon ist das autokrine Gastrin-releasing-peptide (GRP)-System eines der am besten untersuchten beim SCLC. GRP hat große Homologien zu dem aus Amphibien isolierten Peptid Bombesin. Es wird physiologisch in neuroendokrinen Zellen der embryonalen Lunge, im zentralen Nervensystem und im GUT-endokrinen System exprimiert.

Vor allem die Bombesin-ähnlichen Peptide als autokrine Wachstumsfaktoren und vermutete Tumorsuppressorgene auf Chromosom 3 und 9 scheinen eine Rolle für die Genese und Entwicklung dieses Tumortyps zu spielen, da sie eine mitogene Wirkung auf normales Bronchialepithel und Zelllinien haben und Antikörper gegen diese und gegen das Gastrin-releasing peptide inhibitorisch auf das Zellwachstum des SCLC *in vitro* und *in vivo* wirken. GRP wird von nahezu allen SCLC und bis zu 20% der NSCLC gebildet (Moody et al., 1981; Viallet und Minna, 1989). Ein hochaffiner GRP Rezeptor wird ebenfalls in SCLC Tumoren exprimiert (Moody et al., 1985). Dieser Rezeptor für GRP ist ein Mitglied der Guanin-Nukleotid bindenden Protein-Familie (G-Protein). Das GRP/GRP-Rezeptorsystem ist eines der potentesten bekannten Systeme beim Bronchialkarzinom (Weynants et al., 1990).

Als molekulargenetische Marker zeigen 100% der SCLC-Zelllinien einen Verlust eines oder beider Arme des Chromosoms 3p, vor allem der Abschnitte 3p14, 3p21 und 3p25 (Gazdar, 1990; Minna, 1993; Johnson und Kelley 1995).

Ebenso ist eine Deletion oder Translokation der chromosomalen Region 9p21 (CDKN2-Gen) in SCLC häufig zu finden. Diese Region enthält das Gen für den Zyklin-abhängigen Kinase 4-Inhibitor, p16^{INK4}, einen wichtigen Regulator des Zellzyklusses (Johnson und Kelley, 1995; Wistuba et al., 1997).

SCLC weisen zusätzlich einen Verlust oder ein Rearrangement des RB-Genlokus in ca. 20% der Fälle auf. Fehlende oder nahezu keine mRNA Expression des Gens findet man bei 55% der Tumoren, und ein Fehlen des Proteins konnte in 80% aller Tumoren und auch Zelllinien gezeigt werden. Damit verfügen SCLC-Zellen nicht über ein wichtiges, den Zellzyklus regulierendes Tumorsuppressorgen (Weynants et al., 1990; Gazdar, 1992; Minna, 1993; Kalemkerian, 1994; Johnson und Kelley, 1995; Roth, 1995;).

1.1.2 Karzinoide

Karzinoide werden als ein Mitglied der Gruppe der Bronchialadenome angesehen. Sie entwickeln sich nur sehr langsam über Jahre oder Jahrzehnte und wachsen häufig lokal infiltrierend. Ein Auftreten dieses Tumors in der Peripherie der Lunge ist ungewöhnlich. Karzinoide machen etwa 1 bis 2% aller Lungentumoren aus und haben, ganz im Gegensatz zu den SCLCs, nur ein geringes metastasierendes Potential. Die Metastasierungshäufigkeit wird mit 5% bis 22% angegeben. Sie haben eine geringe Wachstumsrate, was sie operierbar macht. Dadurch haben diese Tumoren eine sehr hohe fünfjahres krankheitsfreie Überlebensrate von etwa 92%. Diese Tumorgruppe wird nicht mit Rauchen und der Exposition von Karzinogenen in Zusammenhang gebracht.

Typische Befunde in Zellen von Karzinoiden sind neurosekretorische Granula im Zytoplasma der Tumorzellen. Somit exprimieren Karzinoide unter anderem zum Teil neuroendokrine Faktoren (Müller: in Doerr, Seifert und Uehlinger, spezielle pathologische Anatomie, Pathologie der Lunge, Band 16 II).

Interessanterweise läßt sich das RB-Protein in 75% aller Karzinoid-Zelllinien wie in SCLC-Tumoren ebenfalls nicht nachweisen (Harbour et al., 1988).

1.1.3 Nicht-kleinzellige Tumoren (NSCLC)

Diese morphologische abgrenzbare Gruppe setzt sich aus Plattenepithelkarzinomen (SCC), Adenokarzinomen (ADC) und großzelligen Tumoren (LCC) zusammen. Dabei nehmen die SCC die prädominante Form des Lungenkrebses weltweit ein.

Die Zuordnung zu einer dieser Gruppen orientiert sich an der Auswertung histologisch faßbarer phänotypisch-variabler Differenzierungsmuster der Tumoren mit z.B. plattenepithelialen und drüsigen Strukturen im Vergleich zu anatomisch regelgerechten Gewebestrukturen. Dabei erreicht die Differenzierung der Strukturen unterschiedliche Grade, die über einen hohen, mittleren, niedrigen bis zu unbestimmbarer Differenzierung führen (Übersichtsartikel: Gazdar, 1992; Testa und Siegfried, 1992; Minna, 1993; Kalemkerian, 1994; Müller, 1994; Roth, 1995; Becher, 1993 und 1995; Schuermann, 1995; Müller et al., 1995; Tockman, 1996; Carbone, 1997; Wistuba et al., 1997).

1.1.3.1 Plattenepithelkarzinome (SCC)

SCCs sind stark assoziiert mit chronischem Tabakkonsum. Sie entwickeln sich als isolierte knotige Rundherde in der Lungenperipherie oder bevorzugt im Bereich der Segment- und Subsegmentbronchien als stenosierend wachsende Tumoren (Carbone, 1997).

In den Tumoren lassen sich häufig metaplastische und dysplastische Bereiche um den Tumor beobachten. In fortgeschrittenen Tumorphasen sind Nekrosen bis zur ausgedehnten Kavernenbildung häufige Befunde.

Tumoren mit squamöser Differenzierung werden im Grunde nie im tracheo-bronchialen Epithel gefunden, so daß angenommen wird, daß diese Tumorentität aus normalen, sich differenzierenden Vorläuferzellen entsteht, die durch verschiedenen Faktoren maligne entarten können (Müller et al., 1995).

Mikroskopisch bauen sich diese Tumoren aus mehr oder weniger deutlich epidermisähnlichen Epithelverbänden auf. In den atypischen Tumorzellen kann eine massive Keratinexpression bis zur Ausbildung konzentrischer Hornperlen vorgefunden werden. Generell sind hochmolekulare Keratine, Involukrin- und Transglutaminase-Expression und eine Überexpression von EGF-Rezeptoren typisch für Plattenepithelkarzinome (Roth, 1995).

Die mittlere Kerngröße der Tumorzellen von Plattenepithelkarzinomen liegt bei 9µm, die durchschnittliche Zellgröße bei 14µm. Die Tumorzellen sind charakterisiert durch ausgedehnte Kernatypien mit Lappungen und prominenten Nukleolen. Das tumorführende Stroma besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I und III, wobei höher differenzierte und offensichtlich langsam wachsendere Tumoren sich durch einen höheren Stromaanteil im Vergleich zu niedrig differenzierten Karzinomen auszeichnen. Die Angaben der Häufigkeit der Plattenepithelkarzinome schwanken zwischen 31% und 45% (Müller et al., 1995).

1.1.3.2 Adenokarzinome (ADC)

Beim Adenokarzinom unterscheidet man zwischen azinären, papillären und soliden Varianten. Über die Vorgänge der Entstehung der Adenokarzinome (ADC) ist kaum etwas bekannt, es läßt sich jedoch beobachten, daß das Umgebungsgewebe solcher Tumoren hyperplastisch und atypisch ist (Müller, 1994).

Diese Tumoren entstehen bevorzugt in der Lungenperipherie und produzieren intrazelluläre mucinhaltige Granulas als Folge ihrer azinösen bzw. glandulären Differenzierung. Es wird angenommen, daß viele der Adenokarzinome sich aus Vorläuferzellen der peripheren Luftwege, den TypII Pneumozyten und Clarazellen entwickeln (Müller et al., 1995).

Im Bereich der Blutgefäße der zentralen Stromaanteile sind häufig Tumorregressionen zu beobachten, die, zusammen mit einer besonderen angioinvasiven Tendenz dieser Tumoren, zu zentralen Nekrosen und Vernarbungen führen. Die morphologisch faßbare hohe Angioinvasivität als besonderes Zeichen der pulmonalen Adenokarzinome spiegelt sich in der relativ hohen hämatogenen Metastasierungsrate, bevorzugt in das zentrale Nervensystem, wider.

Die mikroskopische Charakterisierung resultiert aus der mehr oder weniger deutlichen Entwicklung atypischer drüsenähnlicher Strukturen. Dort können histochemisch in unterschiedlicher Ausprägung Schleimsubstanzen oder Sekretvakuolen nachgewiesen werden. Das endoplasmatische Retikulum ist kräftig entwickelt. An der Zelloberfläche können Mikrovilli ausgebildet sein.

Adenokarzinomzellen zeigen häufig mehrkernige Riesenzellen, was ihre Abgrenzung zu den großzelligen Karzinomen schwierig macht. Die mittlere Zellgröße des Adenokarzinoms liegt bei $13,2\mu\text{m}$, die mittlere Kerngröße bei $8,5\mu\text{m}$ (Müller et al., 1995).

Der histopathologische Differenzierungsgrad des Adenokarzinoms korreliert mit dem Krankheitsverlauf, so liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei Patienten mit hochdifferenzierten Karzinom bei 87%, bei Patienten mit niedrig differenzierten Tumor nur bei 30%.

Die Häufigkeitsangaben für das Vorkommen dieses Tumors liegen zwischen 18% und 40% (Müller et al., 1995).

1.1.3.3 Bronchioalveolarkarzinome, Alveolarzellkarzinome (BAC)

Diese Tumorform wird allgemein als ein Subtyp der ADCs angesehen, der in den terminalen Bronchiolen und Alveolis entsteht (Carbone 1997).

Zellen dieses Tumortyps zeichnen sich vor allem durch ihr Wachstumsverhalten aus. Sie wachsen entlang der Alveolarwände, ohne dabei die darunterliegenden Strukturen zu zerstören.

Einige dieser Tumoren sezernieren Schleim und entstehen daher wahrscheinlich aus metaplastischen Schleim-produzierenden Zellen, die aber in den normalen Luftwegen selbst kein Schleim absondern. Viele dieser Tumoren haben ultrastrukturelle Ähnlichkeit und ein vergleichbares biochemisches Profil wie Clarazellen und TypII Pneumozyten (Müller et al., 1995).

1.1.3.4 Großzellige Karzinome

Dieser Lungentumorsubtyp ist ein undifferenzierter Tumor, der nicht den SCLC zugeordnet werden kann, aber keinerlei squamöse oder glanduläre Differenzierung aufweist. Tumoren mit vorwiegend großzelligem Typ sind jedoch sehr selten. In der Regel handelt es sich um Tumoren mit führender plattenepithelialer oder adenoider Komponente, in denen herdförmig, auch gehäuft, mehrkernige Riesenzellen entwickelt sind.

Ultrastrukturuntersuchungen haben jedoch gezeigt, daß neuroendokrine Marker sich in diesem Tumortyp nachweisen lassen.

Großzellige Karzinome machen etwa 10% bis 20%, anderen Angaben nach nur 1% bis 7%, aller Lungentumoren aus (Müller et al., 1995).

1.2 Die Akkumulation von DNA-Schäden führt zur Entstehung eines Tumors

Tumorzellen sind aus einer normalen Körperzelle hervorgegangen, durch Änderung ihres Genoms entartete Zellen mit der Fähigkeit eines autonomen, das heißt unkontrollierten, und progressiven Wachstums. Als Tumor im engeren Sinne (Neoplasie) bezeichnet man eine Gewebeneubildung in Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten, autonom und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist.

Die Entstehung und Ausbreitung, und damit die Progression maligner Tumoren wird heute als Folge einer allmählichen Akkumulation von genetischen Schäden erklärt. Einhergehend mit der Anhäufung von genetischen Veränderungen lassen sich morphologische Umwandlungen der vorhandenen Gewebestrukturen beobachten, die über die Stadien der Hyperplasie, Dysplasie des präinvasiven und invasiven Karzinoms bis hin zur Fernmetastasierung führen

(Fearon und Vogelstein 1990; Wistuba et al., 1997). Auch beim Bronchialkarzinom können ausgehend vom normalen Bronchial- und Alveolarepithel solche veränderlichen Prozesse beobachtet werden.

Lungenkrebs entsteht, wie andere epitheliale Tumoren, nicht *de novo* aus normalem Epithel, sondern nach einer Serie von morphologischen und progressiven pathologischen genetischen Veränderungen, die teilweise Jahre dauern können. Solche schrittweisen Anhäufungen von Schäden der DNA im Bronchialepithel führen dann zu präneoplastischen Gewebeveränderungen. Die Beobachtung, daß in den Prozeß der malignen Transformation Gene involviert sind, die eine veränderte Form von normalen, in eukaryontischen Zellen enthaltenen Genen sind, hat viel zum molekularen Verständnis der Lungenkarzinogenese beigetragen.

Die nachzuweisenden genetischen Alterationen sind chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen. Multiple genetische Veränderungen können in jedem Lungentumor beobachtet werden. Viele Fälle zeigen dabei fast vollständige Triploidien oder Tetraploidien. Auch Polysomien und partielle Verluste einzelner Chromosomen werden beobachtet. Immer wieder auftretende Verluste betreffen die chromosomalen Abschnitte 1p, 3p, 5q, 6q, 7p, 9p, 11p, 15p und 17p (Testa und Siegfried, 1992; D'Amico et al., 1992; Kishimoto et al., 1995; Walker et al., 1995; Miozzo et al., 1996). Besonders häufig, wenn nicht die häufigste Beobachtung bei Lungentumoren ist der Verlust von 3p. Der Verlust eines Allels von Teilen des kurzen Armes von Chromosom 3 wird bei mehr als 90% der kleinzelligen und bis zu 50% der nicht-kleinzelligen Karzinome beobachtet (Whang-Peng et al., 1982; Hibi et al., 1992). Der 3p Allelverlust ließ sich schon in präneoplastischen Läsionen, Stadien erkennbarer Hyperplasie und Dysplasie, nachweisen (Hung et al., 1995).

Neben den Verlusten großer chromosomaler Abschnitte sind aber auch Modifikation einzelner Gene durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen belegt. Viele dieser veränderten Gene sind direkt oder indirekt an der Regulation von Wachstum, Proliferation oder Differenzierung der Zelle involviert (Bishop, 1991).

So kann die Aktivierung eines Wachstum-stimulierenden Gens Folge einer DNA-Schädigung sein. Diese als dominante Onkogene bezeichneten Gene lassen sich nach ihren Aufgaben in Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, zytoplasmatische Signaltransduktoren und nukleäre Transkriptionsfaktoren aufteilen (Hunter et al., 1991). Einige der bekanntesten Onkogene sind dabei *H-ras*, *K-ras* und *N-ras* (kodieren für G-Proteine), ebenso wie *c-myc*, *N-myc* und *L-myc*, *raf* (Produkte sind Mitogen-aktivierte Protein

Kinasen), *myb* (Kern-Onkogen), *fos* und *jun* (kodieren für Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1) und *bcl-2* (das Protein ist ein Apoptoseinduktor).

Bei Lungentumoren spielt die *ras*-Familie vor allem eine Rolle in NSCLC, wo eine Mutation dieses Gens in etwa 50% aller Fälle, hauptsächlich in Adenokarzinomen, nachgewiesen werden kann. In SCLC spielen *ras*-Mutationen praktisch keine Rolle (Mitsudomi et al., 1991; Rodenhuis et al., 1988). *myc*-Gene hingegen sind selten mutiert, allerdings sind sie häufig überexprimiert oder weisen eine Genamplifikation auf. Eine Amplifikation von *myc* läßt sich mit dem varianten Phänotyp einiger SCLC in Verbindung bringen (Prins et al., 1993; Brennan et al., 1991). Die Expression des Onkogens *bcl-2* ist in den meisten SCLC, bis zu 65% aller Fälle, und in ca. 25% der NSCLC nachweisbar. Eine nachweisbare Überexpression der letzteren Gruppe ist bei 12% der untersuchten Adenokarzinome und 25% der Plattenepithelkarzinome gefunden worden (Yan et al., 1996; Jiang et al., 1995; Pezzella et al., 1993).

Das Ergebnis eines Schadens der DNA kann ebenso eine Inaktivierung eines wachstumshemmenden Gens, eines Tumorsuppressorgens, sein. Zu einem funktionellen Verlust dieser Gene kommt es erst, wenn beide Genkopien (Allele) betroffen sind.

Tumorsuppressorgen-Produkte sind häufig Proteine, die das Zellzyklusprogramm kontrollieren, die genomische Integrität aufrecht erhalten, oder sie sind funktionell wichtige Moleküle in der Zellverankerung. Der Prototyp eines Tumorsuppressors ist das *rb*-Gen, das für ein nukleäres Phosphoprotein kodiert, welches in der Regulation des Zellzyklusses eine wesentliche Rolle spielt.

Während zwischen 60% und 95% aller SCLC kein oder ein abnormales RB-Protein aufweisen, ist dieses Protein nur selten in NSCLC (10%-25%) betroffen (Harbour et al., 1988). Das Tumorsuppressorgen *p53* hat Aufgaben bei der Erhaltung der Genomstabilität, der DNA-Reparatur, sowie der Transaktivierung und Regulation anderer für die Zellteilung wichtiger Gene und der Induktion der Apoptose als Folge genetischer Schäden. Das *p53*-Protein kann ebenso wie RB die Zellzyklusregulation als negativer Regulator beeinflussen, indem es einen Zellzyklusarrest bewirkt. *p53* ist häufig in Lungentumoren verändert. Mutationen findet man in über 50% der NSCLC und über 90% der SCLC. Eine Korrelation mit *p53* Mutationen und einer Chemoresistenz konnte gezeigt werden (Chiba et al., 1990; D'Amico et al., 1992).

Neben den klassischen Tumorsuppressor- und Onkogenen sind häufig auch Gene für Oberflächenrezeptoren, die der interzellulären Kommunikation dienen, deren Liganden, oder Rezeptoren, die Zellen in der extrazellulären Matrix bzw. aneinander verankern, betroffen.

Ist die normale Funktion eines Adhäsions-Rezeptors nicht mehr gewährleistet, kann dies zu einem Lösen der Zelle aus dem Zellverband bzw. des Mikromillieus führen oder zu einer bis dahin nicht vorhandenen Möglichkeit, an andere Substrate zu binden. Solche Prozesse spielen für die Metastasierung eine entscheidende Rolle. Als Folge einer Veränderung von Rezeptoren, die der Zellkommunikation dienen, kann es zu einer fehlerhaften Signalübertragung kommen. Modifikationen an solchen in der Signaltransduktionskaskade beteiligten Molekülen führen zu einer nicht-koordinierten und nicht-funktionellen Reaktion auf eintreffende Informationen. Auch veränderte Liganden solcher Rezeptoren können zu einer modifizierten Aktivierung des entsprechenden Rezeptors führen. Ebenso ist eine Bindung an einen für diesen Liganden unspezifischen Rezeptor denkbar. Da Rezeptor-Liganden-Interaktionen zumeist positive Wachstumssignale vermitteln, kann auch die Produktion beider Komponenten von einer Tumorzelle ihr die Fähigkeit eines autokrinen Wachstums geben.

1.3 Molekulare Mechanismen der Wachstumsregulation

Für die Entwicklung und das Zusammenspiel multizellulärer Organismen ist die interzelluläre Kommunikation und die Steuerung von Proliferationsprozessen von entscheidender Bedeutung. Solche Vorgänge werden von Faktoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone) durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Diese leiten die Signale über komplizierte Verkettungen von Transmittern im Zellinneren bis hin zur eigentlichen Zielstruktur, der DNA weiter (Hill et al., 1995).

Die Übertragung des Signals vom Rezeptor in den Zellkern erfolgt zumeist mittels Übertragung von Phosphatgruppen durch Kinasen bzw. Phosphatasen, die in einer festgelegten Reihenfolge aktiviert werden. Die komplexe Signaltransduktionskaskade, die durch Bindung extrazellulärer Faktoren ausgelöst wird, stellt einen Kontrollmechanismus der Proliferation dar. Kommt es durch Mutation und Überexpression der zellulären Gene, die für die Signaltransmitter und ihre Rezeptoren kodieren, zu einer fehlerhaften Signalübertragung, kann eine kontrollierte Zellteilung nicht mehr gewährleistet werden, und es kann zu einer Transformation, d.h. zu einer bösartigen Veränderung einschließlich einer Änderung der Morphologie und des Wachstums der betroffenen Zellen kommen.

Viele der Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine stimulieren die Proliferation von Zellen. Exprimiert eine Zelle neben diesen Peptiden ebenfalls den entsprechenden Rezeptor, führt die Expression zu einer parakrinen bzw. autokrinen Stimulation. Autokrine Systeme sind in normalen Zellen vorhanden, sie sind dort streng kontrolliert und dienen der Reaktion und

Antwort auf physiologische Signale der interzellulären Kommunikation. Jedoch existieren gegenregulatorische Systeme, um das balancierte Wachstum aufrecht zu erhalten. Dieses Gleichgewicht ist bei Tumorzellen gestört. Die Co-Expression von Rezeptor und Ligand unterliegt keinen Kontrollmechanismen, es kommt zu einem sich selbst-stimulierenden, von anderen Einflüssen unabhängigen Zellwachstum. Die Bildung solcher autokriner Wachstumsschleifen spielt eine wichtige Rolle in der Tumorphogenese. Permanentes Wachstum von Tumoren steht häufig in Zusammenhang mit autokriner Stimulation der Zellen und kann zu einer Selektion hochmaligner Tumorzell-Varianten führen. Deregulierte Signaltransduktionswege vermitteln nicht nur mitogene Signale und somit eine konstitutive Aktivierung von wachstumsunterstützenden Wegen, sie beeinflussen ebenfalls die normale Zelldifferenzierung und modulieren den Phänotyp der Zellen (Aaronson, 1991).

1.3.1 Protein-Tyrosinkinasen

Viele Stoffwechsel- und Signalübertragungsvorgänge werden durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen reguliert. Serin und Threonin spielen unter den Aminosäuren, auf die Phosphatgruppen übertragen werden, quantitativ die größte Rolle. Bei einem geringen Anteil, ca. 0,1% der zellulären Phosphoproteine, sind die Phosphatreste an Tyrosin gebunden.

Enzyme, die solche Phosphorylierungsreaktionen katalysieren, werden als Protein-Kinasen bezeichnet. Der Gruppe der Tyrosinkinasen und ihren Substraten kommt, trotz des geringen Anteils an phosphorylierten Tyrosinen, dabei eine zentrale Bedeutung im Rahmen der Regulation von Wachstumsprozessen, morphologischen Programmen aber auch der malignen Transformation zu (Rodrigues et al., 1994).

1.3.2 Nicht-Rezeptortyrosinkinasen

Tyrosinkinasen, denen transmembranöse und extrazelluläre Domänen fehlen, werden als Nicht-Rezeptortyrosinkinasen oder zytoplasmatische Kinasen bezeichnet, da sie auf Grund ihres Aufbaus nicht auf der Zelloberfläche sondern nur im Zellinneren lokalisiert sind.

Aufgrund funktioneller und struktureller Charakteristika lassen sich die bekannten zytoplasmatischen Kinasen in acht unterschiedliche Familien aufteilen.

Eine Familie dieser Gruppe stellen die Src-Tyrosinkinasen dar (Hunter und Sefton, 1980). Für ihre Mitglieder codieren die Gene *src*, *yes*, *fyn*, *lyn* und *lck*. Die Proteine dieser Gene sind beteiligt an der Übertragung extrazellulärer Signale in die Zelle, indem sie intrazellulär an

Rezeptoren, die zum Teil eigene Tyrosinkinaseaktivität aufweisen, binden (Bolen et al., 1991).

Eine weitere wichtige Gruppe der Nicht-Rezeptortyrosinkinasen sind die mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die MAP-Kinasen, die sowohl Serin als auch Threonin und Tyrosin in Zielproteinen phosphorylieren. Sie geben Signale ins Zytoplasma weiter und bilden das Ende der Signaltransduktionskaskade, indem sie Transkriptionsfaktoren aktivieren. (Seger et al., 1991; Wu et al., 1991).

1.3.3 Rezeptortyrosinkinasen

Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose sind zum Teil durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine reguliert, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Viele der üblichen Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF oder FGF binden dabei an Rezeptortyrosinkinasen. Solche Rezeptortyrosinkinasen besitzen die physiologische Aufgabe, extrazelluläre Botschaften in intrazelluläre Signale umzuwandeln. Diese Vermittlung meist positiver Wachstumssignale kann dann gestört sein, wenn die normale Funktion des Rezeptors durch Mutation, Aberration oder Überexpression nicht mehr gewährleistet ist. Eine solche Fehlfunktion und damit das Vermitteln „falscher“ Signale spielt bei der Genese von Tumoren häufig eine entscheidende Rolle. Exprimieren Zellen solche in ihrer Wirkung veränderte onkogene Rezeptoren, können sie in die Lage versetzt werden, ihr zelluläres Programm bezüglich Proliferation und Differenzierung so zu modulieren, daß sie entarten, das heißt zu unbegrenzter oder beschleunigter Teilung fähig und somit zu einer Tumorzelle werden.

In einfachsten Fall kann eine Veränderung der Expression eines Rezeptors oder seines Ligand schon eine neoplastische Transformation auslösen. Dies konnte für Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie, die CSF-Rezeptoren, die Rezeptoren der Axl-Familie und die Met-Rezeptoren gezeigt werden. Eine Modifikation kann aber auch zu einer Liganden-unabhängige Aktivierung führen, wie im Fall einiger EGF-Rezeptoren, c-kit und anderer (Fantl et al., 1993).

Die Aktivierung eines Zelloberflächenrezeptors wird durch die Bindung eines spezifischen Liganden an seine extrazelluläre Domäne eingeleitet. Diese Bindung löst eine Kaskade von Ereignissen aus, die die Tyrosinkinaseaktivität und Proteinphosphorylierung (Autophosphorylierung bzw. Phosphorylierung anderer zellulärer Proteine, die mit den zytoplasmatischen Domänen assoziiert sind), die Stimulation von *second messenger*-erzeugenden Systemen, Ionen-Ströme und eine verstärkte DNA-Synthese beinhalten und in

Proliferation und Differenzierung gipfeln kann (Ullrich et al., 1984, Ullrich und Schlessinger, 1990).

Der strukturelle Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen ist allen Mitgliedern dieser Gruppe gemeinsam. Dieser Grundplan gliedert sich in eine große extrazelluläre, glykosylierte Ligandenbindungsdomäne, eine daran angeschlossene hydrophobe Transmembrandomäne und eine dem Zytoplasma zugewandte katalytische Effektor-domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Die Ligandenbindungsdomäne gewährleistet die hochspezifische Erkennung und Bindung des Liganden, die zu einer Stimulation des Rezeptors führt (Schlessinger et al., 1992). Wird der Rezeptor über den Liganden aktiviert, so kommt es zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Rezeptormolekülen (Heldin et al., 1995) oder zu einer Konformationsänderung. Dabei werden sowohl homomere Proteinkomplexe als auch heteromere Komplexe aus unterschiedlichen Rezeptormolekülen gebildet. Viele onkogene Mutationen führen zu einer konstitutiven Dimerisierung von Rezeptoren und imitieren so die Wirkung der physiologischen Liganden.

Die Transmembrandomäne ist im wesentlichen aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut und verankert den Rezeptor in der Plasmamembran. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß ihr zusätzliche Aufgaben bei der Signaltransduktion zukommen (Bargmann und Weinberg, 1988).

Die katalytische Domäne liegt im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptormoleküls. Durch Homo- bzw. Heterodimerisierung wird eine Autophosphorylierung rezeptoreigener Tyrosine und eine Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine durch Übertragung anorganischer Phosphatgruppen auf Substratproteine induziert. An die phosphorylierten Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne binden zelluläre Proteine, die charakteristische Sequenzmotive (SH₂ Domänen; *Src-Homology-Domänen Typ II*) aufweisen. Sie stellen die Verbindung ins zytoplasmatische Milieu und der weiteren Signalkette dar. Die Spezifität der Bindung von Proteinen an die Phospho-Tyrosin-Reste der Rezeptoren wird durch die Struktur der SH₂ Domäne und dreier benachbarter Aminosäuren bestimmt. Mutationen im Bereich der Kinasedomäne können zu Störungen der Signalübertragung führen (Ullrich und Schlessinger, 1990).

Aufgrund struktureller Homologien lassen sich die Rezeptortyrosinkinasen in unterschiedliche Familien einteilen (Wilks, 1993) (EGF-Rezeptoren, Insulin-Rezeptoren, PDGF-Rezeptoren, Met-Rezeptoren, Ret-Rezeptor, VEGF-Rezeptoren, Trk-Rezeptoren, FGF-Rezeptoren, Eph-

Rezeptoren und Axl-Rezeptoren). Als strukturelle Motive der Ligandenbindungsdomänen treten neben cysteinreichen Domänen auch häufig Cadherin-, immunglobulinähnliche und Fibronectin Typ III Domänen auf, die mit ihrer β -Faltblattstruktur zur Stabilisierung des Rezeptors beitragen.

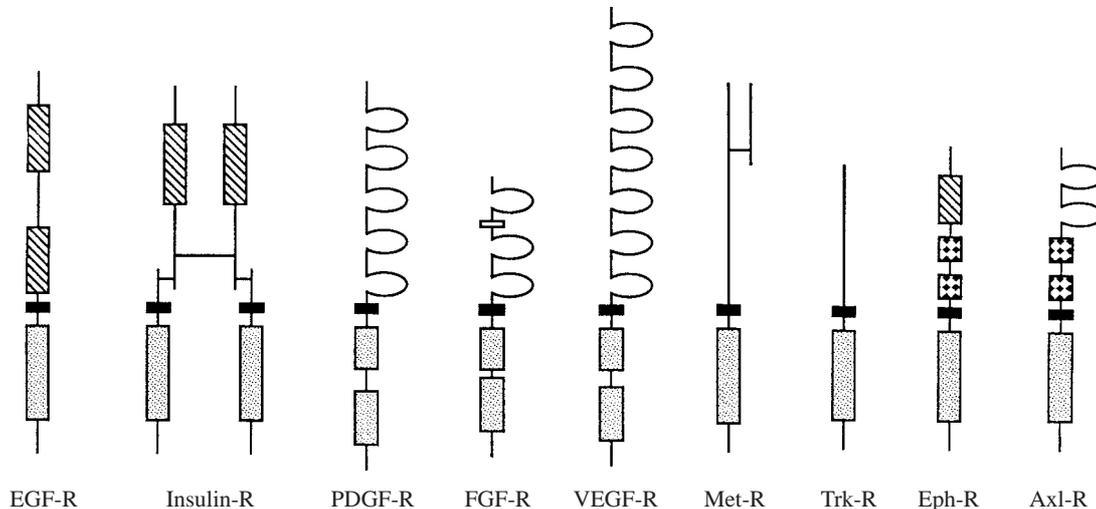


Abb. 1 Rezeptortyrosinkinasefamilien der Vertebraten

Dargestellt sind unterschiedliche Subfamilien von Rezeptortyrosinkinasen, basierend auf der Klassifikation von Ullrich und Schlessinger (1990). Die strukturellen Merkmale sind wie folgt dargestellt: Tyrosinkinasedomänen (gepunktete Felder); Transmembrandomänen (ausgefüllte Felder); cysteinreiche Regionen (gestreifte Felder); Immunglobulin-ähnliche Domänen (Halbkreise); *acid-box* Domänen (offene Felder); Fibronectin Typ III Domänen (karierte Felder) (nach Fantl et al., 1993).

1.4 Onkogene Rezeptortyrosinkinasefamilien

1.4.1 EGF-Rezeptortyrosinkinasen

Der Prototyp dieser Familie ist der EGF-Rezeptor (*c-erb B1*) selbst. Zu dieser Familie zählen zusätzlich die Rezeptoren der Gene *erb B2* (Her-2/neu-Rezeptor), *erb B3* und *erb B4*. Alle Rezeptoren dieser Familie besitzen zwei cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne und eine zusammenhängende Tyrosinkinase-Domäne im zytosolischen Teil. Eine EGF-Rezeptorexpression wird in einer Vielzahl von Geweben beobachtet. Die onkogene Wirkung dieser Kinase-Familie beruht auf strukturellen Aberrationen. Die Rezeptoren sind dabei durch Mutationen (trunkierte Formen) so verändert, daß sie konstitutiv aktiviert sind. Auch Überexpression und Genamplifikationen, die zu einer fehlregulierten Signalübertragung wachstumsregulierender Signalen führt, sind als ursächlich an der onkogenen Wirkung beschrieben (Downward et al., 1984; Bargmann et al., 1986; Collins et al., 1988; Gullick, 1990). Für den *erb B2*-Rezeptor wurde zusätzlich eine Punktmutation im für die

Transmembrandomäne kodierenden Genabschnitt beschrieben, der eine konstitutive Dimerisierung der daraus entstehenden Rezeptoren bewirkt (Gullick et al., 1990).

Häufig werden in Tumoren die Wachstumsfaktoren EGF und TGF α (transforming growth factor α) zusammen mit dem EGF-Rezeptor exprimiert, so daß es zu autokrin bzw. parakrin vermittelten Wachstum kommt.

erb B1 und *Her-2/neu* gelten als Protoonkogene. Eine Überexpression des *erb B1* Gens wird bis zur 50fachen Amplifikation in Plattenepithelkarzinomen beobachtet. Eine *erb B2* Überexpression ist in NSCLC, im Gegensatz zu SCLC, die kein *erb B2* exprimieren, häufig nachzuweisen (40% der Fälle). Genamplifikationen von *erb B2* sind selten in NSCLC. Beim *erb B2* Gen scheint zusätzlich eine erhöhte mRNA-Stabilität als Ursache für eine erhöhte Proteinexpression mit verantwortlich zu sein. Adenokarzinome weisen die höchste Expressionsrate auf (Knyazev et al., 1992; Weiner et al., 1990).

Die Überexpression von *Her2/neu* korreliert mit einem schlechteren Überleben und einer erhöhten Chemoresistenz, vor allem bei Patienten mit Adenokarzinom, eine *erb B1* Überexpression dagegen mit einer kürzeren mittleren Überlebenszeit von Patienten mit Plattenepithelkarzinom.

1.4.2 Insulin-Rezeptoren

Zu dieser Familie gehört außer dem Insulin-Rezeptor auch der IGF-1-Rezeptor. Rezeptoren der Insulin-Rezeptor-Familie sind Heterotetramere, die aus zwei α - und zwei β -Einheiten bestehen. Beide Rezeptoren bilden Heterodimere aus, indem sie die extrazellulären Ligandenbindungsdomänen über Disulfidbrücken verbinden. Die Bindung des Liganden bewirkt neben der Heterodimerisierung auch die gegenseitige Phosphorylierung. Der Insulin-Rezeptor spielt bei der Regulation metabolischer Prozesse wie dem Glukosetransport und der Lipolyse, ebenso wie bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle. Dem IGF-1-Rezeptor wird eine Funktion im Rahmen der Wachstumsstimulation von Fibroblasten des Tumorstromas durch IGF-1-produzierende Karzinomzellen zugeschrieben.

IGFs und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Lungenentwicklung und dem Wachstum der Zellen des Respirationstraktes. In vielen Bronchialkarzinomzelllinien können IGF-1 und der IGF-1-Rezeptor autokrine Proliferation vermitteln (Nakanishi et al., 1988; Ankrapp und Bevan, 1993). Es konnte gezeigt werden, daß Zellen, die den IGF-1-Rezeptor

nicht exprimieren, sich nicht transformieren lassen (Sell et al., 1993). Die Wirkung von IGF-1 kann durch Somatostatin-Analoga geblockt werden. Eine Expression von IGFs in Lungentumoren wird als negativ prognostischer Faktor angesehen.

1.4.3 PDGF-Rezeptoren

Als Mitglieder dieser Familie sind die PDGF-Rezeptoren α und β (*platelet derived growth factor receptor*), der M-CSF-Rezeptor (auch CSF-1-R), *c-fms* (*macrophage colony stimulating factor receptor*) und FLT1, FLT3/FLK2 bekannt. Strukturell zeichnen sie sich durch das Auftreten von 5 Immunglobulin-ähnlichen und zwei Kinasedomänen aus.

Der PDGF-Rezeptor kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden, die sich in ihrer Spezifität und in ihrer Gewebeexpression unterscheiden.

Zu einer Autokrinie kommt es beim PDGF-Rezeptor häufig durch eine Veränderung des Liganden. Eine Mutation im Gen des Wachstumsfaktors verändert die Rezeptorbindung des verfälschten Proteins, durch die es zur Fehlregulation der Rezeptoraktivierung und des Wachstums kommt.

Der CSF-1-Rezeptor wurde als Zellmembranrezeptor auf Makrophagen identifiziert und kann durch Mutation zu Liganden-unabhängiger Transformation führen. In kleinzelligen Lungentumoren ist das Transkript von *c-fms* nicht nachweisbar.

c-kit gehört ebenfalls zur Familie der PDGF-Rezeptoren. Der Ligand für *c-kit* ist SCF (*stem cell factor*; auch *kit* oder *mast cell growth factor*), der vor allem von Fibroblasten hergestellt wird (Williams et al., 1990). Eine Interaktion zwischen SCF und *c-kit* spielt eine Rolle in der Regulation der normalen und malignen Hämatopoese, hierbei vor allem bei der erythroiden und myeloiden Differenzierung (André et al., 1989). Eine wichtige Rolle nimmt *c-kit* auch bei der Entwicklung des intestinalen „Schrittmacher“-Systems ein, und eine abnorme Expression wird in Patienten mit Morbus Hirschsprung gefunden (Yamatoka et al., 1995).

Die onkogene Wirkung von *c-kit* scheint, im Gegensatz zur onkogenen Aktivierung von *c-fms*, nicht mit einer Mutation des Rezeptors verbunden zu sein (Arland et al., 1994).

In der Differenzierung von Lungentumoren kommt *c-kit* eine besondere Rolle zu, da es ausschließlich von kleinzelligen Tumoren und Zelllinien exprimiert wird.

Da *c-kit* eine Rolle in der Regulation des zellulären Wachstums spielt, könnte das Vorkommen dieses Rezeptors in Zusammenhang mit dem enorm schnellen Wachstum solcher Zellen stehen. Untersuchungen zeigten, daß in kleinzelligen Tumoren und Zelllinien weder

Amplifikationen noch Rearrangements des *c-kit* Gens gefunden wurden. Damit scheint *c-kit* ein eindeutiger biologischer Marker für SCLC darzustellen. So könnte auch die einmalige Charakteristik von kleinzelligen Tumoren mit dem Produkt des *c-kit* Gens verbunden sein, das wahrscheinlich an autokriner oder parakriner Stimulation des SCLC-Wachstums teilnimmt (Hibi et al., 1991).

Interessanterweise läßt sich das *c-kit* Produkt auch in normaler Lunge, wenn auch nur in sehr geringen Mengen, nachweisen. Dort scheint es während der Embryonalentwicklung eine Rolle zu spielen. *c-kit* konnte aber auch in Zellen hämatopoetischen Ursprungs und in Glioblastomen nachgewiesen werden (Sekido et al., 1991). Eine Co-Expression von *c-kit* und SCF wurde für einen Großteil der SCLC-Tumoren und Linien gezeigt, dabei blieb jedoch unklar, welchen Einfluß dieses potentiell autokrine System auf das Wachstum hat (Rygaard et al., 1993).

1.4.4 Met -Rezeptorfamilie

Zu diese Gruppe von Rezeptortyrosinkinasen gehören die Rezeptoren Ron, dessen Ligand das MSP (Makrophagen stimulierendes Protein) ist (Wang et al., 1994), die Lim-Kinase (*c-sea*) und der Met/HFG-Rezeptor, für den HGF (*hepatocyte growth factor*)/SC (*Scatter factor*) als Ligand beschrieben ist. Der HGF-Rezeptor besitzt zwei extrazelluläre Untereinheiten, die durch proteolytische Spaltung eines einkettigen Vorläufermoleküls entstehen.

Ron (*Recepteur d'Origine Nantaise*) hat eine 63% Sequenzidentität in der intrazellulären Region mit Met. Das Gen für Ron ist auf Chromosom 3p21 lokalisiert, einer Region, die in SCLC deletiert ist. Transkripte des Ron-Gens ließen sich u.a. in normaler Lunge nachweisen. Ron ist funktionell bedeutsam für die Entwicklung von Epithelien, Knochen (Ossifikation) und neuroendokrinen Geweben, in dem Zellen zur weiteren Proliferation stimuliert werden (Gaudino et al., 1995).

c-Met ist vor allem in epithelialen Geweben und Tumoren epithelialen Ursprungs nachweisbar. In der Leber reguliert *c-Met* und HGF/SF die Regeneration des Gewebes. Da HGF/SF das Zellwachstum unterschiedlicher Zelltypen stimulieren kann, spielt ein fehlreguliertes *c-Met*-HGF/SF-System eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tumoren. Zusätzlich erhöht HGF/SF die Motilität unterschiedlicher Epithelien und Endothelzellen, vermindert ihren Zusammenhalt und unterstützt so die Invasivität von (epithelialen) Karzinomzellen in die Extrazellulärmatrix. Diese Eigenschaft des Wachstumsfaktors wird

unterstützt von der Tatsache, daß HGF/SF einen Verlust der Differenzierung in epithelialen Zellen induziert.

In der Entwicklung von Organstrukturen kann HGF/SF als Morphogen dienen, indem es das Auswachsen von tubulären Strukturen fördert. So wird eine starke Wachstumspromotion und ein invasives Einwachsen röhrenförmiger Zellgebilde in die Kollagen-Matrix durch HGF/SF beobachtet. HGF/SF unterstützt in solchen Zellen sowohl das Wachstum als auch die Motilität der Zellen. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, daß HGF/SF auch angiogenetisch wirkt. Seine Wirkung entfaltet HGF/SF dabei über eine Bindung und Aktivierung von c-Met (Weidner et al., 1993a und b).

Eine starke Expression von Met konnte in NSCLC-Tumoren beobachtet werden, aus denen ohne weitere Behandlung Zelllinien gezogen werden konnten. Aus Primärtumoren, die keine starke Expression von Met aufwiesen, ließen sich keine Zelllinien etablieren (Liu und Tsao, 1993).

Eine autokrine Stimulation von Met-HGF/SF in Lungenkarzinomzelllinien wurde ebenso gezeigt (Itakura et al., 1994) wie eine parakrine Stimulation der DNA Synthese von Alveolarepithelzellen Typ II, welche Met exprimieren (Shiratori et al., 1995). HGF/SF ist ein Mitogen für humane Bronchialepithelzellen und Lungenkarzinomzellen, die Met exprimieren, bei denen aber keine mRNA für HGF/SF nachweisbar ist. HGF/SF stimuliert bei diesen Zellen die Proliferation und die Formation von Kolonien. Ein Einfluß von HGF/SF als wahrscheinlich parakriner Wachstumsfaktor auf Zellen des Bronchus und ein Einfluß auf das Wachstum und die Progression von Lungentumoren konnte so gezeigt werden (Singh-kaw et al., 1995).

Eine weitere Studie zeigte, daß Met auch in einem Großteil der SCLC-Tumoren und Zelllinien exprimiert wird, jedoch eine Co-Expression mit HGF/SF in weniger als 5% der untersuchten Fälle nachweisbar ist. Da aber HGF/SF sowohl im Plasma präsent ist, wie auch von normalem Lungengewebe exprimiert wird, ist hier eine parakrine/endokrine Wirkung möglich. Wie sich diese Rezeptorstimulation allerdings auf das Wachstum der SCLC-Zellen auswirkt, ist unklar (Rygaard et al., 1993).

Lim-Kinase (*homeodomain-containing motif*, Lin-11, Isl-1, Mec-3)/Sea wird von hämatopoetischen Zellen und epithelialen Geweben exprimiert und spielt eine Rolle in der Embryogenese. Ein Einfluß auf die Zellwachstumsregulation wird vermutet (Huff et al., 1993).

Die Lim-Kinase hat zusätzlich eine Serin/Threonin-Kinase Aktivität und enthält ein nukleäre Signalsequenz, die einen Transport in den Zellkern wahrscheinlich macht. Ebenso finden sich Motive für eine Interaktion mit dem Zytoskelett. Aber auch eine Mitwirkung in der Signaltransduktion ausgelöst durch Zelladhäsion ist aufgrund des strukturellen Aufbaus denkbar (Mizuno et al., 1994).

Eine Expression von Lim-Kinase konnte in Lunge und anderen Geweben nachgewiesen werden (Ohashi et al., 1994).

1.4.5 Ret-Rezeptor

Das Proto-Onkogen *ret* (*rearranged during transfection*) kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase (Takahashi und Cooper, 1987), die in der Entwicklung des zentralen und des peripheren Nervensystems sowie dem exkretorischen System bei der Maus stark exprimiert ist. Neben der Steuerung der Entwicklung des nervösen Systems spielt *ret* eine fundamentale Rolle in der Nierenembryogenese (Pachnis et al., 1993; Avantaggiato et al., 1994; Tsuzuki et al., 1995). Die Ret-Rezeptortyrosinkinase besitzt eine extrazelluläre Cadherin-Domäne. Da Cadherine Zelladhäsion vermitteln, ist für Ret eine Funktion im Rahmen der Zelladhäsion wahrscheinlich.

Mutationen, die zu einer Funktionsverstärkung (*gain of function*) führen, sind assoziiert mit einer erblichen Prädisposition für Tumoren von familiären medullären Thyroid Karzinomen (FMTC) und multiplen endokrinen Neoplasien Typ 2A (MEN2A) und 2B (MEN2B) (Hofstra et al., 1994; Santoro et al., 1995). Dabei handelt es sich vor allem um Punktmutationen in der extrazellulären Domäne, die die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors konstitutiv aktivieren (Mulligan et al., 1993).

Generell wird eine Veränderung des *ret*-Proto-Onkogens in unterschiedlichen neuroendokrinen Tumoren assoziiert. Andere Mutationen, die einem Verlust der Funktion (*loss of function*) nach sich ziehen, führen zur Ausprägung der erblichen Hirschsprung-Krankheit. Diese kennzeichnet sich durch das angeborene Fehlen von parasymphatischen Basalganglien im unteren Intestinaltrakt (Romeo et al., 1994).

Als Ligand für Ret konnte GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) isoliert werden, der über den GDNF-Rezeptor α die Autophosphorylierung von Ret stimuliert (Jing et al., 1996). GDNF ist ein glykosyliertes, durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer und ein Mitglied der TGF β (*transforming growth factor β*)-Superfamilie (Lin et al., 1993).

In SCLC-Tumoren und daraus etablierten Zelllinien konnte in zwei von sechs untersuchten Tumorproben eine ausschließlich in dieser Tumorentität zu beobachtende Punktmutation detektiert werden, die in normalem Gewebe der selben Patienten nicht nachzuweisen war (Futami et al., 1995).

1.4.6 Weitere Rezeptortyrosinkinasefamilien

Viele weitere Familien von Rezeptortyrosinkinasen sind bekannt. So die VEGF-Rezeptorfamilie, die Neutrophin-Rezeptorfamilie (Trk), die Familie der FGF-Rezeptoren und die Eph-Rezeptoren von denen jedoch bisher keine onkogene Beteiligung an der Genese von Tumoren nachgewiesen werden konnte.

1.5 Die Axl-Rezeptortyrosinkinase Familie

Axl (*anexelektio*; unkontrolliert), auch als Ufo (*unidentified function of its protein*) oder ARK (*adhesion-related kinase*) bzw. Tyro7 bezeichnet, ist der Prototyp einer neuen Familie von Rezeptortyrosinkinasen (O`Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991; Rescigno et al., 1991; Bellosta et al., 1995).

Weitere Mitglieder dieser Familie sind die Rezeptoren Tyro3 (Sky, Rse, Brt, DTK, Tif, Etk2 und Rek) (Lai et al., 1994; Ohashi et al., 1994; Mark et al., 1994; Fujimoto und Yamamoto, 1994; Dai et al., 1994; Biscardi et al., 1996) und cMer (cEyk, Nyk und Tyro12) (Jia und Hanafusa, 1994, Graham et al., 1994).

Diese Rezeptorfamilie zeichnet sich durch eine extrazelluläre Domäne mit zwei Immunglobulin-ähnlichen, verbunden mit zwei Fibronectin-Typ III Domänen aus (Lai et al., 1994). Bisher war ein solcher Aufbau nur von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. N-CAM, und Rezeptorphosphatasen, z.B. DCC, bekannt (Cunningham et al., 1987; Streuli et al. 1989). Die Axl-Familie gehört zur Gruppe der Klasse I -Proteine, die durch eine Transmembrandomäne verankert sind und ihren N-Terminus in das extrazelluläre Milieu präsentieren.

Studien zeigten, daß die Mitglieder der Axl-RTK-Familie eine Rolle in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen, in der Funktion des hämatopoetischen und nervösen Systems und in der Tumorgenese spielen (Faust et al., 1992; Bellosta et al., 1995; Neubauer et al., 1994; Craven et al., 1995; Nemoto et al., 1997; Ohashi et al., 1994; Matsubara et al., 1996; Taylor et al., 1995; Graham et al., 1994; Ling und Kung, 1995).

1.5.1 Axl

1.5.1.1 Genomische Organisation des Axl-Gens

Das Gen für Axl wurde auf Chromosom 19q13.1-2 lokalisiert. Es umfaßt 20 Exons, die einen Bereich von 44kb überspannen. Ein Polymorphismus wurde identifiziert.

Das Axl-Gen wird als Folge der Nutzung zweier unterschiedlicher imperfekter Polyadenylierungsstellen in zwei mRNAs mit einer Länge von 5,0 (4,7) kb bzw. 3,2 kb transkribiert (Linz et al., 1993), wobei das größere Transkript durch repetitive Alu-Sequenzen eine höhere Stabilität aufweist (Janssen et al., 1991).

Zusätzlich sind zwei Spleißvarianten, die durch unterschiedliches Einspleißen von 27 bp des Exons 10 (O`Bryan et al., 1991, Schulz et al., 1993) und eine unterschiedliche Nutzung zweier imperfekter Polyadenylierungsstellen entstehen, die in einer Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer 1,5 kb 3`-untranslatierten Sequenz resultieren, bekannt.

Die Transkription des Axl-Gens wird von einer 5`-gelegenen Promotorsequenz reguliert, die sich über ca. 2000 bp erstreckt. Im proximalen Bereich ließen weder eine TATA-Box noch eine CAAT-Box lokalisieren, dieser Bereich ist aber sehr GC-reich. Im Promotor ließen sich drei SP 1-Bindungsstellen (GC-Boxen) ermitteln, die distal des Startpunktes liegen.

Zusätzlich existieren drei AP2-Elemente (8-nt repeats) und ein CREB-Motiv (zyklisches AMP Antwort Element) im Promotorbereich. Allerdings ist das CREB-Motiv in eine Region der DNA eingebettet, die wahrscheinlich Z-Konformation einnimmt.

In vitro wurde nachgewiesen, daß durch Phorbol ester und Interferon α und γ die Genexpression induziert wird. Weitere Elemente des Promotors konnten bisher nicht identifiziert werden. Der Haupttranskriptionsstartpunkt liegt 169bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes (Schulz et al., 1993).

Exon 1 bis Exon 10 kodieren für die extrazelluläre und die Transmembrandomäne, Exon 1 enthält die Sequenz für das *leader*-Protein (Signalpeptid) und drei weitere Aminosäuren. Die Ig-ähnlichen, die FN III Module und die kodierende Sequenz für die Transmembrandomäne liegen in unterschiedliche Exons. Im Abschnitt des Exon10 kommt es durch alternatives Spleißen zu Varianten, die durch eine 27 bp-Deletion gekennzeichnet sind.

Die Sequenz des Exon 20 kodiert für das C-terminale Ende der Tyrosin Kinase Domäne und den carboxyterminalen Schwanz des Proteins. Dieses relativ große Exon enthält zusätzlich

eine 15 bp untranslatierte Sequenz (Rescigno et al., 1991; O`Bryan et al., 1991, Schulz et al., 1993).

1.5.1.2 Struktureller Aufbau des Axl-Proteins

Das vom 2682 bp langen offenen Leseraster abgeleitete Protein hat eine Größe von 894 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von etwa 140 kD. Zwei im Leseraster befindliche Methioninreste können nach den Kozak-Regeln als Initiatoren der Aminosäurenkette dienen. Weiterhin liegt ein Stop-Codon 170 bp stromaufwärts des ersten Methioninrestes. Dieses Methionin stellt gleichzeitig den Beginn einer Polypeptid-Signalsequenz von 32 Aminosäuren dar.

1.5.1.2.1 Der carboxyterminale Bereich enthält unterschiedliche Substratbindungsstellen
Zwischen den Aminosäuren 543 bis 569 der zytoplasmatische Region befindet sich eine Konsensussequenz, die als Mg^{2+} -ATP Bindungsstelle für Tyrosinkinasen dient. Ungefähr 100 Aminosäuren in Richtung des C-Terminus befindet sich eine weitere für Tyrosinkinasen typische Konsensussequenz (O`Bryan et al., 1991). Zwei weitere Stellen, die Aminosäuren 779 und 821 des C-Terminus von Axl, beinhalten Phosphotyrosin, Bindungsstellen für die Phosphadidylinositol-3-Kinase, die bei einer Aktivierung des Rezeptors autophosphoryliert werden.

Co-Immunpräzipitationen eines stimulierten chimären EGF-Rezeptor/Axl-Kinase-Konstruktes belegten weiterhin die Bindungen von Phospholipase C γ 1 (AS (Tyrosine) 821 und 866), den p85 α und p85 β Untereinheiten der PI3-Kinase (AS (Tyrosin) 779 und 821) von GRB2, Src und Lck (alle AS 821) an die Kinasedomäne von Axl. Die Aminosäure 821 ist damit eine Bindungsstelle für unterschiedliche Substrate, die Tyrosine an den Autophosphorylierungsstellen 866 und 779 scheinen nur eine untergeordnete Rolle als Bindungsstellen für Effektorproteine zu spielen. Eine Aktivierung des Rezeptors ist dabei hauptsächlich von einer Assoziation mit den p85 α und p85 β Untereinheiten abhängig (Braunger et al., 1997).

1.5.1.2.2 Der transmembranöse Bereich und die Extrazellulardomäne

Die Aminosäuren 448 bis 472 bilden eine hydrophobe Region, die der Transmembrandomäne entspricht. Im N-terminalen Bereich der Polypeptidkette dominieren die hydrophoben Aminosäuren des Signalpeptids, die den gerichteten Transport des Proteins durch das Zytoplasma über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat steuern. In den

Kompartimenten finden zahlreiche Modifikationen wie z.B. N-Glykosylierungen der Extrazellulardomäne statt (Janssen et al., 1991).

Innerhalb der extrazellulären Domäne, von Aminosäure 224 bis 428, aminoterminal zur Transmembranregion, befinden sich zwei Fibronektin Typ III- (FN III) Wiederholungen. Weiter N-terminal dieser FN III Wiederholungen, Aminosäuren 37 bis 212, sind zwei Immunglobulin-ähnliche (Ig) Wiederholungen, in denen vor allem die hochkonservierten Cystein- und Tryptophan-Reste charakteristisch sind. Zusätzlich befinden sich in der extrazellulären Domäne von Axl sechs Konsensussequenzen für eine N-Glykosylierung und 11 Cysteinreste, die zur Ausbildung von Disulfidbrücken dienen (O`Bryan et al., 1991).

1.5.1.2.3 Eine lösliche Form der Axl-Kinase entsteht durch Prozessierung des Rezeptors. Es konnte eine posttranslational prozessierte Form des Rezeptors nachgewiesen werden, die nach Proteolyse als 80 kD große, lösliche Form der extrazellulären Domäne und als 55 kD große membranständige Kinasedomäne auftritt. Diese Kinasedomäne ist an ihren Tyrosinen phosphoryliert. Interessanterweise konnte eine solche lösliche Form nicht nur in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, sondern auch in Exsudaten von Tumoren der Maus *in vivo* und in Serum von Maus, Mensch und Ratte (Costa et al., 1996).

Eine potentielle Schnittstelle des Signalpeptids ist in Position 25 lokalisiert (Janssen et al., 1991). Der Rezeptor wird dabei in einer 14 Aminosäuren großen Region zwischen den Aminosäuren 438 und 451 gespalten.

Die Produktion der löslichen Form wird über die Protein Kinase C reguliert. Die Funktion einer löslichen Axl-Form ist nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, daß sie eine Rolle in der Verminderung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche spielt oder einer negativen Regulierung der Kinaseaktivität dient, da lösliches Axl in der Lage ist, die durch den physiologischen Liganden Gas6 vermittelte DNA-Syntheseinduktion zu blockieren (O`Bryan et al., 1995; Costa et al., 1996).

1.5.1.3 Expressionsorte von Axl

1.5.1.3.1 Embryonale und organspezifische Expression von Axl

Eine Expression ist während der Maus-Embryogenese in einem großen Spektrum Zellen zu finden, vor allem im sich entwickelnden Mesenchym und in mesodermalen Geweben, hierbei besonders in subepidermalen Zellreihen der Haut.

In adulten Tieren war eine Axl-Expression in einer großen Reihe von Gewebe wie Herzmuskel, Skelettmuskulatur, Ovarfollikeln und Vorläuferzellen der myeloiden Reihe des

Knochenmarks, hier vor allem den Stromazellen, nicht jedoch in epithelialen Geweben nachzuweisen. Dabei beschränkte sie sich ausschließlich auf Zellen mesodermalen Ursprungs an den Grenzen differenzierender Gewebe. Die Belege der Axl-Expression während der Embryonalentwicklung der Maus und auch im adulten Tier legen in diesen Geweben eine grundlegende Funktion nahe. Axl könnte die Rolle eines Signalvermittlers zwischen spezifischen Zelltypen mesodermalen Ursprungs einnehmen und somit involviert sein in die Entwicklung des Mesenchyms und der Organogenese (Faust et al., 1992).

Eine Expression ließ sich zusätzlich in Zellen, die Organkapseln bilden und bindegewebigen Strukturen unterschiedlicher Organe nachweisen. Eine Rolle von Axl bei der Organisation und Aufrechterhaltung der Organstruktur scheint daher wahrscheinlich. Diese Vermutung wird unterstützt durch den extrazellulären Aufbau des Rezeptors, der vor allem in Adhäsionsmolekülen zu finden ist und solchen Strukturen, die bei der interzellulären Kommunikation eine Rolle spielen. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß Axl Zellaggregation und homophile Bindungen vermitteln kann (Bellosta et al., 1995). Aber auch in Makrophagen und Neuralgeweben ist Axl nachzuweisen (Faust et al., 1992). Zellen des normalen peripheren Blutes exprimieren kein Axl (Neubauer et al., 1993). In einer Auswahl von Thymusepithelzelllinien und in Primärkulturen von Thymusepithelzellen konnte Axl-Expression in ausschließlich nicht-hämatopoetischem Gewebe nachgewiesen werden (Rinke de Wit et al., 1996). *In vitro* konnte eine Axl Expression in NIH3T3-Fibroblasten, in Zelllinien myeloischer und monozytärer Leukämien und in einer nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie nachgewiesen werden (O`Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991).

1.5.1.3.2 Tumorassoziierte Axl-Expression

In metastasierten Tumorproben von Sarkomen konnte gezeigt werden, daß Axl dort sehr stark exprimiert ist (Weiner et al., 1994). Axl Expression konnte aber auch in soliden Tumoren des Kolons nachgewiesen werden. Innerhalb des malignen Gewebes ließ sich eine Expression von Axl ausschließlich auf Tumorzellen beschränken. Im normalen Colongewebe konnte Axl nur schwach im Drüsenepithel detektiert werden. Schon in Colonpolypen wurde eine deutliche Zunahme der Axl-Expression nachgewiesen werden. In peritonealen Metastasen und Lebermetastasen wurde, im Vergleich mit malignen Gewebe des Primärtumors, eine deutliche Überexpression beobachtet. Zusätzlich wurde ein Unterschied zwischen Protein aus normalem Gewebe und solchem aus Tumorgewebe beobachtet (Craven et al., 1995).

In Ösophagustumoren, ebenso wie in normalem Ösophagusgewebe, aber auch in normaler Magenmukosa und in Geweben des Kolons wurde die Expression von Axl und Tyro3

detektiert. Ein signifikanten Unterschied in der Expressionsstärke von Axl in normalem und malignem Gewebe, im Gegensatz zur Tyro3 Expression, wurde allerdings nicht beobachtet (Nemoto et al., 1997).

1.5.1.4 Zelluläre Funktionen von Axl

Zur Funktion des Axl-Rezeptors ist bisher wenig bekannt. *In vitro*-Analysen haben gezeigt, daß das Gen der Rezeptortyrosinkinase onkogenes Potential besitzt und somit in der Lage ist, Zellen zu transformieren (Janssen et al., 1991; McCloskey et al., 1994; Zhang et al., 1996). Da Axl aber auch von vielen normalen Zellen exprimiert wird, sind Aufgaben in der normalen zellulären Aktivität anzunehmen. Eine Rolle in der Regulation der Proliferation aufgrund der transformierenden Aktivität ist wahrscheinlich.

Der extrazelluläre Aufbau von Axl legt zusätzlich eine potentielle Funktion bei Zell-Zell-Kontakten nahe (Janssen et al., 1991; O`Bryan et al., 1991; Bellosta et al., 1995).

1.5.1.4.1 Axl besitzt transformierende Aktivität

Axl wurde als transformierendes Gen aus DNA zweier Patienten mit CML und einem Patienten mit myeloproliferativen Störung isoliert (O`Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991). Durch Transfektions-Tumorgenitäts-Assays an NIH3T3 Zellen, die mit DNA aus Tumoren der Patienten transfiziert worden waren, konnte gezeigt werden, daß das Gen des Axl-Rezeptors transformierende Aktivität besitzt, das heißt, daß sich nach Inokulation der transfizierten Zellen in Mäuse Tumoren ausbilden (Janssen et al., 1991).

Auch die Überexpression von Axl in Fibroblasten konnte eine neoplastische Transformation der Zellen auslösen. Eine schwache Expression hingegen war nicht in der Lage, die Zellen zu transformieren. (O`Bryan et al., 1991).

Einen natürlichen transformierenden Virus (*Moloney murine leukemia virus*) nachahmend wurden unterschiedliche trunkierte Axl-Kinasestücke an ein GAG-Protein eines Mäuseleukämievirus gekoppelt. Auch das Konstrukt, das nur die Axl-Kinasedomäne enthielt, war in der Lage, 3T3-Zellen zu transformieren. Allerdings wurden, konstruktabhängig (Teile der Extrazellulardomäne, Transmembrandomäne und Kinasedomäne bzw. nur ein Teil der Kinasedomäne), unterschiedliche morphologische Veränderungen beobachtet. Wurden die Axl-Viren (MMLV) Mäusen gespritzt, so entwickelten diese keine Tumoren (Zhang et al., 1996).

Untersuchungen, die die transformierende Aktivität von Axl-Mutanten untersuchten, zeigten, daß für die Transformation von Zellen vor allem die Überexpression von Axl eine Rolle

spielt. Zellen, die sich nach Axl-Transfektion nicht veränderten, wiesen keine Phosphorylierung der Kinasedomäne auf. Gelang es, bei diesen Zellen die Tyrosine der Axl-Kinasedomäne zu phosphorylieren, transformierten auch diese Zellen. Diese Phosphorylierung ließ sich durch eine extreme Überexpression auslösen. In 3T3 Zellen, die schon bei geringerer Axl-Expression transformierten, ließ sich ein 190kD großes Protein nachweisen, daß die Phosphorylierung anscheinend positiv beeinflußt und in den Axl exprimierenden, aber nicht transformierenden Zellen nicht nachweisbar ist. Der transformierende Effekt von Axl scheint vor allem auf eine Überexpression der Rezeptors und die Aktivierung seiner Kinase zurückzuführen zu sein, wobei das Tyrosin an der Position 866 hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Burchert et al., 1998).

1.5.1.4.2 Axl-Kinase Aktivität erzielt Apoptoseschutz und mitogene Wirkung

Die mitogene Aktivität von Axl führt zu einem Wiedereintritt in die S-Phase des Zellzyklusses. Dieser durch den Liganden Gas6 induzierte mitogene Effekt von Axl wird über die PI3-Kinaseaktivität weitergeleitet (Goruppi et al., 1997).

Ergänzend konnte gezeigt werden, daß sich für Zellen, die mit dem Axl-Gen transfiziert wurden und Gas6 sezernierten, ein Selektionsvorteil bei Serumentzug ergab, indem sie vor Apoptose geschützt wurden (Goruppi et al. 1996). Dieser Befund wird unterstützt durch die Beobachtung, daß konstitutiv exprimiertes Gas6 nicht zu Transformation oder unkontrolliertem Wachstum führte, die Zellen aber vor Apoptose durch Serumentzug geschützt waren. Der gleiche Effekt ließ sich mit exogen zugeführtem Gas6 erreichen bei Konzentrationen, die die DNA-Synthese nicht stimulierten. Dieser Schutzeffekt von Gas6 auf Serum-deprivierte Zellen ging einher mit einer Induktion der MAP-Kinaseaktivität.

Der Schutz vor Apoptose durch Axl-Signalaktivierung ließ sich jedoch nur bei gehungerten, *myc* überexprimierenden Zellen und TNF α Stimulation demonstrieren, er versagte bei Bestrahlung und Behandlung mit Staurosporin.

Diese Resultate legen die Hauptfunktion einer Gas6-Axl-Interaktion für das Zellüberleben unter Konditionen, die ein Wachstum nicht zulassen, nahe. Dies könnte auch die starke Expression von Gas6 in ruhenden Zellen erklären. Dabei scheint vor allem ein über Src geleiteter Signaltransduktionsweg von Bedeutung zu sein (Bellosta et al., 1997; Goruppi et al., 1997).

1.5.2 Tyro3

Ein weiteres Mitglied der Axl-RTK-Familie wurde gleichzeitig von mehreren Gruppen isoliert und als Brt, Dtk, Etk2, Rse, Rek, Sky, Tif und Tyro3 bezeichnet (Fujimoto und Yamamoto, 1994; Crosier et al., 1994; Biesecker et al., 1995; Mark et al., 1994; Ohashi et al., 1994; Dai et al., 1994; Lai et al., 1994; Biscardi et al., 1996).

In folgenden Hybridisierungsexperimenten wurde gezeigt, daß Tyro3 nahezu ausschließlich im Hirn zu finden ist, dort vor allem im CA1-Feld des Hippocampus und in den großen Zellen des Neokortex, hier vor allem in den tieferen Zellagen. Aber auch in den Granulazellen des Cerebellum war eine Tyro3 Expression nachzuweisen (Lai und Lemke, 1991) ebenso wie in Retina von Hühnerembryonen (Biscardi et al., 1996).

Das Gen für Tyro3 wurde auf Chromosom 15q15 (Crosier et al., 1994) bzw. 14q14 bis q25 lokalisiert, wo sich ein Tyro3-Pseudogen befindet (Polvi et al., 1993).

Die genomische Struktur von Tyro3 ist nahezu identisch mit der Axl (Lewis et al., 1996).

Das offene Leseraster kodiert für ein 890 bzw. 884 bp großes Protein, die hauptsächlich zu findende mRNA ist 4 kb lang. Das Tyro3-Gen hat an seinem 5'-Ende 3 alternativ gespleißte Exons (2A, 2B und 2C), die zu jeweils unterschiedlich großen Proteinen synthetisiert werden, die unterschiedliche Signalsequenzen besitzen (Biesecker et al., 1995; Lewis et al., 1996).

Nach dem Startkodon befindet sich eine 40 Aminosäuren lange Signalsequenz für den Transport in das endoplasmatische Retikulum. Die Extrazellulardomäne von Tyro 3 ist gleich aufgebaut wie die der Axl-RTK. Die AS 429 bis 451 kodieren für die 23 (25) AS große Transmembrandomäne, und die folgende zytoplasmatische Domäne enthält eine Sequenz (AS 525 bis 776) für eine Protein-Tyrosin-Kinase. Diese besitzt eine ATP Bindungsstelle, eine mögliche SH2-Bindungsstelle und mögliche PI 3-Kinase und SEM-5 (Grb-2) Bindungsstellen. Tyro3 besitzt zu Axl eine 64% AS Sequenzhomologie (Ohashi et al., 1994; Mark et al., 1994; Lai et al., 1994). Auch eine aktive, im Zytoplasma lokalisierte Form von Tyro3 ist beschrieben worden (Taylor et al., 1995).

Tyro3 ist ubiquitär während der embryonalen Entwicklung exprimiert und scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns einzunehmen. In adulten Geweben wird eine Expression hauptsächlich im Gehirn, hier vor allem in den Neuronen des Neokortex, des Cerebellums und des Hippocampus aber auch im olfaktorischen System (Ohashi et al., 1994;

Mark et al., 1994), den Gonaden, Ovar und Testis (Dai et al., 1994) und der Niere (Stitt et al., 1995) gefunden. Eine moderate Expression wurde in Lunge, Niere, Milz, Blase und Colon nachgewiesen (Crosier et al., 1994; Lai et al., 1994; Ohashi et al., 1995).

In der Embryonalentwicklung des Zebrafisches konnte eine Tyro3 Expression bereits während der Gastrulation nachgewiesen werden, später ließ sich Tyro3 im gesamten Embryo belegen. Mit Beginn der frühen Segmentationsperiode war eine Tyro3 Expression dann nahezu ausschließlich im Hirn zu finden (Jansa-Perez et al., 1996).

Tyro3 scheint zusätzlich in der Entwicklung der Gonaden eine Rolle bei der sexuellen Differenzierung zu spielen. So ist Tyro3 in der Entwicklung der männlichen Genitalhügel, in ursprünglichen Keimzellen und ihren Stützzellen zu finden, in der Entwicklung der Ovarien aber erst später und auch nur auf die Stützzellen beschränkt. Gas6 wurde gleichfalls in interstitialen Zellen nachgewiesen, die die Tyro3 exprimierenden Zellen der Genitalhügel umgeben (Matsubara et al., 1996).

Aber auch ein Nachweis einer Tyro3 Expression in hämatopoetischen Zelllinien und in sich entwickelnden hämatopoetischen Geweben, wie fetaler Leber und fetalem Thymus, deutet auf eine Rolle von Tyro3 in der Regulation der Hämatopoese hin (Crosier et al., 1995; Crosier et al., 1996).

In epithelialen Tumorzellen der Brust ließ sich ein Anstieg des Tyro3 mRNA-Spiegels beobachten, wenn diese mit SV40 *large-Antigen* und v-Ha Ras transformiert werden. Eine Tyro3 Überexpression konnte auch in Mammakarzinomzelllinien, verglichen mit nicht-tumorigenen Gewebe, nachgewiesen werden, (Taylor et al., 1995). Tyro3 Expression wurde auch in Prostatakarzinomzelllinien beobachtet (Robinson et al., 1996).

Eine Transformation konnte bei Zellen beobachtet werden, die Tyro3 oder cMer überexprimierten, wobei offen ist, ob der Effekt von der Anwesenheit des Liganden abhängig ist (Lai et al., 1994; Goruppi et al., 1996; Ling et al., 1995; Taylor et al., 1995).

Eine Überexpression von Tyro3 in NIH3T3-Zellen führte zu einer Aktivierung der Kinase und induzierte morphologisch transformierte Foci (Biscardi et al., 1996). Weitere Transfektionsexperimente mit Tyro3 legten das onkogene Potential von Tyro3 dar (Lai et al., 1994). So transformierten NIH3T3-Zellen, die mit dem Wildtypgen für Tyro3 transfiziert und die mit Serum, das Protein S enthält, stimuliert wurden. Gleichfalls transformierten 3T3-Zellen, die man mit einem EGF Rezeptor-Tyro3-Chimär transfiziert hatte und die mit EGF stimuliert wurden. Dieses chimäre Konstrukt konnte allerdings kein Wachstumsfaktor-

unabhängiges Wachstum in einer IL-3 abhängigen Zelllinie auslösen, was auf ein Anschalten von Signalwegen, die nicht für die Proliferation dieser Zelllinie verantwortlich sind, zurückgeführt wurde. Wurde die Zelllinie mit einem Tyro3-Trk-Chimär transfiziert und mit Serum stimuliert, zeigte sie eine Wachstumsfaktor unabhängige Proliferation (Stitt et al., 1995).

Weiterhin konnte demonstriert werden, daß die Überexpression von Tyro3 Zellen unempfindlich gegenüber Serumentzug werden läßt. Bei diesen Zellen konnte, auch unter serumfreien Bedingungen, ein Absinken der Phosphorylierung von Tyro3 nicht beobachtet werden. Es wird deshalb eine Liganden unabhängige Dimerisierung, hervorgerufen durch die Überexpression von Tyro3, angenommen. Auch eine im Zytoplasma befindliche Isoform konnte den Effekt der Phosphorylierung bei starker Expression hervorrufen. Diese Isoform besitzt ein hydrophiles Signalpeptid, das zytoplasmatisch auch in Abwesenheit von Ligand Dimere formen und so transformierende Aktivität entfalten kann (Taylor et al., 1995).

Eine Autophosphorylierung von Tyro3 nach Dimerisierung und eine Verbindung/Assoziation mit Proteinen der SRC-Familie konnte belegt werden (Toshima et al., 1995).

1.5.3 cMer

Das dritte Mitglied der Axl-RTK-Familie wurde ursprünglich in Hühnern als zelluläre Form des RPL30 Virusprotein v-ryk identifiziert (Jia und Hanafusa, 1994). Zelluläre Mensch- und Maus-Homologe wurden isoliert und als cMer bezeichnet (Graham et al., 1994 und 1995).

Wie Axl und Tyro3 besitzt auch cMer zwei aminoternale Ig ähnliche und zwei Membranproximale Fibronektin Typ III Domänen.

Das Protein besteht aus 984 Aminosäuren. Ein alternativ gespleißtes Transkript, das ein Insert in der proximalen Membranregion enthält und für einen trunkierten Rezeptor zu kodieren scheint, wurde identifiziert.

cMer ist weitläufig während der Embryonalentwicklung exprimiert. Eine starke Expression läßt sich in adulten Geweben von Testis, Ovar, Prostata, Niere, Hirn und Lunge aber auch im Knochenmark und Monozyten des peripheren Blutes nachweisen. cMer konnte nicht in B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden, jedoch fand man in neoplastischen B- und T-Zelllinien und lymphoiden Erkrankungen eine Expression des Gens.

Während der Embryonalentwicklung konnten große Mengen an Transkript schon in der Morula und dem Blastozyst belegt werden. Einen deutlichen Anstieg der Expression findet

man dann zusätzlich mit Beginn der Hämatopoese und der Differenzierung des hämatopoetischen Systems (Graham et al., 1994 und 1995).

Eine mögliche Funktion von cMer bei der Entstehung von Glioblastomen konnte ebenfalls demonstriert werden (Ling und Kung, 1995).

Das onkogene Potential der Axl-Rezeptoren wird zusätzlich verdeutlicht durch den Befund, daß cMer als Teil des RPL30-Viruses, einem akut onkogenem Vogelretrovirus, isoliert wurde. Bei der Virusform von Mer ist die intrazelluläre Kinasedomäne von cMer mit dem retroviralen *Envelope*-Protein fusioniert, dieser Rezeptor wird als v-Eyk bezeichnet. Zusätzlich finden sich in v-Eyk zwei Punktmutationen. Der Mechanismus, der dem trunkierten Rezeptor onkogene Wirkung verleiht, ist nicht abschließend geklärt, allerdings wird angenommen, daß hier die Kinasedomäne konstitutiv aktiviert und somit von einer Ligandenbindung unabhängig ist (Ling und Kung, 1995; Ling et al., 1996).

Ein chimärer Rezeptor aus Fms und cMer erzeugte, in NIH 3T3-Zellen transfiziert, einen transformierten Phänotyp und zeigte eine Proliferationsinduktion nach Stimulation mit CSF-1. Als weiterleitende Komponenten des Signaltransduktionsweges wurden die Phospholipase C γ , die Phosphatidylinositol -3- Kinase/p70 S6 Kinase, Shc, Grb2, Raf-1 und die mitogen-aktivierte Kinase identifiziert. Ras p62 und p190 werden nicht von dem chimären Rezeptor aktiviert (Ling und Kung, 1995).

Die vollständige Aktivierung der cMer-Kinasedomäne benötigt die Phosphorylierung der Tyrosinreste der Positionen 749, 753 und 754. Eine nur teilweise Phosphorylierung der Tyrosine moduliert die Kinaseaktivität und könnte somit ein Kontrollelement bei der Regulation der Kinaseaktivität darstellen (Ling et al., 1996).

1.5.4 Gas6, das Produkt des *growth-arrest-specific-gene 6*, ist der gemeinsame Ligand der Mitglieder der Axl-Familie

Der Befund, daß Gas6 als Ligand an alle Mitglieder der Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie bindet und diese phosphoryliert, stellte eine Verbindung zwischen Vitamin K abhängigen, die Protease-Kaskade einschließlich des Koagulationssystems kontrollierenden Proteinen und der Regulation des Zellwachstums her (Varnum et al., 1995; Stitt et al., 1995; Ohashi et al., 1995; Nagata et al., 1996; Chen et al., 1997; Mark et al., 1996).

Eine Expression von Gas6 konnte in fast allen Geweben, mit Ausnahme der Leber, nachgewiesen werden. Hierbei wurde jedoch nicht deutlich, ob verschiedene Zelltypen Gas6

exprimieren, oder ob nur ein Zelltyp, z.B. Endothelzellen, dieses Protein bilden und sezernieren.

1.5.4.1 Struktureller Aufbau, Aktivierung und Bindungseigenschaften von Gas6

Das Gas6 Protein hat eine Größe von 678 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 75 kD. Gas6 weist große strukturelle Homologien (44%) zu dem antikoagulatorisch wirkenden Protein S, einem physiologischer Proteinase-Regulator, der als Inhibitor der Gerinnung eine Rolle spielt, auf. Dies zeigt sich vor allem in der Konservierung der Amino-terminalen γ -Carboxy-Glutaminsäure-Domänen (Gla), einer Serie von vier EGF-ähnliche Wiederholungen und der carboxyterminalen Region mit kugelförmigen (globular) oder G-Domänen mit Homologie zu Steroid-bindenden Globulinen (Dahlbäck et al., 1990). Im Gas6-Protein fehlen allerdings die zwei Thrombin Schnittstellen mit dem Thrombin-sensitiven Element des Protein S. Somit unterscheiden sich beide Proteine nur in der Thrombin-sensitiven Region und der ersten EGF-ähnlichen Domäne, den Arealen, die beim Protein S in die Interaktion mit aktiviertem Protein C involviert zu sein scheinen (Dahlbäck et al., 1990).

Für Gas6 konnte gezeigt werden, daß die hintereinander liegenden G-Domänen (Steroidhormon Bindungsdomänen) in der C-terminalen Region ausreichend sind für die Rezeptoraktivierung, für die Bindung allerdings die Gla- und EGF-Domänen benötigt werden (Mark et al., 1996; Goruppi et al., 1997). Eine alternative Spleißform von Gas6, die ein 43 AS-Insert zwischen der vierten EGF Domäne und der SHGB Domäne besitzt, wird dort proteolytisch gespalten. Der die C-terminale SHGB Domäne enthaltende Teil ist verantwortlich für die Aktivierung von Axl. Eine physiologische Rolle dieser Spleißform könnte einen neuen Mechanismus für die Kontrolle der Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors Gas6 darstellen (Tanabe et al., 1997; Goruppi et al., 1997).

Sowohl Protein S als auch Gas6 werden Vitamin K-abhängig reguliert. Dabei ist Vitamin K als Co-Faktor der Carboxylase der Glutaminsäure für eine γ -Carboxylierung der Proteine verantwortlich. Erst nach vollständiger, Vitamin K-abhängiger Modifikation der vier Glutaminsäurereste ist das Protein voll aktiv. Damit sind erstmals γ -carboxylierte Proteine als Liganden von Rezeptoren beschrieben worden (Manfioletti et al., 1993; Varnum et al., 1995). Zwar kann die γ -Carboxylierung der Gla Domäne die Rezeptorbindung und die mitogene Aktivität modulieren, ursächlich für beides ist jedoch die Steroidhormon bindende Globulin-ähnliche Domäne (SHBG-like domain). Allerdings ist eine spezifische Bindung von Gas6 von der Anwesenheit von Ca^{2+} abhängig (Nakano et al., 1996).

1.5.4.2 Mögliche Funktionen von Gas6

Gas6 (Protein und DNA-Sequenz) wurde aus serumfrei kultivierten NIH3T3-Zellen isoliert. In diesen Zellen kam es nach Serumentzug zu einem deutlichen Anstieg der Gas6-Expression und zu einer negativ-regulierten Expression nach Wachstumsinduktion. Die Expression von Gas6 wird deshalb in Zusammenhang mit Bedingungen, die eine Proliferation nicht zulassen, gebracht. Als Antwort auf einen Wachstumsstop exprimiert, gilt Gas6 als negativer Regulator der Zellproliferation (Schneider et al., 1988; Manfioletti et al., 1993).

In seneszenten Zellen hingegen ist eine Gas6-Expression deutlich reduziert, so daß von unterschiedlichen Aufgaben von Gas6 in ruhenden (G_0) Zellen und alternden Zellen ausgegangen werden kann (Cowled et al., 1994). Gas6 könnte in ruhenden Zellen als *Survivalfactor* dienen, der ein Überleben der Zellen auch unter widrigen Bedingungen ermöglicht und vor Apoptose schützt.

Die Bindung von Gas6 an Axl hingegen aber scheint die Proliferation zu stimulieren. Auch der Befund, daß Gas6 nach Bindung an die Rezeptoren der Axl-Familie diese phosphoryliert und so in der Lage ist, wachstumsmodulierende Signale in die Zelle zu übertragen, spricht gegen eine Funktion als negativer Regulator der Proliferation (Varnum et al., 1995; Stitt et al., 1995; Nagata et al., 1996). Während jedoch Gas6 die Proliferation von 3T3-Zellen stimuliert, ist dieser Effekt in anderen Zelllinien, einer Gas6 produzierenden und einer Axl exprimierenden Linie, nicht zu beobachten.

Es wird weiterhin vermutet, daß Gas6 die DNA-Synthese in serumfrei kultivierten, aber nicht Dichte arretierten NIH-3T3 Zellen stimuliert und dieser Effekt durch Axl vermittelt wird. Auch der durch Gas6 vermittelte mitogene Effekt auf glatte Muskelzellen wird einem Rezeptor der Axl-Familie zugeschrieben (Varnum et al., 1995).

1.5.4.3 Protein S bindet an Tyro3

Protein S selbst ist ein Vitamin K abhängiges Plasmaprotein, das eine wichtige Rolle als Inhibitor der Koagulation spielt (Dahlbäck 1995). Protein S wird als 69 kD großes, einkettiges Molekül synthetisiert und ins Blut sezerniert. Dort dient es als Co-Faktor für aktiviertes Protein C, eine Serin-Protease, und unterstützt die Beschleunigung der Degradation der prokoagulatorischen Faktoren Va und VIIIa.

Protein S wird vor allem in Hepatozyten (Fair und Marlar, 1986) und vaskulären Endothelzellen (Fair et al., 1986; Stern et al., 1986) synthetisiert. Aber auch in anderen Geweben wie Hirn (He et al., 1995), Megakaryozyten (Ogura et al., 1987), Osteoblasten

(Maillard et al., 1992) und Lymphozyten (Smiley et al., 1997) konnte eine Expression von Protein S nachgewiesen werden.

Ungefähr 60% des Protein S sind an das Komplement-regulierende C4b-Bindungsprotein, einem negativen Regulator des Komplementsystems, gebunden, jedoch dient nur freies Protein S als Co-Faktor für aktiviertes Protein C (Dahlbäck und Stenflo, 1981; Dahlbäck 1986).

Zusätzlich zur Funktion als Antikoagulans besitzt Protein S wahrscheinlich auch zelluläre Funktionen. So dient Protein S als Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen (Gasic et al., 1992) und ist involviert beim Aufbau und Metabolismus von Knochen (Maillard et al., 1992). Umgekehrt fördert Protein S in T-Lymphozyten die Aggregation und dient als negativer Regulator der Proliferation (Smiley et al., 1997). Auch die Produktion von Protein S in neuronalen Tumorzellen deutet auf eine Funktion in diesem Gewebe hin (Phillips et al., 1993).

Die Idee, daß Protein S neben seiner antikoagulatorischen Wirkung weitere Funktionen besitzt, wurde durch die Beobachtung gestützt, daß es als Ligand für Tyro3 dienen kann. Protein S als Ligand für Tyro3 wird jedoch kontrovers diskutiert (Godowski et al., 1995). Eindeutig konnte zwar die Bindung von Gas6 an Tyro3 mit anschließender Aktivierung der Kinasedomäne gezeigt werden, es wurde aber auch berichtet, daß Protein S an Tyro3 bindet und den Rezeptor aktiviert (Stitt et al., 1995).

1.6 Der CD44 Rezeptor

Zell-Zell und Zell-Substrat bzw. Zell- Matrix Interaktionen, die durch Adhäsionsmoleküle vermittelt werden, spielen eine fundamentale Rolle in vielen biologischen Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Zellmigration und Metastasierung.

Eines der an diesen Prozessen beteiligten Moleküle ist der CD44 Oberflächenrezeptor.

CD44 wird synonym auch als phagozytotisches Glykoprotein 1 (Pgp-1) (Hughes et al., 1983), extrazellulärer Matrixrezeptor II (ECMR-III) (Carter und Wayner, 1988), HUTCH-1 (Gallatin et al., 1989), HCAM (Goldstein et al., 1989) und Hermes Antigen (Jalkanen und Jalkanen, 1992) bezeichnet.

CD44 wird von den meisten Epithelien und mesenchymalen Geweben exprimiert. Es konnte in einer großen Anzahl normaler Epithelien, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, den meisten hämatopoetischen Geweben und in vielen Tumoren nachgewiesen werden (Hofmann et al., 1991; Birch et al., 1991; Kuppner et al., 1992; Heider et al., 1993).

1.6.1 Genomische Organisation

Das CD44-Gen ist auf Chromosom 11p13 lokalisiert und besteht aus einer 60 kb langen Sequenz, die 20 Exons enthält, von denen 10, Exons 1 bis 5 und 16 bis 20, gemeinsam als sogenannte Standardform exprimiert werden (Goodfellow et al., 1982; Sreaton et al., 1992). Diese cDNA kodiert für 360 Aminosäuren, die ein 37 kD Proteinrückgrat bilden. Das Protein wird stark N- und O- glykosyliert bevor es an die Oberfläche gelangt und bringt so eine 85 bis 90 kD Form hervor, die manchmal an Chondroitinsulfat-Seitenketten gebunden ist und eine 180 bis 200 kD Form ergibt (Stamenkovic et al., 1989). Etwa 120 Aminosäuren im N-terminalen Bereich zeigen etwa 30% Homologie zu Domänen Hyaluron bindender Proteine (Wolffe et al., 1990).

Die unterschiedlichen Isoformen des CD44-Rezepsors entstehen durch alternatives Spleißen und Insertion der Exons 6 bis 15 in den N-terminalen, extrazellulären Bereich der Standardform (Tölg et al., 1993). Diese Insertionen können bis zu 10 unterschiedliche Exons (V1 bis V10; 132- 162 AS) enthalten.

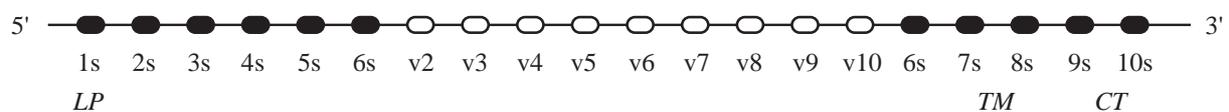


Abb. 2 Schematischer Aufbau des CD44 Gens

Ausgefüllte Ellipsen repräsentieren Exons konstanter Regionen, leere Ellipsen stellen Exons, die durch alternatives Spleißen in eine variable Region insertiert werden können dar. Das Gen besteht aus einem großen, für den extrazellulären Bereich kodierenden Abschnitt, das zu Beginn aller Varianten die Exons 1s bis 5s enthält. Das Exon 1s kodiert für das *leader-peptide* (LP). Das Exon 5s wurde als möglicherweise alternativ gespleißt angesehen und trägt deshalb auch die Bezeichnung 1v. Es stellte sich jedoch heraus, daß das als 5s bezeichnete Stück beim Menschen nicht variabel, sondern grundsätzlich im Protein vorhanden ist. Diesem konservativen Abschnitt folgt ein Bereich, der aus 9 variablen, unabhängig voneinander einzuspleißenden Stücken besteht, die als v2 bis v10 bezeichnet werden. Es schließt sich ein extrazellulär kodierender Bereich, der zwei immer vorhandene Stücke 6s und 7s enthält, an diesen variablen Teil an. Diesen Stücken folgen die kodierenden Bereiche für die Transmembrandomäne (TM) mit den Abschnitten 7s und 8s und der zytoplasmatische Teil mit dem Bereich 10s. Die Exons 9s bzw. 10s enthalten die Sequenz für den zytoplasmatischen Abschnitt (CT). Das Protein bildet einen Oberflächenrezeptor auf Zellen, eine lösliche Form ist jedoch ebenfalls beschrieben, die den zytoplasmatischen Teil und die Transmembrandomäne nicht enthält und in der Blutbahn zirkuliert.

Das variante Exon v1 wird beim Menschen nicht exprimiert (Tölg et al., 1993; Günthert, 1993; Jackson et al., 1992; Sreaton et al., 1992).

Das Ende des menschlichen Rezeptors kann sowohl durch das Exon 18 wie auch durch das Exon 19 gebildet werden (Hayens et al., 1991; Herrlich et al., 1993; Tölg et al., 1993; Günthert 1993; Lesley et al., 1993; Ruiz et al., 1995).

Aufgrund dieser vielen Kombinationsmöglichkeiten können eine Reihe varianter Protein-Isoformen entstehen, 17 unterschiedliche Kombinationen sind beschrieben (Herrlich et al., 1993). Damit ist das CD44-Gen eines der am häufigsten alternativ gespleißten Gene (Goodison und Tarin, 1998).

Alle Isoformen werden durch Glykosylierung und Addition von Chondroitinsulfaten weiter modifiziert, größere Formen sind dabei stärker glykosyliert (Jalkanen et al., 1988; Stamenkovic et al., 1989; Goldstein et al., 1989; Stamenkovic et al., 1991; Brown et al., 1991; Kincade et al., 1998). Es ist somit ein Schwefelsäure-haltiges Glykoprotein auf Zellmembranen, das multiple Phosphoserinreste trägt und mehrere Disulfidbrücken besitzt

1.6.2 Aufbau des CD44 Rezeptors

Ein Vergleich von CD44 Molekülen aus unterschiedlichen Geweben enthüllte die ausgedehnte Größenheterogenität des CD44 Rezeptors. Unter den unterschiedlichen Formen treten zwei Formen prominent hervor, die als C44s (Standardform) oder CD44H (hämatopoetische Form; 70 bis 90 kD groß) und CD44E (epitheliale Form, bindet kein Hyaluron) bezeichnet werden. Diese häufig beobachteten Formen CD44s und CD44E beinhalten entweder keines der variablen Exons oder die Exons v8 bis v10. Weitere Formen werden allgemein als CD44v (variante Isoformen) bezeichnet. Auch eine lösliche Form von CD44 konnte in Serum, Plasma und Synovialflüssigkeit detektiert werden (Dalchau et al., 1980; Telen et al., 1983; Fraser und Laurent, 1989). Wozu diese vielen möglichen unterschiedlichen Isoformen dienen, ist nicht geklärt. Auch spezifische Liganden für die Isoformen von CD44 sind bislang nicht nachgewiesen worden. Wahrscheinlich binden unterschiedliche Formen verschiedene Liganden, oder CD44 Isoformen beeinflussen die Bindung eines einzigen Liganden.

Durch die Transmembranregion wird die variable extrazelluläre Domäne von dem zytoplasmatischen Teil getrennt. Die zytoplasmatische Region wird an Serinresten phosphoryliert und ist mit der Proteinkinase C assoziiert (Kalomiris und Bourguignon, 1989; Carter und Wayner, 1988). Es wird angenommen, daß alternatives Spleißen von Exons, die für den zytoplasmatischen Teil des Moleküls kodieren, Formen mit unterschiedlichen Transduktionsrollen hervorbringt. Diese unterschiedlichen Anordnungen können einen

Einfluß auf den G-Proteinstatus haben und die Sekretion unterschiedlicher Wachstumsfaktoren stimulieren (Tarin und Matsumura, 1993).

1.6.3 Funktionen des CD44 Rezeptors

CD44 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das als Rezeptor für das extrazelluläre Matrixglykosaminoglykan Hyaluron, Kollagen I und VI, Fibronectin, Serglycin, Laminin, Osteopontin und Chondroitinsulfat fungiert (Aruffo et al., 1990; Jalkanen und Jalkanen, 1992; Faassen et al., 1992; Gallatin et al., 1989; Knutson et al., 1996; Toyama-Sorimachi et al., 1995; Weber et al., 1996; Kincade et al., 1998).

Die Bindung von Hyaluronsäure an CD44, das auf vielen Tumorzellen vorhanden ist, kann die Streuung von Tumorzellen durch Unterstützung der Tumorzelladhäsion, Tumorzellmotilität und Aktivierung der für die Metastasierung wichtigen Genen fördern (Sy et al., 1997).

Allerdings ist CD44, im Gegensatz zu dem ebenfalls Hyaluron bindenden Rezeptor RHAMM, nicht in der Lage, Bewegung von Fibroblasten an Hyaluron zu vermitteln (Turley et al., 1993). Eine mit CD44H transfizierte Melanomzelllinie zeigte jedoch eine gesteigerte Beweglichkeit auf Hyaluron beschichteten Flächen. Transfektanten, die andere Isoformen exprimierten, zeigten diesen Effekt nicht (Thomas et al., 1992).

CD44H und wahrscheinlich auch andere Isoformen können in zwei Formen existieren, einer aktiven, z.B. Hyaluron bindenden, und einer inaktiven Form (Lesley et al., 1993). Diese Möglichkeit der Hyaluronbindung von CD44 ist von einem B(X₇)B Motiv (Domänen mit zwei Basisaminosäuren, die durch sieben Aminosäuren getrennt sind) in der extrazellulären Domäne abhängig (Yang et al., 1994).

CD44 ist an vielen Aspekten der Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion beteiligt (St. John et al., 1990; Aruffo et al., 1990), wie dem Lymphozyten-Homing (Stamenkovic et al., 1989; Hayens et al., 1989), der Tumorzelladhäsion, Motilität und Invasion (Faassen et al., 1992), ebenso wie am Tumorwachstum (Sy et al., 1991).

Physiologisch funktionell ist CD44 an der Bindung zirkulierender Lymphozyten an das vaskuläre Endothel, das sezählende Epithel und an Stromazellen aneinander oder an die Interzellulärmatrix involviert (Jalkanen et al., 1988; Stamenkovic et al., 1989; Lesley et al., 1993; Rudzki et al., 1997). Auch eine verstärkte Zytokin-induzierte Modulation der T-Zell-Adhäsion durch das Makrophagen Entzündungsprotein-1 β (MIP-1 β), das in der Lage ist, sich durch seine Glykosaminoglykan-Bindungsstelle an CD44 anzuheften und so die Immobilisierung zu vermitteln, konnte beobachtet werden (Tanaka et al., 1993).

Während der durch Antigene hervorgerufenen Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und Makrophagen und während der postnatalen Periode exprimieren diese Zellen zusätzlich transient die Isoform CD44v6. Wird diese Expression unterdrückt, können keine zytotoxischen T-Zellen und keine T-Helferzellen generiert werden. Antikörper gegen CD44 können diese *in vivo* Aktivierung unterdrücken (Koopman et al., 1993; Arch et al., 1992). Da auch viele metastasierenden Tumorzellen CD44v6 auf ihrer Oberfläche tragen, wird vermutet, daß diese Zellen einen spezifischen Liganden in den Lymphknoten binden können. Sollten Tumorzellen so das lymphozytäre Verhalten durch Mimikri nachahmen, würde dies ihre Chancen einer Metastasierung durch Aussendung ins Blut vervielfachen (Herrlich et al., 1993). CD44 könnte dadurch nötig sein, um eine lymphatische Streuung von Tumorzellen hervorzurufen.

1.6.4 Einfluß von CD44 auf das Metastasierungsverhalten von Zellen

Durch Untersuchungen einer differentiellen Genexpression von metastasierenden und nicht-metastasierenden Zelllinien konnte eine CD44 Variante identifiziert werden, die notwendig für die Metastasierung der untersuchten Zellen war (Günthert et al., 1991). Solche Beobachtungen, daß eine Rattenpancreastumorlinie nach Transfektion mit einer CD44v6 Isoform, im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen, Metastasen über das lymphatische System setzen konnten (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993) und eine CD44 negative Burkitt-Lymphom Zelllinie dann metastasieren konnte, wenn sie mit dem Gen für CD44H transfiziert worden war (Sy et al., 1991), legten die Vermutung nahe, daß die Expression von CD44 bei der Entwicklung und Streuung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielt. Anschließende Nacktmausversuche mit transfizierten Zellen belegten die Bedeutung der Expression von CD44, da nur mit dem CD44 Gen transfizierte Zellen in der Lage waren, zu metastasieren und exogen zugefügtes Hyaluron zu binden. Interessanterweise zeigten die unter die Haut gespritzten Tumoren keine CD44 Expression, wohl aber in der Lunge nachgewiesene Mikrometastasen. Das CD44 Gen konnte aber in den subkutanen Tumoren noch nachgewiesen werden, so daß von einer Inhibition der Expression ausgegangen wird. Die CD44 Expression scheint somit eine wichtige Komponente für den metastatischen Phänotyp von Zellen zu sein (Kogerman et al., 1997).

Unterschiedliche CD44 Isoformen ließen sich aber auch in vielen normalen Geweben nachweisen (Fox et al., 1993 und 1994; Givehchian et al., 1996). In zahlreichen Epithelien

fand sich vor allem eine Expression von v9, dagegen waren die Exons v6 und v4 nur noch in Plattenepithelien bzw. das Exon v6 mit geringer Expression in epithelialen Zellen der Brustdrüse, der Lunge und der Prostata auszumachen. Im Plexusepithel, in Hepatozyten, im Epithel der Nebennierenrinde, in peripheren Neuronen, in Nervenzellen der Großhirnrinde, in Herzmuskelzellen, in Zellen der Glomeruluskapsel und in Keim- und Sertolizellen des Hodens konnte hingegen keine Expression detektiert werden (Terpe et al., 1993).

Aufgrund der Befunde an den Zelllinien und des Nachweises einer CD44-Expression in normalen Geweben folgten vielfältige Studien über den Status dieses Zelloberflächenrezeptors in Tumoren, da hier häufig eine Störung der zellulären Kohäsion beobachtet wird.

Erste Ergebnisse zeigten, daß in Tumorgeweben unübliche CD44 Transkripte, verglichen mit dem normalen Gewebe, nachweisbar waren (Matsumura und Tarin, 1992). Aber auch ein Verlust oder eine erniedrigte Expression von CD44 in Tumoren konnte beschrieben werden. In der Mehrheit der Befunde jedoch ließ sich eine Erhöhung der Expression von CD44s und CD44v Transkripten in den häufigsten Tumortypen wie Magenkarzinomen (Heider et al., 1993; Yokozaki et al., 1994), Colonkarzinomen (Matsumura und Tarin, 1992), Mammakarzinomen (Bolodeoku et al., 1995; Kaufmann et al., 1995), Blasenkrebs (Matsumura et al., 1994; Sugino et al., 1996) und Cervixkarzinomen (Dall et al., 1994) nachweisen.

Eine große Anzahl weiterer Studien der CD44 Genexpression in neoplastischen Geweben zeigte, daß Fehlregulation des Gens und ein unüblicher Zusammenbau des Proteins Kennzeichen pathologischer Prozesse sind (Tarin et al., 1995). Allerdings konnte bis heute nicht geklärt werden, ob die beobachteten Veränderungen ursächlich für die Pathogenese von Tumoren sind, oder ob sie eine Konsequenz der veränderlichen Prozesse sind. Da Metastasierung ein vielstufiger Prozeß ist, wird angenommen, daß es sich bei CD44(v) um ein regulatorisches Genprodukt handelt, mit dessen Expression möglicherweise eine Kaskade von Ereignissen in Gang gesetzt wird (Zöller und Kaufmann, 1994).

Interessanterweise läßt sich die CD44 Expression durch Transfektion unterschiedlicher Onkogene modulieren. So waren stark erhöhte Spiegel an CD44 in H-ras oder K-ras transformierten Zellen verglichen mit der Ausgangszelllinie zu detektieren. Diese Zellen banden auch verstärkt Hyaluron, so daß eine Fehlregulation der CD44 Expression mit der Folge einer positiven Selektion von Tumorzellen, die so ein erhöhtes Metastasierungspotential

besitzen, eine Entwicklung vorhergehender Schädigungen der Zellen sein könnte (Kogerman et al., 1996).

1.6.5 Tumorspezifisches Auftreten von Spleißvarianten

Für die Genese einiger Tumorarten scheinen spezifische CD44 Varianten eine besondere Rolle zu spielen. Dabei ist die CD44 Expression in Tumorzellen komplexer als ursprünglich erwartet (Cooper und Dougherty, 1995; Sleeman et al., 1995).

Die Funktionen der einzelnen Isoformen sind nicht befriedigend charakterisiert, das unterschiedliche Auftreten verschiedener Varianten läßt jedoch auf eine Rolle in der Organ-, und damit zusammenhängend, Tumor-spezifischen Differenzierung schließen.

So wurde beispielsweise in Tumoren der Lunge eine erniedrigte Expression von CD44 in SCLC beobachtet, während für Plattenepithelkarzinome eine Reihe von Isoformen beschrieben worden sind (Penno et al., 1994; Ariza et al., 1995; Jackson et al., 1994; Washimi et al., 1994).

In Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, in Hodgkin´s Lymphomen, in Endometriumkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen korreliert der Verlust oder das Auftreten einer spezifischen Isoform mit der Malignität des Tumors (Shtivelman und Bishop, 1991; Tarin et al., 1993; Gross et al., 1994; Fujita et al., 1994; Salmi et al., 1993).

In andern Tumorformen, wie humanen malignen Mesotheliomen wurde im Vergleich mit normalem Gewebe eine erhöhte CD44 Expression nachgewiesen (Günthert, 1993).

Spezielle Varianten, wie die besonders intensiv untersuchte Isoform CD44v6, korrelierten mit unterschiedlichen Stadien von Magenkarzinomen (Mayer et al., 1993; Heider et al., 1993), Brustkarzinomen (Kaufmann et al., 1995) und mit Non-Hodgkin´s Lymphomen (Stauder et al., 1995).

1.6.5.1 Spezifisches Auftreten der epithelialen CD44-Form (CD44s)

In normalem Hirngewebe sowie Hirntumoren unterschiedlicher Histologie zeigte sich, daß vor allem eine prominente, dem CD44s entsprechende, Isoform nachgewiesen werden kann.

Hirnmetastasen anderer Tumorentitäten hingegen exprimierten auch variante Isoformen (Nagasaka et al., 1995; Li et al., 1993).

Ein Anstieg der CD44 Expression wurde für Glioblastome (Kuppner et al., 1992) und reaktive Astrozyten in aktiven multiplen sklerotischen Läsionen (Girgrah et al., 1991) beschrieben.

Glioblastome und Glioblastomzelllinien weisen ebenfalls keine CD44v, wohl aber eine CD44s Expression auf (Li et al., 1993). Für Glioblastomzelllinien konnte eine Beteiligung von CD44 an der Invasion von Tumorzellen *in vitro* gezeigt werden (Merzak et al., 1994).

Eine hohe CD44s Expression wurde auch bei Stadium I-II und IVs (Schwann / Glia Differenzierung) Neuroblastomen und nur in wenigen Stadium IV Ganglioneuromen Tumoren gefunden (Gross et al., 1994).

Sehr aggressive Melanomzelllinien exprimierten verstärkt CD44s (Hart et al., 1991). Dabei sind die Interaktionen zwischen CD44s und Hyaluronsäure entscheidend für die Melanomzellmigration *in vitro* und die Metastasierung *in vivo* (Thomas et al., 1992; Guo et al., 1994). Aggressive Melanome zeigten nicht nur mehr CD44s, sondern auch eine höhere Abgabe von CD44 Protein von ihrer Oberfläche. Interessanterweise produzierten diese Zelllinien auch Hyaluronsäure, so daß möglicherweise ein autokriner Mechanismus zur Zellmotilität vorliegt (Goebeler et al., 1996).

In lymphoproliferativen Erkrankungen kann eine starke Expression der CD44 Standardform in Zellen der meisten Non-Hodgkin´s Lymphomen nachgewiesen werden (Terpe et al., 1994; Picker et al., 1988). Hochmaligne Lymphome zeigen eine starke Expression unterschiedlicher Spleißvarianten sowohl im Tumor als auch im Serum, vor allem solche, die v3, v6 und v9 beinhalten (Terpe et al., 1994; Koopman et al., 93; Ristamaki et al., 1994; Picker et al., 1994).

Nasopharyngale Karzinome exprimieren die CD44 Standardform und eine Reihe unterschiedlicher, individuell verschiedener Isoformen, wobei die epitheliale Form, CD44v8-v10, nur in neoplastischen Epithelzellen nachweisbar war (Brooks et al., 1995).

Allgemein läßt sich festhalten, daß die meisten bisher untersuchten Tumorzellen multiple CD44 Isoformen exprimieren, die prädominante Isoform auf Tumorzellen ist jedoch CD44s. Es wurde bis jetzt von keinem Tumorzelltyp berichtet, der ausschließlich variante CD44 Proteine exprimierte ohne Co-Expression von CD44s. Allerdings sind Tumorzellen beschrieben worden, die nur CD44s ohne andere Isoformen exprimieren (Sy et al., 1997). Treten jedoch weitere Varianten von CD44 auf, so werden praktisch alle Isoformen beobachtet (Fox et al., 1994).

1.6.5.2 Tumorassoziertes Auftreten von CD44 v5

Bei Pankreaskarzinomen sind spezifische Isoformen assoziiert mit bestimmten Tumorformen, so findet man CD44v5 zwar in Karzinomgewebe, nicht aber in normalem pankreatischem Gewebe. CD44v6 konnte dagegen sowohl in Pankreaskarzinomzellen als auch in normalen Ductuszellen des Pankreas nachgewiesen werden (Gansauge et al., 1995).

Auch metastasierte Melanome weisen gewöhnlich hohe Spiegel an CD44v5 auf, CD44v6 konnte bei ihnen allerdings nicht nachgewiesen werden (Manten-Horst et al., 1995).

1.6.5.3 Bedeutung der CD44 v5/v6 für die Differenzierung von Karzinomen

Normale Magenschleimhaut weist keine Expression von CD44 Varianten auf (Mayer et al., 1993). Andere Untersuchungen zeigten eine Expression des CD44v5 in der foveolären proliferativen Zone und dem mukösen Oberflächenepithel. In Arealen intestinaler Metaplasie, einer präkanzerösen Läsion, hingegen läßt sich CD44v5 oder -v6 nachweisen (Heider et al., 1993).

In einem Vergleich zwischen unterschiedlichen histologischen Subtypen des Magenkarzinoms stellte sich heraus, daß Karzinome vom intestinalen Typ signifikant auch häufiger CD44s und -v6 exprimierten als solche vom diffusen Typ. Während nahezu alle Tumoren des intestinalen Typs, ebenso wie intestinale Metaplasien und chronisch atrophische Gastritis, eine CD44v6 Expression aufweisen, konnte diese Isoform in Karzinomen vom diffusen Typ nur in etwa einem Fünftel der Fälle nachgewiesen werden.

Dabei korrelierte das Auftreten der beiden Isoformen beim Karzinom des intestinalen Typs nicht mit histopathologischen und klinischen Prognosefaktoren. Allerdings war eine CD44v6 Expression assoziiert mit infiltrierendem Tumorwachstum, Tiefe der Invasion, Lymphknotenbefall und größerer Gefahr distaler Metastasen, diese korrelierte auch mit dem Auftreten von CD44s in Tumoren des diffusen Typs. Dabei scheint CD44v6 zusätzlich wichtig für infiltrative Streuung in die Lymphknoten zu sein. Das Vorkommen von CD44 Isoformen war in keinem der Tumortypen signifikant assoziiert mit der Überlebenszeit (Dammrich et al., 1995; Heider et al., 1993; Harn et al., 1995; Hong et al., 1995).

Wie auch in der normalen Magenschleimhaut findet man in gesundem Lebergewebe und in cirrhotischem Gewebe keine CD44 Expression. Die meisten hepatozellulären Karzinome dagegen weisen unterschiedliche Isoformen in unterschiedlicher Intensität auf, vor allem

CD44v6, -v5 und CD44s. Auch eine quantitative Zunahme der Isoformen mit Abnahme des Differenzierungsgrades des Tumors wurde beobachtet (Seelentag et al., 1995).

Auch eine Korrelation zwischen der Expression von CD44 mit der Präsenz des Hepatitis B Virus Oberflächenantigens ließ sich zeigen (Sy et al., 1997).

1.6.5.4 CD44 v6 in Tumoren

Bedeutende Befunde betreffen das Auftreten von CD44v6, das unter anderem mit der Progression und der Metastasierung von colorektalen Karzinomen assoziiert wird. In Proben, die normalem proximalem Colon entnommen wurden, ließ sich keine signifikante Expression von CD44v6 nachweisen, ebenso nicht in Proben des Dünndarms (Rosenberg et al., 1995). Sämtliche primäre und metastasierte Tumoren hingegen zeigten hohe Spiegel an CD44v6. Die verstärkte CD44v6 Expression ging gleichzeitig mit einer erhöhten Tumorprogression bzw. einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer damit verbundenen Streuung von Metastasen und einer schlechteren Überlebensrate einher. CD44v6 kann somit als Progressionsmarker beim Colorektalkarzinom dienen (Heider et al., 1993; Tanabe et al., 1993; Wielenga et al., 1993; Mulder et al., 1994 und 1995; Imazeki et al., 1996; Orzechowski et al., 1995; Herrlich et al., 1995).

Andere Studien belegen einen inversen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CD44v6 und dem Tumorstadium, so daß v6 nicht uneingeschränkt als unabhängiger prognostischer Marker angesehen werden kann (Finke et al., 1995).

Eine Expression von CD44 v6 konnte im Myoepithel und Ductusepithel des normalen Brustgewebes nachgewiesen werden (Dall et al., 1995; Günthert, 1995; Fox et al., 1994). Eine Überexpression vieler unterschiedlicher CD44 Isoformen in Tumoren ist belegt, wobei der Grad der fehlerhaften Isoformen mit der Tumorprogression einhergeht (Matsumura et al., 1994). Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v3, -v4 und -v6 und einer niedrigeren Differenzierung bei Mammakarzinomen wurde berichtet (Sinn et al., 1995). Andere Studien demonstrieren, daß CD44s, -v9 und -v6 bei Mammakarzinomen als Marker für zelluläre Differenzierung dienen, nicht aber als Marker für die Tumorprogression angesehen werden können. Bei diesen Tumoren scheint zusätzlich der Hormonrezeptorstatus mit der *in vivo* Expression von CD44v6 assoziiert zu sein (Joensuu et al., 1993; Friedrichs et al., 1995; Kaufmann et al., 1995; Hole et al., 1997).

Normales Cervixepithel weist eine Expression von CD44 nur in der Basalreihe und Spinalzellen, aber nicht in höheren Schichten auf. (Dall et al., 1994).

Die Expression von CD44 Varianten, die v7, v8 und besonders v6 beinhalten, ist assoziiert mit einer signifikant schlechteren Prognose bei Patientinnen mit Cervixkarzinomen im Stadium III (Kainz et al., 1995).

Auch Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, das CD44 Varianten exprimiert, hatten eine signifikant kürzere krankheitsfreie Überlebenszeit als Patientinnen, deren Tumoren solche Varianten nicht aufwiesen. Bei den Patientinnen ließ sich auch ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der CD44v Expression und der präoperativen Plättchenzahl herstellen (Uhl-Steidl et al., 1995).

Bei invasiven und metastasierten Plattenepithelkarzinomen der Haut und metastasierten Adenokarzinomen wurden hohe Spiegel an CD44 nachgewiesen, wogegen Basalzellkarzinome kein oder nur eine fokale und schwache Expression zeigten. In einem überwiegenden Teil der Tumoren von Patienten mit systemisch metastasierten cutanen Lymphomen konnte CD44v6 nachgewiesen werden. Patienten ohne systemische Streuung des Tumors zeigten keine CD44v6 Expression (Dommann et al., 1995).

Diese *in situ* gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß CD44v6 nicht, wie aus den Befunden mit der Rattenpankreaslinie zuerst vermutet wurde, für invasives Wachstum und Metastasierung verantwortlich ist. Es scheint vielmehr, als spiele auch v6 eine Rolle in der normalen Differenzierung und Proliferation von Epithelzellen, dagegen ist die Expression still bei maligner Transformation.

Es läßt sich somit nicht unbedingt eine bestimmte Spleißform der Metastasierung zuweisen, vielmehr scheint die Spezies, der Karzinomtyp und das Mikromillieu eine entscheidende Rolle zu spielen.

1.6.5.5 CD44 v10 beeinflusst die Tumorzellendifferenzierung

In der Niere werden CD44 Isoformen vor allem im distalen Tubulusepithel exprimiert. In Klarzellkarzinomen der Niere konnte ein signifikanter Anstieg der CD44s Expression und anderer Isoformen in Zusammenhang mit der Tumordifferenzierung nachgewiesen werden, allerdings exprimieren diese Tumoren kein CD44v6. Renale Zellkarzinome wiesen ebenfalls höhere Spiegel an CD44 mRNA auf. Dabei wurde besonders stark CD44v10 von diesen Tumoren exprimiert (Kan et al., 1995). Die Expression von CD44 Isoformen korrelierte dabei

mit dem Grading und scheint dabei die aggressiven Phänotypen der renalen Karzinome herbeizuführen.

In chronisch myeloischen Leukämien exprimiert ein signifikant größerer Teil der zirkulierenden, neoplastischen Kolonien bildenden, granulozytären Makrophagen sehr hohe Spiegel an CD44. Diese Kolonien bildenden Einheiten mit granulozytären Makrophagen werden begleitet von einer zunehmenden Anzahl CD44v10 tragender Zellen.

Anscheinend spielt die CD44 Isoformexpression während der normalen Hämatopoese eine wichtige Rolle und ist dereguliert in neoplastischen Klonen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Ghaffari et al., 1995).

1.6.5.6 Fehlerhaft gespleißte Introns

Auch in Blasentumoren und Neoplasien läßt sich eine Überexpression von CD44 belegen. Dabei lassen sich unübliche CD44 mRNAs und Proteine in abgeschilferten Tumorzellen im Urin nachweisen, unter anderem auch ein nicht gespleißtes Intron 9 in vielen Tumorzellen. Der Nachweis einer unregulierten CD44 Expression in Neoplasien deuten auf eine Bedeutung der CD44 Expression in einem frühen Entwicklungsprozeß dieser Tumoren hin (Matsumara et al., 1994; Sugiyama et al., 1995).

Colorektalkarzinome weisen ebenfalls sehr häufig ein nicht gespleißtes Intron 9 in ihrer mRNA auf. Dies kann zwar auch in Zelllinien unterschiedlicher Gewebe demonstriert werden, in Tumoren läßt es sich jedoch vor allem in colorektalen Karzinomen nachweisen (Yoshida et al., 1995).

1.6.6 Tumorassoziierter Verlust der CD44 Expression

Aufgrund der durch sie vermittelten Zell-Zell Kontakte haben einige Zelladhäsionsmoleküle eine inhibitorische Wirkung auf die Tumormetastasierung. Eine Tumorzelle, die nur an andere Zellen angeheftet ist und sich nicht aus dem Zellverband lösen kann, ist nicht in der Lage zu metastasieren. Eine negative Regulation von CD44 könnte das Lösen von Tumorzellen aus der Tumormasse und die Migration und Dissemination der Zellen beeinflussen und somit das Wachstum und die Metastasierung einiger Tumorzellen unterstützen.

So ließen sich zwar im normalen Endometrium unterschiedliche CD44 Isoformen nachweisen, Tumoren und Zelllinien hingegen zeigten eine stark reduzierte oder keinerlei Expression.

Zelllinien, die kein CD44 mehr aufwiesen, zeichneten sich zusätzlich durch ein höheres Metastasierungspotential aus (Fujita et al., 1994).

Ein Expressionsverlust von CD44 läßt sich u.a. bei Neuroblastomen beobachten (Shtivelman und Bishop, 1991). Dieser Verlust ist gleichzeitig ein Marker für die Aggressivität des Tumors und unabhängiger prognostischer Faktor für ein weiteres ereignisfreies Überleben (Shtivelman und Bishop, 1991; Combaret et al., 1995; Christiansen et al., 1995). Gleichzeitig korreliert das Absinken des CD44 Spiegels mit dem Grad der Tumorzeldifferenzierung, nicht aber mit dem klinischen Stadium und einer N-myc Amplifikation (Terpe et al., 1995). In Neuroblastomzelllinien konnte jedoch gezeigt werden, das die CD44 Expression nicht direkt mit der N-myc Amplifikation zusammenhängt, jedoch mit der Differenzierung oder der Abstammung und den tumorigenen Eigenschaften der Zellen (Gross et al., 1995).

Benigne Onkozytome der Niere wiesen ebenfalls keine CD44 Expression auf (Terpe et al., 1993 und 1996; Heider et al., 1996).

Auch ein großer Teil aszitischer Ovarialkarzinome exprimieren kein CD44 (Cannistra et al., 1993).

Eine inverse Korrelation zwischen der CD44 Expression und der histologischen Differenzierung beim Prostatakarzinom wurde ebenfalls beschrieben. Bei diesen Tumoren ließen sich in Lymphknotenmetastasen dagegen deutlich geringere Spiegel an CD44 verglichen mit dem Primärtumor detektieren (Nagabhushan et al., 1996).

Plattenepithelkarzinome, unabhängig von ihrem Ursprungsorgan, scheinen ihre CD44v6 Expression zu unterdrücken (Salmi et al., 1993).

In Colonkarzinomen ließ sich eine geringere Expression von CD44s verglichen mit der normalen Schleimhaut beobachten. Ein Wiedereinbringen der CD44s Isoform in Colonkarzinomzellen reduzierte ihre *in vitro* Wachstumsrate und ihre *in vivo* Tumorigenität. Allerdings war der wachstumshemmende Effekt von CD44s in diesen Tumorzellen von der Fähigkeit des Moleküls Hyaluronsäure zu binden abhängig (Takahashi et al., 1995).

In Lunge findet man CD44s und die Isoformen CD44v3 und -v6 in NSCLC häufig exprimiert, jedoch in SCLC Tumoren keine CD44 Expression (Ariza et al., 1995).

1.6.7 Bedeutung von CD44 Isoformen in Lungenkarzinomen

1.6.7.1 Befunde in normaler Lunge

Eine physiologische Rolle von CD44s und anderen Isoformen in Lunge konnte durch den Nachweis der Expression in Bronchialepithelzellen, die dem Hauptbronchus, den Segmentbronchien und peripherem Lungenparenchym entnommen wurden, nachgewiesen werden (Washimi et al., 1994). In normalen bronchialen Basalzellen und alveolären Pneumozyten ließ sich die Expression von CD44s, -v3 und -v6 und -v9 mit starker basolateraler Eingrenzung der Typ II Pneumozyten und Basalzellen belegen (Mackay et al., 1994; Fox et al., 1994; Penno et al., 1994; Kasper et al., 1995; Tran et al., 1997).

Die Expression von CD44v6 ist dabei auf die basalen Bronchialzellen, squamöse Metaplasien und basolaterale Membranen der Typ II Pneumozyten begrenzt. Allerdings scheint die CD44 Expression der Pneumozyten Typ II auf aktive Zellen beschränkt zu sein, da ruhende keine Expression zeigten, wohl aber die Surfactant sezernierenden Typ II Zellen (Penno et al., 1994).

Fibröse Lungen wiesen eine veränderte CD44 Expression im Vergleich mit normaler Lunge auf, wie die Anreicherung von CD44s in Alveolarepithelzellen und eine reduzierte Expression von CD44v6 und -v9 Isoformen in Alveolarepithelzellen und Bronchialzellen (Kasper et al., 1995). Zusätzlich zu der veränderten CD44-Expression produzierten normale Lungenfibroblasten große Mengen an Hyaluron, NSCLC und SCLC Zelllinien dagegen nur sehr geringe Mengen (Teder et al., 1995).

1.6.7.2 NSCLC

CD44 Isoformen sind in NSCLC Tumoren und Zelllinien weit verbreitet. Dabei ist vor allem CD44s dominant exprimiert. Allerdings wurden große Unterschiede in der Expression von Spleißvarianten zwischen einzelnen Zelllinien beobachtet (Ariza et al., 1995).

RT-PCR Analysen demonstrierten, daß eine immortalisierte Bronchialepithelzelllinie das gleiche Expressionsprofil wie einige Plattenepithelkarzinomlinien besaß, der gleiche Befund zeichnete sich bei untersuchten Mesotheliomzelllinien verglichen mit einer immortalisierten normalen Mesothelzelllinie ab (Jackson et al., 1994).

Andere Untersuchungen zeigten, daß in SCLC- und Plattenepithelkarzinomzelllinien nur eine geringe Expression von CD44s und anderen Isoformen nachweisbar war, so daß die CD44 Expression nicht mit der Tumorentwicklung und der Dissemination korrelierte. Eine Expression von CD44 konnte ebenfalls in Adenokarzinomlinien demonstriert werden, jedoch

war die CD44 Isoformexpression in dieser Tumorgruppe weniger heterogen als in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome (Jackson et al., 1994). Kultivierte man die sonst adhärennten NSCLC Linien als Suspensionskulturen (Rührkulturen), zeigten diese eine deutliche Abnahme ihrer CD44 Expression (Penno et al., 1994).

Weitere Arbeiten demonstrierten, daß von Zelllinien unterschiedlichen Histiotyps nur eine SCC Linie Hyaluron binden konnte. Eine Hyaluronbindung könnte deshalb evtl. als Marker für eine Plattenepitheldifferenzierung dienen, und die Zellen umgebendes Hyaluron die Migration und Invasivität Hyaluron bindender Zellen beeinflussen (Teder et al., 1995).

Untersuchungen an Tumoren zeigten eine CD44 Expression in Plattenepithelkarzinomen, in Adenokarzinomen aber auch in großzelligen Karzinomen und eine schwache Expression in einem Karzinoid, wobei die Expression häufig fokal und in Tumorzellsubpopulationen beobachtet wurde (Penno et al., 1994).

Nur wenig oder keine Expression von CD44 Isoformen, die das mit Metastasierung in Zusammenhang stehende Stück v6 enthielten, konnten in Tumoren, auch in SCLC, nachgewiesen werden (Jackson et al., 1994).

Eine Analyse von Hirnmetastasen unterschiedlicher histologischer Lungentumoren zeigte, daß in den Metastasen squamöser Karzinome alle Proben eine Expression von CD44s und CD44v aufwiesen, metastasierte Adenokarzinome jedoch nur CD44s (Li et al., 1993).

1.6.7.3 SCLC

In SCLC-Linien ließ sich generell beobachten, daß die CD44 Expression assoziiert war mit einem aggregierten, nicht adhärennten Wachstum. Wurden SCLC Zelllinien mit dem Gen für H-ras transfiziert, zeigten diese unter anderem einen 40-fachen Anstieg der CD44 Expression (Penno et al., 1994). Interessanterweise wird der dem CD44 verwandte RHAMM Rezeptor in SCLC Linien deutlich stärker als in NSCLC Linien exprimiert (Teder et al., 1995).

In SCLC Tumoren konnte keinerlei CD44 Isoformexpression nachgewiesen werden (Jackson et al., 1994; Teder et al., 1995), so daß angenommen werden muß, daß die Metastasierung dieser Tumorgruppe CD44-unabhängig verläuft (Ariza et al., 1995). In varianten Zelllinien hingegen konnte eine Expression von CD44s und -v5 belegt werden (Penno et al., 1994; Givchian et al., 1996). Selbst Hirnmetastasen kleinzelliger Tumoren wiesen keinerlei CD44 Expression auf, was die Idee eines CD44 unabhängigen alternativen Weges der Metastasierung in einigen Zelltypen unterstützt (Li et al., 1993).

In einer Studie, in der die Überlebenszeit von Patienten mit SCLC Tumoren mit der Expression von CD44 korreliert wurde, zeigte sich keinerlei Unterschied in den beiden Gruppen von Patienten, die weniger als ein Jahr nach Diagnose verstarben und Patienten, die länger als zwei Jahre nach Diagnose noch lebten (Sloman et al., 1996).

1.7 Aufgabenstellung

Die molekularen und zellulären Ursachen, die zur Entwicklung von Bronchialkarzinomen führen, sind weitgehend ungeklärt. Analysen unterschiedlicher Phasen der histologischen Entdifferenzierung der Zellen ließen eine dichte Assoziation der Tumorprogression mit der molekularen Veränderungen einer Vielzahl von Signalübertragungs- und Adhäsionsmolekülen zutage treten. Da Oberflächenrezeptoren sowohl der Verankerung der Zellen als auch der Übertragung von Signalen in die Zelle dienen, spielen sie bei diesen Prozessen häufig eine entscheidende Rolle. Dabei ist oft nicht bekannt, in welchem Umfang auftretende Veränderungen dieser Rezeptoren die Differenzierung und Progression von Lungentumoren beeinflussen.

Von dieser Problemstellung ausgehend sollte zunächst die Möglichkeit autokrinen Wachstums von Bronchialkarzinomzelllinien untersucht und vorhandene autokrine Stimulationsmöglichkeiten beschrieben werden. Bei diesen Untersuchungen fiel eine histiotypische Expression der Rezeptortyrosinkinase Axl auf. Dieses Vorkommen von Axl ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelliger Karzinome ließ einen Einfluß auf die Differenzierung dieser Zelllinien vermuten. Da die biologische Funktion von Axl jedoch nicht ausreichend geklärt ist, sollte der Einfluß von Axl auf das Proliferationsverhalten und die Morphologie von Bronchialkarzinomzelllinien geklärt werden.

Neben der Untersuchung möglicher Einflüsse über die Dysregulation von Signalübertragungswegen sollte die Expression des aufgrund seiner Eigenschaft als Adhäsionsmoleküls in Zusammenhang mit Differenzierung und Metastasierung von Tumoren gebrachten CD44-Rezeptors und seiner verschiedenen Isoformen in Lungenkarzinomen und Bronchialkarzinomzelllinien ermittelt werden und mit klinischen Daten korreliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacryl Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Aquamount	BDH, England
Borsäure/Borat	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Buthanol	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant blue R250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Sigma, München
Dithiothreiol (DTT)	Sigma, München
E 64 (trans-Epoxysuccinyl-L-leucyl-Amino-(4-guanidinio)-butane)	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
Essigsäure (99,8%)	Riedel de Haen AG, Seelze
Ethanol p.a., absolut	Riedel de Haen AG, Seelze
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
G50 Push-Columns	Stratagen, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Gluthation-Sepharose-4B-Affinitätssäulen	Pharmacia, Uppsala/Schweden
Hämatoxylin	Vector, Petersborough/UK
Hi-Trap-Säulen	Pharmacia, Uppsala/Schweden
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamin	Gibco BRL, Eggenstein
Magermilchpulver	Difco, Augsburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maxi-Präp Präparations-Kit	Qiagen, Hilden

Mecaptoethanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, München
Mini-Präp Präparations-Kit	Qiagen, Hilden
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecyl (SDS)	Sigma, München
Natriumhydroxyd Plättchen	Merck, Darmstadt
NP-40	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer Mannheim
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Protein-Assay nach Bradford, Bio-Rad	Biorad, München
Protein-Assay nach Lowry, DC-Protein Assay	Biorad, München
ProteinaseK	Boehringer Mannheim
Rainbow protein weight marker (14-200 kD)	Amersham, Braunschweig
RNaseA	Boehringer Mannheim
RNazol B, RNA Extraktionslösung	CINNA/BIOTECX
RNA PolyA Extraktionssäulen	Qiagen, Hilden
Salzsäure konzentriert	Merck, Darmstadt
Sephadex G25	Sigma, München
N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Promega, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, München
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, München
Xylen-Cyanol	Sigma, München

2.1.2 Nukleinsäuren, Nukleotide, Vektoren, Enzyme, Material für RT-PCR

pEX-2T-Expressionsvektor	Promega, Heidelberg
pGEX-GST-Axl	
1kb DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
2`Deoxynukleosid 5`Triphosphat	Boehringer Mannheim
5` γ - ³³ P-dCTP	DuPont/NEN, Boston
5` α - ³³ P-dCTP	DuPont/NEN, Boston

Oligo dT (p12-p18)	Gibco BRL, Eggenstein
Reverse Transkriptase (Superscript)	Gibco BRL, Eggenstein
RNase Inhibitor	Boehringer Mannheim
Taq Polymerase	Boehringer Mannheim/Eurogentec
T ₄ Poly Nuceotid Kinase	Gibco BRL, Eggenstein
1kb Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
Autoradiographiekassetten	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme, Kodak X-OMAT, Kodak	Kodak, Stuttgart
PCR-Geräte Robocycler Gradient 40	Stratagene, Heidelberg
Filmentwicklungsgerät Curix 60	Agfa, Leverkusen
Acrylamid-Gelapparaturen Horizontal	von Keutz, Reiskirchen
Geltrockner	Biorad, München

2.1.3 Primer/Oligonukleotide

GAPDH 5`	5` CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3`
GAPDH 3`	5` CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3`
CD44std 5`	5` CAG CAA CCC TAC TGA TGA CG 3`
CD44std 3`	5` GCC AAG AGG GAT GCC AAG ATG A 3`
CD44 v2 (mit CD44std 5`)	5` AAG ATG ATT CTT TGA CTC TGA TGG 3`
CD44 v3 (mit CD44std 5`)	5` GTG CTG GAG ATA AAA TCT TCA 3`
CD44 v4 (mit CD44std 5`)	5` CAG TCA TCC TTG TGG TTG TCT G 3`
CD44 v5 (mit CD44std 5`)	5` TGA TGC TCA TGG TGA ATG AGG 3`
CD44 v6 (mit CD44std 5`)	5` CTG TCC CTG TTG TCG AAT GG 3`
CD44 v7 (mit CD44std 5`)	5` GGT GTG AGA TTG GGT TGA AG 3`
CD44 v8 (mit CD44std 3`)	5` ATG GAC TCC AGT CAT AGT ACA ACG 3`
CD44 v9 (mit CD44std 3`)	5` GAG CTT CTC TAC ATC ACA TGA AGG 3`
CD44 v10 (mit CD44std 3`)	5` ATA GGA ATG ATG TCA CAG GTG G 3`
CD44 exon15 (mit CD44std 3`)	5` GAG ACC AAG ACA CAT TCC ACC 3`
CD44 TM (mit Oligo dT)	5` AGT TTG CAT TGC AGT CAA CAG TCG 3`
PJA 2 (Axl C-terminal)	5` GGT GGC TGT GAA GAC GAT GA 3`
PJA 3 (Axl C-terminal)	5` CTC AGA TAC TCC ATG CCA 3`
PJA 11 (Axl N-terminal)	5` TGA GCT TGG CAG CTC AGG TT 3`
PJA 12 (Axl N-terminal)	5` GCA GGC TGA AGA AAG TCC CT 3`
c Mer 3F	5` CAC CTC TGC CTT ACC ACA TCT 3`

cMer 2R	5` ATC CAC AAA AGC AGC CAA AGA 3`
Tyro3 5`	5` CAC TGA GCT GGC TGA CTA AGC CCC 3`
Tyro3 3`	5` AAT GCA TGC ACT TAA GCA GCA GGG 3`
Ron 5`	5` CGG CCC CGG CCA CTC TCA GAG CC 3`
Ron 3`	5` GGG TCA GTG TTG GTG TGG TCA CTG C 3`
Protein S 5`	5` GCC TGG TTA CTG TGG AGA AGG GC 3`
Protein S 3`	5` CGG CAA GTT GTC TTT GAA GGT C 3`
Met 5`	5` CAA AAC AGG TGC AAA GCT GCC AGT G 3`
Met 3`	5` GAG AAG GAT ACG GAG CGA CAC 3`
Ret p5	5` AGG GAT AGG GCC TGG GCT TC 3`
Ret p3	5` TAA CCT CCA CCC CAA GAG AG 3`
gas 6-1	5` CAA TCT CTG TTG AGG AGC TGG 3`
gas 6-2	5` CCG TCA ACC GAG AAG CGC T 3`
HGF 5`	5` GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CC 3`
HGF 3`	5` CTG TAT CTC AAA CTA ACC ATC CAT CC 3`
GDNF 5`	5` GCG GAA TCG GCA GGC TGC AGC TGC C 3`
GDNF 3`	5` GGC GAT GGG TCT GCA ACA TGC CTG CCC 3`
MSP 5`	5` GAC ACA GTC CTA AAT GTG GCC 3`
MSP 3`	5` CCC CAA GGC ATA TGG CAT CAA GGT 3`
LimK 5`	5` GGG CGC TGG CTC ACT GGG CTC CCC 3`
LimK 3`	5` GCC CCG GAG CGT GCC GCC C 3`
SCF 5`	5` GGA GAA GGC TAC AGG GGC 3`
SCF 3`	5` GAC CCA GGG TCC ATG AGC 3`
c-kit 5`	5` CCT CCT TAC TCA TGG TCG G 3`
c-kit 3`	5` GGG CTG AGC ATC CGG AAG CC 3`
Amphiregulin 5`	5` CCG TCC TCG GGA GCC GAC TAT GAC 3`
Amphiregulin 3`	5` CAT GGA CTT TTC CCC ACA CCG TTC ACC G 3`
Heregulin 5`	5` GTG TGA ATG GAG GGG AGT GCT TCA TGG 3`
Heregulin 3`	5` GTT AAT GTT CTC ATG CGA CAG GCA GAG GC 3`
TGF α 5`	5` GTG TTG GCT GCG TGC CAG GCC 3`
TGF α 3`	5` CGG ACC TGG CAG CAG TGT ATC AGC 3`
hum-fra1 5`	5` CCA AGC ATC AAC ACC ATG AG 3`
hum-fra1 3`	5` AGG GAG ATA CAA GGT ACA GG 3`

fra1-rat 5`	5` CCT CCA GGG GTG CGA CGC AGG CCC 3`
fra1-rat 3`	5` GGG GCC CGG TGG GCT ACC CGC CCC 3`
erb B2 5`	5` CGC TTT GTG GTC ATC CAG 3`
erb B2 3`	5` CAC TGT ACC GCT GTA GAG 3`
erb B3 5`	5` GGT GAT GGT CAA GTG TTG G 3`
erb B3 3`	5` GGG CAT GTA TCC AGA TG 3`
erb B4 5`	5` GGT CAT GGT CAA ATG TTG G 3`
erb B4 3`	5` CCT CCA TCT CGG TAT AC 3`
EGF-R 5`	5` ACG GAA TCC CTG CCA GCG AG 3`
EGF-R 3`	5` TGC AAG CCA CGG TGG AAT TG 3`

2.1.4 Antikörper und Materialien für Proteinnachweise

anti-Axl Antikörper; polyklonales Kaninchen eigene Herstellung bei Eurogentec, Belgien

Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne

(N-Terminus), Aminosäuren 31-163

anti CD44 std (Klon SFF-2)	Bender MedSystems, Wien
anti CD44 v5 (Klon VFF 8)	Bender MedSystems, Wien
anti CD44 v6 (Klon VFF 7)	Bender MedSystems, Wien
anti CD44 v7/8 (Klon VFF17)	Bender MedSystems, Wien
anti Ki67 (Klon MIB-1)	dianova, Hamburg
anti Protein S	Behring Diagnostics, Marburg
anti Gas6	Claudio Schneider, Triest
Goat anti-Mouse (E 0433)	DAKO, Glostrup/Dänemark
Swine anti-Rabbit (E 0353)	DAKO, Glostrup/Dänemark
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Bulinghame/CA
AEC Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Bulinghame/CA
DAB Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Bulinghame/CA
Hämatoxylin	Vector Laboratories, Bulinghame/CA
Westernblot-Nitocellulose-Membran, 0,4µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-3mm Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Semi-Dry-Elektroblotting Apparatur	Biometra, Göttingen

2.1.5 Zellkulturmaterial

Aqua ad injectabilia Braun, Melsungen

EDTA 0,02%	Boehringer Mannheim
Fötales Kälberserum, FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Geneticin, G418	Gibco BRL, Eggenstein
Glutamin, 200mM	Seromed, Wertheim
PBS-Konzentrat	Behring Werke, Marburg
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Selenit, Transferrin, Insulin-Lösung	Sigma, München
CellTiter 96 Aquenouse One Solution	Promega, Heidelberg
Proliferations Assay	
EGF, rekombinant aus <i>S. cerevisiae</i>	upstate biotechnology, Lake Placid, NY
Gewebekulturflaschen	Greiner; Frickenhausen
24 well-Schalen	Greiner, Frickenhausen
Quadriperm-Schalen	Heraeus, Hanau
Einfrierröhrchen	Greiner; Frickenhausen
Neubauerzählkammer	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Molsheim
Absaugpumpe	Dunn, Aspach
Inkubator	Hereaus, Hanau
Sterilbank, Laminar Flow	Bioflow, Clan LAF, Meckenheim
Durchlicht-Mikroskop	Leica, Heerburg/Schweiz
Umkehr-Mikroskop	Leica, Heerburg/Schweiz
Stickstofftank, Chrono Biosafe	Messer Griesheim
Wasserbad	Hereaus, Hanau

2.1.6 Zelllinien

2.1.6.1 Non Small Cell Lung Cancer-Zelllinien

EPLC-32M1	Plattenepithelkarzinom
U1752	Plattenepithelkarzinom
LCLC-103H	großzelliges Karzinom
U1810	großzelliges Karzinom
LCLC-97TM1	großzelliges Karzinom
NCI-H23	Adenokarzinom
NCI-H125	Adenokarzinom

NCI-H820	Adenokarzinom
NCI-H1573	Adenokarzinom
NCI-H2009	Adenokarzinom
NCI-H2077	Adenokarzinom
NCI-H2126	Adenokarzinom

2.1.6.2 Small Cell Lung Cancer-Zelllinien

NCI-H22, -H24	kleinzelliges Karzinom
NCI-H60	kleinzelliges Karzinom
NCI-H69	kleinzelliges Karzinom
DMS79	kleinzelliges Karzinom
NCI-H82	kleinzelliges Karzinom
NCI-H146	kleinzelliges Karzinom
NCI-H510	kleinzelliges Karzinom
NCI-H526	kleinzelliges Karzinom
N592	kleinzelliges Karzinom
NCI-H841	kleinzelliges Karzinom

2.1.6.3 Normale humane Bronchialepithelzellen

NHBE	Spenderzellen aus normalem Bronchialepithel
------	---

2.1.7 Bakterienkulturmaterial

Bakterien-Inkubator	New Brunswick Scientific, USA
Bakterienbrutschrank	Heraeus, Hanau
Agar	Gibco BRL, Eggenstein
Chloramphenicol	Sigma, München
Yeast-Extract	Gicbo BRL, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, München
Select Peptone	Gibco BRL, Eggenstein

2.2 Geräte

2.2.1 Laborgeräte

Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson/Abimed, Villiers-le-Bel (Frankreich)
Pipetus-Akku Pitettierhilfe	Integra Bioscience, Feldkirch

Heraeus-Zentrifugen	Hereaus, Hanau
Vortex	Heidolph, Kelkheim
Heizblock Techne Triblock	Techne, Wertheim
Geiger-Müller Zählrohr	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Magnetrührer	Heidolph, Kelkheim
Kühlzentrifuge	Hereaus, Hanau; Beckman Instruments
Rotoren	Beckman Instruments, München
Zentrifugengefäße	Beckman Instruments, München
Vakuum-Zentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Kühlfalle	Bachofer, Reutlingen
Autoklav AE50	Melag; Fedegari, Pavia, Italien
Waage	Hereaus, Hanau
pH-Meter	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Ultraspect 4000 Photometer	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)

2.3 Lösungen und Puffer

1x PBS:

8g NaCl
 0,2g KCl
 1,15g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
 ad 1l auf pH 7,3

5x DNase Stop Mix:

2,5% SDS
 62,5 mM EDTA

10x RIPA-Puffer

20ml 1M Tris pH 7,5
 60ml 5M NaCl
 50ml 10% SDS
 30ml H₂O
 20g Natriumdesoxycholat
 20ml 100% NP-40

bei 4°C unter langsamen Rühren lösen

ad 200ml mit H₂O

vor Gebrauch 1mM DTT zu 1x RIPA zufügen

5x SDS Laufpuffer:

15,1g Tris-Base

94g Glycin

900ml H₂O

50ml 10% SDS

ad 1l

6x SDS Probenpuffer:

7ml 0,5M Tris + 0,4% SDS pH 6,8

3,6 ml Glycerin

1g SDS

0,93g DTT

6% Mercaptoethanol

1,2mg Bromphenolblau

ad 10 ml mit H₂O

1x STE Puffer

10ml 1M NaCl

2ml 1M Tris

2ml 0,5% EDTA

ad 100ml mit H₂O

10x Western Blot Pufferkonzentrat:

315g Tris pH 8,3

200g Glycin

ad 5l mit H₂O

1x Western Blot Blottingpuffer

50ml 10x Western Blot Pufferkonzentrat

100ml Methanol

350ml H₂O

10x TBE:

540g Tris-Base
240g Borat
200ml 0,5% EDTA pH 8
ad 5l mit H₂O

Coomassie Fixierungslösung (Fixing-Solution):

50% Methanol
10% Eisessig
40% H₂O

Coomassie Färbelösung (Staining Solution):

50% Methanol
0,005% Coomassie brilliant Blue R250
10% Eisessig
40% H₂O

Coomassie Entfärbungslösung (Destaining Solution):

7% Eisessig
5% Methanol
88% H₂O

6x DNA Ladepuffer

3% Glycerin
0,025% Bromphenolblau
0,02% Xylen-Cyanol

Hämatoxylin-Färbelösung:

20% Hämatoxylin in H₂O

Hämatoxylin-Reinigungslösung:

2% Essigsäure

Hämatoxylin-Bläuinglösung:

1,5 ml NH_4OH
98,5 ml 70% Ethanol

Hoechst-Färbelösung

5 ml Hoechst 33258 Lösung (5mg/100ml)
5 ml 1/3 M Na_2HPO_4
5 ml 1/3 M KH_2PO_4
85 ml H_2O
sterilfiltrieren

Luri-Bertani-Medium, LB

10g Pepton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
mit 2N NaOH auf pH 7,5, mit H_2O ad 1l
autoklavieren

1x STE:

100 mM NaCl
20 mM Tris pH 7,5
10 mM EDTA

Zamboni-Fixativ:

20g Paraformaldehyd
150 ml gesättigte Pikrinsäure
2h bei 60°C inkubieren
Lösung mit 2,5% NaOH neutralisieren, pH 7, Lösung sollte klar sein
filtrieren und mit PBS auf 1l auffüllen

TSS-Puffer:

85 ml LB-Medium
10% Polyethylenglycol
5ml DMSO
25 mM MgCl_2

2.4 Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Routinekultur von Zellen

Ständiges Wachstum und permanente Proliferation von in Kultur gehaltenen Zellen machen es notwendig, diese regelmäßig auszudünnen und zu füttern. Die verwendeten Zelllinien wurden durchschnittlich zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium der konfluenten Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS, 37°C, gewaschen und bei adhärent wachsenden Zellen EDTA auf die Kulturflaschen gegeben, so daß der Zellrasen damit bedeckt war. Unter dem Mikroskop wurde der Zeitpunkt des Ablösens der Zellen, auf Grund des Entzuges zweiwertiger Ionen, beobachtet. Die Zellen wurden durch Abklopfen vollständig von der Flasche gelöst, die gelösten Zellen in etwas Medium resuspendiert. Ebenso wurden nicht adhärent wachsende, sich in schräg gestellten Flaschen absetzende Zellen resuspendiert und dabei vereinzelt, und 1:5 in bereits mit 37°C warmen Medium gefüllte Flaschen ausgesät. Alle Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Sämtliche hier verwendeten Karzinomzelllinien wurden in RPMI 1640 gezüchtet, das 10% fötales Kälberserum enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in begasbaren Brutschränken kultiviert. Mycoplasmentests wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

2.4.1.2 Herstellung von Zytospins und Objektträgerkulturen für die Immunhistochemie

In Suspension wachsende Zellen wurden vereinzelt, gezählt und in definierter Konzentration mit Hilfe einer Zytozentrifuge (7min 700rpm) auf zuvor mit APES beschichtete Objektträger aufgebracht. Zellen, die angeheftet wuchsen, wurden von ihrer Kulturflasche abgelöst, gezählt und in definierter Anzahl auf gereinigte und sterile Objektträger in Quadripermschalen ausgebracht. Die Zellen wuchsen mindestens 24h auf diesen Objektträgern an, bis sie geerntet wurden. Alle Zytopräparate wurden getrocknet und bei -80°C gelagert.

2.4.1.3 Kultur von Primärzellen

Die Kultur der normalen Bronchialepithel-(NHBE-)Spenderzellen erfolgte nach Beschreibung des Herstellers in BEG-Medium. Sie wurden maximal viermal passagiert.

2.4.1.4 Kryopräservation und Lagerung von Zellen

Aus einer 75 cm² Kulturflasche wurde eine Zellsuspension für zwei Einfrierampullen von je 1ml gewonnen. Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 800rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in einer vorgeschriebenen Menge Medium resuspendiert. Anschließend wurde langsam eine DMSO-Lösung dazu getropft, und zwar in einer Menge, daß die Endkonzentration des DMSO 7,5% betrug. Die Zellsuspension wurde dann schnellstmöglich in auf Eis vorgekühlte Einfrierampullen transferiert und sofort auf Eis gestellt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Ampullen in einen geeigneten Styroporbehälter gegeben und zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren. Nach mindestens 24h wurden die Ampullen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.1.5 Auftauen von Zellen

30ml kaltes Medium wurden in ein steriles Röhrchen gefüllt und die Ampulle in einem 37°C warmen Wasserbad soweit aufgetaut, daß noch eine kleine Eiskugel in Inneren sichtbar war. Die Zellsuspension wurde dann langsam unter leichtem Schütteln in das vorbereitete Medium getropft und 2min stehen gelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension 5min bei 800rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in eine mit Medium gefüllte Kulturflasche überführt.

2.4.1.6 Transfektion von Zellen

Um zellfremde DNA-Genkonstrukte in eine Zelle einschleusen zu können, müssen die zu transfizierenden Zellen mit unterschiedlichen Methoden vorbehandelt und die DNA zum Teil speziell aufgereinigt werden. Dazu wurden für die Bronchialkarzinomzelllinien die Methoden der Lipofektion und der Elektroporation verwendet.

2.4.1.6.1 Lipofektion

Bei der Lipofektion werden die einzuschleusenden DNA-Stücke in mizellenartige Vesikel verpackt, die in die Zellmembran integrieren und somit die DNA in die Zelle schleusen. Dazu wurden 2µg des zu transfizierenden Plasmids mit 100µl serumfreiem Medium gemischt, 10µl Lipofectamin-Reagenz mit 100µl serumfreiem Medium vermischt und beide Mischungen, nachdem sie vereinigt wurden, 30min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 800µl serumfreiem Medium auf 1ml aufgefüllt. Die zu transfizierenden, in definierter Zellzahl ausgesäten Zellen wurden mit serumfreiem Medium gewaschen. Dabei sollte das verwendete Medium keinerlei Zusätze wie z.B. Antibiotika enthalten. Der fertig vorbereitete

DNA-Ansatz wurde auf die Zellen gegeben und im Brutschrank für 5 Stunden inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde danach abgesaugt und serumhaltiges Medium auf die Zellen gegeben. Bei Suspensionskulturen wurde das Transfektionsmedium nur mit serumhaltigem verdünnt. Nach 24 Stunden wurde mit der Selektion der transfizierten Zellen mit einem geeigneten zytotoxischen Agens begonnen.

2.4.1.6.2 Elektroporation

Das Prinzip der Elektroporation beruht auf der Wirkung kurzzeitiger Spannungsänderungen an der Zellmembran. Dabei kommt es zu Öffnungen verschiedener Kanäle, durch welche DNA aufgenommen werden kann. Ein Zell-DNA-Gemisch (definierte Zellzahl; 10µg DNA) in serumhaltigem Medium wurde dazu bei 1050µF und einer Spannung von 240V ausgesetzt (Impuls). Direkt anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen gebracht und nach 24 Stunden mit der Selektion der transfizierten Zellen begonnen.

2.4.1.7 Proliferationskinetiken mit einem Substratassay

Um eine biologische Funktion transfizierter Genkonstrukte aufzudecken, wurden transfizierte, selektionierte polyklonale Zellen in ihrem Wachstumsverhalten unter unterschiedlichen Bedingungen beobachtet. Dabei wurde eine indirekte Zellzahlbestimmung einer direkten vorgezogen, da eine Zählung einzelner Zellen sich nicht für in Konglomeraten wachsenden Suspensionszellen (SCLC-Zelllinien) eignet. Bei einer indirekten Bestimmung der Zellzahl macht man es sich zunutze, daß lebende Zellen in der Lage sind, durch Bioreduktion ein Tetrazoliumderivat (MTS, Owen's Reagenz) in Formazan umzuwandeln, dessen Anwesenheit im Medium quantitativ bei 490nm (Absorption) bestimmt werden kann. Bei diesem Assay werden somit nur lebende, also stoffwechselaktive Zellen gezählt.

Für eine Wachstumskinetik wurden Zellen auf 24-well Platten (12 000 Zellen/1ml) in serumfreien Medium ausgesät. Nach 48 Stunden wurde dann das Stimulans, rekombinantes humanes EGF (100ng/1ml), zu einem Teil der Zellen gegeben, ein Teil erhielt zum Vergleich keinen Wachstumsfaktor. Die Umsatzrate an Formazan wurde zweimal pro Woche über einen Zeitraum von drei Wochen bestimmt. Dazu wurde 100µl/1ml der Substratlösung in die einzelnen Löcher der Kulturplatten pipettiert und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Leerwert wurde Substratlösung in frisches, serumfreies Medium gegeben und ebenfalls inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Substrat-Mediumlösung in Plastikküvetten überführt und zuerst der Leerwert bei 490nm bestimmt. Darauf folgte die Messung der

Absorption der Proben. Eventuell vorhandene Zellen in der Lösung stören nicht, da sie die Absorption bei dieser Wellenlänge nicht beeinflussen.

2.4.2 Bakterienkultur

2.4.2.1 Transformation

Eine Transformation dient der Übertragung von DNA auf Bakterien. Um die Bakterien auf die Aufnahme von DNA vorzubereiten, wurden sie durch eine Behandlung mit DMSO zuvor kompetent, das heißt aufnahmefähig gemacht. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 5ml LB-Medium angeimpft und 500µl dieser Kultur in 50ml LB-Medium mit 50µl Tetracyclin (12,5mg/ml) überimpft und bis zu einer OD von 0,5 bei 600nm im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Nach einer 20-minütigen Ruhezeit auf Eis wurden die Bakterien für 10min bei 2500rpm pelletiert und anschließend in TSS-Puffer resuspendiert. 100µl dieser Bakterienlösung wurde dann mit den entsprechenden Plasmiden für 20min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde darauf einer Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 1min unterzogen, sofort in 1ml LB-Medium überführt und für 1h bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die daraus resultierenden resistenten klonalen Kolonien wurden in 3ml LB-Medium, das Antibiotika enthielt, aufgenommen und über Nacht hochgezogen. Die so entstandenen Bakterienkulturen wurden, nach Überprüfung des Plasmids in einem Mini-Präp und anschließendem Restriktionsverdau, in 20% Glycerin enthaltendem LB-Medium kryopräserviert.

2.4.2.2 Präparative Plasmidgewinnung

Um Plasmide aus Bakterien zu gewinnen und diese zu Überprüfen, wird eine Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien in LB mit Antibiotika angeimpft, diese in eine größere Menge Medium überimpft und bis zu einer OD (600nm) von 0,8 bis 1,2 inkubiert. Um eine Anreicherung der Plasmide zu erhalten, kann der Kultur dann Chloramphenicol zugesetzt (150µg/ml) werden. Dadurch sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, sich zu teilen, synthetisieren aber weiterhin ihre Plasmide, so daß es bei einer Aufarbeitung zu einer hohen Ausbeute an Plasmid-DNA, aber verringertem Anteil von Bakterienmembranen kommt, was bei einer folgenden Transfektion der Plasmide in Eukaryontenzellen die Aufnahme deutlich verbessert. Nach der Inkubation mit Chloramphenicol wurden die Bakterien pelletiert und mit Hilfe von Plasmidpräparationskits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die

Menge an gewonnenem Plasmid wurde photometrisch bestimmt und seine Qualität auf einem 1% Agarosegel überprüft.

2.4.2.3 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Durch Transformation geeigneter, proteasefreier Bakterienstämme mit einem induzierbaren Plasmid können aus Bakterien große Mengen eines gewünschten Proteins gewonnen werden. Dazu wurden von transformierten Bakterien des JM101-Stammes eine Übernachtskultur gezogen, die in LB-Medium mit Ampicillin (50µg/ml) überimpft wurde. Die Kultur wurde bis zu einer OD (600nm) von 0,6 bis 1, was der „*mid-log-phase*“ der Bakterien entspricht, inkubiert und dann die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (1mM) induziert. Nach drei bis fünf Stunden Inkubation wurden die Bakterien pelletiert und in 1/50 des ursprünglichen Volumens in 1x PBS mit 1% Triton resuspendiert. Es folgte eine Lyse durch Ultraschallbehandlung auf Eis und eine Zentrifugation für 5min bei 10.000g. Der klare Überstand wurde steril filtriert und, da ausschließlich GST-Fusionsproteine exprimiert wurden, auf eine GST-Affinitätssäule zur Reinigung des gewünschten Proteins gegeben. Dazu wurde die Säule äquilibriert, der filtrierte Überstand zweimal aufgetragen und die Säule dann mit 1x PBS gespült. Die GST-Fusionsproteine wurden in fünf Fraktionen mit 50mM Tris/HCl pH8 mit 10mM Gluthation eluiert. Der Proteingehalt der gewonnenen Fraktionen wurden mit einer Proteinbestimmung nach Bradford spektrometrisch bestimmt und die Qualität der Präparation auf einem Coomassie gefärbten 10% SDS-Gel überprüft.

2.4.3 Nukleinsäuretechniken

2.4.3.1 Präparation genomischer DNA

Um Veränderungen im Genom zu finden, ist eine Analyse der genomischen DNA notwendig. Um diese zu erhalten, wurden Zellen 1x PBS gewaschen und 4ml PBS vermischt mit 1ml 1x DNaseI Stop Mix auf die Zellen gegeben. Durch Inkubation der Zellsuspension mit 20 µl RNaseA (1µg/ml) für 30min und anschließender ProteinaseK Behandlung über Nacht wurden störende Moleküle verdaut. Eine Aufreinigung der DNA erfolgte über einmaliges Extrahieren mit Phenol, zweimaliger Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Behandlung und einmaligem Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol, um Phenolreste zu beseitigen. Die gereinigte DNA wurde dann in 1M NaCl und Zugabe des 1,5-fachen Volumens Isopropanol gefällt, in 70% Alkohol gewaschen und in TE aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260/280nm bestimmt.

2.4.3.2 Präparation von gesamt-RNA aus Zelllinien und Geweben

Für die Analyse der Genexpression von Zellen verwendet man die von der Zelle exprimierte RNA, da sie ein direktes Bild aller exprimierter Gene der Zelle wiedergibt. Die Zellen wurden dazu, soweit nötig, von den Kulturflaschen abgelöst und mit 1x PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in RNazol resuspendiert, anschließend Chloroform zugegeben und 15sec geschüttelt. Die Mischung wurde dann 15min auf Eis stehen gelassen, bei 12.000 g abzentrifugiert und die obere wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe eines äquivalenten Volumens Isopropanol und einer Inkubation von 15min auf Eis. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde das so erhaltene Pellet mit 70% Alkohol gewaschen und etwas angetrocknet. Nach Lösen des Pellets in Wasser erfolgte eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung bei 260/280nm.

2.4.3.3 mRNA Isolation

Für Hybridisierungen von RNA bzw. transkribierter cDNA sollte, um unspezifische Bindungen weitestgehend auszuschließen, nur die *messenger* RNA benutzt werden. Dazu wird, da mRNA im Gegensatz zu allen anderen RNA Formen, einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende trägt, diese über eine mit Poly-T-Ketten bestückte Säule von der restlichen RNA über Affinitätsbindungen abgetrennt. Mit Hilfe vorgefertigter Säulen wurde 1mg total RNA nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) aufgereinigt.

2.4.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren beruht auf der linearen Beziehung der Konzentration einer Nukleinsäurelösung und ihrer Absorption von Licht einer Wellenlänge von 260nm. Die Verhältnisse der Basenzusammensetzung spielen dabei eine zu vernachlässigende Rolle, so daß jede RNA bzw. DNA mit dieser Methode quantifiziert werden kann. Bei einer optischen Dichte von 1 beträgt die Konzentration von doppelsträngiger DNA 50µg/ml, von RNA 40µg/ml und von Oligonukleotiden 33µg/ml. Mißt man zusätzlich bei 280nm die Absorption der in der Lösung befindlichen Proteine, so erhält man aus dem Quotienten $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ eine Aussage über die Reinheit des Nukleinsäurepräparates. Idealerweise beträgt der Wert des Quotienten 1,8 für DNA und 1,9 für RNA.

2.4.3.5 Reverse Transkription

Arbeiten mit RNA müssen äußerster Sorgfalt unterliegen, da RNA extrem durch den Abbau von RNasen und dem Brechen bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren gefährdet ist. Das

Risiko einer Kontamination und Degradation der RNA läßt sich umgehen indem man sie für Genexpressionsstudien in komplementäre DNA (copy oder complementary DNA; cDNA) umschreibt. Dazu benutzt man ein ursprünglich aus Viren isoliertes Enzym, das in der Lage ist, anders als sämtliche Säuger-Polymerasen, RNA in DNA umzuschreiben. Man macht sich weiterhin zu nutze, daß der in der Zelle synthetisierten messenger RNA (mRNA) an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz angehängt. Dieser wird zum anlagern eines Oligo(dT)-Primers genutzt, von dem aus die Reaktion der reversen Transkriptase beginnen kann und der in Folge dessen komplementär zur als Vorlage dienenden RNA verlängert wird. Für eine Reaktion wurde 1µg total RNA in 7,5µl H₂O aufgenommen und für 10 min bei 70°C denaturiert um Sekundärstrukturen zu zerstören. Nach raschem Abkühlen auf Eis wurde ein vorbereiteter Mix zupipettiert, der für jeden Reaktionsansatz folgende Komponenten enthielt:

Menge	Komponenten des Reaktionsansatzes
2µl	Oligo(dT) (0,5µg/µl)
6µl	5x Reaktionspuffer
3µl	0,1 M DTT
8µl	dNTP (1,25mM jedes)
1,5µl	RNase-Inhibitor
2µl	Superscript (200U/µl) (Reverse Transkriptase)

Der Reaktionsansatz wurde dann für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 10min auf 95°C erhitzt. Die neu synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.4.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das PCR-Verfahren ist eine *in vitro* Methode zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz. Dazu wird ein sequenzspezifisches Primerpaar, das hochspezifisch an eine Komplementärsequenz des gesuchten Gens bindet und einen bestimmten Genabschnitt eingrenzt, der zwischen den beiden Primern liegt, von einer DNA-Polymerase verlängert. Durch Wiederholung des Vorganges werden immer wieder neue DNA-Stränge synthetisiert, es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten Genabschnitts. Da zur Vervielfältigung immer wieder die sich neu gebildeten DNA-Stränge durch Erhitzen getrennt werden müssen, benutzt man die DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums, die hitzebeständig ist (*Thermus aquaticus*; Taq-Polymerase).

Während eines Zyklusses der DNA-Synthese werden zuerst Doppelstränge durch Hitzedenaturierung von einander getrennt, dann erfolgt eine Anlagerung der Primer an ihre komplementäre Sequenz, gefolgt von ihrer Verlängerung durch die DNA-Polymerase, welche die Zielsequenz spezifisch synthetisiert (Denaturierung, Anlagerung, Elongation)..

Für die Amplifikation wurde je PCR-Probe ein Endvolumen von 50µl gewählt, der Ansatz enthielt folgende Zusammensetzung:

Menge	Komponente	Konzentration
8µl	dNTP-Mix	je 1,25mM
5µl	10x PCR-Puffer	
5µl	5'-Primer	0,1µg/µl
5µl	3'-Primer	0,1µg/µl
26µl	H ₂ O	
0,2µl	Taq-Polymerase	1U/µl
0,1µl	³³ P-α-dCTP	1µCi
1µl	cDNA	

Die Reaktionsansätze wurden in Thermocyclern in 25 bis 30 Zyklen nach folgendem Profil inkubiert:

1. Zyklus	Hitzedenaturierung	5min	94°C
	Anlagerung der Primer	1min	54° bis 64°C
	Elongation	2min	72°C
2. bis max. 35. Zyklus	Hitzedenaturierung	1min	94°C
	Anlagerung der Primer	1min	54° bis 64°C
	Elongation	2min	72°C

Durch diese Reaktionen können geringste Mengen an cDNA hochspezifisch amplifiziert werden. Unter optimalen Bedingungen erfolgt eine exponentielle Akkumulation des spezifischen Zielfragments. Ein Nachweis dieser entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach der Signalstärke des amplifizierten DNA-Fragments (Vorhandensein an Templates (Vorlagen) in der cDNA),

da alle verwendeten Thermocycler heizbare Deckel besitzen, die ein Verdunsten des Ansatzes verhindern, konnte auf eine Überschichtung der Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden.

2.4.3.7 Formulierung von Primerpaaren

Ein Design der Sequenzen der Primerpaare sollte unterschiedliche Aspekte berücksichtigen. Die einzelnen Primer sollten zwischen 16 und 26 Nukleotide lang sein, um ein hochspezifisches Anlagern zu gewährleisten, sie sollten zusätzlich GC-reich sein; Guanin und Cytosin bilden drei Wasserstoffbrücken zueinander aus, Thymidin und Adenin nur zwei, so kann eine hohe Anlagerungstemperatur erreicht werden. Die beste Temperatur für die Anlagerung (Schmelzbereich) der Primer läßt sich nach unterschiedlichen Formeln errechnen, jedoch muß sie in der Praxis meistens optimiert werden, um die Amplifikation unspezifischer Fragmente vollständig auszuschließen. Der Bereich, der durch das Primerpaar eingegrenzt wird, sollte zwischen 200 bp und 1000 bp groß sein, da kürzere Fragmente kaum von unspezifischen Fragmenten zu unterscheiden und somit schlecht nachzuweisen sind und die Synthese längerer Fragmente durch die DNA-Polymerase in der kurzen Zeit der Reaktion nicht vollständig gewährleistet ist. Die kurzen Oligonukleotide, die als Primer benutzt werden, werden synthetisch hergestellt. Dabei gibt es unterschiedliche Verfahren, die in dieser Arbeit benutzten Primer wurden nach Abspaltung einer Trityl-Schutzgruppe lyophilisiert ausgeliefert und konnten nach Lösen in Wasser direkt eingesetzt werden (MWG-Biotech).

2.4.3.8 Gelelektrophoresen

Elektrische Felder üben auf geladene Teilchen eine Kraft aus, die abhängig ist von der Gesamtladung des Teilchens und der Stärke des wirkenden Feldes. Die wirkende Kraft führt zur Wanderung des Teilchens, dessen Mobilität bei gegebener Ladung und Feldstärke von ihrer Größe und Form und der Durchlässigkeit der Matrix abhängig ist, da Reibung der Mobilität entgegenwirkt. Aufgrund unterschiedlicher Mobilität können Teilchen durch eine Gelelektrophorese voneinander getrennt werden. Die Laufgeschwindigkeit von DNA in einem Spannungsfeld verhält sich proportional zur Größe des Fragmentes.

2.4.3.8.1 Horizontalgelelektrophorese

In Agarosegelen können schnell und einfach DNA-Fragmente nach ihrer Größe und ihrer Konformation, linear, verdrillt, bzw. superverdrillt, aufgetrennt werden. Dazu wird ein horizontales Gel gegossen, dessen Anteil an Agarose sich nach der zu erwartenden Fragmentgröße richtet. Je kleiner ein Fragment ist, desto höher sollte die Agarosekonzentration sein. So lassen sich Fragmente zwischen 100 und 1200 bp am besten in

einem 1 bis 1,5 % Agarosegel auftrennen. Zur Herstellung eines solchen Geles wird eine entsprechende Menge Agarose eingewogen, mit 1x TAE-Puffer vermischt und durch Aufkochen schlierenfrei gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 2µl/100ml Ethidiumbromidlösung (0,1% in H₂O) hinzugefügt, vermischt und in einen entsprechenden Gelschlitten gegossen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid ist es möglich, da Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA interkaliert, DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die aufzutragenden Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, die Elektrophorese der Fragmente erfolgte bei 80V für ca. 1,5 Stunden. Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator ausgewertet.

2.4.3.8.2 PAGE

In Polyacrylamidgelen können Fragmente, die eine sehr ähnliche Größe haben, noch gut voneinander getrennt werden. Zusätzlich lassen sich durch die Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE) geringere Mengen an DNA detektieren als in Agarosegelen. Die Matrix von Polyacrylamidgelen besteht aus Acryamidpolymeren, die über N'N'-Methylbisacrylamid quervernetzt sind. Die Durchlässigkeit der Gelmatrix hängt von der Konzentration der Polyacrylamid-Monomere und der Quervernetzung, also von der Konzentration der bifunktionellen Gruppe ab. Ein 6% Gel enthält folgende Bestandteile:

Menge	Komponente
2,5ml	10x TBE
10ml	Acrylamid/Bisacryl (30%)
37,5ml	H ₂ O
500µl	APS (10%)
50µl	TEMED

Der Ansatz wurde durchmischt und zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit 1x TBE-Laufpuffer bei 80V ca. 20min unter Spannung gesetzt. Die aufzutragenden Proben wurden in Ladepuffer aufgenommen und ohne anliegende Spannung aufgetragen. Der Einlauf der Proben ins Gel erfolgte bei 80V, danach wurde eine Spannung von 120V angelegt für ca. 1,5 Stunden. Abhängig von einer evtl. radioaktiven Markierung der Proben wurden die Gele getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert bzw. silbergefärbt.

2.4.3.8.3 Denaturierende DNA-Gele (Sequenzgele)

Sequenzgele bestehen aus einer speziellen Gellösung, die sich durch eine hohe Bandenschärfe auszeichnet. Um Sekundärstrukturen in den DNA-Fragmenten zu vermeiden, wird dem Gel denaturierender Harnstoff zugefügt, so daß die Fragmente ausschließlich nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Da Sequenzgele, um eine besonders deutliche Schärfe zu haben, sehr dünn sind, muß, zum besseren Ablösen des Gels von der Glasplatte, eine der beiden Glasplatten mit Dimethylchlorsilan eingerieben werden. Für den Gel-Mix wurden angesetzt:

6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel
200ml AA/BA (30%)
100ml 10x TBE
420g Harnstoff
ad 1000ml mit H ₂ O

Die Lösung wurde filtriert und entgast und die Polymerisation mit 1ml APS (10%) und 5µl TEMED gestartet. "Haifischzahnkämme" wurden zunächst mit der Flachseite in die Gellösung gesteckt, nachdem sie mit APS benetzt wurden. Der Probenauftrag erfolgte nach Polymerisation in die durch die Kammzähne gebildeten Taschen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 W (max. 65W) und 1500mA für vier bis sechs Stunden.

2.4.3.8.4 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht und nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt. Dazu werden die Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β-Mercaptoethanol reduziert. SDS bindet mit seinen aliphatischen Schwänzen an hydrophobe Regionen in Proteinen und führt somit viele negative Ladungen ein, welche die eigentliche Ladung des Proteins unwichtig werden lassen. Die Mobilität von Proteinen in einem SDS-Gel hängt also nur noch von ihrer Größe und nicht mehr von ihrem isoelektrischen Punkt ab. Die Proben werden dazu mit SDS-Probenpuffer vermischt und für 5min bei 95°C erhitzt.

Denaturierende SDS-Proteingele bestehen aus zwei Teilen, einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Sammelgel dient der Konzentration der Proteine auf ein minimales Volumen (Ionenverhältnisse), so daß alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel einlaufen können. Das Trenngel dient dann der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Diese Zweiteiligkeit macht es nötig, daß zuerst in vorbereitete Glasplatten das Trenngel gegossen

wird und dieses überschichtet wird mit Butanol, um bei der Polymerisation eine glatte Oberfläche zu erhalten. Ist das Trenngel dann vollständig polymerisiert, wird das Butanol verworfen und die Oberfläche mit Wasser gereinigt. Auf das Trenngel wurde nun das Sammelgel gegossen, in das auch der zum Erhalt von Auftragstaschen ein Kamm gesteckt wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Gelapparatur mit 1x SDS-Laufpuffer gespannt und die vorbereiteten Proben aufgetragen.

Ein SDS-Gel hat folgend Zusammensetzung:

Komponente	Trenngel 5%	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Sammelgel
0,75M Tris pH 8,8	15ml	15ml	15ml	/
0,625M Tris pH 6,8	/	/	/	3ml
H ₂ O	10ml	7,5ml	5ml	9,45ml
AA/BA (30%)	5ml	7,5ml	10ml	2,55ml
10% SDS	300µl	300µl	300µl	150µl
10% APS	300µl	300µl	300µl	75µl
TEMED	15µl	15µl	15µl	7,5µl

Für den Probenlauf durch das Sammelgel wurde eine Stromstärke von 27mA angelegt, während des Laufes durch das Trenngel diese auf 35mA erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel, da es keine Proteine enthielt, entfernt.

2.4.3.9 Silberfärbung von PAGE-Gelen

DNA- und RNA-Fragmente lassen sich in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung sichtbar machen. Dazu wird das Gel nach erfolgtem Lauf in Methanol/H₂O/Essigsäure (5/5/1) bis zu 30min lang fixiert und abschließend in Äthanol/Eisessig (10/1) überführt. Nach kurzem Schwenken in H₂O folgt eine reduzierende Behandlung mit einer Lösung aus 5g Na₂S₂O₃ und 8g K₃Fe(CN)₆, wovon 40mg in 20ml H₂O gelöst wurden (die Lösung sollte gelb sein) für 1 bis 2min. Dann wurde das Gel für mindestens 30min in H₂O gewaschen, wobei mehrfach ein H₂O-Wechsel erfolgte. 0,1% Silbernitratlösung (AgNO₃) wurde anschließend für maximal 30min auf das Gel gegeben und nachfolgend 1min mit H₂O gespült. Die Entwicklungsreaktion wurde mit einer Zugabe von 2,5% Na₂CO₃ für 1min und 50ml 2,5% Na₂CO₃ + 100µl Formaldehyd gestartet. Bei einer evtl. auftretenden Braunfärbung des Gels wurde diese Lösung gewechselt. Die Reaktion wurde mit 10% Essigsäure gestoppt. Die Gele wurden im feuchten Zustand fotografiert und anschließend auf Whatman-Papier getrocknet.

2.4.3.10 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu schneiden. Oft handelt es sich dabei um Palindrom-Sequenzen, die abhängig von der jeweiligen Endonuklease so geschnitten werden, daß 3'-, 5'- überhängende oder glatte Enden entstehen können. Dies ermöglicht zum einen eine Abschätzung der Größe eines bekannten, verdauten DNA-Stückes mit spezifischen Spaltstellen der daraus resultierenden Längen der DNA-Fragmente nach Gelelektrophorese und zum anderen eine Rekombination mit Fragmenten, die kompatible Spaltstellen aufweisen. Restriktionsendonukleasen besitzen ihr Wirkungsoptimum bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und verschiedenen Temperaturen, meist 37°C. Um eine sequenzspezifische Reaktion (Staraktivität) zu verhindern, sollte eine Endkonzentration von 5% Glycerin im Restriktionsansatz nicht überschritten werden. 20µl Ansätze mit 1µg DNA, 2µl 10x Reaktionspuffer, 1µl Enzym (1-10U) wurden für mindestens 1 Stunde inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.4.3.11 Ligation

Als Ligation bezeichnet man das Verbinden eines unterbrochenen DNA-Strangs mit einem Sequenzkomplementären DNA-Stück. Diese Reaktion wird *in vitro* durch die T₄-Ligase katalysiert. Dabei werden die Phosphatgruppen benachbarter Nukleotide durch Veresterung miteinander verknüpft. Somit erreicht man entweder eine Rezirkulation eines aufgeschnittenen Plasmides oder eine Rekombination des Vektors mit einem DNA-Fragment. Dazu sollten die zu verknüpfenden Enden der DNA-Stücke komplementäre Sequenzen besitzen, da sonst keine Kompatibilität zwischen Vektorplasmid und zu rekombinierendem DNA-Stück besteht. Zur gerichteten Klonierung sollten die beiden Enden des einzubringenden Fragmentes unterschiedliche Schnittstellen besitzen. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10µl durchgeführt mit ca. 1µg Vektor-DNA in 1x Ligase-Puffer mit 1µl Ligase (400U/µl) bei 16°C über Nacht. Zur Vermehrung und Analyse wurde der gesamte Ligationsansatz in Bakterien transformiert.

2.4.3.12 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Um eine korrekte Sequenz der klonierten, mit PCR vermehrten Vektoren zu gewährleisten, wurde das Insert neuer Konstrukte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Dazu wurde in einer PCR das zu überprüfende Fragment angereichert und präzipitiert. 4µg DNA wurden dann in 18µl H₂O aufgenommen mit 2µl 2M NaOH/2mM EDTA vermischt und

5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2µl 7,5M NH₄OAc pH4,6 zupipettiert, und gevortext. Nach dieser Denaturierung wurde die DNA-Lösung mit 75µl 100% Äthanol versetzt und 10min bei -80°C mit anschließender 10min Zentrifugation die DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 80% Äthanol gewaschen. Die eigentliche Sequenzreaktion wurde mit einem Sequenzierungskit (USB Seq. 2.0) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen, elektrophoriert und mit Hilfe eines Röntgenfilmes ausgewertet.

2.4.3.13 Kinasierung synthetischer Oligonukleotide und Restriktionsfragmente

Um einen DNA-Größenmarker für den radioaktiven Nachweis von Fragmenten benutzen zu können, muß auch dieser radioaktiv sein. Dazu wird der am 5`-Ende befindliche Phosphatrest mit einem radioaktiven Phosphat markiert. Dabei ist zu beachten, ob das zu markierende Stück ein synthetisches Oligonukleotid ist, solche haben keinen 5´-Phosphatrest, oder ein durch Restriktion entstandenes Fragment ist.

Für Restriktionsfragmente wird ein Ansatz mit folgenden Komponenten hergestellt:

Menge	Komponente
10µl	1kb Leiter (10µg)
5µl	³³ P-γATP
5µl	5x Exchange Puffer
4µl	H ₂ O
0,5-1µl	T ₄ Poly Nukleotid Kinase

Synthetische Oligonukleotide wurden in eine Lösung aufgenommen, die folgende Bestandteile enthielt:

Menge	Komponente
2µl	Oligo (10ng/µl)
4µl	³³ P-γATP
2µl	10x Kinase-Puffer
11µl	H ₂ O
1µl	T ₄ Poly Nukleotid Kinase

Die jeweiligen Puffer wurden mit dem Enzym mitgeliefert. Beide Ansätze wurden für 1/2 bis 1 Stunde bei 37°C inkubiert und Nukleotide, die bei der Markierungsreaktion nicht eingebaut worden waren, durch Gelchromatographie mit Sephadex G50-"Push-Columns" entfernt. Dazu wurde jeder Ansatz auf 70µl mit 1x STE-Puffer aufgefüllt, eine Säule mit 1x STE-Puffer äquilibriert und der Markierungsansatz auf die Säule gegeben. Danach wurde 3x mit STE-Puffer eluiert und jede Fraktion einzeln aufgefangen. Die markierten Fragmente befanden sich im zweiten und dritten Eluat, die freien Nukleotide auf der Säule.

2.4.4 Proteinnachweis

2.4.4.1 Aufreinigung bakteriell hergestellter Proteine zur Antikörpergewinnung

Zur Gewinnung spezifischer, gegen Teilstücke eines Proteins gerichteter Antikörper wurde die für dieses Proteinstück kodierende Sequenz in ein Plasmid kloniert, das das Proteinstück mit einem Stück der Gluthation-S-Transferase verbindet, so daß ein Hybridmolekül hergestellt wird. Dieses speziell klonierte Plasmid wurde in proteasefreie Bakterien transformiert und wie unter 2.4.2.3 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Nach Quantifizierung und Qualitätskontrolle wurde das humane Teilstück des Proteins lyophilisiert, resuspendiert und in Kaninchen injiziert. Eine Serumentnahme erfolgte jeweils zwei Wochen nach Injektion des Antigens.

2.4.4.2 Antikörperherstellung

Körperfremde Proteine rufen im damit konfrontierten Organismus eine Abwehrreaktion hervor. Diese Immunantwort auf das eingedrungene Protein macht man sich bei der Gewinnung spezieller, gegen ein gewünschtes Protein gerichteter Antikörper zunutze. Dazu wird ein aufgereinigtes Protein einer Spezies in eine andere injiziert, um so eine Immunantwort hervorzurufen. Auf diese Weise lassen sich auch Antikörper gewinnen, die nur gegen einen Teil eines Proteins gerichtet sind.

Gereinigtes Protein wurde in Kaninchen gespritzt und diesen regelmäßig Serum entnommen. Die erfolgte Antikörperentwicklung wurde im Western-Blot beobachtet und überprüft.

Um einen höheren Antikörpertiter zu erhalten und somit eine verbesserte Qualität des Antikörpers, wurden die Kaninchen mehrfach mit dem gleichen als Antigen wirkenden Protein gespritzt. Es erfolgte jedesmal eine Serumentnahme um den Verlauf der Entwicklung der Immunantwort zu beobachten. Nach Erreichen der gewünschten Antikörperreaktion wurden die Kaninchen ausgeblutet. Das Spritzen der Kaninchen und die Serumentnahme wurden von der Firma Eurogentech in Belgien durchgeführt. Die Seren wurden direkt nach

Entnahme eingefroren, auf Eis verschickt und bei Ankunft direkt bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurden die Seren aufgetaut, aliquotiert und wiederum bei -20°C gelagert.

2.4.4.3 Affinitätsreinigung des polyklonalen Serums

Da das den immunisierten Kaninchen entnommene Serum nicht nur gegen das injizierte Protein gerichtete Antikörper enthält, können die mit anderen Epitopen reagierenden "kanincheneigenen" Antikörper unspezifische Reaktionen (*background*) hervorrufen. Um eine solche unerwünschte Reaktion zu unterbinden, wurde das Serum vor Verwendung über Affinitätssäulen aufgereinigt. Dazu wurde hochaufgereinigtes, aus Bakterien gewonnenes Protein, welches auch als Antigen zur Immunisierung benutzt wurde, an ein Säulenmaterial kovalent gekoppelt. Hierfür wurden vorgefertigte Hi-Trap Säulen verwendet. Die Kopplung erfolgte nach Beschreibung des Herstellers. Über die so mit dem Antigen gekoppelte Säule wurde dann das Immuns Serum des Kaninchens gereinigt. Dabei kommt es zur hochaffinen Anlagerung des gegen das gespritzte Protein gerichteten Antikörpers an das angekoppelte Antigen. Unspezifische Antikörper können abgewaschen werden und der gebundene spezifische Antikörper kann durch pH-Absenkung und damit einem Herabsetzen der Affinität eluiert werden. Eine sofortige Neutralisierung des pH ist nötig, um eine Degradierung des Antikörpers zu vermeiden. Die Elution erfolgte nach Anweisung des Herstellers, die Antikörperlösung wurde mit 3M Tris pH 8,3 neutralisiert. Die Qualität des so aufgereinigten Antikörpers wurde im Western-Blot überprüft.

2.4.4.4 Herstellung von Proteinextrakten aus Zelllinien

Für den Nachweis der Expression von Proteinen wurden Ganzzellextrakte hergestellt. Dazu wurden Zellen, subkonfluent wachsend, mit kaltem 1x PBS gespült und auf PBS mit Hilfe eines "rubberpoliceman" abgekratzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Zellen zu lysieren und gleichzeitig eine effektive Extraktion von Membranproteinen zu gewährleisten, wurden die Extrakte mit 1x RIPA-Puffer und Natriumdesoxycholat versetzt. Gleichzeitig müssen, um eine Degradierung der Proteinen durch Proteasen zu vermeiden, Proteaseinhibitoren zugesetzt werden. Hierzu wurden dafür die sich in ihrer Wirkung ergänzenden Inhibitoren PMSF (Endkonz. 1mM) und E64 (Endkonz. 10nM) gewählt. Um die im Extrakt vorhandene genomische DNA zu scheren, wurden die lysierten Zellen durch eine Kanüle gezogen und nochmals PMSF zugefügt. Um das Herauslösen der Proteine aus den Zellorganellen zu gewährleisten, folgte eine Inkubation auf Eis für 30 bis 60min. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile bei 4°C für mind. 1

Stunde abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Extrakte wurden quantifiziert und in 150µg Gesamtproteinaliquots bei -80°C gelagert.

2.4.4.5 Proteingewinnung aus Zellkulturüberständen

Um auch von Zellen synthetisierte und sezernierte Proteine nachweisen zu können, wurden Zellkulturüberstände gewonnen. Dazu wurden subkonfluente Zellen mit serumfreiem Medium 2x gespült und mit serumfreiem Medium für 4 bis 5 Tage kultiviert. Diesem Medium wurde, waren die Zellen besonders empfindlich, ein Gemisch aus Selenit, Transferrin und Insulin zugesetzt. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden Aliquots immer vollständig getaut.

Für einen Western-Blot Proteinnachweis wurden die im Überstand enthaltenen Proteine gefällt. Hierzu wurden 2 Teile kalten Überstandes mit 1 Teil kalter 21% Trichloressigsäure gemischt und über Nacht auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden dann bei 4°C und 4000rpm für 15 bis 30min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Röhrchen gut trockengeputzt und das Pellet in 3M Tris pH 8 bis 8,5 gelöst. Nach Aufnahme in SDS-Probenpuffer wurden die Proteine 5min aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.4.4.6 Proteinseparation und Konzentration von Proteinen

Proteine lassen sich nach ihrer Größe durch Ultrafiltration auftrennen, entsalzen und konzentrieren. Dies kann zum Abtrennen unerwünschter Proteine genutzt werden, aber auch zum Ankonzentrieren einer bestimmten Proteinfraktion, ohne diese fällen zu müssen oder gleichzeitig den Puffer mit anzukonzentrieren. Hierzu wurden Konzentratoren der Firma amicon/Millipore mit verschiedenen Membranen zur unterschiedlichen Größenseparation nach Anleitung des Herstellers benutzt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, vor einer anderweitigen Verwendung der entsprechenden Fraktion wurde immer ein Proteinnachweis des gesuchten Proteins mit Western-Blot durchgeführt.

2.4.4.7 Protein S Clotting Test

Um die biologische Aktivität des Protein S aus Zellkulturüberständen nachzuweisen, wurde ein Clotting Test mit 10µl konzentriertem aufgearbeitetem Zellkulturüberstand nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der Wirkung von Protein S als Co-Faktor des aktivierten Protein C, dessen antikoagulatorische Wirkung es steigert. Diese Steigerung zeigt sich in der Verlängerung der Gerinnungszeit eines Systems, das mit Faktor Va, ein physiologisches Substrat des aktivierten Protein C, angereichert ist. Dazu wird eine Bezugskurve erstellt, in dem mit sogenanntem Thrombokalibrator-Plasma in einer definierten

Verdünnung die Gerinnungszeit bestimmt wird. Auf die ermittelte Eichkurve wird dann die entsprechende Protein S-Aktivität aufgetragen, die Umrechnung der gemessenen Sekundenwerte in Prozent erfolgt anhand dieser Kurve. Die Protein S-Aktivität wird in Prozent der Norm angegeben. Bei Blutplasmaproben erwartet man einen vorläufigen Normalbereich von 65% bis 140%, wobei während Schwangerschaft und bei Verwendung von oralen Kontrazeptiva oft erniedrigte Werte gefunden werden. Liegt der Aktivitätswert über dem Normalwert, so ist die Aktivität des Protein S erhöht, geringere Gerinnungszeiten werden gemessen. Wird hingegen eine verkürzte Gerinnungszeit beobachtet, ist der Wert für die Protein S-Aktivität erniedrigt. Werte unter 20% gelten als negativ, das heißt, keine Aktivität von Protein S ist zu messen.

2.4.4.8 Quantifizierung von Proteinen

2.4.4.8.1 Proteinnachweis nach Lowry (DC-Assay)

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen, die Detergenzien bis zu 1% enthält, wurde ein colormetrischer Assay benutzt. Dabei reagieren die in der Lösung enthaltenen Proteine in einer alkalischen Kupfer-Tartat-Lösung mit Folin-Reagenz. Vor allem die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan reagieren mit dem Kupfer und reduzieren dabei das Folin-Reagenz, wodurch eine charakteristische Blaufärbung entsteht, die in einem Absorptionsmaximum von 750nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Konzentration der Proteinlösung wird mittels einer Eichkurve bestimmt. Bei Verwendung eines DC-Assays, einer verbesserten Lowry-Messung, wurde eine Eichkurve mit einem BSA-Standard zwischen 2µg und 20µg erstellt. Für die Messung wurden zur Doppelbestimmung unterschiedliche Mengen des Proteinextraktes mit Wasser auf 200µl aufgefüllt, 100µl des den Puffer S enthaltenden Puffer A vermischt und 800µl Puffer B zugefügt und gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750nm gemessen. Durch Vergleich mit der Eichkurve wurde die Konzentration der Proteinlösung ermittelt.

2.4.4.8.2 Proteinnachweis nach Bradford (Biorad)

Proteinlösungen, die keine Detergenzien enthalten, können mit der Methode nach Bradford quantifiziert werden. Diese Methode basiert auf der Reaktion von Coomassie brilliant blue G-250 mit Proteinen zu einem blauen, anionischen Farbstoff und der daraus resultierenden Veränderung im Absorptionsmaximum. Dabei bleibt der Extinktionskoeffizient über einen großen Konzentrationsbereich konstant. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wird eine Eichkurve mit einer bekannten Menge Protein erstellt. Die zu

quantifizierte Proteinlösung wird mit Wasser auf 800µl aufgefüllt und mit 200µl Farbreagenzlösung vorsichtig durchmischt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 595nm gemessen und die Konzentration an der erstellten Eichkurve abgelesen.

2.4.4.9 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteine können in Gelen mit Hilfe von Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Dazu wird nach erfolgter Gelelektrophorese das Gel in Fixing-Lösung für mind. 15min fixiert und mit Coomassie-Färbelösung für 10 bis 20min gefärbt. Zum Herauswaschen ungebundenen Farbstoffes wird das Gel dann bis zur gewünschten Intensität in Entfärbungslösung entfärbt. Für einen Proteinnachweis im Gel sollten mindestens 5µg Protein aufgetragen sein.

2.4.4.10 Antikörpernachweis von Proteinen aus Zellextrakten und Zellkulturüberständen; Western-Blot

Um spezielle Proteine in Zellen nachzuweisen, werden Proteinextrakte dieser Zellen in SDS-Gelen aufgetrennt und für ihren spezifischen Nachweis mit Hilfe eines *Semi-Dry*-Elektroblottes auf Membranen transferiert und so immobilisiert. Das gesuchte Protein läßt sich dann, an die Membran gebunden, mit Antikörpern nachweisen.

Nach Gewinnung von Ganzzellextrakten und Bestimmung des Proteingehalts wurde ein Volumen mit 150µg Protein mit einer entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer vermischt und für 5min bei 95°C erhitzt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Ebenso verfährt man mit gefällten Proteinen aus Zellkulturüberständen.

Beim Transfer macht man sich die einheitlich negative Ladung der Proteine in einem SDS-Gel zu nutze, alle Proteine wandern von der Anode zur Kathode. Dazu wurden 20 Whatman-Papiere und die Nitrocellulosemembran auf Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und in 1x Western-Blot-Blotting-Puffer eingeweicht. Zehn angefeuchtete Whatman-Papiere wurden auf die Anodenplatte der Elektroblottapparatur gelegt, darauf luftblasenfrei die Membran und auf die Membran das Proteingel. Anschließend wurden zehn weitere Whatman-Papiere luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht, der Stapel, um evtl. noch vorhandene Luftblasen zu entfernen, mit Hilfe einer Pipette abgerollt und die Kathodenplatte aufgelegt. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 5mA/cm² durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer der

Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose wurde die zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau S gefärbt und anschließend wieder entfärbt.

Der Nachweis bestimmter, an Membranen gebundener Proteine ist durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion möglich. Dazu wird die Nitrocellulose mit 5% Magermilchpulver in 1x PBS geblockt (Abblocken proteinfreier Membranstellen), um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Überschüssige Proteine werden durch dreimaliges Waschen in 1x PBS entfernt und der Blot mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper in einer 1x PBS, 0,5% Tween20, 0,5% BSA enthaltenden Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Da ab diesem Zeitpunkt eine Austrocknen der Membran unbedingt zu verhindern war, wurde dazu die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Nach zweimaligem waschen mit 1x PBS um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dann mit einem zweiten, gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Alle verwendeten Zweitantikörper waren Biotin-gekoppelt, so daß nach Inkubation des Zweitantikörpers und dreimaligem Waschen der Membran an den Antikörper noch ein Avidin-Biotin-Komplex gekoppelt werden mußte. Durch diese Verfahren ist es möglich, mehrere solcher Komplexe an ein Antikörpermolekül zu koppeln, um so eine Verstärkung der Nachweisreaktion zu erreichen. Dazu wurde ein Avidin-Biotin-Kit benutzt, der für 30min in 1x PBS vorinkubiert werden muß und anschließend für weitere 30min an die Antikörper gekoppelt wird. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde zur Sichtbarmachung der an den Zweitantikörper gekoppelten Komplexe ein Diaminobenzidin-Farb-Kit (DAB) benutzt. Die DAB-Lösung wurde dazu auf den Blot gegeben. Nach sichtbarer Farbreaktion und beginnendem Ausfallen des Farbstoffes wurde die DAB-Lösung abgenommen und die Reaktion mit Wasser gestoppt. DAB bildet einen schwarzbraunen Niederschlag bei der Reaktion mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern.

2.4.4.11 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Auf Membranen transferierte Proteine können mit dem Farbstoff Ponceau-Rot sichtbar gemacht werden, ohne daß der Farbstoff dauerhaft an diese oder an die Membran bindet. Dazu wird der Blot für etwa 5min in eine 20% Ponceau-Rot-Lösung gelegt und geschüttelt. Durch kurzes Abspülen mit Wasser entfernt man den überschüssigen Farbstoff und kann so die Proteinbanden auf dem Blot erkennen. Der Farbstoff wird durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wieder von den membrangebundenen Proteinen entfernt.

2.4.4.12 Antikörpernachweis spezifischer Proteine an Zellen; Immunhistochemie

Um eine Proteinsynthese *in situ* (an Gewebeschnitten) darzustellen und gleichzeitig die Lokalisation der Expression aufzuzeigen, weist man Proteine an oder in Zellen mit Hilfe der Immunhistochemie direkt nach. Dazu werden spezifische Antikörper auf unzerstörte Zellen, Kulturzellen oder Gewebeschnitte, direkt inkubiert und ihre Bindung detektiert.

Eine genaue Quantifizierung des nachgewiesenen Proteins ist bei diesem Verfahren, im Gegensatz zu einem Western-Blot Proteinnachweis nur schwer möglich. Eine Aussage kann dafür aber über den Expressionsort und die Anzahl über die dort das Protein exprimierenden Zellen gemacht werden.

2.4.4.12.1 Nachweis an Zelllinien (Zytospins, Objektträgerkulturen)

Auf Objektträger aufgebrachte Kulturzellen wurden vor der weiteren Behandlung fixiert. Je nach verwendetem erstem Antikörper wurden sie dazu nativ oder denaturierend fixiert.

Mußten die Zellproteine zur weiteren Färbung denaturiert werden, geschah dies entweder durch eine Inkubation in 100% Äthanol oder durch eine Behandlung der Objektträger mit einer Lösung aus:

22,5ml H₂O

2,5ml 1M NaOH

11ml 100% Äthanol

für 10 Sekunden bis 3min.

Folgende Fixative wurden benutzt:

Fixativ	Anwendung und Art der Fixierung
3,7% Formaldehyd in 1x PBS	für 15min bei Raumtemperatur oder 4°C; ermöglicht natives Fixieren, vernetzt allerdings Proteine leicht
Methanol/Eisessig (3:1)	für 1x 15min und evtl. weitere 2x 30min; für leicht denaturierendes Fixieren ohne die DNA aufzulösen
eiskaltes Aceton	für 15min; natives, entwässerndes Fixieren
Aceton/Formaldehyd- Kombination	eiskaltes Aceton für 2min und 3,7% Formaldehyd in 1x PBS für 10 min
80% Äthanol	für mind. 20min; leicht denaturierendes Fixieren
Zamboni	für 10min; natives Fixieren und Permeabilisieren von Membranen, Verlust der DNA kann nicht ausgeschlossen werden

Sollten die Zellmembranen gut permeabilisiert werden, erfolgte dies in einer Lösung aus 0,2% Triton in 1x PBS und einer Behandlung mit NaBH₄ in 1x PBS für 2x 10min. Die Schnitte wurden anschließend 3x für 5min in 1x PBS gespült und die endogene Peroxidase für mindestens 10min in 100% eiskaltem Methanol mit 0,3% H₂O₂ geblockt. Wiederum wurden die Objektträger 3x 5min in 1x PBS gewaschen und anschließend unspezifische Bindungen mit 5% Magermilch in 1x PBS für mind. 15min abgesättigt. Es folgten drei weitere Waschschrte in 1x PBS für 5min. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte dann in 1x PBS, 0,1% Triton X 100, 0,5% BSA über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden dazu in Kammern gebracht, die ein Austrocknen verhinderten oder das Austrocknen mit einem aufgelegten Deckglas verhindert. Die Verdünnung des jeweiligen Antikörpers wurde individuell ausgetestet. Nach erfolgter Bindung des Primärantikörpers wurden die Objektträger 3x mit 1x PBS gewaschen und mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten, biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Dieser wurde in einer gleich zusammengesetzten Lösung verdünnt wie schon der Primärantikörper. Alle verwendeten Sekundärantikörper waren Biotin-gekoppelt, so daß ein Avidin-Biotin-Komplex angekoppelt werden mußte. Dazu wurde ein ABC-Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet. Nach Spülen der Objektträger mit 1x PBS erfolgte der Nachweis der Antikörper durch eine Färbereaktion der gekoppelten Peroxidase mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC). AEC ergibt nach erfolgter Reaktion ein rotes, mit organischen Lösungsmitteln lösliche Präzipitat. Die Reaktion wurde nach 20min mit Wasser abgestoppt, die Zellen gegengefärbt und mit Eindeckmittel und Deckgläsern zur dauerhaften Aufbewahrung eingedeckt.

2.4.4.13 Beschichtung von Objektträgern für Gewebeschnitte

Damit Gewebeschnitte bei der folgenden Behandlung auf den Objektträgern haften bleiben, werden diese mit Substanzen beschichtet, die ein Ablösen der Schnitte vom Glas verhindern.

2.4.4.13.1 APES-Beschichtung

Um Schnitte auf Objektträgern einer Mikrowellenbehandlung unterziehen zu können, müssen diese mit Aminospropyltriethoxysilan (APES) beschichtet sein. Dazu reinigt man 200 Objektträger in Wasser vor und taucht sie anschließend für 5min in Acteon. Sie werden dann für 5min in einer 2% APES-Aceton-Lösung belassen, zwei mal mit Wasser gespült und über Nacht getrocknet. Die Beschichtung erfolgt auf beiden Seiten des Objektträgers und ist beliebig lange haltbar.

2.4.4.13.2 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Müssen Gewebeschnitte nicht mit Hitze behandelt werden, so genügt eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin. Dazu wird eine gesättigte Poly-L-Lysin-Lösung auf die Objektträger aufgestrichen - Poly-L-Lysin "klebt" die Gewebeschnitte auf dem Objektträger fest - und getrocknet. Diese Beschichtung ist somit nur auf einer Seite des Objektträgers und, da Lysin eine Aminosäure ist und degradiert, nicht lange haltbar.

2.4.4.14 Immunhistochemischer Nachweis an kryopräservierten Gewebeschnitten

Um die Expression bestimmter Proteine in Geweben nachzuweisen, kann man diese nach Entnahme aus dem Organismus in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und in Superdünnschnitten (4µm) auf beschichtete Objektträger aufbringen. An solchen Schnitten lassen sich über eine Antigen-Antikörperbindung Proteine detektieren.

Dazu sollte das zu untersuchende Gewebe nach der Entnahme möglichst schnell schockgefrostet werden. Ein Wiederauftauen des gefrostenen Gewebes muß unbedingt verhindert werden, da dadurch die Membranen und Organellen der Zellen zerstört werden ("Gefrierbrand") und sie für die Immunhistochemie somit unbrauchbar werden.

Schockgefrostete Gewebe wurden in dicht abgeschlossenen Plastikgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

Zur Anfertigung der Schnitte wurden die Gewebeblöcke in einem Kryostaten-Mikrotom in einer Dicke von 4 bis 5 µm geschnitten. Nach Aufbringen auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wurden die Schnitte kurz getrocknet und bei -80°C in speziellen Boxen aufbewahrt.

Für einen immunhistochemischen Nachweis wurden die Gefrierschnitte wie unter 2.4.4.12.1 fixiert und weiter behandelt. Um den Verbrauch an Antikörpern gering zu halten, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet.

2.4.4.15 Nachweis an paraffineingebetteten Gewebeschnitten

Entnommenes Gewebe kann alternativ zur Kryopräservierung auch dauerhaft in Paraffin eingebettet werden. Dazu wird das entnommene Gewebe in 3,7% Formaldehyd in 1x PBS fixiert.

Die durch Paraffin-Einbettung erhaltenen Gewebeblöcke wurden in einem Mikrotom in 4 bis 5 µm Dicke geschnitten, die Schnitte in einem 60°C warmen Wasserbad gespreitet, auf APES-beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C getrocknet. Um das Paraffin vom Schnitt zu lösen wurden die Objektträger für 4x 5min in Histol gebadet und

anschließend rehydriert durch jeweils zweiminütige Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %; 96%; 90%; 80%; 70%). Es folgte ein Blockieren der endogenen Peroxidase in 100% Methanol, 0,3% H₂O₂ für 20min. Die Schnitte wurden in Wasser gespült und zur Freilegung von Epitopen - Formaldehyd kann durch Vernetzung von Proteinen die für Antikörper zur Erkennung des Antigens wichtigen Epitope maskieren - in 0,01M Zitratpuffer pH6,0 für 20min einer 600W Mikrowellenbehandlung unterzogen. Die Schnitte wurden im Puffer für 15min abgekühlt und anschließend in 1x PBS gespült. Um das Volumen an zur Abdeckung des Schnittes benötigter Antikörperlösung gering zu halten, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet und in einer 5%-Magermilchlösung in 1x PBS unspezifische Bindungen abgeblockt. Die Inkubation der Antikörper und der Nachweis spezifischer Bindungen wurde wie unter 2.4.4.12 beschrieben durchgeführt.

2.4.4.16 Gegenfärbungen immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte

Um unterschiedliche Zelltypen voneinander unterscheiden zu können, Gewebestrukturen besser abgrenzen zu können und die spezifische Farbreaktion der Immunhistochemie genauer zuzuordnen, werden alle gefärbten Objektträger gegengefärbt. Man macht sich dabei zunutze, daß einige Farbstoffe an bestimmte Proteine bzw. an die DNA binden und so die gesamte Zelle sichtbar gemacht werden kann.

2.4.4.16.1 Hämatoxylin-Gegenfärbung

Hämatoxylin ist ein Farbstoff, der Zellkerne blau anfärbt. Damit ist zum einen ein guter Kontrast zur Membranfärbungen möglich, zum anderen kann bei einer immunhistochemischen Kernfärbung an Hand der Farbe unterschieden werden, ob eine Antikörperbindung stattgefunden hat. Hämatoxylin verdrängt oder überlagert AEC nicht, so daß Kerne, in denen eine Antikörperdetektion stattgefunden hat rot erscheinen und Zellkerne, in denen kein Antikörper gebunden hat blau sind. Da Hämatoxylin normalerweise Lösungsmittel enthält, die den AEC-Farbstoff zerstören würden, wurde ein speziell entwickeltes, nur in Wasser gelöstes Hämatoxylin verwendet.

Zur Gegenfärbung werden die Objektträger in Leitungswasser gespült und in 20% Hämatoxylin für 5min gefärbt. Die Objektträger wurden dann so lang mit Leitungswasser gespült, bis sich kein Farbstoff mehr löste. Zur Klärung wurden die Objektträger dann kurz (unter 1min) in Reinigungslösung getaucht, kurz mit Leitungswasser gespült und für 1min in Bläuungslösung gestellt. Wiederum wurden sie mit Leitungswasser gespült und, damit sich

keinerlei Salzkristalle bilden konnten, vor dem Eindecken mit dest. Wasser abgewaschen. Als Eindeckmittel muß ein wäßriges Eindeckmittel gewählt werden (Aquamount).

2.4.4.16.2 Gegenfärbung mit Hoechst-Farbstoff

Hoechst 33258 ist ein Farbstoff, der in DNA interkaliert und mit UV-Licht sichtbar wird. Immunhistochemisch gefärbte Präparate müssen deshalb gleichzeitig mit Durchlicht und Fluoreszenzanregung (Halogen- und UV-Licht) betrachtet werden. Die gefärbten Objekte werden zur Gegenfärbung für 20min in eine Hoechst-Färbelösung gestellt, anschließend mit 1x PBS gespült und darin 5min stehen gelassen. Um die Bildung von Salzkristallen auf den Objektträgern zu verhindern, wurden sie vor dem Eindecken mit dest. Wasser abgewaschen. Als Eindeckmittel ist ein wasserlösliches, UV durchlässiges Eindeckmittel verwendet worden ("altes", nicht verbessertes Aquamount).

2.4.4.17 Hämatoxylin-Eosin-Färbung, HE

Um Gewebeschnitte histologisch eindeutig zuordnen zu können, färbt man das zu untersuchende Gewebe mit unterschiedlichen Farbstoffen an. Eine Standardfärbung, in der sowohl basische wie auch saure Proteine mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt werden ist die HE-Färbung. Hierbei werden Zellkerne, Kalk, grampositive Bakterien und Knorpelsubstanz von Hämalaun blau angefärbt. Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten erscheinen durch Eosin rot. Von jedem in dieser Arbeit verwendeten Tumor wurden mindestens zwei dicht hintereinander gelegene HE-Schnitte angefertigt. Dazu wurden entparaffinierte oder fixierte Gefrierschnitte in dest. Wasser gespült und für 7min in Hämalaun (100%) gefärbt. Die Schnitte wurden dann in dest. Wasser gespült und in Leitungswasser für 15min gebläut. Nach Spülen in dest. Wasser wurde dann für 30sec mit Eosin (1% in 80% Äthanol) gefärbt und anschließend in 70% Alkohol differenziert. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 2x 2min (70%; 80%; 90%; 100%) entfärbt und dehydriert. Nach zweimaligem baden in Histol wurden die Schnitte mit Korbitbalsam eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasefamilien und ihrer Liganden in humanen Bronchialkarzinomzelllinien

Da onkogene Rezeptortyrosinkinasen Zellen transformieren und zu einem unkontrollierten Wachstum veranlassen können, war die Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasen in Lungentumoren bereits Gegenstand vieler Untersuchungen. Eine umfassende Analyse über den Rezeptorstatus in Bronchialkarzinomzelllinien lag bisher jedoch nicht vor, so daß Lungenzelllinien unterschiedlicher histologischer Subtypen auf eine mögliche Expression onkogener Rezeptoren untersucht werden sollten.

Expressieren Zellen gleichzeitig die korrespondierenden Liganden der Kinasen, besteht die Möglichkeit, daß so die Zellen ihr Wachstum autokrin bzw. parakrin stimulieren. Da diese eigenständigen, einer allgemeinen Kontrolle entzogenen Kreisläufe häufig entscheidend für die Genese und die Progression von Tumoren sind, schloß sich eine Ermittlung der Expression der bekannten Liganden an.

3.1.1.1 Expressionsanalyse onkogener RTKs und ihrer korrespondierenden Liganden

Hierfür wurde RNA aus subkonfluent wachsenden Kulturzellen gewonnen, diese revers transkribiert und die gewonnene cDNA für die Amplifikation mittels PCR verwendet. Bei jeder neu durchgeführten cDNA-Synthese wurde die Gleichmäßigkeit der Reaktion untereinander mit einer PCR mit Primern gegen das *housekeeping*-Gen GAPDH überprüft. Die Ergebnisse mehrfach durchgeführter RT-PCRs mit spezifischen Primern sind tabellarisch aufgelistet.

Bei der RT-PCR Analyse unterschiedlicher onkogener Rezeptortyrosinkinasen zeigte sich, daß die untersuchten Zelllinien mindestens eine, meist jedoch mehrere onkogene Kinasen exprimierten.

Gen	RT-PCR Bedingungen	NSCLC-Linien											
		SCC			LCC			ADC					
Primer- paar	Temp; Zyklenzahl	32M1	U1752	97TM1	H103	U1810	H23	H125	H820	H1573	H2009	H2077	H2126
EGF-R	61°; 30	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	-	+++
erbB2	61°; 30	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
erbB3	60°; 30	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
erbB4	60°; 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Met	56°; 25	-	+	++	++	-	-	+	+++	+	+	-	++
Ron	59°; 25	+	++	+++	+	-	-	+	+	+	+	-	++
Lim-K	66°; 30	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-
Axl	56°; 25	+	+	-	++	+	-	++	+	-	+	-	-
Tyro3	58°; 25	+	+	++	+	+	+	++	+	+	++	+	+
cMer	64°; 35	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	-	+++	+++
Ret	59°; 25	++	++	+	++	+	+	++	+	+	++	++	+
c-kit	56°; 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGF α	59°; 30	++	+	++	+	+	+	-	+	+	+++	++	+
Amphi	58°; 30	+	-	+++	-	-	+	-	++	++	+	+	+
Her	58°; 30	+	++	++	+++	+	-	-	+	+	+	-	-
HGF	54°; 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
MSP	56°; 30	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Gas6	59,5°; 25	-	+++	-	+++	+	+	+++	++	+	+	++	+
Prot S	56°,5; 25	+	+	+	+	+	+	++	+++	+	++	++	++
GDNF	54°; 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCF	56°; 30	+	+	++	++	-	-	+	++	+	+	++	+

Tab. 1 Bestimmung der Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden mittels RT-PCR in NSCLC-Zelllinien

Die Expressionsstärke wurde unter den angegebenen Bedingungen ermittelt und wie folgt aufgeführt:

starke Expression: +++
 moderate Expression: ++
 schwache Expression: +
 keine Expression: -

Gen	RT-PCR Bedingungen	SCLC-Linien										
		H24	H60	H69	DMS79	H82	H146	H510	H526	N592	H841	NHBE
Primer- paar	Temp; Zyklenzahl											
EGF-R	61°; 30	++	++	-	++	-	++	++	-	-	++	++
erbB2	61°; 30	++	+	+++	++	++	+	+	+	++	+++	-
erbB3	60°; 30	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+
erbB4	60°; 30	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Met	56°; 25	+	+	+	-	-	+	+	+	++	-	+
Ron	59°; 25	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Lim-K	66°; 30	++	++	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Axl	56°; 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tyro3	58°; 25	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+
cMer	64°; 35	++	+	++	+++	++	+++	++	++	+	+	+
Ret	59°; 25	++	++	+	+	++	++	+	+	+	-	+
c-kit	56°; 30	++	+	+	++	-	+++	+++	++	++	-	-
TGF α	59°; 30	+	-	+++	+++	-	++	++	++	+	-	++
Amphi	58°; 30	+	-	-	++	-	++	-	-	-	-	+++
Her	58°; 30	+	+	-	++	-	-	++	++	-	+++	+
HGF	54°; 30	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MSP	56°; 30	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
Gas6	59,5°; 25	++	++	++	+++	-	+++	++	++	+	-	+++
Prot S	56°,5; 25	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+
GDNF	54°; 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCF	56°; 30	+	+	++	+++	++	++	++	+	+++	+	+++

Tab. 2 Ermittlung der Expressionsstärke onkogener Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden in SCLC-Zelllinien mittels RT-PCR

Die Stärke der Expression wurde dabei wie folgt festgelegt:

starke Expression: +++
 moderate Expression: ++
 schwache Expression: +
 keine Expression: -

Die RT-PCR Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Rezeptor	NSCLC		SCLC		NHBE
EGF-Rezeptorfamilie					
EGF-R	11/12	92,7 %	6/10	60 %	1/1
erbB2	12/12	100 %	10/10	100 %	0/1
erbB3	8/12	66,7 %	9/10	90 %	0/1
erbB4	0/12	0 %	0/10	0 %	1/1
Met-Rezeptorfamilie					
Met	8/12	66,7 %	7/10	70 %	1/1
Ron	9/12	75 %	8/10	80 %	1/1
Lim-K	3/12	25 %	4/10	40 %	0/1
Axl-Rezeptorfamilie					
Axl	7/12	58,3 %	0/10	0 %	1/1
Tyro3	7/12	58,3 %	9/10	90 %	1/1
cMer	10/12	83,3 %	9/10	90 %	1/1
andere					
Ret	12/12	100 %	8/10	80 %	0/1
c-kit	0/12	0 %	8/10	80 %	0/1

Tab. 3 Auswertung der Expressionsanalyse onkogener Rezeptortyrosinkinasen in Bronchialkarzinomzelllinien

Die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse demonstriert, daß Ret, Ron und Met-Transkripte in nahezu allen Zelllinien gefunden wurden, Lim-Kinase konnte nur in wenigen Linien nachgewiesen werden.

Der EGF-Rezeptor, erbB2 und erbB3 sind allgemein in beiden histologischen Subtypen von Zelllinien exprimiert, eine Expression von erbB4 wurde nur in NHBE-Zellen beobachtet. c-kit wurde ausschließlich in Zelllinien kleinzelligen Ursprungs gefunden, was sich mit bereits publizierten Beobachtungen deckt (Hibi et al., 1991).

Tyros3 und cMer, Mitglieder der Axl-Familie wurden in beiden Subtypen der Zelllinien nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde eine Expression von Axl ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs gefunden. Axl ist somit eine nur für NSCLC typische RTK. Während für SCLC histiotypische Marker wie das c-kit bereits beschrieben sind, sind solche Marker für die Gruppe der NSCLC nicht bekannt gewesen.

Die Analyse der Expression der Liganden ergab, daß viele der Zelllinien mehrere der untersuchten Liganden exprimierten. Einigen Zellen stehen somit mehrere autokrine Stimulationswege offen.

Ligand	NSCLC		SCLC		NHBE
TGF α	8/12	66,7 %	5/10	50 %	1/1
Amphiregulin	6/12	50 %	6/10	60 %	1/1
Heregulin	8/12	66,7 %	3/10	30 %	1/1
HGF	1/12	8,3 %	0/10	0 %	0/1
MSP	3/12	25 %	9/10	90 %	0/1
Gas6	8/12	66,7 %	8/10	80 %	1/1
Protein S	12/12	100 %	10/10	100%	1/1
GDNF	0/12	0 %	0/10	0 %	0/1
SCF	8/12	66,7 %	7/10	70 %	1/1

Tab. 4 Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse der Analyse der untersuchten Liganden

3.1.1.2 Co-Expression onkogener Rezeptoren und ihrer korrespondierenden Liganden

Zellen, denen mehrere autokrine Stimulationswege zur Verfügung stehen, werden sich, da diese positiv auf die Proliferation wirken und somit ihre Selektion beeinflussen, in einer Tumorzellpopulation durchsetzen.

Die Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse zeigte, daß eine Expression von TGF α und Amphiregulin - beides dient als Ligand für den EGF-Rezeptor - und von Heregulin, das an

erbB3 und erbB4 bindet, in vielen Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Eine Co-Expression der EGF-Rezeptorfamilie mit ihren Liganden läßt sich für nahezu 50% der Zelllinien beschreiben. Eine besondere Stellung nimmt dabei das mögliche Rezeptor-Ligandensystem von erbB4 und Heregulin ein, da die Möglichkeit einer Autokrinie nur in normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) nachweisbar war.

Rezeptor	Ligand	Co-Expression				
		NSCLC		SCLC		NHBE
EGF-Rezeptorfamilie						
EGF-Rezeptor	TGF α	7/12	58,3 %	4/10	40 %	1/1
EGF-Rezeptor	Amphiregulin	6/12	50 %	5/10	50 %	1/1
erbB2	unbekannt					
erbB3	Heregulin	7/12	58,3 %	2/10	20 %	0/1
erbB4	Heregulin	0/12	0 %	0/10	0 %	1/1
Met-Rezeptorfamilie						
Met	HGF/SF	0/12	0 %	1/10	10 %	0/1
Ron	MSP	3/12	25 %	5/10	50 %	0/1
Lim-K	unbekannt					
Axl-Rezeptorfamilie						
Axl	Gas6	5/12	41,7 %	0/10	0 %	1/1
Tyro3	Gas6	5/12	41,7 %	8/10	80 %	1/1
Tyro3	Protein S	9/12	75 %	4/10	40 %	1/1
cMer	Gas6	8/12	66,7 %	8/10	80 %	0/1
andere						
Ret	GDNF	0/12	0 %	0/10	0 %	0/1
c-kit	SCF	0/12	0 %	6/10	60 %	0/1

Tab. 5 Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Rezeptoren und ihrer Liganden hinsichtlich Co-Expression

HGF, der Ligand für Met ist nur selten exprimiert, eine Co-Expression wird nur in einer SCLC Zelllinie gefunden. Der Ligand für Ron, MSP, wird hauptsächlich in SCLC Linien exprimiert. Potentielle autokrine Schleifen können in einigen Linien detektiert werden, vor allem jedoch in SCLC-Linien.

GDNF, der Ligand für Ret konnte nicht nachgewiesen werden. SCF, Wachstumsfaktor für c-kit, wurde in nahezu allen Linien gefunden, aber aufgrund der histiotypischen Expression von c-kit sind nur 50% der SCLC-Zelllinien in der Lage, sich selbst zu stimulieren.

In fast allen Axl-exprimierenden NSCLC-Linien wurde eine Co-Expression mit Gas6 nachgewiesen, was bedeutet, daß in 50% aller NSCLC-Linien eine potentielle autokrine Stimulation möglich ist. Gas6 ist zusätzlich in den meisten SCLC-Linien zu finden. Diese Linien exprimieren zwar kein Axl, jedoch andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie, so daß eine mögliche Autostimulation über diese Rezeptoren möglich ist. Interessanterweise ist Gas6, der Ligand für alle Mitglieder der Axl-Familie, stark in NHBE-Zellen exprimiert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Co-Expression von Rezeptoren und ihrer Liganden in nahezu allen der untersuchten Linien zu finden ist, einige Linien zeigen mehrere potentielle autokrine Schleifen.

3.2 Expression der Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie in humanen Bronchialkarzinomzelllinien

Die Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie ist eine Gruppe transformierender Rezeptoren mit onkogenem Potential. Die bis heute bekannten Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine bis dahin nicht bekannte Anordnung ihrer extrazellulären Domäne aus. Dieser spezifische extrazelluläre Aufbau führte zu einer Einteilung der bekannten Mitglieder Axl, Tyro3 und cMer als eigenständige Familie.

Gas6, ein Protein das eine starke Homologie zu Protein S aufweist, wurde als Ligand für alle Axl-Familienmitglieder identifiziert. Eine Bindung von Gas6 an diese initiiert die Kinaseaktivität.

3.2.1 Alle Mitglieder der Axl-Familie sind in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert

Da die Expression der Rezeptoren der Axl-Familie, Axl, Tyro3 und cMer in humanen Lungenkarzinomen bisher nicht untersucht war, wurden humane Lungenkrebszelllinien unterschiedlicher histologischer Ursprünge mit Hilfe der RT-PCR auf Expression dieser Rezeptoren analysiert.

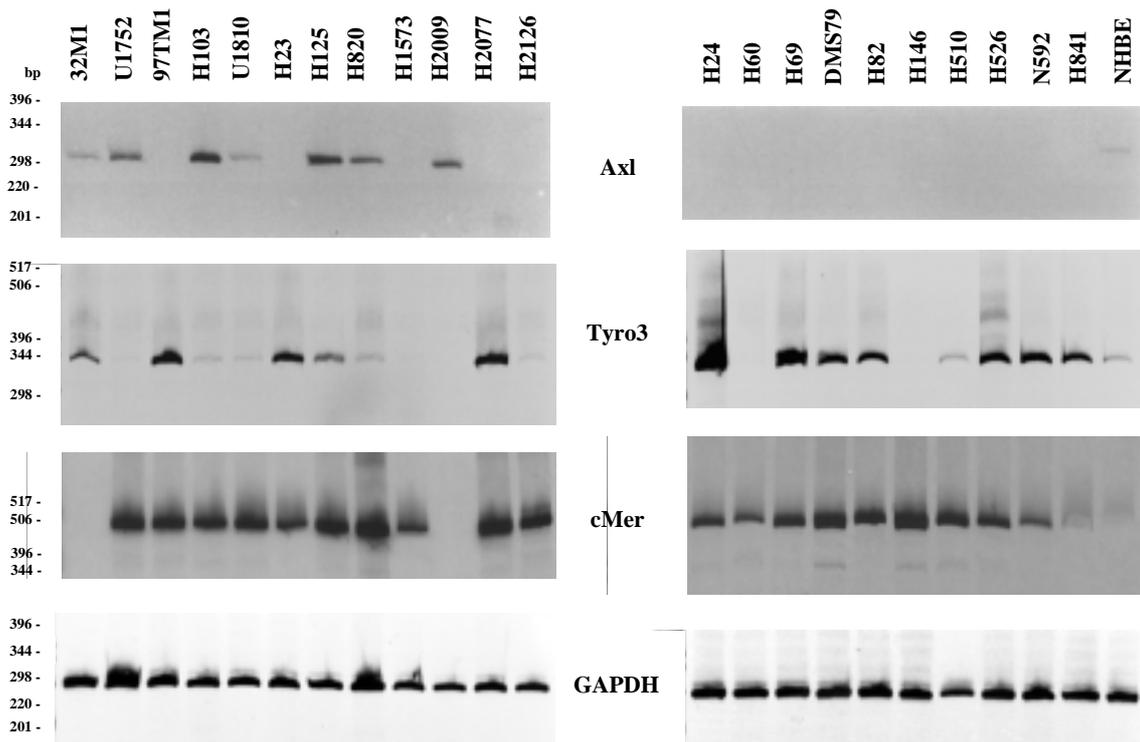


Abb. 3 Nachweis der mRNA-Expression der Axl-RTK-Familie

Gezeigt sind Autoradiographien der semiquantitativen RT-PCRs nach erfolgter 5% PAGE. Die Zelllinien sind entsprechend ihres histologische Ursprungs geordnet. Die erwarteten PCR-Fragmente haben auf Grund der gewählten Primerpaare eine Größe von 283 bp für Axl, 344 bp für Tyro3 und 526 bp für cMer. NSCLC-Zelllinien (links) zeigen eine Expression aller drei RTKs, wohingegen SCLC-Zelllinien (rechts) nur cMer und Tyro3 exprimieren, nicht aber Axl. Zur Abschätzung der relativen Menge wurde eine RT-PCR gegen das hochexprimierte *housekeeping*-Gen GAPDH durchgeführt.

Es zeigte sich, daß cMer in nahezu allen Zelllinien unabhängig von ihren histologischen Ursprung, im Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) deutlich überexprimiert ist. Ähnliche Befunde lieferten auch die Untersuchungen der Genexpression von Tyro3.

Hingegen zeigte sich auch, daß Axl nur in der Mehrzahl von Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs (NSCLC) und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE), nicht jedoch in Zelllinien kleinzelliger Herkunft (SCLC) exprimiert wird. Axl kann somit als differentieller Marker für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien dienen. Es ist damit einer der wenigen bekannten histotypischen Marker für NSCLC.

Eine Auswertung der RT-PCR Ergebnisse zeigt die folgende Verteilung der Expression in NSCLC und SCLC-Linien:

Gen	RT-PCR Bedingungen	NSCLC-Linien											
		SCC			LCC				ADC				
Primer- paar	Temp; Zyklenzahl	32M1	U1752	97TM1	H103	U1810	H23	H125	H820	H1573	H2009	H2077	H2126
Axl	56°; 25	+	+	-	++	+	-	++	+	-	+	-	-
Tyro3	58°; 25	+	+	++	+	+	+	++	+	+	++	+	+
cMer	64°; 35	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	-	+++	+++
Gas6	59,5°; 25	-	+++	-	+++	+	+	+++	++	+	+	++	+
Prot S	56°,5; 25	+	+	+	+	+	+	++	+++	+	++	++	++

Tab. 6 Nachweis der Mitglieder der Axl-Kinasefamilie und ihre Liganden in NSCLC Bronchialkarzinomzelllinien

Gen	RT-PCR Bedingungen	SCLC-Linien										
		H24	H60	H69	DMS79	H82	H146	H510	H526	N592	H841	NHBE
Primer- paar	Temp; Zyklenzahl											
Axl	56°; 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tyro3	58°; 25	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+
cMer	64°; 35	++	+	++	+++	++	+++	++	++	+	+	+
Gas6	59,5°; 25	++	++	++	+++	-	+++	++	++	+	-	+++
Prot S	56°,5; 25	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+

Tab. 7 RT-PCR Nachweis der Expression der Mitglieder der Axl-Familie und ihrer Liganden in SCLC-Zelllinien

	NSCLC		SCLC		NHBE
Axl	7/12	58 %	0	0 %	100%
Tyro3	7/12	58 %	9/10	90 %	100%
cMer	10/12	83 %	9/10	90 %	100%
Gas6	10/12	83%	8/10	80 %	100%
Protein S	12/12	100%	10/10	100 %	100%
Co-Expression Axl/Gas6	5/12	42%	0/10	0 %	100%
Co-Expression Tyro3/Gas6	5/12	42%	8/10	80 %	100%
Co-Expression cMer/Gas6	8/12	67%	8/10	80 %	100%
Co-Expression Tyro3/Protein S	9/12	75%	4/10	40 %	100%

Tab. 8 Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Axl-RTK-Familie und ihrer Liganden

3.2.2 Axl ist in Gewebe aus Lungentumoren nachweisbar

Da die Expression von Genen in Linien nur Hinweise auf ein Vorkommen des Produktes im Gewebe liefert, wurde die Expression von Axl in soliden Tumoren analysiert. Dazu wurde RNA aus Tumorgewebe isoliert, revers transkribiert und für eine RT-PCR Analyse eingesetzt.

Alle eingesetzten Proben wiesen eine Expression von Axl-RNA auf, unabhängig von ihrem histologischen Ursprung. Wie die mikroskopische Untersuchung der Tumoren zeigte, waren in den Tumoren jedoch nicht nur Tumorzellen sondern auch Bindegewebe, Entzündungszellen aller Art und andere Zelltypen vorhanden, so daß über den Expressionsort bzw. den exprimierenden Zelltyp innerhalb des Tumorverbandes mit dieser Methode keine Aussage zu treffen war. Lediglich das Vorhandensein von Axl im Tumorverband kann bestätigt werden.

3.2.3 Etablierung eines polyklonalen, gegen Axl gerichteten Antikörperserums

Zur Detektion synthetisierter Proteine mußte, da der Nachweis einer Transkription eines Gens nicht zwangsläufig Schlüsse auf eine Translation zuläßt, ein Anti-Axl spezifisches Antiserum gewonnen werden. Ein hochspezifisches Antiserum erlaubt neben dem allgemeinen Nachweis

der Synthese des als Antigen dienenden Proteins u.a. auch eine relative Quantifizierung des erkannten Proteins im Western-Blot.

Zur Antikörperherstellung in Kaninchen wurde ein Teil des Gens der Axl-Kinase, ein Stück aus der extrazellulären Domäne, das für die Aminosäuren 31 bis 163 kodiert, in einen Expressionsvektor (pGEX-GST) kloniert, so daß das Teilstück mit einem GST-Protein als ein Protein exprimiert wird (GST-Fusionsprotein). Zur Überprüfung der Sequenz wurde das einklonierte Fragment komplett sequenziert. Dabei wurden keine Basenaustausch, Deletion oder andere Fehler detektiert. Das Plasmid (pGEX-GST-Axl) wurde in Bakterien (x12blue) transformiert und dort vermehrt. Die Gewinnung der Expressionsvektoren erfolgte mit einem Maxipräp.

Ein proteasefreier Bakterienstamm (JM101) wurde mit diesem Plasmid transformiert und das gewünschte Protein in diesen Bakterien synthetisiert. Nach Aufschluß der Bakterien wurde das neu-exprimierte Protein mit Hilfe des angefügten GST-Schwanzes über GST-Bindungssäulen von den bakteriellen Proteinen abgetrennt.

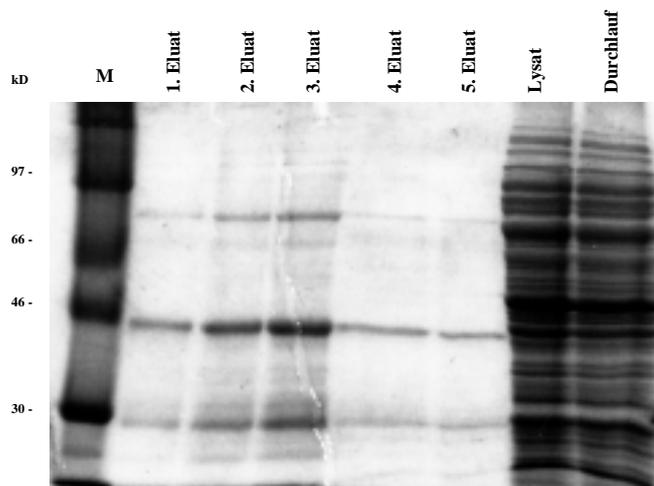


Abb. 4 Aufreinigung des GST-Axl-Fusionsproteins

Das in Bakterien hergestellte Fusionsprotein wurde nach Aufschluß der Bakterien über einer GST-Affinitätssäule aufgereinigt. Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-Gel mit unterschiedlichen Eluaten der Affinitätssäule.

Das aufgereinigte und konzentrierte Protein wurde lyophilisiert und nach Lösen in PBS in Kaninchen injiziert. Eine Blutentnahme zur Verlaufskontrolle wurde zwei Wochen nach jeder erfolgten Injektion vorgenommen.

Die unterschiedlichen Seren wurden von ihren zellulären Bestandteilen getrennt und in Western-Blots an affinitätsgereinigtem Fusionsprotein getestet. Nachdem eine ausreichend

starke Reaktion des Serums mit dem Antigen gegeben war, wurde dieses polyklonale Serum an Zellextrakten getestet.

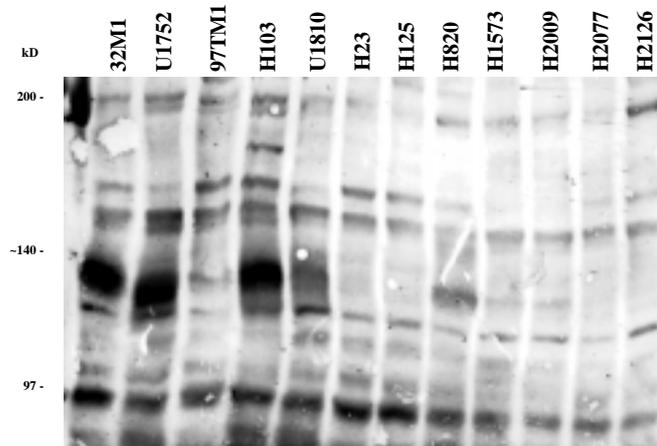


Abb. 5 Western-Blot mit polyklonalem Serum an Ganzzellextrakten nicht-kleinzelliger Zelllinien
150µg Gesamtzellextrakt je Linie wurden auf einem 5% SDS-Gel aufgetrennt und auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Nach Inkubation mit dem 1:100 verdünnten Antiserum erfolgte der Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen mit einem biotinkoppelten Zweitantikörper und DAB als Farbstoff.

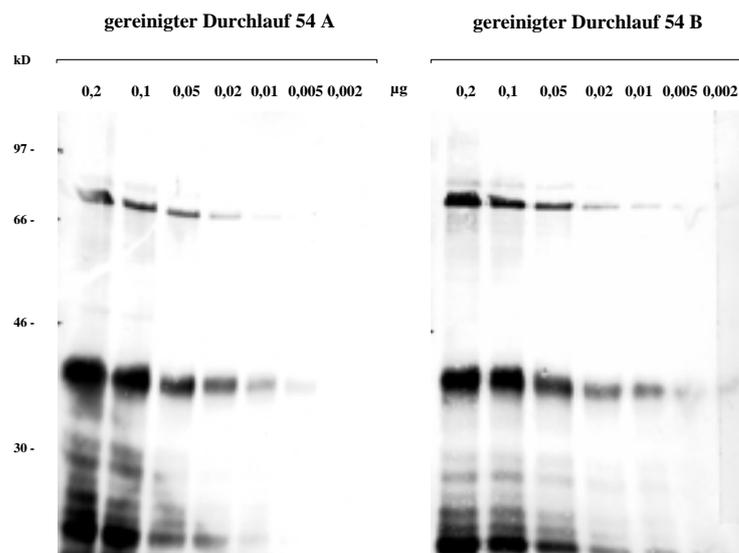


Abb. 6 Test der Nachweisgrenze des aufgereinigten Antikörperserums mit Western-Blot
Unterschiedliche Mengen Fusionsprotein wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem aufgereinigtem Serum (1:250 verdünnt) inkubiert. Der Nachweis spezifischer Antikörperbindungen erfolgte mit biotinkoppelten Zweitantikörpern und DAB als Farbstoff.

Da das gewonnene Serum zunächst noch mehrere Proteine in Zellextrakten erkannte (unspezifische Reaktion, unbefriedigende Sensitivität), wurde das Antikörperserum über Säulen, an die zuvor das Fusionsprotein gekoppelt wurde, aufgereinigt. Der im Eluat gewonnene aufgereinigte Antikörper wurde auf seine Empfindlichkeit anhand des Fusionsproteins (GST-Axl) im Western-Blot getestet.

Entsprechend aufgereinigte Anti-Axl-Antikörperseren wurden für weitere Western-Blot Analysen eingesetzt.

3.2.4 Axl wird ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs synthetisiert

Da die Expression eines Gens nicht zwangsläufig zur Herstellung des entsprechenden Proteins führt, erfolgte der Proteinnachweis von Axl aus Ganzzellextrakten mit der Western-Blot-Technik. Dazu wurden 150µg Extrakt auf ein 5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf einer Nitrocellulosemembran transferiert und so immobilisiert. Das Axl-Protein wurde durch eine Axl-spezifisches polyklonales, affinitätsgereinigtes Antiserum, das gegen den extrazellulären N-Terminus gerichtet ist, immunhistochemisch nachgewiesen. Die Detektion des Antigen (Axl)-Antikörperkomplexes erfolgte mittels eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers und dem Farbstoff DAB.

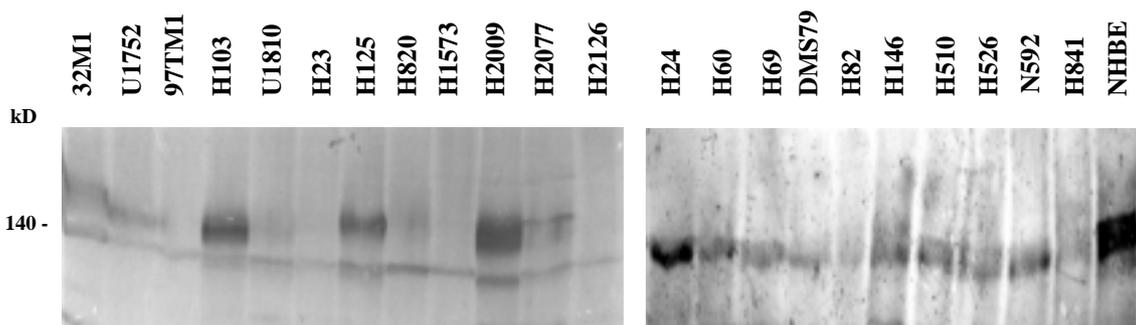


Abb. 7 Proteinnachweis der Axl-RTK durch Western-Blot-Analyse

Dargestellt sind die mit DAB entwickelten Western-Blots. 150µg Gesamtzellextrakt wurden in einem 5% SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose immobilisiert und mit gegen Axl gerichtetem, polyklonalem Antiserum in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Die Anordnung der Zelllinien erfolgte nach ihrem histologischen Ursprung. Die Synthese von Axl in NSCLC-Zelllinien ist links dargestellt, die von SCLC-Linien und NHBE Zellen rechts. Auch die Western-Blot-Analyse zeigte, daß Axl ausschließlich von Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs synthetisiert wird.

Proteinextrakte der nicht-kleinzelligen Linien zeigten spezifische Signale bei einem Molekulargewicht von 140kD, der Größe der Axl-RTK. Extrakte kleinzelliger Linien zeigten kein spezifisches Signal, NHBE-Zellen eine schwache Bande, was einen Hinweis auf ein geringes Vorhandensein von Axl auch in normaler Bronchialschleimhaut gibt.

Die Ergebnisse der Western-Blot bestätigen somit die Resultate der RT-PCR der Zelllinien. Auch die Menge nachgewiesenen Proteins korrelierte mit der Expressionsstärke der RNA.

3.2.5 Eine lösliche Axl-Form ist in konditionierten Zellkulturüberständen nachweisbar

Wie in der Literatur beschrieben (Costa et al., 1996), kann die Axl-RTK posttranslational proteolytisch gespalten werden. Dadurch wird der aminoternale, extrazelluläre Teil in den Extrazellularraum abgegeben.

Eine solche mögliche Prozessierung des Rezeptors in dieser modifizierten Form wurde durch Western-Blot Proteinnachweis in den Überständen der untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Für einen Nachweis der Sekretion dieses N-terminalen Restes des Axl-Rezeptors wurden die Proteine aus jeweils 10ml serumfreiem, eingefrorenem Kulturüberstand gefällt, anschließend präzipitiert und in einem möglichst kleinen Volumen wieder gelöst. Die Proteine wurden auf einem 7,5% SDS-Gel aufgetrennt und im Anschluß daran auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert.

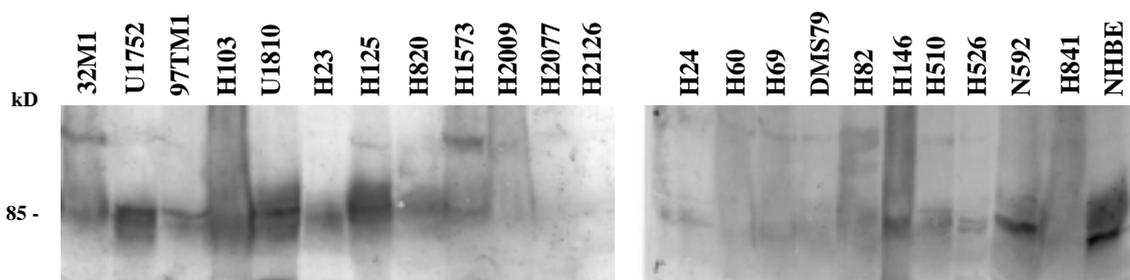


Abb. 8 Western-Blot Proteinnachweis einer löslichen Axl-Form in Kulturüberständen

Die posttranslationale Modifikation von Axl in NSCLC-Linien ist links dargestellt, die von SCLC-Linien und NHBE rechts. Dieser Nachweis einer abgespaltenen Extrazellulardomäne bestätigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen der Zellextrakte, bei denen zu erkennen war, daß Axl ausschließlich von NSCLC-Linien und NHBE synthetisiert wird und demonstriert gleichzeitig, daß bei diesen Zellen Axl auch in der modifizierten Form nachzuweisen ist. Die Zellen sind somit in der Lage, auf einem bis jetzt unbekanntem Weg die Extrazellulardomäne abzuspalten und somit in den Extrazellularraum abzugeben.

Der spezifische Nachweis der Axl-Extrazellulardomäne erfolgte durch Inkubation des Blots mit affinitätsgereinigtem, polyklonalem Kaninchen Anti-Axl Serum (1:100) und der Nachweis

der Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen Zweitantikörper, einem daran gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex und DAB als Farbsubstrat

Die Überstände der NSCLC-Linien zeigten eine spezifische Bande bei 85 kD. Dieses Molekulargewicht ist für die prozessierte lösliche Axl-Extrazellulardomäne beschrieben worden. In den Überständen der kleinzelligen Zelllinien war keine spezifische Bande detektierbar, NHBE Zellen zeigten wie NSCLC-Linien einen modifizierten Rezeptor. Diese Ergebnisse bestätigen das exklusive Vorkommen von Axl in NSCLC-Zelllinien und NHBE und deuten auf einen Mechanismus einer Rezeptordegradation durch posttranslationale Spaltung von Axl an der Zelloberfläche hin.

3.2.6 Der gemeinsame Ligand der Axl-Familie, Gas6, wird von nahezu allen Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert und sezerniert

Autokrine Stimulation spielt bei der Genese von Tumoren eine wichtige Rolle. Da die Expression von Rezeptoren der Axl-Familie in Lungentumorzellen nachgewiesen worden war, schloß sich ein Nachweis der Expression von Gas6 mit Hilfe der RT-PCR und ein Synthese- und Sekretionsnachweis durch einen Proteinnachweis im Western-Blot an.

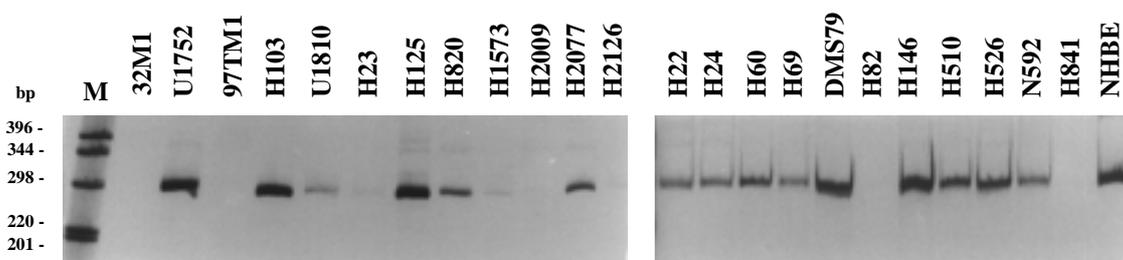


Abb. 9 Nachweis der Gas6-Genexpression in Lungentumorzelllinien

Abgebildet ist das Ergebnis der RT-PCR mit spezifischen Primern nach PAGE. Zelllinien sind sortiert nach ihrem histologischen Ursprung getrennt aufgetragen. Sowohl NSCLC-Zelllinien (links) wie auch SCLC –Linien (rechts) weisen eine starke Expression von Gas6-mRNA auf.

Für den Expressionsnachweis wurde RNA aus subkonfluent wachsenden Zellen isoliert und nach Quantifizierung revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte mit spezifisch gegen Gas6 gerichteten Primern. Dabei zeigte sich, das Gas6 in nahezu allen Zelllinien, unabhängig von ihrem histologischen Ursprung, exprimiert wird. Ebenso zeigten NHBE-Zellen eine starke Expression des Gas6 Gens, wie es von Manfioletti et al. für Lunge beschrieben ist.

Da Gas6 zugleich Ligand für die RTKs cMer, Tyro3 und Axl ist, ergibt sich damit für die meisten Zelllinien die Möglichkeit der autokrinen Stimulation mit Gas6, jedoch besitzen nur NSCLC-Linien die Möglichkeit der Autokrinie mit Axl und Gas6.

Da ein Ligand für einen transmembranösen Rezeptor nur dann an der extrazellulären Seite an diesen binden kann, wenn es aus den Zellen geschleust wird, sollte, im Falle einer autokrinen Stimulation, sezerniertes Gas6-Protein in aufgearbeiteten Zellkulturüberständen nachweisbar sein.

Dazu wurden subkonfluent wachsende Zellen für 4 Tage mit serumfreiem Medium inkubiert. Das konditionierte Medium wurde abgenommen, der Proteinanteil von 10ml dieses Überstandes gefällt, präzipitiert und in einem kleinen Volumen resuspendiert. Die gelösten Proteine wurden auf einem 10% SDS-PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer und Immobilisierung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte ein Nachweis des Gas6-Proteins mit polyklonalem Anti-Gas6-Antiserum, daß freundlicherweise von Claudio Schneider, Triest, zur Verfügung gestellt wurde. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und dem Farbstoff DAB nachgewiesen.

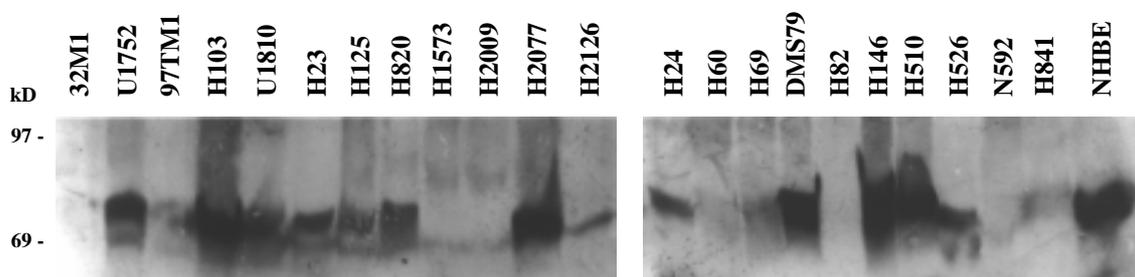


Abb. 10 Proteinnachweis von Gas6 in Zellkulturüberständen von Bronchialkarzinomzelllinien

Dargestellt ist die Western-Blot-Analyse von Gas6 unterschiedlicher Zelllinien. Proteine von 10ml serumfreien, vier Tage inkubierten Zellkulturüberstands wurden gefällt und auf einem 10% SDS-PAA-Gel auf getrennt. Nach Immobilisierung auf einer Nitrocellulosemembran erfolgte ein spezifischer Proteinnachweis mit polyklonalem Antiserum in einer Verdünnung von 1:200.

Wie schon die RT-PCR-Ergebnisse vermuten ließen, wird Gas6 von nahezu allen Zelllinien synthetisiert und ins Medium sezerniert. Dabei sind die nachgewiesenen relativen Mengen an Protein mit denen detektierter mRNA vergleichbar.

3.2.7 Protein S, ein Ligand für Tyro3, wird in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert und als gerinnungsaktives Protein sezerniert

Für die Axl-ähnliche Kinase Tyro3 wurde neben Gas6 ein weiterer Ligand, das aus der Gerinnungskaskade bekannte Protein S, beschrieben (Stitt et al., 1995). Protein S ist, ebenso wie Gas6, ein Vitamin K-abhängiges Protein. Vitamin K, das für die Blutgerinnung notwendig ist, wirkt an der Carboxylierung von Glutamatresten zu γ -Carboxyglutamat mit. Carboxylierte Glutamate bilden Stellen mit hoher Affinität für Ca^{2+} , und sind damit in der Lage, Proteine an Phospholipidmembranen zu verankern.

Um die Expression von Protein S in Bronchialkarzinomzelllinien zu untersuchen, erfolgte ein Genexpressionsnachweis mit RT-PCR und ein Proteinnachweis mit Western-Blot.

Für den Nachweis der Genexpression wurde die aus subkonfluent wachsenden Zellen isolierte RNA nach Quantifizierung revers transkribiert und mit der gewonnenen cDNA eine RT-PCR mit spezifischen Primern gegen Protein S durchgeführt. Nach Auftrennung der PCR-Fragmente in einer PAGE und Autoradiographie zeigte sich, daß das Protein S-Gen in allen 22 untersuchten (12 NSCLC; 10 SCLC) Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert wird.

Eine Expression des gerinnungshemmenden Protein S in Lungentumoren war bis dahin nicht bekannt. Dadurch ergibt sich somit die Möglichkeit, daß die RTK Tyro3 nicht nur durch Gas6 autokrin stimuliert werden kann, sondern auch durch Bindung von Protein S eine Wirkung auf Zellen ausübt. Da über die biologische Funktion von Tyro3 nur sehr wenig bekannt ist, ist eine unterschiedliche Funktion der Kinase durch Bindung verschiedener Liganden nicht auszuschließen.

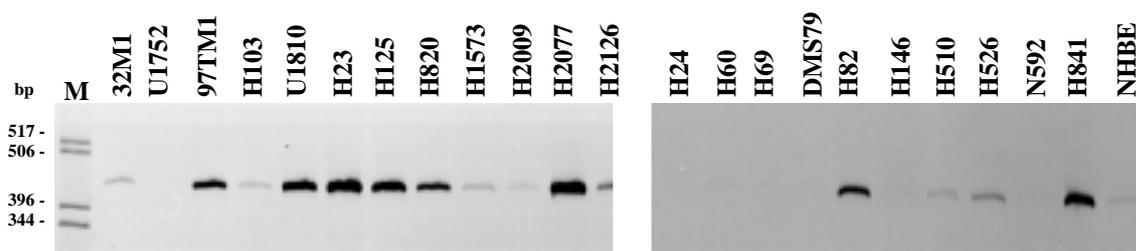


Abb. 11 RT-PCR Nachweis der Protein S Genexpression

Gezeigt ist die Autoradiographie der semiquantitativen gegen Protein S gerichteten RT-PCR Analyse. Eine Expression des Protein S-Gens kann in allen Zelllinien, unabhängig von ihrer Histologie (links: NSCLC; rechts: SCLC) nachgewiesen werden, wobei kleinzellige Zelllinien weniger Protein S im Vergleich mit nicht-kleinzelligen exprimieren. Auch NHBE Zellen zeigen eine schwache Protein S-Expression.

Die antikoagulatorische Wirkung und das Binden an einen Rezeptor von Protein S ist nur dann möglich, wenn es aus den Zellen ins Interstitium abgegeben wird. Es erfolgte deshalb ein Nachweis von Protein S in Zellkulturüberständen.

Hierzu wurden Proteine aus serumfreien, 4 Tage inkubierten Zellkulturüberständen gefällt und in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach Transferierung auf eine

Nitrocellulosemembran erfolgte der spezifische Proteinnachweis mit Hilfe eines gegen Protein S gerichteten polyklonalen Kaninchen-Anti-Protein S Antiserums, das freundlicherweise von Dr. Michael Kraus (Behring diagnostics, Marburg) zur Verfügung gestellt wurde.

Es konnte in vielen Überständen eine 70kD große, dem Molekulargewicht von Protein S entsprechende Bande detektiert werden. Protein S wird von Lungenkarzinomzellen und normalen Bronchialepithelzellen exprimiert, synthetisiert und sezerniert. Damit ließen sich in den meisten Fällen die RT-PCR Ergebnisse bestätigen. Einzuschränken sind jedoch die kleinzelligen Zelllinien, da diese im Unterschied trotz nachgewiesener mRNA, mit Ausnahme der Zelllinie NCI-H841, nur sehr geringe Mengen an Protein S in den Überstand abgeben. Protein S konnte nahezu ausschließlich in Überständen von NSCLC-Linien nachgewiesen werden.

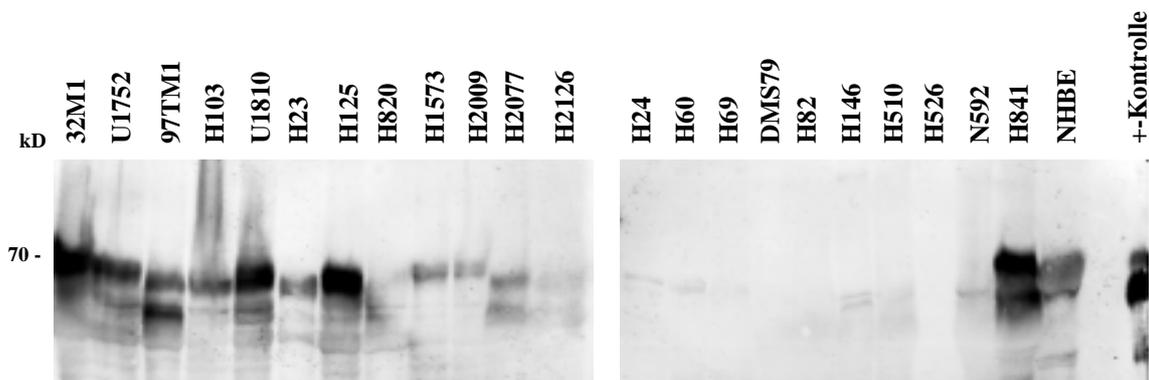


Abb. 12 Proteinnachweis von Protein S in Zellkulturüberständen von Bronchialkarzinomzelllinien

Gezeigt ist ein mit DAB entwickelter Western-Blot. Die Zelllinien sind nach ihrem histologischen Subtyp sortiert aufgetragen, links Proteine aus Überständen von NSCLC-Linien, rechts solche von SCLC-Linien. Es wurden jeweils die gefällten Proteine aus 5ml serumfreiem Zellkulturüberstand auf einen 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem gegen Protein S gerichteten polyklonalen Antiserum, das 1:250 verdünnt wurde, nachgewiesen. Eine spezifische Bande konnte bei 70kD detektiert werden, dem Molekulargewicht von Protein S.

3.2.7.1 Das im Zellkulturüberstand nachgewiesene Protein S besitzt antikoagulatorische Aktivität

Protein S fungiert neben seiner Rolle als Ligand für die RTK Tyro3, physiologisch als Co-Faktor für aktiviertes Protein C in der Gerinnungskaskade. Dort werden die Faktoren Va und VIIIa durch diese Proteine degradiert.

Um eine mögliche antikoagulatorische Wirkung des Protein S in Zellkulturüberständen zu demonstrieren, wurden die Zellkulturüberstände zweier Zelllinien speziell aufgearbeitet und einem funktionellen Protein S Test zugeführt (modifizierte aPTT-Reaktion). Konfluent wachsende Zellen wurden dazu für vier Tage mit serumfreiem Medium inkubiert, dieses Medium abgenommen und durch Zentrifugation noch evtl. vorhandene Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde, um den den Aktivitätstest beeinflussenden *tissue factor*, ein stark glykosyliertes und stark vernetztes Protein, abzutrennen, durch ein Centriprep-Separator mit einem *cut-off* von 500 kD filtriert. Der durch Glykosylbrücken vernetzte *tissue factor* kann die Membran des Separators nicht passieren und bleibt im Konzentrat zurück. Das Filtrat wurde dann in Centipreps mit einem *cut-off* von 30kD zehnfach ankonzentriert.

Bevor die Überstände in einem Clotting-Test eingesetzt wurden, erfolgte ein Nachweis des Proteins im Western-Blot. Dabei zeigte sich, daß sich im Konzentrat des Centripreps der Firma Amicon große Mengen von Protein S befanden, wohingegen bei den Konzentratoren der Firma Pall zuviel Protein bei der Aufreinigung verloren ging, so daß ausschließlich aufgereinigte Überstände, die mit den Konzentratoren der Firma Amicon gewonnen wurden für den Aktivitätsnachweis verwendet wurden.

Die aufgereinigten und ankonzentrierten Zellkulturüberstände wurden in einem routinemäßig durchgeführten Protein S Clotting-Test, einem funktionellen und hochspezifischen Aktivitätsnachweises dieses Proteins, eingesetzt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf einer durch Protein S gesteigerten antikoagulatorischen Wirkung des aktivierten Protein C, durch die eine Verlängerung der Gerinnungszeit verursacht wird. In diesem Test wird zur Steuerung der aPTT-Reaktion ein Protein S Mangelplasma eingesetzt, so daß die gemessene Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit allein von exogen zugefügten Protein S abhängig ist. Das zu untersuchende Material wird dabei einem System zugesetzt, das mit Faktor Va, einem physiologischen Substrat des aktivierten Protein C, angereichert ist. Zur Standardisierung der Reaktionszeit wird einem Protein S Mangelplasma aktiviertes Protein C und Faktor Va zugesetzt und eine Bezugskurve mit Thrombokalibrator-Plasma erstellt. Die Gerinnungszeit dieses Kalibrators wird gemessen und als 100% Aktivität

bestimmt, die Zeit ohne Kalibratorzugabe dient als Leerwert (0-Wert). Die Protein S Aktivität wird in Prozent der Norm angegeben.

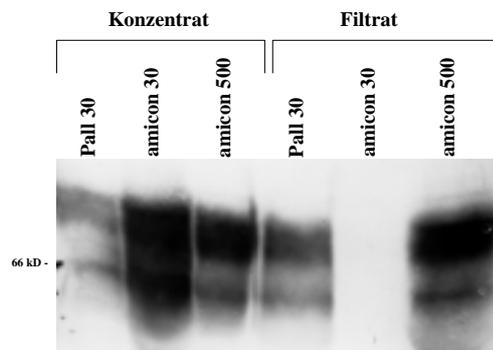


Abb. 13 Nachweis von Protein S in Filtraten und Konzentraten verschiedener Centripreps unterschiedlicher Firmen

Eine sehr geringe Menge (20µl) Flüssigkeit wurde den jeweiligen aufgereinigten Proben entnommen und auf einem 7,5% SDS-PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetragen. Der Nachweis von Protein S auf Nitrocellulosemembran erfolgte mit einem 1:500 verdünnten spezifischen polyklonalen Antiserum (Western-Blot). Die beiden ersten Spuren mit den Konzentraten der 30 kD *cut-off* Konzentratoren sollten das gesuchte Protein S enthalten.

Während dies hoch konzentriert in dem Konzentrat der Säule der Firma Amicon der Fall ist, ist deutlich weniger Protein in dem Konzentrat der Säulen der Firma Pall zu finden. Ebenso ist deutlich zu sehen, daß im Filtrat der Säule der Firma Pall mit einem *cut-off* von 30 kD reichlich Protein S vorhanden ist, obwohl Protein S ein Molekulargewicht von 70 kD hat, während ein Proteinnachweis im Filtrat der 30 kD *cut-off* Säule der Firma Amicon nicht möglich ist. Für einen spezifischen Protein-Aktivitätstest wurden ausschließlich die vorbehandelten Konzentrate der 30 kD *cut-off* Säulen der Firma Amicon verwendet.

Zur Normierung der zu bestimmenden Proben wird die Gerinnungszeit gemessen und mit den kalibrierten Werten verglichen. Ergeben sich dabei Werte, die über der maximalen Gerinnungszeit, also über 100% liegen, ist durch die Probe die Gerinnung weiter verzögert, die Probe gerinnt langsamer als die Thrombokalibrator-Plasmakontrolle. Werte unter 100% gelten als erniedrigt, die Probe gerinnt schneller als die Kalibratorkontrolle. Werte von unter 20% werden als negativ angesehen, das heißt, die Probe enthält kein aktives Protein S.

Beim Einsatz der konzentrierten Zellkulturüberstände zeigte sich, daß das dort vorhandene Protein S in der Lage ist, die Gerinnungszeit des aPTT-Test deutlich zu verzögern. Protein S wird somit von Lungenkarzinomzelllinien synthetisiert und in funktionsfähiger, prozessierter Form in den Überstand abgegeben.

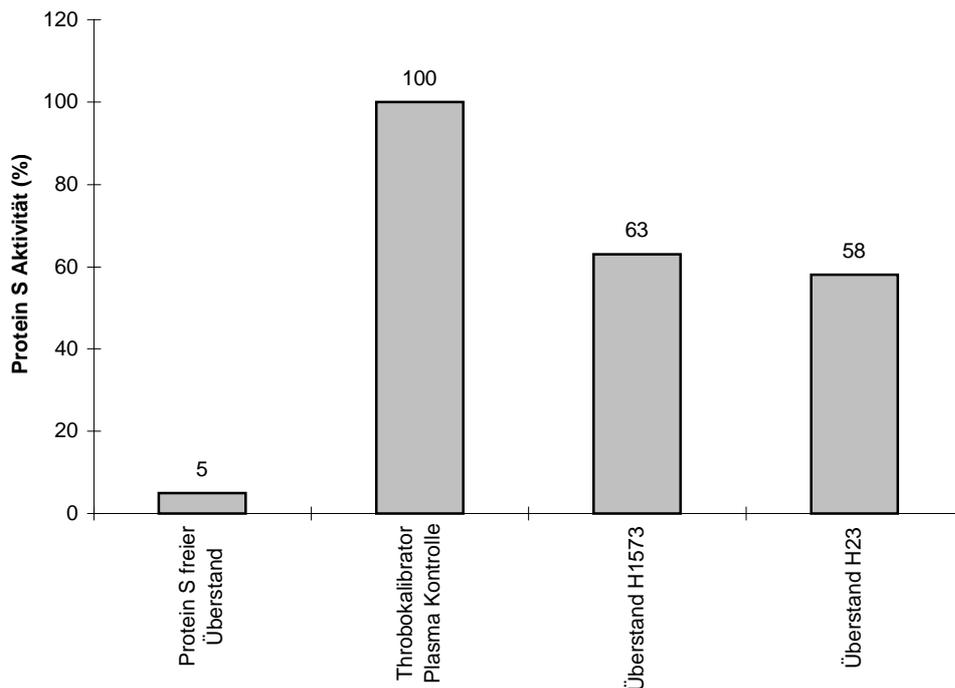


Abb. 14 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Protein S Clotting-Tests

Dargestellt ist die Gerinnungsaktivitäten eines Protein S-freien Überstandes, einem Protein S Standard und von zwei speziell aufgereinigten und ankonzentrierten Zellkulturüberständen. Beide Zellkulturüberstände enthalten aktives Protein S in einer den Gerinnungstest beeinflussenden Menge bzw. Aktivität.

Die antikoagulatorische Aktivität des Protein S aus Zellkulturüberständen ist durchaus vergleichbar mit Normalwerten aus Serum, für die der Hersteller des Tests einen vorläufigen Normalbereich von 65% bis 140% angibt. Eine Quantifizierung ist jedoch an Hand dieses Tests nicht möglich.

3.2.7.2 Protein S hat keinen mitogenen Effekt auf Zelllinien

Neben der antikoagulatorischen Wirkung von Protein S wurde auch ein mitogener Effekt auf verschiedene Zelltypen, so z. B. glatte Muskelzellen, berichtet (Gasic et al., 1992). Um einen solchen Effekt auf Bronchialkarzinomzelllinien nachzuweisen, wurden drei nicht-kleinzellige Linien, EPLC-32M1 (Tyro3 +, Protein S +), 97TM1 (Tyro3 ++, Protein S -) und NIH-H125 (Tyro3 ++, Protein S ++), in definierter Zellzahl ausgesät, für drei Tage gehungert und anschließend mit 10 µg/ml Protein S (physiologische Konzentration) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Zellzahl wurde über drei Wochen ermittelt. Es konnte keine signifikante Änderung im Proliferationsverhalten der drei beobachteten Zelllinien mit und ohne Protein S im Medium gezeigt werden.

3.2.7.3 Protein S ist *in situ* in Lungentumoren nachweisbar

Da eine Expression von Protein S in der Lunge bisher nur in *in situ*-Hybridisierungen an Kaninchenlunge (Dahlbäck et al.), nicht aber in humaner Lunge und Lungentumoren gezeigt wurde, erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie ein Nachweis an Tumorschnitten. Dazu wurden Schnitte von 21 Tumoren (6 ADC, 14 SCC, 1 BAC) mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum gegen Protein S inkubiert. Ein spezifischer Nachweis erfolgte mit einem Sekundärantikörper und AEC als Farbstoff.

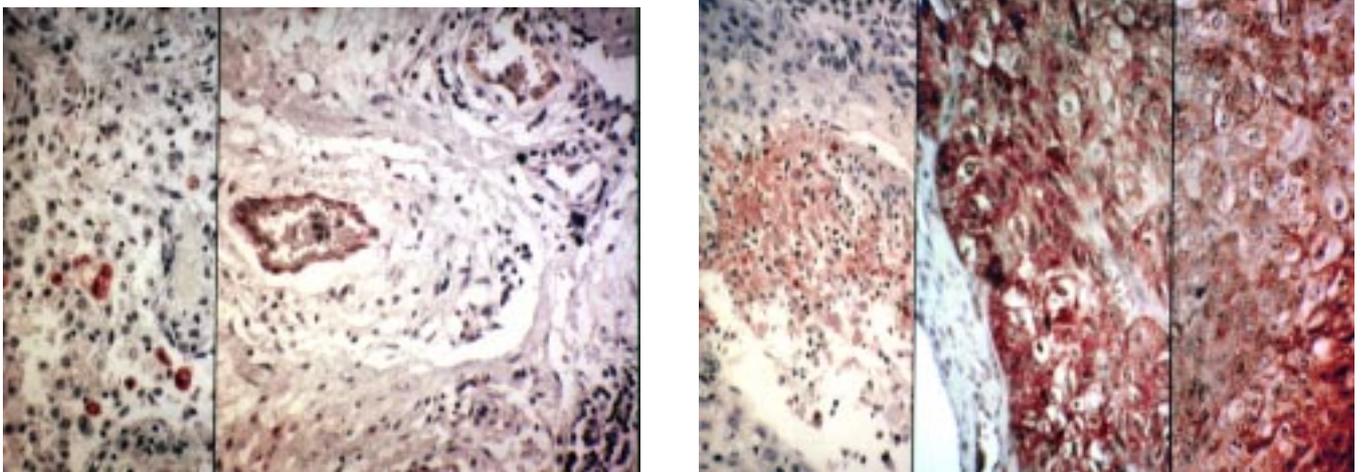


Abb. 15 Photographien der an Lungentumorgewebe durchgeführten Immunhistochemien

Alveolarmakrophagen und Blutgefäße reagierten mit dem Anti-Protein S Antiserum. Tumorschnitte zeigten eine Antigenreaktion in der Nähe nekrotischer Areale und eine starke Reaktion an der Gewebegrenze zum Umgebungsgewebe. Die Detektion spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und AEC als Farbsubstrat. Zellkerne wurden mit 10% Hämatoxylin gegengefärbt. Die Vergrößerung ist 40fach.

Die Auswertung zeigte, daß etwa 50% aller Lungentumoren, da sie deutlich mit spezifischen Protein S-Antikörpern reagierten, Protein S synthetisierten, unabhängig von ihrem Histiotyp. Besonders auffällig war, daß starke Antikörperfärbungen gegen Protein S häufig in Tumoringeln konzentriert und in der Nähe nekrotischer Regionen gefunden wurde. Eine starke Antigenfärbung wurde vor allem in den Plattenepithelkarzinomen beobachtet, wo es in von Bindegewebe umschlossenen Tumoringeln nachgewiesen wurde. In den Adenokarzinomen war die Färbung auf Foci einzelner Zellen beschränkt. Protein S wurde aber auch in normalen Bronchialepithel, Alveolarmakrophagen und Endothelzellen der Blutgefäße nachgewiesen; Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Dahlbäck et al. Die mikroskopische Auswertung der Färbungen ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tumorart	positive Befunde	% Anteil positiver Tumoren
Plattenepithelkarzinom	10/14	71,5
Adenokarzinom	3/6	50
Bronchioalveolarkarzinom	1/1	100

Tab. 9 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

3.2.8 Einfluß der Axl-RTK auf humane Bronchialkarzinomzelllinien

Da Axl in Lunge vorwiegend histiotypisch exprimiert wird, seine Funktion bezüglich eines Einflusses auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen aber nicht bekannt ist, wurden unterschiedliche Linien mit einem Plasmid, das zur Expression der Axl-Kinase führt, transfiziert. Ziel dieser Versuche war es, den biologischen Einfluß von Axl auf die Differenzierung (Morphologie) der Zellen zu untersuchen und eine möglicherweise mitogene Wirkung (Proliferation) nachzuweisen. Für die Transfektionsexperimente wurden Zelllinien nach Kriterien ihrer Rezeptorexpression ausgewählt und mit unterschiedlichen Vektoren transfiziert. Eine Auswahl der Zelllinien erfolgte hinsichtlich der endogenen Expression von Axl und des EGF-Rezeptor, beide Rezeptoren wurden von den gewählten Linien nicht exprimiert (negativer RT-PCR Nachweis).

Da nur eine untersuchte NSCLC-Linie EGF-Rezeptor negativ war, die endogen Gas6 exprimierte, mußte hier auf die Transfektion einer Gas6 negativen Linien verzichtet werden. Allerdings war es möglich, sich hinsichtlich ihrer Gas6 Expression unterscheidende SCLC-Linien zu transfizieren und so einen Effekt von endogenem Gas6 auf die eingebrachte Axl-Kinase zu unterscheiden.

Als Kontrolle wurde bei den Transfektionen ein Plasmid eingesetzt, das kein Insert enthielt (pCMV neoleer; Leervektor), um eine Beeinflussung des Plasmids oder der Transfektion selbst auszuschließen. Zum Nachweis einer möglichen Rolle Axls in der Differenzierung von Zellen wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das als Insert das gesamte Gen der Wildtyp-Axl-RTK unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielt. Da gereinigtes Gas6 nicht zur Verfügung stand und somit die Wildtyp-Axl-Kinase nicht direkt stimuliert werden konnte, wurde die Zelllinien zusätzlich mit einem Plasmid, das ein Chimärkonstrukt aus dem extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors und des Transmembrananteils und der Kinasedomäne des Axl-Rezeptors war, transfiziert. Ein solches Chimärkonstrukt läßt sich mit Hilfe von EGF als Liganden stimulieren und der Einfluß der Kinase auf die Signaltransduktion und ein eventuell verändertes Wachstumsverhalten kann so beobachtet werden. Diese Plasmide

wurden freundlicherweise von Dr. H.W.G. Janssen, Ulm, zur Verfügung gestellt. Ein Nachweis der Phosphorylierbarkeit beider exprimierter Rezeptoren ist von Braunger et al., 1998, erbracht worden. Es wurden Linien mit allen Konstrukten transfiziert und etabliert. Zellen, die mit diesen Konstrukten transfiziert wurden, wurden im Folgenden mit ihrer Nummer und folgendem Zusatz bezeichnet:

Expressionskonstrukt	neue Bezeichnung der Zelllinien nach Transfektion
pCMV-neoAXL	NCI-Nummer A
pCMV-neoEGFR/AXL	NCI-Nummer EA
pCMV-neoleer	NCI-Nummer LV

Da die Zellen, die mit den Plasmiden transfiziert werden sollten, sowohl nicht den Axl-Rezeptor wie auch keinesfalls den EGF-Rezeptor exprimieren sollten, wurden hierfür die Zelllinien NCI-H69, -H82 (SCLC) und -H2077 (NSCLC) gewählt.

Diese Linien wurden mit den Plasmiden transfiziert, selektioniert und polyklonal etabliert. Um zu gewährleisten, daß das transfizierte Gen in ausreichender Menge exprimiert wird, bzw. daß das Leerkonstrukt keinen Einfluß auf die Zellen nimmt, wurde mRNA aus transfizierten Zellen extrahiert, revers transkribiert und mit Hilfe der RT-PCR getestet. Dazu wurden Primerpaare gewählt, die einmal den C-terminalen Bereich von Axl, die Kinasedomäne erkennen (PJA2 und PJA3), und weiterhin ein Primerpaar, das den N-Terminus, den extrazellulären Bereich von Axl (PJA 11 und PJA12) erkennt.

3.2.8.1 Die Axl-Kinase hat keinen direkten Einfluß auf die Morphologie transfizierter Zelllinien

Unmittelbar nach Transfektion und auch nach Selektion von transfizierten Zellen ließ sich eine direkte Veränderung hinsichtlich ihrer Morphologie, in Bezug auf ihr Wachstum als Suspensionszellen bzw. adhärenente Zellen, nicht nachweisen. Alle mit dem Leervektor, dem Wildtyp-Konstrukt oder mit dem Chimärkonstrukt transfizierten Zellen zeigten keine Unterschiede im Phänotyp auf. Daher kann ein entscheidender Einfluß von Axl auf die morphologische Differenzierung von Bronchialkarzinomzelllinien nicht belegt werden.

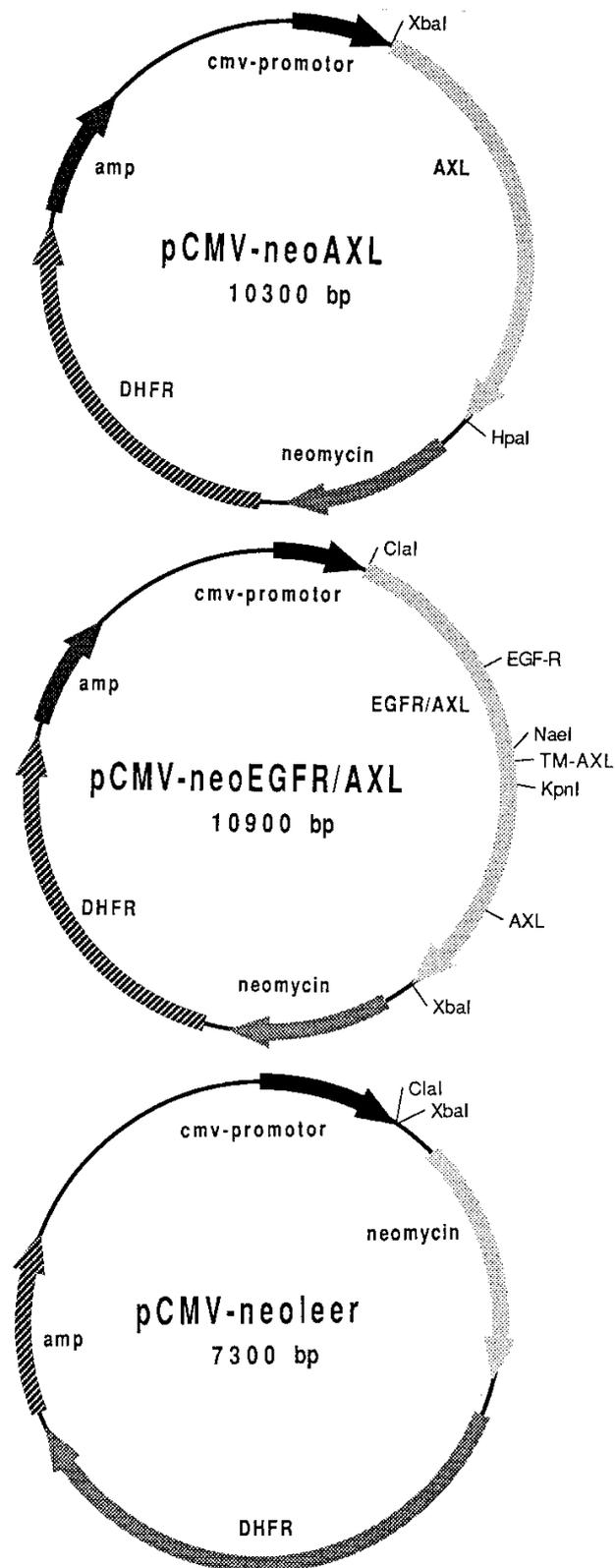


Abb. 16 Expressionskonstrukte der Axl Rezeptortyrosinkinase und das EGF-R/Axl-Rezeptorchimärs und des Vektors ohne Expressionskonstrukt (Leervektor)

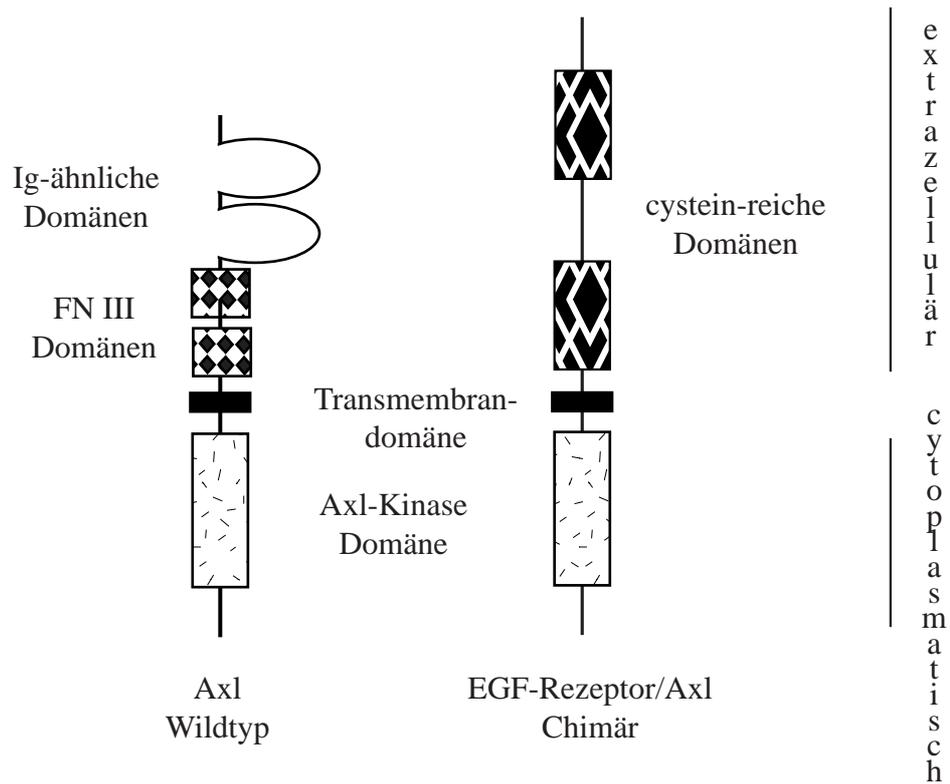


Abb. 17 Aufbau der Rezeptortyrosinkinase Axl und des EGF-Rezeptor-Axl-Kinase-Chimärs zur Untersuchung der biologischen Funktion von Axl

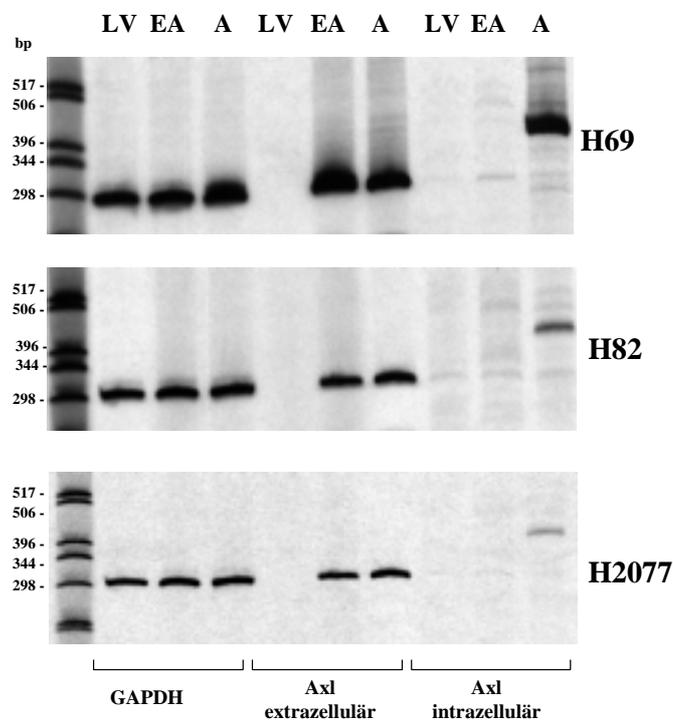


Abb. 18 Autoradiographie der PCR-Resultate transfizierter Zelllinien

In den Zelllinien, die mit dem Leerkonstrukt (pCMV-neoleer) transfiziert wurden, konnte auch nach Transfektion und Selektion keine Axl-Expression nachgewiesen werden. Die Zellen, die mit dem Axl-Wildtyp

Expressionskonstrukt (pCMV-neoAXL) transfiziert worden waren, waren Signale sowohl für den extrazellulären wie auch für den intrazellulären Bereich von Axl zu detektieren. Eine vollständige Expression des Axl-Gens konnte somit nachgewiesen werden. In den mit dem chimären Expressionskonstrukt (pCMV-neo EGFR/AXL) transfizierten Zellen ließ sich hingegen nur der intrazelluläre Axl-Anteil nachweisen, wie es zu erwarten war.

3.2.8.2 Unerwartete EGF-abhängige Wachstumsregulation von Axl-transfizierten Zelllinien

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Axl-Kinase auf das Proliferationsverhalten von Zellen, wurde die Teilungsraten unterschiedlich transfizierter Zellen (chimärer Rezeptor, Wildtyp- und Leervektor, mit und ohne EGF- Stimulation) in Wachstumskinetiken bestimmt. Die Leervektor transfizierten Zellen dienten dabei als Negativkontrolle. Aus dem Vergleich des Proliferationsverhaltens der verschiedenen Zelllinien und möglichen Unterschieden in ihrer Proliferation ließen sich Rückschlüsse auf eine Axl-Funktion ziehen.

Hierfür wurde jeweils eine definierte Anzahl Zellen ausgesät, für drei Tage serumfrei gehalten und anschließend ein Teil der Zellen mit 100ng/ml EGF stimuliert. Über die Dauer des jeweiligen Versuches wurde einmal wöchentlich frisches EGF zugesetzt. Eine Bestimmung der relativen Zellzahl erfolgte alle drei bzw. vier Tage mit einem Substratassay (Formazan).

	Absorption					
	H69 LV	H69 LV +EGF	H69 EA	H69 EA +EGF	H69 A	H69 A +EGF
Tage						
1	0,17	0,15	0,1	0,16	0,27	0,33
6	0,4	0,27	0,15	0,23	0,355	0,585
9	0,3	0,1	0,13	0,17	0,19	0,86
12	0,57	0,12	0,094	0,15	0,25	1,83
14	0,47	0,19	0,15	0,3	0,33	1,6
16	0,65	0,29	0,35	0,47	0,23	1,84
19	0,8	0,4	0,37	0,68	0,36	2,74
22	0,85	0,49	0,53	0,71		

Tab. 10 Auswertung der Proliferationskinetiken für die aus den H69 gezogenen Linien

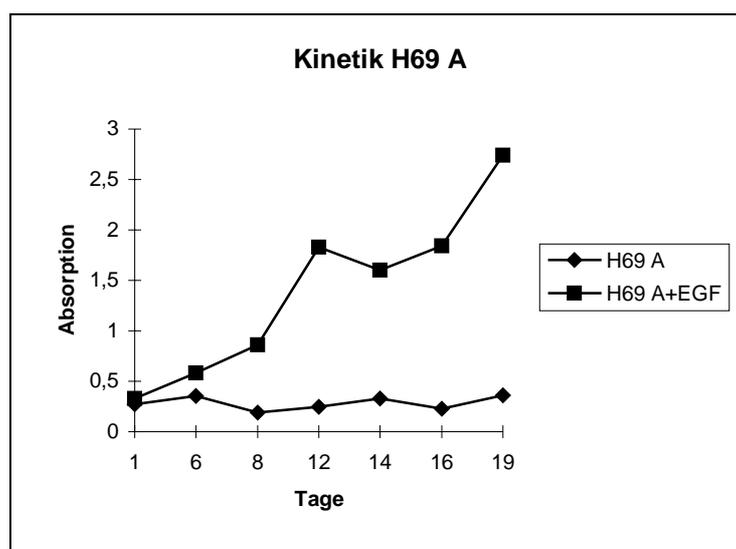
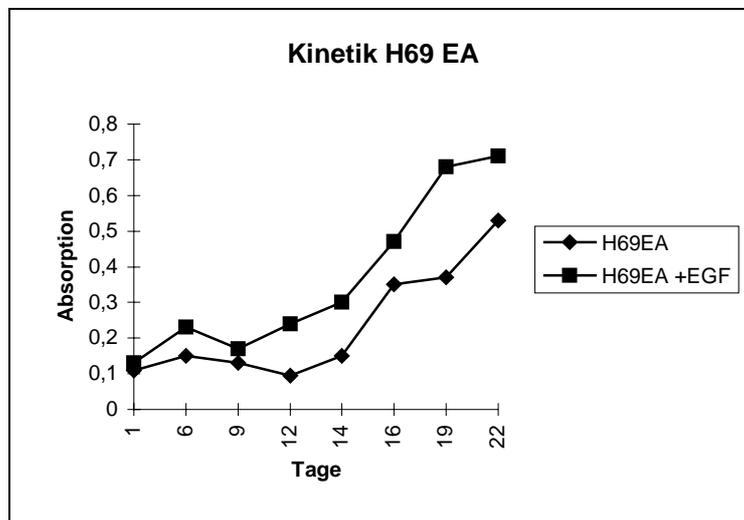
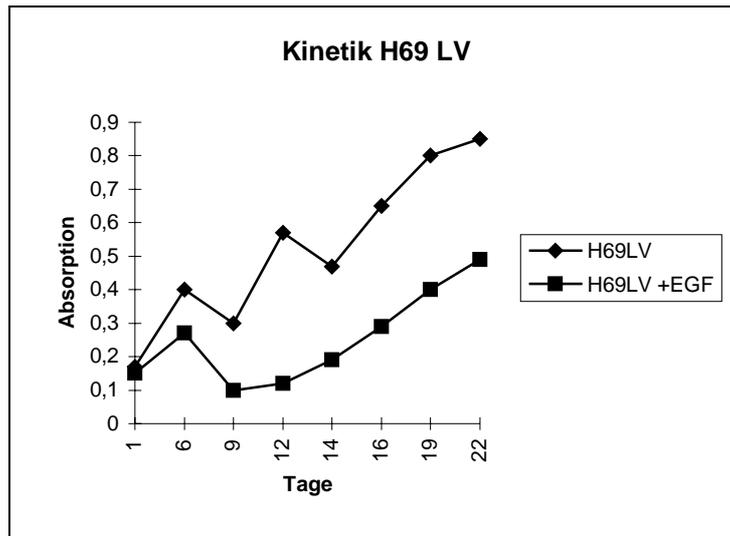


Abb. 19 Graphische Darstellung der Wachstumskinetiken der transfizierten H69 Zellen

Die gemessenen Absorptionen wurden gegen die Stimulationsdauer mit EGF aufgetragen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Y-Achsen!

	Absorption					
	H82 LV	H 82 LV +EGF	H82 EA	H82 EA +EGF	H82 A	H82 A +EGF
Tage						
1	0,24	0,25	0,15	0,2	0,295	0,35
6	0,37	0,32	0,32	0,35	0,3	0,51
9	0,27	0,145	0,24	0,24	0,155	0,48
12	0,59	0,27	0,35	0,35	0,31	0,61
15	0,71	0,49	0,58	0,73	0,61	1,38
19	1,1	0,6	0,65	0,95	0,735	1,53

Tab. 11 Auswertung der Proliferationskinetiken transfizierter H82 Linien

In der graphischen Auswertung der Proliferationskinetiken der kleinzelligen Linien NCI-H69 und -H82 wird deutlich, daß Zellen, die mit dem Leervektorkonstrukt transfiziert wurden, auch ohne EGF-Zugabe noch in der Lage sind, sich in deutlichem Maße zu teilen, was auf eine basale Proliferation schließen läßt. Diese Zellen scheinen jedoch nach Zugabe von EGF in ihrem Wachstum gehemmt. Da diese Zellen keinen EGF-Rezeptor besitzen, ist dieser Effekt nicht eindeutig zu erklären. Er könnte auf unspezifische Einflüsse zurückzuführen sein. Zellen, die mit dem Rezeptorchimär, dessen Stimulierbarkeit mit EGF durch Braunger et al., 1997, gezeigt wurde, transfiziert wurden, proliferieren ohne EGF-Stimulation kaum, im Vergleich dazu zeigen diese Zellen aber auch nur ein minimal beschleunigtes Wachstum nach Zugabe von EGF. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate dieser Zellen mit und ohne EGF.

Ebenfalls wachsen Axl-Wildtyp transfizierte Zellen ohne Zugabe von EGF nur minimal. Erstaunlicherweise proliferieren diese Zellen jedoch nach Zugabe von EGF. Dieser Effekt ließ sich in drei unabhängigen Experimenten bislang wiederholen. Da diese Zellen jedoch keinen EGF-Rezeptor besitzen, ist dieser Effekt unklar und erfordert weitere Untersuchungen. Eine Stimulation von Axl durch EGF kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

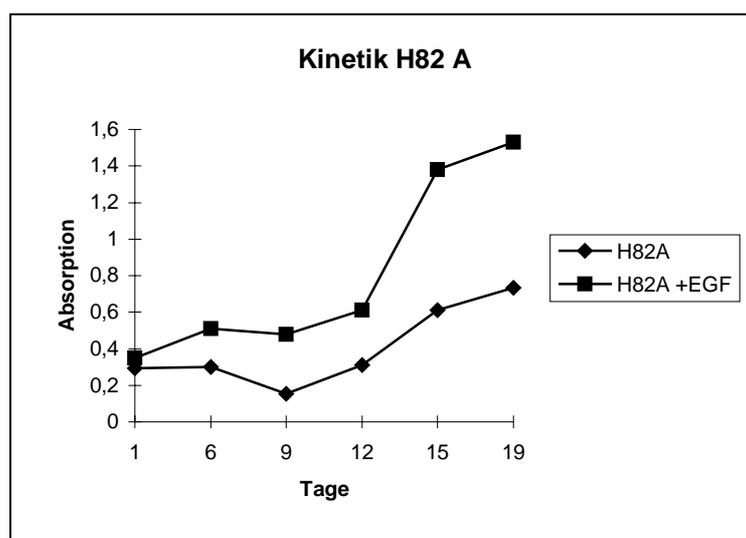
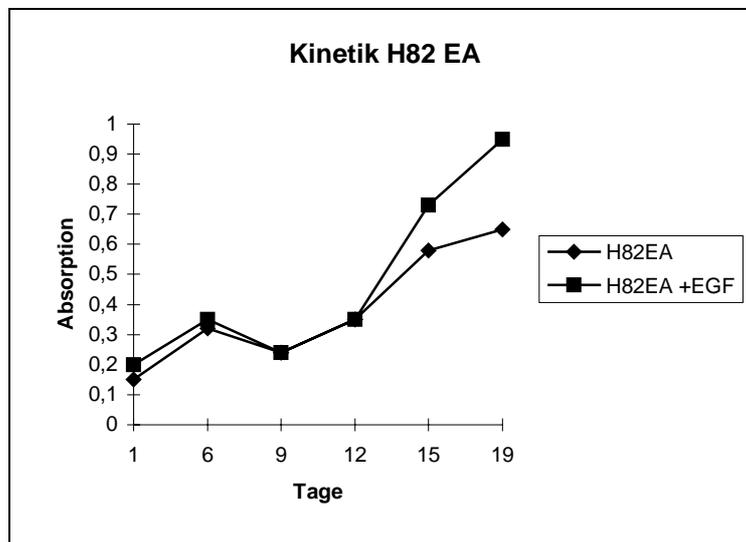
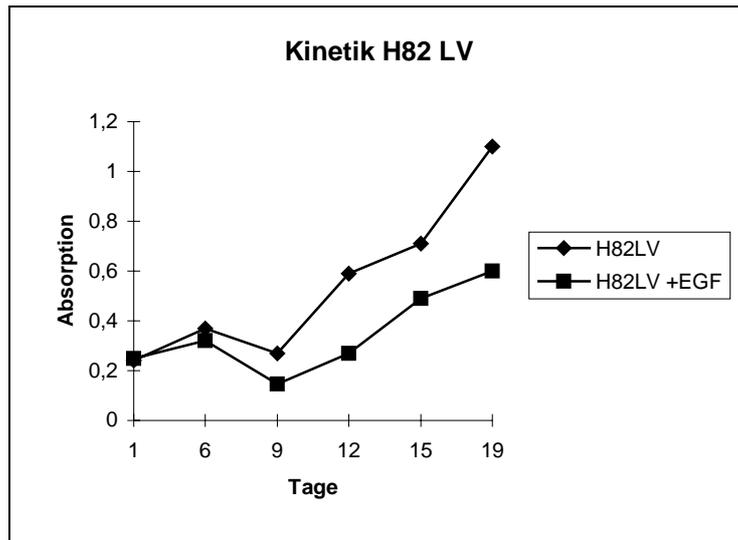


Abb. 20 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskinetiken der H82 transfizierten Zelllinien. Aufgetragen wurden die gemessenen Absorptionen gegen die Dauer der EGF-Stimulation. Zu Beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen!

	Absorption					
	H2077 LV	H 2077 LV +EGF	H2077 EA	H2077 EA +EGF	H2077 A	H2077 A +EGF
Tage						
1	0,35	0,4	0,05	0,1	0,03	0,2
3	0,69	0,84	0,44	0,44	0,41	0,55
5	1,76	0,97	0,73	0,82	0,72	1,14
7	3,97	3,33	2,9	2,7	2,08	3,75
9	4,01	2,33	3,53	2,57	3,63	4,15
11	3,81	1,42	3,83	2,65	3,64	3,71

Tab. 12 Auswertung der Proliferationskinetik der transfizierten H2077

Die Leervektor transfizierten NCI-H2077 Zellen zeigten mit und ohne Zugabe von EGF anfänglich ein nahezu identisches Wachstumsprofil. Während die unstimulierten Zellen dann ihr Wachstum deutlich verlangsamen, scheint die Zahl der EGF stimulierten Zellen abzunehmen.

Wie schon bei den kleinzelligen transfizierten Linien zeigen die mit dem chimären Konstrukt transfizierten Zellen zu Beginn der Kinetik keinen Proliferationsunterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen. Auch hier ist, wie schon bei den Leervektor transfizierten Zellen nach einigen Tagen eine weitere Zunahme der Zellzahl nicht zu beobachten, während unstimulierte ihre Teilungsraten zwar reduzieren, aber noch weiterwachsen.

Die Kinetik der Axl transfizierten Zellen hingegen ist an allen Tagen der Bestimmung nahezu identisch, ein Absinken der Zellzahl oder ein Wachstumsstopp der stimulierten Zellen ist nicht zu beobachten.

Damit konnte im Gegensatz zu transfizierten SCLC-Linien kein proliferationsfördernder Effekt durch EGF, weder in EGF-R/Axl- noch in Wildtyp-Axl-transfizierten Linien beobachtet werden. Ein proliferationsinduzierender Effekt von EGF kann dabei durch die sehr hohe basale Proliferation der Zellen auch nach Serumentzug überdeckt werden.

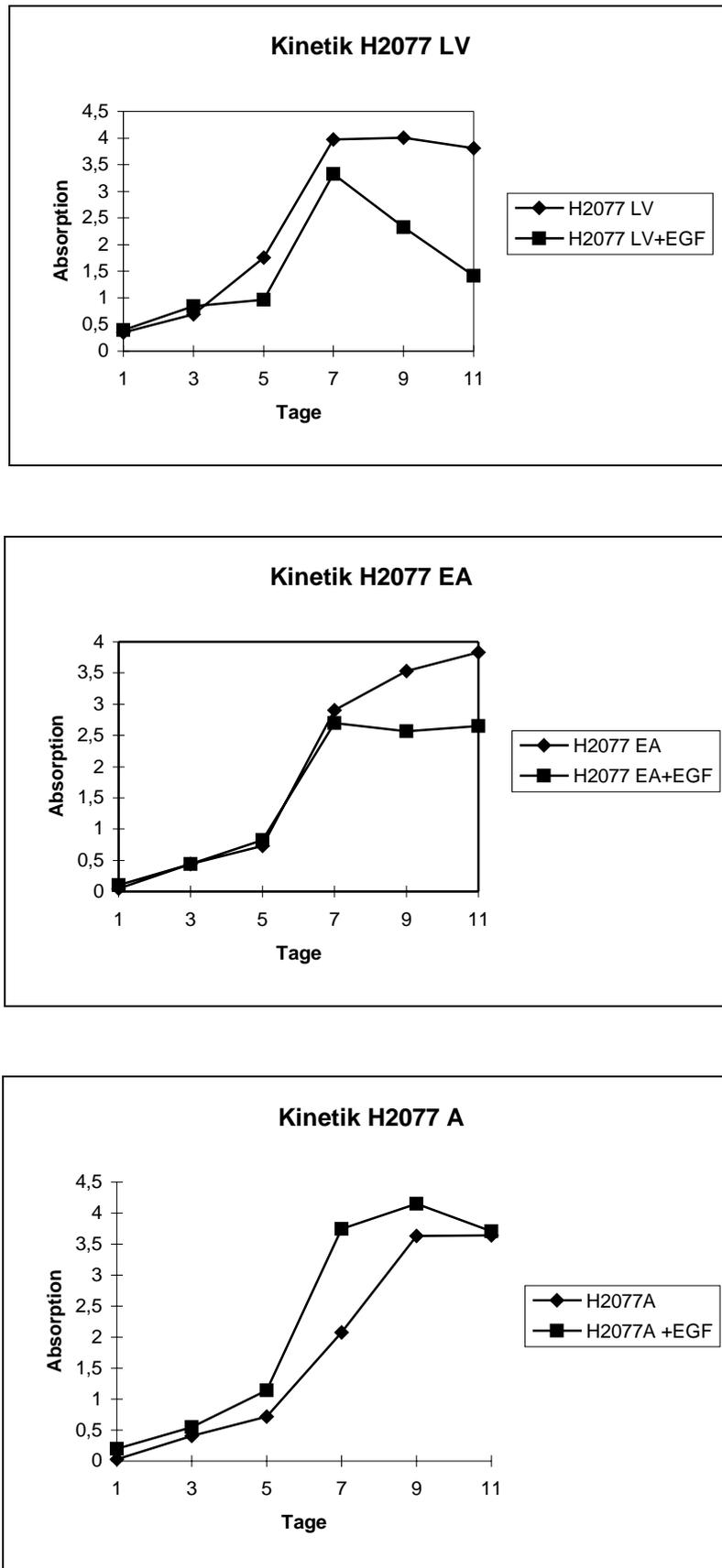


Abb. 21 Graphische Darstellung der Wachstumskinetik der transfizierten H2077 Zelllinien

3.2.8.3 Endogen exprimiertes Gas6 hat keinen Einfluß auf das Proliferationsverhalten Axl-transfizierter Zellen

Da Gas6 endogen von NCI-H69 und -H2077 sezerniert wird, konnte durch einen Vergleich von Leervektor-transfizierten Zellen mit Axl-Wildtyp-transfizierten Zellen (ohne Zugabe eines Stimulans und unter serumfreien Bedingungen) ein möglicher vorhandener Einfluß von Gas6 auf diese Zellen untersucht werden. NCI-H82 Zellen, die kein Gas6 sezernieren, dienten, in Hinblick auf die Spezifität eines Effekts, als Negativkontrolle.

Die graphische Darstellung der Wachstumskurven (Abb. 22) zeigt deutlich, daß die Gas6 sezernierenden Zelllinien H69 A und H2077 A keinerlei Proliferationsvorteil gegenüber der Gas6 negativen H82 A haben, verglichen mit den entsprechenden Leervektor-transfizierten Zelllinien.

Dies läßt den Schluß zu, daß Gas6 auf die Axl-transfizierten Zellen (NSCLC und SCLC) unter dem gewählten Versuchsbedingungen keinen positiven Einfluß auf die Proliferation der Zellen hat. Da in diesem Versuch nur ein Einfluß von endogenem Gas6 auf Axl untersucht werden konnte, ist es nicht ausgeschlossen, daß exogen zugesetztes Gas6 (in einer höheren Konzentration als das endogen vorhandene), eine Veränderung in der Proliferation der Zellen bewirkt.

3.2.8.4 Zusammenfassung bisheriger Befunde zur zellulären Funktion von Axl

Faßt man die Ergebnisse der Untersuchungen zur möglichen biologischen Funktion von Axl zusammen, so läßt sich weder ein direkter Einfluß von Axl auf die Art des Wachstums hinsichtlich Adhärenz, noch ein Einfluß auf die Proliferation in Gegenwart des als physiologisch beschriebenen Liganden Gas6 beobachten. Auch eine Wachstumsinduktion durch Aktivierung (über eine Ligandenbindung) eines chimären Rezeptorkonstrukt in entsprechend transfizierten Zellen ließ sich nicht beobachten. Somit vermittelt Axl weder Zell-Matrix-Kontakte im untersuchten System, mit oder ohne Ligand, noch wird die Teilungsrates durch die aktivierte Axl-Kinasedomäne mit beeinflusst.

Allerdings ließ sich ein proliferationsinduzierender Einfluß auf Axl-Wildtyp transfizierte Zellen beobachten, wurden diese mit EGF stimuliert. Ein solcher synergistischer Effekt von EGF und Axl wurde bisher nicht beobachtet, so daß es sich hierbei um ein mögliches neues Rezeptor-Ligandensystem mit proliferativer Funktion handeln könnte. Dies bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

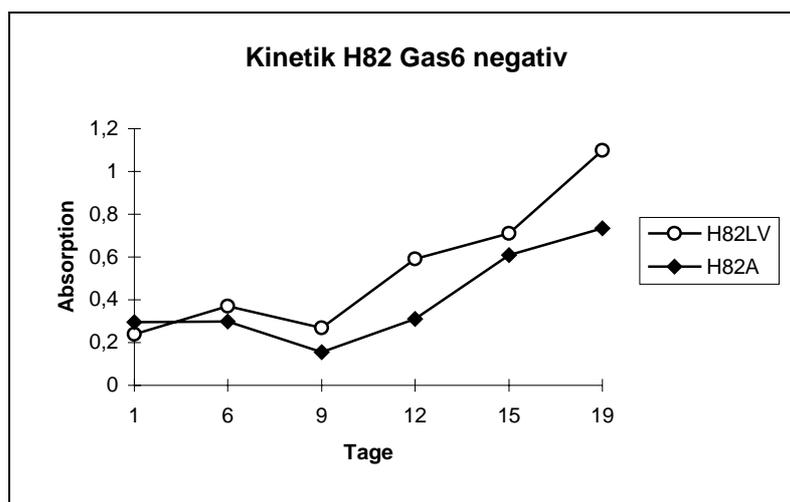
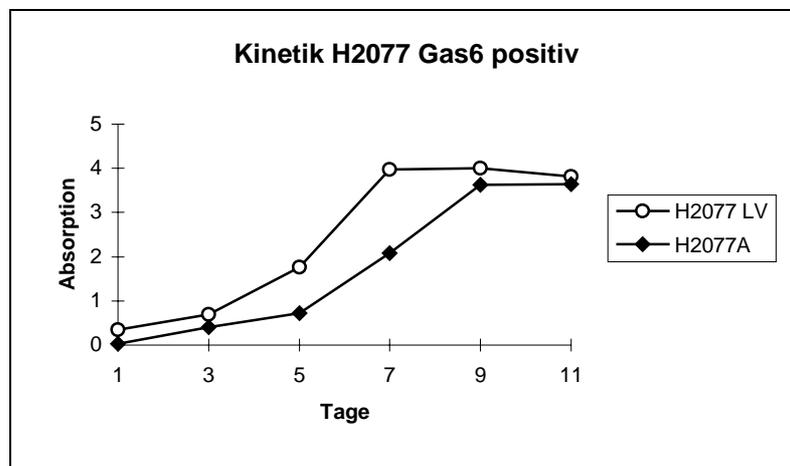
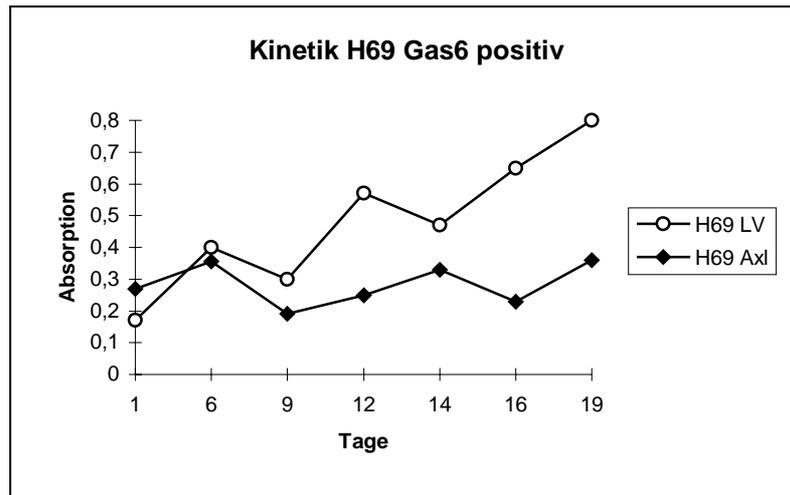


Abb. 22 Graphische Darstellung der Proliferation Wildtyp-Axl transfizierter Zellen gegen die Proliferation Leervektor transfizierter Zellen

3.3 Expression des CD44-Rezeptors in Bronchialkarzinomen

Der CD44-Rezeptor ist beim Menschen in vielen variablen Formen bekannt. Alle bekannten Varianten des CD44-Rezeptors entstehen durch Expression eines Gens und folgendem alternativem Spleißen.

Da einige Teile der variablen Region des CD44-Rezeptors, vor allem das Teilstück v6, in Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten von Zellen gebracht wurden, ergab sich die Fragestellung des Einflusses auf Zellen des Bronchialkarzinoms. Daher wurden zuerst Kulturzellen und später auch solide Tumoren auf auftretende Formen des Rezeptors untersucht.

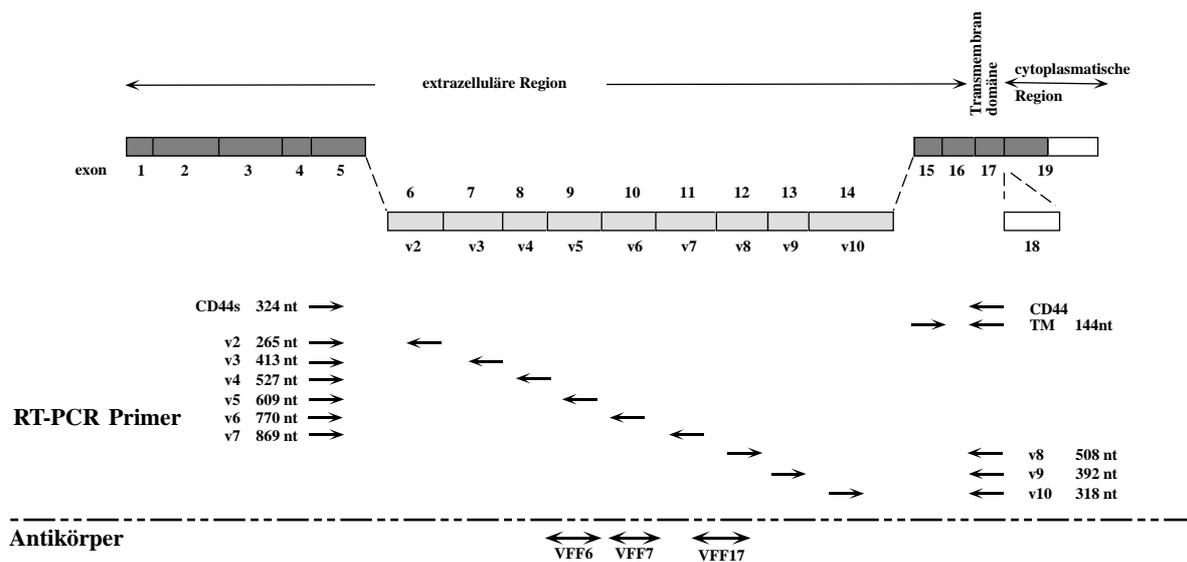


Abb. 23 Schematische Darstellung des CD44-Gens mit Lage der gewählten Primer zur RT-PCR Analyse. Gezeigt sind die konstanten und variablen Exons des humanen CD44 Transkripts. Darunter ist die Lokalisierung der für die RT-PCR eingesetzten Primer wiedergegeben, um mögliche eingespleißte Exons ebenso wie die Transmembrandomäne zu amplifizieren. Die Pfeile zeigen die Richtung der DNA-Synthese der einzelnen Primer an. Die Größe der mit den unterschiedlichen Primern zu erwartenden Transkripte ist daneben angegeben.

3.3.1 Der CD44-Rezeptor wird in Bronchialkarzinomzelllinien exprimiert

Um die Expression des CD44-Rezeptors und seiner Varianten in Zelllinien aus Lungentumoren zu analysieren, wurde zunächst RNA aus subkonfluent wachsenden Linien isoliert, revers transkribiert und die so erhaltene cDNA für die PCR-Untersuchung eingesetzt. Zur Expressionsanalyse wurden Primer ausgewählt, die den in jeder Isoform enthaltenen konservierten Bereich, wie in Abb. 23 dargestellt, abdeckten. Diese ließen sich mit spezifisch gegen einzelne variable Exons gerichteten Primern kombinieren, so daß eine Detektion immer von dem untersuchten Exon bis in die konservierte Domäne stattfand. Dieses Verfahren

ermöglichte einen Exon-spezifische RT-PCR-Nachweis. Die Expression des CD44-Gens mit seinen variablen Exons konnte vollständig untersucht werden.

Teilweise zeigte sich, daß mehrere PCR-Produkte unterschiedlicher Länge mit dem selben Primerpaar in einem Reaktionsansatz auftraten. Die detektierten multiplen PCR-Fragmente deuten darauf hin, daß das nachgewiesene Exon in mehreren unterschiedlichen CD44-mRNAs präsent war. Dies ist aufgrund der vielen möglichen, durch den Spleißvorgang bedingten Kombinationen und der Art der gewählten Primer denkbar, da teilweise die Amplifikation des DNA-Fragmentes über mehrere variable Exons erfolgte.

Auch die Menge an transkribierter CD44 mRNA variierte zwischen einzelnen Linien. So zeigten vor allem SCLC- und Adenokarzinomzelllinien teilweise nur eine sehr schwache Amplifikationsbande. In drei Linien (1 NSCLC, 2 SCLC) ließ sich keine cDNA für ein CD44 Transkript nachweisen. Auffällig war, daß das Exon v5 ausschließlich von NSCLC-Linien exprimiert wurde.

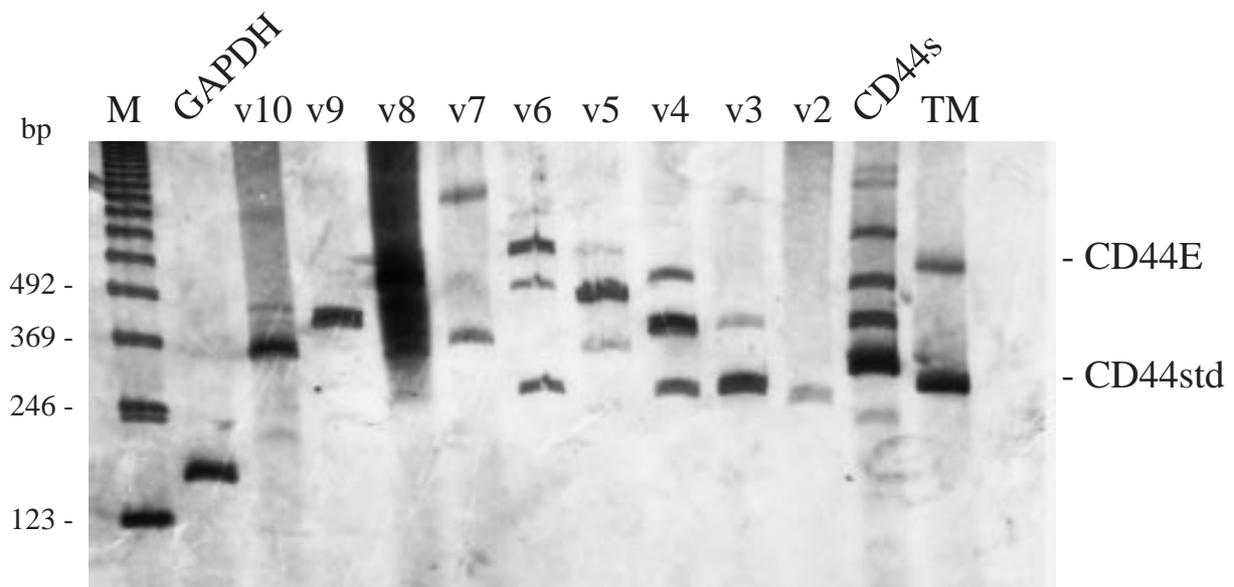


Abb. 24 Zusammenstellung der RT-PCR-Ergebnisse für die Zelllinie 97TM1

Die PCRs wurden mit den beschriebenen Primerkombinationen durchgeführt. Gezeigt ist eine Silberfärbung zur Detektion amplifizierter DNA-Fragmente nach PAGE (6% Gel). GAPDH ist als interne Kontrolle zur Abschätzung relativer Mengen mit aufgetragen. Die Analyse der variablen Exons zeigte teilweise, daß mehrere das Exon enthaltende Form exprimiert werden. Die CD44std-Primer amplifizieren alle vorkommenden CD44-Formen. Prominent sind hierbei vor allem die als CD44H/CD44s beschriebene Form, die keines der variabel einspleißbaren Exons enthält und die als CD44E beschriebene, epitheliale Form, die die Exons v8 bis v10 einschließt.

Die Auswertung der RT-PCR Analysen zeigte, daß CD44-mRNA in allen Subtypen der untersuchten Linien zu finden ist, allerdings in Linien kleinzelligen Ursprungs weniger häufig als in Linien nicht-kleinzelliger Abstammung.

Zusätzlich ließ sich beobachten, daß die Exons v8, v9 und v10 in den untersuchten Linien grundsätzlich kombiniert exprimiert werden. Die gemeinsame Expression variabler Stücke ist als epitheliale Form des CD44-Rezeptors beschrieben worden und läßt sich häufig auch in anderen Geweben beobachten.

		NSCLC-Linien											
		SCC			LCC			ADC					
Standard RT-PCR	Temp; Zyklenzahl	32M1	U1752	97TM1	H103	U1810	H23	H125	H820	H1573	H2009	H2077	H2126
CD44s	59°; 25	+++	++	+++	+++	+++	+	+	++	+	++	-	+
TM	59°; 25	++	++	++	++	+++	+	+	+	+	++	-	+
Exon-spezifische RT-PCR													
v2	56°; 25	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
v3	57°; 25	-	++	++	-	-	-	-	+	+	-	-	-
v4	56°; 25	-	++	++	-	-	-	-	+	+	+	-	+
v5	56°; 25	-	++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
v6	56°; 25	+	++	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
v7	58°; 25	+	++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
v8	59°; 25	+	++	+++	+	-	-	-	++	+	++	-	++
v9	59°; 25	+	++	++	+	-	-	-	++	+	++	-	++
v10	58°; 25	+	++	++	+	-	-	-	++	+	+	-	++

Tab. 13 Expression der CD44-Isoformen in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien

Die Expressionsstärke wurde ermittelt und aufgeführt wie folgt:

starke Expression: +++
 moderate Expression: ++
 schwache Expression: +
 keine Expression: -

Das Exon v5 wurde ausschließlich von Zellen nicht-kleinzelligen Ursprungs exprimiert. Bei der Analyse der kleinzelligen Linien stellte sich heraus, daß nur drei Linien (37,5%) in der Lage sind, variable Exons einzuspleißen. Hingegen sind in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs erheblich häufiger variable Exons nachzuweisen, acht von elf CD44 positive Linien (72,7%) zeigen Isoformen.

		SCLC-Linien							
		H24	H69	DMS79	H82	H146	H510	H526	H841
Standard RT-PCR	Temp; Zykluszahl								
CD44s	59°; 25	+	+	++	-	++	-	+	-
TM	59°; 25	+	+	++	+	++	-	-	-
Exon-spezifische RT-PCR									
v2	56°; 25	-	-	+	-	+	-	-	-
v3	57°; 25	-	-	++	-	++	-	-	-
v4	56°; 25	-	-	++	-	++	-	-	-
v5	56°; 25	-	-	-	-	-	-	-	-
v6	56°; 25	-	-	++	-	++	-	-	-
v7	58°; 25	-	-	++	-	++	-	-	-
v8	59°; 25	+	+	++	-	++	-	+	-
v9	59°; 25	+	+	++	-	+	-	+	-
v10	58°; 25	+	+	++	-	++	-	+	-

Tab. 14 CD44-Isoformexpression in SCLC-Bronchialkarzinomzelllinien

Die Expressionsstärke wurde ermittelt und ist wie folgt aufgeführt:

starke Expression: +++
 moderate Expression: ++
 schwache Expression: +
 keine Expression: -

Die RT-PCR Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

	NSCLC		SCLC	
Standard RT-PCR				
CD44s	11/12	91,7 %	5/8	62,5 %
TM	11/12	91,7 %	5/8	62,5 %
Exon spezifische RT-PCR				
v2	4/12	33,3 %	2/8	25 %
v3	4/12	33,3 %	2/8	25 %
v4	6/12	50 %	2/8	25 %
v5	4/12	33,3 %	0/8	0 %
v6	7/12	58,3 %	2/8	25 %
v7	5/12	41,7 %	2/8	25 %
v8	8/12	66,7 %	5/8	62,5 %
v9	8/12	66,7 %	5/8	62,5 %
v10	8/12	66,7 %	5/8	62,5 %

Tab. 15 Zusammenfassende Auswertung der CD44-Expressionsergebnisse

Um die Translation der nachgewiesenen CD44-Transkripte zu bestätigen, wurden an den untersuchten Zelllinien die Epitope v5, v6 und v7/8 des CD44-Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden subkonfluente, adhärent wachsende Zellen auf Objektträger ausgesät bzw. von Suspensions-Linien Zytospins hergestellt, an denen der Antikörper-Nachweis erfolgte.

Die Zellen auf den Objektträgern wurden fixiert, die endogene Peroxidase geblockt und mit jeweils Epitop-spezifischen Antiseren über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Nachweis von spezifischen Bindungen erfolgte mit einem biotinkoppelten Zweitantikörper und AEC als Substrat. Die Zellen wurden anschließend entweder mit Hoechst 33258 oder mit Hämatoxylin gegengefärbt. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten von jeder untersuchten Zelllinie mit jedem Antikörper Objektträger gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

	NSCLC-Linien											
	SCC		LCC			ADC						
AK gegen	32M1	U1752	97TM1	H103	U1810	H23	H125	H820	H1573	H2009	H2077	H2126
CD44s	++	++	++	+++	++	+	+	++	+	+	-	+
v5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
v6	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
v7/8	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	-	+

Tab. 16 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen nicht-kleinzelliger Zelllinien mit CD44 Epitop-spezifischen Antikörpern

	SCLC-Linien							
	H24	H69	DMS79	H82	H146	H510	H526	H841
AK gegen	H24	H69	DMS79	H82	H146	H510	H526	H841
CD44s	-	+	++	-	+	-	+	-
v5	-	-	-	-	-	-	-	-
v6	-	-	+	-	+	-	-	-
v7/8	+	+	+	-	+	-	+	-

Tab. 17 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen kleinzelliger Zelllinien mit gegen CD44-Isoformen gerichteten Antikörpern

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte, daß 11/12 NSCLC Linien und 4/8 SCLC Linien den CD44-Rezeptor exprimieren. Auch konnten die RT-PCR Analysen bestätigt werden, daß die Epitope v7/8 die am häufigsten exprimierten variablen Exons der untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien sind. Ebenso ließ sich das Ergebnis der RT-PCR bestätigt werden, daß das Exon v5 nur von nicht-kleinzelligen Zelllinien exprimiert wird.

Exon-spezifische Antikörper	NSCLC		SCLC	
CD44s	11/12	91,7 %	4/8	50 %
v5	5/12	41,7 %	0/8	0 %
v6	4/12	33,3 %	2/8	25 %
v7/8	11/12	91,7 %	5/8	62,5 %

Tab. 18 Tabellarische Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

Mit wenigen Ausnahmen konnten die RT-PCR Ergebnisse immunhistochemisch bestätigt werden.

Unterschiedliche Ergebnisse traten vor allem in solchen Fällen auf, in denen mit Hilfe der PCR nur eine sehr schwache Expression des Transkripts nachweisbar war; hier detektierten die Antikörper in einigen Fällen kein Protein. So waren zwar in den Linien NCI-H82 und -H24 mRNA für den CD44 Rezeptor nachweisbar, (eingeschränkt in der -H82 Linie), jedoch gelang kein immunhistochemischer Nachweis mit einem gegen den extrazellulären Teil von CD44 gerichteten Antikörper. Ebenso ließ sich in den Linien NCI-H103, H1573, H1752 und -H2009 mRNA des varianten Exons v6 detektieren, ein immunhistochemischer Nachweis gelang jedoch nicht.

In der Zelllinie NCI-H82 gelang ausschließlich ein mRNA Nachweis der Transmembrandomäne. Ein Fehlen des vollständigen CD44 Rezeptors ist somit wahrscheinlich. In Fall der Zelllinie NCI-H24 konnte zwar der Rezeptor nicht mit einem gegen CD44 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden, jedoch gelang ein Rezeptornachweis mit einem Epitop-spezifischen Antikörper. Der fehlende Nachweis läßt sich mit einem Nichterkennen des nicht gegen spezifische Epitope gerichteten Antikörpers erklären.

Da in den nicht-kleinzelligen Zelllinien U1752, NCI-H103 und -H2009 eine mRNA Expression des Exons v6 belegbar war, eine Isoform des Rezeptors mit v6 jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, kann dies u.a. bedeuten, daß die Translation der v6 beinhaltenden mRNA unterdrückt wird. Daß die Transkription eines Gens nicht zwangsläufig zur Synthese des Proteins führt, ist ein Phänomen, das vielfach beobachtet wird.

Andere differierende Ergebnisse betreffen das Vorkommen einer positiven Immunhistochemie ohne entsprechenden mRNA-Nachweis. Da die Amplifikation der mRNA Transkripte in der RT-PCR auf 25 Zyklen limitiert war, sind sehr geringe Mengen an cDNA nicht unbedingt nachweisbar bzw. spielen evtl. vorhandene Inhibitoren im Reaktionsansatz eine wichtige Rolle. So ließ sich in der Zelllinie EPLC 32M1 immunhistochemisch das Epitop v5 ebenso wie in den Linien NCI-H125 und U1810 die Epitope v7/8 nachweisen, ohne das eine mRNA-Expression belegt werden konnte.

Zusammenfassend läßt sich auf Grund der RT-PCR Analysen und der immunhistochemischen Färbungen festhalten, daß die Mehrzahl der Linien, unabhängig von ihrem histologischen Ursprung, das CD44-Gen transkribieren und das Protein synthetisieren.

3.3.2 Expression des CD44 Rezeptors in Lungentumoren

3.3.2.1 CD44-Transkripte sind in der mRNA solider Lungentumoren nachweisbar

Um ein Anwesenheit von CD44 in Primärtumoren nachweisen zu können, wurde mRNA aus kryopräservierten Tumoren gewonnen. Diese wurde revers transkribiert und für RT-PCR Analysen eingesetzt.

Als Ergebnis stellte sich heraus, daß alle untersuchten Tumore nahezu sämtliche Exons aufwiesen. Da das CD44 Expressionsmuster der Tumoren darüber hinaus identisch mit den entsprechenden mituntersuchten normalen Referenzgeweben war, schien es, daß die Heterogenität in Bezug auf die detektierten Spleißvarianten nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von ihrem Umgebungsgewebe herrührte. Da das Homogenisieren der Tumoren zur RNA Extraktion keine Unterscheidung zwischen den im Tumormaterial vorhandenen Zelltypen zuläßt, kann über die zelluläre Herkunft der detektierten mRNA keine Aussage getroffen werden. Da jeder Tumor nicht nur Tumorzellen, sondern auch Stromazellen, Entzündungszellen und weitere Arten nicht-maligner Zellen enthält, ist nicht ausgeschlossen, daß viele der nachgewiesenen Exons nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von Zellen des "Umgebungsgewebes" exprimiert wurden. Da die RT-PCR Analyse an aus Tumormaterial gewonnener RNA keine Aussagekraft hat, wurden diese Analysen eingestellt.

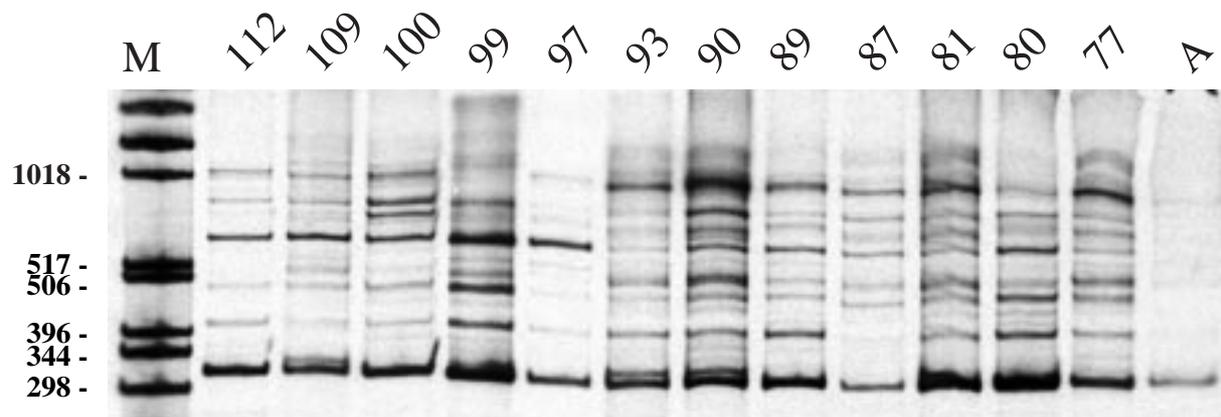


Abb. 25 RT-PCR Analysen extrahierter mRNA aus Tumoren

In fast allen Tumoren finden sich Transkripte für CD44 mit unterschiedliche Exons. Es kann hier aber nicht zwischen unterschiedlichen, im Tumor vorhandenen Gewebetypen differenziert werden.

3.3.2.2 Histiotypische Expression einer CD44 Isoform (v6) in primären Lungentumoren

Neben der Fragestellung, ob CD44-Isoformen eine Rolle in Lungentumorzelllinien zukommt, wurde die Expression auch für Bronchialkarzinome untersucht. Da sich die RT-PCR Analyse an isolierter mRNA aus Tumorgewebe als ungeeignet erwies, an den Zelllinien jedoch gezeigt

werden konnte, daß ein Antikörpernachweis eine adäquate alternative Methode darstellt, wurden Tumoren unterschiedlichen histologischen Ursprungs mit spezifisch gegen CD44-Isoformen gerichteten Antikörpern gefärbt.

Bevor die Antikörper für eine immunhistochemische Analyse eingesetzt wurden, wurde ihre spezifische Reaktion an Zellextrakten einiger Zelllinien getestet und im Western-Blot bestätigt.

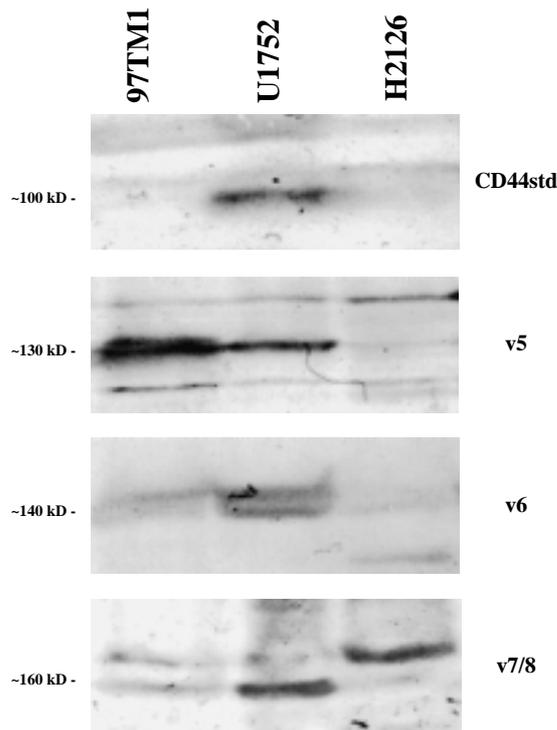


Abb. 26 Spezifitätstest der monoklonalen CD44- Antikörper

Western-Blot mit unterschiedlichen CD44 Antikörpern. Zur Testung der Spezifität der käuflichen Antikörper wurde 150µg Ganzzellextrakt jeder Linie auf einem 5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteinen nach erfolgtem Gellauf auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die spezifischen Antikörper wurden 1:250 verdünnt, ein Nachweis spezifischer Bindungen erfolgte mit einem biotinylierten Zweitantikörper und DAB als Substrat. Die Ergebnisse der RT-PCR konnten mit diesem Test bestätigt werden, so daß die Antikörper als hochspezifisch bindend gelten können.

Kryopräservierte und paraffineingebettete Tumoren wurden mit den getesteten Antikörpern auf die Expression von CD44 und einigen varianten Exons dieses Rezeptors untersucht. Solche Färbungen lassen eine genaue Lokalisation der Antigen-Antikörper-Reaktion zu, da einzelne Zellen angefärbt werden und so eine Auswertung von Tumorzellanteilen selbst

möglich wird. Für die Analysen mit unterschiedlichen Antikörpern wurden Serienschnitte hergestellt, so daß die Untersuchungen eines Tumors in ihrer Lokalisation vergleichbar waren. Eine Reaktion mit dem gegen die Standardform gerichteten Antikörper konnte im Bindegewebe, in Fibroblasten und Makrophagen, in den Alveoli, Pneumozyten, in infiltrierenden Makrophagen und entlang des die Bronchien ausstattenden Epithels detektiert werden. Keinerlei Antikörperreaktion zeigte sich dagegen im Knorpelgewebe.

Zusätzlich zu den CD44-Färbungen wurden Schnitte mit einem gegen Ki67-gerichteten Antikörper gefärbt. Das Ki67/MIB1-Protein ist ein in der S/G2-Phase spezifisch auftretendes Nicht-Histon Protein, das dadurch nur in proliferierenden Zellen zu finden ist. Mit Ausnahme von Bronchioalveolarkarzinomen, die nur sehr wenige replizierende Zellen enthalten, erlaubt die Anti-Ki67 gerichtete Färbung die Identifizierung proliferierenden Gewebes und damit eine gute Abgrenzung von Tumorzellen zum Umgebungsgewebe.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen an einem großen Teil der untersuchten Tumoren ergab, daß unterschiedliche Tumortypen variable Grade an Immunogenität mit den jeweiligen CD44-Antikörpern zeigten.

So färbten sich Plattenepithelkarzinome und Bronchioalveolarkarzinome deutlich stärker und einheitlicher an als Adenokarzinome. Großzellige Karzinome zeigten häufig nur einen geringen Anteil an angefärbten, positiven Zellen, der 10% der Gesamtzahl aller Tumorzellen unterschritt. Ein solch geringer Anteil das untersuchte Protein exprimierender Zellen wurde in der Auswertung als negativ gewertet. Die untersuchten SCLC-Tumoren färbten sich nicht mit den CD44-Antikörpern an. Karzinoide hingegen zeigten eine starke Reaktion, was auf eine hohe CD44-Expression schließen läßt.

Innerhalb der Tumoren selbst fand sich generell die stärkste Antikörperreaktion an Zellen, die an der Grenze der Tumordinfiltration zu finden waren, während zentrale, im Tumorgewebe liegende Bereiche häufig keine Antikörperreaktion aufwiesen.

Die Tumoren wurden mit den beschriebenen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des CD44-Rezeptors mehrfach gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Gezeigt sind Fotografien typischer immunhistochemischer Färbungen unterschiedlicher histologischer Tumoren mit gegen verschiedene CD44-Isoformen gerichteten Antikörpern (Anti-CD44 Färbungen links und Anti-v6 Färbungen rechts).

Die gewählte mikroskopische Vergrößerung war 160fach. Alle Färbungen wurden mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, und deren spezifische Bindung mit biotinylierten

Zweitantikörpern und AEC als Substrat nachgewiesen. Die Zellkerne sind mit Hämatoxylin gegengefärbt.

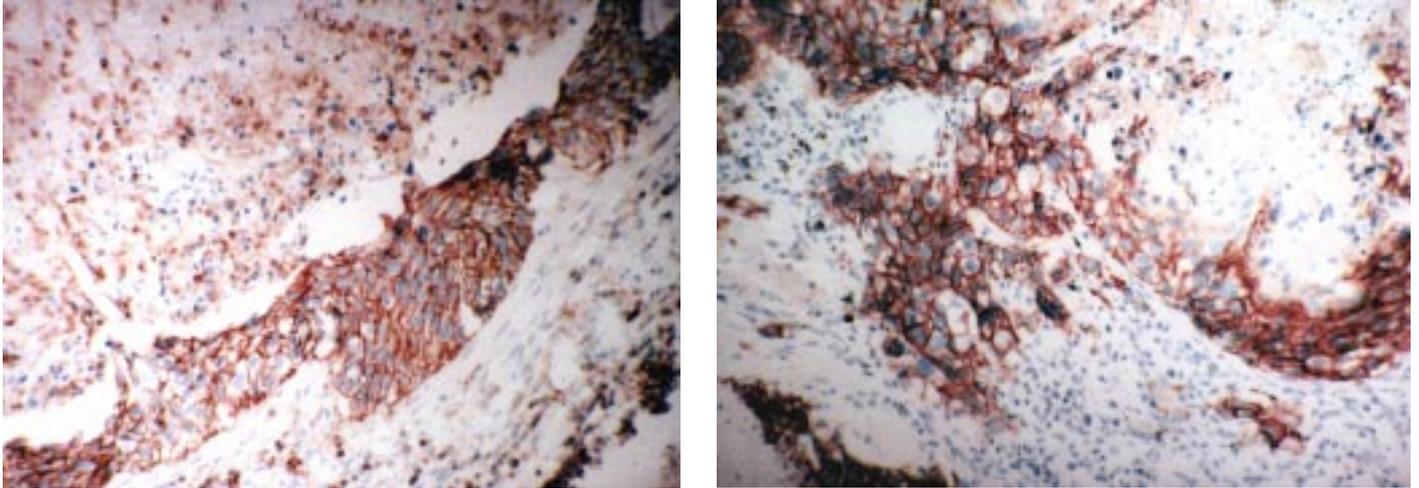


Abb. 27 Aufnahmen der Anti-CD44 Färbungen eines Plattenepithelkarzinoms (1655) (links:CD44; rechts:v6)

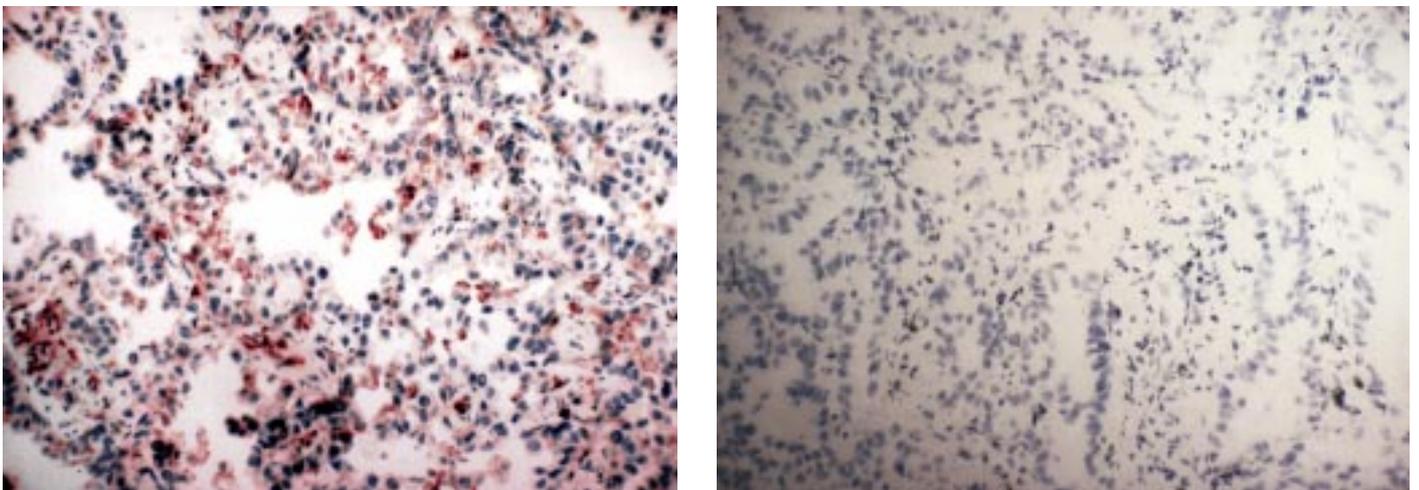


Abb. 28 Aufnahmen eines mit unterschiedlichen CD44-Antikörpern gefärbten Adenokarzinoms (5740) (links:CD44; rechts:v6)

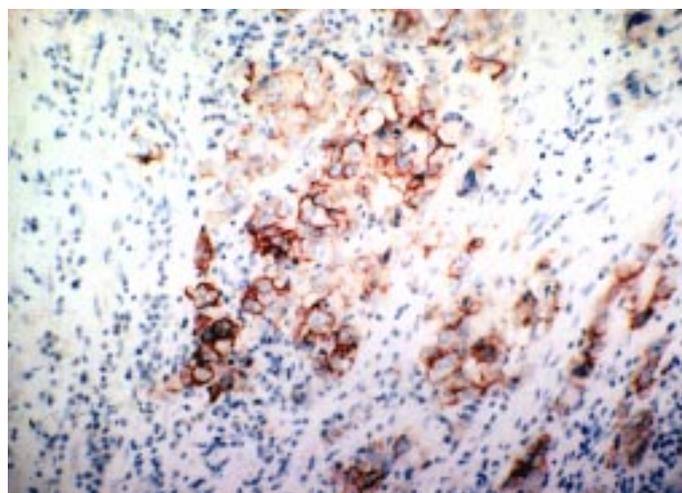
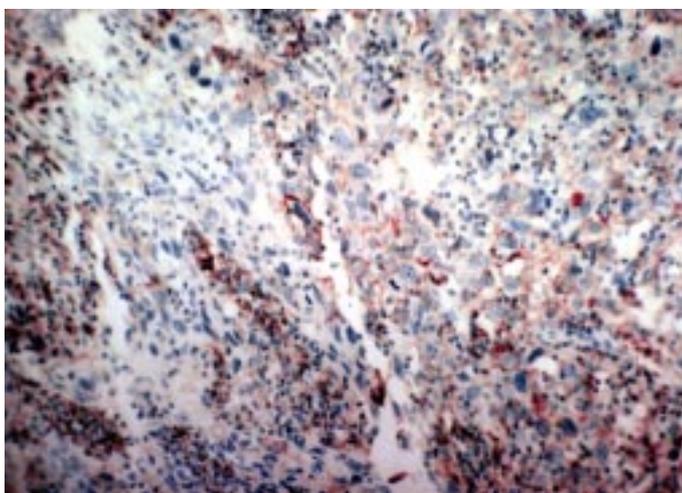


Abb. 29 Fotografien eines großzelligen Tumors mit anti-CD44 Färbung (1469) (links:CD44; rechts:v6)

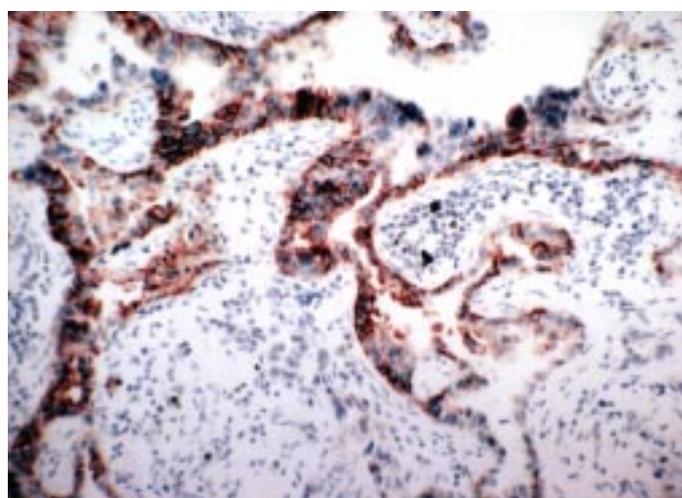
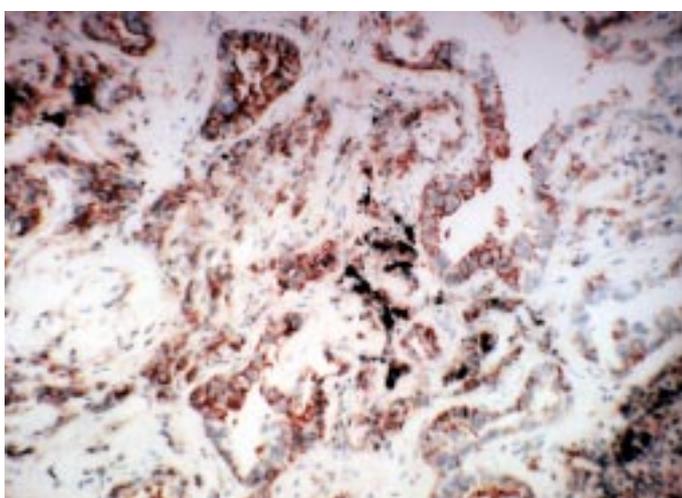


Abb. 30 Aufnahmen eines anti-CD44 (links) und -v6 (rechts) gefärbten Bronchioalveolarkarzinoms (10578)

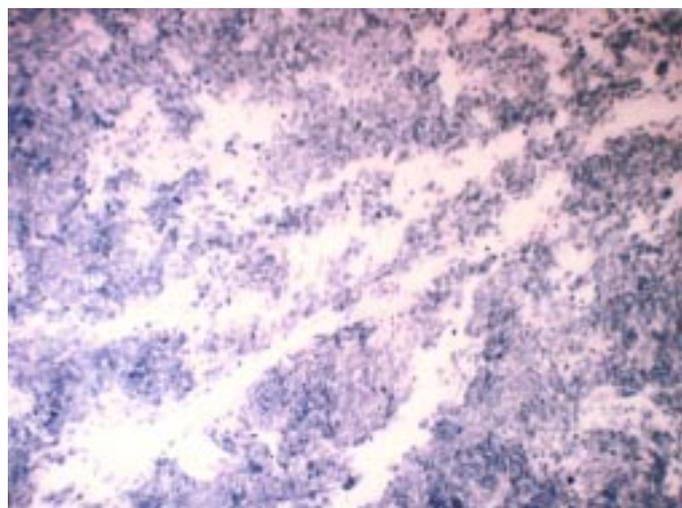
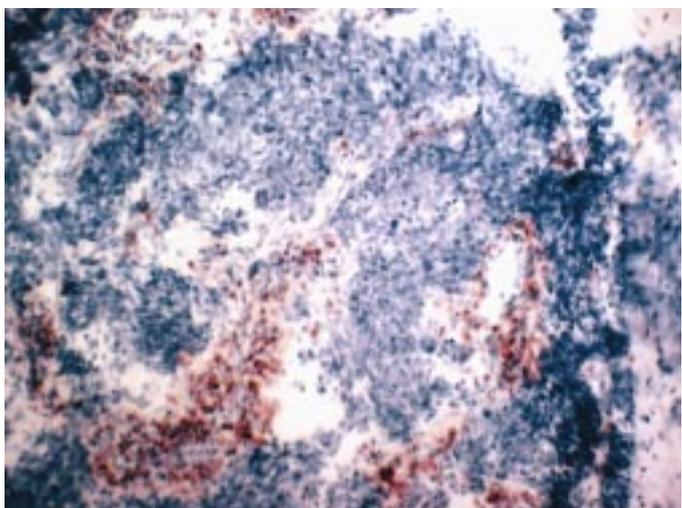


Abb. 31 Aufnahmen der CD44-Antikörperfärbungen eines kleinzelligen Tumors (5729)(CD44 links; v6 rechts)

Tumor	CD44 std		v5	v6	v7/8	Ki67 (% pos. Zellen)	TNM- Status	klinik. Stag.	Grading
	(% pos. Zellen)	Intensität							
ADC									
A	90	+++	-	-	-	70	T ₁ N ₁ M ₀	II	G1
80	20	+	-	-	-	50	T ₂ N ₀ M ₀	II	G2
81	10	+	-	-	-	30	T ₄ N ₃ M ₀	IIIB	G
97	50	+	(+)	-	+	30		IIIA	G2
100	30	+	-	-	+	30	T ₃ N ₁ M ₀	IIIA	G2
117	55	++	(+)	-	+	5	T ₂ N ₀ M ₀	I	G2
121	60	+	-	-	-	10	T ₂ N ₀ M ₀	I	G2
122	10	+	-	-	-	5	T ₂ N ₃ M ₀	IIIB	G2
138	30	+	-	-	-	25	T ₃ N ₂ M ₀	IIIA	G3
330	60	+++	(+)	-	+	<5	T ₃ N ₂ M ₀	I	G1
640	25	+	-	-	(+)	40	T ₃ N ₂ M ₀	IIIA	G3
4389	35	+	+	+	-	10	T ₁ N ₁ M ₀	II	G2
5563	0	-	-	-	-	10	T ₁ N ₀ M ₀	I	G2
5740	10	+	+	+	+	<1	T ₂ N ₀ M ₀	II	G1
12107	10	+	-	-	-	<1	T ₁ N ₀ M ₀	I	G1
15166	15	+	-	-	+	<1	T ₁ N ₀ M ₀	I	G2
BAC									
31-1	0	-		-	-	4	T ₁ N ₀ M ₀	I	G1
32-1	0	-	+	(+)	-	1	T ₁ N ₀ M ₀	I	G1
2624	50	+++	+	+	+	<1	T ₁ N ₀ M ₀	I	G1
10578	90	+++	+	+	+	<2	T ₂ N ₀ M ₀	II	G1
10674	40	+++	-	+	-	2	T ₂ N ₁ M ₀	III	G1
10909	30	+++	(+)	+	+	10	T ₃ N ₀ M ₀	II	G1
SCLC									
93	<5	+	-	-	-	80	T ₂ N ₁ M ₀	I	G4
113	<5	+	-	-	-	80	T ₂ N ₃ M ₀	I	G4
Karzinoid									
99	>90	++	-	-	-	<1		I	GX
83	>90	++	+	+	-	<1	T ₁ N ₀ M ₀	-	GX
353	>90	++	-	-	+/-	<1	T ₂ N ₀ M ₀	I	GX
476	>90	++	+	-	-	<1	T ₁ N ₀ M ₀	-	GX
LCC									
77	5	+	-	-	-	80	T ₁ N ₁ M ₀	I	G4
87	50	+	-	-	-	60	T ₃ N ₂ M ₀	IV	G4

89	35	+	-	-	+	>90	T ₂ N ₁ M ₀	II	G4
109	80	++	-	-	-	30	T ₃ N ₂ M ₀	IIIA	G4
570	70	++	(+)	-	(+)	<5	T ₂ N ₁ M ₀	II	G4
680	10	+	-	-	-	<5	T ₂ N ₃ M ₀	IIIA	G4
1469	>60	++	+	+	+	40	T ₃ N ₁ M ₀	III	G4
11401	<10	+	-	+	-	<5	T ₁ N ₁ M ₀	II	G4
SCC									
90	>90	+++	+	+	+	75	T ₂ N ₂ M ₀	IIIB	G2
112	>90	+++	+	+	+	60	T ₂ N ₀ M ₀	I	G2
132	>90	++	+	+	+	n.s.	T ₂ N ₀ M ₀	I	G1
323	>90	++	+	+	+	40	T ₂ N ₁ M ₀	II	G2
324	>90	++	+	+	+	70	T ₃ N ₁₋₂ M ₀	II	G2
556	>90	++	+	+	+	30	T ₂ N ₀ M ₀	I	G1
564	<10	+	-	-	-	20	T ₂ N ₂ M ₀	IIIA	G3
565	80	+++	+	+	+	20	T ₂ N ₁ M ₀	I	G3
579	>90	+++	+	+	+	5	T ₄ N ₃ M ₀	IIIB	G3
610	80	+++	+	+	+	n.s.		II	G2
634	>90	++	+	+	+	n.s.	T ₂ N ₁ M ₀	II	G3
653	>90	+++	+	+	+	20	T ₂ N ₃ M ₀	IIIA	G3
657	>90	++	(+)	+	+	40	T ₂ N ₂ M ₀	IIIA	G1
690	>90	+++	+	+	+	80	T ₂ N ₁₋₂ M ₀	IIIA	G3
1134	<5	-	-	-	(+)	10	T ₂ N ₁₋₂ M ₀	IIIA	G2
1154	80	++	+	+	+	60	T ₃ N ₀ M ₀	II	G2
1271	<5	-	(+)	-	-	15	T ₂ N ₂ M ₀	II	G2
1655	>90	+++	+	+	+	45	T ₃ N ₀ M ₀	II	G2
1720	80	++	+	+	+	45	T ₂ N ₁₋₂ M ₀	IIIA	G3
2229	60	++	+	+	+	40	T ₁ N ₁ M ₀	II	G3
2616	10	+	+		+	10	T ₂ N ₁₋₂ M ₀	IIIA	G2
6130	0	-	-	-	-	30	T ₁ N ₁ M ₀	II	G2
9165	10	+	+	+	+	10	T ₂ N ₂ M ₀	IIIA	G2
11681	50	++	+	+	+	50	T ₂ N ₀ M ₀	I	G2
915-16	50	+++	+	+	+	20	T ₁ N ₀ M ₀	I	G2
LCC/SCC									
552	90	+	+	+	+	+	T ₄ N _X	IIIB	G4
586	50	+	+	+	+	+		II	G4
1478	70	++	+	+	-	30	T ₃ N ₁ M ₀	III	G4

Tab. 19 Immunhistochemischer Nachweis von CD44-Isoformen in Bronchialkarzinomen mit Angabe des durch Ki67-Nachweis erhobenen Proliferationsindexes und klinischer Tumordaten

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression unterschiedlicher Epitope des CD44-Rezeptors zeigte, daß ein großer Teil der Tumoren sowohl v5 exprimiert (39/64; 60,9%), v7/8 (37/64; 57,8%) als auch v6 (33/64; 51,6%).

Interessanterweise zeigten vor allem SCC eine Reaktion mit Antikörpern gegen alle untersuchten Epitope (19/25), was den Schluß zuläßt, daß diese drei bzw. vier Epitope (v5, v6, v7/8) häufig co-exprimiert werden. Ebenso zeigten BAC (2/6) und kombinierte Tumoren aus SCC und LCC (Mischtumoren) (2/3) diese Co-Expression aller drei bzw. vier untersuchten Epitope. Es konnte beobachtet werden, daß vor allem in den kombinierten Tumoren häufig nur Zellinseln angefärbt waren, die aber nicht eindeutig histologisch einer bestimmten Tumorform zugeordnet werden konnten. Weiterhin wurde eine kombinierte v5 bis v7/8 Expression in 1/16 ADC, 1/8 LCC aber keinem der 4 Karzinoide gefunden. Die 2 SCLC-Tumoren zeigten keine detektierbare Expression des CD44-Rezeptors.

Der größte Unterschied im Expressionsmuster wurde für das Epitop v6 festgestellt. Während CD44v6 in 20/25 (80%) der SCC und 5/6 (83%) aller Bronchioalveolarkarzinome gefunden wurde, konnte diese Variante nur in 2/8 (25%) der untersuchten LCC und 2/16 (12,5%) aller ADC nachgewiesen werden.

Da Adenokarzinome histologisch sehr eng verwandt mit Bronchioalveolarkarzinomen sind, ergibt sich so eine histologische Unterscheidungsmöglichkeit dieser beiden Tumorgruppen.

Histologie	Anzahl der Fälle	% positive Fälle			
		CD44s	CD44v5	CD44v6	CD44v7/8
ADC	16	93,8	37,5	12,5	43,8
BAC	6	66,7	66,7	83,3	50
SCC	25	84,0	88	84	80
LCC	8	75,0	25	25	37,5
LCC/SCC	3	100	100	66,7	100
SCLC	3	33,3	33,3	0	0
Karzinoide	3	100	33,3	33,3	33,3

Tab. 20 Tabellarische Zusammenstellung der Tumorhistologie und Expression der CD44-Isoformen

3.3.2.3 CD44-Isoform Expression korreliert nicht mit patho-klinischen Daten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Präsenz von CD44-Isoformen und dem TNM-Status der Patienten zum Zeitpunkt der Operation, dem Proliferationsindex der Ki67 positiven Fraktion und dem Grading - einer histologischen Einteilung des Differenzierungsgrades des Tumors - wurden die aus den histologischen Färbungen gewonnenen Daten mit diesen Angaben auf eine mögliche Korrelation hin untersucht.

Charakteristika	Anzahl der Fälle	% positive Fälle			
		CD44s	CD44v5	CD44v6	CD44v7/8
Tumorgröße	n=58				
T1	14	57,1	42,9	42,9	26,7
T2	29	82,8	62,1	55,2	65,5
T3	12	100	58,3	50	58,3
T4	3	100	66,7	66,7	66,7
Lymphknotenstatus	n=57				
N0	21	85,7	66,7	57,1	54,5
N1	15	73,3	46,7	53,3	50
N2	15	80	60	66,7	60
N3	6	83,3	33,3	33,3	33,3
Grading	n=58				
G1	12	83,3	66,7	66,7	58,3
G2	22	81,8	63,6	50	60,9
G3	11	90,9	72,7	63,6	72,7
G4	13	69,2	38,5	38,5	38,5
Proliferationsindex	n=58				
Ki67 < 10%	18	83,3	55,6	50	55,6
Ki67 10-30%	21	76,2	57,1	38,1	47,6
Ki67 > 30%	19	84,2	57,9	57,9	57,9

Tab. 21 Beziehung zwischen patho-klinischen Daten und der CD44-Expression

Die Auswertung zeigte, daß weder die Anwesenheit des CD44-Rezeptors generell, noch das Vorkommen irgendeiner der drei untersuchten Isoformen mit der TumorgroÙe, dem Lymphknotenbefall (bis N2), dem Grading (G1 bis G3) oder dem prozentualen Anteil proliferierender (Ki67 positiver) Zellen im X^2 -Test korrelierte.

Ein Rückgang der CD44-Isoform-Expression läÙt sich in N3 Tumoren beobachten, was auf eine inverse Korrelation mit einer fortgeschrittenen Lymphknotenbeteiligung hindeutet.

Ebenso zeigten die gering oder entdifferenzierten G4-Tumoren eine signifikante globale Reduktion der CD44- Expression. Da die Gruppe der G4-Tumoren sich nur aus Tumoren der histologischen Typen der LCC und SCLC zusammensetzt, die grundsätzlich entdifferenziert sind, ist nicht zu unterscheiden, ob dieser Zusammenhang auf einem histiotypischen Effekt oder dem Verlust der Differenzierung beruht.

Zusammenfassend läÙt sich sagen, daß mit Ausnahme der N3- und G4-Tumoren, die CD44-Expression aller Isoformen in Lungentumoren unabhängig vom Staging (TumorgroÙe), dem Grading (Differenzierungsgrad), dem Metastasierungsgrad des Tumors in die Lymphknoten und dem Proliferationsindex ist.

3.3.3 CD44 Expression ist in normaler Lunge nachweisbar

Neben der Serie von Lungentumoren wurden histologische Schnitte normaler Lunge mit CD44-Antikörpern gefärbt, um die Situation der CD44-Expression in Tumoren mit der physiologischen Expression in Normalgewebe vergleichen zu können.

Die Färbungen ergaben, daß auch in normaler Lunge CD44-Rezeptor-Isoformen exprimiert werden. So konnte im Drüsengewebe, in den Bronchioli und in der Bronchialschleimhaut eine CD44-Expression nachgewiesen werden. Auffällig war, daß vor allem die Basalreihe der Bronchialschleimhaut positiv mit dem CD44-Antikörper reagierte.

Eine Expression des Epitops v6 konnte nur sehr schwach in Bronchioli und Drüsengewebe nachgewiesen werden, die Basalreihe der Bronchialschleimhaut aber reagierte stark mit v6-spezifischen Antikörpern.

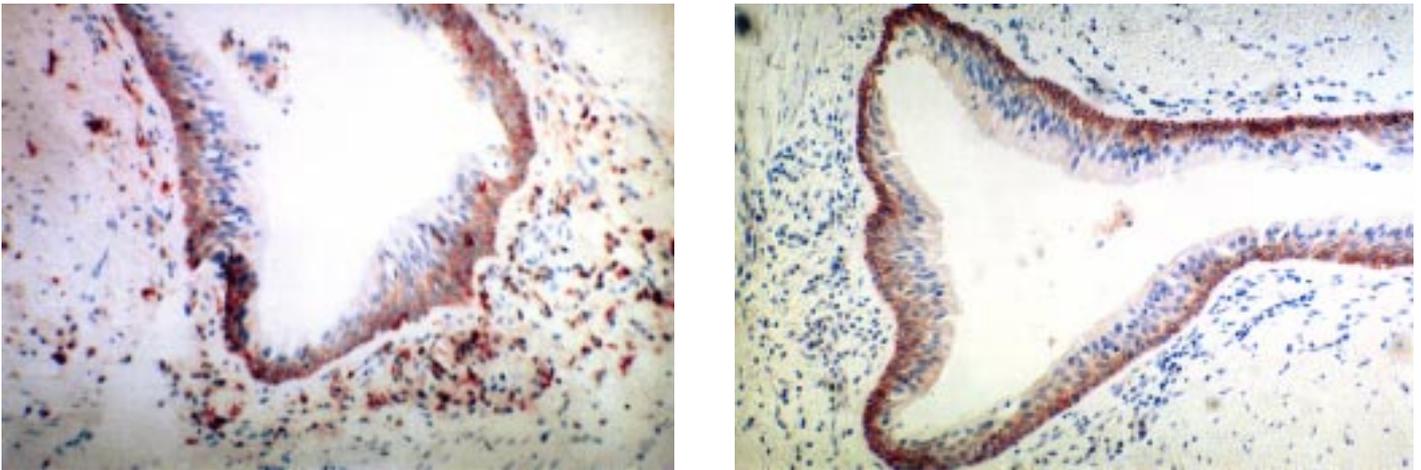


Abb. 32 Fotografien der immunhistochemischen Färbungen normaler Bronchialschleimhaut

Die histologischen Schnitte wurden mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen erfolgte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und AEC als Chromogen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Mikroskopische Vergrößerung 160fach. Linke Abbildung: Normale Lunge, Bronchialschleimhaut mit CD44-Färbung; Rechte Abbildung: Normale Lunge, Bronchialschleimhaut mit v6-spezifischer Färbung.

3.3.4 Eine Veränderung im Vorkommen von CD44 und CD44v6 ist schon in Präneoplasien der Bronchialschleimhaut belegbar

Da das physiologische Auftreten des CD44-Rezeptors und v6-beinhaltenender Isoformen in normalem Lungengewebe Hinweise auf eine Funktion innerhalb der Homöostase gibt, wurde an Präneoplasien und Neoplasien untersucht, ob eine Veränderung der Expression, wie sie in Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden konnte, schon in morphologischen, nicht invasiven Veränderungen der Bronchialschleimhaut beobachtet werden kann.

Der Nachweis einer veränderten CD44-Expression könnte einen Hinweis liefern auf die Entstehung eines Tumors und damit auf eine Rolle des CD44-Rezeptors in der Genese von Tumoren deuten.

Dazu wurden proliferierende Läsionen des Bronchialepithels mit CD44- und v6-Antikörpern gefärbt.

Eine Auswertung der Immunhistochemien zeigte eine Veränderung der CD44-Expression schon in frühen, hyperplastischen Läsionen des Bronchialepithels.

So waren in den Dysplasien durchgehend, im Gegensatz zu normaler Lunge, in der nur die Basalzellreihe CD44 positiv ist, alle Zellreihen stark angefärbt. Der gleiche Befund konnte in squamösen Metaplasien und in Basalzellhyperplasien mit oder ohne Atypien, beobachtet werden, in denen *multilayer* angefärbt waren.

Tumor	CD44std (Intensität)	v6 (Intensität)
Dysplasie		
6462	+++	+++
14133	++	+++
12702	++	+++
2795	++	+++
7759	+++	+++
8129	++	++
8276	++	+++
squamöse Metaplasie		
11317	+++	+++
3759	++	++
6462	+	++
14133	++	++
8276	++	+++
15207	++	+++
12702	++	+++
atypische Basalzellhyperplasie		
13178	+++	+++
12310	++	+++
12702	+++	+++
3026	+/-	+/-
Basalzellhyperplasie		
3759	++	++
12842	+	++
941/42	+/-	+/-
1752	+	++
12308	+	+
2791	+	+++
561	+	++
10395	++	+
muköse Zellhyperplasie		
16774	+	++
3028	+	-
12406	+++	+
12957	-	+

1752	+	+
11302	+/-	+
11507	+	+++
12842	+	+
12310	++	++
7759	++	+++
12702	+	+++
8129	+/-	+
2791	+	+/-
3759	+/-	++
Adenomatosis		
11305	-	-
3026	-	-
10392	+/-	+/-
3025	+/-	+/-
3751	-	-
2902	-	-

Tab. 22 Zusammenstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Präneoplasien der Lunge

Bei der mukösen Zellhyperplasie hingegen waren hauptsächlich nur die Basalreihen angefärbt, ein Verlust der CD44-Expression ließ sich in den Adenomatosis-Präparaten nachweisen.

Damit konnte demonstriert werden, daß sich eine Veränderung der CD44-Expression schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium von gegebenenfalls späteren tumorösen Veränderungen nachweisen läßt.

Dies bestärkt die Vermutung, daß CD44 eine wichtige Rolle in der Genese von Lungentumoren spielen kann. Ob CD44-Isoformen die Differenzierung von Lungentumoren beeinflußt, bedarf jedoch weiterer Klärung.

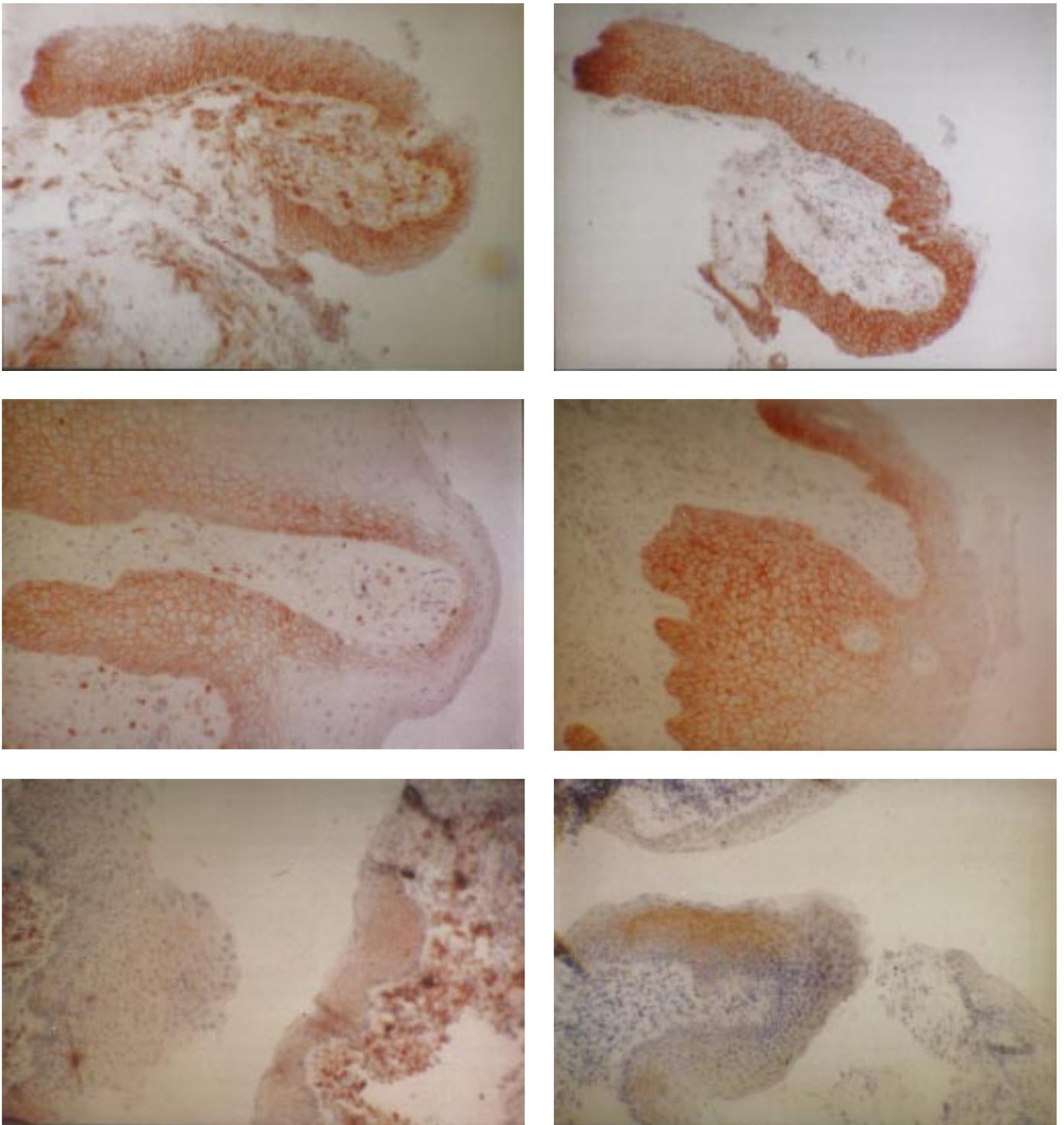


Abb. 33 Fotografien immunhistochemischer Färbungen präneoplastischer Bronchialschleimhaut

Gezeigt sind Aufnahmen einer anti-CD44- und einer anti-v6-gerichteten Färbung. Klar erkennbar ist, im Vergleich mit Abb. 32, daß teilweise die Anzahl positiver Zellreihen deutlich zunimmt, bzw. ist ein Verlust der CD44 Expression zu sehen (links: CD44; rechts: v6). (Neoplasien Nr.:8276 oben; 14133 mittig; 15207 unten)

Histologie	Anzahl der Fälle	CD44s	CD44v6
		% positive Fälle	% positive Fälle
Dysplasie	7	100	100
squamöse Metaplasie	7	100	100
atypische Basalzellhyperplasie	4	75	75
Basalzellhyperplasie	8	87,5	87,5
muköse Zellhyperplasie	14	71,4	85,7
Adenomatosis	6	33,3	33,3

Tab. 23 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen präneoplastischer Veränderung der Bronchialschleimhaut

Die Auswertung der Färbungen erbrachte, daß besonders adenomatöse Veränderungen mit einem Verlust der CD44-Expression einhergehen. Da ein Verlust des CD44-Rezeptors sich auch in vielen Adenokarzinomen beobachten ließ, könnte hier ein Zusammenhang zwischen den sehr frühen Veränderungen und der histiotypischen Differenzierung dieser Tumoren bestehen. Betrachtet man nur die eigentliche Reaktion der Schnitte mit den Antikörpern (Reaktion oder nicht), so scheint sich zum Normalgewebe bei allen andern Veränderungen kein Unterschied zu ergeben. Da jedoch viele der Präneoplasien ein vom Normalgewebe verändertes Expressionsmuster bezüglich ihres Vorkommens zeigten, ist auch hier davon auszugehen, daß dies in Zusammenhang mit der Differenzierung von Zellen steht. Ob das variante Expressionsmuster des Epitops v6 mit der Genese von Plattenepithelkarzinomen in Verbindung zu bringen ist, die die am häufigsten das Epitop v6 exprimierende Tumorsubgruppe darstellen, ist spekulativ, jedoch nicht auszuschließen.

4 Diskussion

4.1 Onkogene Rezeptortyrosinkinasen in Bronchialkarzinomzelllinien

Die physiologische Aufgabe von Rezeptortyrosinkinasen ist es, nach Bindung eines spezifischen Liganden extrazelluläre Signale durch Substratphosphorylierung an die zytoplasmatische Signaltransduktionskaskade der Zelle weiterzuleiten. Sie dienen damit der Übermittlung von Signalen, die die Zellproliferation und Differenzierung beeinflussen (Schlessinger und Ullrich, 1992). Ist die Expression solcher Rezeptoren fehlreguliert, können Prozesse in Gang gesetzt werden, die ursächlich für die Genese von Tumoren sind. Solche Rezeptortyrosinkinasen bezeichnet man als onkogen.

Die Analyse onkogener Rezeptortyrosinkinasen in Bronchialkarzinomzelllinien zeigte sowohl eine teilweise veränderte Expressionsstärke als auch ein verändertes Expressionsmuster (Verlust bzw. eine *de novo* Expression) physiologisch exprimierter Rezeptoren. Dabei diente die untersuchte Rezeptorexpression der normalen Bronchialepithelzellen als nicht-tumorigener und physiologischer Vergleich. Da diese Zellen dem nicht-malignen Epithel gesunder, nicht rauchender Spender entnommen worden waren, bilden sie keine permanente Zelllinien (Clonetics Produkt Beschreibung für NHBE).

Die Auswertung der einzelnen Rezeptorfamilien zeigte, daß die Expression der Rezeptoren der EGF-Familie dabei als auffälligstes Merkmal eine *de novo* Expression von erb B2 in allen untersuchten Zelllinien aufwies. In Tumoren ist eine erb B2 Expression nur in NSCLC beschrieben (Knyazev et al., 1992; Weiner et al., 1990). Bemerkenswert ist auch der Verlust der erb B4 Expression in allen Linien. Die Rezeptoren der Met-Rezeptorfamilie und des Ret-Rezeptors wurden individuell unterschiedlich von jeder Zelllinie exprimiert. Ein Vergleich mit der Literatur über Met-Expression in Lungentumoren (Liu und Tsao 1993; Rygaard et al., 1993) bestätigte das häufige Auftreten (ca. 70% der NSCLC- und SCLC-Linien) dieser Kinase in Bronchialkarzinomzelllinien. Auch eine Met-Expression in normalen Bronchialepithelzellen (Singh-kaw et al., 1995) konnte belegt werden. Eine Ron-Expression ist in der Literatur für normale Lunge beschrieben worden. Da die NHBE-Zellen ebenfalls ein Ron-Expression aufwiesen, stimmt damit die Beobachtung mit den publizierten Befunden überein. Da das Gen für Ron auf einem chromosomalen Bereich lokalisiert ist, der in SCLC-Tumoren häufig deletiert ist (3p21), wäre ein Verlust der Expression in solchen Zelllinien zu erwarten. In 70% der untersuchten SCLC-Zelllinien war jedoch eine Ron-Expression nachweisbar. Eine *de novo* Expression ist im Fall der Lim-Kinase in einigen Zelllinien zu

beobachten. Zwar ist eine Expression von Lim-Kinase in Lunge beschrieben worden (Ohashi et al., 1994), die untersuchten NHBE-Zellen jedoch wiesen keine Expression auf. c-kit konnte, wie in der Literatur bereits beschrieben (Hibi et al., 1991; Sekido et al., 1991), nur in Linien kleinzelligen Ursprungs detektiert werden. Eine schwache Expression von c-kit konnte ebenfalls in NHBE-Zellen detektiert werden, eine geringe Expression ist in normaler Lunge bereits beschrieben worden (Hibi et al., 1995). Die Ergebnisse stimmen damit mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein.

Die auffälligsten Ergebnisse betrafen die Rezeptoren der Axl-Kinasefamilie (siehe Tab. 1, Tab. 2 und Tab. 3). Es konnte gezeigt werden, daß alle Mitglieder der Axl-Kinasefamilie in Bronchialkarzinomlinien exprimiert wurden. Auch in den normalen Bronchialepithelzellen war eine Expression aller drei Kinasen nachzuweisen. In nahezu allen Zelllinien konnte, im Vergleich mit der Expression in NHBE-Zellen, eine deutliche Überexpression von cMer detektiert werden. Dies stimmt mit Beschreibungen anderer Autoren (Graham et al., 1994 und 1995) überein, die eine Expression in normaler Lunge und einer Bronchialkarzinomzelle fanden. Tyro3, dessen Expression bisher in Lunge nicht bekannt war, zeigt keine großen Auffälligkeiten in seiner Expression. Es war sowohl in NHBE-Zellen als auch in kaum veränderter Quantität in sämtlichen Zelllinien nachzuweisen. In Fall der Axl-Kinase ließ sich eine bisher nicht bekannte Expression ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs belegen. Dort war es in mehr als 50% der Zelllinien zu finden. SCLC-Linien wiesen, im Vergleich mit NHBE-Zellen, einen Verlust der Expression auf. Axl wird damit histiotypisch exprimiert. Ein alle NSCLC Histiotypen einschließender Marker war bis dahin nicht bekannt.

Die Analyse demonstrierte, daß alle untersuchten Zelllinien mehrere der als onkogen beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen abweichend von dem als physiologisch angenommenen Kontext der NHBE Zellen exprimieren. Der Befund einer „Fehl“-Expression vieler solcher Rezeptoren kann als ein Hinweis auf die Dedifferenzierung und die Transformigenität dieser Zellen angesehen werden. Inwieweit dies ihre Tumorgenität oder Malignität beeinflusst, ist jedoch kaum abzuschätzen.

4.2 Co-Expression onkogener Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden

Da Veränderungen im Expressionsmuster von Liganden von signalübertragenden Rezeptoren eine modulierte Zell-Zell-Kommunikation und damit eine veränderte zelluläre Reaktion nach sich ziehen können, kann die Transformation von Zellen auch durch eine modulierte Ligandenexpression begünstigt bzw. ausgelöst werden.

Für viele der Wachstumsfaktoren ist ein transformierender, proliferativer Einfluß auf Lungenzellen bekannt, so daß von einem stimulierenden Effekt dieser Faktoren auf die untersuchten Zelllinien ausgegangen werden kann (Liu et al., 1990; Rubin et al., 1991; Rygaard et al., 1993; Weidner et al., 1993; Liu und Tsao, 1993; Itakura et al., 1994; Shiratori et al., 1995; Singh-kaw et al., 1995). Interessanterweise können die Überstände (serumhaltige konditionierte Medien) von Wachstumsfaktoren exprimierenden Zelllinien die Etablierung von Zelllinien aus Primärtumoren ermöglichen. Primärtumorzellen ohne solche konditionierten Medien sind hingegen häufig nicht in der Lage, Zelllinien zu bilden (Siegfried und Owens, 1988). Die Bedeutsamkeit und Potenz solcher Wachstumsfaktoren wird durch derartig Versuche demonstriert.

Die Untersuchung der Expression von Wachstumsfaktoren, die onkogene Rezeptortyrosinkinasen stimulieren können, zeigte, daß alle untersuchten Zelllinien mehrere solcher Peptide exprimierten. Dabei unterschied sich die Expressionsstärke in nahezu allen Fällen von der als der normalen Bronchialepithelzellen. Aber auch ein Verlust der Expression konnte beobachtet werden (siehe Tab. 4).

Eine Fehl-Expression der an die EGF-Rezeptoren bindenden Faktoren TGF α , Amphiregulin und Heregulin konnte häufig beobachtet werden. Dies trifft auch für den SCF zu, der individuell unterschiedlich nachzuweisen war. HGF war in nur wenigen Linien *de novo* exprimiert, in Übereinstimmung mit der Literatur (Rygaard et al., 1993; Singh-kaw et al., 1995). MSP, SCF, Gas6 und Protein S wiesen hauptsächlich eine nicht als physiologisch angenommene Expressionsstärke auf.

Korreliert man die Expression dieser Liganden mit der mittels RT-PCR durchgeführten Expressionsanalyse onkogener Rezeptortyrosinkinasen (siehe Tab. 5), kann davon ausgegangen werden, daß alle untersuchten Zelllinien die Möglichkeit besitzen, autokrin mehrere untersuchte Rezeptor-Liganden-Interaktionen einzugehen. Die Zelllinien haben so die Möglichkeit eines größtenteils von exogenen Faktoren unabhängigen Wachstums.

Mehr als die Hälfte der Zelllinien verfügte über den EGF-Rezeptor und seine Liganden TGF α und Amphiregulin, unabhängig von ihrer histologischen Einteilung. Auch eine Co-Expression von erbB3 und Heregulin konnte in einigen Linien nachgewiesen werden, häufiger in NSCLC - als in SCLC-Linien. Ein Nachweis einer erbB4 Expression war in den Karzinomlinien nicht möglich. Auch normale Bronchialepithelzellen (NHBE) verfügten über die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation über den EGF-Rezeptor und seine beiden Liganden und zusätzlich, im Gegensatz zu den Tumorzelllinien über eine mögliche autokrine Schleife mittels erbB4-

Rezeptor und Heregulin, jedoch nicht, wie viele Karzinomzelllinien, über eine über den erbB3-Rezeptor vermittelte, da diese Zellen ein erbB3 exprimieren.

Eine autokrine Stimulation über den Met-Rezeptor scheint in Bronchialkarzinomzelllinien keine Rolle zu spielen, da von allen untersuchten Zelllinien lediglich eine SCLC-Linie in der Lage war, mRNA für ein autokrines Met-HGF-System zu synthetisieren. Dies ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Befunden, die das Vorkommen von autokrinen Schleifen über Met und HGF in Lungentumoren bestätigen (Itakura et al., 1994), diese jedoch in nur 5% der untersuchten SCLC-Linien belegen können (Rygaard et al., 1993). Eine Autokrinie über Met und HGF wurde, in Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit, in normalen Bronchialepithelzellen nicht gefunden (Shing-kaw et al., 1995). Hingegen ist ein Einfluß über Ron und MSP auf Bronchialkarzinomzelllinien denkbar, da mehr als ein Drittel aller untersuchten Linien beide Komponenten exprimierten. NHBE-Zellen verfügten nicht über die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation über Met-Rezeptoren.

Da in der Bronchialkarzinomzelllinien und NHBE-Zellen ein mRNA-Nachweis von GDNF nicht möglich war, ist eine Stimulation des Rezeptors durch autokrine Ligandenbindung in den untersuchten Zelllinien unwahrscheinlich. Für den c-kit-Rezeptor ist, auf Grund seines histiotypischen Auftretens, eine Autokrinie nur in 60% der SCLC-Zelllinien denkbar. Dies deckt sich mit bereits veröffentlichten Befunden (Hibi et al., 1991; Rygaard et al., 1993). Sowohl Ret/GDNF als auch c-kit/SCF werden nicht von NHBE-Zellen co-exprimiert.

Zusätzlich konnte, neben den bekannten autokrinen Systemen im Bronchialkarzinom, in der Mehrzahl der Zelllinien eine Co-Expression der Axl-RTK-Familienmitglieder und Gas6/Protein S-Liganden gezeigt werden (siehe Tab. 8). So sind 5/22 (NSCLC 42%, SCLC 0%) Linien mit Axl und Gas6, 13/22 Linien mit Tyro3 und Gas6 (NSCLC 42%, SCLC 80%) bzw. 13/22 Linien mit Tyro3 und Protein S (NSCLC 75%, SCLC 40%) und 16/22 Linien mit cMer und Gas6 (NSCLC 67%, SCLC 80%) in der Lage, sich autokrin zu stimulieren.

Aufgrund einer Expression von Axl ausschließlich in NSCLC-Zelllinien kann eine Co-Expression mit Gas6 nur in einem Teil dieser Zelllinien beschrieben werden.

Interessanterweise bilden NHBE-Zellen ebenfalls die Rezeptoren der Axl-Familie und die Liganden Gas6 und Protein S. Dies ist bislang nicht beschrieben und könnte ein zusätzliches wichtiges Autoregulationsglied, insbesondere für NSCLC, darstellen. Allerdings läßt sich nicht sicher sagen, ob und in welcher Weise die Autokriniemöglichkeiten *in vivo* genutzt werden. Es ist nicht gesichert, daß alle Rezeptoren durch Gas6 aktiviert werden. Es konnte zwar gezeigt werden, daß Gas6 eine deutlich höhere Affinität zu Axl als zu cMer hat, da cMer

aber in fast allen Linien stark überexprimiert ist, ist hier ein Einfluß, auch durch eine Aktivierung des Rezeptors durch Dimerisierung in Folge der Überexpression durchaus denkbar (Chen et al., 1997). Welche Bedeutung die histiotypische Axl-Expression hat, ist spekulativ. Beachtenswert ist, daß alle drei Kinasen in die Embryonalentwicklung involviert sind (Ohashi et al., 1994; Mark et al., 1994; Bellosta et al., 1995; Graham et al., 1994 und 1995). Die veränderte Expression könnte ein Zurückgreifen auf embryonale Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsmechanismen sein, die einen Selektionsvorteil für die Tumorzellen bieten.

Ein natürlich gewonnenes Chemotherapeutikum, *pau d'arco*, das Lapachol enthält, hat die Wirkung eines Vitamin K-Antagonisten. Da Vitamin K allerdings notwendig ist um Gas6 vollständig zu aktivieren und ein lebensverlängernder Effekt in Patienten mit SCLC und Colontumoren beobachtet wurde, wird vermutet, speziell im Fall der Colonkarzinome, für die eine Überexpression von Axl beschrieben wurde, daß die Carboxylierung von Gas6 unterdrückt wird und somit die Transduktion wachstumsstimulierender Signale vermindert wird (Dinnen et al., 1997). Da aber SCLC-Tumoren, wie die Befunde an den Bronchialkarzinomlinien zeigten, offensichtlich kein Axl exprimieren, muß der beobachtete Effekt auf andere Interaktionen Vitamin K regulierter Proteine mit Rezeptoren zurückzuführen sein. Denkbar wäre z.B. eine Gas6-Interaktion mit cMer oder Tyro3, die auch in SCLC-Linien nachgewiesen werden konnten. Über die biologische Wirkung dieser Rezeptoren in Lungentumoren ist jedoch nichts bekannt. Lediglich eine starke Überexpression von cMer, das allerdings nur mit geringer Affinität Gas6 als Liganden bindet (Nagata et al., 1996; Chen et al., 1997), konnte beobachtet werden.

Der Nachweis, daß normale Bronchialepithelzellen in der Lage sind, viele der untersuchten autokrinen Wege zu nutzen, war unerwartet. Eine kontrollierte autokrine Stimulation normaler Zellen ist jedoch bekannt und hängt in diesem Fall wahrscheinlich mit der hohen Erneuerungsrate des Gewebes im Bronchialtrakt zusammen. Da die untersuchten NHBE-Zellen allerdings nicht direkt dem Bronchialepithel entnommen, sondern zur weiteren Vermehrung als Primärkulturen gezüchtet wurden, kann auch eine Reaktion der Zellen auf die veränderte Umgebung als Folge der Kultivierung nicht ausgeschlossen werden (Liu und Tsao, 1993). Da innerhalb des Bronchialepithels neben Epithelzellen auch andere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten existieren, sind solche Gewebeverbände physiologisch darauf angewiesen, über parakrine Wege auf neue Gegebenheiten in ihrer Umgebung mit verändertem Verhalten zu

reagieren (Siegfried und Owens, 1988). Es ist denkbar, daß die Isolation und kurzzeitige Kultivierung einzelner Zelltypen aus einem Gewebeverband heraus solche Zellen veranlaßt, durch nicht mehr vorhandene Signale und Rückkopplungen anderer Zelltypen dies als Veränderung zu registrieren, und sie infolgedessen sie ihrerseits ihre Signale verändern. Die Beobachtung, daß Primärtumoren verglichen mit den aus ihnen etablierten Lungenkarzinomzelllinien grundsätzlich niedrigere Spiegel an Wachstumsfaktoren und Rezeptoren aufwiesen, unterstützt diese Behauptung, daß die Kultivierung von Zellen artifizielle Reaktionen auslösen kann (Liu und Tsao, 1993).

Die Beobachtung, daß Tumorzellen häufig mehrere autokrine Stimulationsmöglichkeiten besitzen, mag an der Etablierung permanenter Linien liegen. Da jene Zellen am besten wachsen, die möglichst viele autokrine Schleifen benutzen, steht der gewonnene Selektionsvorteil aufgrund einer autokrinen Wachstumsstimulation bei der Anzucht und Selektion von (nicht SV40 transformierten) Zelllinien im Vordergrund und wird zur Selektion autokriner Klone führen (Liu und Tsao, 1993). Gerade die Bedingungen einer Zellkultivierung wird zur Selektion einer besonders schnell wachsenden Zellpopulation führen. Da in Kulturzellen verstärkt solche Autokriniemechanismen angetroffen werden, ist davon auszugehen, daß eine positive Selektion der Zellen bezüglich autokriner Stimulation stattgefunden hat, gleichzeitig aber auch als eine Adaption an die neue Umgebung nicht ausgeschlossen werden kann (Liu und Tsao, 1993). So konnte gezeigt werden, daß Primärtumorzellen, die spontan in der Lage waren Zelllinien zu formen, eine deutliche erhöhte TGF α und Met Expression aufwiesen als Tumorzellen, die keine Linien bildeten. Zusätzlich waren vor allem solche Zellen in der Lage Nacktmaustumoren zu bilden, die eine hohe Met Expression zeigten (Liu und Tsao, 1993).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle untersuchten Tumorzelllinien über mehrere Rezeptor-Ligandensysteme verfügen, die ihnen die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation boten. Solche autokrinen Schleifen liefern Zellen *in vitro* und *in vivo* Selektionsvorteile, so daß das Auftreten vieler solcher Autokriniemechanismen sicherlich die Genese eines Tumors positiv beeinflusst. Sie sind zusätzlich Ausdruck des transformierten Charakters der untersuchten Zelllinien.

4.3 Die Axl-Rezeptortyrosinkinasefamilie in Bronchialkarzinomzelllinien

Die Mitglieder der Axl-RTK-Familie bilden aufgrund ihres extrazellulären Aufbaus eine eigene Familie von Rezeptortyrosinkinasen, die alle onkogenes Potential besitzen. Die *in vitro* auslösbare, neoplastische Transformation scheint vor allem auf die Überexpression des

jeweiligen Proteins zu beruhen. So konnte u.a. im Epithelgewebe von Brusttumoren eine erhöhte Expression von Tyro3 detektiert werden (Taylor et al., 1995). Eine Axl-Expression wurde in Tumorproben metastasierter Sarkome (Weiner et al., 1994), in soliden Tumoren des Kolons (Craven et al., 1995) und in Ösophagustumoren (Nemoto et al., 1997) detektiert. Die Expression von cMer fand man in neoplastischen B- und T- Zelllinien und lymphoiden Erkrankungen (Graham et al., 1994 und 1995), aber auch in der Entwicklung von Glioblastomen scheint cMer eine Rolle zu spielen (Ling und Kung, 1995). Eine Expression der Axl-Kinasefamilie in Bronchialkarzinomen war, mit Ausnahme von cMer, bislang nicht bekannt.

4.3.1 Funktion der Axl-Kinase in Bronchialkarzinomzelllinien

Axl konnte als transformierende Rezeptortyrosinkinase in verschiedenen Geweben identifiziert werden. Die Fähigkeit der Transformation von Zellen durch Axl ließ sich auf eine verstärkte Tyrosinkinaseaktivität der zytoplasmatischen Rezeptorregion zurückführen, Grundlage der transformierenden Wirkung ist jedoch eine Überexpression (O`Bryan et al., 1991; Burchert et al., 1998). Ob Axl eigenständig, das heißt nach Bindung eines Liganden und Autophosphorylierung, diese Wirkung entfalten kann, scheint zelltypabhängig zu sein. So ist das Vorhandensein eines nicht näher identifizierten Proteins pp190 notwendig, um bestimmte Zellen zu transformieren (Burchert et al., 1998).

Als Ligand für Axl wurde Gas6, ein Protein mit großer Homologie zu Protein S identifiziert. Eine Bindung von Gas6 an Axl initiiert die intrazelluläre Kinaseaktivität. Neben einer Reihe von normalen Geweben konnte eine Axl-Expression auch in einigen Tumoren nachgewiesen werden.

4.3.1.1 Histiotypische Expression von Axl in Bronchialkarzinomzelllinien

Um die Rolle von Axl in Lungentumoren zu untersuchen, wurde die Genexpression und Proteinsynthese in 23 humanen Bronchialkarzinomzelllinien unterschiedlichen histologischen Ursprungs und in normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) untersucht. Die Analysen zeigten, daß Axl in 7/12 NSCLC-Linien unterschiedlicher histologischer Subtypen (2/2 SCC; 2/3 LCC; 3/7 ADC) exprimiert wird. Verglichen mit NHBE-Zellen zeigten über 50% der NSCLC-Zelllinien eine Überexpression von Axl. In kleinzelligen Karzinomlinien hingegen ließ sich keine Axl-Expression belegen, verglichen mit NHBE Zellen weisen diese Zellen einen Expressionsverlust auf (siehe Tab. 6 und Tab. 7). Ein ausschließlich in allem Subtypen

des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms exprimiertes Gen war bislang nicht bekannt. Axl kann somit als Marker für diese Klasse von Bronchialkarzinomzelllinien dienen.

Das ausschließliche Vorkommen von Axl in einer tumorbiologischen Untergruppe läßt auf eine Beteiligung an der Differenzierung von Bronchialkarzinomen schließen. Da Axl an Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist, und somit einen Einfluß auf die Zellaggregation hat (Bellosta et al., 1995), ist in diesem Zusammenhang das unterschiedliche Wachstum der untersuchten Zellen bemerkenswert. Während NSCLC-Linien angeheftet wachsen, sind SCLC-Linien nicht in der Lage, sich an verschiedene Substrate anzuheften. Über einen Einfluß von Axl auf diese Zell-Matrix-Interaktionen beim Bronchialkarziom kann nur spekuliert werden. Es konnte allerdings in anderen Zellsystemen gezeigt werden, daß eine Axl exprimierende monoblastische Zelllinie in der Lage war, an unterschiedliche Substrate nach Zugabe von Gas6 und Ca^{2+} zu binden. So konnte die Gas6 und Ca^{2+} -abhängige Adhärenz dieser Zellen an Phosphatidylserin gezeigt werden. Gleichzeitig ließ sich jedoch ein unabhängiges adhärentes Wachstum auf Phosphatidylinositol beobachten. An Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin waren diese Zellen, auch in Anwesenheit von Gas6 und Ca^{2+} , nicht in der Lage sich anzuheften (Nakano et al., 1997). Ein Einfluß von Axl auf das phänotypische Wachstumsverhalten in den untersuchten Zelllinien war damit nicht auszuschließen. Sollte Axl in Bronchialzellen Zell-Matrix-Kontakte vermitteln oder unterstützen, so könnte der Verlust von Axl in SCLC-Linien nicht nur deren nicht-adhärentes Wachstum erklären, sondern auch in Zusammenhang mit dem deutlich höheren Metastasierungspotential dieser Zellen, aufgrund fehlender Zell-Matrix-Kontakte, im Vergleich mit NSCLC-Tumoren stehen.

Da viele der NSCLC-Linien eine Axl-Überexpression aufwiesen und die onkogene Wirkung von Axl vor allem durch eine solche ausgelöst wird, ist ein Axl-vermittelter Effekt auf diese Zellen wahrscheinlich. Auch die bisher bekannten Funktionen der Axl Kinase, ein Apoptoseschutz unter Wachstumsfaktormangel-Bedingungen und eine Stimulation der Proliferation, sprechen für einen Einfluß von Axl, da Zellen so einen Selektionsvorteil gewinnen.

4.3.1.2 Axl-Expression in Lungentumorgewebe

Für Axl konnte gezeigt werden, daß das Gen in hochgradigen Colonkarzinomen stark überexprimiert ist (Craven et al., 1995). Bis heute ließen sich keine genomischen Veränderungen wie Mutationen oder Rearrangements beobachten, in untersuchten Tumoren war das Axl-Gen durch Überexpression aktiviert (O`Bryan et al., 1991).

Da über die Expression von Axl in Lungentumoren nichts bekannt war, wurden Lungentumoren auf ihre Axl Expression hin untersucht. An aus Gewebeschnitten isolierter mRNA wurde mit Hilfe der RT-PCR ein Axl-Expressionsnachweis durchgeführt. Alle auf diese Weise untersuchten Tumorproben enthielten Axl-mRNA. Aufgrund des gewählten Verfahrens, der Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorschnitten, war nicht zu unterscheiden, ob die detektierte mRNA von Tumorzellen oder Zellen des Umgebungsgewebes exprimiert wurde. Eine Aussage kann deshalb nur hinsichtlich des gesamten Tumorgewebes, nicht aber speziell die Tumorzellen betreffend, gemacht werden. Dies ist nur mit einem direkten Nachweis an Tumorzellen möglich, wie z.B. durch einen immunhistochemischen Antikörpernachweis. Die Austestung des aus Kaninchen gewonnenen Antikörperserum an Nacktmaustumoren und paraffineingebetteten Lungentumorgewebe führte zu keinem spezifischen Signal. Es muß, aufgrund der Befunde an den Zelllinien, davon ausgegangen werden, daß der Antikörper nicht in der Lage ist, an Axl-Protein in paraffineingebetteten Material zu binden. Damit bleibt offen, ob die mit der RT-PCR nachgewiesene Expression von Tumorzellen oder von Zellen des Umgebungsgewebes ausgeht.

4.3.1.3 Regulationsmechanismen der Axl RTK durch posttranskriptionale Prozessierung

Über die Regulierung der Axl-Kinase Aktivität ist wenig bekannt. Zwar ist eine Stimulation der Axl-Kinase mit Gas6 bekannt, man weiß jedoch kaum etwas über die Mechanismen der Inaktivierung. Eine Regulation der Kinaseaktivität kann über eine Regulierung der Rezeptordichte oder einen transkriptionell regulierenden Mechanismus ablaufen (O`Bryan et al., 1994; Costa et al., 1996). Die Expression von Axl, und damit die Möglichkeit zur Aktivierung der Kinase über das Vorhandensein des Rezeptors, kann auf Transkriptionsebene einer Kontrolle unterworfen sein. Auch posttranskriptionale Prozesse, wie eine veränderte mRNA Halbwertszeit oder ribosomale Kontrollmechanismen sind denkbar. Ist das Protein jedoch synthetisiert und in der Membran verankert, müssen andere regulierende Kontrollelemente die Kinasefunktion beeinflussen. Hierbei spielen die Halbwertszeit eines Proteins und seine aktive Degeneration eine wesentliche Rolle.

Für die Axl-RTK wurde eine posttranslationale Spaltung in einen extrazellulären, löslichen Teil und einen membranständigen Kinaseteil beobachtet, der unter anderem zur Regulation der Kinaseaktivität dienen könnte (O`Bryan et al., 1994; Costa et al., 1996). Durch den abgespaltenen extrazellulären Teil kann zusätzlich die Verfügbarkeit von Ligand für intakte Rezeptoren eingeschränkt werden, da gezeigt werden konnte, daß der abgespaltene extrazelluläre Teil des Rezeptors in der Lage ist, Gas6 zu binden (O`Bryan et al., 1995; Costa

et al., 1996). Eine Rezeptordichteregulierung ist so ebenfalls möglich. Vermutet wird zusätzlich eine Interaktion zwischen der verbliebenen Kinasedomäne mit vollständigen, ungespaltenen Rezeptoren, die zu einer Aktivierung der Rezeptoren führt.

Die mit aus konditionierten Überständen gewonnenen Proteinen durchgeführten Western-Blot Analysen demonstrierten, daß Bronchialkarzinomzelllinien, die den Axl-Rezeptor exprimieren, diesen auch prozessieren, das bedeutet, daß in den Überständen die lösliche Axl-Form nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 8). Es ist nicht bekannt, welche Protease die Axl-Kinase spaltet (Costa et al., 1996). Sie muß in allen untersuchten Zelllinien vorhanden und aktiv sein, wie die Anwesenheit der löslichen Axl-Form in allen Axl-exprimierenden Linien demonstriert. Die Bedeutung dieser N-terminalen Spaltprodukte in Bronchialkarzinomzellen ist unklar, eine der oben beschriebenen Funktionen liegt jedoch nahe.

4.3.1.4 Axl-Überexpression fördert kein adhärentes Wachstum

Die Korrelation zwischen Axl Expression und adhärentem Wachstum war eines der auffälligsten Merkmale der histiotypischen Expression von Axl. Eine Adhärenz-vermittelnde Funktion von Axl wurde schon wegen des Aufbaus seiner extrazellulären Domäne, die der des N-CAM ähnelt, vermutet (Bellosta et al., 1995). Auch N-CAM hat neben der Funktion als Adhäsionsmolekül einen onkogen transformierenden Charakter und kann die Proliferation von Zellen stimulieren.

Drosophila S2 Zellen, die mit dem Axl-Gen transfiziert wurden, zeigten Zell-Zell-Interaktionen durch homophile Bindung, die mit einer Rezeptoraktivierung und einem Anstieg der Rezeptorphosphorylierung einher ging (Bellosta et al., 1995). Diese Phosphorylierung des Rezeptors wurde dabei durch die Aggregation der Zellen ausgelöst, was demonstrierte, daß Axl nicht nur durch Bindung seines Liganden aktiviert werden kann. Die beobachtete Aggregation der Zellen ist dabei aber unabhängig von der Rezeptoraktivierung, da die Zellen auch verklumpten, wenn die Intrazellulärdomäne deletiert war. Eine Funktion von Axl als Zelladhäsionsmolekül, daß die homophile Interaktion von Zellen und interzelluläre Zellerkennung vermittelt, liegt somit nahe.

Auch der strukturelle Aufbau von Axl mit einer aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen und zwei Fibronektindomänen deutet auf eine Funktion in der homophilen Zell-Zell-Interaktion hin. Dabei scheinen vor allem die Ig-ähnlichen Domänen eine Rolle zu spielen. Allerdings wurde eine Ca^{2+} unabhängige Aggregation beobachtet, eine über Ig-Domänen vermittelte Bindung ist normalerweise davon abhängig. (Bellosta et al., 1995).

In einer anderen Axl-transfizierten myeloiden Zelllinie war die Bildung von Aggregaten wiederum von einer Bindung von Gas6 an den Rezeptor abhängig. Unbehandelte Zellen aggregierten nicht. Die Aktivierung der Kinasedomäne scheint diesen Effekt selbst nicht zu beeinflussen, denn es wurde beobachtet, daß Gas6 auch ohne an einen Rezeptor gebunden zu sein, an Zelloberflächen binden kann und daß Axl-negative Zellen, die mit Gas6 inkubiert wurden, mit unbehandelten, aber Axl-transfizierten Zellen Aggregate bilden können. Damit scheint eine biologische Funktion von Gas6 und Axl in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakte sicher, allerdings bleibt die homotypische Bindung in Frage gestellt (McCloskey et al., 1997).

Doch nicht nur Axl vermittelte Zell-Zell-Kontakte sind beschrieben, sondern, wie schon erwähnt, auch Zell-Matrix-Kontakte an spezifische Substrate, die allerdings teilweise Gas6 und Ca^{2+} abhängig waren (Nakano et al., 1997).

Um zu klären, ob Axl ursächlich für das adhärenzte Wachstum der NSCLC-Linien verantwortlich ist, wurde ein Wildtyp-Axl-Expressionskonstrukt in zwei kleinzellige Linien mit und ohne endogene Gas6 Expression eingebracht. Die Expression von Axl in diesen Zellen führte jedoch nicht zu einer morphologischen Veränderung der transfizierten Zellen. Auch das Vorhandensein des physiologischen Liganden in einer der beiden Zelllinien schien keinen Einfluß auf die Zelladhäsion zu haben. Damit kann Axl nicht ursächlich für das adhärenzte Wachstum von Zellen sein. Ein die Adhärenz unterstützender und verstärkender Effekt, in Anwesenheit weiterer, nicht untersuchter Adhäsionsmoleküle, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.3.1.5 EGF/Axl-Kinase Rezeptorkonstrukt hat keinen wachstumsstimulierenden Effekt

Um eine exogen zu steuernde, sichere Aktivierung eines Rezeptors untersuchen zu können, werden chimäre Rezeptoren konstruiert. Solche Chimären bestehen aus einem extrazellulären Teil eines Rezeptors, dessen Ligand in ausreichender Menge zur Verfügung steht, einer Transmembrandomäne und der Kinasedomäne des zu untersuchenden Rezeptors. Wird nun ein solcher Rezeptor in Zellen transfiziert, läßt sich durch Zugabe des Liganden die Kinasedomäne aktivieren und ein meßbarer, ausschließlich durch die Kinasedomäne des zu untersuchenden Rezeptors vermittelter Effekt studieren. Dabei muß, um Artefakte auszuschließen, sowohl die Funktionalität des Rezeptorchimärs wie auch die Abwesenheit des die extrazelluläre Domäne stellenden Rezeptors in den Zellen gewährleistet sein.

Ein solches chimäres Rezeptorkonstrukt aus EGF-Rezeptor und Axl-Kinase wurde breites von anderen Arbeitsgruppen zur differenzierten Klärung der zellulären Funktion von Axl in der

Myelopoese in eine myeloide Vorläuferzelllinie transfiziert. Die gewählten 32D Zellen, eine IL-3 abhängig wachsende Zelllinie, konnten Wachstumsfaktor-unabhängig wachsen, wenn sie die (aktivierte) Axl-Kinase exprimierten. Die Wildtyp-Axl-Kinase selbst ließ diese Zellen nicht IL-3 unabhängig wachsen und verstärkte auch nicht ihr Überleben unter Abwesenheit des Wachstumsfaktors. Allerdings ließ sich sowohl bei Zellen, die mit dem Wildtyp-Axl-Gen wie auch mit dem chimären Rezeptorgen transfiziert wurden, eine Unempfindlichkeit gegen eine Zelldichtearretierung in G1 beobachten. Diese Zellen wiesen auch im Vergleich mit der Ausgangslinie und Leervektor-transfizierten Zellen ein größeres Zytoplasma auf und zeigten Anzeichen einer Differenzierung zu Promyelozyten und Myelozyten. Ein transformierter Phänotyp war aber, wie schon der mitogene Effekt der Axl-Kinase, abhängig von der Axl-Kinase-Aktivierung durch den Liganden (McCloskey et al., 1994).

Da über die Wirkung der Axl-Kinase im Bronchialkarzinom nichts bekannt war, wurden zur Klärung unter anderem einige der zellbiologischen Studien ebenfalls am Beispiel eines chimären Rezeptormoleküls durchgeführt. Dieses war aus der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors und der Transmembrandomäne und Kinasedomäne des Axl-Rezeptors konstruiert. Der Einfluß der Axl-Kinaseaktivität konnte so in Stimulationsexperimenten untersucht werden, da für Stimulationsversuche des Wildtyprezeptors kein rekombinantes Gas6 zur Verfügung stand. Das Chimär war so konstruiert, daß die Axl-Kinase durch Bindung von EGF an die extrazelluläre EGF-Rezeptordomäne aktiviert wird (Braunger et al., 1998). Damit war die Axl-Kinaseaktivität durch Zugabe von EGF regulierbar. Die Funktionsfähigkeit des Chimärs, die Kinasedomäneaktivierung nach EGF-Stimulation und Dimerisierung des Rezeptors, wurde durch die Arbeitsgruppe von J.W.G. Janssen (Braunger et al., 1998) - der die Expressionsvektoren freundlicherweise zur Verfügung stellte - und Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Autophosphorylierungsassays gezeigt. Die Kinaseaktivierung ist damit auch unabhängig vom Vorhandensein des pp190 Proteins, das als notwendig für die Aktivierung des Wildtyprezeptors postuliert wird. Die Verwendung eines solchen Rezeptorchimärs verhindert zusätzlich einen störenden Einfluß von endogenen Gas6 und die bei einer Stimulation des Wildtyp-Axl-Rezeptors nicht auszuschließende Wirkung auf endogen exprimierte weitere Axl-RTK-Familienmitglieder. Alle transfizierten Bronchialkarzinomzelllinien waren EGF-Rezeptor negativ, so daß auch hier kein Effekt durch Zugabe von EGF auf einen endogen vorhandenen EGF-Rezeptor zu erwarten war.

Um eine Wirkung des Expressionsvektors allein auszuschließen, wurden die Zelllinien zur Negativkontrolle mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert. Diese Zellen zeigten nach EGF Stimulation keine Induktion der Proliferation. Allerdings konnte bei allen transfizierten Zelllinien ein leicht zytotoxischer Effekt nach EGF-Zugabe beobachtet werden, der aber zu keiner Beeinträchtigung der Proliferation der überlebenden Zellen führte. Abgesehen von dieser Wirkung auf die Zellen konnte kein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen stimulierten und unstimulierten Leervektor-transfizierten Zellen beobachtet werden, so daß der Expressionsvektor allein keinerlei Effekt auf das Proliferationsverhalten hatte. Damit können die Ergebnisse der Wachstumskinetiken der mit dem Chimärkonstrukt transfizierten Zellen auf einen Effekt des eingebrachten Rezeptors zurückgeführt werden.

Die Wachstumskinetiken der mit dem Chimärrezeptor transfizierten Zellen zeigte ebenso wie die der Leervektor-Zellen einen leicht zytotoxischen Effekt des EGFs direkt nach Zugabe. Die Wachstumskurven der stimulierten und unstimulierten Zellen unterschieden sich im weiteren Verlauf der Untersuchung nur marginal, so daß das transfizierte Rezeptorkonstrukt keinen mitogenen Effekt auf die Zellproliferation der untersuchten Zellen hatte (siehe Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21).

Da die Funktionsfähigkeit des verwendeten Chimärs demonstriert wurde, bedeutet dieser Befund, daß die Axl-Kinase in Bronchialkarzinomzelllinien keinen Effekt auf die Zellproliferation hat. Eine Wirtszell-spezifische Wirkung von Axl ist in der Literatur vielfach beschrieben worden, so daß Axl zwar die Proliferation von Fibroblasten (3T3-Zellen), Schwannzellen und Leukämiezellen stimuliert (Goruppi et al., 1996; Fridell et al., 1996; Li et al., 1996), diese Wirkung aber auf Bronchialkarzinomzellen nicht hat. Dies deckt sich mit Befunden aus der Untersuchung glatter Muskelzellen, die ebenfalls keine Proliferationsinduktion zeigten (Fridell et al., 1998).

Eine solche Aussage ist aber nicht uneingeschränkt zu machen, da mit einem ähnlichen EGF-Rezeptor/Axl-Kinase-Konstrukt (Extrazellular- und Transmembrandomäne des EGF-Rezeptors, Axl-Kinasedomäne) in IL-3 Zellen beobachtet wurde, daß diese Zellen nach Transfektion und Stimulation eine von Wachstumsfaktor unabhängige Proliferation aufweisen. Wildtyp-Axl-RTK transfizierte Zellen hingegen zeigten diesen Effekt nicht. Ursächlich hierfür konnte gezeigt werden, daß das chimäre Konstrukt andere intrazelluläre Signaltransduktionswege als die Wildtyp Axl-RTK anschaltet. Eine artifizielle Wirkung des chimären Rezeptorkonstruktes ist also nicht auszuschließen.

Das durch die Expression und Aktivierung des Chimärs in IL-3 Zellen induzierte Zellüberleben und der beobachtete mitogene Effekt waren abhängig von der Ras/extrazellulär Signal regulierten Proteinkinase (ERK)-Kaskade. Die verschiedenen Funktionen, Apoptoseschutz bzw. Proliferationsinduktion, von Axl wurden dabei durch unterschiedliche Schwellenwerte der Ras/ERK-Aktivierung hervorgerufen (Fridell et al., 1996). Obwohl der Phosphatidylinositol 3 Kinase-Weg durch des Chimär aktiviert werden kann, schien dieser entbehrlich für die beobachtete biologische Wirkung der Axl-Kinase.

Ist aber eine Ras/ERK-Aktivierung nicht gegeben, so läßt sich durch Gas6 in Axl-Wildtyp-exprimierenden Zellen weder die Apoptose blockieren noch Proliferation induzieren.

Überhaupt scheint der Ras/ERK-Signalweg nicht von einer Gas6-Axl-Interaktion induziert zu werden, obwohl der Rezeptor durch sie phosphoryliert wird.

Die Ursache für die unterschiedliche Wirkung von chimärem Rezeptor und Wildtyp-Axl könnte der Aufbau der Extrazellulardomäne sein, der evtl. entscheidend für die Wahl des Signaltransduktionsweges ist. Es konnte gezeigt werden, daß chimäre Rezeptoren Homodimere bilden, der Axl-Rezeptor aber evtl. auf eine Heterodimerisierung zur Entfaltung seiner Wirkung angewiesen ist. Es ist ebenso denkbar, daß die beobachteten Effekte beide durch die Axl-Kinase vermittelt werden können, jedoch beim Wildtyprezeptor durch unterschiedliche Liganden hervorgerufen werden. Da nur Gas6 bislang als physiologischer Ligand für Axl beschrieben wurde, könnte das chimäre Rezeptorkonstrukt den Effekt eines bislang unbekanntem Liganden nachahmen, denn der mitogene bzw. transformierende Effekt beider Konstrukte (Chimär; Wildtyp) ist völlig unterschiedlich (Apoptoseschutz, Proliferationsinduktion). Die extrazelluläre Domäne eines chimären Rezeptors scheint somit entscheidend die intrazelluläre Antwort verändern zu können (Fridell et al., 1996), auch unphysiologische Reaktionen eines solchen Rezeptors sind nicht auszuschließen.

In wie weit die unterschiedliche Konstruktion der Chimärrezeptoren (die in dieser Arbeit verwendeten besitzen die Transmembrandomäne des Axl-Rezeptors, die in der Literatur untersuchten die des EGF-Rezeptors) eine entscheidende Rolle auf die Aktivierung und Wirkung dieses Chimärs spielt, ist spekulativ. Da aber schon der extrazelluläre Teil eine entscheidende Rolle für die angeschaltete Signaltransduktionskaskade spielt, ist dieser Aspekt nicht außer Acht zu lassen. Es ist aber davon auszugehen, daß ein aus mehreren Axl-Anteilen bestehendes Konstrukt eine physiologischere Übertragung wiedergibt als ein nur mit der Kinasedomäne versehenes. Es bleibt fraglich, ob das chimäre Rezeptorkonstrukt die physiologische Aufgabe von Axl übernehmen kann und ob Befunde über die Wirkung eines

solchen Konstruktes uneingeschränkt zu übertragen sind. Die Ergebnisse von Versuchen mit einem solchen Konstrukt können jedoch Hinweise auf eine Wirkung liefern und sind deshalb durchaus zu beachten.

Wie Ergebnisse zeigten, die nach Abschluß der Experimente für diese Arbeit gewonnen wurden, wird von dem chimären Konstrukt vor allem der Phosphatidylinositol-3 Kinase Weg angeschaltet, wie es in der Literatur (McCloskey et al., 1994; Fridell et al., 1996) beschrieben worden ist. Ob dieser Weg von der Wildtyp-Kinase ebenfalls angeschaltet wird, ist fraglich, da eine Beteiligung des MAP-Kinaseweges in der Literatur beschrieben ist (Bellosta et al., 1997). Für die verschiedenen Wirkungsweisen von Axl werden unterschiedliche Signaltransduktionswege verantwortlich gemacht. So wird diskutiert, ob der mitogene Effekt über den PI3-Kinase Weg vermittelt wird und der Schutz vor Apoptose über die Src-Kinase (Goruppi et al., 1997). Andere Arbeitsgruppen sehen ebenfalls eine mitogene Antwort nach Aktivierung der Axl-Kinase über den PI3-Kinase-Weg (McCloskey et al., 1994: chimäres Konstrukt aus Ratten-EGF-R und humaner Axl-Kinase). Dies würde wiederum bedeuten, daß das stimulierte chimäre Rezeptorkonstrukt in der Lage sein sollte, einen mitogenen Effekt zu vermitteln. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, daß eine starke Überexpression von chimären EGF-R/Axl-Konstrukten durch homophile Bindungen auch zu einer Aktivierung führt (Fridell et al., 1996). Weitere Publikationen berichten jedoch von einer Beteiligung des MAP-Kinaseweges bei der Induktion der Proliferation (Goruppi et al., 1996: endogenes Axl der Maus stimuliert mit rekombinantem humanem Gas6; Fridell et al., 1996: chimäres Konstrukt aus Ratten-EGF-R und humaner Axl-Kinase über ras/ERK). Da in den Bronchialkarzinomzelllinien kein proliferativer Effekt beobachtet wurde, ist davon auszugehen, daß die Axl-Kinase unter den gewählten Bedingungen keinen mitogenen Effekt auf Bronchialkarzinomzelllinien hat.

4.3.1.6 Keine mitogene Wirkung von endogen exprimiertem Gas6 auf Bronchialkarzinomzellen

Neben der transformierenden Wirkung von Axl ist ein mitogener Effekt auf bestimmte Zellen bekannt. So zeigen serumfrei kultivierte NIH-3T3-Zellen eine deutliche Induktion eines S-Phase Eintritts, wenn dem Medium Gas6 zugesetzt wird. Dieser Effekt ließ sich nur in Anwesenheit von endogenem Axl beobachten. Der wachstumsinduzierende Effekt von Gas6 ist allerdings signifikant schwächer als der mitogene Effekt von bFGF oder FKS auf diese Zellen. Die Zugabe von Gas6 zu den gehungerten Zellen induzierte eine starke Axl-Kinaseaktivität mit anschließender MAP-Kinase Aktivierung (Goruppi et al., 1996). Jedoch

war die Aktivierung dieses Signalweges ebenfalls signifikant schwächer als die durch bFGF ausgelöste. Gas6 hatte allerdings eine vergleichbar starke Apoptoseschutz-Wirkung, so daß hierin die wichtigste physiologische Aufgabe von Gas6 und evtl. auch von Axl vermutet wird (Goruppi et al., 1996). Der mitogene Axl-vermittelte Effekt scheint, wie andere Untersuchungen belegten, über die PI3-Kinaseaktivität gesteuert zu werden, wo hingegen der Apoptoseschutz vor allem über die Src Kinase und den MAP-Kinaseweg vermittelt wird (Fridell et al., 1996; Goruppi et al., 1997; Bellosta et al., 1997). Während die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege teilweise von der Anwesenheit von Gas6 abhängig ist, konnte auch eine von Liganden unabhängige mitogene Wirkung von Axl gezeigt werden. Vor allem scheint die Überexpression der RTK für diese Wirkung wichtig zu sein. So konnte eine starke Überexpression allein die Kinaseaktivität auslösen (Bellosta et al., 1995).

Auch ein mitogener Effekt auf Axl und Tyro3 exprimierende Schwanzzellen durch Gas6 wurde beobachtet. Inkubierte man Schwanzzellen mit Gas6, ließ sich sowohl eine Phosphorylierung beider Rezeptoren als auch eine mitogene Antwort der Kulturen beobachten (Li et al., 1996).

Es sind aber auch Zellsysteme (NIH 3T3; hämatopoetische Vorläuferzellen; Fibroblasten des Knochenmarkstromas) bekannt, in denen Axl keinen mitogenen sondern nur einen Apoptoseschutzeffekt hatte (Bellosta et al., 1997). Teilweise war dieser Effekt der Kinaseaktivität dosisabhängig, teilweise ließ sich bei Zellen auch bei starker Überexpression und Ligandengabe kein mitogener Effekt beobachten, so daß die mitogene Wirkung möglicherweise Zellsystem spezifisch ist (Avanzi et al., 1997). Auch auf glatte Muskelzellen hatte Gas6 keinen mitogenen Effekt. Allerdings konnte eine Axl vermittelte Induktion der Migration dieser Zellen durch Gas6 belegt werden. Eine Autophosphorylierung von Axl wurde nach Zugabe von Gas6 in diesen Zellen beobachtet. Ferner konnte gezeigt werden, daß Gas6 als neues Chemoattraktant Axl-vermittelt Migration in glatten Muskelzellen induziert, jedoch keine proliferationsstimulierende Wirkung hatte (Fridell et al., 1998).

Zur Untersuchung eines Effektes von endogenem Gas6 auf Axl-exprimierende Bronchialkarzinomzelllinien wurden Axl-transfizierte Bronchialkarzinomzelllinien (mit und ohne endogener Gas6 Expression) untersucht. Jedoch zeigten die mit der Wildtyp-Axl-RTK transfizierten Zellen keinerlei Veränderung in ihrer Proliferation. Sowohl die isolierte Axl-(Über-)Expression als auch die Expression von Axl mit endogen vorhandenem Gas6 keinen mitogenen Effekt auf die Zelllinien hatte (siehe Abb. 22). Da vor allem die durch Überexpression beschriebene Aktivierung der Axl-Kinaseaktivität einen möglichen

proliferativen Effekt zeigen sollte, bleibt die Wirkung des Gas6-Axl Rezeptor-Ligandensystems in Bronchialkarzinomzelllinien unklar. Die Co-Expression von Axl und Gas6 ist in vielen der untersuchten NSCLC-Linien und NHBE-Zellen belegt. Eine bis jetzt nicht bekannte physiologische Aufgabe ist damit wahrscheinlich, sie ist aber weder mitogen noch direkt differenzierend, da Axl-transfizierte Zellen keinerlei morphologische Veränderungen zeigten.

Da nicht geklärt ist, ob Axl Homo- bzw. Heterodimere bildet und so evtl. unterschiedliche Wirkungen entfaltet, ist es nicht möglich klarzustellen, ob das Fehlen eines Effekts auf die Abwesenheit eines für eine solche Wirkung nicht vorhandenen Partners zurückzuführen ist. Für einen Einfluß von Axl wird weiterhin das Vorhandensein eines pp190 Proteins postuliert, ohne das einige Zellen nicht in der Lage waren, die Kinase zu aktivieren (Braunger et al., 1998). Da dies erst nach Abschluß dieser Arbeit bekannt wurde, ist nicht untersucht worden, ob die gewählten Zelllinien dieses Protein exprimieren und ob es für die Vermittlung der Axl-Kinaseaktivität durch Gas6 notwendig ist.

4.3.1.7 Proliferation Axl-transfizierter Zellen nach EGF Stimulation

Zellen die mit dem Wildtyp-Axl-RTK Expressionskonstrukt transfiziert worden waren, zeigten ohne Zugabe eines Stimulans keinerlei Veränderungen in Morphologie und Wachstum gegenüber Zellen, die zur Negativkontrolle mit einem Expressionskonstrukt ohne Insert transfiziert wurden. Auch endogen exprimiertes Gas6 führte keine Veränderung bezüglich Aussehen und Proliferationsverhalten herbei. Zellen, die mit einem chimären EGF-Rezeptor/Axl-Kinase Konstrukt transfiziert wurden, wiesen keine Modifikation in Morphologie und Wachstum, unabhängig von der Anwesenheit des aktivierenden Liganden EGF, auf. Parallel dazu wurden auch die Wildtyp-Axl transfizierten Zellen mit EGF stimuliert und eine Wachstumskurve erstellt.

Dabei konnte in mehreren unabhängigen Versuchen gezeigt werden, daß die Zellzahl Wildtyp-Axl transfizierte Zellen, deren Medium EGF zugesetzt wurde, deutlich schneller zunahm als Axl transfizierte Zellen, deren Medium kein EGF zugesetzt wurde (siehe Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21). Die mit EGF stimulierten Zellen zeigten autonomes Wachstum, das nur vom Liganden und nicht mehr von anderen Wachstumsfaktoren abhängig war.

Ein Einfluß von endogenem Gas6 und anderen bekannten Gas6 bindenden Axl-RTK-Familienmitgliedern konnte, wie schon diskutiert, ausgeschlossen werden. EGF scheint damit auf Axl transfizierte Lungentumorzelllinien eine stark mitogene Wirkung auszuüben.

Unterschiede zwischen den transfizierten SCLC-Linien und der NSCLC-Linien ließen sich jedoch beobachten. Während die SCLC Linien über die gesamte Dauer des Beobachtungszeitraumes diesen EGF abhängigen Effekt zeigten, war eine mitogene Wirkung des EGFs in den NSCLC-Linien nur in den ersten Tagen deutlich zu beobachten. Da sich die Proliferation der NSCLC-Linie durch Serumentzug nicht vollständig unterdrücken ließ, ist dieser Effekt wahrscheinlich auf eine EGF-unabhängige Dichtearretierung der Zellen zurückzuführen.

Um sowohl eine Verwechslung mit einem anderen Konstrukt als auch einen Einfluß des möglicherweise durch die Axl-Expression induzierten EGF-Rezeptors auszuschließen, wurde mittels RT-PCR die Expression des EGF-Rezeptors an mRNA aus den transfizierten Zellen überprüft. Die Axl-transfizierten Zellen zeigten weder eine Expression des endogenen EGF-Rezeptors noch EGF-Anteile des chimären Konstrukts.

Aus diesen überraschenden, inzwischen durch Wiederholung der Experimente bestätigten Befunden ergeben sie mehrere mögliche Konsequenzen. Obwohl EGF als Ligand für Axl nicht beschrieben ist, kann von einem EGF-Axl-abhängigen Effekt ausgegangen werden. Es ist dabei an die spekulative Möglichkeit zu denken, daß EGF direkt Axl-Aktivität, etwa durch Bindung beeinflusst. Experimente, die nach Beendigung der Versuche für diese Arbeit durchgeführt wurden, belegten eine starke Aktivierung des MAP-Kinaseweges nach Stimulation der Axl-transfizierten Zellen mit EGF. Eine solcher Anstieg einer durch die aktivierte Axl-Kinase stimulierten MAP-Kinaseaktivität, allerdings mit Gas6 als Ligand, ist bekannt (Bellosta et al., 1997; Goruppi et al., 1996 und 1997; Fridell et al., 1996). Während myeloide Vorläuferzellen der murinen 32D Zelllinie weder eine Induktion der Proliferation noch einen Apoptoseschutz durch die Gas6-Axl-Interaktion erfuhren, ließ sich in Fibroblasten (NIH-3T3) ein mitogener Effekt und ein koordinierter S-Phaseeintritt beobachten. Allerdings scheint der MAP-Kinaseweg, induziert über die Gas6-Axl-Interaktion, dort hauptsächlich die Zellen vor Apoptose unter Konditionen, die keine Proliferation zulassen, zu schützen (Goruppi et al., 1996 und 1997; Bellosta et al., 1997). Dabei ist jedoch zu beachten, daß 3T3-Zellen Mausfibroblasten sind und die beschriebenen Effekte von endogen exprimierten Axl abhängig sind. Das zur Stimulation eingesetzte rekombinante Gas6 jedoch ist aus der menschlichen Sequenz gewonnen. Wie schon bei der Protein S-Tyro3-Interaktion, sind hier speziesabhängige Kreuzreaktion denkbar. Die 32D Zelllinie hingegen wurde mit einem die menschliche Axl-Sequenz enthaltenden Expressionskonstrukt transfiziert und mit rekombinantem humanem Gas6 stimuliert (McCloskey et al., 1994; Fridell et al., 1996). Diese

Axl-Gas6 Interaktion zwischen humanem Rezeptor und humanem Ligand rief jedoch, wie auch in den Bronchialkarzinomlinien (transfiziertes Axl mit endogenem Gas6) keinerlei Veränderung der Zellen hinsichtlich einer mitogenen Induktion oder Transformation hervor. Das den transfizierten Bronchialkarzinomzelllinien zugesetzte humane EGF war jedoch in der Lage, die Proliferation stark zu stimulieren. Es ist somit möglich, daß EGF ein neuer, bisher nicht beschriebener Ligand der Axl-RTK ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings diese Frage nicht abschließend geklärt werden. Da aber der beobachtete Effekt reproduzierbar und die Aktivierung der MAP-Kinase gesichert ist, ist davon auszugehen, daß EGF direkt oder indirekt über die Axl-Kinase eine biologische Wirkung auf Bronchialkarzinomzelllinien hat. Eine private Mitteilung von Prof. Dr. Gullick (London) bestätigte, daß die Existenz eines weiteren EGF-bindenden Rezeptors seit langem postuliert wird, dieser jedoch kein Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie sein kann. Somit ist eine Rezeptor-Liganden-Interaktion von humanem EGF und humanem Axl denkbar. Sollte sich eine solche Beziehung bestätigen, wären somit unterschiedliche, über Axl vermittelte Einflüsse auf Zellen über die Bindung unterschiedlicher Liganden möglich. Für die Interaktion zwischen Axl und Gas6 wurde nur in wenigen Zellsystemen ein reproduzierbarer proliferativer Effekt bzw. ein Gas6 konzentrationsabhängiger Apoptoseschutz beschrieben. Andere Axl exprimierende Zellen reagieren nicht auf die Zugabe von Gas6 (McCloskey et al., 1994; Varnum et al., 1995; Stitt et al., 1995; Goruppi et al., 1996; Nagata et al., 1996; Fridell et al., 1996; Goruppi et al., 1997; Bellosta et al., 1997; Avanzi et al., 1997; Fridell et al., 1998). Weitere Funktionen von Axl sind mit einem neuen Liganden auch in solchen Zellen denkbar.

Neben einem direkten über eine EGF-Axl Interaktion vermittelten Effekt ist es möglich, daß EGF in der Lage ist, in kooperativer Weise die Zellproliferation zu stimulieren. Als Beispiel hierfür ist an einen Synergismus wie zwischen Insulin und EGF in Mausfibroblasten zu denken (Pardee et al., 1981). In diesem Fall wären residuale, in der RT-PCR nicht nachgewiesene EGF-Rezeptoranteile in den untersuchten Linien zu vermuten. Aktivierte Axl-Kinase könnte hier ähnlich der vermuteten Funktion als Apoptoseschutzfaktor (Bellosta et al., 1997; Goruppi et al., 1996 und 1997), die Empfänglichkeit für EGF-vermittelte Proliferation drastisch verstärken. Diese Hypothese sollte sich durch Kontrollversuche mit variablen EGF-Mengen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Axl-RTK sowie Blockadeexperimenten mittels EGF- und EGF-Rezeptor-spezifischen Antikörpern überprüfen lassen.

Da in den humanen Bronchialkarzinomzelllinien kein Effekt von endogenem Gas6 und humanem Axl beobachtet werden konnte, eine Co-Expression dieser beiden Komponenten aber in NHBE Zellen beobachtet wurde, kann, wenn überhaupt, nur von einem unterstützenden Effekt dieses möglichen Rezeptor-Ligandensystems auf Proliferation und Apoptoseschutz ausgegangen werden. Andere Aufgaben dieser Interaktion sind aber möglich. Der stark proliferative Effekt von EGF in Axl-transfizierten Bronchialkarzinomzelllinien hingegen scheint auf eine eindeutige Wirkung hinzuweisen. Inwieweit in Lunge und Lungentumoren ein solches System hinsichtlich der Genese und Progression von Tumoren eine Rolle spielt, ist spekulativ. Aufgrund des beobachteten starken proliferativen Effekts ist ein Einfluß auf die Regeneration des normalen Bronchialepithels, das auf Grund eines ständigen Kontaktes mit der Atemluft und darin enthaltenen Noxen permanenter Erneuerung unterliegt, und die positive Selektion von Tumorzellen durchaus denkbar.

Es ist also möglich, daß Axl zwei unterschiedliche Funktionen besitzt, die möglicherweise ligandenabhängig gesteuert werden. So könnte mit Gas6 als Liganden ein Schutz vor Apoptose bei Wachstumsfaktormangel möglich sein (Goruppi et al., 1996; Bellosta et al., 1997; Goruppi et al., 1997, Fridell et al., 1996; Stitt et al., 1995; Varnum et al., 1995; McCloskey et al., 1994), eine Induktion der Chemotaxis (Fridell et al., 1997), eine Wirkung auf die Adhärenz von Zellen (Avanzi et al., 1997; Nakano et al., 1997; McCloskey et al., 1997; Bellosta et al., 1995), und die Differenzierung hämatopoetischen Gewebes induzieren (Avanzi et al., 1997; Neubauer et al., 1997; Rinke de Wit et al., 1996; Challier et al., 1996; Neubauer et al., 1994). Gleichzeitig könnte aber auch ein mitogener Effekt mit EGF (als Liganden) über Axl vermittelt werden. Die Aktivierung von verschiedenen Liganden würde auch das Anschalten von unterschiedlichen Signalübertragungswegen erklären. Die Gas6 vermittelten Signale könnten über einen anderen Weg weitergeleitet werden als die, die EGF an den Rezeptor vermittelt. Da sowohl eine Aktivierung des PI3-Kinase und des MAP-Kinaseweges für Axl beschrieben sind, ließen sich so auch die unterschiedlichen beobachteten Wirkungen erklären.

Auch die differierenden Effekte des Chimärs und des Wildtyprezeptors ließen sich so erklären. Es könnte möglich sein, daß das in der Literatur beschriebene Chimär (EGF-R extraz. und transm., Axl intraz.) Signalwege angeschaltet hat, die bei einer Axl-EGF Interaktion aktiviert werden. Die Gas6-Axl-Bindung dagegen scheint eine ganz andere intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen. Dies kann allerdings nicht der durch das Chimär aktivierte PI3-Kinaseweg sein, da dieser nachweislich auch von dem in dieser Arbeit

benutzten Chimär aktiviert wird, wie ergänzende Experimente zu dieser Arbeit ergaben, und zu keinerlei Effekt führten.

4.3.2 Protein S-Synthese in Bronchialkarzinomzelllinien

4.3.2.1 Expression des Protein S-bindenden Rezeptors Tyro3

Tyro3 scheint ursächlich in die Entwicklung und Differenzierung von Geweben involviert zu sein (Lai und Lemke, 1991; Ohashi et al., 1994; Mark et al., 1994; Perez et al., 1996). Auch in vielen Geweben und malignen Erkrankungen konnte Tyro3 nachgewiesen werden. Eine fehlregulierte Expression eines solchen an der Kontrolle zellulärer Vorgänge beteiligten Moleküls scheint die Genese und Progression von Tumoren zu beeinflussen. Auch in Bronchialkarzinomzelllinien konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Tyro3-Expression nachgewiesen werden. Eine Expression von Tyro3 in Lunge und Lungentumoren war bis jetzt nicht bekannt. Zusätzlich konnte in vielen der untersuchten Zelllinien nicht nur eine unregulierte Tyro3 Expression beobachtet werden, sondern auch eine Co-Expression mit dem die Kinase aktivierenden Liganden Gas6. Tyro3 besitzt somit die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation mit Gas6 als Liganden. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Wirkungsweisen von Tyro3 ist die Möglichkeit eines Überlebens oder Proliferierens der Zellen unter suboptimalen Bedingungen durch Inanspruchnahme dieses möglichen autokrinen Systems denkbar.

4.3.2.2 Co-Expression von Protein S und Tyro3

Auch die Expression des als Ligand für Tyro3 kontrovers diskutierten Protein S (Stitt et al., 1995; Godowski et al., 1995) konnte in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 11). Die Synthese und Sekretion des Proteins ließ sich aber, mit einer Ausnahme, nur für NSCLC-Linien und NHBE Zellen belegen (siehe Abb. 12). Diese Protein S synthetisierende SCLC Zelllinie ist eine variante Linie, d.h. sie zeigt keine vollständige SCLC-Differenzierung, so daß die Synthese eine Folge ihrer unvollständigen Differenzierung sein könnte. Der spezifische Aktivitätsnachweis des Protein S stellte zusätzlich die Funktionsfähigkeit des sezernierten Proteins heraus (siehe Abb. 14). Protein S wurde somit von Bronchialkarzinomzelllinien als gerinnungsphysiologisch aktiver Faktor sezerniert. Untersuchungen von Resektionsmaterial belegten, daß Protein S auch von Tumoren unterschiedlichen histologischen Ursprungs synthetisiert wurde (siehe Abb. 15). Der Befund, daß Protein S von Lungenkarzinomen exprimiert wurde, ist die erste Beschreibung der

Synthese eines antikoagulatorisch wirkenden Proteins in soliden Tumoren. Zwar konnten bereits unterschiedliche prokoagulatorisch wirkende Faktoren, wie *tissue factor*, ein Faktor X aktivierendes Protein, und der Prothrombin-Aktivator in Lungentumorzelllinien aktiv nachgewiesen werden (Seitz et al., 1993; Shoj et al., 1998), eine Expression antikoagulatorisch wirkender Faktoren war aber, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, in Bronchialkarzinomen nicht bekannt.

Da Protein S auch von nicht tumorigenen NHBE-Zellen *in vitro* und Bronchialepithelzellen, Endothelzellen und Alveolarmakrophagen *in vivo* nachgewiesen werden konnte - dies deckt sich mit Befunden aus der Literatur (He et al., 1995) - ist eine physiologische Aufgabe von Protein S in Lunge nicht ausgeschlossen. Dies läßt auch der Aktivitätsnachweis in den Zelllinien vermuten. Über die Aufgabe von Protein S in diesem Organsystem kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre zum einen eine klassische antikoagulatorische Aufgabe im Lungengewebe, daß aufgrund seiner Aufgabe als Gasaustauschorgan für Erythrozyten stark durchblutet ist und extrem kleine und enge Blutgefäße besitzt. Die Bildung von Thrombosen außerhalb der Kapillaren könnte hier durch Protein S verhindert werden.

Weiterhin ist das Bronchialepithel eines der am meisten von belebten und unbelebten Noxen betroffenen Organe. Eine hohe Erneuerungsrate des Epithels ist deshalb notwendig. Da Protein S auch mitogene Wirkung auf Zellen haben kann (Gasic et al., 1992; Maillard et al., 1992; Phillips et al., 1993; Smiley et al., 1997), wäre eine die Zellproliferation regulierende Aufgabe denkbar. Die mögliche Bindung an eine Rezeptortyrosinkinase gibt einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Beteiligung in die Regulation zellulärer Vorgänge. In Transfektionsexperimenten zeigten Zellen, die mit einem Tyro3-Expressionskonstrukt transfiziert waren, ein Tyro3 abhängiges Wachstum. Zellen, die sowohl mit einem Tyro3- als auch einem Protein S-Expressionskonstrukt transfiziert waren, zeigten eine Vitamin K abhängige autokrine Transformation (Stitt et al., 1995). Vermutlich ist dieser Effekt aber auf eine Kreuzreaktion zwischen unterschiedlichen Spezies zurückzuführen, in der Protein S von Rind und Mensch murines Tyro3 bindet und den Rezeptor phosphoryliert (Stitt et al., 1995; Godowski et al., 1995). Weitere Studien belegten allerdings, daß für humanes Tyro3 nur humanes oder Gas6 der Ratte, nicht jedoch humanes Protein S ein potenter, ein den Rezeptor phosphorylierender Ligand ist. Indes konnte nicht abschließend geklärt werden, ob humanes Protein S überhaupt an humanes Tyro3 binden kann (Godowski et al., 1995; Ohashi et al., 1995; Nagata et al., 1996). Die zur Zeit verfügbaren Daten weisen daraufhin, daß nur Gas6 ein physiologisch relevanter Ligand für Tyro3 ist.

4.3.2.3 Protein S hat keine mitogene Wirkung auf Bronchialkarzinomzelllinien

Eine mitogene Wirkung von humanem, exogen zugefügtem Protein S auf die untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien mit endogener Tyro3 Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Dies kann zum einen mit der kontrovers diskutierten Möglichkeit einer Bindung von Protein S an Tyro3 zusammenhängen (Stitt et al., 1995; Ohashi et al., 1995; Godowski et al., 1995; Nagata et al., 1996). In diesem Fall würde das zugefügte Protein S nicht an den Rezeptor binden bzw. diesen nicht aktivieren und so keine Wirkung entfalten können. Zum anderen kann eine Stimulierbarkeit des gewählten Zellsystems nicht gewährleistet werden. Da kein Tyro3 Expressionskonstrukt zur Verfügung stand, wurden endogen Tyro3 exprimierende Zellen mit und ohne eigener Protein S-Synthese stimuliert. Damit ist dieses System nur eingeschränkt aussagekräftig. Unter den gewählten Bedingungen jedoch hatte die Zugabe von Protein S auf keine der gewählten Zelllinien einen mitogenen oder transformierenden Effekt.

Eine Wirkung von Protein S mit Tyro3 ist allerdings auch ohne Aktivierung der Kinaseaktivität denkbar. Wenn Protein S an Tyro3 binden kann, so kann es dadurch zu einer lokalen Anreicherung von Protein S im Mikromillieu kommen, die wiederum die antikoagulatorisch Wirkung unterstützen kann. Dies könnte bedeuten, daß Tumorzellen diesen Effekt ausnutzen, um neu einsproßende Gefäße zu ihrer optimalen Versorgung offenzuhalten und somit das Tumorstadium und die Neoangiogenese indirekt hinsichtlich eines schnelleren Tumorstadiums beeinflussen können. Der Befund, daß Protein S stark in Gebieten reduzieren Blutflusses, in der Nähe nekrotischer Areale nachgewiesen werden konnte unterstützt diese Hypothese.

4.3.3 Konsequenzen der Interaktionen von Gas6 und Protein S mit RTKs der Axl-Familie

Der Befund, daß Vitamin K abhängige Proteine in die Regulation von Protease-Kaskaden involviert und gleichzeitig als Liganden für RTKs dienen können, war unerwartet. Dies eröffnete die Möglichkeit, daß Proteasen (z.B. Protein C) und Protease-Regulatoren (z.B. Protein S), spezifische Zelloberflächenrezeptoren aktivieren können. Es wäre so möglich, Koagulation mit damit verbundenen zellulären Antworten, die für die Gewebereparatur und das Wachstum benötigt werden, zu vereinen. Auch eine Koordination von Protease-Kaskaden und assoziierte zelluläre Antworten anderer Systeme, die involviert sind in Wachstum und Wiederaufbau des nervösen Systems, wäre so möglich (Stitt et al., 1995).

Paradox erscheint allerdings, daß ausgerechnet ein aus gehungerten Zellen isolierter Faktor ein Ligand für eine Familie von RTKs ist, die an mitogenen Transformationsprozessen beteiligt sind. Es ist fraglich, ob die Wirkung von Gas6, ein aus gehungerten Zellen isolierter Faktor, in den Zellzyklus-arretierten Zellen ursächlich mit dem Wachstumsstopp zusammenhängt. Das Auftreten von Gas6 könnte unter solchen die Proliferation nicht erlaubenden Bedingungen einen durch eine Axl-Interaktion vermittelten Apoptoseschutz der Zellen parakrin oder sogar autokrin vermitteln, dabei jedoch nicht einen Eintritt in die S-Phase auslösen. Dies würde sowohl das Vorkommen von Gas6 in Zellen, die unter Wachstumsfaktormangel kultiviert werden erklären, als auch die Apoptoseschutzwirkung von Axl. Gas6 diene bei unter Wachstumsfaktormangel leidenden Zellen als „Überlebensfaktor“, der seine Wirkung über Axl weiterleitet. Diese Wirkung von Gas6 über die Axl-RTK ist deshalb deutlich von der mitogenen Wirkung zu trennen (Goruppi et al., 1996). In einer myeloiden Zelllinie konnte eine Interaktion von Gas6 und Axl allerdings weder die Zellproliferation unterstützen noch die Apoptose blockieren (Fridell et al., 1996), was eine Wirkungsweise als „Überlebenssystem“ in Frage stellt.

Neben dem teilweise beobachteten Apoptoseschutz hat Gas6 auch eine proliferative Wirkung auf Zellen. So wird durch die mitogene Wirkung von Gas6 auf NIH3T3 Zellen ein koordinierter Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus induziert (Goruppi et al., 1996). Dabei führt die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors durch Dimerisierung. Die phosphorylierten Tyrosine des zytoplasmatischen Teils des Rezeptors assoziieren mit der SH₂-Domäne im Adaptorprotein. Das aktive SHC löst durch Phosphorylierung der Zielproteine den Signaltransduktionsweg der MAP-Kinase aus, das mitogene Signal wird über den ras/raf /MAP-Kinaseweg in den Zellkern weitergeleitet. Dabei muß jedoch die mögliche, bereits diskutierte Spezies-Kreuzreaktion, wie bei Protein S und Tyro3 beschrieben, in Betracht gezogen werden. Andere Studien konnten eine Induktion des MAP-Kinase-Signalweges durch die Mitglieder der Axl-RTK-Familie bestätigen und zeigen, daß Src-Kinasen in die Regulation der Signalübertragung involviert sind, ebenso wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) und die Phospholipase C γ (Fridell et al., 1996; Toshima et al., 1995; Ling et al., 1995).

Auch für Protein S gibt es deutliche Hinweise, daß es außer der negativen Regulation der Koagulation weitere Funktionen hat. So interagiert Protein S mit dem C4b-Bindungsprotein, einem Inhibitor der Komplementkaskade und wirkt mitogen auf glatte Muskelzellen (Gasic et

al., 1992; Hessing et al., 1991). Dieser Hinweis auf eine Rolle von Protein S im Zellmetabolismus wird durch die Befunde verstärkt, daß Protein S auch von Osteoblasten und, in Folge einer Verletzung, von Neural- und Gliazellen exprimiert wird (Maillard et al., 1992; Stitt et al., 1995). Da Tyro3 im Hirn stark exprimiert wird und eine Bindung von Protein S an Tyro3 denkbar ist, könnte hier Protein S direkt in den Metabolismus der Zellen eingreifen. Jedoch muß diese Wirkung von Protein S mit einem Rezeptor noch gesichert werden.

4.4 CD44 Spleißvarianten als histiotypische Differenzierungsmarker des Bronchialkarzinoms

CD44 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das in den meisten Geweben und in einem Großteil der Neoplasien exprimiert wird. Da das Gen alternativ gespleißt werden kann, existieren multiple Isoformen des Proteins, von denen einige mit spezifischen Tumortypen und einem erhöhten Metastasierungsrisiko assoziiert werden (Sy et al., 1997)

4.4.1 Multiple CD44 Isoformen in Bronchialkarzinomzelllinien

Exon-spezifische RT-PCR Nachweise des CD44 Rezeptors an mRNA aus Bronchialkarzinomzelllinien zeigten, daß viele der untersuchten Zelllinien mehrere unterschiedlich gespleißte mRNAs aufwiesen (siehe Tab. 15). Dabei fanden sich in nahezu allen NSCLC-Linien und etwa 50% der SCLC-Linien Transkripte für CD44H oder CD44E (v8-v10). Quantitativ zeigten sich große individuelle Unterschiede zwischen den Linien. Drei Linien (1/12 NSCLC; 2/10 SCLC) wiesen keinerlei CD44 Transkripte auf. Spleißvarianten waren in 8/12 NSCLC und 2/8 SCLC Linien zu finden. NSCLC-Linien zeichneten sich allgemein durch eine starke Expression der Exons v8-v10 aus, die die epitheliale CD44 Form bilden. Da angenommen wird, daß Bronchialkarzinomzellen Abkömmlinge von Zellen des Bronchialepithels sind, stellt diese Expression wahrscheinlich physiologische Gegebenheiten dar.

In den untersuchten NSCLC-Linien traten alle variablen, einzuspleißenden Exons auf; das Exon 5 war jedoch in den SCLC-Linien nicht nachweisbar. Diese Expression von CD44v5 in Bronchialkarzinomzelllinien stellte den deutlichsten Zusammenhang zwischen dem Histiotyp und der CD44 Expression dar. Eine solche tumortypspezifische Expression von CD44v5 ist auch in anderen neoplastischen Geweben zu finden. So scheint die Tumordifferenzierung verschiedener Magenkarzinome mit der CD44v5 Expression in Zusammenhang zu stehen. Dort exprimieren vor allem schlecht differenzierte Tumoren diese Isoform (Harn et al., 1995; Heider et al., 1993). In den Bronchialkarzinomzelllinien hingegen zeigten die

entdifferenzierten SCLC-Linien keine v5 Expression, so daß v5 nicht in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad zu stehen scheint, sondern einen histiotypischen Marker darstellt. Die zur Sicherung der RT-PCR Ergebnisse durchgeführten immunhistochemischen Nachweise der CD44 Varianten bestätigten, mit wenigen Ausnahmen, die Befunde der exonspezifischen RT-PCR Analysen (siehe Tab. 18). Zu diesen Ausnahmen gehörten der fehlende Proteinnachweis bei positivem mRNA Befund in einigen der Linien. Dies kann mit einer translationalen Kontrolle der Zelle erklärt werden, da eine „fehlerhafte“ RNA (u.a. durch sinnwidriges Spleißen) nicht translatiert wird. In drei Fällen konnte das Protein nachgewiesen werden, ohne die entsprechende mRNA nachweisen zu können. Da eine RT-PCR Amplifikation nur über 25 Zyklen erfolgte, die monoklonalen Antikörper aber hoch sensitiv sind, ist die Amplifikation sehr geringer Mengen cDNA nicht ausreichend gegeben. Ein entsprechender mRNA Nachweis konnte in einigen Fällen bei höherer Zyklenzahl gezeigt werden.

4.4.2 CD44 Expression in normalem Lungengewebe

Um die physiologische Situation der CD44 Expression *in situ* zu erfassen, wurde an Schnitten normalen Lungengewebes mit monoklonalen Antikörpern eine CD44 Expression nachgewiesen. Im Drüsengewebe, den Alveoli (Pneumozyten und Makrophagen) und im Epithel der Bronchioli und der Bronchialschleimhaut ebenso wie im Stroma ließ sich eine CD44 Expression detektieren. Dabei war der epitopspezifische Nachweis von CD44 v6 in Zellen der Basalreihe des Bronchialepithels besonders auffällig. Isoformen, die v6 enthalten, waren nur sehr schwach in Bronchioli und Drüsengewebe nachzuweisen, die Basalreihe des normalen Epithels hingegen zeigte eine starke Expression (Abb. 32). Diese stark begrenzte Lokalisierung des Auftretens von v6 läßt auf eine wichtige zellspezifische Funktion schließen. Das physiologische Vorhandensein von CD44 und vor allem des Epitops v6 in der Bronchialschleimhaut gibt einen wichtigen Hinweis auf eine obligate Aufgabe in normaler Lunge, evtl. in Zusammenhang mit der Differenzierung und Spezialisierung der Zellen. Das Vorhandensein dieses Epitops in einigen Tumoren kann einen Hinweis auf den Ursprung der Tumorzellen liefern, aber auch eine fehlregulierte „Differenzierung“ in Richtung spezialisierter Bronchialepithelzellen darstellen.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen eine Expression von CD44H, -v3, -v5, -v6, -v7 und -v10 in Zellen der Basalreihe des normalen säulenartigen Bronchialepithels. Dabei ließ sich die Expression von CD44H auf die Basalreihe des respiratorischen Epithels und das darunterliegende Bindegewebe beschränken. Andere Isoformen hingegen konnten nur im

Epithel nachgewiesen werden. Muköse Drüsen waren generell negativ, nur sehr wenige zeigten eine schwache CD44 Expression. Lymphoide Zellen andererseits zeigten häufig CD44H, allerdings keine Expression von CD44v3 und -v6 (Ariza et al., 1995; Givvehchian et al., 1996).

CD44H konnte zusätzlich zu diesen Zellen auch in Lymphozyten und Alveolarmakrophagen des Parenchyms ebenso wie in einigen intestinalen und epithelialen Zellen nachgewiesen werden (Kasper et al., 1995; Fasano et al., 1997). Die Ergebnisse dieser Gruppen scheinen in einigen Fällen im Widerspruch zu den detektierten Befunden zu stehen. Da viele der Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Biopsiematerial durchgeführt wurden, ist das Ausbleiben einer Detektion der CD44-Expression durch die Wahl des Untersuchungsmaterials zu erklären.

Welche Aufgabe dabei die einzelnen Isoformen einnehmen bleibt unklar, auch das lokale Auftreten von CD44v6-Isoformen läßt sich zur Zeit keiner direkten Funktion zuordnen. Da aber ausschließlich die Basalreihe CD44v6 positiv war, liegt eine Funktion in einem Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Kontakt mit anderen Geweben bzw. der Abgrenzung zu diesen nahe.

4.4.3 CD44 Isoformen in primären Lungenkarzinomen

4.4.3.1 RNA-Expression von CD44 in Tumorgewebe

Die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen, die Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln, ist häufig von dem die Zellen direkt umgebenden Substrat abhängig. Um den Status der CD44 Isoformexpression in Tumoren zu untersuchen, wurden RT-PCR Analysen an isolierter RNA aus Tumorschnitten durchgeführt (siehe Abb. 25). Als Ergebnis fiel eine Expression vielfältiger CD44-Isoformen auf. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Qualität (Expressionsmuster) der CD44 Isoformen zwischen Normalgewebe und Tumoren, unabhängig von der histologischen Differenzierung. Da die zur RNA-Isolierung verwendeten Schnitte nicht nur aus Tumorzellen bestand sondern auch Umgebungsgewebe, das u.a. Entzündungszellen aller Art und Fibroblasten, ist dieses Resultat vermutlich auf die Kontamination von Nicht-Tumorzellen zurückzuführen. Eine RT-PCR Analyse mit aus Tumorschnitten isolierter RNA läßt damit keine Aussage über die Anwesenheit spezifischer Spleißvarianten in Tumorzellen zu.

Dieses Problem, daß ein mit Hilfe der RT-PCR durchgeführter Vergleich der CD44 Expression von normalem Gewebe mit Primärtumoren und Metastasen in nahezu allen Fällen kein Unterschied der CD44 Expression in den Proben zu finden war, wurde durch

Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Washimi et al., 1994; Tarin et al., 1995). Abweichungen wurden nur in der erhöhten CD44 Expression aus einem einer Metastase entnommenen Gewebe beobachtet (Washimi et al., 1994). Aber auch hier wurde Gesamttumormaterial verwendet, so daß von einer mRNA Kontamination des Umgebungsgewebes auszugehen ist.

4.4.3.2 Histiotypische Expression von CD44v6 in NSCLC

Aufgrund der Erfahrungen mit den durchgeführten RT-PCRs an RNA aus Tumorgewebe sind Aussagen über das Vorhandensein von Isoformen auf den Tumorzellen nur möglich, wenn die Tumorzellen selbst beurteilt werden. Zur Untersuchung der CD44 Expression in Lungentumoren wurden Tumorschnitte mit monoklonalen, gegen einzelne Epitope der Isoformen gerichteten Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Serienschritte wurden alternierend mit den jeweiligen Antikörperseren gegen CD44 Isoformen und zur Detektion proliferierender Zellen, mit einem Ki67-Antikörper gefärbt.

Die untersuchten Tumorsubtypen wiesen eine unterschiedliche Reaktivität und Intensität mit dem jeweiligen Antikörper auf. Generell war eine Abnahme der CD44 Expression, unabhängig von der Isoform, in schlecht differenzierten Tumoren zu beobachten.

Deutliche tumorspezifische Unterschiede konnten in der Expression von CD44v6 zwischen den unterschiedlichen histologischen Subtypen beobachtet werden. Plattenepithelkarzinome und Bronchioalveolarkarzinome exprimierten diese Isoform in über 80% der untersuchten Fälle, andere Subtypen hingegen kaum. Die anderen untersuchten Isoformen, wie v5 und v7/8, zeigten kein klares histiotypisches Auftreten in primären Lungentumoren (siehe Tab. 20).

Diese Befunde wurden später durch Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen Biopsiematerial von Plattenepithelkarzinomen ebenfalls eine hohe Expression von CD44H, -v5 und -v6, aber nur eine geringe Expression von CD44v7 und v10 aufwies, belegt (Givehchian et al., 1996).

Die Expression von CD44v6 in SCC könnte die Expression von Basalzellen des normalen Epithels, wie sie auch in der Haut, dem Ösophagus und den Bronchien (Mackay et al., 1994; Heider et al., 1993) gefunden wird, widerspiegeln. Da Epithelien häufig hyperplastische Basalzellen beherbergen, die zu SCC transformieren können (Gazdar und Linnoila, 1988), könnte die v6 Expression in SCC ein konservierter histiotypischer Marker sein.

Vergleicht man die Spezifität von v6 mit anderen gewebespezifischen Markern, wie z.B. dem SCC-Antigen (Picardo et al., 1994) oder dem spr-1 Protein (Tesfaigzi et al., 1995), so ist der prozentuale Anteil von CD44v6 in Plattenepithelkarzinomen der höchste, der bisher

beobachtet werden konnte. Damit bekommt CD44v6 eine besondere Relevanz für die histologische Diagnostik dieses Lungentumortyps.

Eine Evaluation von CD44 Serumspiegeln von Patienten mit NSCLC Tumoren ergab, daß sich die Spiegel der CD44H und CD44v6 Isoformen nicht signifikant von denen benigner Lungenerkrankungen unterschieden. Unterteilte man allerdings die Gruppe der NSCLC nach ihrer Histiotypisierung, so zeigte sich, daß sich der CD44v6 Serumspiegel in SCC signifikant höher war als bei benignen Lungenerkrankungen. Innerhalb der Gruppe der NSCLC Karzinome konnte beobachtet werden, daß eine CD44v6 Expression am häufigsten in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome zu beobachten war, gefolgt von großzelligen Karzinomen und nur in etwa einem Fünftel der Adenokarzinome. Eine histiotypische Assoziation kann damit sogar bei CD44v6 Spiegel von NSCLC-Patienten gefunden werden (Takigawa et al., 1997).

Eine quantitativ und qualitativ deutlich eingeschränkte CD44 Expression von Varianten konnte in den untersuchten Adenokarzinomen nachgewiesen werden. Vergleichende Studien anderer Arbeitsgruppen zwischen SCC und ADC zeigten, daß drei Viertel der SCC CD44v4/5, aber nur ein Fünfzigstel der ADC diese Isoform exprimierten. In nahezu allen metastasierten Tumoren ließ sich CD44v6 nachweisen (Tran et al., 1997). In einer anderen Studie konnte in Adenokarzinomen allerdings kein CD44 nachgewiesen werden, wohl aber in Bronchioalveolarkarzinomen, die eine schwache CD44H Expression aufwiesen (Givehchian et al., 1996). Da in dieser Studie nur Biopsiematerial verwendet wurde, können die gefundenen Unterschiede auf das Vorhandensein nur weniger Zellen in solchen Biopsieproben zurückzuführen sein, da gerade bei den Adenokarzinomen häufig nur ein geringer prozentualer Anteil der Tumorzellen CD44 positiv war.

Das im Vergleich wesentlich geringere und schwächere Auftreten von CD44 in diesem Tumortyp ist funktionell schwer zu deuten. Da die untersuchten Adenokarzinome einen relativ hohen Differenzierungsgrad aufwiesen, ist das verminderte Auftreten von CD44 nicht auf eine schlechtere Differenzierung der Adenokarzinome gegenüber den Plattenepithelkarzinomen zurückzuführen. Vielmehr scheint ein genereller, die histiotypische Auseinanderentwicklung von Zellen beeinflussender Mechanismus vorzuliegen. Aber auch der Erhalt eines Merkmals der Ursprungszellen könnte Ursache der beobachteten unterschiedlichen CD44v6 Expression sein. Dies würde allerdings bedeuten, daß die unterschiedlichen Subtypen des Bronchialkarzinoms aus verschiedenen Zellen des

respiratorischen Trakts entstehen. Es läßt sich jedoch festhalten, daß die durchgängig schwache und geringe CD44 Expression ein Kennzeichen der Adenokarzinome zu sein scheint.

Interessant ist die beobachtete starke Expression von CD44 und CD44v6 in den untersuchten Bronchioalveolarkarzinomen. BACs gelten als ein Subtyp der Adenokarzinome. Sie stellen eine Gruppe gut differenzierter Tumoren mit der Tendenz des Wachstums entlang der oberflächlichen Luftwege dar. Invasives, die pulmonale Architektur zerstörendes Wachstum wird in dieser Gruppe nicht beobachtet (Hammar, 1987). Aufgrund ultrastruktureller Ähnlichkeiten mit Clarazellen bzw. Typ II Pneumozyten gelten diese Zellen als Vorläufer der BACs. Analog zu der v6 Expression in Plattenepithelkarzinomen läßt sich vermuten, daß die v6 Expression der BACs der physiologische Ausdruck eines Merkmal einer bestimmten Gruppe von Vorläuferzellen ist. Da ADCs diese Isoform nicht exprimieren, obwohl eine Abstammung aus der selben respiratorischen Epithelzelle postuliert wird, müssen diese Tumortypen entweder verschieden differenzieren, CD44v6 könnte hier als Differenzierungsmarker gelten, oder beide Tumortypen haben unterschiedliche Vorläuferzellen. Welchen Einfluß die Expression einzelner CD44-Isoformen auf die Entwicklung und Differenzierung der Tumortypen hat, ist aber nur schwer abzuschätzen. Auch andere Studien zeigen eine CD44v6 Expression in mehr als zwei Drittel der Bronchioalveolarkarzinome (Fasano et al., 1997). Diese später publizierten Befunde bezüglich einer histiotypischen Expression des CD44v6 Exons bestätigen vollständig die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Eine relativ starke CD44 Expression konnte in Karzinoiden nachgewiesen werden, jedoch zeigten diese Tumoren nur ein eingeschränktes Auftreten von Spleißvarianten, vor allem v7/8. Großzellige Karzinome wiesen ebenfalls CD44 auf, jedoch oft schwach und nur in einem geringen Anteil der Zellen. Spleißvarianten waren in diesen Tumortyp generell selten zu finden. Auch andere Studien zeigten, daß die meisten großzelligen Karzinome, ebenso wie Karzinoide und alle kleinzelligen Tumoren CD44v6 negativ waren (Fasano et al., 1997).

4.4.3.3 Verlust von CD44 in SCLC

In SCLC-Tumoren war kaum CD44 Expression belegbar, nur in einem sehr geringen Anteil der kleinzelligen Karzinome (unter 5%) war eine CD44 Expression nachweisbar. Die untersuchten SCLC-Tumorzellen wiesen keinerlei Isoformexpression auf. Publikationen

anderer Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls, daß kleinzellige Tumoren CD44 negativ waren (Fasano et al., 1997). SCLC Tumoren scheinen damit, im Vergleich zu allen andern Lungentumortypen, einen generellen Verlust von CD44 aufzuweisen. Ein Verlust der Expression in Tumoren gegenüber dem Normalgewebe konnte ebenfalls in Ovarialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Prostatakarzinomen und einigen Hirntumoren gezeigt werden (Cannistra et al., 1993; Shtivelman und Bishop, 1991; Combaret et al., 1995; Christiansen et al., 1995; Nagabhushan et al., 1996; Fujita et al., 1994).

Da SCLC im Verlauf der Tumorprogression schon in einem sehr frühen Stadium metastasieren, kann der Verlust eines u.a. zur Verankerung dienenden Moleküls die Metastasierung unterstützen. Dies gilt vor allem für CD44H, da CD44H der Interaktion mit Hyaluron dient. Wenn eine solche Interaktion die Verankerung von Zellen im Gewebe bewirkt, kann das Fehlen von funktionellem CD44H dann dazu führen, daß sich Zellen aus hyaluronreichem Gewebe lösen können und somit den Prozeß der Metastasierung in Gang gesetzt wird.

4.4.3.4 Zusammenhang der CD44 Expression mit Differenzierung und Metastasierung

In vielen anderen Tumorgeweben ließ sich eine Korrelation mit der *de novo* Expression varianter Isoformen mit dem Tumortyp oder der Progression zeigen. Ein solcher Zusammenhang zwischen dem Auftreten spezifischer Isoformen mit der Tumorgröße, dem Proliferationsindex oder der Dissemination/Metastasierung des Tumors (TNM-Status) konnte für die untersuchten Lungentumoren nicht belegt werden (siehe Tab. 21). Auch in anderen, sich mit der CD44-Expression und Lungentumoren auseinandersetzender Studien, ließ sich eine Korrelation zwischen der Expression von CD44H und varianten Isoformen mit dem Tumorstadium, erneutem Auftreten oder Überlebensraten nicht erkennen (Tran et al., 1997). Da das Auftreten von CD44v6 mit einem höheren Metastasierungspotential in Zusammenhang gebracht wird, fiel auf, daß vor allem solche Lungentumoren diese Isoform zeigen, die normalerweise nur in einem fortgeschrittenen Stadium metastasieren, wie SCCs und BACs. Zusätzlich ist ein genereller Verlust von CD44 in niedrig differenzierten und früh metastasierenden Tumoren zu beobachten. Das Auftreten von CD44 Varianten in Lungentumoren scheint damit, im Gegensatz zu vielen Befunden anderer Tumoren und Zelllinien, einen positiven prognostischen Marker darzustellen und Zellen mit reduziertem metastatischen Potential zu kennzeichnen.

Dies wird durch Studien bestätigt, die der CD44 Expression eine histogenetische Funktionen im respiratorischen Epithel zuschreiben und ebenfalls den Verlust der CD44 Expression als

die Metastasierung unterstützend beschreiben (Givehchian et al., 1996), bzw. keine Korrelation der CD44v6 Expression mit klinischen Stadien belegen konnten. Aufgrund der histiotypischen Expression von CD44 wird eine unterschiedliche Abstammung der untersuchten Tumortypen postuliert. Eine Expression von CD44 wird von diesen Arbeitsgruppen nicht als notwendig für den Prozeß der malignen Transformation von Bronchialepithelzellen angesehen (Washimi et al., 1994; Fasano et al., 1997). Auch der CD44v6 Serumspiegel von Patienten mit NSCLC korrelierte weder mit dem Tumorstadium noch mit dem Grad der Metastasierung. Der CD44v6 Spiegel kann somit nicht als Indikator für das Tumorstadium oder die Metastasierung dienen, vielmehr scheint für diese CD44 Variante eine histiotypische Assoziation vorzuliegen (Takigawa et al., 1997).

4.4.4 Veränderungen der CD44 Expression in präneoplastischen Geweben

Da die beobachtete generelle CD44 Expression und das histiotypische Auftreten der v6-Isoform Hinweise auf die Differenzierung und evtl. auch den Ursprung der Lungentumoren gab, wurden Präneoplasien auf ihre CD44 Expression hin untersucht. Dies sollte Aufschluß über frühe Vorgänge der malignen Transformation in Bezug auf das Auftreten eines solchen Differenzierungsmarkers geben.

Es ließ sich nachweisen, daß schon Dysplasien eine besonders starke Expression von CD44 und v6 aufwiesen. Auch squamöse Metaplasien und atypische Basalzellhyperplasien zeigten noch eine starke CD44 und v6 Expression. Bei Basalzellhyperplasien und mukösen Zellhyperplasien hingegen war dazu im Vergleich eine leichte CD44 Abnahme zu vermerken, adenomatöse Proben wiesen kaum noch CD44 und v6 auf (siehe Tab. 23). Doch nicht nur eine Abweichung in der Quantität der CD44 Expression war festzustellen, viele der untersuchten präneoplastischen Gruppen zeigten eine Veränderung in der Lokalisation der CD44 Expression. Während in normalem Bronchialepithel eine über alle Zellen des Epithels verbreitete CD44 Expression zu beobachten war, beschränkte sich das Vorkommen von v6 Isoformen ausschließlich auf die Basalreihe. Die Dysplasien und squamösen Metaplasien wiesen ohne diese lokale Beschränkung in allen Schichten des Epithels eine CD44v6 Expression auf (siehe Abb. 33). In squamösen Metaplasien wurde zuvor bereits eine starke CD44 Expression beschrieben (Penno et al., 1994). Auch in den Basalzellhyperplasien, mit und ohne Atypie, war ein mehrreihiges Auftreten von v6 zu erkennen. Die mukösen Zellhyperplasien wiesen, im Vergleich zu den Befunden in normalem Bronchialepithel, kaum Abweichungen in ihrer v6 Expression auf. Die Adenomatosis-Proben zeigten einen CD44

Verlust. Eine sehr frühe, schon im prämaligen Stadium zu detektierende histiotypische Differenzierung der Zellen war offensichtlich.

Diese Befunde belegen bereits frühe Veränderungen im CD44 Expressionsmuster von neoplastischen Umbauten des respiratorischen Epithels. Inwieweit diese Modifikationen schon eine Folge bereits begonnener Umwandlungen oder ursächlich für die neoplastischen Veränderungen sind, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Diese frühen veränderlichen Prozesse der CD44 Expression deuten allerdings auf eine entscheidende Rolle bei der Genese und Progression von Lungentumoren, auch hinsichtlich ihrer Differenzierung hin.

Befunde über das Auftreten der CD44v6-Variante in Assoziation mit der Progression und der Metastasierung von colorektalen Karzinomen betreffen, stützen die Hypothese einer in der Genese und Differenzierung wichtigen Rolle von CD44. Erhöhte CD44v6 Spiegel wurden bereits in benignen adenomatösen Colorektalpolypen und adenomatösen Polypen mit milder Dysplasie nachgewiesen, was den Schluß einer frühen Funktion in der colorektalen Karziogenese nahelegt (Herrlich et al., 1995).

4.5 Relevanz einer histiotypischen Expression von Oberflächenrezeptoren

Die Progression von Tumoren ist von einer Kaskade genetischer Veränderungen begleitet. Die Selektion eines malignen Phänotyps, ein selten vorkommendes Ereignis einer geringen Anzahl von Zellen, ist begrenzt durch eine erfolgreiche und vollständige Akkumulation vieler die Metastasierung unterstützender Aktivitäten, wie u.a. die Überwindung der Apoptose.

Diese schließen die Induktion der Vaskularisierung, das Lösen aus dem primären Tumorgewebe, Invasion in benachbarte Gewebe, die Intravasion der Blut- und Lymphwege und die hämatogene und lymphogene Wanderung zu den „Zielorganen“ ein. Der Erwerb der Fähigkeit, Aggregate zu bilden und die Passage der durch das Endothel gebildeten natürlichen Barriere erlauben es den Tumorzellen, sich in den Kapillaren festzusetzen und sich im Sekundärgewebe anzusiedeln (Fidler, 1995).

Analysen unterschiedlicher Phasen der Tumorprogression ließen die dichte Assoziation dieses Prozesses mit der Aktivität einer Vielzahl von Signalübertragungs- und Adhäsionsmolekülen zutage treten. Dabei wurde klar, daß maligne Zellen die gleichen Gegebenheiten zur Adhäsion und Signalübertragung nutzen, die auch von normalen Zellen zur Unterhaltung ihrer normalen physiologischen Aktivitäten benutzt werden.

Oberflächenrezeptoren spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle. Sie können sowohl der Verankerung der Zellen dienen als auch der Übertragung von Signalen in die

Zelle. Von vielen beschriebenen Rezeptoren ist bekannt, daß sie nicht nur eine Funktion im normalen Metabolismus der Zelle haben, sondern auch in den Prozeß der malignen Transformation und Metastasierung involviert sind. Häufig ist die physiologische Aufgabe dieser Rezeptoren nicht bekannt, man beobachtet nur eine Veränderung ihrer Expression oder Struktur in Tumorzellen. Damit ist es offensichtlich, daß diese Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Genese und Progression des Karzinoms spielen. Es ist jedoch nicht immer klar, welchen Einfluß sie darauf nehmen. Solche Rezeptoren, von denen man nur eingeschränkt ihre Aufgabe in normalen Geweben kennt, deren Expression und Struktur aber in Tumoren verändert ist, sind die Axl-Rezeptortyrosinkinase und CD44. Beide Gene sind involviert in die Entwicklung von Tumoren. Axl spielt in Tumoren des hämatopoetischen Gewebes eine wichtige Rolle, CD44 ist eines der in Tumoren am häufigsten veränderten Gene überhaupt. Über die Rolle dieser Rezeptoren in Lunge war nur wenig bekannt.

Lungentumoren sind eine der heterogensten Tumorgruppen. Sie lassen sich in zwei große Untergruppen aufteilen, kleinzellige und nicht-kleinzellige Tumoren, von denen letztere wiederum in Subtypen zu unterteilen ist. Vor allem zwischen den beiden großen Subgruppen lassen sich Unterschiede in der Expression von Genen, einschließlich denen für Oberflächenrezeptoren, belegen. Welche Rolle diese Unterschiede in der Genese, Entwicklung und Differenzierung der Tumoren spielen, ist jedoch weitestgehend unklar. Wie die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, sind auch die beiden Rezeptoren Axl und CD44 histiotypisch exprimiert. Sowohl CD44, ein an der Adhäsion von Zellen beteiligtes Molekül, als auch Axl, eine an der Signalübertragung involvierte Rezeptortyrosinkinase, lassen sich nur in Zellen nicht-kleinzelliger Tumoren nachweisen. Während Axl generell in solchen Tumorzellen zu finden ist, läßt eine spezielle Isoform des CD44, v6, eine weitere Sub-Differenzierung der NSCLC-Tumoren zu. Im Falle des Axl-Rezeptors konnte der zugrunde liegende Mechanismus nicht geklärt werden, für CD44 allerdings zeigten die Befunde an Präneoplasien eine frühe Beteiligung an Prozessen der malignen Umwandlung. Das histiotypische Auftreten dieser beiden Rezeptoren läßt klar auf eine Rolle in der Differenzierung von Bronchialkarzinomzellen schließen. Diese Befunde haben damit zunächst nur Bedeutung für die Diagnostik von Tumoren, können aber zum weiteren Verständnis der zellbiologischen Vorgänge dieser Tumoren beitragen.

4.6 Probleme und Lösungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine grundlegend unterschiedliche Differenzierung der verschiedenen Typen des Bronchialkarzinoms hin.

Die Bedeutung der histiotypischen Expression Axl-Rezeptortyrosinkinase im untersuchten Zellsystem blieb, auch mit Co-Expression des als physiologisch beschriebenen Liganden, unklar. Es ließ sich weder ein direkter Einfluß auf den Phänotyp noch auf die Proliferation nachweisen. Auch Versuche mit einem EGF-Rezeptor-Axl-Kinase-Rezeptorchimär waren nur bedingt aussagekräftig. Überraschenderweise konnte eine stark mitogene Wirkung in Zusammenhang mit der Axl-RTK und EGF gezeigt werden. Es muß jedoch abschließend geklärt werden, ob die beobachtete Wirkung des EGFs direkt durch Axl vermittelt wird, ob EGF tatsächlich ein physiologischer Ligand von Axl ist, oder ob die Axl-EGF-Synergie indirekt, z.B. in der Form kooperativer Effekte (Adaptorproteine; Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor) stattfindet. Hierzu wären weitere Stimulationsexperimente notwendig. Mit Hilfe eines Axl-Fc Konstrukts soll weiterführend versucht werden, die Wirkung des zugegebenen EGFs aufzuheben. Falls die Bindung von EGF an Axl direkt und nicht über weitere Proteine vermittelt ist, sollte der lösliche Axl-Rezeptor durch kompetitive Bindung den Effekt des zugesetzten EGFs aufheben. Damit soll auch der Zusammenhang einer möglicherweise ligandenabhängigen Wirkung geklärt werden (Gas6 und EGF). Für einen Nachweis von Axl *in situ*, zur Bestimmung der Bedeutung von Axl in Tumoren, sollen u.a. Methoden entwickelt werden, die einen immunhistochemischen Nachweis an Tumorschnitten ermöglichen.

Aufgrund der veränderten CD44 Expression in Präneoplasien soll weiterhin untersucht werden, ob solche Veränderungen ein generelles, sehr frühes Ereignis maligner Lungenerkrankungen sind, oder ob ein verändertes CD44 Expressionsmuster auch in nicht-malignen Lungenerkrankungen zu finden ist. Diese anstehenden Untersuchungen sollen schließlich zeigen, ob die veränderte CD44v6 Expression als Frühmarker dienen kann und ein frühes Ereignis in der Genese maligner Lungenerkrankungen ist.

5 Zusammenfassung

Autonomes Zellwachstum menschlicher Tumoren wird durch eine Reihe auto- bzw. parakriner Mechanismen ermöglicht. Auch das Bronchialkarzinom, die häufigste maligne Erkrankung des Menschen, weist häufig eine solche, von anderen Umweltfaktoren unabhängige, Proliferation auf.

Die Untersuchung potenter autokriner Stimulationswege in Bronchialkarzinomzelllinien zeigte, daß alle verwendeten Zelllinien mehrere Möglichkeiten besitzen, ihr Wachstum über solche autokrinen Wege zu beeinflussen.

Ein auffälliges Expressionsmuster zeigte die Rezeptortyrosinkinase Axl, ein als onkogen beschriebener Rezeptor, der seine tumorgene Wirkung durch Überexpression entfaltet und der durch einen speziellen Aufbau der extrazellulären Domäne gekennzeichnet ist. Axl konnte ausschließlich in Zelllinien nicht-kleinzelligen Ursprungs nachgewiesen werden. In vielen Fällen wurde sie dort, im Vergleich zu normalen Bronchialepithelzellen, überexprimiert. Alle kleinzelligen Linien zeigten keine Expression. In diesen Linien ist folglich von einem Verlust der Expression auszugehen. Ein in allen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Subtypen exprimiertes Gen, das somit als Marker für nicht-kleinzellige Zelllinien dienen kann, war bis dahin nicht beschrieben worden. Ergänzend konnte der physiologische Ligand für die Axl-RTK, das Produkt des *growth arrest specific gene 6*, Gas6, in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Viele der NSCLC-Zelllinien besaßen somit die Möglichkeit zu einer autokrinen Stimulation mit Axl und Gas6.

Als weiterer Ligand der Axl-Rezeptorfamilie konnte, neben der Sekretion von Gas6, zum ersten Mal auch das antikoagulatorisch wirkende Protein S in Lungentumoren nachgewiesen werden. Durch Separation dieses Proteins aus Kulturüberständen verschiedener Zelllinien konnte ergänzend die physiologische Wirksamkeit in einem Protein S-abhängigen Gerinnungstest demonstriert werden.

Um die Funktion des Axl-Rezeptors in Lungenkarzinomen näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Expressionskonstrukte, die das Gen für den Wildtyprezeptor bzw. ein chimäres Rezeptorkonstrukt aus EGF-Rezeptor und Axl-Kinase enthielten, in ausgewählte Zelllinien transfiziert. Die Beobachtung der transfizierten Zellen zeigte, daß die Axl-Kinase

keinen Einfluß auf die Morphologie hat, und mit ihrem endogen exprimierten Liganden Gas6 die Proliferation nicht positiv beeinflussen konnte. Auch der chimäre Rezeptor, so konstruiert, daß die Axl-Kinase durch Stimulation mit EGF aktiviert wird, hatte keine Wirkung auf die Proliferation. Interessanterweise konnte jedoch eine Proliferationsinduktion der mit der Wildtyp-Axl-RTK transfizierten Zellen nach Zugabe von EGF beobachtet werden, so daß EGF einen möglichen physiologischen Ligand der Axl-RTK darstellen könnte.

Einen weiteren wichtigen Bestandteil dieser Arbeit bildeten Untersuchungen des CD44 Rezeptors einschließlich einiger in Zusammenhang mit Tumormetastasierung diskutierten Spleißvarianten. Analysen der CD44 Expression in Bronchialkarzinomzelllinien zeigten, daß in allen Zelllinien Isoformen nachzuweisen waren. Kleinzellige Linien integrierten jedoch nicht das variable Exon v5 in die mRNA ihrer CD44-Rezeptoren. Immunhistochemische Nachweise einzelner Isoformen an Tumorschnitten demonstrierten einen Expressionsverlust in allen kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Innerhalb der Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome hingegen ließ sich eine Sub-Differenzierung in Bezug auf die Expression des Epitops v6 erkennen. Eine starke CD44 und v6 Expression fand sich in Plattenepithelkarzinomen einschließlich angenommener früher Vorläuferstadien. Ferner konnte eine solche Expression von v6 enthaltenden Isoformen auch in Bronchioalveolarkarzinomen belegt werden. In Adenokarzinomen hingegen, ebenso wie in adenomatösen Hyperplasien, war diese Isoform kaum exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen der CD44-Expression und dem Differenzierungsgrad (Grading) bzw. der disseminierten Tumorausbreitung konnte nicht belegt werden. Die sich aus diesen Untersuchungen ergebende frühe histiotypische Differenzierung von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen könnte sowohl von funktioneller als auch von diagnostischer Bedeutung sein.

6 Literaturverzeichnis

- Aaronson, S. A. (1991). Growth factors and cancer. *Science* 254, 1146-53.
- Andre, C., d'Auriol, L., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Galibert, F. (1989). c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene* 4, 1047-9.
- Ankrapp, D. P., and Bevan, D. R. (1993). Insulin-like growth factor-I and human lung fibroblast-derived insulin-like growth factor-I stimulate the proliferation of human lung carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 53, 3399-404.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., and Zoller, M. (1992). Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257, 682-5.
- Ariza, A., Mate, J. L., Isamat, M., Lopez, D., Von Uexkull-Guldeband, C., Rosell, R., Fernandez-Vasalo, A., and Navas-Palacios, J. J. (1995). Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J Pathol* 177, 363-8.
- Arland, M., Fiedler, W., Samalecos, A., and Hossfeld, D. K. (1994). Absence of point mutations in a functionally important part of the extracellular domain of the c-kit proto-oncogene in a series of patients with acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 8, 498-501.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-13.
- Avantaggiato, V., Dathan, N. A., Grieco, M., Fabien, N., Lazzaro, D., Fusco, A., Simeone, A., and Santoro, M. (1994). Developmental expression of the RET protooncogene. *Cell Growth Differ* 5, 305-11.
- Avanzi, G. C., Gallicchio, M., Bottarel, F., Gammaitoni, L., Cavalloni, G., Buonfiglio, D., Bragardo, M., Bellomo, G., Albano, E., Fantozzi, R., Garbarino, G., Varnum, B., Aglietta, M., Saglio, G., Dianzani, U., and Dianzani, C. (1998). GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* 91, 2334-40.
- Avanzi, G. C., Gallicchio, M., Cavalloni, G., Gammaitoni, L., Leone, F., Rosina, A., Boldorini, R., Monga, G., Pegoraro, L., Varnum, B., and Aglietta, M. (1997). GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol* 25, 1219-26.
- Bargmann, C. I., Hung, M. C., and Weinberg, R. A. (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226-30.
- Bargmann, C. I., and Weinberg, R. A. (1988). Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *Embo J* 7, 2043-52.
- Becher, H. (1995). Epidemiologie des Bronchalkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung des Passivrauchens. *Onkologie* 1, 417-423.

- Becher, H., Jedrychowski, W., Wahrendorf, J., Basa-Cierpialek, Z., Flak, E., and Gomola, K. (1993). Effect of occupational air pollutants on various histological types of lung cancer: a population based case-control study. *Br J Ind Med* *50*, 136-42.
- Bellosta, P., Costa, M., Lin, D. A., and Basilico, C. (1995). The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol* *15*, 614-25.
- Bellosta, P., Zhang, Q., Goff, S. P., and Basilico, C. (1997). Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* *15*, 2387-97.
- Biesecker, L. G., Giannola, D. M., and Emerson, S. G. (1995). Identification of alternative exons, including a novel exon, in the tyrosine kinase receptor gene *Etk2/tyro3* that explain differences in 5' cDNA sequences. *Oncogene* *10*, 2239-42.
- Birch, M., Mitchell, S., and Hart, I. R. (1991). Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* *51*, 6660-7.
- Biscardi, J. S., Denhez, F., Buehler, G. F., Chesnutt, D. A., Baragona, S. C., JP, O. B., Der, C. J., Fiordalisi, J. J., Fults, D. W., and Maness, P. F. (1996). *Rek*, a gene expressed in retina and brain, encodes a receptor tyrosine kinase of the *Axl/Tyro3* family. *J Biol Chem* *271*, 29049-59.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* *64*, 235-48.
- Bolen, J. B., Thompson, P. A., Eiseman, E., and Horak, I. D. (1991). Expression and interactions of the *Src* family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes. *Adv Cancer Res* *57*, 103-49.
- Bolodeoku, J., Yoshida, K., Sugino, T., Churchman, M., Woodman, A., Goodison, S., and Tarin, D. (1997). CD44 expression in human breast cancer cell lines is related to oestrogen receptor (ER) status and confluency in vitro. *Biochem Soc Trans* *25*, 356S.
- Braunger, J., Schleithoff, L., Schulz, A. S., Kessler, H., Lammers, R., Ullrich, A., Bartram, C. R., and Janssen, J. W. (1997). Intracellular signaling of the *Ufo/Axl* receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene* *14*, 2619-31.
- Brennan, J., T, O. C., Makuch, R. W., Simmons, A. M., Russell, E., Linnoila, R. I., Phelps, R. M., Gazdar, A. F., Ihde, D. C., and Johnson, B. E. (1991). *myc* family Dna amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res* *51*, 1708-12.
- Brooks, L., Niedobitek, G., Agathangelou, A., and Farrell, P. J. (1995). The expression of variant CD44 in nasopharyngeal carcinoma is unrelated to expression of LMP-1. *Am J Pathol* *146*, 1102-12.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., and Carter, W. G. (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* *113*, 207-21.

- Burchert, A., Attar, E. C., McCloskey, P., Fridell, Y. W., and Liu, E. T. (1998). Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 16, 3177-87.
- Cannistra, S. A., Kansas, G. S., Niloff, J., DeFranzo, B., Kim, Y., and Ottensmeier, C. (1993). Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 53, 3830-8.
- Carbone, D. P. (1997). The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 24, 388-401.
- Carter, W. G., and Wayner, E. A. (1988). Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263, 4193-201.
- Challier, C., Uphoff, C. C., Janssen, J. W., and Drexler, H. G. (1996). Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia- lymphoma cell lines. *Leukemia* 10, 781-7.
- Chen, J., Carey, K., and Godowski, P. J. (1997). Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 14, 2033-9.
- Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M. M., D. D. A., Curiel, D. T., Mitsudomi, T., Buchhagen, D. L., Carbone, D., Piantadosi, S., Koga, H., and et al. (1990). Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 5, 1603-10.
- Christiansen, H., Sahin, K., Berthold, F., Hero, B., Terpe, H. J., and Lampert, F. (1995). Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A, 541-4.
- Collins, M. K., Downwards, J., Miyajima, A., Maruyama, K., Arai, K., and Mulligan, R. C. (1988). Transfer of functional EGF receptors to an IL3-dependent cell line. *J Cell Physiol* 137, 293-8.
- Combaret, V., Lasset, C., Frappaz, D., Bouvier, R., Thiesse, P., Rebillard, A. C., Philip, T., and Favrot, M. C. (1995). Evaluation of CD44 prognostic value in neuroblastoma: comparison with the other prognostic factors. *Eur J Cancer* 31A, 545-9.
- Cooper, D. L., and Dougherty, G. J. (1995). To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat Med* 1, 635-7.
- Costa, M., Bellosta, P., and Basilico, C. (1996). Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 168, 737-44.
- Cowled, P. A., Ciccarelli, C., Coccia, E., Philipson, L., and Sorrentino, V. (1994). Expression of growth arrest-specific (gas) genes in senescent murine cells. *Exp Cell Res* 211, 197-202.
- Craven, R. J., Xu, L. H., Weiner, T. M., Fridell, Y. W., Dent, G. A., Srivastava, S., Varnum, B., Liu, E. T., and Cance, W. G. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer* 60, 791-7.

- Crosier, K. E., and Crosier, P. S. (1997). New insights into the control of cell growth; the role of the AxI family. *Pathology* 29, 131-5.
- Crosier, K. E., Hall, L. R., Lewis, P. M., Morris, C. M., Wood, C. R., Morris, J. C., and Crosier, P. S. (1994). Isolation and characterization of the human DTK receptor tyrosine kinase. *Growth Factors* 11, 137-44.
- Crosier, P. S., Freeman, S. A., Orlic, D., Bodine, D. M., and Crosier, K. E. (1996). The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Exp Hematol* 24, 318-23.
- Crosier, P. S., Hall, L. R., Vitas, M. R., Lewis, P. M., and Crosier, K. E. (1995). Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts. *Leuk Lymphoma* 18, 443-9.
- Crosier, P. S., Lewis, P. M., Hall, L. R., Vitas, M. R., Morris, C. M., Beier, D. R., Wood, C. R., and Crosier, K. E. (1994). Isolation of a receptor tyrosine kinase (DTK) from embryonic stem cells: structure, genetic mapping and analysis of expression. *Growth Factors* 11, 125-36.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R., and Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.
- D'Amico, D., Carbone, D., Mitsudomi, T., Nau, M., Fedorko, J., Russell, E., Johnson, B., Buchhagen, D., Bodner, S., Phelps, R., and et al. (1992). High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene* 7, 339-46.
- D'Amico, D., Carbone, D. P., Johnson, B. E., Meltzer, S. J., and Minna, J. D. (1992). Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. *Cancer Res* 52, 1996-9.
- Dahlback, B. (1986). Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem* 261, 12022-7.
- Dahlback, B. (1995). New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 74, 139-48.
- Dahlback, B., Frohm, B., and Nelsestuen, G. (1990). High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K- dependent protein S in the presence of calcium. Suggestion of a third component in blood regulating the interaction. *J Biol Chem* 265, 16082-7.
- Dahlback, B., Hildebrand, B., and Malm, J. (1990). Characterization of functionally important domains in human vitamin K- dependent protein S using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 265, 8127-35.
- Dahlback, B., Lundwall, A., and Stenflo, J. (1986). Primary structure of bovine vitamin K- dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4199-203.

- Dahlback, B., and Stenflo, J. (1981). High molecular weight complex in human plasma between vitamin K- dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2512-6.
- Dai, W., Pan, H., Hassanain, H., Gupta, S. L., and Murphy, M. J., Jr. (1994). Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, tif, highly expressed in human ovary and testis. *Oncogene* 9, 975-9.
- Dalchau, R., Kirkley, J., and Fabre, J. W. (1980). Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10, 737-44.
- Dall, P., Heider, K. H., Hekele, A., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., Ponta, H., and Herrlich, P. (1994). Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 54, 3337-41.
- Dall, P., Heider, K. H., Sinn, H. P., Skroch-Angel, P., Adolf, G., Kaufmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. (1995). Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v- expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 60, 471-7.
- Dammrich, J., Vollmers, H. P., Heider, K. H., and Muller-Hermelink, H. K. (1995). Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 73, 395-401.
- Dinnen, R. D., and Ebisuzaki, K. (1997). The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. *Anticancer Res Mar-Apr;17*, 1027-33.
- Doll, R., Gray, R., Hafner, B., and Peto, R. (1980). Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors. *Br Med J* 280, 967-71.
- Dommann, S. N., Ziegler, T., Dommann-Schener, C. C., Meyer, J., Panizzon, R., and Burg, G. (1995). CD44v6 is a marker for systemic spread in cutaneous T-cell lymphomas. A comparative study between nodal and cutaneous lymphomas. *J Cutan Pathol* 22, 407-12.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M. D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-7.
- Faassen, A. E., Schragar, J. A., Klein, D. J., Oegema, T. R., Couchman, J. R., and McCarthy, J. B. (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 116, 521-31.
- Fair, D. S., and Marlar, R. A. (1986). Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the Protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood* 67, 64-70.
- Fair, D. S., Marlar, R. A., and Levin, E. G. (1986). Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 67, 1168-71.

- Fantl, W. J., Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 62, 453-81.
- Fasano, M., Sabatini, M. T., Wieczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S., and Jagirdar, J. (1997). CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer* 80, 34-41.
- Faust, M., Ebensperger, C., Schulz, A. S., Schleithoff, L., Hameister, H., Bartram, C. R., and Janssen, J. W. (1992). The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene* 7, 1287-93.
- Fidler, I. J. (1995). Critical factors in the biology of human cancer metastasis. *Am Surg* 61, 1065-6.
- Finke, L. H., Terpe, H. J., Zorb, C., Haensch, W., and Schlag, P. M. (1995). Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins [letter; comment]. *Lancet* 345, 583.
- Fox, S. B., Fawcett, J., Jackson, D. G., Collins, I., Gatter, K. C., Harris, A. L., Gearing, A., and Simmons, D. L. (1994). Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54, 4539-46.
- Fox, S. B., Gatter, K. C., Jackson, D. G., Sreaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I., Harris, A. L., Simmons, D., and Fawcett, J. (1993). CD44 and cancer screening [letter]. *Lancet* 342, 548-9.
- Fraser, J. R., and Laurent, T. C. (1989). Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 143, 41-53; discussion 53-9, 281-5.
- Fridell, Y. W., Jin, Y., Quilliam, L. A., Burchert, A., McCloskey, P., Spizz, G., Varnum, B., Der, C., and Liu, E. T. (1996). Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 16, 135-45.
- Fridell, Y. W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T. (1998). GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273, 7123-6.
- Friedrichs, K., Franke, F., Lisboa, B. W., Kugler, G., Gille, I., Terpe, H. J., Holzel, F., Maass, H., and Gunthert, U. (1995). CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 55, 5424-33.
- Fujimoto, J., and Yamamoto, T. (1994). brt, a mouse gene encoding a novel receptor-type protein-tyrosine kinase, is preferentially expressed in the brain. *Oncogene* 9, 693-8.
- Fujita, N., Yaegashi, N., Ide, Y., Sato, S., Nakamura, M., Ishiwata, I., and Yajima, A. (1994). Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res* 54, 3922-8.
- Futami, H., Egawa, S., Tsukada, T., Maruyama, K., Bandoh, S., Noguchi, M., and Yamaguchi, K. (1995). A novel somatic point mutation of the RET Proto-oncogene in tumor tissues of small cell lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 86, 1127-30.

- Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St. John, T., Butcher, E. C., and Carter, W. G. (1989). Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4654-8.
- Gansauge, F., Gansauge, S., Zobywalski, A., Scharnweber, C., Link, K. H., Nussler, A. K., and Beger, H. G. (1995). Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res* 55, 5499-503.
- Gasic, G. P., Arenas, C. P., Gasic, T. B., and Gasic, G. J. (1992). Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2317-20.
- Gaudino, G., Avantaggiato, V., Follenzi, A., Acampora, D., Simeone, A., and Comoglio, P. M. (1995). The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues. *Oncogene* 11, 2627-37.
- Gazdar, A. F. (1992). The molecular biology of lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 168, 239-45.
- Gazdar, A. F. (1992). Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Cancer* 69, 1592-9.
- Gazdar, A. F., and Linnoila, R. I. (1988). The pathology of lung cancer: changing concepts and newer diagnostic techniques. *Semin Oncol* 15, 215-25.
- Ghaffari, S., Dougherty, G. J., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1995). Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood* 86, 2976-85.
- Girgah, N., Letarte, M., Becker, L. E., Cruz, T. F., Theriault, E., and Moscarello, M. A. (1991). Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 50, 779-92.
- Givehchian, M., Woerner, S. M., Lacroix, J., Zoller, M., Drings, P., Becker, H., Kayser, K., Ridder, R., and von Knebel Doeberitz, M. (1996). Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. *Oncogene* 12, 1137-44.
- Godowski, P. J., Mark, M. R., Chen, J., Sadick, M. D., Raab, H., and Hammonds, R. G. (1995). Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell* 82, 355-8.
- Goebeler, M., Kaufmann, D., Brocker, E. B., and Klein, C. E. (1996). Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J Cell Sci* 109, 1957-64.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., and Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-72.

- Goodfellow, P. N., Banting, G., Wiles, M. V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R., and Fabre, J. W. (1982). The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol* *12*, 659-63.
- Goodison, S., and Tarin, D. (1998). Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia [In Process Citation]. *Front Biosci* *3*, E89-E109.
- Goodison, S., and Tarin, D. (1998). Current status of CD44 variant isoforms as cancer diagnostic markers. *Histopathology* *32*, 1-6.
- Goruppi, S., Ruaro, E., and Schneider, C. (1996). Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* *12*, 471-80.
- Goruppi, S., Ruaro, E., Varnum, B., and Schneider, C. (1997). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* *17*, 4442-53.
- Goruppi, S., Yamane, H., Marcandalli, P., Garcia, A., Clogston, C., Gostissa, M., Varnum, B., and Schneider, C. (1997). The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation. *FEBS Lett* *415*, 59-63.
- Graham, D. K., Bowman, G. W., Dawson, T. L., Stanford, W. L., Earp, H. S., and Snodgrass, H. R. (1995). Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene* *10*, 2349-59.
- Graham, D. K., Dawson, T. L., Mullaney, D. L., Snodgrass, H. R., and Earp, H. S. (1994). Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer [published erratum appears in *Cell Growth Differ* 1994 Sep;5(9):1022]. *Cell Growth Differ* *5*, 647-57.
- Gross, N., Beck, D., Beretta, C., Jackson, D., and Perruisseau, G. (1995). CD44 expression and modulation on human neuroblastoma tumours and cell lines. *Eur J Cancer* *31A*, 471-5.
- Gross, N., Beretta, C., Perruisseau, G., Jackson, D., Simmons, D., and Beck, D. (1994). CD44H expression by human neuroblastoma cells: relation to MYCN amplification and lineage differentiation. *Cancer Res* *54*, 4238-42.
- Gullick, W. J. (1990). The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl* *5*, 55-61.
- Gunthert, U. (1993). CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* *184*, 47-63.
- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* *65*, 13-24.

- Gunthert, U., Stauder, R., Mayer, B., Terpe, H. J., Finke, L., and Friedrichs, K. (1995). Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv* 24, 19-42.
- Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M., and Sy, M. S. (1994). Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody [published erratum appears in *Cancer Res* 1994 Apr 15;54(8):2284]. *Cancer Res* 54, 1561-5.
- Hammar, S. (1987). Adenocarcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Ultrastruct Pathol* 11, 263-91.
- Harbour, J. W., Lai, S. L., Whang-Peng, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Kaye, F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241, 353-7.
- Harn, H. J., Ho, L. I., Chang, J. Y., Wu, C. W., Jiang, S. Y., Lee, H. S., and Lee, W. H. (1995). Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44V in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 75, 1065-71.
- Hart, I. R., Birch, M., and Marshall, J. F. (1991). Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 10, 115-28.
- Haynes, B. F., Liao, H. X., and Patton, K. L. (1991). The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 3, 347-50.
- Haynes, B. F., Telen, M. J., Hale, L. P., and Denning, S. M. (1989). CD44: a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation [published erratum appears in *Immunol Today* 1990 Mar;11(3):80]. *Immunol Today* 10, 423-8.
- He, X., Shen, L., Bjartell, A., and Dahlback, B. (1995). The gene encoding vitamin K-dependent anticoagulant protein S is expressed in multiple rabbit organs as demonstrated by northern blotting, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 43, 85-96.
- Heider, K. H., Dammrich, J., Skroch-Angel, P., Muller-Hermelink, H. K., Vollmers, H. P., Herrlich, P., and Ponta, H. (1993). Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 53, 4197-203.
- Heider, K. H., Hofmann, M., Hors, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. T. (1993). A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120, 227-33.
- Heider, K. H., Ratschek, M., Zatloukal, K., and Adolf, G. R. (1996). Expression of CD44 isoforms in human renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 428, 267-73.
- Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-23.
- Herrlich, P., Pals, S., and Ponta, H. (1995). CD44 in colon cancer. *Eur J Cancer* 31A, 1110-2.

- Herrlich, P., Zoller, M., Pals, S. T., and Ponta, H. (1993). CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 14, 395-9.
- Hessing, M. (1991). The interaction between complement component C4b-binding protein and the vitamin K-dependent protein S forms a link between blood coagulation and the complement system. *Biochem J* 277, 581-92.
- Hibi, K., Takahashi, T., Sekido, Y., Ueda, R., Hida, T., Ariyoshi, Y., Takagi, H., and Takahashi, T. (1991). Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. *Oncogene* 6, 2291-6.
- Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H., Nakamura, Y., and Takahashi, T. (1992). Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7, 445-9.
- Hill, C. S., and Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80, 199-211.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and Gunthert, U. (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51, 5292-7.
- Hofstra, R. M., Landsvater, R. M., Ceccherini, I., Stulp, R. P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener, J. W., van Amstel, H. K., Romeo, G., and et al. (1994). A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma [see comments]. *Nature* 367, 375-6.
- Hole, A. K., Belkhiri, A., Snell, L. S., and Watson, P. H. (1997). CD44 variant expression and estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* Apr;43, 165-73.
- Hong, R. L., Lee, W. J., Shun, C. T., Chu, J. S., and Chen, Y. C. (1995). Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse-type and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *Oncology* 52, 334-9.
- Huff, J. L., Jelinek, M. A., Borgman, C. A., Lansing, T. J., and Parsons, J. T. (1993). The protooncogene c-sea encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6140-4.
- Hughes, E. N., Colombatti, A., and August, J. T. (1983). Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp- 1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells. *J Biol Chem* 258, 1014-21.
- Hung, J., Kishimoto, Y., Sugio, K., Virmani, A., McIntire, D. D., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1995). Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *Jama* 273, 1908.
- Hunter, T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-70.
- Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods Enzymol* 200, 3-37.

- Hunter, T., and Pines, J. (1991). Cyclins and cancer. *Cell* 66, 1071-4.
- Hunter, T., and Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1311-5.
- Imazeki, F., Yokosuka, O., Yamaguchi, T., Ohto, M., Isono, K., and Omata, M. (1996). Expression of variant CD44-messenger RNA in colorectal adenocarcinomas and adenomatous polyps in humans. *Gastroenterology* 110, 362-8.
- Itakura, Y., Yamamoto, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1994). Autocrine stimulation of motility in SBC-5 human lung carcinoma cells by a two-kringle variant of HGF. *Cancer Lett* 83, 235-43.
- Jackson, D. G., Schenker, T., Waibel, R., Bell, J. I., and Stahel, R. A. (1994). Expression of alternatively spliced forms of the CD44 extracellular- matrix receptor on human lung carcinomas. *Int J Cancer Suppl* 8, 110-5.
- Jalkanen, S., Bargatze, R., Jalkanen, M., Lewinsohn, D., Streeter, P., Lakey, E., and Butcher, E. C. (1988). Lymphocyte migration molecules. *Adv Exp Med Biol* 237, 21-9.
- Jalkanen, S., and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-25.
- Jansa Perez, M., Walshe, J. A., Crosier, K. E., and Crosier, P. S. (1996). Expression of the DTK receptor tyrosine kinase during zebrafish development. *Int J Dev Biol Suppl* 1, 101S-102S.
- Janssen, J. W., Schulz, A. S., Steenvoorden, A. C., Schmidberger, M., Strehl, S., Ambros, P. F., and Bartram, C. R. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6, 2113-20.
- Jia, R., and Hanafusa, H. (1994). The proto-oncogene of v-eyk (v-ryk) is a novel receptor-type protein tyrosine kinase with extracellular Ig/GN-III domains. *J Biol Chem* 269, 1839-44.
- Jiang, S. X., Sato, Y., Kuwao, S., and Kameya, T. (1995). Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol* 177, 135-8.
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J. C., Hu, S., Altrock, B. W., and Fox, G. M. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-24.
- Joensuu, H., Klemi, P. J., Toikkanen, S., and Jalkanen, S. (1993). Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* 143, 867-74.
- Johnson, B. E., and Kelley, M. J. (1995). Biology of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 12 Suppl 3, S5-16.
- Kalemkerian, G. P. (1994). Biology of lung cancer. *Curr Opin Oncol* 6, 147-55.

- Kalomiris, E. L., and Bourguignon, L. Y. (1989). Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, GP85, and may function in GP85-ankyrin binding. *J Biol Chem* 264, 8113-9.
- Kan, M., Aki, M., Akiyama, K., Naruo, S., Kanayama, H., and Kagawa, S. (1995). High-level expression of the CD44 variant sharing exon v10 in renal cancer. *Jpn J Cancer Res* 86, 847-53.
- Kasper, M., Gunthert, U., Dall, P., Kayser, K., Schuh, D., Haroske, G., and Muller, M. (1995). Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 648-56.
- Kaufmann, M., Heider, K. H., Sinn, H. P., von Minckwitz, G., Ponta, H., and Herrlich, P. (1995). CD44 isoforms in prognosis of breast cancer [letter; comment]. *Lancet* 346, 502.
- Kincade, P. W., Yamashita, Y., Borghesi, L., Medina, K., and Oritani, K. (1998). Blood cell precursors in context. Composition of the bone marrow microenvironment that supports B lymphopoiesis. *Vox Sang* 74 Suppl 2, 265-8.
- Kishimoto, Y., Sugio, K., Hung, J. Y., Virmani, A. K., McIntire, D. D., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1995). Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 87, 1224-9.
- Knutson, J. R., Iida, J., Fields, G. B., and McCarthy, J. B. (1996). CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell* 7, 383-96.
- Knyazev, P. G., Imyanitov, E. N., Chernitca, O. I., Nikiforova, I. F., and Hanson, K. P. (1992). Amplification of ERBB-2 (HER-2/NEU) oncogene in different neoplasms of patients from USSR. *Oncology* 49, 162-5.
- Kogerman, P., Sy, M. S., and Culp, L. A. (1997). Counter-selection for over-expressed human CD44s in primary tumors versus lung metastases in a mouse fibrosarcoma model. *Oncogene* 15, 1407-16.
- Kogerman, P., Sy, M. S., and Culp, L. A. (1996). Oncogene-dependent expression of CD44 in Balb/c 3T3 derivatives: correlation with metastatic competence. *Clin Exp Metastasis* 14, 73-82.
- Kogerman, P., Sy, M. S., and Culp, L. A. (1997). Overexpressed human CD44s promotes lung colonization during micrometastasis of murine fibrosarcoma cells: facilitated retention in the lung vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13233-8.
- Koopman, G., Griffioen, A. W., Ponta, H., Herrlich, P., van den Berg, F., Manten-Horst, E., and Pals, S. T. (1993). CD44 splice variants; expression on lymphocytes and in neoplasia. *Res Immunol* 144, 750-4; discussion 754-62.
- Kuppner, M. C., Van Meir, E., Gauthier, T., Hamou, M. F., and de Tribolet, N. (1992). Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer* 50, 572-7.

Lai, C., Gore, M., and Lemke, G. (1994). Structure, expression, and activity of Tyro 3, a neural adhesion-related receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 9, 2567-78.

Lai, C., and Lemke, G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 6, 691-704.

Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P. W. (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54, 271-335.

Lewis, P. M., Crosier, K. E., Wood, C. R., and Crosier, P. S. (1996). Analysis of the murine Dtk gene identifies conservation of genomic structure within a new receptor tyrosine kinase subfamily. *Genomics* 31, 13-9.

Li, R., Chen, J., Hammonds, G., Phillips, H., Armanini, M., Wood, P., Bunge, R., Godowski, P. J., Sliwkowski, M. X., and Mather, J. P. (1996). Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* 16, 2012-9.

Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [see comments]. *Science* 260, 1130-2.

Ling, L., and Kung, H. J. (1995). Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 15, 6582-92.

Ling, L., Templeton, D., and Kung, H. J. (1996). Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271, 18355-62.

Linz, U., Schleithoff, L., Janssen, J. W., Bartram, C. R., and Muller, C. R. (1993). A PvuII-polymorphism within the AXL gene on chromosome 19q13.1. *Hum Mol Genet* 2, 492.

Liu, C., and Tsao, M. S. (1993). In vitro and in vivo expressions of transforming growth factor-alpha and tyrosine kinase receptors in human non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 142, 1155-62.

Liu, C., and Tsao, M. S. (1993). Proto-oncogene and growth factor/receptor expression in the establishment of primary human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 142, 413-23.

Liu, F., Powell, D. R., and Hintz, R. L. (1990). Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in human serum from patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 620-8.

Mackay, C. R., Terpe, H. J., Stauder, R., Marston, W. L., Stark, H., and Gunthert, U. (1994). Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124, 71-82.

- Maillard, C., Berruyer, M., Serre, C. M., Dechavanne, M., and Delmas, P. D. (1992). Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology* *130*, 1599-604.
- Maneckjee, R., and Minna, J. D. (1992). Nonconventional opioid binding sites mediate growth inhibitory effects of methadone on human lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 1169-73.
- Maneckjee, R., and Minna, J. D. (1990). Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 3294-8.
- Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., and Schneider, C. (1993). The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* *13*, 4976-85.
- Manten-Horst, E., Danen, E. H., Smit, L., Snoek, M., Le Poole, I. C., Van Muijen, G. N., Pals, S. T., and Ruiter, D. J. (1995). Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int J Cancer* *64*, 182-8.
- Mark, M. R., Chen, J., Hammonds, R. G., Sadick, M., and Godowsk, P. J. (1996). Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* *271*, 9785-9.
- Mark, M. R., Scadden, D. T., Wang, Z., Gu, Q., Goddard, A., and Godowski, P. J. (1994). rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem* *269*, 10720-8.
- Matsubara, N., Takahashi, Y., Nishina, Y., Mukouyama, Y., Yanagisawa, M., Watanabe, T., Nakano, T., Nomura, K., Arita, H., Nishimune, Y., Obinata, M., and Matsui, Y. (1996). A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev Biol* *180*, 499-510.
- Matsumura, Y., Hanbury, D., Smith, J., and Tarin, D. (1994). Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *Bmj* *308*, 619-24.
- Matsumura, Y., Sugiyama, M., Matsumura, S., Hayle, A. J., Robinson, P., Smith, J. C., and Tarin, D. (1995). Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. *J Pathol* *177*, 11-20.
- Matsumura, Y., and Tarin, D. (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation [see comments]. *Lancet* *340*, 1053-8.
- Mayer, B., Jauch, K. W., Gunthert, U., Figdor, C. G., Schildberg, F. W., Funke, I., and Johnson, J. P. (1993). De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* *342*, 1019-22.

- McCloskey, P., Pierce, J., Koski, R. A., Varnum, B., and Liu, E. T. (1994). Activation of the Axl receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D cells. *Cell Growth Differ* 5, 1105-17.
- Merzak, A., Koocheckpour, S., and Pilkington, G. J. (1994). CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res* 54, 3988-92.
- Minna, J. D. (1993). The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 103, 449S-456S.
- Miozzo, M., Sozzi, G., Musso, K., Pilotti, S., Incarbone, M., Pastorino, U., and Pierotti, M. A. (1996). Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 56, 2285-8.
- Mitsudomi, T., Viallet, J., Mulshine, J. L., Linnoila, R. I., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1991). Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 6, 1353-62.
- Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T., and Nakamura, T. (1994). Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* 9, 1605-12.
- Moody, T. W., Carney, D. N., Cuttitta, F., Quattrocchi, K., and Minna, J. D. (1985). High affinity receptors for bombesin/GRP-like peptides on human small cell lung cancer. *Life Sci* 37, 105-13.
- Mulder, J. W., Kruyt, P. M., Sewnath, M., Oosting, J., Seldenrijk, C. A., Weidema, W. F., Offerhaus, G. J., and Pals, S. T. (1994). Colorectal cancer prognosis and expression of exon-6-containing CD44 proteins [see comments]. *Lancet* 344, 1470-2.
- Mulder, J. W., Wielenga, V. J., Polak, M. M., van den Berg, F. M., Adolf, G. R., Herrlich, P., Pals, S. T., and Offerhaus, G. J. (1995). Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis [see comments]. *Gut* 36, 76-80.
- Müller, K. M., and Theile, A. (1994). [Lung tumors. Pathologic-anatomic diagnosis]. *Internist (Berl)* 35, 710-23.
- Müller, K.-M., Junker, K., and Wiethage, T. (1995). Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome; Morphologie, Tumorregression, Molekularpathologie. *Onkologe* 1, 429-440.
- Mulligan, L. M., Kwok, J. B., Healey, C. S., Elsdon, M. J., Eng, C., Gardner, E., Love, D. R., Mole, S. E., Moore, J. K., Papi, L., and et al. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458-60.
- Nagabhushan, M., Pretlow, T. G., Guo, Y. J., Amini, S. B., Pretlow, T. P., and Sy, M. S. (1996). Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. *Am J Clin Pathol* 106, 647-51.

- Nagasaka, S., Tanabe, K. K., Bruner, J. M., Saya, H., Sawaya, R. E., and Morrison, R. S. (1995). Alternative RNA splicing of the hyaluronic acid receptor CD44 in the normal human brain and in brain tumors. *J Neurosurg* 82, 858-63.
- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., and Mizuno, K. (1996). Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 30022-7.
- Nakanishi, Y., Mulshine, J. L., Kasprzyk, P. G., Natale, R. B., Maneckjee, R., Avis, I., Treston, A. M., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Cuttitta, F. (1988). Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines in vitro. *J Clin Invest* 82, 354-9.
- Nakano, T. (1996). [A novel growth-regulating factor for vascular smooth muscle cells and its receptors, Gas6 and Axl/Sky]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 41, 1543-9.
- Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., and Arita, H. (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272, 29411-4.
- Nakano, T., Kawamoto, K., Kishino, J., Nomura, K., Higashino, K., and Arita, H. (1997). Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 323, 387-92.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J. D., and Hirokawa, K. (1997). Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65, 195-203.
- Neubauer, A., Burchert, A., Maiwald, C., Gruss, H. J., Serke, S., Huhn, D., Wittig, B., and Liu, E. (1997). Recent progress on the role of Axl, a receptor tyrosine kinase, in malignant transformation of myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 25, 91-6.
- Neubauer, A., Fiebeler, A., Graham, D. K., JP, O. B., Schmidt, C. A., Barckow, P., Serke, S., Siegert, W., Snodgrass, H. R., Huhn, D., and et al. (1994). Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84, 1931-41.
- Neubauer, A., JP, O. B., Fiebeler, A., Schmidt, C., Huhn, D., and Liu, E. T. (1993). Axl, a novel receptor tyrosine kinase isolated from chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 30, 34.
- O'Bryan, J. P., Fridell, Y. W., Koski, R., Varnum, B., and Liu, E. T. (1995). The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 270, 551-7.
- O'Bryan, J. P., Frye, R. A., Cogswell, P. C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R. d., Le Beau, M. M., Earp, H. S., and Liu, E. T. (1991). axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 11, 5016-31.

- Ogura, M., Tanabe, N., Nishioka, J., Suzuki, K., and Saito, H. (1987). Biosynthesis and secretion of functional protein S by a human megakaryoblastic cell line (MEG-01). *Blood* 70, 301-6.
- Ohashi, K., Mizuno, K., Kuma, K., Miyata, T., and Nakamura, T. (1994). Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain. *Oncogene* 9, 699-705.
- Ohashi, K., Nagata, K., Toshima, J., Nakano, T., Arita, H., Tsuda, H., Suzuki, K., and Mizuno, K. (1995). Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 270, 22681-4.
- Ohashi, K., Toshima, J., Tajinda, K., Nakamura, T., and Mizuno, K. (1994). Molecular cloning of a chicken lung cDNA encoding a novel protein kinase with N-terminal two LIM/double zinc finger motifs. *J Biochem (Tokyo)* 116, 636-42.
- Orzechowski, H. D., Beckenbach, C., Herbst, H., Stolzel, U., Riecken, E. O., and Stallmach, A. (1995). Expression of CD44v6 is associated with cellular dysplasia in colorectal epithelial cells. *Eur J Cancer* 31A, 2073-9.
- Pachnis, V., Mankoo, B., and Costantini, F. (1993). Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119, 1005-17.
- Pardee, A. B., Cherington, P. V., and Medrano, E. E. (1981). On deciding which factors regulate cell growth. *Prog Clin Biol Res* 66 Pt A, 495-502.
- Penno, M. B., August, J. T., Baylin, S. B., Mabry, M., Linnoila, R. I., Lee, V. S., Croteau, D., Yang, X. L., and Rosada, C. (1994). Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res* 54, 1381-7.
- Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M. F., Dunnill, M. S., Pierce, C. B., Harris, A., Gatter, K. C., and Mason, D. Y. (1993). bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma [see comments]. *N Engl J Med* 329, 690-4.
- Phillips, D. J., Greengard, J. S., Fernandez, J. A., Ribeiro, M., Evatt, B. L., Griffin, J. H., and Hooper, W. C. (1993). Protein S, an antithrombotic factor, is synthesized and released by neural tumor cells. *J Neurochem* 61, 344-7.
- Picardo, A. L., Torres, A. J., Maestro, M., Ortega, D., Garcia-Asenjo, J. A., Mugerza, J. M., Hernando, F., Diez, M., and Balibrea, J. L. (1994). Quantitative analysis of carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CA 125, and CA 50 cytosolic content in non-small cell lung cancer. *Cancer* 73, 2305-11.
- Picker, L. J. (1994). Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 6, 394-406.
- Picker, L. J., Medeiros, L. J., Weiss, L. M., Warnke, R. A., and Butcher, E. C. (1988). Expression of lymphocyte homing receptor antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 130, 496-504.

- Polvi, A., Armstrong, E., Lai, C., Lemke, G., Huebner, K., Spritz, R. A., Guida, L. C., Nicholls, R. D., and Alitalo, K. (1993). The human TYRO3 gene and pseudogene are located in chromosome 15q14-q25. *Gene* 134, 289-93.
- Prins, J., De Vries, E. G., and Mulder, N. H. (1993). The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res* 13, 1373-85.
- Quong, R. Y., Bickford, S. T., Ing, Y. L., Terman, B., Herlyn, M., and Lassam, N. J. (1994). Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma Res* 4, 313-9.
- Rescigno, J., Mansukhani, A., and Basilico, C. (1991). A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene* 6, 1909-13.
- Rinke de Wit, T. F., Izon, D. J., Revilla, C., Oosterwegel, M., Bakker, A. Q., van Ewijk, W., and Kruisbeek, A. M. (1996). Expression of tyrosine kinase gene in mouse thymic stromal cells. *Int Immunol* 8, 1787-95.
- Ristamaki, R., Joensuu, H., Salmi, M., and Jalkanen, S. (1994). Serum CD44 in malignant lymphoma: an association with treatment response. *Blood* 84, 238-43.
- Robinson, D., He, F., Pretlow, T., and Kung, H. J. (1996). A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5958-62.
- Rodenhuis, S., Slebos, R. J., Boot, A. J., Evers, S. G., Mooi, W. J., Wagenaar, S. S., van Bodegom, P. C., and Bos, J. L. (1988). Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 48, 5738-41.
- Rodrigues, G. A., and Park, M. (1994). Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* 4, 15-24.
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kaariainen, H., and et al. (1994). Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto- oncogene in Hirschsprung's disease [see comments]. *Nature* 367, 377-8.
- Rosenberg, W. M., Prince, C., Kaklamanis, L., Fox, S. B., Jackson, D. G., Simmons, D. L., Chapman, R. W., Trowell, J. M., Jewell, D. P., and Bell, J. I. (1995). Increased expression of CD44v6 and CD44v3 in ulcerative colitis but not colonic Crohn's disease [see comments]. *Lancet* 345, 1205-9.
- Rubin, J. S., Chan, A. M., Bottaro, D. P., Burgess, W. H., Taylor, W. G., Cech, A. C., Hirschfield, D. W., Wong, J., Miki, T., Finch, P. W., and et al. (1991). A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 415-9.
- Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zoller, M., Heider, K. H., Ponta, H., and Herrlich, P. (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 53, 1262-8.

- Rudzki, Z., and Jothy, S. (1997). CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol* 50, 57-71.
- Ruiz, P., Schwarzler, C., and Gunthert, U. (1995). CD44 isoforms during differentiation and development. *Bioessays* 17, 17-24.
- Rygaard, K., Nakamura, T., and Spang-Thomsen, M. (1993). Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer* 67, 37-46.
- Rygaard, K., Vindelov, L. L., and Spang-Thomsen, M. (1993). Expression of myc family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts. *Int J Cancer* 54, 144-52.
- Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H., and Jalkanen, S. (1993). Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 122, 431-42.
- Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D. P., Dathan, N. A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B., Kraus, M. H., and et al. (1995). Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267, 381-3.
- Schlessinger, J., Mohammadi, M., Margolis, B., and Ullrich, A. (1992). Role of SH2-containing proteins in cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 67-74.
- Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9, 383-91.
- Schneider, C., King, R. M., and Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787-93.
- Schuermann, M. (1995). Zytogenetische und molekulargenetische Grundlagen in der Entwicklung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Onkologie* 1, 424-8.
- Schulz, A. S., Schleithoff, L., Faust, M., Bartram, C. R., and Janssen, J. W. (1993). The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene* 8, 509-13.
- Schulz, N. T., Paulhiac, C. I., Lee, L., and Zhou, R. (1995). Isolation and expression analysis of tyro3, a murine growth factor receptor tyrosine kinase preferentially expressed in adult brain. *Brain Res Mol Brain Res* 28, 273-80.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., and Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12160-4.
- Seelentag, W. K., Flury, R., Schmid, M., Komminoth, P., Saremaslani, P., Gunthert, U., Heitz, P. U., and Roth, J. (1995). [Expression of CD44 isoforms in normal human liver and also in regenerative and neoplastic liver changes]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79, 144-7.

- Seger, R., Ahn, N. G., Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ericsson, L., Bratlien, R. L., Cobb, M. H., and Krebs, E. G. (1991). Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6142-6.
- Seitz, R., Heidtmann, H. H., Maasberg, M., Immel, A., Egbring, R., and Havemann, K. (1993). Activators of coagulation in cultured human lung-tumor cells. *Int J Cancer* *53*, 514-20.
- Sekido, Y., Obata, Y., Ueda, R., Hida, T., Suyama, M., Shimokata, K., Ariyoshi, Y., and Takahashi, T. (1991). Preferential expression of c-kit protooncogene transcripts in small cell lung cancer. *Cancer Res* *51*, 2416-9.
- Sell, C., Ptasznik, A., Chang, C. D., Swantek, J., Cristofalo, V. J., and Baserga, R. (1993). IGF-1 receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* *194*, 259-65.
- Shiratori, M., Michalopoulos, G., Shinozuka, H., Singh, G., Ogasawara, H., and Katyal, S. L. (1995). Hepatocyte growth factor stimulates DNA synthesis in alveolar epithelial type II cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* *12*, 171-80.
- Shoji, M., Hancock, W. W., Abe, K., Micko, C., Casper, K. A., Baine, R. M., Wilcox, J. N., Danave, I., Dillehay, D. L., Matthews, E., Contrino, J., Morrissey, J. H., Gordon, S., Edgington, T. S., Kudryk, B., Kreutzer, D. L., and Rickles, F. R. (1998). Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* *152*, 399-411.
- Shtivelman, E., and Bishop, J. M. (1991). Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* *11*, 5446-53.
- Siegfried, J. M., and Owens, S. E. (1988). Response of primary human lung carcinomas to autocrine growth factors produced by a lung carcinoma cell line. *Cancer Res* *48*, 4976-81.
- Singh-Kaw, P., Zarnegar, R., and Siegfried, J. M. (1995). Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* *268*, L1012-20.
- Sinn, H. P., Heider, K. H., Skroch-Angel, P., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. (1995). Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res Treat* *36*, 307-313.
- Sleeman, J., Moll, J., Sherman, L., Dall, P., Pals, S. T., Ponta, H., and Herrlich, P. (1995). The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer. *Ciba Found Symp* *189*, 142-51; discussion 151-6, 174-6.
- Sloman, A., F. D. A., and Yousem, S. A. (1996). Immunohistochemical markers of prolonged survival in small cell carcinoma of the lung. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* *120*, 465-72.

- Smiley, S. T., Boyer, S. N., Heeb, M. J., Griffin, J. H., and Grusby, M. J. (1997). Protein S is inducible by interleukin 4 in T cells and inhibits lymphoid cell procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11484-9.
- Smiley, S. T., Stitt, T. N., and Grusby, M. J. (1997). Cross-linking of protein S bound to lymphocytes promotes aggregation and inhibits proliferation. *Cell Immunol* *181*, 120-6.
- St. John, T., Meyer, J., Idzerda, R., and Gallatin, W. M. (1990). Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* *60*, 45-52.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M., and Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* *56*, 1057-62.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* *10*, 343-8.
- Stauder, R., Eisterer, W., Thaler, J., and Gunthert, U. (1995). CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* *85*, 2885-99.
- Stern, D., Brett, J., Harris, K., and Nawroth, P. (1986). Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol* *102*, 1971-8.
- Stern, D. M., Carpenter, B., and Nawroth, P. P. (1986). Endothelium and the regulation of coagulation. *Pathol Immunopathol Res* *5*, 29-36.
- Stern, D. M., Nawroth, P. P., Harris, K., and Esmon, C. T. (1986). Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C- protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem* *261*, 713-8.
- Stern, S., Wilson, R. C., and Noller, H. F. (1986). Localization of the binding site for protein S4 on 16 S ribosomal RNA by chemical and enzymatic probing and primer extension. *J Mol Biol* *192*, 101-10.
- Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., and et al. (1995). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* *80*, 661-70.
- Streuli, M., Krueger, N. X., Tsai, A. Y., and Saito, H. (1989). A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 8698-702.
- Sugino, T., Gorham, H., Yoshida, K., Bolodeoku, J., Nargund, V., Cranston, D., Goodison, S., and Tarin, D. (1996). Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* *149*, 873-82.

- Sy, M. S., Guo, Y. J., and Stamenkovic, I. (1991). Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* 174, 859-66.
- Sy, M. S., Mori, H., and Liu, D. (1997). CD44 as a marker in human cancers. *Curr Opin Oncol* 9, 108-12.
- Takahashi, K., Stamenkovic, I., Cutler, M., Saya, H., and Tanabe, K. K. (1995). CD44 hyaluronate binding influences growth kinetics and tumorigenicity of human colon carcinomas. *Oncogene* 11, 2223-32.
- Takahashi, M., and Cooper, G. M. (1987). ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7, 1378-85.
- Takigawa, N., Segawa, Y., Mandai, K., Takata, I., and Fujimoto, N. (1997). Serum CD44 levels in patients with non-small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features. *Lung Cancer* 18, 147-57.
- Tanabe, K., Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., and Mizuno, K. (1997). Roles of gamma-carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6. *FEBS Lett* 408, 306-10.
- Tanabe, K. K., Nishi, T., and Saya, H. (1993). Novel variants of CD44 arising from alternative splicing: changes in the CD44 alternative splicing pattern of MCF-7 breast carcinoma cells treated with hyaluronidase. *Mol Carcinog* 7, 212-20.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta [see comments]. *Nature* 361, 79-82.
- Tarin, D., Bolodeoku, J., Hatfill, S. J., Sugino, T., Woodman, A. C., and Yoshida, K. (1995). The clinical significance of malfunction of the CD44 locus in malignancy. *J Neurooncol* 26, 209-19.
- Tarin, D., and Matsumura, Y. (1993). Deranged activity of the CD44 gene and other loci as biomarkers for progression to metastatic malignancy. *J Cell Biochem Suppl* 17G, 173-85.
- Tarin, D., and Matsumura, Y. (1993). Deranged CD44 gene activity in malignancy [editorial]. *J Pathol* 171, 249-50.
- Taylor, I. C., Roy, S., and Varmus, H. E. (1995). Overexpression of the Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene* 11, 2619-26.
- Taylor, I. C., Roy, S., Yaswen, P., Stampfer, M. R., and Varmus, H. E. (1995). Mouse mammary tumors express elevated levels of RNA encoding the murine homology of SKY, a putative receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270, 6872-80.
- Teder, P., Bergh, J., and Heldin, P. (1995). Functional hyaluronan receptors are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 55, 3908-14.

- Telen, M. J., Eisenbarth, G. S., and Haynes, B. F. (1983). Human erythrocyte antigens. Regulation of expression of a novel erythrocyte surface antigen by the inhibitor Lutheran In(Lu) gene. *J Clin Invest* 71, 1878-86.
- Terpe, A., Franke, F., Stark, H., Gustmann, C., Mackay, C., Marston, W., and Gunthert, U. (1993). [Occurrence of CD44 and its isoforms under orthological and pathological conditions]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 77, 276-81.
- Terpe, H. J., Christiansen, H., Gonzalez, M., Berthold, F., and Lampert, F. (1995). Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 31A, 549-52.
- Terpe, H. J., Storkel, S., Zimmer, U., Anquez, V., Fischer, C., Pantel, K., and Gunthert, U. (1996). Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol* 148, 453-63.
- Tesfaigzi, J., An, G., Wu, R., and Carlson, D. M. (1995). Two nuclear proteins in tracheal epithelial cells are recognized by antibodies specific to a squamous differentiation marker, spr1. *J Cell Physiol* 164, 571-8.
- Testa, J. R., and Siegfried, J. M. (1992). Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 52, 2702s-2706s.
- Thomas, L., Byers, H. R., Vink, J., and Stamenkovic, I. (1992). CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 118, 971-7.
- Tockman, M. S. (1996). Clinical detection of lung cancer progression markers. *J Cell Biochem Suppl* 25, 177-84.
- Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 21, 1225-9.
- Toshima, J., Ohashi, K., Iwashita, S., and Mizuno, K. (1995). Autophosphorylation activity and association with Src family kinase of Sky receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 656-63.
- Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K., and Miyasaka, M. (1995). A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* 270, 7437-44.
- Tran, T. A., Kallakury, B. V., Sheehan, C. E., and Ross, J. S. (1997). Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 28, 809-14.
- Tsuzuki, T., Takahashi, M., Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., and Asai, J. (1995). Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* 10, 191-8.

- Turley, E. A., Austen, L., Moore, D., and Hoare, K. (1993). Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp Cell Res* 207, 277-82.
- Uhl-Steidl, M., Muller-Holzner, E., Zeimet, A. G., Adolf, G. R., Daxenbichler, G., Marth, C., and Dapunt, O. (1995). Prognostic value of CD44 splice variant expression in ovarian cancer. *Oncology* 52, 400-6.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-25.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-12.
- Varnum, B. C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T. D., Fridell, Y. W., Hunt, R. W., Trail, G., Clogston, C., Toso, R. J., and et al. (1995). Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373, 623-6.
- Viallet, J., and Minna, J. D. (1989). Gastrin-releasing peptide (GRP, mammalian bombesin) in the pathogenesis of lung cancer. *Prog Growth Factor Res* 1, 89-97.
- Walker, C., Dixon, G. R., and Myskow, M. (1995). Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression [letter; comment]. *J Pathol* 176, 319-20.
- Walker, C., Robertson, L., Myskow, M., and Dixon, G. (1995). Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 72, 164-9.
- Wang, M. H., Ronsin, C., Gesnel, M. C., Coupey, L., Skeel, A., Leonard, E. J., and Breathnach, R. (1994). Identification of the ron gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein. *Science* 266, 117-9.
- Washimi, O., Ueda, R., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Seki, T., Takahashi, T., and Takahashi, T. (1994). Expression of CD44 variant isoforms in normal and neoplastic cells of the lung. *Jpn J Cancer Res* 85, 1112-6.
- Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., and Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509-12.
- Weidner, K. M., Hartmann, G., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8, 229-37.
- Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 121, 145-54.

- Weiner, D. B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P. C., Gazdar, A., Greene, M. I., Williams, W. V., Cohen, J. A., and Kern, J. A. (1990). Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50, 421-5.
- Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J., and Cance, W. G. (1993). Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 342, 1024-5.
- Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J., and Cance, W. G. (1994). Expression of growth factor receptors, the focal adhesion kinase, and other tyrosine kinases in human soft tissue tumors. *Ann Surg Oncol* 1, 18-27.
- Weynants, P., Humblet, Y., Canon, J. L., and Symann, M. (1990). Biology of small cell lung cancer: an overview. *Eur Respir J* 3, 699-714.
- Whang-Peng, J., Kao-Shan, C. S., Lee, E. C., Bunn, P. A., Carney, D. N., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23). *Science* 215, 181-2.
- Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 53, 4754-6.
- Wilks, A. F. (1993). Protein tyrosine kinase growth factor receptors and their ligands in development, differentiation, and cancer. *Adv Cancer Res* 60, 43-73.
- Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S., and et al. (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63, 167-74.
- Wistuba, II, Lam, S., Behrens, C., Virmani, A. K., Fong, K. M., LeRiche, J., Samet, J. M., Srivastava, S., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1997). Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 89, 1366-73.
- Wolffe, E. J., Gause, W. C., Pelfrey, C. M., Holland, S. M., Steinberg, A. D., and August, J. T. (1990). The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and homology to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core/link proteins. *J Biol Chem* 265, 341-7.
- Wu, J., Rossomando, A. J., Her, J. H., Del Vecchio, R., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991). Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen-activated protein kinase on tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9508-12.
- Yamataka, A., Kato, Y., Tibboel, D., Murata, Y., Sueyoshi, N., Fujimoto, T., Nishiye, H., and Miyano, T. (1995). A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 30, 441-4.
- Yan, J. J., Chen, F. F., Tsai, Y. C., and Jin, Y. T. (1996). Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein in small cell carcinomas. *Oncology* 53, 6-11.

Yang, B., Hall, C. L., Yang, B. L., Savani, R. C., and Turley, E. A. (1994). Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biochem* 56, 455-68.

Yokozaki, H., Ito, R., Nakayama, H., Kuniyasu, H., Taniyama, K., and Tahara, E. (1994). Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas. *Cancer Lett* 83, 229-34.

Yoshida, K., Bolodeoku, J., Sugino, T., Goodison, S., Matsumura, Y., Warren, B. F., Toge, T., Tahara, E., and Tarin, D. (1995). Abnormal retention of intron 9 in CD44 gene transcripts in human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 55, 4273-7.

Zhang, Q. K., Boast, S., de los Santos, K., Begemann, M., and Goff, S. P. (1996). Transforming activity of retroviral genomes encoding Gag-Axl fusion proteins. *J Virol* 70, 8089-97.

Zöller, M., and Kaufmann, M. (1994). CD44 and Metastasis. *Onkologie* 17, 114-122.

7 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1 Rezeptortyrosinkinasefamilien der Vertebraten.....	14
Abb. 2 Schematischer Aufbau des CD44 Gens	34
Abb. 3 Nachweis der mRNA-Expression der Axl-RTK-Familie	92
Abb. 4 Aufreinigung des GST-Axl-Fusionsproteins	95
Abb. 5 Western-Blot mit polyklonalem Serum an Ganzzelextrakten nicht-kleinzelliger Zelllinien	96
Abb. 6 Test der Nachweisgrenze des aufgereinigten Antikörperserums mit Western-Blot	96
Abb. 7 Proteinnachweis der Axl-RTK durch Western-Blot-Analyse.....	97
Abb. 8 Western-Blot Proteinnachweis einer löslichen Axl-Form in Kulturüberständen	98
Abb. 9 Nachweis der Gas6-Genexpression in Lungentumorzelllinien.....	99
Abb. 10 Proteinnachweis von Gas6 in Zellkulturüberständen von Bronchialkarzinomzelllinien..	100
Abb. 11 RT-PCR Nachweis der Protein S Genexpression	101
Abb. 12 Proteinnachweis von Protein S in Zellkulturüberständen von Bronchialkarzinomzelllinien.....	102
Abb. 13 Nachweis von Protein S in Filtraten und Konzentraten verschiedener Centripreps unterschiedlicher Firmen	104
Abb. 14 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Protein S Clotting-Tests	105
Abb. 15 Photographien der an Lungentumorgewebe durchgeführten Immunhistochemien	106
Abb. 16 Expressionskonstrukte der Axl Rezeptortyrosinkinase und das EGF-R/Axl- Rezeptorchimärs und des Vektors ohne Expressionskonstrukt (Leervektor).....	109
Abb. 17 Aufbau der Rezeptortyrosinkinase Axl und des EGF-Rezeptor-Axl-Kinase-Chimärs zur Untersuchung der biologischen Funktion von Axl.....	110
Abb. 18 Autoradiographie der PCR-Resultate transfizierter Zelllinien.....	110
Abb. 19 Graphische Darstellung der Wachstumskinetiken der transfizierten H69 Zellen.....	112
Abb. 20 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskinetiken der H82 transfizierten Zelllinien.....	114
Abb. 21 Graphische Darstellung der Wachstumskinetik der transfizierten H2077 Zelllinien	116
Abb. 22 Graphische Darstellung der Proliferation Wildtyp-Axl transfizierter Zellen gegen die Proliferation Leervektor transfizierter Zellen	118
Abb. 23 Schematische Darstellung des CD44-Gens mit Lage der gewählten Primer zur RT- PCR Analyse.....	119
Abb. 24 Zusammenstellung der RT-PCR-Ergebnisse für die Zelllinie 97TM1	120
Abb. 25 RT-PCR Analysen extrahierter mRNA aus Tumoren	126
Abb. 26 Spezifitätstest der monoklonalen CD44- Antikörper.....	127
Abb. 27 Aufnahmen der Anti-CD44 Färbungen eines Plattenepithelkarzinoms (1655) (links:CD44; rechts:v6)	129
Abb. 28 Aufnahmen eines mit unterschiedlichen CD44-Antikörpern gefärbten Adenokarzinoms (5740) (links:CD44; rechts:v6).....	129
Abb. 29 Fotografien eines großzelligen Tumors mit anti-CD44 Färbung (1469) (links:CD44; rechts:v6)	130
Abb. 30 Aufnahmen eines anti-CD44 (links) und -v6 (rechts) gefärbten Bronchioalveolarkarzinoms (10578)	130
Abb. 31 Aufnahmen der CD44-Antikörperfärbungen eines kleinzelligen Tumors (5729)(CD44 links; v6 rechts)	130
Abb. 32 Fotografien der immunhistochemischen Färbungen normaler Bronchialschleimhaut	136
Abb. 33 Fotografien immunhistochemischer Färbungen präneoplastischer Bronchialschleimhaut	139

8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

(V/V)	Volumen pro Volumen; Volumenprozent
(W/V)	Gewicht pro Volumen; Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADC	Adenokarzinom
APS	Ammoniumpersulfat
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
BAC	Bronchioalveolarkarzinom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD44	Cluster of Differentiation 44
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylebaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
et al.	et aliter
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
kD	Kilodalton
l	Liter
LCLC	großzelliges Lungenkarzinom; large cell lung cancer

M	molar
m	Meter
min	Minute
mRNA	messenger-RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
NCI	National Cancer Institut
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom; non small cell lung cancer
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Posphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCC	Plattenepithelkarzinom; squamous cell carcinoma
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom; small cell lung cancer
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
U	Einheit enzymatischer Aktivität
ü.N.	über Nacht
UV	ultaviolettetes Licht
V	Volt

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Adolph; Amon; Aumüller; Beato; Bestgen; Braasch; Dötz; Drenckhahn; Fischer; Franke;
Frustorfer; Gansauge; Golenhofen; Grzeschik; Habermehl; Havemann; Hesse; Ihm; Kaffarnik;
Kirchner; Koecke; Kogan; Koolmann; Löffler; Lührmann; Mannherz; Melsheimer; Müller;
Müller; Neumann; Niessing; Petzold; Rogausch; Röhm; Schachtschabel; Schindler;
Schneider; Schuermann; Schulz; Seifart; Siegel; Unsicker; Voigt; von Löw; Waßmut;
Wesemann; Westfahl; Wiegand;

9.2 Publikationen, Vorträge und Poster

- Poster:
- 2nd workshop Genes, Chromosomes and Cancer, Freiburg 22.-23. September 1994: Expression and gene regulation pattern of CD44 in human lung cancer cell lines and tumor tissue
- 8th AEK Symposium, Heidelberg 29.-31. März 1995: CD44 expression in human lung cancer cells and tumor tissue
22. deutscher Krebskongreß, Berlin 20.-24. Februar 1996: Expression der Rezeptortyrosinkinase AXL/UFO in Linien und Geweben von Bronchialkarzinomen
104. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 18.-22. April 1998: Sekretion des antikoagulatorisch wirkenden Protein S in Bronchialkarzinomlinien
- Vorträge:
22. deutscher Krebskongreß, Berlin 20.-24. Februar 1996: Expression von CD44-Spleißvarianten in der normalen Bronchialschleimhaut und in Bronchialkarzinomen
- 8th world conference on lung cancer, Irland, Dublin, 10.-14. August 1997: Co-expression of AXL-receptor tyrosine kinase and its ligand GAS6 in non-small cell lung cancer cell lines
23. deutscher Krebskongreß, Berlin 8.-12. Juni 1998: Bildung und Sekretion des antikoagulatorisch wirkenden Protein S in Bronchialkarzinomzelllinien
- Publikationen:
- Wimmel A., Lucibello F. C., Sewing A., Adolph S. und Müller R. (1994): Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene* 9, 995-997
- Wimmel A., Schilli M., Kaiser U., Havemann K., Ramaswamy A., Brandscheid D., Kogan E. und Schuermann M. (1997): Preferential histotypic expression of CD44 isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer* 16, 151-172
- Risse-Hackl G., Adamkiewicz J., Wimmel A. und Schuermann M. : Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP1-proteins. *Oncogene* 16 (23), 3057-3068
- Wimmel A., Rohner I., Ramaswamy A., Heidtmann H.H., Seitz R., Kraus M. und Schuermann M.: Synthesis and secretion of the anticoagulant Protein S and co-expression of Tyro3 receptor in human lung cancer cells, eingereicht

9.3 Danksagung

Herrn PD Dr. Marcus Schuermann möchte ich für die Bereitstellung des Themas, das Überlassen des Laborplatzes, die Betreuung und die Diskussionsbereitschaft danken. Auch für die Unterstützung zur Teilnahme an mehreren Kongressen möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Der Schering Forschungsgesellschaft mbH danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Sabine Adolph, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn's mal brannte und die unermüdliche Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ganz besonders wichtig war ihr fachlicher und vor allem persönlicher Beistand, ohne den es manchmal sicherlich zu Verzweiflungstaten gekommen wäre.

Für ihre Ruhe und das Vermitteln ihres umfangreichen Wissens über die Histologie des Bronchialkarzinoms, die viele Zeit am Mikroskop und den Spaß, den wir miteinander hatten danke ich Prof. Dr. Evguenia Kogan. Ohne ihre moskauer Tumorsammlung, die sie wie selbstverständlich zur Verfügung stellte, wären große Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen, dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Dr. Anette Ramaswami danke ich für ihre Hilfe beim Staging und Grading der Tumoren und für die Ergänzung der moskauer Tumorsammlung mit vielen Schnitten aus ihrem Archiv. Allen Mitarbeitern der Häm/Onk/Imm danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Den Mitarbeitern im Labor, hier seinen besonders Dagmar Glitz, Qun Shen, Gundula Risse-Hackl, Moira Behn, Michael Kersting, Alison Kraus, Cordula Löchelt, Behnoush Parviz und Margret Schilli-Westermann genannt, danke ich für alle neuen Anregungen und die Bereitstellung diverser Materialien. Auch den Kommunikationsaustausch und die technische Unterstützung möchte ich nicht missen. Wir hatten viel Spaß!

Für das Korrekturlesen danke ich Orell Witthuhn und Michael Klees, ich hoffe, sie hatten wenigstens ihren Spaß dabei. Auch Herrn Dr. Jürgen Schlegel möchte ich für die Korrekturen danken, die mir eine große Unterstützung waren.

Mein ganz besonderer Dank jedoch gilt Alexander Schelbert, der mit unglaublicher Geduld und Gleichmut alle Probleme und Pannen am Computer irgendwie in den Griff bekommen hat. Auch für das Korrekturlesen der Primer möchte ich mich bei ihm bedanken, vor allem jedoch für die Nachsicht und Gelassenheit der letzten heißen Phase dieser Arbeit, die er überhaupt so erst ermöglicht hat.