

**Untersuchungen zur Funktion der Rezeptor-Tyrosinkinase
FGFR4 in der Krebszellinvasion und Apoptose**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Hans-Jürgen Berger
aus München

April 2006

Promotionsgesuch eingereicht am:
Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prüfungsausschuss:

Vorsitzender
1. Prüfer
2. Prüfer
3. Prüfer

10. April 2006
Prof. Dr. Axel Ullrich / Prof. Dr. Rainer Deutzmann

Prof. Dr. Ralph Witzgall
Prof. Dr. Rainer Deutzmann
Prof. Dr. Axel Ullrich
Prof. Dr. Stephan Schneuwly

„Wer nicht gelegentlich auch einmal
kausalwidrige Dinge zu denken vermag,
wird seine Wissenschaft nie um eine neue
Idee bereichern können.“

Max Planck (1858-1947)

Meiner liebsten Boglarka

I EINLEITUNG	1
I.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen	1
I.1.1 Die FGF-Rezeptorfamilie	2
I.1.2 Die Signaltransduktion von FGF-Rezeptoren	5
I.1.3 Die FGF-Rezeptoren 1–3 und damit verbundene Krankheiten	8
I.2 Der FGF-Rezeptor 4	10
I.2.1 Grundlegende Eigenschaften des FGF-Rezeptor 4	11
I.2.2 Der Promotor und die transkriptionelle Kontrolle	12
I.2.3 Die Signaltransduktion und die FGF-Rezeptor 4 Lokalisation	12
I.2.4 Die Expression des FGF-Rezeptors 4 in der Entwicklung	14
I.2.5 Der FGF-Rezeptor 4 in transgenen Mäusen	15
I.2.6 Der FGF-Rezeptor 4 und Krebs	16
I.3 Charakteristika von Krebszellen	17
I.3.1 Mechanismen der Zellmigration und Krebszellinvasion	18
I.3.1.1 Der Einfluss der FGF-Rezeptorfamilie	20
I.3.2 Die verschiedenen Apoptose-Mechanismen	21
I.3.2.1 Die Apoptose im Zusammenhang mit der FGF-Rezeptorfamilie	23
I.4 Zielsetzung dieser Arbeit	24
II MATERIAL UND METHODEN	25
II.1 Bezugsquellen	25
II.1.1 Chemikalien	25
II.1.2 Enzyme	26
II.1.3 Radiochemikalien	26
II.1.4 Handelsübliche „Kits“ und Sonstiges	26
II.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden	27
II.2 Medien und Puffer	27
II.2.1 Medien für <i>E. coli</i> Bakterien	27
II.2.2 Zellkulturmedien	27
II.2.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	27
II.3 Bakterienstämme	29
II.4 Zelllinien	30
II.5 Antikörper	31
II.6 Plasmide und Oligonukleotide	32
II.6.1 Ausgangsvektoren	32
II.6.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide	33
II.6.3 Wichtige Oligonukleotide	35
II.7 Molekularbiologische Methoden	38
II.7.1 Plasmidpräparationen	38
II.7.1.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke	38
II.7.1.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke	38
II.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
II.7.3 Sequenzierung von DNA	38
II.7.4 Enzymatische Behandlung von DNA	39
II.7.4.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	39
II.7.4.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden	39

II.7.4.3 Phosphorylierung von Primern	39
II.7.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	39
II.7.4.5 Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase	40
II.7.4.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - ³³ P]-dATP	40
II.7.5 Gelelektrophorese von DNA	40
II.7.6 Isolierung von DNA-Fragmenten	40
II.7.7 DNA-Transfer in <i>E. coli</i> Bakterien	41
II.7.7.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	41
II.7.7.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	41
II.7.7.3 Dauerkulturen von <i>E. coli</i> Bakterien	41
II.7.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	41
II.7.8.1 PCR-Amplifikation von DNA	41
II.7.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	42
II.7.9 Arbeiten mit RNA	42
II.7.9.1 Präparation von Total-RNA	42
II.7.9.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA	43
II.7.9.3 Präparation von cDNA	43
II.7.9.4 Herstellung der cDNA-Makro-Arrays	44
II.7.9.5 Prähybridisierung der cDNA-Makro-Arrays	44
II.7.9.6 Hybridisierung der Arrays mit radioaktiv-markierter cDNA	44
II.7.9.7 Waschen der cDNA-Arrays	45
II.7.9.8 Auswertung der cDNA-Makro-Arrays	45
II.7.9.9 Gruppierung der Gene	46
II.8 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	46
II.8.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	46
II.8.2 Mykoplasmentest	46
II.8.3 Transfektion von Zellen	47
II.8.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion	47
II.8.3.2 Transfektion mit anderen Methoden	47
II.8.4 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen	48
II.9 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper	48
II.9.1 Isolierung von Antigenen zur Produktion polyklonaler Antikörper	48
II.9.2 Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen	48
II.9.3 Affinitätsreinigung des Serums	49
II.9.3.1 Präparation der CNBr aktivierten Sepharose	49
II.9.3.2 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie	49
II.10 Proteinanalytische Methoden	50
II.10.1 Expression und Aufreinigung von FGFR4 _{ex} -GST	50
II.10.2 Triton X-100 Lyse von Zellen	50
II.10.3 Proteinbestimmung	50
II.10.4 Immunpräzipitation von Proteinen	50
II.10.5 Zellfraktionierung	51
II.10.6 GST-Pulldown-Assay	51
II.10.7 Tandem-Affinity-Purification (TAP) Pulldown	52
II.10.8 Proteinfällung nach Wessel & Flügge	52
II.10.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
II.10.10 Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	53
II.10.11 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	53
II.10.12 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	53
II.10.13 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	53
II.10.14 Extrazelluläre Matrix (ECM) ELISA	53
II.11 Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen	54
II.11.1 Stimulation von Zellen	54
II.11.2 Assays zum Nachweis von Chemotaxis	54
II.11.2.1 Wundheilungsexperiment	54

Inhaltsverzeichnis	C
<hr/>	
II.11.2.2 Transwell-Migrationsassay	54
II.11.2.3 Tumorzellinvasionsassay	55
II.11.2.4 Branching-Assay	55
II.12 Apoptose-Assays mit Propidium-Jodidfärbung	55
III ERGEBNISSE	56
III.1 Interaktionspartner von FGFR4	56
III.1.1 Untersuchungen zur Interaktion von FGFR4 mit NCAM	58
III.1.2 GST-Pulldown und TAP-Tagging Technologie	59
III.2 cDNA-Makro-Array Analysen von polyklonalen Zelllinien	65
III.2.1 Klonierung von Zelladhäsionsmolekülen für die Arrays	65
III.2.2 Nachweis der FGFR4-Proteinexpression in polyklonalen Zelllinien	66
III.2.3 cDNA-Makro-Array Analyse von MCF7 Zellen	68
III.2.4 cDNA-Makro-Array Analyse von MDA-MB-231 Zellen	71
III.2.5 cDNA-Makro-Array Analyse von MDA-MB-435S Zellen	75
III.3. Rolle des FGFR4 in Zellmigration und Krebszellinvasion	78
III.3.1 Expression verschiedener FGFR4-Isoformen in stabilen Zelllinien	78
III.3.2 Untersuchungen des Migrationsverhaltens von stabilen Zelllinien	80
III.3.3 Untersuchungen zur Krebszellinvasion	86
III.3.4 Untersuchungen zur Funktion des FGFR4 in 3D-Matrices	88
III.4 Der FGFR4 in der Apoptose	91
III.4.1 Stabile Repression der FGFR4-Expression in Zellsystemen	91
III.4.2 Apoptoseverhalten von stabilen FGFR4-reprimierten Zelllinien	93
III.4.3 Beeinflussung der Signaltransduktion in stabilen FGFR4-Zelllinien	98
III.4.4 Transiente Repression der endogenen FGFR4-Expression	101
IV DISKUSSION	103
IV.1 Die Bindungseigenschaften der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen	103
IV.2 Die Überexpression von FGF-Rezeptor 4-Isoformen beeinflusst das Genexpressionsprofil von Brustkrebszellen	106
IV.3 Die Krebszellinvasion wird durch die Expression bestimmter FGF-Rezeptor 4-Isoformen supprimiert	109
IV.4 Der FGF-Rezeptor 4 vermittelt Apoptose-Resistenz von Krebszellen durch eine regulierte Co-Expression von BclX_L	113
V ZUSAMMENFASSUNG	117
VI LITERATURVERZEICHNIS	118
VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	141

I Einleitung

I.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen stellen eine große Familie von Membranproteinen dar, die strukturell in 20 Subfamilien eingeteilt werden können (van der Geer et al., 1994). Allen gemeinsam ist eine extrazelluläre, liganden-bindende und in der Regel glykosylierte Domäne, eine Transmembranhelix zur Plasmamembranlokalisation bzw. -verankerung und eine cytoplasmatische Domäne, welche Kinaseaktivität besitzt und zur Autophosphorylierung des Rezeptors selbst oder zur Tyrosinphosphorylierung von Rezeptorsubstraten führt (Yarden and Ullrich, 1988). Die Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine entscheidende Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen und sind so an der Kontrolle des Zellzyklus, der Zellmigration, des Zell-Metabolismus, der Apoptoseresistenz von Zellen, der Proliferation, sowie der Differenzierung von Zellen beteiligt (Hunter 1998; Hubbard et al., 1998).

Mit Ausnahme der Insulin-Rezeptorfamilie liegen alle Rezeptormoleküle in der Membran zuerst als Monomere vor. Die Ligandenbindung induziert durch Konformationsänderung und Stabilisierung der Rezeptoren eine Dimerisierung, was schließlich eine erhöhte Kinaseaktivität und die Autophosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne bewirkt (Greenfield et al., 1989; Ullrich and Schlessinger, 1990; Heldin 1995). Als Konsequenz dieser Rezeptoraktivierung werden andere Adapterproteine über SH2- (Src homology 2) oder PTB- (phosphotyrosine binding) Domänen gebunden und ebenfalls aktiviert. Dadurch besitzen die Rezeptor-Tyrosinkinasen nicht nur eine enzymatische Aktivität, sondern fungieren auch als Plattform für andere Signalmoleküle (Pawson and Schlessinger, 1993).

Man nimmt an, dass es insgesamt drei verschiedene Mechanismen gibt, wie Signalproteine nach Rezeptor-Tyrosinkinase Stimulation aktiviert und extrazelluläre Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden können.

Entweder kommt es zu einer sog. „Membran-Translokation“ des entsprechenden Signalmoleküls, wenn z.B. die PI3-Kinase aktiviert und Inositoltriphosphat gebildet wird, um membranassoziierte PDK1- und PKB-Kinase (auch Akt-Kinase genannt) sequentiell zu phosphorylieren (Alessi et al., 1997; Anderson et al., 1998). Es besteht andererseits die

Möglichkeit, dass durch die Bindung eines Adaptermoleküls an Phosphotyrosinreste des Rezeptors eine Konformationsänderung und die Aufhebung einer Autoinhibition induziert, und dadurch die eigene Enzymaktivität stimuliert wird. Dies geschieht zum Beispiel, wenn die Src-Kinase an entsprechende Tyrosinreste des PDGF-Rezeptors bindet (Thomas and Brugge, 1997; Xu et al., 1999). Schließlich kann ein gebundenes Signalmolekül auch unmittelbar über Tyrosin-Phosphorylierung durch die Rezeptor-Tyrosinkinase, wie im Fall von PLC γ aktiviert werden (Kim et al., 1991).

Die Negativregulation der Rezeptor-Tyrosinkinase Signaltransduktion kann über die Expression von antagonistischen Liganden, wie z.B. Argos für Drosophila EGF-Rezeptor (Jin et al., 2000) oder über die Hetero-Oligomerisation mit Rezeptor-Mutanten (Jaye et al., 1992) erfolgen. Eine Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität wird allerdings häufiger über die Phosphorylierung von bestimmten Aminosäureresten, wie z.B. bei dem EGFR-Phospho-Threonin 654 in der Juxtamembrandomäne und einer daraus resultierenden, schlechteren (EGF) Ligandenbindung (Cochet et al., 1984; Davis and Czech, 1985) oder über eine erhöhte Aktivität von Tyrosinphosphatasen (Elchebly et al., 1999) erzielt.

Die Stimulation der Rezeptor-Tyrosinkinase führt in der Regel schließlich zur schnellen Internalisation und Degradation des Membranproteins und seinem Liganden. Nachdem das Protein durch E3-Ubiquitin-Ligasen wie z.B. Cbl modifiziert wurde, wird ein mono-ubiquitiniertes Rezeptor dabei entweder in multivesikulären Körperchen und seinen lysosomalen Enzymen abgebaut bzw. wieder recycelt und zur Zelloberfläche zurücktransloziert, was von der Kinaseaktivität des Rezeptors abhängt (Ullrich and Schlessinger, 1990; Mosesson et al., 2003; Haglund et al., 2003), oder die poly-ubiquitinierte Rezeptor-Tyrosinkinase wird im Cytoplasma durch das Proteasom abgebaut (Joazeiro et al., 1999).

I.1.1 Die FGF-Rezeptorfamilie

Zu der Proteinfamilie von FGF(Fibroblast growth factor)-Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören im engeren Sinne vier Mitglieder: FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4, die untereinander eine Homologie von 55-72 % aufweisen (Lee et al., 1989; Givol et al., 1992; Jaye et al., 1992; Johnson and Williams, 1993). Ein fünftes Familienmitglied – FGFR5 – wurde zwar durch PCR-Analysen von embryonaler cDNA postuliert; dieses homologe Protein mit der Länge von 504 AS

besitzt jedoch keine intrazelluläre Kinasedomäne und kein HAV-Aminosäurenmotiv (Kim et al., 2001).

Strukturell allen anderen FGF-Rezeptoren gemeinsam ist eine extrazelluläre Domäne, bestehend aus drei immunglobulinartigen Domänen, abgekürzt mit D1-D3. Zwischen D1 und D2 findet man in der Linkerregion eine sog. „Acid-Box“ aus 7-8 sauren Aminosäuren; in D2 liegt außerdem eine konservierte, positiv geladene Region als Heparinbindungsstelle vor (Schlessinger et al., 2000). Man geht davon aus, dass speziell die Domänen D2 und D3 die Bindung von FGF-Liganden, sowie Heparin vermitteln, während die Domäne D1 und die Acid-Box eine autoinhibitorische Funktion aufweisen (Olsen et al., 2004; Schlessinger, 2003).

Im menschlichen Genom finden sich 23 verschiedene FGF-Liganden, welche wahrscheinlich durch Chromosomen- und Genduplikationen im Laufe der Evolution entstanden sind, da diese untereinander eine hohe Sequenzhomologie (13-71 %) aufweisen und außerdem teilweise auf denselben Chromosomen lokalisiert sind. Die Proteine besitzen darüber hinaus ein relativ niedriges Molekulargewicht zwischen 17 und 34 kDa. Die Domänen für die Heparinbindung der FGF-Liganden unterscheiden sich außerdem deutlich von den Rezeptorbindungsdomänen. Die FGF-Moleküle können entweder klassisch sekretiert (z.B. FGF3-10 und FGF15-23), über ER-Golgi-unabhängige Mechanismen in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden (z. B. FGF 1 und 2) oder verbleiben wahrscheinlich durch Fehlen entsprechender Signalsequenzen in der Zelle (z. B. FGF 11-14). Das Expressionsmuster der FGF-Liganden variiert oft von Gewebe zu Gewebe und ist in der Regel nicht unbedingt auf bestimmte Stadien in der Entwicklung beschränkt (Ornitz and Itoh, 2001).

Neben der einfachen, α -helikalen Transmembrandomäne besitzt der Rezeptor auch eine cytoplasmatische Proteintyrosinkinase-Domäne – bestehend aus zwei Subdomänen – für seine biologische Aktivität (Eswarakumar et al., 2005). Anhand von Untersuchungen zur Aktivierung von FGFR1 wurde gezeigt, dass dabei eine Phosphorylierung von zwei Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne von entscheidender Bedeutung ist, um die Rezeptoraktivität aufrecht zu erhalten. Im autoinhibierten, inaktiven Zustand konkurriert ein Prolinrest am C-Terminus der Aktivierungsschleife um die Substratbindung, während ATP weiterhin von der Nukleotidbindungsstelle aufgenommen werden kann (Mohammadi et al., 1996).

Als weiteres wichtiges Charakteristikum von FGF-Rezeptoren gilt das Auftreten von verschiedenen Rezeptorisoformen bedingt durch alternatives Spleißen. Dadurch findet man neben sekretierten Molekülen auch FGF-Rezeptoren, die anstelle von drei nur zwei extrazelluläre Domänen aufweisen oder sich in der Domäne D3 unterscheiden.

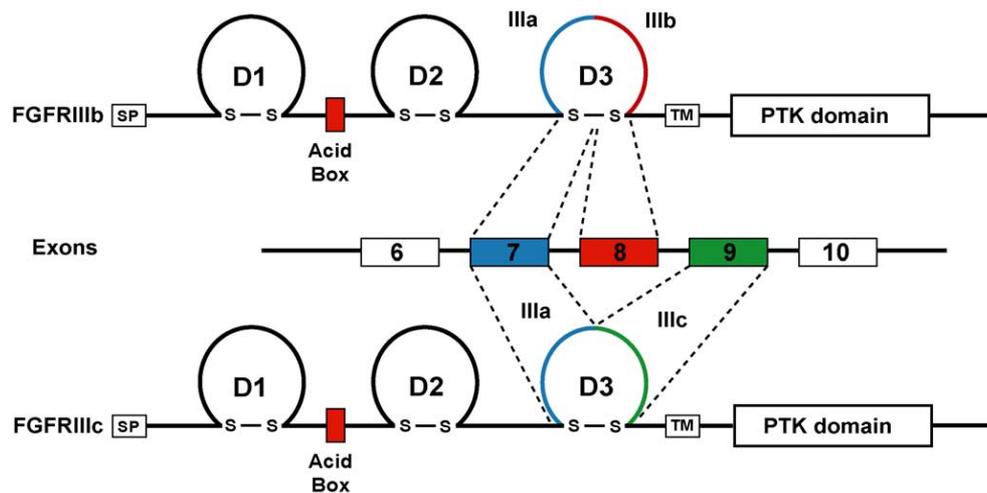


Abb. 1: Struktur und Spleißen von FGF-Rezeptoren anhand des Beispiels FGFR3 (Eswarakumar et al., 2005)

Entsprechend der entwickelten Nomenklatur werden N-terminal exprimierte Hälften der D3-Domäne mit einem „a“ als Zusatz zum Rezeptornamen abgekürzt, während auf C-terminal exprimierte Exons mit FGF-Rezeptor „b“ oder FGF-Rezeptor „c“ hingewiesen wird (Abb. 1). Die FGF-Rezeptoren sind dadurch nicht nur in der Lage, unterschiedliche Liganden je nach exprimiertem Familienmitglied zu binden, sondern die Ligandenbindung kann auch durch die Expression verschiedener Rezeptor-Isoformen und daraus resultierender unterschiedlicher Ligandenaffinität moduliert werden (Miki et al., 1992; Yayon et al., 1992), wie dies in Tab. 1 dargestellt wird.

<i>FGF-Rezeptor-Isoformen</i>	<i>Ligandenaffinität</i>
FGFR1b	FGF1, -2, -3 und -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 und -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10 und -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 und -18
FGFR3b	FGF1 und -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 und -23
FGFR4c	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18 und -19

Tab. 1: Ligandenbindungseigenschaften von FGF-Rezeptoren (Eswarakumar et al., 2005)

I.1.2 Die Signaltransduktion von FGF-Rezeptoren

Es sind nur zwei Faktoren von entscheidender Bedeutung für die Signaltransduktion von FGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Einerseits handelt es sich dabei um die Tatsache, dass der FGF-Rezeptor verschiedene Liganden über die extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden kann (I.1.1). Andererseits besitzt die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors die Eigenschaft, auch verschiedene intrazelluläre Adapterproteine zu komplexieren, um so das Signal in die Zelle weiterzuleiten. Dies wird in einer Übersicht zusammenfassend in Abb. 2 dargestellt.

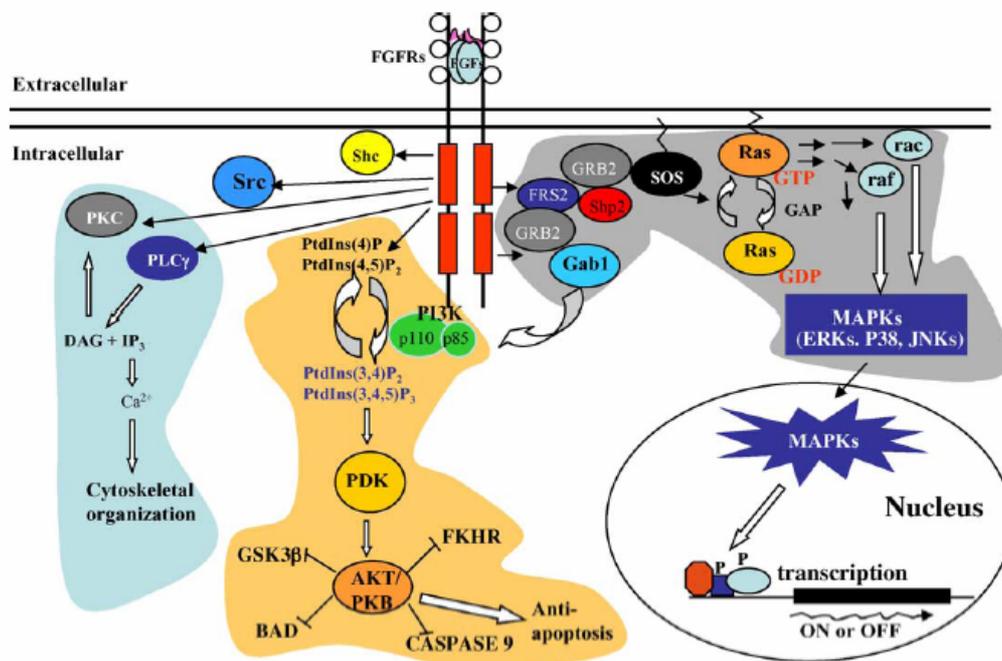


Abb. 2: Übersicht über die FGF-Rezeptor-Signaltransduktionswege (Dailey et al., 2005)

Dabei konnte man prinzipiell feststellen, dass bei identischer Liganden-Stimulation die verschiedenen FGF-Rezeptoren ein unterschiedlich starkes mitogenes Signal in der Zelle auslösen. Dies hängt von den gering verschiedenen, cytoplasmatischen Aminosäuresequenzen der Rezeptoren ab (Ornitz et al., 1996).

Außerdem können alle FGF-Rezeptoren die gleichen Signaltransduktionswege aktivieren und divergieren jeweils nur in der Amplitude des ausgelösten Signals, was auf einen fundamentalen Unterschied in der Kinaseaktivität der cytoplasmatischen Domänen hindeutet (Raffioni et al., 1999).

In der FGFR1 Kinasedomäne existieren zwar z.B. 7 Tyrosinreste, die theoretisch als Substrate phosphoryliert werden können. Nur Tyr653 und Tyr654 sind allerdings für die katalytische Aktivität des Proteins von entscheidender Bedeutung (Mohammadi et al., 1996 b). Wenn nämlich die restlichen Tyrosinreste des Rezeptors mutiert werden, ergibt sich keine verminderte MAP-Kinase-Aktivität, was deren mögliche Bedeutung in der Signaltransduktion unbeantwortet lässt. Andererseits kann ein Adapterprotein auch an Tyrosin-mutierten FGF-Rezeptor binden (Kouhara et al., 1997), was auch die These stützt, dass die Signaltransduktion von FGF-Rezeptoren auf anderen bzw. unterschiedlichen Wegen erfolgen kann.

Phospholipase C ($PLC\gamma$), welche Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat in Diacylglycerol und Inositol-Triphosphat spaltet, wurde als Interaktionspartner von FGF-Rezeptoren identifiziert (Burgess et al., 1990). Die SH2-Domäne von $PLC\gamma$ bindet spezifisch an den Tyrosinrest 766 von FGFR1 und ist für die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositol verantwortlich (Mohammadi et al., 1991 and 1992). Mutationen im Tyr766 beeinträchtigen jedoch nicht die FGF-Rezeptor-vermittelte Mitogenese oder neuronale Differenzierung, was auf andere Funktionen im Zusammenhang mit der FGF-Rezeptor Signaltransduktion hindeutet, z.B. die Zytoskelett-Reorganisation (Spivak-Kroizman et al., 1994; Goldschmidt-Clermont et al., 1991).

Auch Src, eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, könnte in der FGF-Rezeptor Signaltransduktion und einer Zytoskelettveränderungen involviert sein (Zhan et al., 1993). Rekombinanter FGFR1 zeigt zwar in Immunpräzipitationen eine Interaktion mit Cortactin (Zhan et al., 1994), obwohl durch eine Mutierung des Tyrosin 766 zu Phenylalanin andererseits eine erhöhte Phosphorylierung von Src beobachtet werden konnte, und man davon ausgehen muss, dass der $PLC\gamma$ -Signalweg die Src-Aktivität eher inhibiert (Langren et al., 1995).

In Endothelzellen wurde auch eine Interaktion zwischen der SH2-Domäne des Crk Adapterproteins und dem Tyrosin 463 von FGFR1 nachgewiesen, obwohl dieser Zusammenhang vorher in Fibroblasten nicht hergestellt werden konnte (Mohammadi et al., 1996 b). Dabei wird zwar nicht die Zellmotilität, jedoch die Proliferation und die Aktivitäten der MAPK Erk2, sowie der Jun-Kinase beeinflusst (Larsson et al., 1999).

Wie bereits oben erwähnt, phosphoryliert ein tyrosinmutierter FGF-Rezeptor nach einer erfolgten Ligandenstimulation auch ein cytoplasmatisches Adapterprotein, nämlich FRS2/SNT-1, was auf einen Signaltransduktionsweg unabhängig von Proteinen mit SH2-Domänen hindeutet (Wang et al., 1996). Hier wird der Ras/MAPK-Signalweg aktiviert, welcher für die wachstumsfaktor-induzierte Zellzyklus-Progression verantwortlich ist. Zunächst bindet FRS2 das Adapterprotein Grb2/SOS und rekrutiert anschließend Ras in den FGF-

Rezeptorsignalkomplex (Kouhara et al., 1997). FRS2 liegt dabei in einer myristylmembranverankerten Form vor und interagiert mit dem Juxtamembranbereich 407-433 von FGFR1 (Xu et al., 1998), wobei das Adapterprotein und der FGF-Rezeptor wahrscheinlich schon konstitutiv aneinander gebunden sind (Ong, 2000). FRS2 kann jedoch auch an die Protein-Tyrosinphosphatase Shp2 binden, was durch Immunopräzipitationen gezeigt wurde (Ong et al., 1997 and 2000); FRS2 besitzt vier Bindungsstellen für Grb2 und zwei für Shp2 (Kouhara et al., 1997). FRS2 aktiviert unter bestimmten Umständen außerdem auch Isotypen der Proteinkinase C (PKC) über FGF-Rezeptorstimulation, wobei diese physiologische Rolle noch unklar ist (Lim et al., 1999).

FRS2 kann andererseits auch eine Negativregulation auslösen, wenn das Protooncogen Cbl gebunden wird, und dadurch der FGF-Rezeptor-FRS2-Signalkomplex über Ubiquitinierung abgebaut wird (Wong et al., 2002). Die FGF-Signaltransduktion und die MAPK-Aktivierung führt zusätzlich zu einer negativen Rückkopplung, wenn die Tyrosinphosphorylierung von FRS2 abnimmt und stattdessen eine Threoninphosphorylierung stattfindet, wodurch Grb2 schlechter an den Signalkomplex binden kann (Lax et al., 2002).

Die Dauer der FGF-Rezeptorsignaltransduktion kann auch verlängert werden, wenn cytoplasmatische Sprouty-Proteine aktiviert und vom FGF-Rezeptor gebunden werden, wodurch die Komplexierung von Grb2/SOS mit FRS2/FGF-Rezeptor unterbunden wird (Hanafusa et al., 2002). Ähnlich verlängern auch sog. SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signaling) die Signaltransduktion von FGF-Rezeptoren, indem z.B. eine SOCS1-Überexpression zusammen mit FGFR3 die MAPK-Phosphorylierung erhöht und die Internalisation des Rezeptors dabei verlangsamt wird (Ben-Zvi et al., 2006). Andere positive Modulatoren der FGF-Signaltransduktion gehören zur Familie der „Transmembranproteine mit Leucin-reichen Wiederholungen“ wie z.B. XFLRT3 (Bottcher et al., 2004).

Zusammenfassend können die FGF-Rezeptor-Tyrosinkinase also zwei verschiedene Wege der Signaltransduktion aktivieren: entweder findet eine Komplexierung von Adapterproteinen (wie PLC γ oder Crk) statt, die über deren SH2-Domänen und die Phosphorylierung von Rezeptor-Tyrosinresten erfolgt, oder der Rezeptor aktiviert über die Interaktion mit FRS2/SNT-1 den Ras/MAPK-Signalweg.

I.1.3 Die FGF-Rezeptoren 1–3 und damit verbundene Krankheiten

Im menschlichen Organismus spielen die FGF-Rezeptoren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung verschiedener Krankheiten. Viele davon stehen in direktem Zusammenhang mit einer Punktmutation der FGF-Rezeptoren 1-3 (FGFR1-3), wodurch es zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen kommt (Neilson and Friesel, 1996). Dies äußert sich in Fehlbildungen während der Finger-, Schädel- oder Skelettentwicklung, was z.B. zum Zwergwuchs führt. Die Pfeiffer-, Crouzon-, Jackson-Weiss- oder auch Apert-Syndrome stehen im Zusammenhang mit Mutationen im FGFR1 und FGFR2, während Mutationen im FGFR3 meist in Achondroplasie (ACH), Hypochondroplasie (HCH) und thanatophorische Dysplasie I und II (TD I und II) resultieren (Webster and Donoghue, 1997; Wilkie, 1997). Dies wird in Tab. 2 nochmals übersichtlich zusammengefasst.

Die entsprechenden Mutationen von FGFR1 und FGFR2 für die erstgenannten Syndrome finden sich in der extrazellulären Domäne und zwar in einem Bereich, der sich von der Linkerregion zwischen D2 und D3 bis hin zur Linkerregion zwischen D3 und der Transmembrandomäne erstreckt. Der Funktions- und Aktivitätsgewinn ist hier auf ein erhöhtes Dimerisierungspotential oder auf eine verbesserte Ligandenbindung zurückzuführen (Yu et al., 2000; Ibrahimi et al., 2001).

Die entscheidenden Mutationen im FGFR3, welche zu HCH oder TD II führen, liegen in der Proteintyrosinkinasedomäne vor, wodurch es unabhängig von einer vorangegangenen Ligandenbindung zu einer erhöhten autokatalytischen Kinaseaktivität des Rezeptors kommt (Webster and Donoghue, 1997). Der Zwergwuchs bei ACH wird durch eine Mutation in der Transmembrandomäne an der AS-Position 380 und einer damit verbundenen Glycin- zu Argininkonversion ausgelöst. Dadurch nimmt einerseits die Stabilität des Rezeptordimers zu, andererseits wird dadurch die Kinaseaktivität der Rezeptor-Tyrosinkinase erhöht (Webster and Donoghue, 1996).

Das Kallmann-Syndrom, eine autosomal dominante Erbkrankheit, wird im Gegensatz dazu auf eine unterdrückte Signaltransduktion des FGFR1 zurückgeführt. In diesem Zusammenhang konnte man bisher 15 verschiedene Mutationen identifizieren (Dode et al., 2003; Dode et al., 2004).

Genetic alterations of FGFRs in human skeletal disorders

Disease	Description	Gene	Activating mutation
Crouzon syndrome	Synostosis of coronal sutures, midface hypoplasia, ocular proptosis	<i>FGFR2</i>	Multiple; about 39 different mutations were reported, e.g. Cys278Phe, Cys342Tyr, Ser347Cys
Jackson–Weiss syndrome Beare-Stevenson cutis gyrata	Craniosynostosis with foot abnormalities Cloverleaf skull, over growth of skin with furrowed palms and soles, prominent umbilical stump	<i>FGFR2</i> <i>FGFR2</i> ; <i>FGFR3</i>	Ala344Gly; Cys342Ser or Arg Ser372Cys; Tyr375Cys; Pro250Arg
Apert syndrome	Severe and symmetric fusion of hands and feet, craniosynostosis	<i>FGFR2</i>	Ser252Trp; Pro253Arg
Pfeiffer syndrome	Craniosynostosis, broad thumbs and toes	<i>FGFR1</i> ; <i>FGFR2</i>	Pro252Arg Multiple; 36 mutations reported
Muenke syndrome	Unilateral or bilateral coronal synostosis; thimble like middle phalanges (hands)	<i>FGFR3</i>	Pro250Arg
Saethre-Chotzen-like syndrome Achondroplasia	Craniofacial and limb defects Short stature, midface deficiency	<i>FGFR2</i> ; <i>FGFR3</i> <i>FGFR3</i>	ValVal269-70del Pro250Arg Gly346Glu; Gly375Cys; Gly380Arg
SADDAN (severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans)	Short limbs, developmental delay, acanthosis nigricans	<i>FGFR3</i>	Lys650Met
Thanatophoric dysplasia type I	Curved short femurs; lethal	<i>FGFR3</i>	Multiple; 9 different mutations reported
Thanatophoric dysplasia type II Hypochondroplasia	Stright femurs with cloverleaf skull; lethal Short limbs but less severe than achondroplasia, large head circumference	<i>FGFR3</i> <i>FGFR3</i>	Lys650Glu Multiple; 9 different mutations reported

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Syndrome verursacht durch FGF-Rezeptor-Mutationen (Eswarakumar et al., 2005)

Außerdem sind die FGF-Rezeptoren auch an der Entwicklung verschiedener Krebsarten beteiligt, was anhand verstärkter Gewebeexpressionen, nämlich über Immunhistochemie, gezeigt werden konnte: man findet Anomalien in Gehirntumoren (Morrison et al., 1994), in Brustkrebs (Yoshimura et al., 1998), in Prostatakrebs (Giri et al., 1999), in Schilddrüsenkrebs (Shingu et al., 1998), in Hautkrebs (Ahmed et al., 1997) und in Speicheldrüsenkrebs (Myoken et al., 1996).

Dies kann mit einer erhöhten Co-Expression von FGF-Liganden in Verbindung stehen, wodurch es dann zu einer autokrinen Stimulation kommt.

Keimbahnmutationen wie z. B. bei ACH und TDI bzw. TDII können in einigen Fällen ebenfalls für die Entstehung von Krebs mitverantwortlich sein. Am Beispiel von *FGFR3*-Mutationen und gleichzeitig auftretendem Blasenkrebs oder Gebärmutterhalskarzinoma konnte dies gezeigt werden (Cappellen et al., 1999).

Insbesondere chromosomale Translokationen in den FGF-Rezeptorgenen nehmen abschließend eine wichtige Rolle in der Entwicklung von malignen Tumoren ein. Hier treten Gen-Neuordnungen und -Fusionen auf, welche eine Oligomerisierung der FGF-Rezeptoren und schließlich eine konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase hervorrufen. Am Beispiel des *FGFR1* findet man Fusionen mit Teilsequenzen der Bcr-Kinase oder mit dem Zinkfingerprotein

ZNF-198, wobei diese Rezeptorchimären andere Signalwege als sonst üblich in der Zelle aktivieren. Als Ergebnis davon treten vor allem hämatologische Erkrankungen, wie das „8p11 myeloproliferative Syndrom“ (EMS) oder Krankheitsverläufe ähnlich einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) auf (Demiroglu et al., 2001; Fioretos et al., 2001; Roumiantsev et al., 2004). Vergleichbare Translokationen wurden auch für FGFR3 und dem damit verbundenen multiplen Myelom (MM) oder dem peripheren T-Zell-Lymphom beobachtet (Chesi et al., 1997).

I.2 Der FGF-Rezeptor 4

Der FGFR4 als viertes Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie wurde von Armstrong et al. (1992) aus humanen K562 Zellen kloniert und schließlich auf dem Chromosom V (5q33-qter) lokalisiert, während in der Maus der homologe Rezeptor auf dem Chromosom XIII liegt (Avraham KB et al., 1994). Die Homologie zu anderen FGF-Rezeptoren bezüglich des strukturellen Aufbaus des FGFR4 ist dabei deutlich erkennbar (Abb. 3).

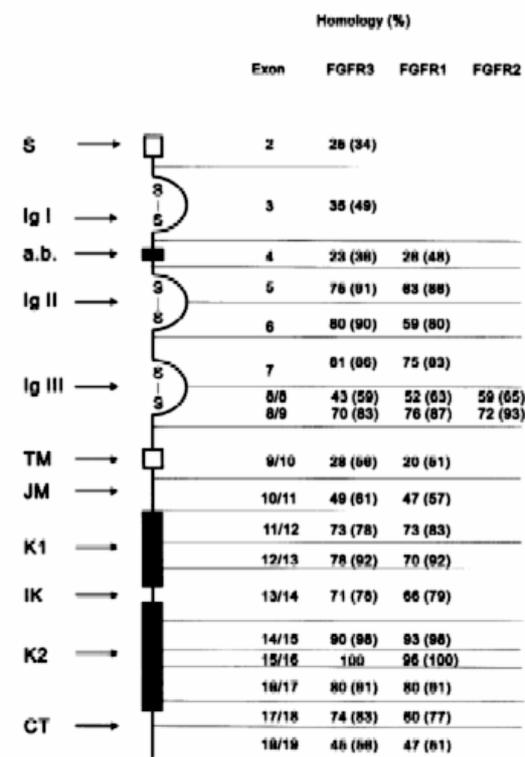


Abb. 3: Struktur von FGFR4 (Kostrzewa and Müller, 1998)

I.2.1 Grundlegende Eigenschaften des FGF-Rezeptor 4

Ein Vergleich des humanen FGF-Rezeptors 4 mit den anderen Familienmitgliedern zeigt, dass dieser Rezeptor nur 18 anstelle von 19 Exons besitzt und deshalb nicht klassisch wie der Rest der Familienmitglieder alternativ in D3 gespleißt werden kann (Vainikka et al., 1992; Kostrzewa and Müller, 1998). Die einzigen „Spleißvarianten“, die man heute kennt, wurden in verschiedenen Krebszelllinien gefunden. Der Rezeptor kann dabei einerseits als transmembrandeletierte und sekretierte (Ezzat et al., 2001; Takaishi et al., 1999), andererseits als membranverankerte, C-terminal verkürzte (van Heumen et al., 1999) oder als cytosolische Isoform (Ezzat et al., 2002) auftreten.

Besonders die extrazelluläre Domäne wurde häufig auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht, da die Rezeptor-Tyrosinkinasen für ihre Aktivierung in der Regel eine Ligandenstimulation benötigen. Rekombinanter FGFR4 wird in seinem N-Terminus prinzipiell an drei Stellen (N88, 234 und 266) N-glykosyliert, besitzt jedoch keine O-Glykosylierung (Tuominen et al., 2001). Zusätzlich wurde speziell die Bindung an FGF1, FGF2 und FGF8 nachgewiesen, obwohl auch Heparin alleine eine Oligomerisation des Rezeptors verursachen kann (Ron et al., 1993; Gao and Goldfarb, 1995; Ornitz et al., 1996; Loo et al., 2000).

Als besonderes Charakteristikum des Rezeptors gilt, dass dieser auch einen besonderen Liganden-Rezeptor-Komplex bildet, welcher für andere FGF-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden konnte. FGFR4 komplexiert als einziger Familienvertreter FGF19, wobei zwar Heparin für die Stabilisierung notwendig ist, die Affinität aber viel geringer als im Vergleich mit anderen Liganden ausfällt (Xie et al., 1999; Harmer et al., 2004).

Für die Kinaseaktivität ist im zellulären Kontext die Expression von verschiedenen Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) anstelle von Heparin von größerer Bedeutung, um die Affinität des FGFR4 für FGF1 oder FGF2 zu modulieren (Kan et al., 1999). Dabei wurde gezeigt, dass strukturell mindestens Oktasaccharide mit einer hohen Zahl an 6-O-Sulfatgruppen für eine effiziente Rezeptor-Liganden-Bindung notwendig sind (Loo et al., 2001). Andere FGF-Rezeptoren benötigen alternative Liganden-HSPG-Komplexe für deren Aktivierung (Ostrovsky et al., 2002).

I.2.2 Der Promotor und die transkriptionelle Kontrolle

Die FGFR4-Signaltransduktion durch die FGF19 Stimulation beeinflusst, soweit bekannt, nur die Expression von Prolactin, aber nicht die des Rezeptors selbst und zwar über Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (Yu et al., 2002a).

Die Expression des FGFR4 wird über einen Promotor kontrolliert, in welchem die üblichen regulatorischen Elemente wie z. B. TATA- oder CCAAT-Box fehlen. Dennoch finden sich im Sequenzbereich -9 bp bis -198 bp aufwärts des Startcodons vielfältige Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren (z.B. Sp1 und AP2), und in der Region -1085 bp bis -1140 bp kann wahrscheinlich ein Repressor an die DNA binden (Becker et al., 2000).

Als Transkriptionsfaktoren mit regulatorischer Bedeutung wurde einerseits Ikaros – eigentlich im hämatopoietischen System charakterisiert – in Hypophysentumoren mit FGFR4-Überexpression nachgewiesen (Yu et al., 2002b; Ezzat et al., 2003). Andererseits führt der überexprimierte Transkriptionsfaktor AP2 α - „activating enhancer binding protein“ – bezüglich Hypophysentumorproben zu einer erhöhten Expression einer N-terminal deletierten, onkogenen FGFR4-Isoform, da eine kryptische Promotorsequenz im Intron 4 und ein entsprechendes Startcodon für eine alternative Transkription erkannt werden (Yu et al., 2003).

Außerdem kann der Transkriptionsfaktor Sp1 in Rhabdomyosarkoma Zelllinien auch den FGFR4-Promotor durch Bindung an die GC-reichen Sequenzen aufwärts des Startcodons aktivieren (Jiang Yu et al., 2004).

I.2.3 Die Signaltransduktion und die FGF-Rezeptor 4 Lokalisation

Im Vergleich mit FGFR1 wurden für den FGFR4 bereits relativ früh einige Unterschiede in der Signaltransduktion deutlich, was verschiedene Funktionen der FGF-Rezeptoren innerhalb der Familie für den physiologischen Kontext nahe legt. Speziell der FGFR4 führt lediglich zu einer schwachen Tyrosinphosphorylierung von PLC γ , Raf-1 oder MAPK nach FGF1 Stimulation und lässt eine Tyrosinphosphorylierung von Shc oder Interaktionen mit Grb2 vollständig vermissen (Vainikka et al., 1994). Das mitogene Potential von FGFR4 ist dabei viel geringer als z.B. jenes

von FGFR1 (Wang and Goldfarb, 1994; Wang et al., 1994), wenngleich in Erythrozyten-Vorläuferzellen eine FGF2/FGFR4-abhängige Proliferation beobachtet wurde, und die Rezeptorexpression dabei erst im Laufe des Differenzierungsprozesses der „Erythropoese“ abnimmt (Koritschoner et al., 1999).

Im Gegensatz zu den restlichen Familienvertretern führt die FGFR4 Stimulation in Brustkrebszellen auch zu einer Aktinfilament-Akkumulation und Plasmamembranauffaltung („membrane ruffling“), was mit einer p21-Rac Aktivierung in Verbindung steht (Johnston et al., 1995a).

Vainikka et al. (1996) konnten zeigen, dass der FGFR4 auch die Serinkinase p85 (PI3-Kinase Untereinheit) nach FGF1 Stimulation bindet, und der Rezeptor dabei an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird, während seine Tyrosinphosphorylierung viel schwächer ausfällt. Ein konstitutiv aktiver FGFR4 kann auch NIH3T3 Zellen transformieren und wirkt dabei als Onkogen, wobei in der Signaltransduktion auch Stat1 und Stat3 (signal transducer and activator of transcription) Proteine phosphoryliert und aktiviert werden. Zusätzlich kann eine Shp2-, PLC γ - und MAP-Kinase-Phosphorylierung, sowie eine PI3-Kinase-Aktivierung nachgewiesen werden (Hart et al., 2000).

Zwischen dem FGFR4 und dem ErbB2 (Her2)-Rezeptor wird schon seit längerer Zeit ein funktioneller Zusammenhang in der Krebsentwicklung vermutet, da beide Rezeptoren in Brustkrebs und in gynäkologischen Tumoren co-amplifiziert sind (Jaakkola et al., 1993). Dabei kooperieren die zwei Rezeptoren über den MAP-Kinase- bzw. PKB/Akt-Signalweg in der Aktivierung der Cyclin D1-Transkription und -Translation und führen so in Brustkrebszellen zu einer erhöhten Proliferation (Koziczak et al., 2004).

Neben den unterschiedlichen, aktivierten Signalwegen für FGF-Rezeptoren wurden auch etliche Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von FGF-Rezeptoren beschrieben. Obwohl man die FGF-Rezeptoren als Membranproteine an der Zelloberfläche lokalisiert erwartet, fanden schon Johnston et al. (1995b) eine Zellkernlokalisation einer FGFR3 Spleißvariante. Es existieren auch einige Hinweise, dass der FGFR4 alternativ in der Zelle lokalisiert werden könnte. In Leberzellen findet man einen 40 kDa großen FGF1/FGFR-Komplex im Nukleus, welcher in Immunpräzipitation und Immunhistochemie mit FGFR1/4-Antikörpern reagiert (Feng et al., 1996). Die Internalisation und der intrazelluläre Transport des Rezeptors erfolgt wahrscheinlich über den alternativen, nicht-klassischen Weg, da der FGFR4 größtenteils in Caveolae und nicht in Clathrin-umhüllten Invaginationen der Plasmamembran gefunden wurde. Nach FGF1 Stimulation wird der Rezeptor in Endosomen angereichert, wobei per se mehr

Protein intrazellulär, in einer detergenten-unlöslichen und zytoskelett-assoziierten Form als an der Zelloberfläche exponiert vorliegt (Citores et al., 1999). Eine Translokation des Liganden FGF1 ins Zytosol oder in den Zellkern ist außerdem von der endständigen, C-terminalen Sequenz des FGFR4 abhängig (Klingenberg et al., 2000).

Aktuelle Untersuchungen zur Internalisation und Lokalisation von FGF1 zeigen, dass der Ligand bei den FGF-Rezeptoren 1-3 vorwiegend in Lysosomen vorzufinden ist, während bei FGFR4 eher ein Internalisations-Mechanismus, vergleichbar mit dem Liganden Transferrin, abläuft und über Endosomen zur Zelloberfläche recycelt wird. Der FGFR4 wird sehr viel langsamer degradiert als alle anderen Rezeptor-Familienmitglieder. Dies mag am Fehlen von entsprechenden Lysinresten in der intrazellulären Domäne liegen, welche in den Rezeptoren FGFR1-3 konserviert sind. Dadurch kann der FGFR4 nicht so gut wie z.B. FGFR1 ubiquitiniert werden, und dies könnte auch alternative Endozytosemechanismen der Rezeptoren erklären (Haugsten et al., 2005).

I.2.4 Die Expression des FGF-Rezeptors 4 in der Entwicklung

Der FGFR4 wird im adulten menschlichen Organismus in einem weitaus geringeren Gewebe- bzw. Organspektrum als die anderen Familienmitglieder exprimiert: man findet das Protein vor allem in der Leber, der Niere, in Muskelgewebe und in der Hypophyse in entsprechend sehr hohen Konzentrationen. Dies deckt sich in etwa mit Mausstudien, wobei hier der Rezeptor zusätzlich noch stärker in der Lunge detektiert werden kann. In den einzelnen Geweben scheint dabei insbesondere die Lokalisation in der Media von Arterien und Venen signifikant zu sein, wobei diese Schicht nicht nur aus Muskelzellen, sondern auch aus Bindegewebssubstanzen wie z.B. Kollagen besteht (Hughes, 1997; Cool et al., 2002).

Der FGFR4 wird auch noch in verschiedensten Stadien der Organismus-Entwicklung exprimiert. Besonders in der Lungen- und Skelettmuskelentwicklung kommt ihm dabei eine Schlüsselrolle zu. Während ein FGFR4 „Knock-out“ (KO) die Lungenentwicklung unbeeinflusst lässt, führt der Verlust von FGFR3 und -4 in Doppel-KO-Mäusen zu Kleinwuchs und einer Blockade der Alveogenese (Weinstein et al., 1998). Daneben wird der FGFR4 auch während der Skelettmuskelentwicklung exprimiert, wobei eine positive Rückkopplung des Rezeptors mit dem myogenen Regulationsfaktor MyoD besteht (Marics et al., 2002; Delfini and Duprez, 2004).

Zusätzlich steuert der Signalkomplex aus FGF6 und FGFR4 auch die Regenerationsfähigkeit von Muskelgewebe (Armand et al., 2003; Zhao and Hoffman, 2004; Zhao et al., 2005).

Der FGFR4 ist auch an der neuronalen Zelldifferenzierung und der embryonalen Anterior-Posterior-Achsenbildung (Cai et al., 2002; Zhang et al., 2002; Shiotsugu et al., 2004), sowie an der Entwicklung der Retina beteiligt (Zhang et al., 2003; Kurose et al., 2005), da insbesondere die Expression von dominant-negativem FGFR4 diese Prozesse inhibiert.

Abschließend sei erwähnt, dass in einigen anderen entwicklungsbiologischen Abläufen eine Beteiligung des FGFR4 ebenso beobachtet werden konnte: in der Pankreas- (Dichmann et al., 2003), in der Nieren- (Cancilla et al., 1999), in der Innenohr- (Wright et al., 2003), in der Knochen- (Cool et al., 2002b), in der Spermien- (Steger et al., 1998) und in der Follikelentwicklung (Puscheck et al., 1997).

I.2.5 Der FGF-Rezeptor 4 in transgenen Mäusen

In der Regel werden heute transgene – oder KO-Mausmodelle zur Aufklärung der Funktion bestimmter Gene eingesetzt. Für den FGFR4 und seinen Liganden FGF19 wurden diese Experimente auch durchgeführt.

In FGFR4-KO-Mäusen wurden vor allem die Organe mit einer natürlich hohen FGFR4-Expression untersucht. Dabei zeigt sich, dass in diesen Mäusen eine verkleinerte Gallenblase, ein erhöhter Leberstoffwechsel, sowie eine gesteigerte Gallensäureproduktion vorliegt (Yu et al., 2000b). Die Daten von transgenen Mäusen verdeutlichen außerdem, dass der FGFR4 die Gallensäuresynthese über die Unterdrückung der Cholesterol-7 α -Hydroxylase-Expression reguliert. Dies geschieht durch Gallensäurebindung und einer damit verbundenen Aktivierung des Farnesyl-X-Rezeptors (FXR) als Transkriptionsfaktor für FGF19, was zu einer nachfolgenden parakrinen Stimulation des FGFR4 durch FGF19 führt, und den JNK-Signalweg anschaltet (Holt et al., 2003; Yu et al., 2005).

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist die Leber von FGFR4-KO-Mäusen in seiner Regenerationsfähigkeit stark eingeschränkt und neigt zu einer Fibrosenbildung, sowie einer Gewichtsvergrößerung, wobei desweiteren die veränderte Regulation von Cytochrom P450 eine entscheidende Rolle spielt (Yu et al., 2002b).

FGF19-transgene Mäuse zeigen im Vergleich zum FGFR4 einen erhöhten Fettstoffwechsel und entwickeln in einer „Fettdiät“ nahezu eine Resistenz gegen Fettleibigkeit oder Diabetes. Man stellt eine erhöhte Masse an braunem Fettgewebe, eine verminderte Acetyl-CoA-Carboxylase-Expression, sowie geringere Triglyzeridwerte der Leber fest (Tomlinson et al., 2002). Genexpressionsanalysen zeigen, dass vor allem die Leptin-Rezeptorexpression in der Leber erhöht wird und wahrscheinlich für die Ausprägung dieses Phänotyps verantwortlich ist (Fu et al., 2004). In weiteren Untersuchungen wird die Ausbildung von Lebertumoren beobachtet, was mit einer erhöhten Proliferation und der Aktivierung des Wnt-Signalweges zusammenhängt (Nicholes et al., 2002).

I.2.6 Der FGF-Rezeptor 4 und Krebs

In I.1.3 wurde bereits auf die Bedeutung einer veränderten FGF-Rezeptor-Expression im Zusammenhang mit verschiedensten Krankheitsverläufen hingewiesen. Für den FGFR4 wurde eine Mutation in der Transmembrandomäne an Position 388 (Glycin/Arginin), die homolog zu FGFR3 und ACH ist, gefunden. Nähere Untersuchungen verdeutlichen, dass dieser Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) entscheidend die Brust- und Dickdarmkrebs-Progression beeinflusst, wobei das Gly-Rezeptor-Allel die Zellmigration unterdrückt (Bange et al., 2002). In weiteren klinischen Studien kann auch für Weichgewebetumoren (Morimoto et al., 2003), Prostatakrebs (Wang et al., 2004), Plattenepithelkarzinoma des Kopf- und Halsbereiches (Streit et al., 2004) und Lungen-Adenokarzinoma (Spinola et al., 2005) eine verbesserte Prognose des Krebsverlaufs für homozygote Gly-Allel-Träger beobachtet werden. In Prostatakrebs kann die erhöhte klinische Aggressivität und die damit verbundene erhöhte Invasivität und Metastasierungspotential auf eine gesteigerte uPAR(urokinase plasminogen activator receptor)-Expression zurückgeführt werden (Wang et al., 2004). In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wird die unterdrückte Migration und Invasion, vermittelt durch das Gly-Rezeptor-Allel, mit einer verminderten Edg2 LPA-Rezeptorexpression und Rho GTPase-Aktivität korreliert (Stadler et al., 2005). Die molekularen Mechanismen sind allerdings bis auf die zwei genannten Ausnahmen ungeklärt, wie sich die Gly- und die Arg-Expressoren z.B. in der Signaltransduktion unterscheiden und so einen anderen Verlauf der Krebsentwicklung bedingen.

Unabhängig vom Allelstatus des FGFR4 wird dessen Überexpression in zahlreichen Tumoren wie z.B. Brustkrebs und Brustfibroadenoma beobachtet (Meric et al., 2002; La Rosa et al., 2005). Auch in Eierstocktumoren wird eine Co-Expression von FGFR4 und den FGF2/8-Liganden gefunden (Valve et al., 2000; De Cecco et al., 2004). Neben diesen gynäkologischen Tumoren findet man eine FGFR4-Überexpression auch in Prostatakrebs (Gowardhan et al., 2005), wobei eine erhöhte Expression von FGF6 diesen Effekt verstärken dürfte (Ropiquet et al., 2000). In Hypophysentumoren wird eine N-terminal verkürzte, cytoplasmatisch lokalisierte Isoform nachgewiesen, welche wahrscheinlich für die Tumorpheriferation und Invasivität verantwortlich ist (Ezzat et al., 2002; Qian et al., 2004). In Schilddrüsen Karzinoma sorgt der FGFR4 auch für eine sehr große Proliferationsrate der Zellen, was durch einen FGF1/FGFR-Inhibitor unterdrückt werden kann (Ezzat et al., 2005; St. Bernard et al., 2005). Daneben spielt der FGFR4 auch eine Rolle in Pankreaskrebs, wobei die Proteinexpression über den Transkriptionsfaktor HNF1 α reguliert wird (Shah et al., 2002). Eine FGFR4-Überexpression wurde noch bei einem besonders schweren Fall von Muskeldystrophie (FSHD) beobachtet (Saito et al., 2000).

In Lungenkrebs hingegen wird erstaunlicherweise eine Abnahme der FGFR4-Expression im Vergleich mit dem normalen Gewebe festgestellt (Nakamura et al., 2004; Wagenaar et al., 2004).

I.3 Charakteristika von Krebszellen

Normalerweise wird die Zellproliferation im menschlichen Organismus genau reguliert, so dass die Zellen des Körpers in regelmäßigen Abständen erneuert werden, indem alte Zellen absterben. Da jedoch spontane oder induzierte Mutationen in somatischen Zellen auftreten können, kommt es gelegentlich zur unkontrollierten Zellvermehrung und Krebsentstehung. Diese Zellen unterliegen außerdem einem Entwicklungsprozess, wobei letztendlich ein maligner Tumor entstehen kann, wenn die Zellen invasive Eigenschaften annehmen und in fremdes Gewebe metastasieren (Abb. 4).

In folgenden Abschnitten wird kurz auf die Grundlagen zweier Krebseigenschaften – nämlich die Zellmigration bzw. Krebszellinvasion und die Anti-Apoptose – eingegangen, da speziell die Untersuchungen dieser Dissertation darauf fokussiert wurden.

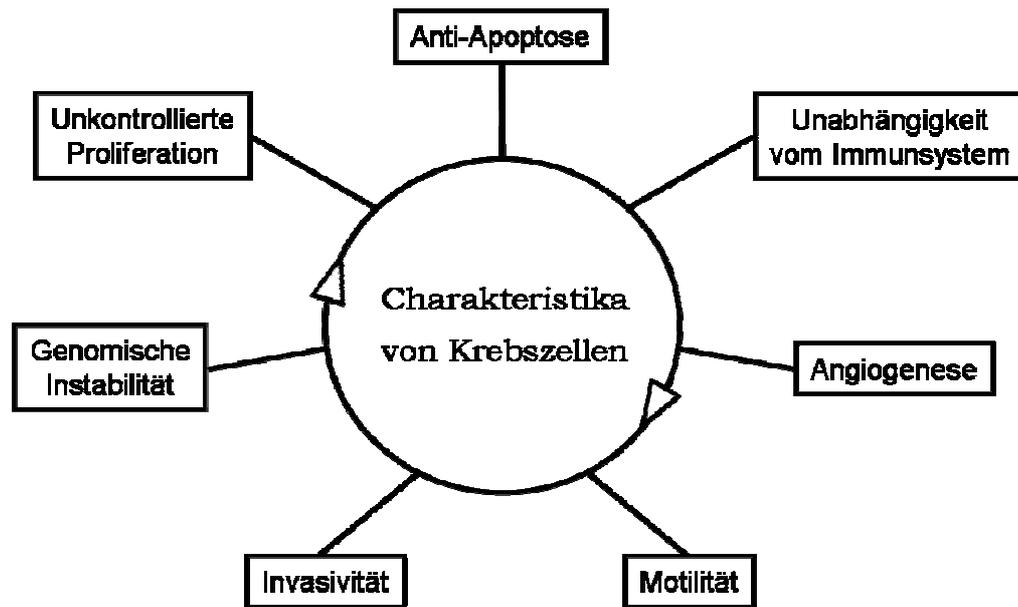


Abb. 4: Charakteristika von Krebszellen

I.3.1 Mechanismen der Zellmigration und Krebszellinvasion

Die Migration von Zellen setzt die Fähigkeit voraus, die Zellmorphologie zu verändern und mit benachbartem Gewebe in Kontakt zu treten. Die Zellen werden dabei polarisiert und elongieren; es bilden sich Pseudopodia (später Lamelipodia, Filopodia oder Invadopodia) am Vorderende der Zellen und Substrate der extrazellulären Matrix werden dabei gebunden. Schließlich kontrahiert sich der ganze Zellkörper und entwickelt eine Zugkraft, die graduell eine Vorwärtsbewegung der ganzen Zelle nach sich zieht (Friedl et al., 2000; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Adams, 2001). Dabei spielt die Aktin-Zytoskelett-Reorganisation eine entscheidende Rolle (Cramer, 1999). Man unterscheidet verschiedene Typen der Migration: mesenchymale Migration, amoeboider Migration, Kettenmigration und kollektive Zellmigration. Da Krebszellen häufig einem Entwicklungsprozess unterliegen und sich das Gen-Expressionsmuster verändern kann, tritt häufig in Krebszellen auch ein Wechsel des Fortbewegungsverhaltens auf, was unter epithelial-mesenchymaler (EMT), mesenchymal-amoeboider (MAT) oder kollektiv-amoeboider (CAT) Transition beschrieben wird (Friedl and Wolf, 2003). Darüber hinaus können Krebszellen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen. Die

Zellen lösen sich von ihrem umliegenden Gewebezellverband, degradieren die Basallamina bzw. extrazelluläre Matrix (ECM) und gelangen dadurch in das interstitielle Stroma. Von dort wandern die Zellen durch eine induzierte Angiogenese in den Blutkreislauf und das Lymphgefäßsystem. Schließlich verlassen die Krebszellen den Blutkreislauf und siedeln sich im Parenchym eines Zielorgans an, um dort unkontrolliert zu proliferieren (Guo and Giancotti, 2004).

Einige Proteine nehmen eine Schlüsselposition im Migrations- und Invasionsprozess ein. Wichtig für die Entstehung von malignen Tumoren ist insbesondere der Verlust von Zell-Zell-Adhäsion, was mit einem Verlust der E-Cadherin-Expression einhergeht (Birchmeier and Behrens, 1994; Hirohashi 1998; Perl et al., 1998) und in einer Reexpression von anderen Cadherinen wie z. B. N-Cadherin, ein sog. „Cadherin-Switch“, resultiert (Tomita et al., 2000; Hazan et al., 2000; Li and Herlyn, 2001). Dies geschieht häufig über die Regulation des Transkriptionsniveaus (Battle et al., 2000; Comijn et al., 2001; Hajra et al., 2002) oder über den proteolytischen Abbau durch z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bzw. durch Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelte Aktivierung von Ubiquitin E3-Ligasen wie z.B. Hakai (Fujita et al., 2002; Nawrocki-Raby et al., 2003).

In diesem Zusammenhang gehört neben den Cadherinen auch die Integrinfamilie zu einer wichtigen Gruppe von Zelloberflächenmolekülen, die die Migration/Invasion von Zellen steuern, wobei es dabei ebenfalls zu einem sog. „Integrin-Switch“ kommen kann (Zutter et al., 1995; Mercurio and Rabinovitz, 2001; Guo and Giancotti, 2004). Das Signal von Integrinen und Rezeptor-Tyrosinkinasen wird von der Focal Adhesion Kinase (FAK) integriert und in das Zellinnere weitergeleitet (Ilic et al., 1995; Sieg et al., 2000; Gabarra-Niecko et al., 2003). Verschiedene Effektormoleküle abwärts von FAK können hierbei aktiviert werden: Ras, Rac/Cdc42, Rho und Etk (Keely et al., 1997; Chen et al., 2001; Raftopoulou and Hall, 2004; Webb et al., 2004).

Die Integrin- und Rezeptor-Tyrosinkinasenaktivierung vermittelt außerdem die Prozesse des ECM-Abbaus und der –Remodellierung, welche direkt durch die Aktivierung von MMPs oder Plasmin eingeleitet werden (Brooks et al., 1996; Sternlicht and Werb, 2001). Integrine können hierbei auch den Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR) binden, aktivieren und sequentiell die Proteolyse weiterer MMPs induzieren, was damit zu einer erhöhten Proliferation und Migration führt (Chapman et al., 2001; Liu et al., 2002; Blasi et al., 2002). Auch neusynthetisierte ECM-Komponenten, wie z.B. Laminine und Kollagene, werden durch die MMPs gespalten, kryptische Peptide für Integrine freigesetzt, und deren Bindung induziert ebenfalls die Migration und die Angiogenese (Gianelli et al., 1997; Xu et al., 2001; Patarroyo et

al., 2002). Schließlich sind die Integrine auch direkt an der Kontrolle der Angiogenese (Hanahan and Folkman, 1996; Hynes, 2002; Byzova et al., 2000) und der Apoptose (Bachelder et al., 1999; Plath, 2000; Stupack et al., 2001) beteiligt, wobei auf den zuletzt genannten Prozess später (I.3.2) genauer eingegangen wird.

I.3.1.1 Der Einfluss der FGF-Rezeptorfamilie

Es wurde bereits erwähnt, dass Rezeptor-Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen spielen. So interagiert z.B. VE-Cadherin mit VEGFR2 (Dejana et al., 2000) oder der Hyaluron-Rezeptor CD44 mit ErbB4 bzw. c-Met (Ponta et al., 2003); ebenso können Integrine mit Rezeptor-Tyrosinkinasen interagieren (Trusolino et al., 2001; Mariotti et al., 2001).

Auch die FGF-Rezeptorfamilie wird mit Zelladhäsionsmolekülen in Verbindung gebracht und beeinflusst so die Zelladhäsion und -migration. Es wurde sowohl eine heterophile Interaktion mit NCAM (Williams et al., 1994), als auch mit N-Cadherin (Williams et al., 2001) nachgewiesen.

NCAM moduliert dabei auch den neuronentartigen Auswuchs von β -Zellen aus Maus-Pankreas-tumoren. Hier interagiert FGFR4 in einem Signalkomplex nicht nur mit NCAM und N-Cadherin, sondern auch mit den intrazellulären Adapterproteinen Shc, FRS2, PLC γ , pp60^{c-src}, GAP-43 und Cortactin. Dominant-negativer FGFR4 kann die NCAM induzierte Matrixadhäsion genauso unterbinden wie Inhibitoren gegen FGF-Signalwege oder blockierende Antikörper gegen β_1 -Integrine. Da im umgekehrten Fall eine FGF-Liganden-Stimulation alleine nicht ausreicht, um neuronalen Auswuchs von Zellen zu induzieren, vermutet man, dass ein anderes Signal von entscheidender Bedeutung für diesen Prozess ist. Die NCAM vermittelte FGF-Rezeptor-Signaltransduktion aktiviert deshalb wahrscheinlicher die Integrine, um die Zelladhäsion indirekt zu erhöhen (Cavallaro et al., 2001).

Auf diese Art und Weise wird die Metastasierung von Krebszellen verhindert, wobei man hier die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen NCAM-Isoformen (NCAM 120, 125, 140 und 180) beachten muss (Perl et al., 1999).

In Hypophysentumoren wird die erhöhte Aggressivität auf eine cytoplasmatisch, lokalisierte FGFR4-Isoform zurückgeführt, welche N-Cadherin im Zytoplasma bindet und dessen

Zelloberflächenexponierung verhindert; dadurch kommen theoretisch weniger Zellkontakte zustande (Ezzat et al., 2004).

Die Synergie von N-Cadherin und FGF2 erhöht die Zellmigration, Krebszellinvasion und die Sekretion von extrazellulären Proteasen (Hazan et al., 2000). Nach erfolgter Ligandenstimulation unterdrückt die Bindung von N-Cadherin an FGFR1 die nachfolgende Internalisation und stabilisiert so den Rezeptor-Liganden-Komplex. Die MAPK-ERK-Signaltransduktion wird verlängert, und die erhöhte Krebszellinvasion wird durch ein erhöhtes MMP9-Transkriptionsniveau ausgelöst. Die Bindung von N-Cadherin an den FGF-Rezeptor wird dabei durch dessen zwei ersten immunoglobulinartigen Domänen vermittelt (Suyama et al., 2002).

Außerdem wird auch die uPA-Expression von FGFR1/FGFR4 über FGF2-Stimulation und die MAPK-Signalwegaktivierung reguliert (Miralles et al., 1998), wodurch auch die ECM-Modellierung beeinflusst werden kann.

I.3.2 Die verschiedenen Apoptose-Mechanismen

Heute kennt man verschiedene Arten des programmierten Zelltods. Die nicht-apoptotischen Formen umfassen die Seneszenz mit Zellzyklusarrest, die Autophagie mit lysosomalem Abbau, die Nekrose mit Membran- bzw. Organellendegeneration und die „mitotische Katastrophe“ bei aberranter Mitose (Okada and Mak, 2004).

Die klassische Apoptose von Zellen kann in zwei unterschiedliche Signalwege eingeteilt werden. Einerseits existiert der sog. extrinsische Apoptosesignalweg (Igney and Krammer, 2002). Hier binden Zelltod-Liganden wie z.B. FasL an ihre entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. Fas (Nakata 1999). Dadurch werden weitere cytosolische Proteine wie z. B. Caspase 8 und FADD (Fas associated death domain) in einem oligomeren, zelltod-induzierenden Signalkomplex (DISC) gebunden, was die sequentielle Aktivierung von Initiator- (Caspase 2, 8-10) und Effektorcaspasen (Caspase 3, 6-7) nach sich zieht (Peter and Krammer, 2003). Der extrinsische Signalweg ist dabei mit dem sog. intrinsischen Signalweg vernetzt, da die Caspase 8 auch Bid aktiviert (Luo et al., 1998).

Dieser intrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen, wie z.B. Cytochrom C, SMAC/DIABLO, AIF (apoptose-induzierender Faktor) oder Endonuklease G, ins Cytoplasma der Zelle ausgelöst (Wang, 2001). Vor allem durch die

Bindung von Cytochrom C an Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1) wird die Bildung des sog. Apoptosomkomplexes und die Aktivierung von Caspase 9 eingeleitet, was schließlich auch die Aktivierung einer Reihe weiterer Caspasen induziert.

Die Regulation des intrinsischen Apoptosesignalwegs erfolgt speziell durch die Gruppe Bcl2-verwandter Proteine. Diese umfasst die anti-apoptotische Bcl2-Subfamilie (Bcl2, BclX_L, Bcl-w, Mcl1), die pro-apoptotische Bax- (Bax, Bak, Bok) und die „BH3-only“-Subfamilie (Bid, Bim, Bad, Noxa, Puma u. a.). Vertreter der Bcl2-Proteinsubfamilie verhindern an der Mitochondrien-, ER- und Zellkernmembran die Aktivierung von apoptotischen, integralen Bax-Membranproteinen. Die sog. BH3-only-Proteine entziehen ihrerseits diesem Gleichgewicht Bcl2-Proteine durch Komplexbildung, wodurch eine Oligomerisation der Bax-Moleküle zustande kommen kann (Cory and Adams, 2002). Dadurch werden moleküldurchlässige Poren geschaffen oder bereits bestehende Membrankanäle erweitert (VDAC) und die Freisetzung von z.B. Cytochrom C in das Cytoplasma ermöglicht, was für diese Art der Induktion von Apoptose entscheidend ist (Tsujimoto and Shimizu, 2000; Antonsson et al., 2001; Mikhailov et al., 2001). Durch die Überexpression von Bcl2 oder BclX_L wird die Membranpermeabilität von Mitochondrien vermindert, da die Bax/Bak-Translokation und Oligomerisation inhibiert wird und dies führt zur erhöhten Resistenz gegenüber Apoptosemechanismen (Breckenridge and Xu, 2004; Ryungsa, 2005). Allerdings wurde auch schon eine BclX_L-vermittelte Apoptose durch Autophagie beobachtet, so dass unter Stress eine jeweils unterschiedliche Antwort von Zellen entsprechend ihres genetischen Programms diskutiert wird (Shimizu et al., 2004).

Als Schlüsselenzyme repräsentieren die Caspasen eine ganze Familie – im menschlichen Organismus wurden 11 charakterisiert – von Cysteinproteasen, die ihre Zielmoleküle nach einem entsprechenden Aspartatrest (-X-Glu-X-Asp- Motiv) spalten und so irreversibel „aktivieren“ (Alnemri et al., 1996; Thornberry and Lazebnik, 1998; Shi, 2002). Das Protease-Zymogen liegt dabei als Homodimer, jeweils bestehend aus einer 20 kDa großen und einer 10 kDa kleinen Untereinheit, vor; der katalytisch aktive Cysteinrest in der zweiten von vier vorhandenen Schleifen des Proteins wird erst durch Proteolyse und Konformationsänderung für Substrate frei zugänglich (Shi, 2002).

Die dadurch eingeleitete Apoptose resultiert letztendlich in der Spaltung verschiedener Zelltod-Substrate (z. B. dem nukleären Lamin, dem Inhibitor von DNase CAD, Aktin oder Rho Kinase 1), was zu der beobachteten Chromatinkondensation, sowie der DNA- und Zellfragmentierung (apoptotische Körper) führt. Benachbarte Phagozyten werden schließlich dazu veranlasst, den verbleibenden Zellkörper zu verdauen (Rathmell and Thompson, 1999; Savill and Fadok, 2000).

I.3.2.1 Die Apoptose im Zusammenhang mit der FGF-Rezeptorfamilie

Die FGF-Rezeptoren werden funktionell mit verschiedenen physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Ob der FGFR 4 an der Steuerung von Apoptosemechanismen beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Vom Einfluss anderer FGF-Rezeptoren wurde in unterschiedlichen Publikationen berichtet. Die Inaktivierung der FGF2/FGFR1-Signaltransduktion resultiert in der Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen, Melanoma- und Prostata-Tumorzellen (Myamoto et al., 1998; Ozen et al., 2001; Valesky et al., 2002). Auch FGFR2 spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Überlebensfähigkeit von Zellen. Allerdings ist hier die Tyrosinkinaseaktivität entgegen oben genannter Untersuchungen für die Einleitung der Apoptose in Prostata- und Speicheldrüsentumorzellen verantwortlich. Durch einen „Switch“ der FGFR2- zu einer FGFR1/4-Expression können Krebszellen diesem physiologischen Prozess entgehen (Zhang et al., 2001; Yasumoto et al., 2004). In Osteoblasten induziert der FGFR2 z.B. auch die Ubiquitinierung und den Abbau von Integrin α_5 , wodurch die Zelladhäsion vermindert und die Caspasenaktivität erhöht wird (Mansukhani et al., 2000; Kaabeche et al., 2005).

Die Verwendung von synthetischer RNA (siRNA) oder chemischen Inhibitoren zur Inaktivierung von FGFR3 in Knochenmarkskrebszellen zeigen, dass dadurch die Sensitivität für apoptotische Signale zunimmt. Im multiplen Myelom wird dabei die Expression von Bcl2, Mcl1, NF- κ B und FGFR3 erhöht, während die Expression von PECAM, Bid, Annexin V, Caspase 2 und Caspase 6 gleichzeitig vermindert wird (Choi et al., 2003; Trudel et al., 2004; Zhu et al., 2005). Konstitutiv aktiver FGFR3 führt in kortikalen Vorläuferzellen des Gehirns von Mausembryonen ebenfalls zu einer verstärkten Proliferation und Anti-Apoptose (Inglis-Broadgate et al., 2005). In TDI/II sorgt die Expression von FGFR3 allerdings für einen verstärkten programmierten Zelltod von differenzierten Chondrozyten (Legeai-Mallet et al., 1998; Dailey et al., 2003), wobei die Aktivierung des STAT1-Signaltransduktionsweges, als auch der ERK-MAPK-Signalweg an diesem physiologischen Prozess beteiligt sind (Sahni et al., 1999 and 2001; Yasoda et al., 2004).

I.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) des FGFR4, bei dem ein Aminosäureaustausch an Position 388 von Glycin zu Arginin in der Transmembrandomäne stattfindet, beeinflusst nachweislich das Migrationsverhalten von Brustkrebszellen und die Tumorprogression *in vivo*. 2001 haben Cavallaro et al. einen Signalkomplex des FGFR4 mit verschiedenen anderen cytosolischen Adapterproteinen, sowie NCAM und N-Cadherin postuliert, wobei die Aktivierung von β 1-Integrinen im intrazellulären Signaltransduktionsweg eingeleitet wird. Es wurde jedoch nicht geklärt, welche Funktionen der SNP des FGFR4 und insbesondere die extrazelluläre Domäne des Proteins allein im Zusammenhang mit der Zelladhäsion besitzen. Darüber hinaus wurde bisher noch nicht untersucht, ob und welche Rolle der FGFR4 in der Apoptose von Krebszellen spielt. Einige Untersuchungen zeigen, dass die FGF-Rezeptoren 1–3 die Überlebensfähigkeit von Zellen kontrollieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des SNP von FGFR4 auf die Zellmigration und die Krebszellinvasion genauer untersucht werden. Durch cDNA-Makro-Array-Analysen sollte geklärt werden, ob in verschiedenen FGFR4-Überexpressionssystemen ein konserviertes Expressionsprofil zu finden ist, welches auf die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege oder den Einfluss einzelner Zelladhäsionsmoleküle in diesem Zusammenhang schließen lässt.

Außerdem sollte der Einfluss des SNP auf die Signalkomplexbildung zwischen NCAM und der Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR4 untersucht werden; darüber hinaus sollten auch andere Moleküle als Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne des FGFR4 identifiziert werden, um die Rolle des Rezeptors im Allgemeinen und der extrazellulären Domäne von FGFR4 im Speziellen bei der Metastasierung von Krebszellen zu erklären. Als Ergänzung sollten physiologische Experimente dazu beitragen, die Funktion des FGFR4 in der Zellmigration und Krebszellinvasion noch genauer zu charakterisieren.

Durch eine Unterdrückung der FGFR4-Expression sollte schließlich analysiert werden, ob der FGFR4 analog zu den anderen FGF-Rezeptor-Familienmitgliedern die Apoptose von Krebszellen beeinflusst und wie diese Effekte vermittelt werden.

II Material und Methoden

II.1 Bezugsquellen

II.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Biorad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserum)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Biotrend Chemikalien, Köln
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dA/G/T/CTP)	Roche, Mannheim
Doxorubicin	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Polysciences, Eppenheim
Geneticin (G 418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid)	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Adrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodekylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N,N-Tetraethylmethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

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

II.1.2 Enzyme

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

II.1.3 Radiochemikalien

Redivue Adenosine 5'-[γ -³³P]-triphosphate, triethylammonium salt
 Redivue L-[³⁵S] Methionine, cell labeling grade

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Freiburg) bezogen.

II.1.4 Handelsübliche „Kits“ und Sonstiges

BD Matrigel Invasion Chambers (Wachstumsfaktor reduziert)	Schubert & Weiss, München
Companionplatten für Membraneinsätze (24-Well)	Schubert & Weiss, München
ECL Kit	Perkin Elmer, Köln
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunc, Dänemark
	Falcon, U.K.
Membraneinsatzsysteme (8,0µm)	Schubert & Weiss, München
Megaprime DNA labelling system	Amersham, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Poly Prep® Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden
Sepharosen (A-, G-, IgG, GST-)	Amersham, Freiburg
Sterilfilter 0,22 µm Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
TEV-Protease	Invitrogen, Eggenstein
Zellulosenitrat 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

II.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

FGF1	Tebu, Offenbach
FGF2	Tebu, Offenbach
FGF19	Tebu, Offenbach
	U3pharma, Martinsried
Insulin (human)	Lilly, Gießen
Heparin	Sigma, Taufkirchen

II.2 Medien und Puffer

II.2.1 Medien für *E. coli* Bakterien

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

Bei Bedarf wurden dem Medium folgende Antibiotika nach dem Autoklavieren zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml

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

II.2.2 Zellkulturmedien

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

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

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

McCoy's 5 A Medium

RPMI Medium 1640 mit 2 mM L-Glutamin

L15 (Leibovitz) Medium

Einfriermedium 10 % DMSO in 90 % FCS

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

II.2.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. „x“ bezeichnet die „fache“ Konzentration einer Stammlösung, aus welcher verdünnt wird.

BBS (2 x)	50 mM	BES
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ pH 6,96
Coomassie-Entfärbelösung	10 %	Essigsäure
	40 %	Propanol
Denhardt (100 x)	2,0 %	Polyvinylpyrrolidon
	2,0 %	Ficoll
	2,0 %	BSA
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30 %	Glyzerin
	100 mM	EDTA pH 8,0
HBS (2 x)	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	100 mM	Hepes pH 7,0
Hy	250 ml	SSC (20 x)
	10 ml	SDS (10 %)
	740 ml	H ₂ O
PreHy 2 x (500 ml)	50 ml	Denhardt (100 x)
	50 ml	SSC (20 x)
	100 ml	Na ₃ PO ₄ (pH 6,8)
	10 ml	Na ₄ P ₂ O ₇ (100 mM)
	290 ml	H ₂ O
Lämmli-Puffer (3 x)	20 %	Glyzerin
	3,0 %	SDS
	10 mM	EDTA pH 8,0
	0,05 %	Bromphenolblau
	5,0 %	β-Mercaptoethanol
MOPS (10 x)	200 mM	Morpholinopropansulfonsäure
	80 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA pH 8,0
NET (10 x)	150 mM	NaCl
	5,0 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl pH 7,4
	0,05 %	Triton X-100
PBS (10 x)	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	809 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,4
RNA-Auftragspuffer (2 x)	48 %	Formamid
	17 %	Formaldehyd
	11 %	Glyzerin
	0,1 %	Bromphenolblau
SD-Transblot	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	40 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,004 %	SDS
SSC (20 x)	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat

„Strip“-Puffer	62,5 mM 2,0 %	Tris/HCl pH 6,8 SDS
TAE (10 x)	100 mM 400 mM 10 mM	β -Mercaptoethanol Tris/Acetat pH 8,0 EDTA
TBE (10 x)	890 mM 25 mM	Tris/HCl EDTA pH 8,0
TBST (10 x)	890 mM 200 mM 1,4 M 50 mM 0,5 %	Borsäure Tris/HCl pH 7,5 NaCl EDTA Tween 20 (frisch)
TE 10/0,1	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10 x)	0,1 mM 250 mM 2,0 M 1,0 %	EDTA pH 8,0 Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS
W1	2,0 x 0,1 %	SSC SDS
W2	0,2 x 0,1 %	SSC SDS

II.3 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α F'	F' endA1 hsd17 (rk ⁻ mk ⁺) supE44 recA1 gyrA (Nal) thi-1 Δ (lacZYA-argF196)	Genentech, USA
AI740827 (EST-clone)	pT7T3D-CDH12 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AI950214 (EST-clone)	pT7T3D-CDH2 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AI791569 (EST-clone)	pT7T3D-CDH16 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
H03783 (EST-clone)	pT7T3D-CDH5 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
BF196457 (EST-clone)	pT7T3D-DSC2 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
W72927 (EST-clone)	pT7T3D-DSG1 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AI582245 (EST-clone)	pT7T3D-DSG3 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AI821753 (EST-clone)	pT7T3D-ICAM3 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AI366526 (EST-clone)	pBS-SK ⁻ -CNTN2 (EcoRI/XhoI)	Invitrogen, Eggenstein
H39560 (EST-clone)	pT7T3D-E-SELE (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
BG831019 (EST-clone)	pOTB7-ITGA3 (XhoI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
AA232847 (EST-clone)	pT7T3D-ITGB3 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein
BF056206 (EST-clone)	pT7T3D-ITGB6 (NotI/EcoRI)	Invitrogen, Eggenstein

II.4 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Phoenix A	Modifizierte HEK 293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, amphotropen Retroviren	Nolan Lab, Stanford
HEK293	Humane embryonale Nierenfibroblasten	ATCC
NIH3T3 cl. 7	Immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC
DAL	Brust-Karzinom	Natali G.
MDA-MB-453	Brust-Karzinom	ATCC
SkBr3	Brust-Adenokarzinom	ATCC
769-P	Primäres Nierenzellkarzinom	ATCC
769-P FGFR4(G)-TAP	pZome1C-FGFR4 _{ex} TM(G388)-TAP	diese Arbeit
769-P FGFR4(R)-TAP	pZome1C-FGFR4 _{ex} TM(R388)-TAP	diese Arbeit
769-P Mock	pZome1C (Leervektor)	diese Arbeit
TE 671	Medulloblastom	DKFZ
TE 671 (G)-TAP	pZome1C-FGFR4 _{ex} TM(G388)-TAP	diese Arbeit
TE 671 (R)-TAP	pZome1C-FGFR4 _{ex} TM(R388)-TAP	diese Arbeit
TE 671 Mock	pZome1C (Leervektor)	diese Arbeit
MDA-MB-468	Brust-Adenokarzinom	ATCC
MDA-MB-468 R1	Doxorubicin-resistenter Klon R1	Andreas Roidl, diese AG
MDA-MB-468 R1 si66	pSUPER-Retro-siRNA66	diese Arbeit
MDA-MB-468 R1 si70	pSUPER-Retro-siRNA70	diese Arbeit
MDA-MB-468 R1 si74	pSUPER-Retro-siRNA74	diese Arbeit
MDA-MB-468 R1 Mock	pSUPER-Retro (Leervektor)	diese Arbeit
MDA-MB-468 R9	Doxorubicin-resistenter Klon R9	Andreas Roidl
MDA-MB-468 R9 si66	pSUPER-Retro-siRNA66	diese Arbeit
MDA-MB-468 R9 si70	pSUPER-Retro-siRNA70	diese Arbeit
MDA-MB-468 R9 si74	pSUPER-Retro-siRNA74	diese Arbeit
MDA-MB-468 R9 Mock	pSUPER-Retro (Leervektor)	diese Arbeit
MDA-MB-231	Brust-Adenokarzinom	ATCC
MDA-MB-231 (G)	pLXSN-FGFR4(G388) monoklonal	Johannes Bange, diese AG

MDA-MB-231 (R)	pLXSN-FGFR4(R388) monoklonal	Johannes Bange
MDA-MB-231 (KM)	pLXSN-FGFR4(G388) KM monoklonal	Johannes Bange
MDA-MB-231 p3x	pLXSN (Leervektor)	Johannes Bange
MDA-MB-231 TM(G)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(G388) monoklonal	diese Arbeit
MDA-MB-231 TM(R)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(R388) monoklonal	diese Arbeit
MDA-MB-231 Sol	pLXSN-FGFR4 _{sol} monoklonal	diese Arbeit
MDA-MB-435S	Brust-Karzinom	ATCC
MDA-MB-435S (G)	pLXSN-FGFR4(G388) monoklonal	Johannes Bange
MDA-MB-435S (R)	pLXSN-FGFR4(R388) monoklonal	Johannes Bange
MDA-MB-435S (KM)	pLXSN-FGFR4(G388) KM monoklonal	Johannes Bange
MDA-MB-435S p3x	pLXSN (Leervektor)	Johannes Bange
MDA-MB-435S TM(G)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(G388) monoklonal	diese Arbeit
MDA-MB-435S TM(R)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(R388) monoklonal	diese Arbeit
MDA-MB-435S Sol	pLXSN-FGFR4 _{sol} monoklonal	diese Arbeit
MCF7	Brust-Adenokarzinom	DKFZ
MCF7 (G)	pLXSN-FGFR4(G388) monoklonal	Johannes Bange
MCF7 (R)	pLXSN-FGFR4(R388) monoklonal	Johannes Bange
MCF7 (KM)	pLXSN-FGFR4(G388) KM monoklonal	Johannes Bange
MCF7 p3x	pLXSN (Leervektor)	Johannes Bange
MCF7 TM(G)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(G388) monoklonal	diese Arbeit
MCF7 TM(R)	pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(R388) monoklonal	diese Arbeit
MCF7 Sol	pLXSN-FGFR4 _{sol} monoklonal	diese Arbeit
HEK293 Sol-GST	pcDNA3-FGFR4 _{sol} polyklonal	Johannes Bange
OCI-AML5-4FA6D3C10	Hybridomazelllinie zur Produktion von monoklonalem FGFR4-Antikörper	Bühring, diese AG

II.5 Antikörper

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

Antikörper	Beschreibung	Referenz
α -Tubulin	Maus, monoklonal, Aszites	Sigma, Taufkirchen
Akt 1/2	Kaninchen, polyklonal, gegen AS 345-480 des humanen Akt	Santa Cruz, USA

P-Akt/PKB	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Serin 473 des murinen Akt	Cell Signaling, USA
1171/1172	Kaninchen, polyklonal, immunisiert mit gereinigtem FGFR4 _{ex} -GST Protein	diese Arbeit
4FA6D3C10	Maus, monoklonal, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4	H. J. Bühring (1999), diese AG
NCAM	Maus, monoklonal, 123C3	Santa Cruz, USA
HER2-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen HER2	Lee et al., 1989
HER2	Maus, monoklonal, 2C4	Genentech, USA
VSV	Maus, monoklonal, gegen 11AS des Glykoproteins des Virus für vesikuläre Stomatitis (VSV-G), Klon p5d4	Boehringer, Mannheim
t-PA	Ziege, polyklonal, C16	Santa Cruz, USA
Annexin II	Ziege, polyklonal, C16	Santa Cruz, USA
NCDH	Kaninchen, polyklonal, H63	Santa Cruz, USA
P-ERK	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Erk1/2 (Thr-202/Tyr-204) MAPK	Cell signaling, USA
ERK2	Kaninchen, polyklonal, K-23 gegen Peptid aus der Subdomäne XI des Ratten Erk2	Santa Cruz, USA
PRL	polyklonal, C17	Santa Cruz, USA
PAI-1	polyklonal, C20	Santa Cruz, USA
PY (4G10)	Maus, monoklonal, gegen Phospho-Tyr	UBI, USA
S6Kinase	Kaninchen, polyklonal	Cell signaling, USA
P-S6Kinase	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Thr 412	Cell signaling, USA
uPAR	polyklonal, FL290	Santa Cruz, USA
BclX _L	Maus, monoklonal	BD Bioscience, Heidelberg
Aktin	Kaninchen, polyklonal	Sigma, Taufkirchen

Die verwendeten, sekundären Antikörper für die Immundetektion der Proteine waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1:20000	BioRad, München
Ziege gegen Kaninchen	1:50000	BioRad, München
Esel gegen Ziege	1:25000	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA

II.6 Plasmide und Oligonukleotide

II.6.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , CMV-Promotor, BGH poly A, fl(+)	Invitrogen, USA

	ori	
pBlueScript KS+	ColE1 ori, Ampr, LacZ, fl(+) IG, SK (MKS)	Stratagene, USA
pSUPER-Retro	siRNA generierender Vektor, H1 RNA Promotor, pBABE Backbone	OligoEngine, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori vom pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR vom MoMuLV, SV40 Promotor	Clontech, USA
pcDNA3JVSV	Modifizierter pcDNA3-Vektor zur Proteinexpression, VSV-Epitop	J. Bange, diese AG
pZome1C	pBABE-puro basierend, enthält TAP-Tag für TAP-tagging von Proteinen am C-Terminus	Euroscarf, Frankfurt*
pZome1N	pBABE-puro basierend, enthält TAP-Tag für TAP-tagging von Proteinen am N-Terminus	Euroscarf, Frankfurt
pEGFP1	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , Kan ^r	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

*<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

II.6.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3-FGFR4(G388)VSV	cDNA von FGFR4(G388) mit VSV-Epitop am C-Terminus	J. Bange, diese AG
pcDNA3-FGFR4(R388)VSV	cDNA von FGFR4(R388) mit VSV-Epitop am C-Terminus	J. Bange, diese AG
pcDNA3-FGFR4(K503M)VSV	cDNA von FGFR4(K503M) mit VSV-Epitop am C-Terminus	C. Stadler, diese AG
pcDNA3-FGFR4 _{int} VSV	intrazelluläre Domäne des FGFR4 mit VSV-Epitop am C-Terminus	C. Stadler, diese AG
pcDNA3-FGFR4 _{ex} TM(G388)VSV	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4(G388) als Fusionsprotein mit VSV-Epitop am C-Terminus (kloniert aus pcDNA3-FGFR4(G388)VSV über HindIII- und EcoRV-Exzision und Ligation über HindIII und NaeI in den pcDNA3-VSV Leervektor)	diese Arbeit
pcDNA3-FGFR4 _{ex} TM(R388)VSV	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4(R388) als Fusionsprotein mit VSV-Epitop am C-Terminus (kloniert aus pcDNA3-FGFR4(R388)VSV über HindIII- und EcoRV-Exzision und Ligation über HindIII und NaeI in den pcDNA3-VSV Leervektor)	diese Arbeit
pLXSN-FGFR4 _{sol}	Extrazelluläre Domäne des FGFR4 von AS 1-369 in pLXSN (PCR kloniert über EcoRI- und XhoI-Überhänge aus Oligos HJB55/56)	diese Arbeit

pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(G388)	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4(G388) von AS 1-396 in pLXSN (PCR kloniert über EcoRI- und XhoI-Überhänge aus Oligos HJB55/57)	diese Arbeit
pLXSN-FGFR4 _{ex} TM(R388)	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4(R388) von AS 1-396 in pLXSN (PCR kloniert über EcoRI- und XhoI-Überhänge aus Oligos HJB55/57)	diese Arbeit
pEGFP-FGFR4(G388) GFP	cDNA von FGFR4(G388) mit GFP-Fusion am C-Terminus (pEGFP1 XhoI und DraI verdaut, pcDNA3-FGFR4(G388)VSV XhoI und NheI verdaut; CIAP-Behandlung und Ligation von Vektor und Insert)	diese Arbeit
pEGFP-FGFR4(R388) GFP	cDNA von FGFR4(R388) mit GFP-Fusion am C-Terminus (pEGFP1 XhoI und DraI verdaut, pcDNA3-FGFR4(R388)VSV XhoI und NheI verdaut; CIAP-Behandlung und Ligation von Vektor und Insert)	diese Arbeit
pZC-FGFR4(G388) _{ex} -TAP	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4 mit Calmodulin- und ProteinA-Bindedomänen am C-Terminus (pZome1C BamHI verdaut, FGFR4 _{ex} TM-Exzision aus pcDNA3-FGFR4(G388)VSV über HindIII und NaeI; Klenow/CIAP-Behandlung und blunt-Ligation)	diese Arbeit
pZC-FGFR4(R388) _{ex} -TAP	Extrazellulär- und Transmembran-Domäne des FGFR4 mit Calmodulin- und ProteinA-Bindedomänen am C-Terminus (pZome1C BamHI verdaut, FGFR4 _{ex} TM-Exzision aus pcDNA3-FGFR4(R388)VSV über HindIII und NaeI; Klenow/CIAP Behandlung und blunt-Ligation)	diese Arbeit
pSUPER-Retro-siRNA66	siRNA generierender Vektor spezifisch für FGFR4 aus Oligos HJB66/67	diese Arbeit
pSUPER-Retro-siRNA70	siRNA generierender Vektor spezifisch für FGFR4 aus Oligos HJB70/71	diese Arbeit
pSUPER-Retro-siRNA74	siRNA generierender Vektor spezifisch für FGFR4 aus Oligos HJB74/75	diese Arbeit
pT4-NCAM120	NCAM120 cDNA in T4(pHβ-Apr-1 neo) kloniert	Frank Walsh, King's College, London UK
pT4-NCAM125	NCAM125 cDNA in T4(pHβ-Apr-1 neo) kloniert	Frank Walsh
pT4-NCAM140	NCAM140 cDNA in T4(pHβ-Apr-1 neo) kloniert	Steve Moore, London School of

		Hygiene and Trop. Medicine UK; Kateryna Kolkova, University of Copenhagen Denmark
pT4-NCAM180	NCAM180 cDNA in T4(pH β -Apr-1 neo) kloniert	Frank Walsh
pcDNA3-GFP	“green fluorescent protein” als Insert	diese AG

II.6.3 Wichtige Oligonukleotide

Name	Sequenz	Definition
HJB 1	CCGGAATTCGGAGTCAGTGACGGTACAGG	CD33 forward
HJB 2	CCGGAATTCGCAGCTCCTCATCCATCTCC	CD33 reverse
HJB 3	CCGGAATTCGTTCTCCTGTCCCAGGTGCT	CDH13 forward
HJB 4	CCGGAATTCCTCGTTGACATCCAGGAC	CDH13 reverse
HJB 5	CCGGAATTCTCTCGCGTCTCTCCTCCTTC	CDH3 forward
HJB 6	CCGGAATTCCTGTGACCTGCCACTGTCT	CDH3 reverse
HJB 7	CCGGAATTCCTCAGCCCTACCCAACCTCTCT	CDH6 forward
HJB 8	CCGGAATTCCTCACCGTCTGTGATGCTG	CDH6 reverse
HJB 9	CCGGAATTCGGAGCCTGCTTATCCTCCAG	DSG2 forward
HJB 10	CCGGAATTCCTAGACTGCCCCCTTGATCC	DSG2 reverse
HJB 11	CCGGAATTCGCAGCAGACACCAAGGTCAC	DSC3 forward
HJB 12	CCGGAATTCGTCGCACGACACTGAGTTGG	DSC3 reverse
HJB 13	CCGGAATTCCTGATGGGCAGTCAACAGC	ICAM1 forward
HJB 14	CCGGAATTCCTCATTATGACTGCGGCTGC	ICAM1 reverse
HJB 15	CCGGAATTCCTGACTGTGGCCCTCTTCAC	ICAM2 forward
HJB 16	CCGGAATTCGACAGCAACACCGACACCAC	ICAM2 reverse
HJB 17	CCGGAATTCGGTCTCTGTTCCCTCTGTCTG	ICAM4 forward
HJB 18	CCGGAATTCCTCAGGGTCACCACCAAGTAGC	ICAM4 reverse
HJB 19	CCGGAATTCCTCAGCAGGACAGGGTTACTGC	ITGA5 forward
HJB 20	CCGGAATTCCTGGGTGTCTGACGAGTCCT	ITGA5 reverse
HJB 21	CCGGAATTCGCAGCTGTGCTTGCTCTACC	ITGA6 forward
HJB 22	CCGGAATTCGGAGGCATATCCCCTAGGC	ITGA6 reverse
HJB 23	CCGGAATTCCTAGACGTGGACAGTCCTGC	ITGAV forward
HJB 24	CCGGAATTCCTTGGTGGCATGCTTCGAGC	ITGAV reverse
HJB 25	CCGGAATTCCTCAGCTAAGCTCAGGAACCC	ITGB1 forward
HJB 26	CCGGAATTCCTCAGACACCAAGGCAGGTC	ITGB1 reverse
HJB 27	CCGGAATTCGGACCTCTCCTACTCCATGC	ITGB2 forward
HJB 28	CCGGAATTCGTAAGCTGACAGGGTGAGG	ITGB2 reverse
HJB 29	CCGGAATTCGTAAGAGCTGCACGGAGTG	ITGB4 forward
HJB 30	CCGGAATTCGCAGAACTGACCCTCGTAGC	ITGB4 reverse
HJB 31	CCGGAATTCCTCAGGGTCCCCTGGAAGAC	COL XIII A1 forward
HJB 32	CCGGAATTCCTGGAAGCCTTTCTCTCC	COL XIII A1 reverse
HJB 33	CCGGAATTCGGCCTCTGAAGGAGGAGAAG	MCAM forward
HJB 34	CCGGAATTCCTCAGCTCCAGGAAGAGGATG	MCAM reverse

HJB 35	CCGGAATTCGGATGGCAGTGAGTCAGAGG	NCAM forward
HJB 36	CCGGAATTCGCTTAGGTGCACTGGGTTCC	NCAM reverse
HJB 37	CCGGAATTCAGTCCTGCTGACCCTTCTGC	PECAM forward
HJB 38	CCGGAATTCCTCTCCAGACTCCACCAC	PECAM reverse
HJB 39	CCGGAATTCGACAACCTTCTCCGGCTCAGG	SDC1 forward
HJB 40	CCGGAATTCGGAGTAGCTGCCTTCGTCCT	SDC1 reverse
HJB 41	CCGGAATTCGTCGATCCGAGAGACTGAGG	SDC4 forward
HJB 42	CCGGAATTCAGAGGAGCTCTGGATGAGG	SDC4 reverse
HJB 43	CCGGAATTCGGGACCACATCTACGCTGAC	VCAM1 forward
HJB 44	CCGGAATTCGAGGAAGGGCTGACCAAGAC	VCAM1 reverse
HJB 45	CCGGAATTCATGAGGTGTGAGTGGGATGG	gp130 forward
HJB 46	CCGGAATTCAGAACAGCACTCCCAGAAG	gp130 reverse
HJB 47	CCGGAATTCCTTGGGGATGTGCCTAGACC	CAV1 forward
HJB 48	CCGGAATTCCAAAGAGTGGGTCACAGACG	CAV1 reverse
HJB 49	CCGGAATTCAGGAGTACCAGGACAAGC	COL IV A1 forward
HJB 50	CCGGAATTCAGTCCCGGTAGACCAACTCC	COL IV A1 reverse
HJB 51	CCGGAATTCCTCAAGTCTGTACCTGTGC	LAMC1 forward
HJB 52	CCGGAATTCGTATCTCGCCTGTCCACTCG	LAMC1 reverse
HJB 53	CCGGAATTCCTGTGTCACCTACCAGAACC	CD171 forward
HJB 54	CCGGAATTCACCAAGAGCTGTGCCCTAC	CD171 reverse
HJB 55	CCGGAATTCGCCACCATGCGG CTGCTGCTGGCCCTGTTGG	FGFR4 forward
HJB 56	CCGCTCGAGTTAGTCCGTATACCTGGCCTCGG	FGFR4Sol reverse
HJB 57	CCGCTCGAGTTAGTGGAGC GCCTGCCCTCGATACAGCC	FGFR4T _{M_{ex}} reverse
HJB 58	GATCCCCGTGGAGCTTGAGCCCTGCCTTCAAGAGA GGCAGGGCTCAAGCTCCACTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start-Base 80)
HJB 59	AGCTTTTCCAAAAAGTGGAGCTTGAGCCCTGCC TCTCTTGAAGGCAGGGCTCAAGCTCCACGGG	FGFR4 siRNA reverse
HJB 60	GATCCCCGGCTGTATCGAGGGCAGGCTTCAAGAGA GCCTGCCCTCGATACAGCCTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start-Base 1162)
HJB 61	AGCTTTTCCAAAAAGGCTGTATCGAGGGCAGGC TCTCTTGAAGCCTGCCCTCGATACAGCCGGG	FGFR4 siRNA reverse
HJB 62	GATCCCCCGATGATGAGGACCCCAAGTCAAGAGA CTTGGGGTCTCATCATCGTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start-Base 373)
HJB 63	AGCTTTTCCAAAAACGATGATGAGGACCCCAAG TCTCTTGAAGTGGGGTCTCATCATCGGGG	FGFR4 siRNA reverse
HJB 64	GCGTCTGTAGAGGCTTCTGG	NCDH forward
HJB 65	GTGCTTGGAGCCTGAGACAC	NCDH reverse
HJB 66	GATCCCCGAGCAGGAGCTGACAGTAGTTCAAGAGAC TACTGTCAGCTCCTGCTTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 123)
HJB 67	AGCTTTTCCAAAAAGAGCAGGAGCTGACAGTAG TCTCTTGAAGTACTGTCAGCTCCTGCTCGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 66)

HJB 68	GATCCCCTGTCAGGGTTCTGCTCGGCTTCAAGA GAGCCGAGCAGAACCCTGACATTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 2589)
HJB 69	AGCTTTTCCAAAAATGTCAGGGTTCTGCTCGGC TCTCTTGAAGCCGAGCAGAACCCTGACAGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 68)
HJB 70	GATCCCCCTACCTGCTAGATGTGCTGTTCAAGA GACAGCACATCTAGCAGGTAGTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 607)
HJB 71	AGCTTTTCCAAAACTACCTGCTAGATGTGCT GTCTCTTGAACAGCACATCTAGCAGGTAGGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 70)
HJB 72	GATCCCCTACGGACATCATCCTGTACTTCAAG AGAGTACAGGATGATGTCCGTATTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 1000)
HJB 73	AGCTTTTCCAAAAATACGGACATCATCCTGT ACTCTCTTGAAGTACAGGATGATGTCCGTAGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 72)
HJB 74	GATCCCCGTGCTCGACCTTGATAGCATTCAAG AGATGCTATCAAGGTCGAGCACTTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 2481)
HJB 75	AGCTTTTCCAAAAAGTGCTCGACCTTGATAG CATCTCTTGAATGCTATCAAGGTCGAGCACGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 74)
HJB 76	GATCCCCTGTGCTGGTGACTGAGGACTTCAA GAGAGTCCTCAGTCACCAGCACATTTTTGGAAA	FGFR4 siRNA forward (Start Base 1850)
HJB 77	AGCTTTTCCAAAAATGTGCTGGTGACTGAGGAC TCTCTTGAAGTCCTCAGTCACCAGCACAGGG	FGFR4 siRNA reverse (zu HJB 76)
HJB 78	GCATGGACACCCAGACCAGG	FGFR4TMGly-TAP forward (inverse PCR)
HJB 79	TCGATACAGCCCGGCCAGCAGCAGG	FGFR4TMGly-TAP reverse (inverse PCR)
HJB 80	GCATACTTCTGCCTGCTGGG	FGFR4TMGly-TAP reverse (inverse PCR)
HJB 81	CTGCTGGCCGGGCTGTATCGAGGG	FGFR4TMGly-TAP forward (inverse PCR)
HJB 82	TCCAGGATAACTGTGACTCC	MSP forward
HJB 83	GGACTTAACATGGGCTATGC	MSP reverse
HJB 84	AGGATGCAGATGTCTCCAGC	PAI1 forward
HJB 85	CCAGATGAAGGCGTCTTTCC	PAI1 reverse
HJB 86	TGTTTCCTGCAACGATCACG	PRL forward
HJB 87	GGAACGGATCATTAAGGACC	PRL reverse
HJB 88	AGAATTCTGCCACCATGTCTCAGAGCAACC	BclX _L forward

HJB 89	GGGTGATGTGGAGCTGGGATGTC	BclX _L reverse
HJB 90	ACCACAGTCCATGCCATCAC	GAPDH forward
HJB 91	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	GAPDH reverse

II.7 Molekularbiologische Methoden

II.7.1 Plasmidpräparationen

II.7.1.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 2 ml *E.coli* Kulturen mit Hilfe des Qiagen Mini Kits nach Herstellerangaben präpariert.

II.7.1.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

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

II.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zum Nullabgleich wurde der gleiche Puffer verwendet, in dem die Nukleinsäuren resuspendiert waren. Die Nukleinsäuren wurden in einer Verdünnung von 1:200 gemessen.

Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Zur Abschätzung der Verunreinigung der Lösung mit Proteinen misst man die Absorption bei 280 nm und bildet anschließend den Quotienten aus OD₂₆₀/OD₂₈₀. Dieser Wert liegt bei nicht ausreichend reiner DNA bei unter 1,8. Für RNA liegt dieser Wert bei < 2,0.

II.7.3 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen erfolgten automatisiert mit Hilfe des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) gemäß der Kettenabbruchmethode. Die zu sequenzierende DNA wurde hierfür einer vorausgehenden PCR (s. II.7.8) nach folgendem "ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencer"-Protokoll unterzogen:

Reaktionsansatz:

4,0 µl	Terminator Ready Reaction Mix (TRR)
0,5 µg	dsDNA
10,0 pmol	Primer
ad 20,0 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

Amplifikation 25 Zyklen:	30 sec	96°C	(Denaturierung)
	15 sec	45-60°C	(Hybridisierung)
	4 min	60°C	(Synthese)
	→	4°C	(Abkühlung)

Anschließend wurde die amplifizierte DNA durch Zugabe von 80 µl H₂O und 250 µl 100 %igem Ethanol (RT) gefällt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA bei 13000 rpm für 20 min in einer Tischzentrifuge pelletiert, das Pellet in 250 µl 75 %igem Ethanol (RT) gewaschen und erneut durch 5-minütige Zentrifugation pelletiert.

Daraufhin wurde der Überstand mit einer Kanüle abgesaugt, und das Pellet für eine Minute bei 90°C im Heizblock getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl "Template Suppression Reagent" (TSR) aufgenommen und in ein Sequenziergefäß überführt, welches vorsichtig mit dem Septum verschlossen wurde. Die so präparierte DNA wurde dann bis zur Sequenzierung bei -20°C aufbewahrt und direkt vor der Sequenzierung für 2 min bei 90°C inkubiert.

II.7.4 Enzymatische Behandlung von DNA

II.7.4.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

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

II.7.4.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

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

II.7.4.3 Phosphorylierung von Primern

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

II.7.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit 2-5 fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-

Fragments, sowie 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und über Nacht bei 16°C oder alternativ 1 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

II.7.4.5 Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase

Das Klenowenzym (DNA Polymerase I, großes Fragment) kann zum Ausfüllen von 5'-Überhängen (nach Restriktionsverdau) verwendet werden, um anschließend glatte (blunt) Enden für die Ligation zu erhalten.

Nach dem Restriktionsverdau, bei dem durch die Restriktionsenzyme 5'-Überhänge entstanden sind, wurde der Ansatz mit Hilfe von Qiagen-Säulen (QIAquick™ PCR Purification Kit) gewaschen und mit 44 µl H₂O eluiert. Zu dem Eluat wurden 5 µl 10 x Klenow-Puffer (enthält 40 µM von allen vier dNTPs und 0,1 mg/ml BSA) und 1 U Klenow-Polymerase pro µg DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert. Nach erneuter Reinigung des Ansatzes mit Hilfe einer Qiagen-Säule wurde diese DNA in einer blunt-end-Ligation eingesetzt.

II.7.4.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α -³³P]-dATP

Zur radioaktiven Markierung von DNA- bzw. cDNA-Fragmenten wurde der „Random Primed Labeling Kit“ von Boehringer Ingelheim verwendet, der auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) beruht. 50 ng DNA bzw. ca. 300 ng cDNA wurden zusammen mit 2,5 µl Hexanukleotiden in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gebracht. Zum Reaktionsansatz wurden je 8,5 µl Reaktionsmix (Puffer:dTTP:dCTP:dGTP = 5:4:4:4), 50 µCi [α -³³P]-dATP und 1,5 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 2 h (< 4 h !) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen gereinigt und die radioaktiv markierte DNA in einem Volumen von 150 µl eluiert.

II.7.5 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 bp bis 14 kbp wurden in 0,6 – 2 %-igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-200 Volt innerhalb von 1-2 Stunden. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1 x TBE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1 x TBE entfärbt.

II.7.6 Isolierung von DNA-Fragmenten

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

II.7.7 DNA-Transfer in *E. coli* Bakterien

II.7.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

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

II.7.7.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* wurden 10 μl eines entsprechenden Ligationsansatzes verwendet und mit kompetenten Bakterien < 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann 1 min bei 42°C inkubiert, anschließend mit 500 μl LB-Medium versetzt und für 45 min auf 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Zellpellets in 100 μl LB-Selektionsmedium wurde der Reaktionsansatz auf eine LB-Selektionsagarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.7.7.3 Dauerkulturen von *E. coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50 %-igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -80°C gelagert werden.

II.7.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

II.7.8.1 PCR-Amplifikation von DNA

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

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 25 μl angesetzt:

- 1 μl Matrizen-DNA (1-100ng)
- 2 μl "sense" Oligomer (10pmol)
- 2 μl "antisense" Oligomer (10pmol)
- 2,5 μl 10x PCR Puffer II (mit 20 mM MgCl_2)

2 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)
 0,5 µl Pfu DNA Polymerase (2,5 U/µl)
 15 µl ddH₂O

alternativ:

1 µl Matrizen-DNA (1-100ng)
 2 µl "sense" Oligomer (10pmol)
 2 µl "antisense" Oligomer (10pmol)
 2,5 µl 10x ExTaq-Puffer (mit 2 mM MgCl₂)
 2 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)
 0,125 µl TaKaRa Ex Taq Polymerase (5 U/µl)
 15,375 µl ddH₂O

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

Erste Denaturierung:	3 min	95°C
Amplifikation 20-30 Zyklen:	45 sec	95°C (Denaturierung)
	45 sec	T _M -5°C (Hybridisierung)
	1 min/kb	72°C (Synthese) für ExTaq <u>oder</u>
	1,5 min/kb	72°C (Synthese) für Pfu
Letzte Synthese:	3 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mittels Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden aufgereinigt (II.7.8.2) und standen danach für weitere molekularbiologische Anwendungen zur Verfügung.

II.7.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits entsprechend den Herstellerangaben zur Verwendung anderer Methoden vorbereitet.

II.7.9 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNase-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM/DEPC-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation wurden ständig Handschuhe zum Schutz vor RNAsen der Haut getragen und häufig gewechselt. DEPC (Diethylpyrocarbonat) in Lösungen ohne Tris (wegen Inaktivierung desselben) inaktiviert irreversibel die vorhandenen RNAsen durch kovalente Modifikationen.

II.7.9.1 Präparation von Total-RNA

Die Präparation von Total-RNA aus Zellen erfolgte hauptsächlich mit Hilfe des „Roti-Quick-Kits“ für die RNA-Isolation nach Herstellerprotokoll. Hierzu wurden stets subkonfluente Zellen verwendet. Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese (II.7.9.2) und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

Für die cDNA-Makro-Arrays wurden die Total-RNA nach einem alternativen Protokoll isoliert. Für die Präparation von total-RNA wurden die Zelllinien (ca. 80 % konfluent) mit Guanidiniumthiocyanatpuffer (4 M GnSCN, 25 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,1 M β -Mercaptoethanol) lysiert. Die genomische DNA wird mittels 10 maliges Saugen durch eine Injektionsnadel geschert. Zu dem Ansatz wurden 500 μ l einer 10 %-igen N-Lauroyl-Sarcosinlösung und 1 ml einer 2 M NaOAc pH 4,2 zugegeben und gemischt. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion mit 10 ml Phenol und 2 ml Chloroform. Nach der Zentrifugation (30' 4000rpm) wurde der Überstand mit einer Volumeneinheit Isopropanol versetzt und 45 min bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (HB4-Rotor 10 min 10000 rpm) wurde das Pellet mit Chloroform / Wasser 1:1 gewaschen und die wässrige Phase mit 0,1 Vol 3 M NaOAc pH 6,0 und 3 Vol Ethanol präzipitiert. Das durch eine Zentrifugation erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 200 μ l H_2O resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

II.7.9.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosekammern (Lehrbach et al., 1977). 1,2 g Agarose wurden in 77 ml H_2O aufgeköcht und 10 min bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in 10 ml 10 x MOPS und 13 ml Formaldehyd (37 % v/v) aufgefüllt und das Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 3 μ g Poly(A⁺)-RNA wurde mit 2,5 μ l 10 x MOPS, 4,4 μ l Formaldehyd (37 % v/v) und 12,5 μ l Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H_2O auf 25 μ l gebracht. Die Proben wurden 15 min bei 55°C erhitzt, anschließend mit 10 μ l RNA-Auftragspuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Pro cm^2 Gelfläche wurden 6 V Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in 100 ml Laufpuffer mit 5 μ l Ethidiumbromid gefärbt (10 mg/ml) und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 60 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

II.7.9.3 Präparation von cDNA

Für die Präparation von cDNA wurden ein Oligo-dT-Primer, der das 3'-Ende von mRNA erkennt (K1, Clontech Inc., USA), und ein „SMART“-Primer (Clontech Inc., USA) verwendet, der die 5'-terminale CAP-Struktur von mRNA erkennt (K2). Es folgte nur die Synthese des zu der RNA komplementären DNA-Stranges. Ein Verdau der RNA nach der Strangsynthese und eine Synthese von doppelsträngiger cDNA erfolgte nicht. 10 μ g Total-RNA wurden in einem Volumen von 10 μ l mit 10 μ M K1 und 10 μ M K2 in H_2O für 2 min bei 68°C erhitzt, anschließend für 10 sec auf Eis inkubiert und folgende Reagenzien in einem Mix zugegeben:

5x RT Puffer	4 μ l
10 mM dNTPs	2 μ l
AMV-Reverse Transkriptase	2 μ l
ddH ₂ O	2 μ l

Folgende PCR-Reaktion wurde anschließend durchgeführt:

10 min 25°C
60 min 42°C

Die synthetisierte cDNA wurde daraufhin mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit 30 μ l Tris/HCl pH 8,0 von der Säule des Kits eluiert.

II.7.9.4 Herstellung der cDNA-Makro-Arrays

Bei der Auswahl der Gene, die mit der cDNA-Makro-Array Analyse untersucht werden sollten, wurde der Schwerpunkt auf Signal- und Zelladhäsionsmoleküle gelegt, besonders Proteinkinasen und -phosphatasen. So kann, im Vergleich zu anderen Array-Systemen, die oft weit mehr Gene enthalten, die Analyse spezifisch auf die Gene des größten Interesses beschränkt werden. Ausgehend von den Daten des „Human Genom Projekts“ wird die Anzahl der Proteinkinasen im menschlichen Genom auf ungefähr 550, die der Proteinphosphatasen, die die Aktivität der Proteinkinasen regulieren, auf 130 geschätzt (Lander et al., 2001). Auf den Arrays sind Sonden von 98 Tyrosinkinase, 429 Serin/Threoninkinasen und 157 Proteinphosphatasen, so dass alle bisher identifizierten Kinasen und Phosphatasen untersucht werden. Die Makroarrays bestehen aus Nylonmembranen, auf die Sonden von etwa 1200 Genen aufgebracht sind. Die Sonden enthalten pBluescript Plasmide, in die Sequenzen der entsprechenden Gene mit einer Länge von 200 bp bis 4000 bp ligiert wurden. Das leere Plasmid ohne zusätzliche Gensequenzen dient als Negativkontrolle. Jede Gensonde ist als Triplikat aufgetragen und für viele Gene befinden sich zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen desselben Gens auf der Membran. Durch diese Mehrfachbestimmung der Expression jedes einzelnen Gens kann die Zuverlässigkeit der Daten gesteigert und der technische Fehler vermindert werden. Des Weiteren enthalten die Arrays sog. „house-keeping“-Gene, die zur Normalisierung verwendet werden können. Die Plasmid-DNA der Sonden wurde 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Anschließend mit 2 mM NaOH versetzt und 10 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 mM NH₄OAc (pH 5,3) wurde der Ansatz neutralisiert und mit 6 x SSC-Bromphenolblau versetzt. Das Aufbringen der Sonden auf die Nylonmembranen erfolgte mit einem GeneTAC™G3-Roboter (Genomic Solutions, USA). Durch Erhitzen der Membranen im Vakuum (80 °C für 2 h) wurden die Sonden fixiert.

II.7.9.5 Prähybridisierung der cDNA-Makro-Arrays

Jede Membran wurde zuerst mit dem Puffer W1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) kurz gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 15 ml 1x Prähybridisierungslösung (2 x PräHy:100x Denhardt, 20 x SSC, 0,5 M Na₃PO₄ pH 6,8, 100 mM Na₄P₂O₇) und 100 µg/ml tRNA in einem Hybridisierungsröhrchen für > 4 h inkubiert. Die Prähybridisierung erfolgte dabei unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersbach) bei 68°C.

II.7.9.6 Hybridisierung der Arrays mit radioaktiv-markierter cDNA

Die gereinigte ³³P-markierte cDNA muss mit COT-DNA (Gibco, USA) inkubiert werden. Diese DNA bindet besonders gut an repetitive Sequenzen und blockiert somit auch die repetitiven Sequenzen der cDNA, die bei der Hybridisation mit den Arrays unspezifische Signale verursachen können.

Dazu wurden den 150 µl radioaktiv-markierter cDNA 40 µl 20 x SSC, 4 µl 10 % SDS und 10 µl COT-DNA (1 mg/ml) zugesetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 68°C weiter inkubiert. Danach wurde dieser Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, welcher vorher auf 70°C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA versetzt wurde. Der Prähybridisierungspuffer auf den Arrays wurde jetzt gegen den radioaktiven Proben-Hybridisierungspuffer getauscht. Diese Hybridisierung erfolgte wiederum bei 68°C unter Rotation der Hybridisierungsröhrchen für mindestens 16 h.

II.7.9.7 Waschen der cDNA-Arrays

Nach der Proben-Hybridisierung wurden die Arrays folgendermaßen gewaschen:

- 1) W1, 20 min bei 42°C
- 2) W1, 20 min bei 42°C
- 3) W2, 20 min bei 42°C
- 4) W2, 60 min bei 65°C

Danach wurden die Arrays mit ddH₂O gewaschen, getrocknet und in entsprechenden Filmkassetten Phosphoimagerplatten (Fuji, Japan) exponiert. Die Entwicklung des Signals unter Lichtausschluss wurde in der Regel über einen Zeitraum von 48 h vorgenommen und anschließend am Phosphoimager (Fuji Bas2500, Japan) über die Software BASreader (Raytest, Kanada) detektiert.

II.7.9.8 Auswertung der cDNA-Makro-Arrays

Die Schwärzung der einzelnen Punkte wurde mit Hilfe des Computerprogramms Array Vision (Imaging Research, USA) ermittelt. Von den Schwärzungen der Punkte wurde der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden in das Computerprogramm Excel (Microsoft, USA) exportiert, wo sie weiter bearbeitet wurden. Dazu wurde eine selber geschriebene Auswertungsroutine (in Visual Basic) verwendet, die die Werte automatisch normalisierte und die in den Klonen stärker oder schwächer exprimierte Gene identifizierte.

Zur Normalisierung wurde zuerst der Durchschnitt der Werte für den Leervektor pBluescript eines cDNA-Arrays von allen Werten desselben Arrays abgezogen. Auf diese Art wurde der Hintergrund, den jeder Punkt wegen unspezifischer Bindungen an den Plasmidvektor enthielt, in weiteren Berechnungen des Programms nicht mehr berücksichtigt. Anschließend wurde für jeden cDNA-Array die Summe aller Werte gebildet und jeder Punkt durch diese Summe geteilt. Dadurch konnten Schwankungen in der Gesamtintensität aller Punkte der cDNA-Arrays untereinander ausgeglichen werden. Jeder Wert wurde dann mit 10000 multipliziert, um handlichere Werte für die spätere Auswertung zu erhalten. Diese Rechenoperation änderte nicht das Verhältnis der Werte untereinander.

Mit den normalisierten Werten wurden die in den Klonen im Vergleich zur Ausgangszelllinie anders exprimierten Gene ermittelt. Als stärker exprimiert wurde ein Gen in einem Klon angesehen, wenn dessen Wert über dem Durchschnittswert der cDNA-Arrays der jeweiligen Ausgangszelllinie plus 2 x Standardabweichung lag. Die so ermittelten unterschiedlich exprimierten Gene wurden in zwei Tabellen für stärker und schwächer exprimierte Gene eingetragen und nach der Anzahl der Klone, in denen eine veränderte Expression festgestellt wurde, sortiert.

Durch Vergleich der Expressionsdaten können die einzelnen Gene entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile eingeteilt werden. Die Expressionsprofile zweier Gene ähneln sich, wenn die Gene in denselben Klonen stärker oder schwächer exprimiert werden. Diese gemeinsame Expression könnte bedeuten, dass die entsprechenden Gene auch funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen. Wenn mehrere Gene, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, ähnliche Expressionsprofile haben, so könnten sie z. B. in einem gemeinsamen Signalweg wirken. Auf diese Weise können also nicht nur einzelne Gene identifiziert werden, welche an die FGFR4-Expression gekoppelt sind, sondern ganze Signaltransduktionswege aufgedeckt werden.

II.7.9.9 Gruppierung der Gene

Für das Gruppieren der Gene wurden die normalisierten Expressionsdaten mit dem Computerprogramm „Cluster“ (Eisen et al., 1998) analysiert. Es wurden nur die Gene verwendet, die in wenigstens 80 % der cDNA-Arrays einen Wert von 1.0 oder höher aufwiesen. Dadurch wurden die Gene ausgeschlossen, deren Werte so klein waren, dass sie zu dicht am unspezifischen Hintergrund der Filter lagen. Dafür wurde die Filterfunktion des Programms verwendet. Anschließend wurden die Daten logarithmiert und nochmals normalisiert. Das Gruppieren der Gene erfolgte durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus. Es wurde der „Average Linkage“ Modus mit der zentrierten Korrelation benutzt. Bei dieser Art des Gruppierens werden zuerst kleinere Gengruppen gefunden und die Ähnlichkeit der Gengruppen untereinander bestimmt, indem ein durchschnittliches Expressionsprofil aus den Genen in einer Gengruppe gebildet wird, und dieses dann mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil der anderen Gengruppen verglichen wird. Die Ergebnisse des Gruppierens wurden in einem Ergebnisdatenfile abgelegt und mit dem Programm „Tree View“ (Eisen et al., 1998) angesehen. Wie gut die Expressionsprofile der Gene und Gengruppen miteinander korrelieren, wurde durch den Korrelationsfaktor ausgedrückt, welcher von 1.0 für identische Profile bis -1.0 für genau entgegengesetzte Profile reichte. Für weitere Untersuchungen wurden nur Gengruppen verwendet, die einen Korrelationsfaktor von 0.7 oder größer besaßen.

II.8 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

II.8.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7 % CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in sog. Einfriermedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) bei -80°C bzw. -196°C. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Coulter Counters (Coulter Electronics, Krefeld).

II.8.2 Mykoplasmentest

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

II.8.3 Transfektion von Zellen

II.8.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK 293 Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird die DNA mit CaCl_2 und einer BES-gepufferten Phosphatlösung (BBS) präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von der Zelle aufgenommen (Graham and van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei Zellteilung verloren (Scangos and Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48-72 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale in 8 ml Medium ausgesät. Pro Transfektion wurden 8 μg DNA in 360 μl H_2O verdünnt und mit 40 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt. Unter Schütteln wurden 400 μl 2 x BBS zugetropft. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese über Nacht bei 37°C und 3 % CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und gegebenenfalls mit serumfreiem Medium bis zur weiteren Verwendung gehungert.

Schalengröße	12-Lochplatte	6-Lochplatte	6 cm Schale	10 cm Schale
Schalenfläche	4 cm^2	10 cm^2	21 cm^2	57 cm^2
Zellzahl	180000	300000	800000	1,8 x 10 ⁶
Medienvolumen	1 ml	2 ml	4 ml	8 ml
DNA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	1 μg in 45 μl	2 μg in 90 μl	4 μg in 180 μl	8 μg in 360 μl
2,5 M CaCl_2	5 μl	10 μl	20 μl	40 μl
2 x BBS (pH6,96)	50 μl	100 μl	200 μl	400 μl
Gesamtvolumen	100 μl	200 μl	400 μl	800 μl

II.8.3.2 Transfektion mit anderen Methoden

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

Insbesondere 21nt siRNA Duplexe (Ambion, Huntington, Cambridge, UK) wurden mit Lipofectamine 2000TM transfiziert, wobei 0,84 μg bzw. 20 nM siRNA pro 6-Loch-Platte eingesetzt wurden (ähnlich Elbashir et al., 2001).

10 μl LF2000 wurden in 240 μl serumfreiem Medium für 5 min bei RT vorinkubiert, anschließend mit dem siRNA-Mix (10 μl in 240 μl serumfreiem Medium) vereinigt und nochmals für 20 min bei RT weiterinkubiert. Der gesamte 500 μl Transfektionsansatz wurde jeweils auf 1,5 ml serumfreies Medium der Zielzellen gegeben und so für 4,5 h bei 37°C und 7 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz von den Zielzellen entfernt und gegen normales 10 % FCS-Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen weiter bei 37°C und 7 % CO_2 kultiviert.

Die siRNA gegen FGFR4 (ID1412 target-validiert, Ambion) wurde gegen die DNA-Sequenz 5'-GGCUCUCCGGCAAGUCAAtt-3', die siRNA gegen Luciferase GL2 wurde gegen die DNA-

Sequenz 5'CGUACGCGGAAUACUU-CGAtt-3' gerichtet. Die Unterdrückung der Proteinexpression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von 48h-168h nach erfolgter Transfektion in Immunoblots überprüft.

II.8.4 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen

Zur Infektion mit retroviralen Vektoren wurde die Verpackungszelllinie Phoenix A (Φ NX-Ampho) verwendet und mittels Kalziumphosphatmethode (II.8.3.1) mit pRETRO-Super, pZome bzw. pLXSN Konstrukten transfiziert. Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine HEPES-gepufferte Phosphatlösung 2 x HBS: (46 mM Hepes pH 7,5, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ pH 7,0) statt 2 x BBS verwendet wurde, und den Zellen 5 min vor der Transfektion 25 μ M Chloroquin zugegeben wurde, um lysosomale DNAsen zu inhibieren.

Nach 24 h wurden die Zellen durch einen Mediumwechsel mit minimalem Volumen an neuem Nährmedium versetzt. Nach weiteren 24 h wurde der virale Überstand gesammelt und durch einen 45 μ m Filter sterilfiltriert. Der Überstand wurde dann mit 8 μ g/ μ l Polybren versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gebracht. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde dieser Vorgang mehrmals, sowohl für die infizierten Phoenix A Zellen als auch für die Zielzelllinien wiederholt. Nach erfolgter 4. Infektion wurde der letzte Überstand gegen normales 10 % FCS-Medium getauscht und die Zellen, wie üblich, über Nacht weiterkultiviert.

Am folgenden Tag wurde das Medium nochmals gewechselt und durch entsprechendes Selektionsmedium ersetzt (entweder Geneticin G418 für mindestens 10 d oder Puromycin für 48 h). Nach erfolgreicher Selektion standen stabil exprimierende Zellen für die entsprechenden Experimente zur Verfügung.

II.9 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

II.9.1 Isolierung von Antigen zur Produktion polyklonaler Antikörper

Von HEK 293 Zellen, die stabil mit dem Gen für das GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4 transfiziert waren (J. Bange, d. AG), wurden alle zwei Tage Medium mit dem darin sezernierten Protein geerntet und gesammelt. Die anschließende Aufreinigung des GST-Fusionsproteins aus dem Überstand wurde wie in II.10.1 beschrieben durchgeführt.

II.9.2 Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen

Als Antigen zur Immunisierung diente das FGFR4_{ex}-GST Fusionsprotein aus II.10.1. Vor der Immunisierung wurden den Kaninchen zunächst an der Ohrvene ca. 2 ml Prä-Immuneserum abgenommen, die als spätere Kontrolle dienen sollten. Zur ersten Immunisierung wurden jeweils 500 μ g des Antigens mit dem gleichen Volumen „komplettes Freund's Adjuvanz“ (Sigma) versetzt und in einer Kanüle zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde den Kaninchen an mehreren Stellen subcutan injiziert. In gleicher Weise erfolgten nochmals Immunisierungen zwei und vier Wochen später, mit dem Unterschied, dass hierfür „nicht-komplettes Freund's Adjuvanz“ verwendet wurde. Acht Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet. Das Blut wurde über Nacht bei 4°C zur Präzipitation des sogenannten Blutkuchens stehen gelassen. Anschließend wurde der flüssige

Bestandteil abgenommen und 10 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nachfolgend schloss sich eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 11000 rpm und 4°C an. Danach wurde das Serum abgenommen und mit Natriumazid versetzt (Endkonzentration 0,02 %)

II.9.3 Affinitätsreinigung des Serums

Um unspezifische Antikörper aus dem Serum zu entfernen, wurde dieses mittels Affinitätschromatographie über eine Zyanbromid aktivierte Sepharose-Säule (CNBr aktivierte Sepharose 4B, Pharmacia) mit daran gekoppeltem Antigen gereinigt.

II.9.3.1 Präparation der CNBr aktivierten Sepharose

500 µg des Antigens wurden zuvor über Nacht bei 4°C gegen 500 ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl pH 8,0) dialysiert.

Zunächst mussten 500-1000 mg der gefriergetrockneten CNBr aktivierten Sepharose für 15 min bei RT in 1 mM HCl-Lösung in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufquellen. 1 g der Sepharose quillt dabei zu 3,5 ml Gel auf. Anschließend wurde das Gel mit 200 ml 1 mM HCl pro 1 g Sepharose in mehreren Fraktionen gewaschen (Zentrifugation bei RT und 2000 rpm). Nach einmaligem Waschen mit Kopplungspuffer wurde sofort 0,5 – 1 mg dialysiertes Antigen in einem Volumen von ca. 2 ml zugegeben. Dieser Schritt muss ohne zeitliche Verzögerung ablaufen, da die CNBr-Gruppen bei pH 8,0 aktiviert werden und schnell hydrolysieren. Durch zweistündige Rotation auf einem Drehrad wurde die Bindung des Antigens an die Säule ermöglicht. Die überschüssigen Bindungsstellen wurden daraufhin durch Zugabe von 15 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,0 und nochmaliger Inkubation auf dem Drehrad für 2 h abgesättigt. Nicht-kovalent gebundene Proteine wurden dann durch einen viermaligen pH-Wechsel von pH 4,0 (100 mM NaAcetat, 500 mM NaCl) auf pH 8,0 (Kopplungspuffer) entfernt. Die so präparierte Säule wurde in 1 x PBS-Puffer mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

II.9.3.2 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Vor der Zugabe des Serums wurde die CNBr aktivierte Sepharose mit dem gekoppelten Antigen in 1 x PBS-Puffer äquilibriert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht unter Rotation auf einem Drehrad (50 ml Falconröhrchen). Am nächsten Morgen wurde das Serum mit der Sepharose in Fraktionen in eine Biorad-Säule transferiert und nach Durchfluss des Serums mehrfach mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte im Anschluß bei RT mit Elutionspuffer (100 mM Glycin, 150-300 mM NaCl, pH 2,5) in mehreren 1 ml Fraktionen. Die Antikörper-Eluate wurden in Neutralisierungspuffer (100 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, pH 11) aufgefangen, so dass der pH-Wert der Eluate bei pH 7,0 – 7,5 lag. Die Fraktionen wurden bei einer OD von 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine OD₂₈₀=1 einer Antikörperkonzentration von 0,5 µg/µl. Anschließend wurden die Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration miteinander vereinigt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer gegen 250-500 ml 1 x PBS-Puffer bzw. 1 x NET-Puffer dialysiert. Am darauf folgenden Tag wurde der PBS/NET-Dialysepuffer gegen 50 % Glycerin in 1 x PBS ausgetauscht; die Eluate wurden erneut über Nacht bei 4°C im Dialysepuffer inkubiert. Die auf diese Weise einkonzentrierten Antikörperlösungen wurden in Aliquots bei – 20°C aufbewahrt.

II.10 Proteinanalytische Methoden

II.10.1 Expression und Aufreinigung von FGFR4_{ex}-GST

Das GST-Fusionsprotein wurde aus dem Mediumüberstand von stabil transfizierten HEK 293 Zellen isoliert, welche nach der Transfektion für zwei Wochen auf Resistenz gegen G418 selektioniert wurden (Dissertation Bange J.). Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurden den Zell-Überständen Aprotinin und PMSF zugesetzt und abzentrifugiert, sowie anschließend durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll) von Zelltrümmern befreit. Der Mediumüberstand wurde dann durch angelegten Unterdruck mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Die eigentliche Aufreinigung erfolgte mit Hilfe einer FPLC (Äcta Explorer 100, Amersham) und einer 5 ml FF GST-Glutathion-Sepharose Säule bei 4°C. Es wurde ein vordefiniertes Programm mit Hilfe des Wizard-Assistenten erstellt und ein automatisches Programm anstelle manueller Steuerung verwendet. Nachdem der Mediumüberstand über die Säule gepumpt worden war, wurde mit 10 x CV (Column Volume) PBS gewaschen und schließlich mit 25 mM Glutathion/50 mM Tris pH 8,0 eluiert. Die Fraktionierung der Proben von ≤ 1 ml erfolgte automatisiert über einen Fraktionierer. Die Protein-Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde durch eine SDS-PAGE überprüft und mit Coomassie visualisiert. Anschließend wurden die entscheidenden Fraktionen vereinigt und gegen PBS/50% Glyzerin dialysiert.

II.10.2 Triton X-100 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM Na₄P₂O₇, 10 % Glycerol, 1 mM EGTA, 1 % Triton-X100 oder NP 40, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 2 mM Na₃VO₄) versetzt, dem zusätzlich frisch 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF und 2 mM Natrium-Orthovanadat (pH 10,0) zugegeben wurde. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde das Zellysat gesammelt und unlösliche Zellbestandteile mittels Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm und 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde dann zur Immunpräzipitation verwendet oder als Totallysat der Zellen analysiert.

II.10.3 Proteinbestimmung

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

II.10.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines spezifischen Proteins aus dem Zellysat wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen das Protein mittels spezifischer Antikörper an Protein A bzw. Protein G Sepharose gekoppelt wird und so von Zellysat abgetrennt werden kann (Chenais et al., 1977). Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag; Protein G mit ähnlichen Bindungseigenschaften stammt aus *Streptococcus spec.* G148.

Ob ein Antikörper besser an Protein A oder G bindet, hängt vornehmlich von seinem Antikörper-Isotyp ab.

Zur Immunpräzipitation wurden 30 µl Protein A/G Sepharose (1:3 verdünnt mit normaler Sepharose) und eine angemessene Menge des spezifischen Antikörpers zu dem u.U. mit Lysepuffer weiterverdünnten Zellysat gegeben und für ≥ 3 h, jedoch nicht länger als über Nacht, bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden bei 6600 rpm (Kühl-Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit Lysepuffer wurden die Proben in 50 µl 1,5 x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 95°C gekocht, um den Immunkomplex von der Sepharose-Matrix zu lösen und die Proteine vollständig zu denaturieren. Die Sepharose wurde schließlich 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, um den Proteinüberstand abzunehmen und auf das Gel laden zu können.

II.10.5 Zellfraktionierung

Die Zellen wurden mit eiskaltem hypotonischem Puffer (10 mM Hepes, 10 mM NaCl, 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM NaHCO_3 , 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2) versetzt und abgeschabt. Zusätzlich wurde der Lösung 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF und 2 mM Natriumorthovanadat (pH 10) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem Dounce-Homogenisator (Bellco, USA) mechanisch aufgeschlossen und das Lysat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden unlösliche Bestandteile wie Zytoskelett, nicht aufgeschlossene Zellen und Zellkerne durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C abgetrennt. Mit dem Überstand wurde nun eine Ultrazentrifugation für 45 min bei 4°C und 105000 g durchgeführt, wodurch die Membranbestandteile pelletiert und somit von der zytoplasmatischen Fraktion abgetrennt wurden. Der Überstand mit Zytosol wurde abgenommen und zur weiteren Analyse verwendet. Die Membranfraktion wurde dann in einem adäquaten Volumen Nonidet P-40 Lysepuffer (hypotonischer Puffer plus 1 % NP40 und 10 % Glycerol), dem natürlich die üblichen Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt wurden, solubilisiert und zur weiteren Analyse verwendet.

II.10.6 GST-Pulldown-Assay

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

Die Pulldown-Assays wurden mit Membranfraktionen (II.10.5) von DAL bzw. MDA-MB-453 Zellen durchgeführt. Dabei wurde GST Protein als Negativkontrolle in einem Parallelansatz im Vergleich zum FGFR4_{ex}-GST Pulldown eingesetzt. 100 µg Bait-Protein wurde mit 30 µl Glutathion-Sepharose und Membranfraktionen aus 10 mg Totallysat über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit NP-40-Puffer wurde die Proben-Sepharose-Matrix in 50 µl Glutathionelutionspuffer (II.10.1) für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation 5 min bei 6600 rpm abgenommen und mit 6x Lämmli-Puffer auf die gewünschte 1 x Endkonzentration gebracht. Das Pulldown-Eluat wurde 3 min bei 95°C aufgeköcht, anschließend auf eine SDS-PAGE aufgetragen und analysiert.

Für entsprechende Vorexperimente wurden die Zellen außerdem über Nacht bei 37°C in 50 µCi/ml Methionin und methioninfreiem Medium vorinkubiert, um neusynthetisierte Proteine zu markieren und später die Sensitivität für den Nachweis von potentiellen Interaktionspartnern von FGFR4 zu erhöhen.

II.10.7 Tandem-Affinity-Purification (TAP) Pulldown

Die TAP-Pulldown-Experimente wurden folgendermaßen durchgeführt: Totallysate (20 mg) mit exprimierten TAP-getaggten Proteinen wurden mit jeweils 100 µl IgG-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation bei 6200 rpm/4°C zweimal mit AcTEV-Protease-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,2 % Triton X-100) gewaschen, und gebundene TAP-Proteine anschließend mit jeweils 250 U AcTEV-Protease (Invitrogen, Eggenstein) in 1 ml Herstellerpuffer (mit 0,2 % Triton X-100) über Nacht bei 4°C von der Matrix „eluiert“. Der Überstand der IgG-Sepharose wurde dann für 9 h in jeweils 75 µl Calmodulin-Sepharose inkubiert; die Äquilibration der Calmodulin-Sepharose erfolgte durch 3 x Waschen mit Cal-Äquilibrationpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgAcetat, 2 mM CaCl₂, versetzt mit üblichen Proteaseinhibitoren vgl. Lysepuffer). Zur Calmodulin-Matrix-Inkubation wurde dem eluierten AcTEV-Puffer noch 50 mM CaCl₂ (Stammlösung 1 M) zugesetzt, um die Bindung an die Sepharose zu gewährleisten. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Calmodulin-Beads erneut 3 x mit dem Cal-Äquilibrationpuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde anschließend durch 200 µl Cal-Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgAcetat, 5 mM EGTA, 50 mM EDTA, 0,2 % Triton X-100) in einem 1 h bei 4°C Inkubationsschritt eluiert. Das durch Zentrifugation von der Sepharose abgetrennte Eluat konnte in nachfolgenden SDS-PAGES weiter analysiert werden.

II.10.8 Proteinfällung nach Wessel & Flügge

Zur Fällung der eluierten TAP-Proteine wurde die Methode nach Wessel & Flügge (1984) verwendet. Auf 200 µl Proteinlösung werden 800 µl Methanol gegeben, kurz gevortext und 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden 300 µl Chloroform zugegeben, nochmals kurz gevortext und erneut bei 13000 rpm für 10 s zentrifugiert. Dann werden 600 µl H₂O zum gesamten Ansatz hinzupipettiert, stark gevortext und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wird nun vorsichtig entfernt. Zur Interphase und unteren Phase werden nochmals 600 µl Methanol gegeben und gevortext; als letzter Schritt wird erneut 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Proteinpellet wird bei RT luftgetrocknet.

II.10.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfate) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Laufgeschwindigkeit im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrer dadurch natürlich gegebenen Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7,5-10 %-ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde im Anschluss ein 4 %-iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde, wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben, durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 bzw. Silbernitrat gefärbt oder die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert.

II.10.10 Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1 % Coomassie G250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol) ≥ 2 h oder über Nacht bei RT gefärbt, anschließend mit 40 % Propanol und 10 % Essigsäure entfärbt und fixiert. Schließlich wurden die Gele bei RT über Nacht getrocknet, indem man die H₂O-angefeuchteten Gele zwischen zwei hydratisierten Folien einlegte und anschließend die beiden Folien mit dem Gel zwischen einem Kunststoff- und Stahlrahmen aufspannte. Zur Sequenzierung von SDS-PAGES wurde eine kolloidale Coomassie-Färbung mit Roti-Blue (Roth GmbH, Karlsruhe) gewählt und dabei protokollarisch nach Herstellerangaben verfahren.

II.10.11 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von SDS-Proteingelen erfolgte nach dem Protokoll von Mann (Rappsilber et al., 2000). Der Vorteil dieser Färbung liegt darin, dass sie sich gegebenenfalls auch zur massenspektrometrischen Analyse eignet, da die Färbung reversibel ist.

II.10.12 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 3 h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2 % TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt und blockiert.

II.10.13 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der spezifischen Erkennung des immobilisierten Proteins durch einen spezifischen, primären Antikörper. In einem zweiten Schritt wird dieser primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper erkannt, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Aufgrund dieser enzymatischen Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit der Firma NEN. Sollte die Membran ein zweites Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Strip-Lösung bei 50°C für 1 h oder alternativ 10 min in 0,2 N NaOH entfernt werden.

II.10.14 Extrazelluläre Matrix (ECM) ELISA

Auf einer Nunc Maxisorp Flat Bottom 96-Loch-Platte (Kapazität 1 µg pro Well) wurden jeweils 10 µg wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel (BD Bioscience, Heidelberg) in 100 µl PBS bzw. 1 µg FGF19 in 100 µl PBS durch eine 6 h/4°C Inkubation immobilisiert. Die einzelnen Wells der Platte wurden dann 4 x mit 200 µl Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween 20) bei RT gespült. Anschließend wurde jeweils pro Well 1 µg gereinigtes GST-Protein oder FGFR4_{ex}-GST-Protein

über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten 4-maligen Waschen mit PBS-Tween-Puffer erfolgte ein Blocken der einzelnen Ansätze mit jeweils 200 µl 2,5 % Hühneralbumin (in Waschpuffer) bei RT für 2 h. Jedes Well wurde erneut 4 x mit 200 µl Waschpuffer gespült und daraufhin mit dem 1:1000 verdünnten Primärantikörper (hier: polyklonaler 1171-AK in Waschpuffer plus 0,1 % Hühneralbumin) bei RT für 1 h inkubiert. Die 96-Loch-Platte wurde nochmals 4 x mit Waschpuffer gespült und anschließend für 1h bei RT mit dem 1: 5000 verdünnten Sekundärantikörper (Pufferzusammensetzung wie beim Primärantikörper) inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze jeweils 6 x mit 200 µl Waschpuffer gespült; die gebundene Proteinmenge wurde durch Zugabe von jeweils 100 µl TMB-Reagenz (Calbiochem, Darmstadt) pro Well am ELISA-Reader bei 630 nm quantifiziert, nachdem eine 10 min Inkubation bei 4°C und die Entwicklung der Farbreaktion erfolgt war.

II.11 Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen

II.11.1 Stimulation von Zellen

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

II.11.2 Assays zum Nachweis von Chemotaxis

II.11.2.1 Wundheilungsexperiment

Ein Verfahren für die mikroskopische Detektion von Wunden in adhärenter Zellkultur, sowie das Zufügen einer mechanischen Verletzung wurde von Swanson beschrieben (Swanson and McNeil, 1987). Dieses Vorgehen wurde für menschliche Epithelzellen erarbeitet, ist jedoch universell für die meisten Zelllinien im Labor einsetzbar.

Wie bei Bange (Bange et al., 2002) ausgeführt, wurden die jeweils zu untersuchenden Zellen mit stabil infiziertem FGFR4 (G388, R388) in 6-Lochplatten zur Konfluenz herangezogen und dann 24 h gehungert. Mit einer blauen (1000 µl) Pipettenspitze wurde der Zellschicht eine möglichst gleichmäßige Wunde zugefügt und anschließend die abgelösten Zellen mit Medium gewegewaschen. Nach einer Inkubation der Zellen in Medium mit 10 % Kälberserum für 24 h bei 37°C (5 % CO₂) konnten die Zellen unter einem Mikroskop beobachtet und fotografiert werden.

II.11.2.2 Transwell-Migrationsassay

Zum Nachweis von Migration (Chemotaxis) wurden 24-Loch-Transwell-Kulturgefäße mit poröser Polykarbonatmembran (8 µm Porengröße) der Firma Falcon verwendet. In die unbeschichtete obere Kammer (Einsatz) wurden 5 x 10⁴ Zellen in serumfreiem Medium ausgesät. Während in der unteren Kammer (24-Loch) normales Kulturmedium als chemischer Lockstoff diente. Nach 18-24 stündiger Kultivierung der Zellen wurden die Einsätze entfernt und

nicht-migrierte Zellen von der Oberseite der Membran mittels Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden anschließend für ≥ 1 h bei Raumtemperatur in 20 % Methanol mit 0,5 % Kristallviolett fixiert und gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit H₂O wurde das gebundene Kristallviolett 10 %iger Essigsäure aus den Zellen gelöst und anschließend bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch quantifiziert.

II.11.2.3 Tumorzellinvasionsassay

Zum Nachweis von Tumorzellinvasion wurden 24-Loch-Transwell-Kulturgefäße mit porösen Polykarbonatmembranen (8 μ m Porengröße) mit bereits vorbeschichtetem, wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel der Firma Falcon verwendet. Nachdem das Matrigel wie vom Hersteller empfohlen rehydratisiert wurde, wurde wie zum Nachweis von Migration (II.11.2.2) weiter verfahren. Die Inkubationszeiten wurden je nach Bedarf auf 24-48 h verlängert.

II.11.2.4 Branching-Assay

Die Zellen (10000/Well) werden zur Simulation von *in vivo* Bedingungen auf 4 mg/ml Matrigel (verdünnt in 10 % FCS-Medium) in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen, die in einer 10 % FCS-Medium-Suspension vorliegen, auf dem ECM-Ersatz ausgesät wurden, sinken diese in die relativ weiche Matrigelschicht ein. Anschließend werden diese bei 37°C und 7 % CO₂ für 7 – 14 Tage inkubiert, wobei kein Mediumwechsel durchgeführt wird und nach der Hälfte des Zeitraums und nach Ablauf des gesamten Zeitraums fotografiert. Filopodia bzw. Zellausläufer waren in der Regel jedoch schon nach 7 d sichtbar und wurden zur Dokumentation verwendet, da nach 14 Tagen die eindeutigen Effekte meistens in einer abgemilderten Form vorlagen.

II.12 Apoptose-Assays mit Propidium-Jodidfärbung

Als schnelles Verfahren zur Bestimmung von Zelltod ist die Färbung mit Propidium-Jodid anzusehen. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung, wodurch der DNA-Gehalt im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen abnimmt. Apoptotische Zellen besitzen deshalb einen DNA-Gehalt, der geringer ist als der von Zellen in der G_{0/1}- bzw. G₂/M-Phase. Nach Fixierung von Zellen und vollständiger Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Propidium-Jodid, einer sequenzspezifisch DNA-interkalierenden Substanz, ist die Fluoreszenz dieser Zellen abhängig von deren DNA-Gehalt. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 529 nm emittiert Propidium-Jodid rotes Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm. Apoptotische Zellen zeigen im Durchflusszytometer deshalb weniger Fluoreszenz als Zellen in G₀/G₁, es erscheint ein sogenannter Sub-G₀/G₁-Wert. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurden je 6×10^4 Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentration von Doxorubicin ($\geq 2 \mu$ M) für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit hypotonischem Färbereagenz (0,1 % (w/v) Natriumcitrat; 0,1 % (v/v) Triton-X-100; 50 μ g/ml Propidium-Jodid) versetzt und für 2-3 h bei 4°C inkubiert. Die Analyse des DNA-Gehalts erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACScalibur) der Firma BD Biosciences.

III Ergebnisse

Für den FGFR4 wurde bereits in früheren Untersuchungen dieser Abteilung die homologe Mutation zu FGFR3 von Glycin zu Arginin an der AS-Position 388 (vgl. G380R) identifiziert. Das Arginin-Allel des FGFR4 spielt dabei nachweislich eine wichtige Rolle bei der Brustkrebs-, Kolonkarzinoma- oder Plattenepithelkarzinoma Progression (Bange et al., 2002; Streit et al., 2004). Klinische Daten beweisen, dass Patienten als Träger des Arginin-Allels mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einer reduzierten rezidiv-freien Überlebenszeit zu rechnen haben. Außerdem wurde noch untersucht und gezeigt (Dissertation Bange J), dass die Kinaseaktivität des Rezeptors bei beiden Allelen unbeeinflusst bleibt. Allerdings führt die Expression des FGFR4(R388) zu einer erhöhten Zellmigration im Vergleich zu FGFR4(G388). Die extrazelluläre Domäne des FGFR4 (FGFR4_{ex}-GST) erhöht zusätzlich eine zweiwertige-kationenabhängige Zelladhäsion und erste GST-Pulldown-Experimente lassen eine Interaktion der extrazellulären Domäne des Rezeptors mit anderen Proteinen vermuten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb die Rolle des FGFR4 in der Krebsentwicklung noch genauer untersucht werden.

III.1 Interaktionspartner von FGFR4

Zu Beginn dieser Arbeit war größtenteils unklar, welche Proteine von FGFR4 und insbesondere durch die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gebunden werden können. In einem einfachen Experiment sollte veranschaulicht werden, dass der FGFR4 besondere Bindungseigenschaften nicht nur in Zell-Zell- (Cavallaro et al., 2001), sondern auch in Zell-Matrix-Interaktionen besitzen könnte. In einem ECM-ELISA (II.10.13) wurden zwei verschiedene Substrate, wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel als ECM Ersatz bzw. FGF19 als Positivkontrolle, auf einer 96-Loch-Platte immobilisiert. Einer Inkubation mit entweder FGFR4_{ex}-GST- oder GST-Protein als Negativkontrolle folgte eine Inkubation der 96-Loch-Platte mit einem anti-FGFR4-AK, um gebundenes FGFR4_{ex}-GST-Protein nachzuweisen. Die eigentliche Detektion geschah über einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und ein entsprechendes

Färbereagenz für ELISA. Die Proteinquantifizierung erfolgte durch eine Absorptionsmessung am ELISA-Reader bei 630 nm. In der Auswertung des Experiments wurde der Absorptionwert der Matrigel-GST-Inkubation auf den Referenzwert 0 gesetzt. Der Versuch zeigte, dass das rekombinante FGFR4_{ex}-GST-Protein, wie erwartet, stark an FGF19 als substratspezifischen FGFR4-Liganden binden konnte. Im Kontrollansatz fiel die Bindung von GST an FGF19 im Vergleich dazu relativ schwach aus. Unabhängig davon konnte auch eine starke Affinität von FGFR4_{ex}-GST für das wachstumsfaktor-reduzierte Matrigel beobachtet werden (Abb. 5).

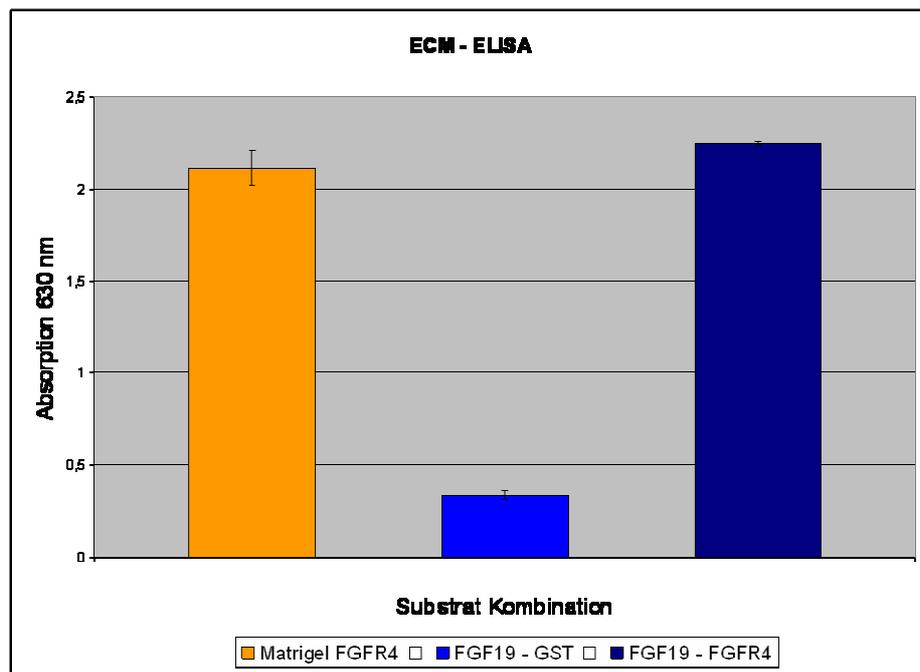


Abb. 5: ECM-ELISA. Gezeigt wird der TMB-Absorptionswert bei 630 nm verschiedener Substrat- (wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel oder FGF19) und Protein- (GST oder FGFR4_{ex}-GST) Kombinationen. Immobilisiertes Matrigel inkubiert mit GST wurde auf den Referenzwert 0 gesetzt.

Für nachfolgende Experimente wurde deshalb und im Hinblick auf frühere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass insbesondere die extrazelluläre Domäne des FGFR4 eine besondere Bedeutung, sowohl in der Zell-Zell-, als auch in der Zell-Matrix-Adhäsion einnehmen könnte. Durch den Nachweis von Interaktionen mit anderen Proteinen kann schließlich der Einfluss des FGFR4 auf verschiedene physiologische Prozesse, wie z.B. die Zellmigration und die Krebszellinvasion erklärt werden.

III.1.1 Untersuchungen zur Interaktion von FGFR4 mit NCAM

Da Cavallaro et al. (2001) einen Signalkomplex bestehend aus FGFR4, NCAM und N-Cadherin postulierten, sollte zuallererst geprüft werden, ob die zwei verschiedenen Allele des FGFR4 (G388/R388) unterschiedliche Bindungseigenschaften für NCAM besitzen. Zu diesem Zweck wurden cDNA-Plasmide verschiedener NCAM-Isoformen 120, 125, 140 und 180 (II.6.1) mit den Vektoren des Glycin- oder Arginin-Allels des FGFR4 in HEK 293 Zellen co-transfiziert und die Proteine dadurch co-exprimiert, so dass eine Co-Immunopräzipitationen aus den Totallysaten dieser Zellen mit einem anti-FGFR4-AK durchgeführt werden konnte. Dabei wurde einerseits die Expression von NCAM im TL nachgewiesen (Abb. 6 A). Andererseits wurden die Co-Immunopräzipitationen im Immunblot mit entsprechenden Antikörpern auf ihren NCAM- (Abb. 6 B) und FGFR4-Gehalt (Abb. 6 C) hin untersucht.

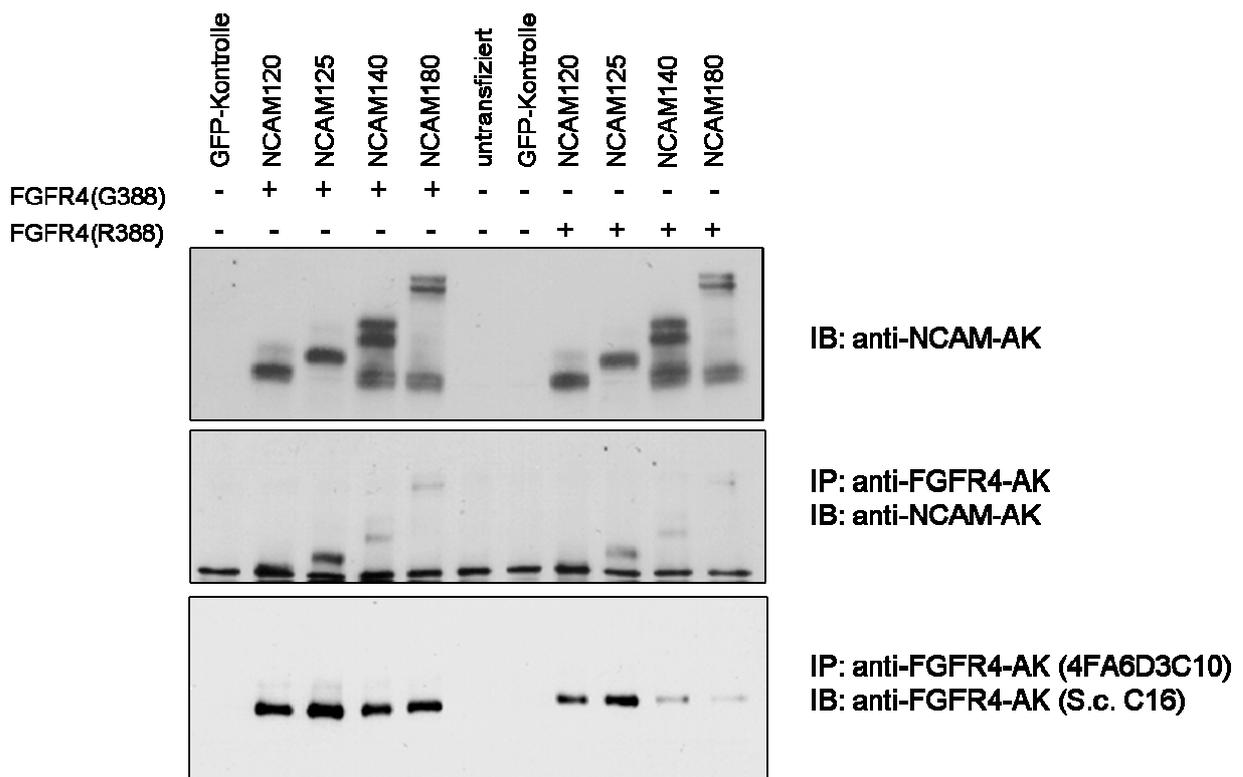


Abb. 6: Co-Immunopräzipitation von NCAM und FGFR4. A, Totallysat-Expression der verschiedenen NCAM-Isoformen in den cotransfizierten HEK 293 Zellen. B, Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10) und Immunoblot auf NCAM. C, Reblot der Immunopräzipitationen mit einem zweiten anti-FGFR4-AK (S.C. C16).

Es zeigte sich, dass der Gehalt an co-immunpräzipitiertem NCAM im Vergleich zur Totallysatkonzentration per se sehr gering war. Überexprimiertes NCAM 120 konnte durch die Überlagerung mit einer Hintergrundbande oder durch endogen vorhandenes NCAM 120 nicht eindeutig identifiziert werden. Für die anderen NCAM-Isoformen konnte allerdings kein Unterschied in der Bindung an co-exprimiertem FGFR4(G388) oder FGFR4(R388) festgestellt werden. Die Effekte bei einer niedrigeren Menge an vorhandenem FGFR4(R388) im Vergleich zum Glycin-Allel wurden durch eine gleichzeitig reduzierte Menge an co-präzipitiertem NCAM in den einzelnen Ansätzen kompensiert. Da außerdem im Prinzip keine endogenen Humanzellsysteme gefunden werden konnten, in denen FGFR4 und NCAM-Isoformen vernünftig co-exprimiert werden, wurde deren *in vivo* Relevanz insbesondere in Brustkrebs in Frage gestellt. Eine Interaktion von FGFR4 mit N-Cadherin konnte in Co-Immünpräzipitationen (Daten nicht gezeigt) auch nicht nachgewiesen werden. Schließlich wurde auf weitere Untersuchungen zur Interaktion von FGFR4 mit NCAM verzichtet und in nachfolgenden Experimenten auf die Identifizierung neuer Interaktionspartner von FGFR4 fokussiert.

III.1.2 GST-Pulldown und TAP-Tagging Technologie

Bereits J. Bange konnte in seiner Dissertation zwei Interaktionspartner für das rekombinante Protein FGFR4_{ex}-GST, d.h. die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, in GST-Pulldown-Experimenten mit Cos7-Zelllysaten nachweisen. Dieser Ansatz wurde zunächst weiter verfolgt, um Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne des FGFR4 zu finden und zu identifizieren. Dadurch sollte geklärt werden, wie FGFR4_{ex}-GST-Protein die Adhäsion von Zellen unterstützen kann, und ob die extrazelluläre Domäne des Rezeptors die Migration und Invasion von Zellen entscheidend beeinflusst.

Das FGFR4_{ex}-GST-Fusionsprotein konnte aus dem Zellkulturüberstand von HEK 293 Zellen durch FPLC gereinigt (II.10.1) werden, da die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne deletiert wurden und das Protein von den Zellen somit nur sezerniert werden konnte. Nach der Säulenelektion des Proteins und der Dialyse gegen PBS/Glycerol wurde das Proteinkonzentrat nochmals auf deren Zusammensetzung und FGFR4_{ex}-GST-Gehalt in einer SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung untersucht. Zwei unabhängige Reinigungen (A und B) zeigten eine vergleichbar gute Reinheit und Konzentration, um die eigentlichen GST-Pulldown-Experimente

durchführen zu können (Abb. 7). Da unter der Verwendung des FGFR4_{ex}-GST-Fusionsproteins ohnehin nur Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors identifiziert werden konnten, wurden für die GST-Pulldown-Experimente Membranpräparationen durchgeführt, um den unspezifischen Hintergrund zu minimieren.

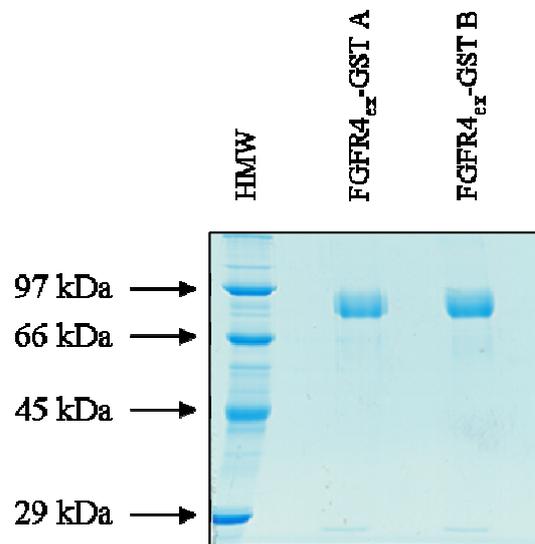


Abb. 7: Reinigung von FGFR4_{ex}-GST. Analyse jeweils eines 20 µl Aliquots von zwei unabhängigen Reinigungen (A und B) von HEK 293 Überständen auf einer SDS-PAGE und anschließende G250 Coomassie-Färbung.

Für die Vorexperimente wurde eine ³⁵S-Radioaktivmarkierung gewählt, um eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis von möglichen Interaktionspartnern zu gewährleisten. Es wurden zwei Brustkrebszelllinien nämlich MDA-MB-453 und DAL gewählt, welche endogen FGFR4 exprimieren, um dabei sicherzustellen, dass potenzielle Bindungspartner von FGFR4 bereits vorhanden sind und präzipitiert werden können. Die Membranpräparationen wurden mit GST- bzw. FGFR4_{ex}-GST und Glutathion-Sepharose inkubiert und gebundene Proteinkomplexe unter reduzierenden Bedingungen eluiert (II.10.6). Die präzipitierten, radioaktiven Proteine wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot durch die Exposition gegen eine Phospho-Imager-Platte sichtbar gemacht und ausgewertet (Abb. 8 A und B). Es konnten sowohl für die Zelllinie DAL als auch für MDA-MB-453 verschiedene Interaktionspartner gefunden werden, die mit Pfeilen rechts neben der Abbildung angedeutet wurden.

In einem erneuten präparativen GST-Pulldown ohne Radioaktivmarkierung, dafür aber mit erhöhter eingesetzter GST- bzw. Fusionsproteinmenge und erhöhter Konzentration an Membranprotein wurden diese GST-Pulldown-Experimente wiederholt. Für die Identifizierung der unbekannt Proteine wurden die GST-Pulldown-Eluat nach Auftrennung in einer SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Die entsprechenden Proteinbanden, die nicht in der

GST-Kontrolle gefunden werden konnten, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie in der MPI-Service-Abteilung analysiert.

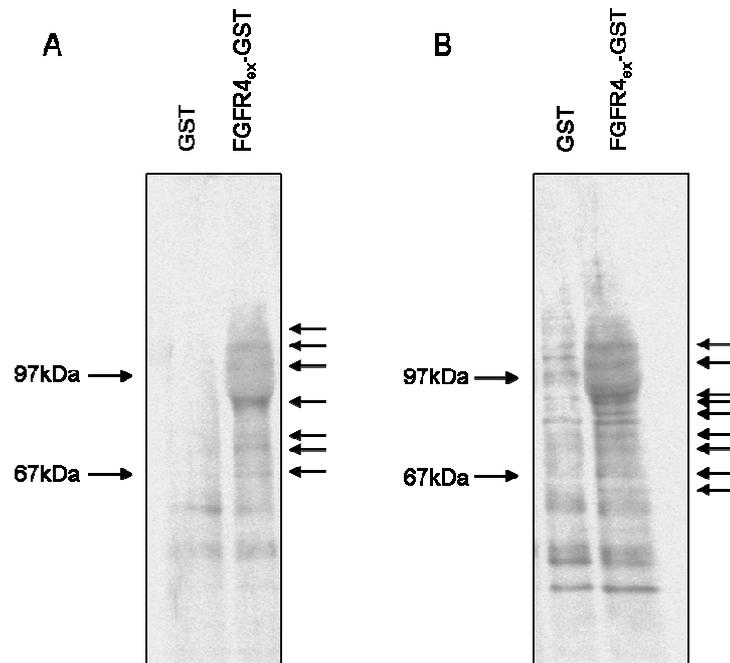


Abb. 8: GST-Pulldown von ^{35}S -markierten Membranproteinen. A, Radioaktiv-markierte Interaktionspartner eines GST- und FGFR4_{ex}-GST-Pulldowns aus der Brustkrebs-Zelllinie DAL werden visualisiert. B, GST-Pulldown wurde (analog A) mit Membranproteinen aus der Zelllinie MDA-MB-453 durchgeführt.

Dabei wurden die folgenden Proteine als potenzielle Bindungspartner gefunden:

FGFR3, (FGFR4), t-PA (tissue type plasminogen activator), sowie Annexin II;

Die mögliche Interaktion von FGFR3 mit FGFR4 wurde in einer anderen Dissertation dieser Arbeitsgruppe (Stadler, 2005) bereits studiert. Co-Immunopräzipitation mit einem anti-FGFR4-AK und anschließende Immunoblots mit anti-t-PA-AK bzw. anti-Annexin II-AK konnten die Ergebnisse der GST-Pulldowns nicht validieren (Daten nicht gezeigt), so dass ein alternatives System zur Identifizierung von co-präzipitierenden Proteinen mit FGFR4 entwickelt wurde. Hier sollten die Bindungseigenschaften durch ein membranverankertes, getaggtetes Fusionsprotein entscheidend verbessert werden, um leichter Interaktionspartner zu finden.

Die Extrazellulär- und Transmembrandomäne von humanem FGFR4(G388) bzw. FGFR4(R388) wurde durch eine blunt-blunt-Klonierung in die BamH1 Schnittstelle des eukaryotischen, retroviralen Expressionsvektors pZome1C eingefügt (Abb. 9). Die cytoplasmatische Domäne wurde auch für diesen Ansatz deletiert, um ebenso wie beim GST-Pulldown nur Bindungspartner für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors zu finden. Der Vektor pZome1C eignet sich speziell zur Transfektion bzw. retroviralen Infektion von humanen Zielzellen, wobei das Fusionsprotein

den TAP-Tag C-terminal exprimiert. Um zu überprüfen, ob die Klonierung des FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsproteins erfolgreich war, wurde nicht nur eine Plasmidsequenzierung, sondern auch eine transiente Transfektion von HEK 293 Zellen durchgeführt. In einem TL-Immunoblot wurde gezeigt, dass sich die beiden klonierten Vektoren zur ektopischen Expression von FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien eignen (Abb. 10).

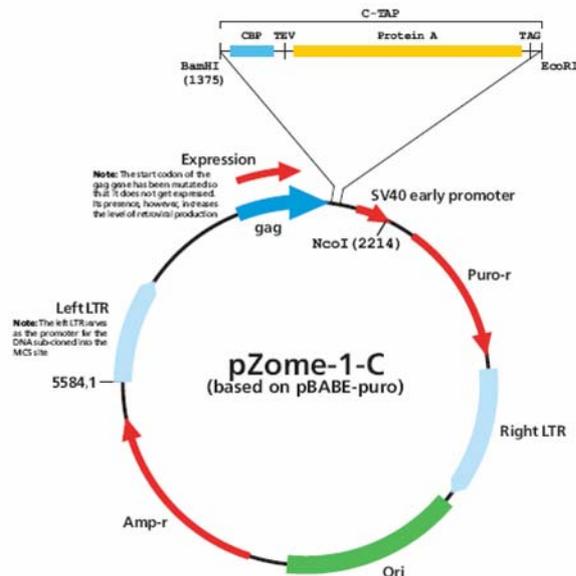


Abb. 9: Vektorkarte des retroviralen Klonierungsvektors pZome1C zur stabilen Expression von C-terminal getaggten TAP-Fusionsproteinen in Humanzelllinien.

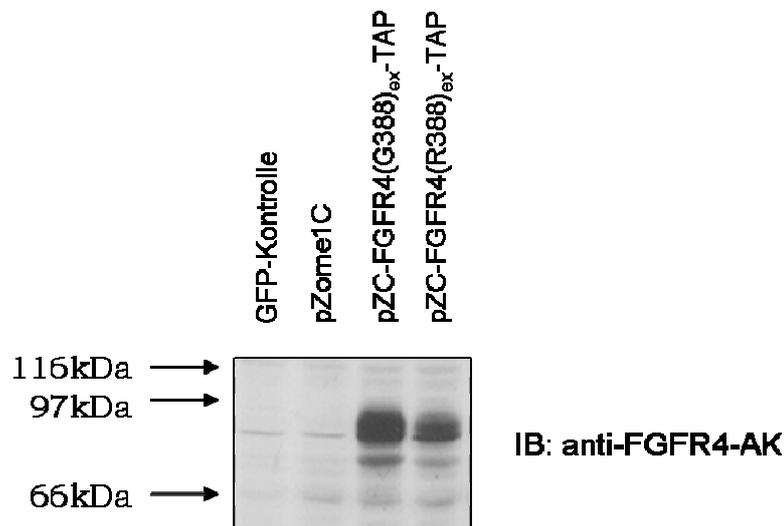


Abb. 10: Transiente Expression von FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsproteinen. HEK 293 Zellen wurden mit den Vektoren pZC-FGFR4(G388)_{ex}-TAP, pZC-FGFR4(R388)_{ex}-TAP, pcDNA3-GFP oder pZome1C transfiziert. Die TL der transfizierten Zellen wurden in einem Immunoblot mit einem anti-FGFR4-AK (1171-AK) gegen die extrazelluläre Domäne des FGFR4 auf die Expression der Fusionsproteine getestet.

Als Ausgangszelllinien zur stabilen Expression der FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsproteine wurden SKBr3, 769-P und TE671 gewählt, da in allen Zellsystemen eine niedrige, endogene Basalexpression von FGFR4 vorhanden ist und auch hier davon ausgegangen werden kann, dass potenzielle Bindungspartner von FGFR4 exprimiert werden. Diese Zelllinien wurden nach der Transfektion von Phoenix A durch anschließend gebildete Virenüberstände mit der genetischen Information des Leervektors pZome1C als Kontrolle oder der pZome1C-FGFR4(G/R)-TAP Konstrukte infiziert (II.8.4). Nach Puromycin-Selektion wurden die neu generierten Zelllinien auf ihre FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsprotein-Expression hin untersucht. In IgG-Sepharose-Präzipitationen und anschließenden Immunoblots gegen die extrazelluläre Domäne von FGFR4 konnten die FGFR4_{ex}-TAP-Fusionsproteine eindeutig in allen drei Zelllinien detektiert werden (Abb. 11).

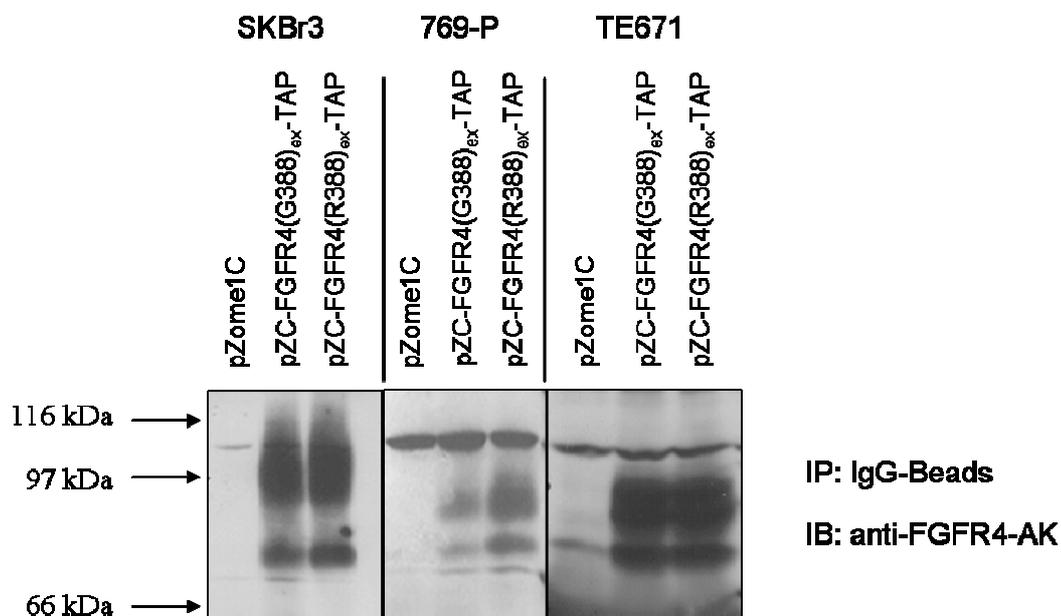


Abb. 11: Stabile ectopische Expression von FGFR4_{ex}-TAP in verschiedenen Zelllinien. Es wurden TL IgG/Cal-Sepharose-Präzipitationen für die drei Zelllinien SKBr3, 769-P und TE671 durchgeführt. Die präzipitierten TAP-Fusionsproteine wurden durch einen gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten anti-FGFR4-AK (1171-AK) in einem Immunoblot nachgewiesen.

Für die quantitativen TAP-Pulldown-Experimente wurden jeweils 75 x 15 cm Platten von TE671 pZome1C und pZC-FGFR4(G388)_{ex}-TAP Zellen lysiert. Nach erfolgter Proteinbestimmung, um die Proteinmengen in beiden Ansätzen anzugleichen, erfolgten IgG-Präzipitationen, AcTEV-Protease-Verdau und Calmodulin-Sepharose-Präzipitationen ähnlich den oben für Abb. 11 beschriebenen Vorexperimenten (II.10.7). Die Zusammensetzung der Proteineluate wurde in einem Immunoblot und einer Silberfärbung analysiert. FGFR4(G388)_{ex}-TAP-Protein konnte

wurden. Deshalb wurden die Experimente mit der TAP-Pulldown-Strategie im Rahmen dieser Dissertation beendet, um besondere Interaktionspartner für FGFR4 zu finden, welche schließlich den unterschiedlichen Einfluss des FGFR4(G388) bzw. FGFR4(R388) auf die Zellmigration oder Krebszellinvasion hätten erklären können.

III.2 cDNA-Makro-Array Analysen von polyklonalen Zelllinien

Durch cDNA-Makro-Array Analysen sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionswege durch überexprimierten FGFR4 aktiviert werden bzw. welche Gene mit FGFR4 co-exprimiert werden. Um diese Experimente durchzuführen, wurden zu Beginn polyklonale Zelllinien generiert, welche verschiedene Isoformen des FGFR4 produzieren. Frühere Array Analysen können auf diese Art und Weise durch die Expression von funktionell inaktivem FGFR4 erweitert werden. Neben den vollständigen cDNA-Isoformen des FGFR4(G388 und R388) sollten auch die membranverankerten, cytoplasmatisch-deletierten FGFR_{ex}TM(G388 und R388), kinase-inaktiver FGFR4(K503M) und die extrazelluläre, sezernierte Domäne des Rezeptors FGFR4_{sol} verwendet werden. Die jeweiligen Konstrukte wurden durch retrovirale Infektion in drei verschiedenen Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB-231 und MDA-MB-435S zur Expression gebracht, und die Zellen anschließend auf entsprechende Antibiotika-Resistenz selektiert. Die cDNA-Makro-Array Analysen wurden dabei mit Filtern, welche in dieser Arbeitsgruppe selbst hergestellt bzw. gespottet wurden und über 1000 Gene mit Krebsrelevanz – hauptsächlich Kinasen – umfassen, durchgeführt.

III.2.1 Klonierung von Zelladhäsionsmolekülen für die Arrays

Die cDNA-Makro-Arrays der letzten Generation beinhalteten einerseits keine gespotteten cDNA-Sequenzen von Zelladhäsionsmolekülen, andererseits sollte geklärt werden, ob auch die Expression von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionspartnern neben bekannten Kinasen oder Adaptermolekülen durch eine ektopische FGFR4-Expression beeinflusst werden kann. Deshalb wurde anfangs eine Reihe von charakteristischen Adhäsionsmolekülen verschiedener Familien

mittels PCR-Amplifikation oder Umklonierung aus EST-Klon-Vektoren in den pBluescript-Vektor ligiert, welcher standardmäßig als Kontrolle auf den cDNA-Makro-Arrays mitgespottet wurde. Dabei wurden in der Regel nur Partialsequenzen von ca. 500 bp der entsprechenden Gene verwendet. Tab. 3 gibt einen Überblick über alle neu klonierten Gene, die in die nächste cDNA-Makro-Array Generation aufgenommen wurden und deshalb in den Analysen zusätzlich erfasst werden konnten.

Protein Familie	Gen
Cadherin	CDH2, 3, 5, 6, 12, 13, 16
Integrin	ITGA3, 5, 6, V ITGB1, 2, 3, 4, 6
Collagen	COL IVA1, COL XIII
Cell adhesion molecules	MCAM, NCAM, PECAM, VCAM, ICAM2, ICAM3
Desmocollin	DSC2, 3
Desmoglein	DSG1, 2, 3
Syndecan	SDC1, 4
andere	CD147, CD171, SELE, LAMC1

Tab. 3: Neue Zelladhäsionsmoleküle der cDNA-Makro-Arrays.

III.2.2 Nachweis der FGFR4-Proteinexpression in polyklonalen Zelllinien

Als Ergänzung zu den vorgesehenen cDNA-Makro-Array Untersuchungen wurde die Expression der verschiedenen, überexprimierten FGFR4-Isoformen parallel auch in Immunpräzipitationen und Immunoblots mit FGFR4-Antikörpern nachgewiesen. Für MCF7 konnte dabei nur eine signifikante Expression der beiden Konstrukte mit vollständig exprimierter cDNA von FGFR4(G388) bzw. FGFR4(R388) gezeigt werden (Abb. 13), so dass für die Array-Experimente die polyklonalen Zellen der cytoplasmatisch-deletierten oder kinase-inaktiven Konstrukte vernachlässigt werden konnten.

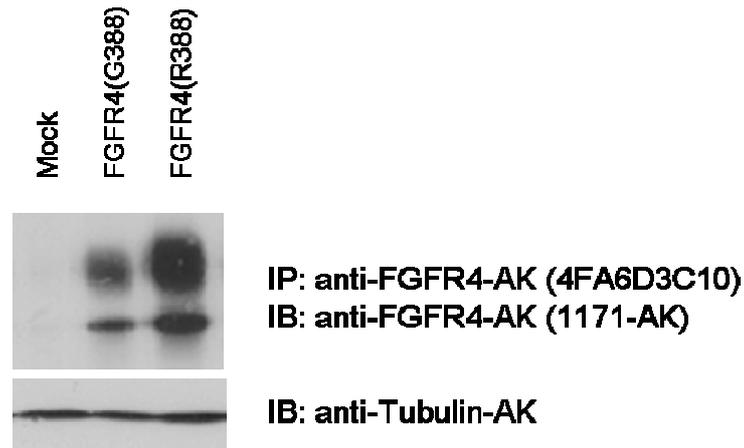


Abb. 13: FGFR4-Expression in polyklonalen MCF7. TL-Immunopräzipitation mit anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK) und Immunoblot mit anti-FGFR4-AK (1171-AK), welcher die extrazelluläre Domäne des Rezeptors erkennt. Der TL-Immunoblot wurde mit einem anti-Tubulin-AK als Kontrolle durchgeführt.

Die MDA-MB-231 und MDA-MB-435S Zellen exprimierten polyklonal alle infizierten FGFR4-Isoformen von den vollständigen cDNA-Konstrukten des Glycin- und Arginin-Allels bis hin zu den cytoplasmatisch-deletierten FGFR4_{ex}TM(G388/R388) oder der kinase-inaktiven FGFR4 (K503M) Isoform (Abb. 14 und 15). Für diese beiden Zelllinien konnten deshalb alle Polyklonalen für die weiteren Array Analysen verwendet werden.

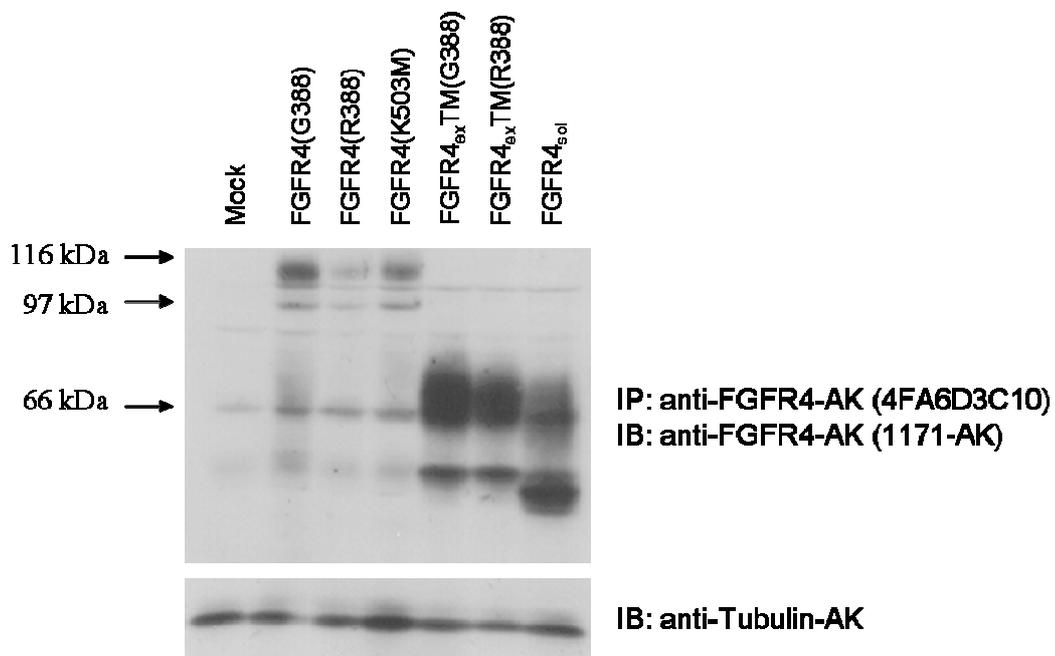


Abb. 14: FGFR4-Expression in polyklonalen MDA-MB-231. TL-Immunopräzipitation mit anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK) und Immunoblot mit anti-FGFR4-AK (1171-AK), welcher die extrazelluläre Domäne des Rezeptors erkennt. Der TL-Immunoblot wurde mit einem anti-Tubulin-AK als Kontrolle durchgeführt.

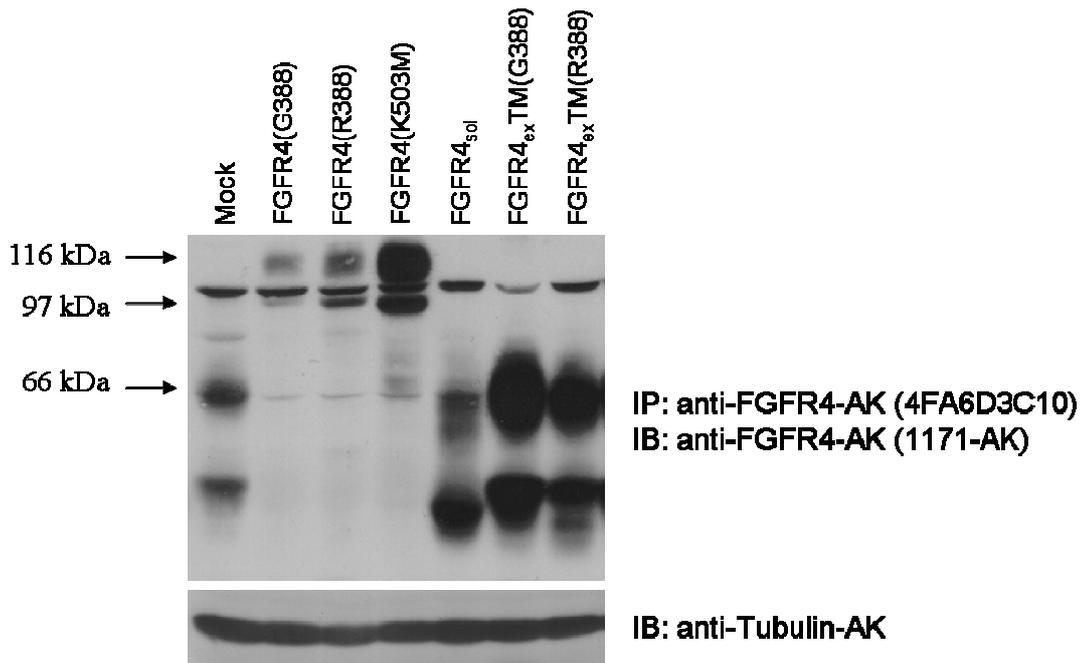


Abb. 15: FGFR4-Expression in polyklonalen MDA-MB-435S. TL-Immunopräzipitation mit anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK) und Immunoblot mit anti-FGFR4-AK (1171-AK), welcher die extrazelluläre Domäne des Rezeptors erkennt. Der TL-Immunoblot wurde mit einem anti-Tubulin-AK als Kontrolle durchgeführt.

III.2.3 cDNA-Makro-Array Analyse von MCF7 Zellen

Alle folgenden Array-Experimente wurden prinzipiell entsprechend den in Kapitel II.7.9 beschriebenen Methoden durchgeführt. Die cDNA-Makro-Array Analyse der FGFR4(G388) und FGFR4(R388) MCF7-Zellen im Vergleich mit der MCF7 Mock-Kontrolle ergab eine Reihe von Genen, welche zusammen mit FGFR4 induziert und co-exprimiert wurden, wobei nur Gene, deren Expression mindestens verdoppelt oder mehrfach erhöht wurde, zusammengestellt wurden (Tab. 4). Dabei konnte FGFR4 unter den hochexprimierten Top-Genen identifiziert werden, was sich mit den Immunoblot-Proteinanalysen deckte und als interne Kontrolle der Arrays gewertet werden konnte. Eine Cluster-Analyse mit Hilfe der Cluster-Software (Eisen et al., 1998) konnte einen genaueren Einblick vermitteln, welche Gene mit FGFR4 signifikant co-exprimiert wurden. Dazu gehörten unter anderem z.B. Shc, Bim, FGFR1 und 2, Adam15 und 22, Akt, sowie BclX_L, wobei der Pearson-Koeffizient für diese Gengruppierung bei 0,88 lag (Abb. 16).

	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones	FGFR4(R388)	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones
FGFR4(G388)					
LIF	8,34	29,82	Transferrin receptor 1	16,73	3,35
Amphiregulin	7,54	28,34	LIF	6,98	24,95
Transferrin receptor 1	7,18	1,44	Amphiregulin	6,94	26,06
RARA	5,93	2,42	Her2	6,10	2,98
c-Vav	5,61	1,12	c-Vav	5,39	1,08
Tensin	5,32	1,07	p38delta/SAPK	5,38	1,74
Dyrk4	5,30	1,06	RARA	4,47	1,82
FGFR4	4,75	0,95	Dyrk4	4,45	0,89
p38delta/SAPK	3,96	1,29	Tensin	3,79	0,76
PB-29	3,82	1,41	TrkE	3,76	11,37
Bim	3,49	0,82	FGFR4	3,68	0,74
c-jun	3,43	0,69	MAP3K5	3,61	0,72
Her2	3,33	1,63	LKB1/STK11	3,47	0,72
Hyl	3,09	0,62	Nck	3,44	0,89
Syndecan4	2,70	1,67	CAK/STK1	3,37	3,65
Jak-1	2,67	2,56	PB-29	3,19	1,18
MAP3K5	2,55	0,51	PKA-RI beta	3,08	0,86
IE72	2,47	0,64	Hyl	3,06	0,61
Syk	2,44	1,15	Bim	2,86	0,67
FGF-R1 L	2,43	0,49	Ste-20likeproteinkinase3	2,78	3,54
PB-32	2,42	1,56	NRK2/STK2	2,70	0,87
FAK R	2,35	8,51	SPHK1	2,68	0,61
Fak	2,32	9,88	c-jun	2,65	0,53
CAK/STK1	2,31	2,51	TIMP1	2,56	9,18
Rip-likekinase	2,26	0,45	PHKalphaM	2,55	0,51
MTR1	2,23	0,53	FAST	2,54	2,41
G3BP2	2,23	2,37	IL-4Stat	2,51	0,50
MTR2	2,22	1,28	PKC eta	2,50	1,43
TrkE	2,21	6,71	ADAM22	2,50	0,50
Shc	2,20	2,27	FGF-R1 L	2,45	0,49
SPHK1	2,19	0,50	LIMK-1	2,45	0,49
p130-Cas	2,19	1,36	TRAIL	2,40	0,48
S6K all/ ISPK-1	2,18	1,19	BclXL	2,36	0,92
PP2C-beta	2,15	0,43	Rac beta	2,35	0,73
MKP1likePTP	2,10	0,45	Syndecan4	2,32	1,43
Caspase3	2,09	0,68	MAPKK3/MEK3	2,32	2,31
MEK5	2,08	0,43	CSNK1G3	2,31	0,85
BclXL	2,04	0,79	FAK R	2,29	8,29
IL-4Stat	2,02	0,40	S6K all/ ISPK-1	2,29	1,25

Tab.4: Übersicht über die induzierte Genexpression durch FGFR4-Überexpression in MCF7 Zellen.

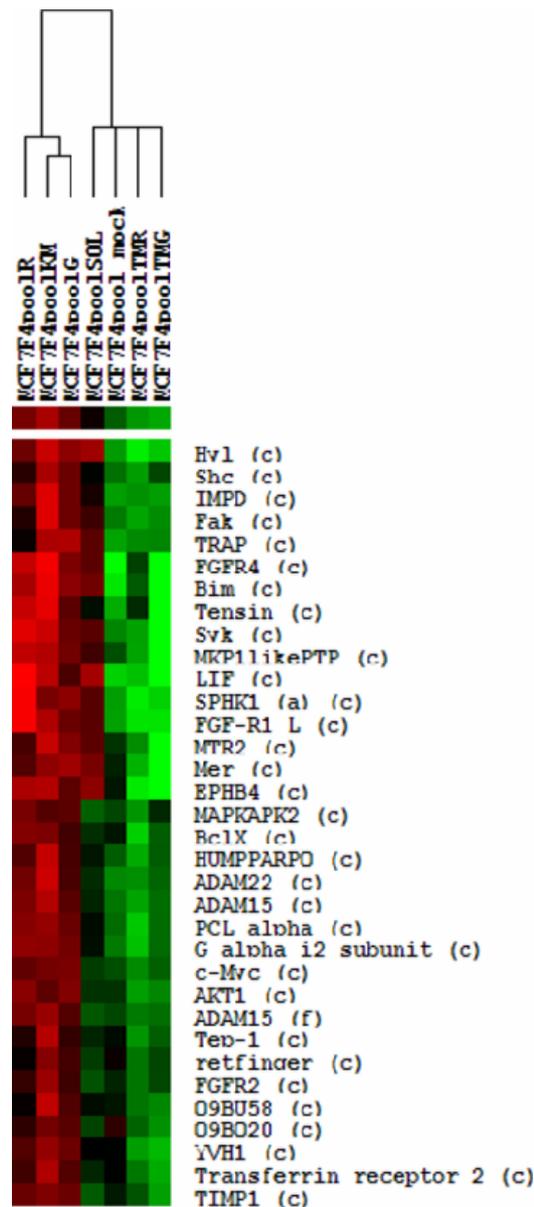


Abb. 16: Cluster von FGFR4 in polyklonalen MCF7 Zelllinien.

Mit besonderem Interesse wurde die Co-Expression mit dem anti-apoptotischen Protein BclX_L registriert, da in Kapitel III.4 noch ausführlicher auf Untersuchungen zum Einfluss des FGFR4 in der Apoptoseresistenz bzw. im Falle des induzierten Zelltodes eingegangen wird.

Die Expression der FGFR4-Allele FGFR4(G388) und FGFR4(R388) war in beiden Fällen gleichbedeutend mit nahezu einer Verdoppelung der BclX_L-Expression, was in Abb. 17 nochmals dargestellt wurde (vgl. Tab. 4). Im Vergleich der zwei FGFR4-Allele konnte zwar eine leicht erhöhte BclX_L-Expression im Arginin-Allel im Vergleich zum Glycin-Allel festgestellt werden, wobei berücksichtigt werden muss, dass die FGFR4(R388)-Expression entsprechend der

Immunoblot-Analysen etwas stärker ausfällt als im Vergleich dazu die Expression von FGFR4(G388).

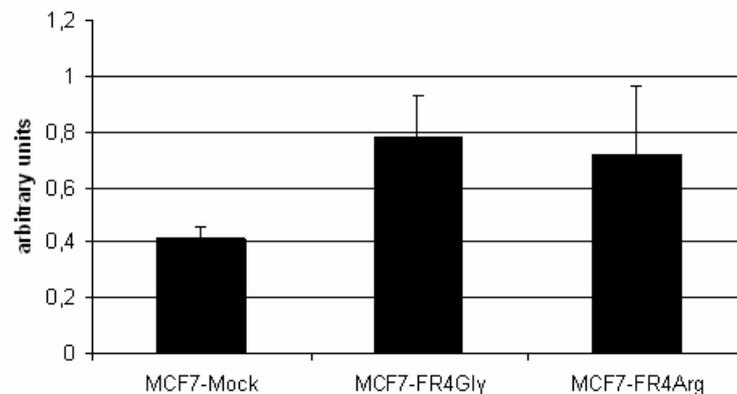


Abb. 17: cDNA-Makro-Array-Quantifizierung der BclX_L-Expression in MCF7 Zellen.

III.2.4 cDNA-Makro-Array Analyse von MDA-MB-231 Zellen

Ähnlich den cDNA-Makro-Arrays von polyklonalen FGFR4-MCF7-Zellen sollten auch die unterschiedlichen Expressionsmuster von polyklonalen MDA-MB-231 Zellen mit verschiedenen, exprimierten FGFR4-Isoformen untersucht werden. Die Array Analysen wurden allerdings dadurch erschwert, dass kein signifikantes FGFR4-Cluster mit anderen Genen und ausreichend hohem Pearson-Koeffizienten erstellt werden konnte. Dennoch wurden auch hier die Gene, welche mindestens eine Verdoppelung der Expressionsstärke im Vergleich zur Mock-Kontrolle aufwiesen, tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5 und 6). Die überexprimierten FGFR4-Isoformen konnten, wie zuvor im Immunoblot (Abb. 14) gezeigt, in allen Fällen auch in den cDNA-Makro-Arrays nachgewiesen werden, wodurch eine interne Positivkontrolle der Experimente vorlag. Besonders bedeutungsvoll im Vergleich zu früheren Array-Experimenten mit MDA-MB-231 FGFR4(G388 und R)-Klonen (Korrespondenz mit Knyazev P; Stadler et al., 2005) war die beobachtete Induktion der Genexpression von MMP9 in polyklonalen FGFR4(R388)-Zellen. Von einer derartigen Beeinflussung von Matrix-Metalloproteinasen (speziell auch MMP1) wurde bereits früher berichtet.

	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones
FGFR4(G388)			FGFR4(R388)			FGFR4(K503M)		
FGFR4	10,20	2,65	FGFR4	5,71	1,48	IL1 beta	6,96	5,78
ILKAP	5,41	1,59	PIR1	5,65	1,19	FGFR4	6,66	1,73
ALS2CR2	5,38	6,35	MTR1	4,72	0,94	epiregulin	4,49	0,90
TRPM-2	4,67	2,93	PP2C-alpha	4,55	2,55	PP2C-alpha Transferrin receptor 1	4,19	2,34
MTR2	4,26	3,80	PTPCAAX1	4,05	6,11		3,89	0,78
PP5	3,79	0,76	MTR2	3,96	3,54	PP5	3,67	0,73
PP2A-Rb65	3,71	2,63	PP1-C gamma	3,81	26,62	NRK2/STK2	3,31	1,23
PP2C-alpha	3,65	2,04	PP1-C beta	3,79	10,53	TRPM-2	3,22	2,02
PU1	3,47	4,05	PP5	3,61	0,72	PTP Alpha	2,85	1,20
PTPCAAX1	3,32	5,01	MTR6	3,56	1,34	Prl-1	2,84	5,16
SGK_214	2,94	0,61	PTP Pest	3,44	0,69	CD24	2,83	0,57
MKP-5	2,93	2,29	PP2B-R	3,40	0,74	MTR2	2,77	2,47
Prl-1	2,90	5,26	PP2A-C alpha	3,33	17,65	PTEN	2,64	0,98
PTEN	2,85	1,06	Her2	3,21	1,62	MAP3K5	2,62	0,73
SPAK	2,77	0,64	Prl-1	3,18	5,76	S6K/RSK3 gene	2,61	0,52
Ack	2,74	0,75	PPM1D	3,12	0,77	PTPCAAX1	2,60	3,92
KAP-1	2,69	9,38	PP2B-Cbeta	3,07	4,57	PTP Pest	2,58	0,52
PP2B-Cbeta	2,58	3,84	YVH1	3,01	4,93	NOXA	2,57	5,97
PTP Alpha	2,54	1,07	Lyk	2,95	4,20	cyclinK	2,47	0,49
CASK	2,49	3,98	CDC25B	2,81	0,84	Her2	2,44	1,23
Bub1	2,48	5,49	PTEN	2,78	1,03	CDC25B	2,44	0,73
TIP30	2,48	8,09	KAP-1	2,68	9,36	MAP4K4	2,39	3,32
PP2A-C alpha	2,46	13,06	NRK2/STK2	2,59	0,97	MMP9	2,31	0,46
PIR1	2,40	0,51	Cadherin 12	2,55	0,51	MTR6	2,26	0,85
PKX1	2,36	0,67	MMP9	2,41	0,48	MCE1	2,24	0,45
PTP Pest	2,33	0,47	FCP1	2,38	0,48	Syndecan4 NEK3/NIMA- related kinase 3	2,22	0,91
PP1-C alpha	2,31	9,85	MASK	2,35	0,64		2,17	0,48
AZP-IS	2,28	5,37	PP2A-Rb65	2,31	1,64	MPSK-1/PKL 12	2,15	0,43
S6K all/ ISPK-1	2,12	2,48						
Maspin	2,04	7,83						

Tab. 5: Übersicht über die induzierte Genexpression durch Überexpression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in MDA-MB-231 Zellen.

	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones
FGFR4sol			FR4exTMGly			FR4exTMArg		
FGFR4	7,35	1,91	FGFR4	6,16	1,60	FGFR4	8,63	2,24
TRAIL	5,95	1,19	PP2C-alpha	3,41	1,91	Yes	4,00	0,80
Her2	4,32	2,18	PTEN	3,29	1,22	MTR2	3,73	3,33
Yes	3,77	0,75	MTR2	3,19	2,85	LIF	3,48	3,62
Hyl	3,67	2,44	MTR1	2,73	0,55	PP2C-alpha	3,47	1,94
NRK2/STK2	3,64	1,35	Yes	2,67	0,53	PTEN	3,31	1,23
Amphiregulin	3,62	3,66	Transferrin receptor 2	2,63	5,28	MCE1	3,30	0,66
Nck (a)	3,55	0,71	MCE1	2,53	0,51	Transferrin receptor 1	3,14	0,63
PTEN (a)	3,50	1,30	Amphiregulin	2,50	2,53	Hyl	3,09	2,05
MCE1 (a)	2,97	0,59	Cadherin 12	2,43	0,49	Amphiregulin	3,03	3,05
PP2A-Rb65	2,73	1,93	Hyl	2,39	1,59	TRAIL	2,90	0,58
Abl L (a)	2,71	63,73	B-Raf	2,27	0,63	PP2A-Rb65	2,81	1,99
MST-2	2,62	1,14	Prl-1	2,24	4,05	PTP Pest	2,77	0,55
CAMK beta	2,62	0,52	PTPCAAX1	2,23	3,36	PTPCAAX1	2,72	4,11
HSU13261	2,61	8,69	HUMTEFSII	2,22	1,76	PIR1	2,69	0,57
CASK	2,56	4,09	PP2A-C alpha	2,17	11,53	TBK1	2,60	1,61
COX IV	2,45	11,87	PIM-2h	2,17	2,17	MTR6	2,51	0,94
PB-31	2,36	0,61	PP2A-Rb65	2,14	1,52	AZP-IS	2,48	5,85
PP2C-alpha	2,34	1,31	MTR6	2,11	0,79	Prl-1	2,47	4,48
MTR2	2,32	2,07	AZP-IS	2,10	4,95	Her2	2,40	1,21
ARK1	2,25	8,65	LIF	2,08	2,17	NAK	2,37	0,87
TIMP1	2,24	14,81	ALS2CR2	2,07	2,44	MTR1	2,34	0,47
LIF	2,23	2,31	Dynamin	2,07	1,81	MKP-5	2,33	1,83
Transferrin receptor 1	2,20	0,44	PHK-g	2,06	0,95	KAP-1	2,33	8,14
PTPCAAX1	2,20	3,31	FCP1	2,05	0,41	PP1-C beta	2,32	6,44
Transferrin receptor 2	2,18	4,38	PP2B-Cbeta	2,02	3,01	PP1-C gamma	2,30	16,04
ALS2CR2	2,18	2,57	PP5	2,00	0,40	Transferrin receptor 2	2,20	4,42
Prl-1	2,16	3,92				S6K all/ ISPK-1	2,11	2,47

Tab. 6: Übersicht über die induzierte Genexpression durch Überexpression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in MDA-MB-231 Zellen.

Die Analyse der reprimierten Genexpressionen speziell für die cytoplasmatisch-deletierten und somit funktionell inaktiven FGFR4-Isoformen zeigte im Gegensatz dazu eine Reduktion der Genexpression von MMP1 und MMP13, so dass hier ein Zusammenhang mit der Rezeptoraktivität bestehen kann. Desweiteren wurde eine reduzierte EDG2-Expression in FGFR4_{sol} und FGFR4_{ex}TM(R388)-Zellen nachgewiesen, was unter Berücksichtigung früherer Untersuchungen von Stadler et al. (2005) diskutiert werden kann. Außerdem wurde in allen drei polyklonalen Zelllinien mit cytoplasmatisch-deletierten FGFR4-Isoformen eine unterschiedlich ausgeprägte Reduktion der BclX_L-Expression beobachtet (Tab. 7), was inhaltlich zu den Expressionsmustern der FGFR4-MCF7-Zellen passt.

	Median fold under cut off reduced	Median normalized volume of reference		Median fold under cut off reduced	Median normalized volume of reference		Median fold under cut off reduced	Median normalized volume of reference
FGFR4sol			FR4exTMGly			FR4exTMArg		
CCK4 L	6,97	1,85	CCK4	9,24	1,85	TrkC	4,55	0,93
EPHA2L	4,52	3,16	InbA (Inhibin)	4,57	0,91	UL44	4,44	0,89
ADAM15	4,32	1,50	TIMP3	4,45	9,41	TGFR2	4,22	1,41
TGFR2	4,11	1,41	TGFR2	3,72	1,41	CCK4 L	3,59	1,85
G alpha i2 subunit	4,06	5,15	bNGF	3,14	0,63	MMP13	3,58	1,26
UL44	4,04	0,89	EPHA2L	3,08	3,16	Desmocollin 2	3,44	1,64
Desmocollin 2	3,82	1,64	PRKAcgamma	2,94	0,59	MAPKAPK2	3,08	0,83
BclXL	3,81	2,30	MMP1	2,89	36,21	MMP13	2,76	0,55
MCAM	3,71	0,78	Caspase9	2,86	0,89	SRPK1	2,58	2,72
MAPKAPK2	3,67	0,83	DNA-PKcs	2,80	1,69	CLK3 M	2,55	0,54
MMP13	3,58	1,26	PB-3020	2,77	0,55	bNGF	2,52	0,63
TrkC	3,48	0,93	MMP13	2,27	1,26	Caspase9	2,47	0,89
ADAM17	3,45	0,69	SRPK1	2,72	2,72	EPHA2L	2,34	3,16
MAPKK2	3,22	2,08	BclXL	2,71	2,30	S6K-2	2,33	0,47
bNGF	3,14	0,63	Endothelin1	2,48	1,88	DRAK1	2,33	2,92
IGF1R	2,89	0,58	PB-2	2,46	1,85	Contactin 2	2,32	0,64
Endothelin1	2,80	1,88	PB-3017	2,45	0,49	SGK	2,24	0,45
MMP13	2,76	0,55	CLK1	2,37	1,23	FRAP2	2,22	0,44
MMP1	2,71	40,03	p38 MAPK	2,37	5,97	PRKAc	2,15	0,59
TIMP3	2,70	9,41	S6K-2	2,33	0,47	PKNb	2,15	0,43
EF-2	2,61	1,86	MAPKAPK2	2,32	0,83	TIMP3	2,11	9,41
PEK	2,59	0,81	AKT1	2,26	1,15	AKT1	2,06	1,15
FGF-R1	2,52	1,70	CKI-gamma	2,26	0,56	YSK1	2,04	0,78
GPI/90K Ligand	2,52	9,84	FRAP2	2,22	0,44	BCR	2,04	0,64
IPTK1	2,51	2,31	p38	2,19	5,55	MCAM	2,01	0,78
InbA (Inhibin)	2,51	0,91	PKN H4/ PRK1	2,17	4,99	PYST2	2,00	0,40
AKT1	2,50	1,15	DRAK1	2,15	2,92	Shb	1,98	0,43
Prohibitin	2,46	1,67	FGF-R1	2,13	1,70	GRK4 beta	1,96	0,39
Caspase9	2,43	0,89	PKN beta	2,12	0,64	HER-3	1,95	0,42
EPHB4	2,39	0,53	Casein kinase 1	2,11	0,60	WNK1	1,94	0,40
Meg2	2,34	0,76	HER-3	2,09	0,42	IGF1R	1,93	0,58
PKN beta	2,32	0,64	CB2	2,08	0,42	PB-34	1,90	0,79
p38	2,26	5,55	IRE1	2,04	0,45	DNA-PKcs	1,87	1,69
RNP-K	2,24	16,75	Contactin 2	2,01	0,64	Bad	1,82	0,36
CK8	2,24	2,76	WNK1	2,00	0,40	DAPK	1,82	0,36
GSK-3 alpha	2,22	0,63				PKN beta	1,82	0,64
Fyn	2,14	5,83				BKDK M	1,81	0,52
Myt1	2,14	0,83				PB-3020	1,78	0,55
Contactin 2	2,11	0,64				PDK2	1,78	0,36
AXL/UFO	2,10	20,72				CaMK	1,77	0,35
PDGF-Rb	2,09	0,42				PI3-Kinase	1,77	0,35
HER-3	2,09	0,42				Dyrk2	1,74	0,35
Gas6	2,09	2,39				IR-S1	1,74	0,45
TCP20	2,08	11,32				BclXL	1,63	2,30
EDG2	2,07	2,55				EDG2	1,58	2,55

Tab. 7: Übersicht über die Unterdrückung der Genexpression bedingt durch eine Überexpression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in MDA-MB-231 Zellen.

III.2.5 cDNA-Makro-Array Analyse von MDA-MB-435S Zellen

In einem letzten Array-Experiment sollten die verschiedenen polyklonalen, FGFR4-Isoform-exprimierenden MDA-MB-435S Zellen analysiert werden. Ebenso wie bereits für die MDA-MB-231 Zellen erklärt, konnte auch hier im Vergleich mit FGFR4-MCF7-Zellen kein FGFR4-Cluster bei einer ausreichend hohen Pearson-Korrelation gefunden werden. Die Auswertung reduzierte sich erneut allein auf eine tabellarische Zusammenstellung aller Gene. Deren Expression sollte auch mindestens um den Faktor 2 oder mehr im Vergleich zur Mock-Kontrolle erhöht worden sein. Die verschiedenen FGFR4-Isoformen konnten auch hier als interne Kontrolle hoch exprimiert nachgewiesen werden, wobei FGFR4_{ex}TM(G388) eine Ausnahme bildete, da hier die detektierte FGFR4-Expressionsstärke unter der gewählten Grenze einer Expressionsinduktion von Faktor 2 lag. Für die vollständigen FGFR4(G388)- bzw. FGFR4(R388)-Isoformen, sowie kinase-inaktivem FGFR4(K503M) konnte z.B. eine Erhöhung von MCAM beobachtet werden. Außerdem zeigten die einzelnen FGFR4-Zelllinien mit verschiedenen, exprimierten FGFR4-Konstrukten durchwegs eine Erhöhung von MMPs, obwohl kein besonderes Muster zu erkennen war. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass in den FGFR4(R388)-exprimierenden Zellen eine Erhöhung der BclX_L-Expression zu beobachten war, während die restlichen Polyklonalen kaum eine Änderung dessen Expression zeigten (Tab. 8 und 9). Auf eine Darstellung der reprimierten Gene durch cytoplasmatisch-deletierte FGFR4-Isoformen wurde an dieser Stelle verzichtet, da die Daten in toto nicht signifikant waren. Es sollte trotzdem darauf hingewiesen werden, dass die BclX_L-Expression in den FGFR4_{ex}TM(G388)-Zellen um den Faktor 2 reduziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Array-Experimente mit den polyklonalen FGFR4-Isoformen, exprimiert in drei verschiedenen Zelllinien MCF7, MDA-MB-231 und MDA-MB-435S, liessen einen Zusammenhang zwischen der FGFR4-Expression und der BclX_L-Expression vermuten. Zusätzlich schien die Expression von Matrix-Metalloproteinasen von der Expression eines funktionellen, aktiven FGFR4 abzuhängen. Insbesondere die Beeinflussung von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen und die Abhängigkeit deren Expressionsstärke von der FGFR4-Expression konnte in den vorliegenden cDNA-Makro-Array Experimenten nicht beobachtet werden.

	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones
FGFR4(G388)			FGFR4(R388)			FGFR4(K503M)		
FGFR4	9,82	1,96	FGFR4	10,80	2,16	FGFR4	9,06	1,81
PB-31	9,79	3,19	MCAM	10,26	2,05	PTP2A-Rb55	6,84	1,52
IL3	5,48	2,21	MMP13	8,13	1,81	Mekk3	6,51	1,58
p53AIP	5,46	1,09	Desmocollin 2	6,61	1,87	MMP3	4,89	0,98
ZIP	5,15	1,03	SGK	5,76	1,15	GRK5	4,63	1,10
MCAM	4,57	0,91	PLC gamma	5,37	1,07	MMP1	4,50	2,83
cadherin6	3,90	0,78	FRAP2	4,59	0,92	PLC gamma	4,30	0,88
TrkE	3,79	3,03	ALK5	4,44	1,16	IL-4Stat	4,03	0,81
SGK3	3,72	0,74	GRK5	4,33	1,03	NRK2/STK2	4,02	0,82
IL1 Ra	3,56	0,71	PB-33	4,19	0,84	MCAM	3,76	0,75
Desmoglein 3	3,54	0,71	Mekk3	4,18	1,01	PB-33	3,41	0,68
Nck	3,52	0,70	S6K/RSK3 gene	4,05	0,83	PB-31	3,39	1,11
GRK5	3,51	0,83	UL44	4,03	2,01	FRAP2	3,32	0,66
PLM110	3,24	2,86	MAPK3	4,01	0,80	CDC25B	3,29	0,85
PB-3029b	3,20	0,65	GSK-3 alpha	3,98	0,80	MMP13	3,17	0,71
UL83-92	3,15	1,32	IL-4Stat	3,94	0,79	IKK2	3,10	1,06
PSK	3,15	49,04	WNK1	3,79	0,76	WEE1	3,10	1,02
ADAM15	3,04	2,49	MMP2	3,76	0,93	ALK5	3,07	0,80
Caspase 8	2,97	0,59	RICK/CARDIAK.	3,71	0,74	RICK/CARDIAK	2,94	0,59
FAST	2,90	11,49	PAK6	3,63	2,33	FSTK1	2,93	0,59
PLC gamma	2,90	0,58	S6K-2	3,62	0,72	SRPK1	2,91	0,58
Mekk3	2,88	0,70	UL54	3,39	0,94	PB-3020	2,90	0,97
ADAM30	2,88	1,81	AKT1	3,33	3,13	COX IV	2,85	23,80
NRK2/STK2	2,80	0,57	MMP1	3,17	1,99	PLC gamma	2,80	0,56
MNK	2,78	0,56	BclXL	3,10	0,62	TGFR2	2,79	0,56
WNK1	2,75	0,55	MKP1likePTP	2,89	0,99	MPSK-1/PKL 12	2,77	0,55
PTP2A-Rb55	2,66	0,59	PLC gamma2	2,89	0,59	UK23	2,73	1,36
ALK5	2,63	0,69	Meg2	2,86	1,19	PPM1D	2,70	0,54
Her2	2,61	30,09	SIRP alpha1	2,85	2,95	Nck	2,68	0,54
PB-33	2,61	0,52	c-Myc	2,84	8,91	CHK1	2,61	0,52
NAK	2,56	1,34	NRK2/STK2	2,76	0,57	MT3MMP	2,58	0,65
PKA-C beta	2,54	0,86	MMP17	2,75	0,55	GSK-3 alpha	2,57	0,51
AKT3	2,53	1,27	ICAM3	2,66	0,81	Fak	2,53	9,08
MMP15	2,52	0,50	Contactin 2	2,64	0,61	Desmocollin 2	2,48	0,70
UK-18	2,50	0,50	ERK6	2,60	0,66	Meg2	2,47	1,03
IR-S1	2,47	21,05	IRE1	2,60	1,81	MKP1likePTP	2,30	0,78
IE2	2,19	164,12	WEE1	2,56	0,84	YSK1	2,29	1,47
UL44	2,11	1,05	TIMP2	2,51	8,96	Myt1	2,28	2,04
IRS-1	2,11	37,23	UK23	2,47	1,23	SIRP alpha1	2,21	2,29
COX IV	2,10	17,56	MLK-3/SPRK	2,38	1,43	PKC- μ /PKD	2,18	0,44
TIMP3	2,02	3,88	MT3MMP	2,34	0,59	FAK R	2,16	7,87
			BDP1	2,32	1,89	retfinger	2,15	7,13
			beta-Catenin	2,31	15,88	CSNK2A1	2,12	11,99
			PTPmu	2,31	3,67			
			Fak	2,27	8,15			

Tab. 8: Übersicht über die induzierte Genexpression durch Überexpression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in MDA-MB-435S Zellen.

	Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones		Median fold over cut off induced	Median normalized volume of clones
FGFR4sol			FR4exTMGly			FR4exTMArg		
MMP13	4,15	0,93	PB-31	6,34	2,07	PB-31	9,01	2,94
RICK/CARDIAK	3,91	0,78	PSK	4,81	74,97	NRK2/STK2	5,02	1,03
MMP1	3,86	1,31	FAS	4,25	16,84	FGFR4	4,45	0,89
MMP14	3,48	1,31	TrkE	4,04	3,23	GRK5	3,63	0,86
PB-34	3,15	1,75	PB-3004	3,68	0,74	MPSK-1/PKL 12	3,54	0,71
h SCF	3,07	0,61	MMP1	3,52	2,21	TrkE	3,54	2,83
FGFR4	2,63	0,53	DSG	2,93	0,59	Nck	3,22	0,64
SGK382	2,59	0,52	PB-33	2,88	0,58	Her2	3,15	36,25
CHK1	2,49	0,50	Caspase 8	2,45	0,49	PSK	3,04	47,35
TFIIB	2,45	2,39	PDGF-Rb	2,43	0,49	Caspase 8	3,03	0,61
Contactin 2	2,43	0,56	Abl L	2,26	50,91	DR5	2,93	0,59
UL54	2,37	0,66	Her2	2,23	25,72	IKK2	2,78	0,95
PHKalphaM	2,36	1,06	MAPKKK6	2,12	1,14	FAST	2,68	10,61
MMP9	2,27	0,45	EGFR	2,08	0,42	Abl L	2,63	59,38
Desmocollin 2	2,26	0,64				MAPKKK6	2,61	1,41
VRK2	2,24	2,12				RICK/CARDIAK	2,53	0,51
PI3-Kinase	2,20	1,67				BCR	2,36	0,63
MT3MMP	2,10	0,53				COX IV	2,30	19,26
MMP3	2,08	0,42				FSTK1	2,30	0,46
PAK6	2,08	1,33				SGK	2,17	7,78
MTK1	2,06	1,26				UL54	2,15	0,59
Nmju-R1	2,04	1,51				HA2	2,09	1,25
CLK1	2,01	1,08				FRAP2	2,03	0,41
FBXL5	2,01	2,16				Bim	2,00	1,73

Tab. 9: Übersicht über die induzierte Genexpression durch Überexpression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in MDA-MB-435S Zellen.

III.3. Rolle des FGFR4 in Zellmigration und Krebszellinvasion

Der FGFR4 und insbesondere das Arginin-Allel des Rezeptors beeinflusst nachweislich die Migration von Krebszellen. In FGFR4(R388) überexprimierenden Zellen wird eine Migration der Zellen beobachtet, während Zellen, welche die Glycin-Allel-Isoform des Rezeptors exprimieren, in ihrem Migrationsverhalten supprimiert werden (Bange et al., 2002; Stadler et al., 2005). Auch die zahlreichen klinischen Studien, in denen eine schlechtere Prognose für rezidivfreie Überlebenszeit von Arginin-Allel tragenden Krebspatienten gezeigt wurde, passen funktionell und inhaltlich zu diesem Zusammenhang (Streit et al., 2004; Wang et al., 2004). Es wurde jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche Funktion der FGFR4 in der Zellmigration und Krebszellinvasion genau einnimmt, und wie der Unterschied im Migrations- bzw. Invasionsverhalten speziell zwischen dem Glycin-Allel und Arginin-Allel des Rezeptors zustande kommt.

III.3.1 Expression verschiedener FGFR4-Isoformen in stabilen Zelllinien

Um die Eigenschaften des FGFR4 in physiologischen Experimenten zur Zellmigration und Krebszellinvasion genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene Isoformen des FGFR4 kloniert (III.2). Neben den vollständigen cDNA-Isoformen des FGFR4(G388/R388) sollten ähnlich wie für die Array Experimente membranverankerter, cytoplasmatisch-deletierter FGFR4_{ex}TM(G388/R), kinase-inaktiver FGFR4(K503M) und die extrazelluläre, sezernierte Domäne des Rezeptors FGFR4_{sol} verwendet werden, um insbesondere den Einfluss der extrazellulären Domäne des FGFR4 auf die Zellmigration und Krebszellinvasion zu klären. Von den jeweiligen Konstrukten, polyklonal exprimiert in den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S, wurden speziell für die nachfolgenden Experimente Zellklone gepickt und erneut hochgezogen. Anschließend wurde zuerst die Expression der verschiedenen FGFR4-Isoformen nach Immunpräzipitationen in Immunoblots bestimmt, um sicherzustellen, dass beobachtete Effekte auch auf die Proteinexpression der jeweiligen FGFR4-Isoform zurückgeführt werden können (Abb. 18). Da die FGFR4-Expression in den polyklonalen

Zelllinien bereits gezeigt wurde, konnten auch hier auf einfache Art und Weise positive Klone identifiziert werden.

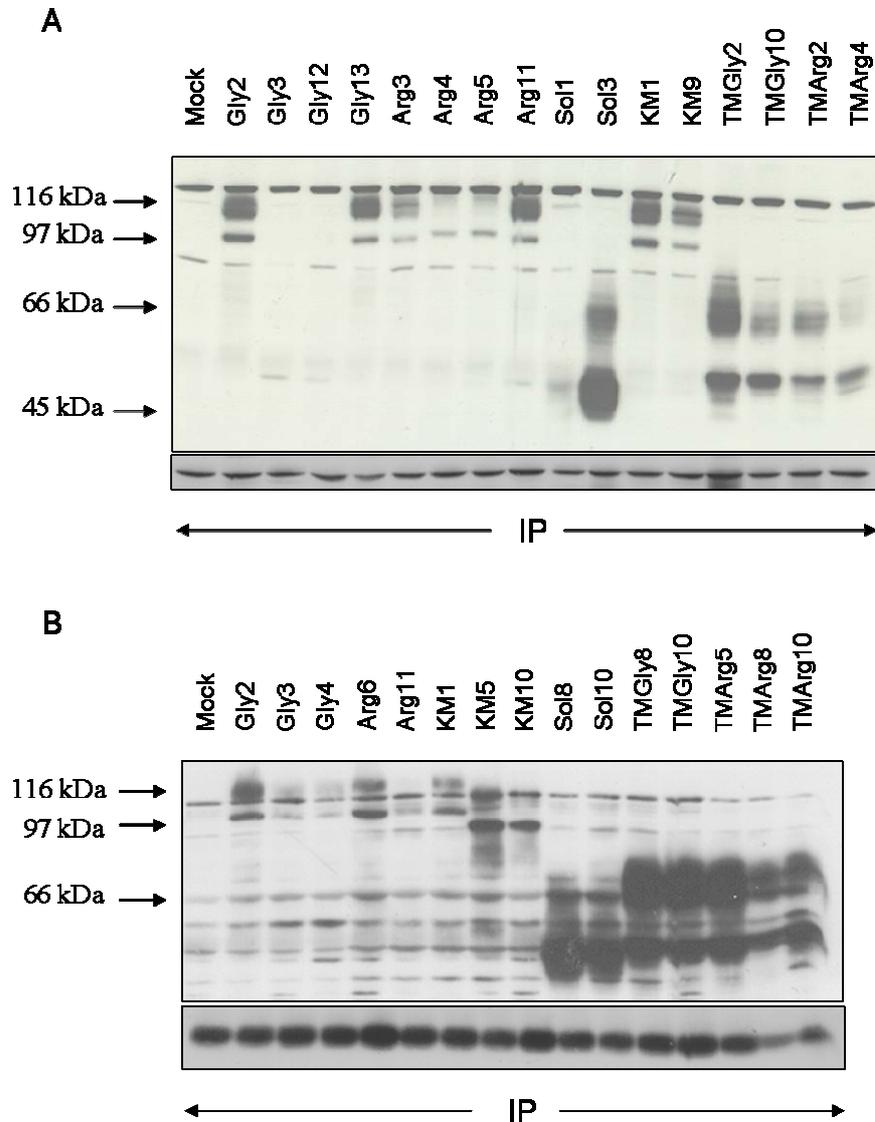


Abb. 18: Expression verschiedener FGFR4-Isoformen. A, Verschiedene FGFR4-Isoformen stabil exprimiert in den Klonen der Zelllinie MDA-MB-435S. Immunpräzipitation mit anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK) und Immunoblot gegen die extrazelluläre Domäne von FGFR4 (1171-AK). B, Unterschiedliche FGFR4-Isoformen stabil exprimiert in Klonen der Zelllinie MDA-MB-231. Immunpräzipitation und Immunoblot analog wie in A. In beiden Fällen erfolgte ein Kontrollblot mit einem anti-Tubulin-AK.

Für jede FGFR4-Isoform konnten mindestens zwei Zellklone isoliert werden, welche eine ausreichend hohe Überexpression des rekombinanten Rezeptorproteins für nachfolgende Versuche aufwiesen.

III.3.2 Untersuchungen des Migrationsverhaltens von stabilen Zelllinien

Zu Beginn sollte geklärt werden, ob die beobachteten Effekte der Zelllinie MDA-MB-231 bezüglich des Migrations- und Invasionsverhaltens auch auf andere Zellsysteme übertragen werden können (Stadler et al., 2005). Hierzu wurden Scratch-Assays mit jeweils zwei verschiedenen Klonen der Zelllinie MDA-MB-435S durchgeführt, in welchen nicht nur die gesamte cDNA von FGFR4(G388) oder FGFR4(R388), sondern auch die unterschiedlichen kinase-inaktiven Isoformen des FGFR4 (durch retrovirale Infektionen überexprimiert) miteinander verglichen wurden. In diesem Vorversuch zeigte sich, dass die mit dem Leervektor-infizierten Wildtyp-Zellen, wie von den MDA-MB-231 Zellen bereits bekannt, stark migrierten (Abb. 19 A). Auch die Zellen, welche das Arginin-Allel des FGFR4 exprimierten, zeigten eine stärkere Migration als Klone des Glycin-Allels (Abb. 19 B und C). Alle anderen Zellklone verschiedener kinase-inaktiver FGFR4-Isoformen wurden in ihrem Migrationsverhalten stark supprimiert (Abb. 19 D-F).

Dieses Ergebnis deckte sich mit den früheren Scratch-Assay-Untersuchungen von MDA-MB-231 Zellklonen. Deshalb lässt sich schlussfolgern, dass die beobachteten Effekte von verschiedenen überexprimierten FGFR4-Isoformen nicht auf den entsprechend unterschiedlichen, genetischen Zelllinienhintergrund zurückzuführen sind, sondern einzig und allein von der jeweiligen vorhandenen FGFR4-Isoform abhängen. Aus diesem Grund konnten beide Zelllinien und ihre Klone für weitere Experimente bezüglich der Zellmigration und Krebszellinvasion verwendet und verglichen werden.

Um die Unterschiede im Migrationsverhalten bei verschiedenen exprimierten FGFR4-Konstrukten besser herauszuarbeiten, wurden anstelle von Scratch-Assays sog. Transwell-Migrationsassays durchgeführt (II.11.2.2). Hier wurde exakt die Fähigkeit von Zellen untersucht, durch 8 µm große Poren (in den Transwells) hindurchzuwandern. Die Migration der Zellen wurde dabei durch einen chemischen Gradienten gegen 10 % FCS/Kulturmedium induziert. Die migrierten Zellen auf der Unterseite des Transwellfilters wurden durch Kristallviolett färbung und schließlich durch eine photometrische Messung im ELISA-Reader quantifiziert.

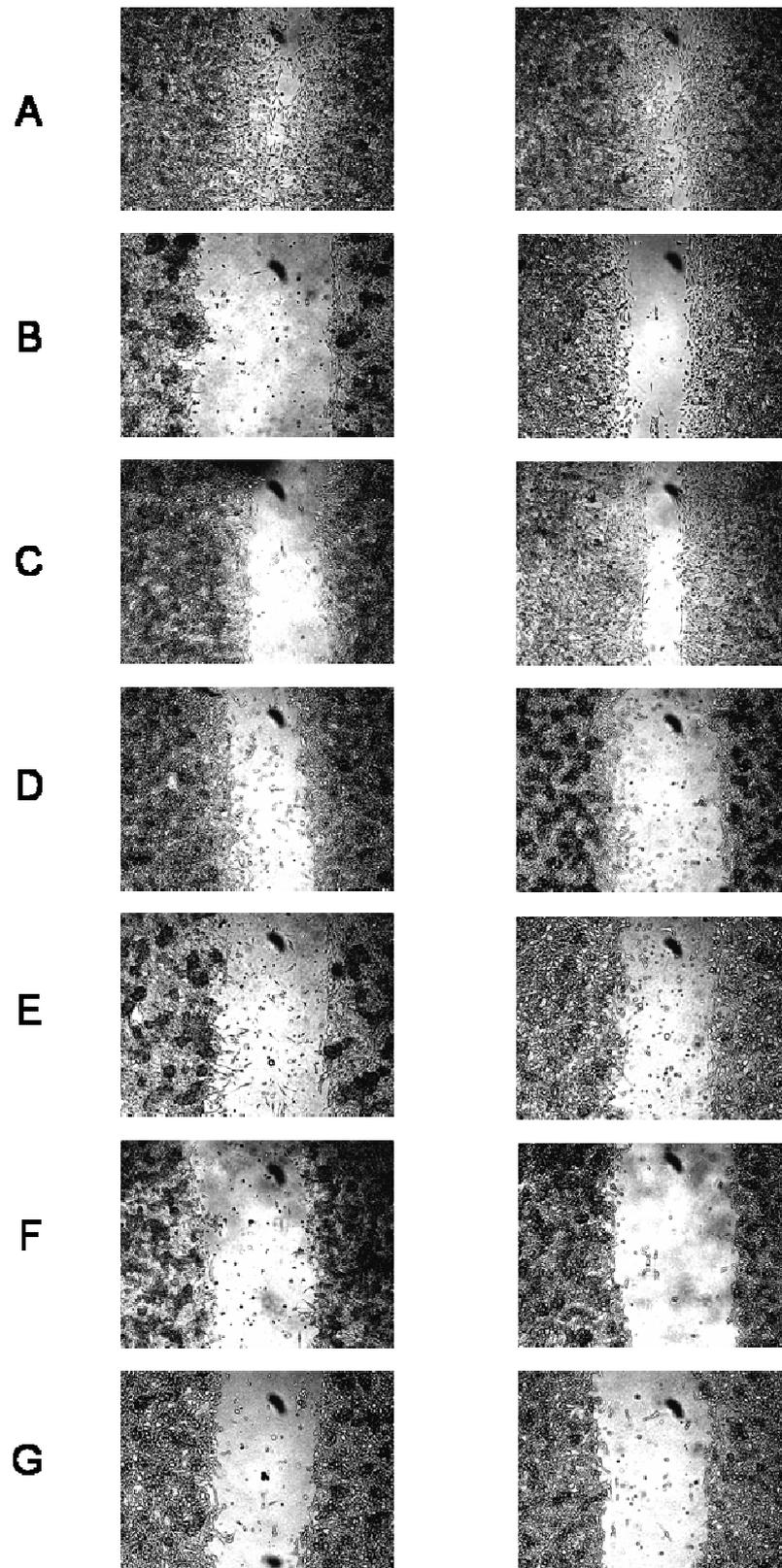


Abb. 19: Scratch-Assay von MDA-MB-435S Klonen. A, Gezeigt wird 2 x ein Scratch-Assay der Mock-Kontrolle. B, Klone 2/13 von FGFR4(G388). C, Klone 3/11 von FGFR4(R388). D, Klone 1/9 von FGFR4(K503M). E, Klone 1/3 von FGFR4_{sol}. F, Klone 2/10 von FGFR4_{ex}TM(G388). G, Klone 2/4 von FGFR4_{ex}TM(R388).

Abb. 20 soll exemplarisch für beide Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S einen Eindruck vermitteln, wieviele Zellen wirklich innerhalb einer Nacht durch einen derartigen Filter wandern konnten und welche unterschiedlichen Effekte zwischen den verschiedenen exprimierten FGFR4-Isoformen auftraten.

Für die eigentlichen Quantifizierungen wurde die Migrationsstärke (Kristallviolett-Absorption) der Mock-Kontrollen der beiden Zelllinien auf 100 % gesetzt. Aus diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass FGFR4(G388) die Migration der Zellen in beiden Zelllinien unterdrückte, während für FGFR4(R388) im Vergleich dazu eine höhere Migration von Zellen auftrat. Eine noch stärkere Suppression der Migration wurde in denjenigen Zellklonen beobachtet, in denen ein nicht-funktionell, inaktiver FGFR4 exprimiert wurde, d.h. FGFR4_{sol}, FGFR4_{ex}TM oder FGFR4(K503M). Dabei spielte es keine Rolle, welches Allel, Glycin oder Arginin, der FGFR4_{ex}TM-Isoform in den Zellen vorhanden war (Abb. 21). Deshalb wurde vermutet, dass nicht nur die extrazelluläre Domäne des FGFR4 eine wichtige Rolle in der Zellmigration und Krebszellinvasion spielen könnte, sondern vielmehr z.B. auch die Kinaseaktivität des Rezeptors entscheidend an der Steuerung und Vermittlung dieser physiologischen Effekte beteiligt sein kann.

In einem alternativen Ansatz wurde die grundlegende Funktion des FGFR4 in der Migration von Zellen nochmals untersucht. 769-P und TE671 Zellen per se migrieren einerseits stark, andererseits schwach und beide Zelllinien exprimieren endogen außerdem in vergleichbaren Mengen FGFR4.

Beide Zelllinien wurden mit einem stabilen FGFR4-Knockdown versehen (siRNA66 und 74) und im Migrationsverhalten mit den Kontrollen (Leervektor Mock bzw. siRNA70) in Transwell-Assays verglichen. [Die unterdrückte FGFR4-Expression wird an anderer Stelle (Abb. 35; III.4.3) nochmals gezeigt.] Dabei wurde deutlich, dass auch Zellen mit endogen exprimiertem homozygotem Glycin-Allel des FGFR4, wie im Falle von TE671 und 769-P (Rücksprache mit Knyazev P), nach Unterdrückung der FGFR4-Expression in der Migration gehemmt werden können (Abb. 22). Deshalb kann für den FGFR4 eine prinzipielle Rolle in der Zellmigration diskutiert werden, obwohl die Experimente mit Überexpressionssystemen von FGFR4 eine Suppression der Migration durch das Glycin-Allel des Rezeptors zeigten, und es sich im Falle der Knockdowns auch um zelllinienspezifische Effekte handeln kann.

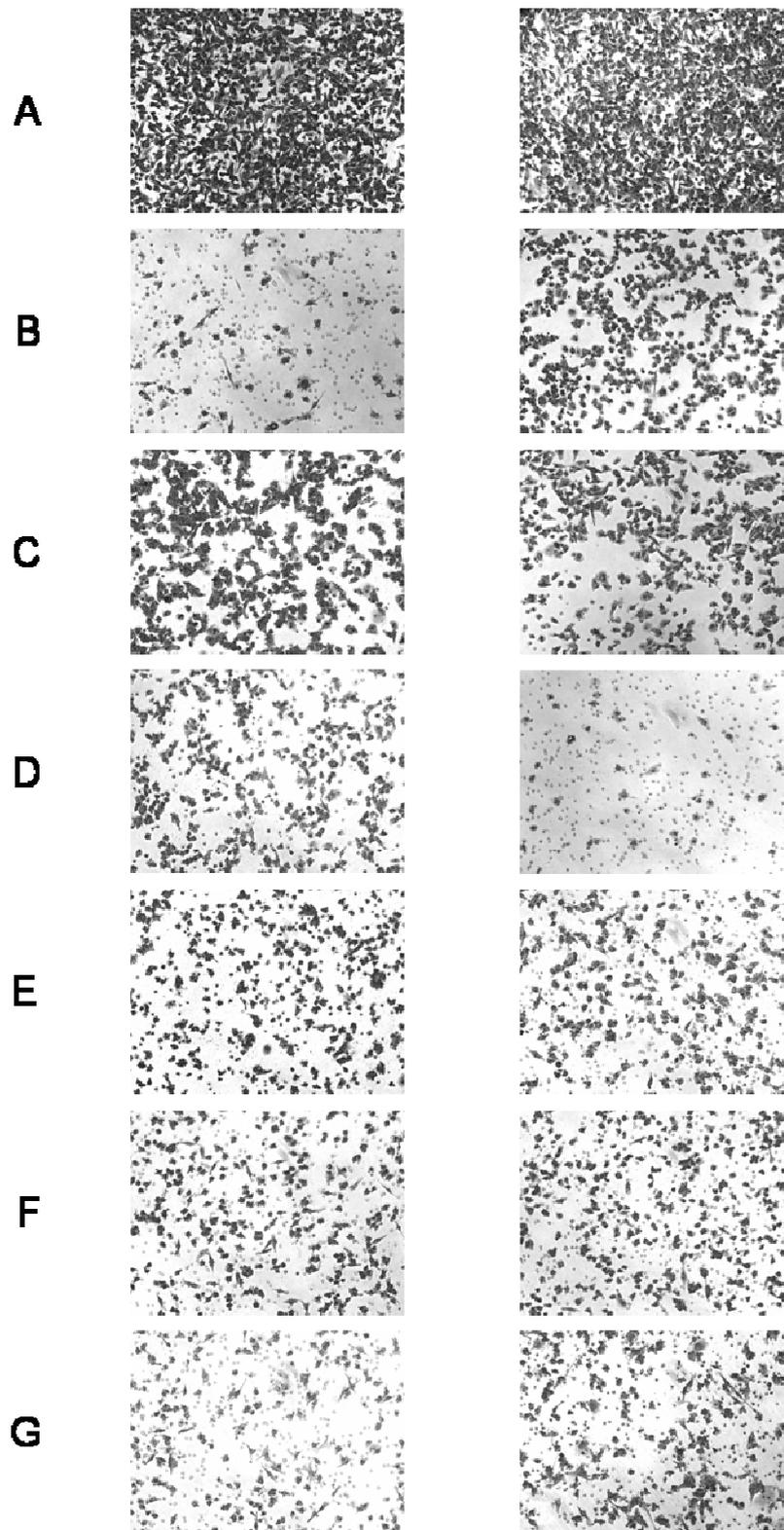


Abb. 20: Filteraufnahmen eines Transwell-Migrationsexperiments von MDA-MB-435S Klonen. A, Filter der Mock-Kontrolle. B, Klone 2/13 von FGFR4(G388). C, Klone 3/11 von FGFR4(R388). D, Klone 1/9 von FGFR4(K503M). E, Klone 1/3 von FGFR4_{sol}. F, Klone 2/10 von FGFR4_{ex}TM(G388). G, Klone 2/4 von FGFR4_{ex}TM(R388).

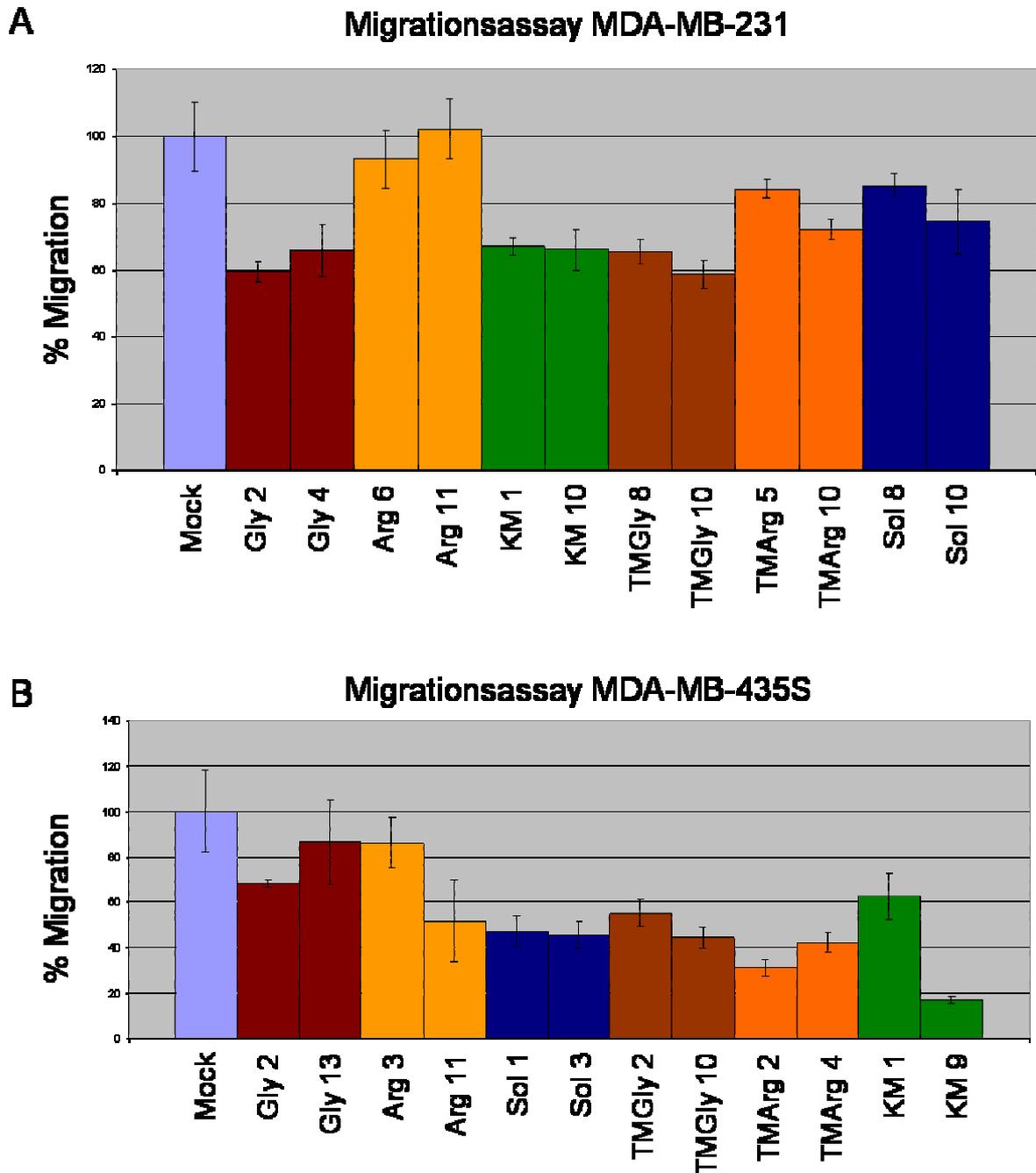


Abb. 21: Quantifizierung der Transwell-Migration der Klone zweier verschiedener Zelllinien. Die kompletten cDNA-Konstrukte (Gly/Arg) wurden links gruppiert, die Deletionskonstrukte (FGFR4_{sol} bzw. FGFR4_{exTM}) und die kinase-inaktiven Isoformen (K503M) wurden jeweils rechts daneben angefügt. A, Gezeigt wird eine Quantifizierung der Migrationsexperimente von MDA-MB-231 FGFR4-Zellklonen, wobei die Migrationsstärke der Mock-Kontrolle auf 100 % als Referenz festgelegt wurde. B, Quantifizierung der Migrationsexperimente von MDA-MB-435S FGFR4-Zellklonen (analog A).

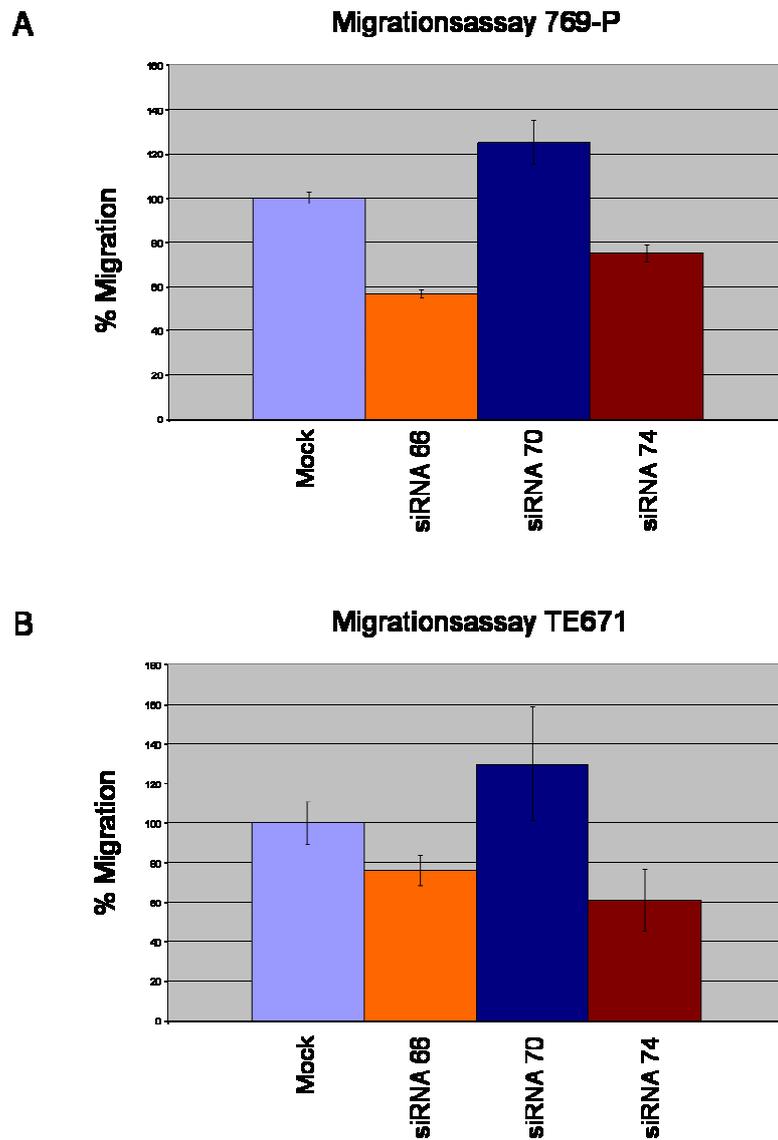


Abb. 22: Transwell-Migration von zwei FGFR4-Knockdown Zelllinien. A, Migration von 769-P Zellen. FGFR4-Knockdowns im Fall von exprimierter siRNA66 und siRNA74 gegeben; als Kontrolle dienten Leervektor (Mock) und siRNA70. B, Migration von TE 671 Zellen (analog A).

III.3.3 Untersuchungen zur Krebszellinvasion

Im Zusammenhang mit der Zellmigration wurden bereits Unterschiede zwischen dem Arginin- und Glycin-Allel des FGFR4, sowie den verschiedenen cytoplasmatisch-deletierten bzw. inaktiven Isoformen des Rezeptors nachgewiesen. In den nächsten Experimenten sollte geklärt werden, ob diese Effekte nicht nur für die Migration von Zellen, sondern auch für die Krebszellinvasion gelten, d.h. ob die physiologischen Effekte der FGFR4-Isoformen auf die Invasion übertragen werden können. Dafür wurden die FGFR4 Klone der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S analog zu den Transwell-Migrationsexperimenten in Transwell-Invasionsassays untersucht. Der einzige Unterschied zwischen beiden Assays liegt in der Verwendung von speziell beschichteten Filtern. Diese Transwells sind auf der Oberseite mit einer sog. Matrigelschicht versiegelt, so dass Zellen, wenn sie sich entlang eines chemischen Gradienten durch die Poren des Filters bewegen wollen, zuerst diese Art von extrazellulärer Matrix verdauen müssen, wodurch die Invasivität von Krebszellen charakterisiert werden kann. Die extrazelluläre Matrix besteht aus verschiedenen Molekülen wie z.B. Kollagenen, Lamininen, Fibronectin, Vitronectin, Elastin, Heparansulfat-Proteoglykanen oder Wachstumsfaktoren. Um die extrazelluläre Matrix abzubauen, ist die Aktivität verschiedener Proteasen von besonderer Bedeutung. Dazu zählen MMPs oder aktiviertes Plasmin(ogen) (Sternlicht and Werb, 2001).

Im Invasionsassay wurde die Quantifizierung der Krebszellen auf der Unterseite der Transwell-Invasionsfilter nach Kristallviolett-Färbung ebenfalls mit einer photometrischen Messung am ELISA-Reader vorgenommen. Ähnlich wie bei den Transwell-Migrationsassays konnte hier eine Unterdrückung der Invasivität für die Klone des exprimierten FGFR4(G388)-Konstrukts in beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S beobachtet werden, während das Arginin-Allel des Rezeptors eine vergleichbare Invasion der Zellen zur Mock-Kontrolle hervorrief. Alle cytoplasmatisch-deletierten Isoformen des Rezeptors oder kinase-inaktiver FGFR4 unterdrückten die Invasion der Krebszellen (Abb. 23), was analog bereits für die Zellmigration beobachtet wurde. Im Falle der Zelllinie MDA-MB-435S wurden repräsentativ für die FGFR4_{sol} Isoform des Rezeptors nur der Klon 3 und für die kinase-inaktive Isoform von FGFR4 nur der Klon 9 verwendet, da sonst die Experimente nicht mehrfach mit der vorhandenen Zahl von Transwell-Invasionsfiltern hätte durchgeführt werden können. In den Migrationsexperimenten zeigten beide Klone jedoch bereits den jeweils stärkeren suppressorischen Effekt von zwei funktionell identischen, vergleichbaren Klonen, und verdeutlichten auch im Zusammenhang mit den jeweiligen MDA-MB-231 Klonen deren Rolle in der Krebszellinvasion.

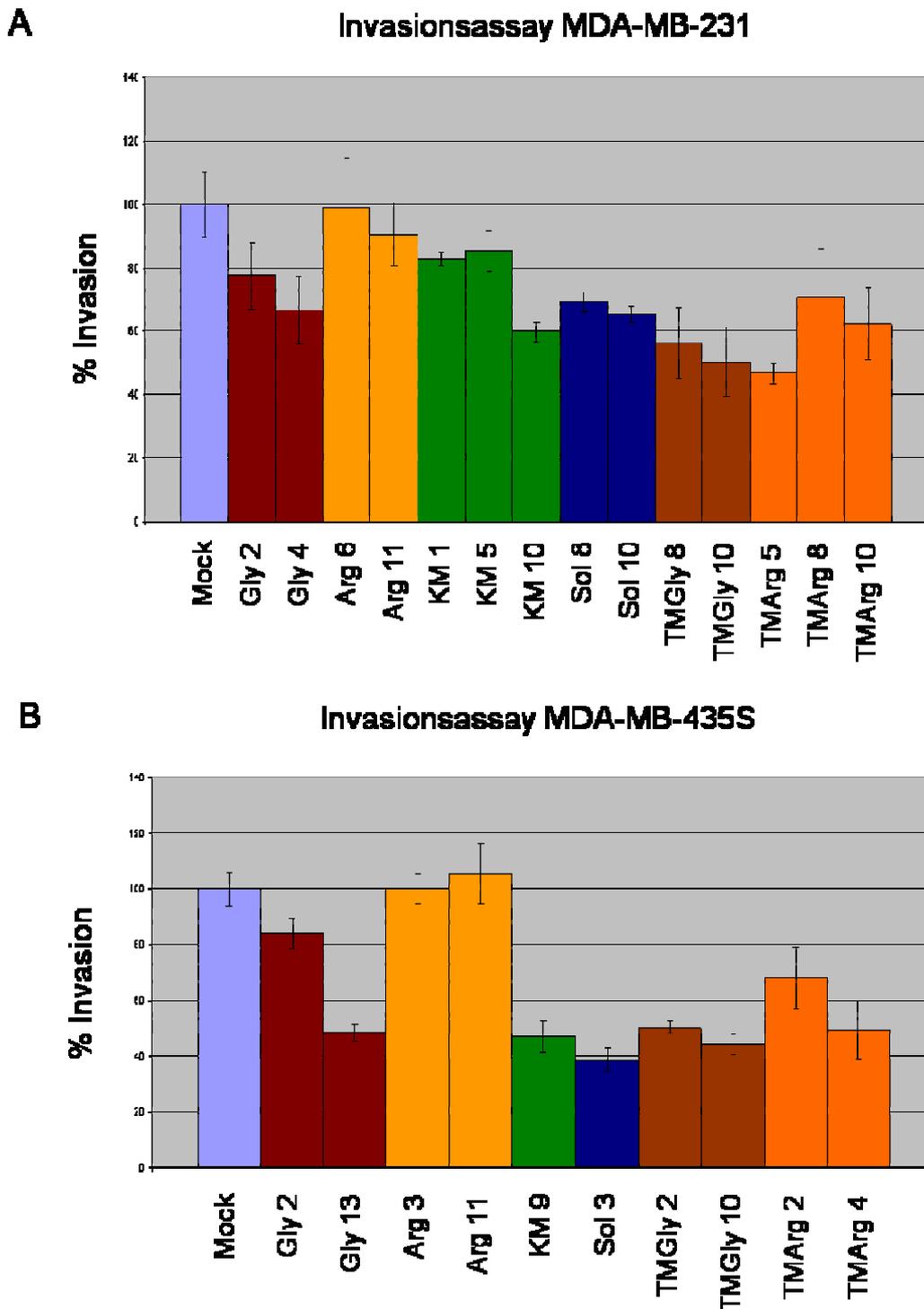


Abb. 23: Quantifizierung der Transwell-Invasion der Klone zweier verschiedener Zelllinien. Die kompletten cDNA-Konstrukte (Gly/Arg) wurden links gruppiert, die Deletionskonstrukte (FGFR4_{sol} bzw. FGFR4_{ex}TM) und die kinase-inaktiven Isoformen (K503M) wurden jeweils rechts daneben angefügt. A, Gezeigt wird eine Quantifizierung der Invasionsexperimente von MDA-MB-231 FGFR4-Zellklonen, wobei die Invasionsstärke der Mock-Kontrolle auf 100 % als Referenz festgelegt wurde. B, Quantifizierung der Invasionsexperimente von MDA-MB-435S FGFR4-Zellklonen (analog A).

III.3.4 Untersuchungen zur Funktion des FGFR4 in 3D-Matrices

Nachdem die verschiedenen Klone der MDA-MB-231 und MDA-MB-435S Zellen mit unterschiedlichen, überexprimierten FGFR4-Isoformen bereits in Migrations- und Invasionsassays getestet wurden, sollte abschließend untersucht werden, welchen Einfluss der FGFR4 in sog. Branching-Assays auf die Zellphysiologie hat. Die Besonderheit dieses Experiments liegt darin, dass dadurch *in vivo* Bedingungen für die Zellen simuliert werden können, welche ansonsten wirklich nur im Organismus selbst vorgefunden werden, wenn z.B. die Zellen subkutan unter die Haut von immunsupprimierten Mäusen gespritzt werden und deren Proliferation und Invasion verfolgt wird. Alternativ werden hier die Zellen in Matrigel über einen Zeitraum von 7 – 14 Tagen inkubiert und kultiviert (II.11.2.4). Matrigel, wie bereits ausgeführt, wird als ECM-Ersatz verwendet. Die Zellen werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, in dieser Matrix Zellausläufer – Filopodia – zu bilden, was ebenfalls auf ihre Invasivität schließen lässt.

In MDA-MB-231 Zellen zeigten die Mock-Kontrollzellen eine ebenso starke Filopodiabildung wie die Arginin-Klone (Abb. 24 A und C). Im Vergleich dazu trat bei den Zellen des exprimierten Glycin-Allels eine deutliche Reduktion der Ausläuferbildung auf (Abb. 24 B). Die Zellklone, welche cytoplasmatisch-deletierte oder kinase-inaktive Isoformen des FGFR4 exprimieren, wurden in ihrer Ausläuferbildung vollständig gehemmt (Abb. 24 D-G). Darüber hinaus vermittelten diese Zellen sogar den Eindruck durch die Einbettung in eine Matrigel-Matrix in ihrer Überlebensfähigkeit eingeschränkt worden zu sein. Die MDA-MB-435S Klone verhielten sich ähnlich den MDA-MB-231 Zellklonen. Während die Mock-Kontrolle und Zellen des Arginin-Allels eine starke Ausläuferbildung in der Matrigel-Matrix entwickelten, wurde die Filopodiabildung in Zellen des Glycin-Allels deutlich gehemmt (Abb. 25 A-C). Die Klone mit exprimierten Deletionsformen des FGFR4 oder kinase-inaktiver FGFR4-Isoform wiesen im Vergleich zur Mock-Kontrolle eine verminderte Filopodiabildung auf (Abb. 25 D-G), was schon für die MDA-MB-231 Klone beschrieben wurde. Allerdings trat der Effekt einer reduzierten Überlebensfähigkeit von MDA-MB-435S Klonen nicht so deutlich auf wie im Vergleich dazu in den MDA-MB-231 Klonen.

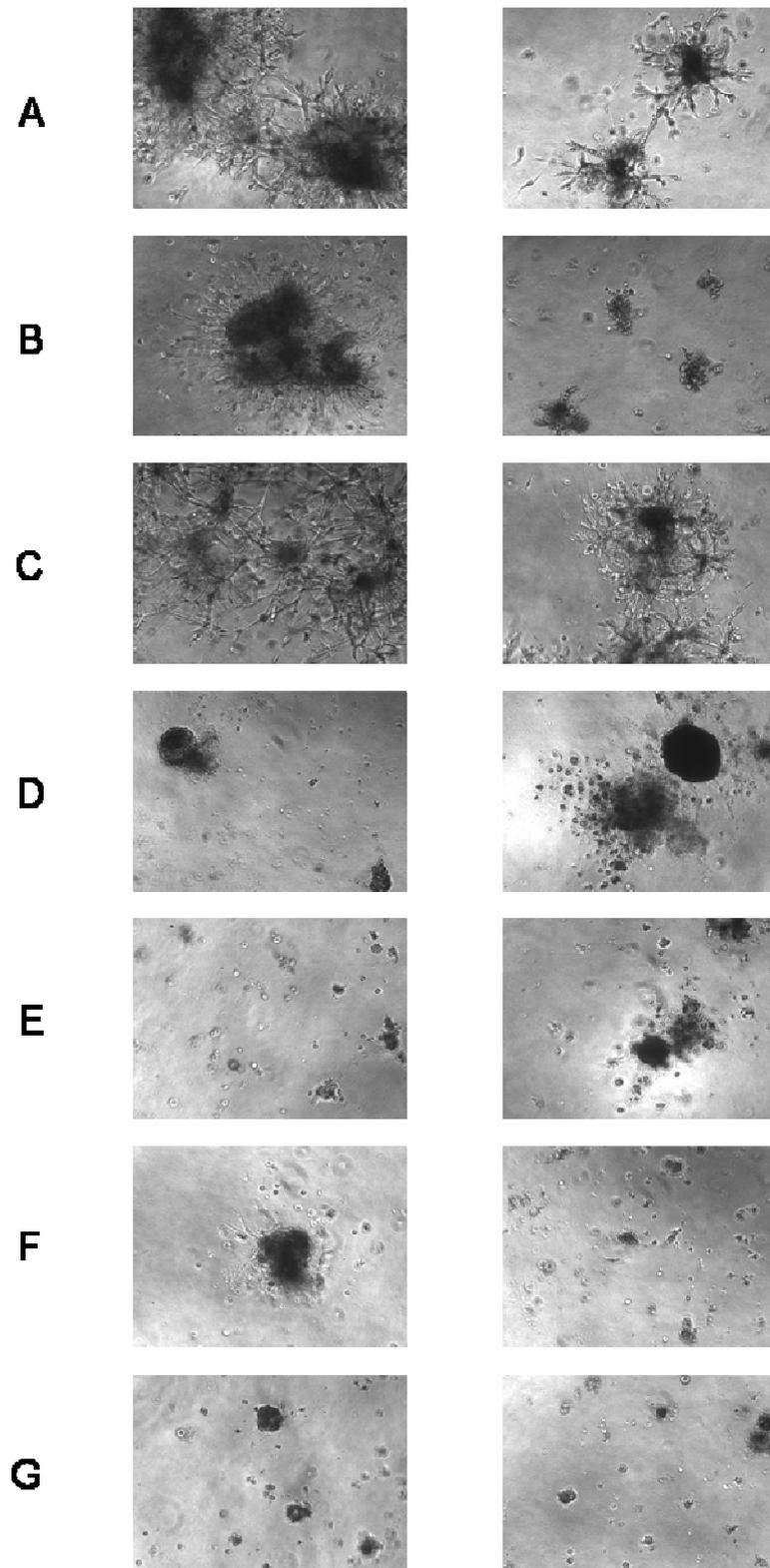


Abb. 24: Branching-Assay von MDA-MB-231 Zellklonen. A, Gezeigt wird 2 x die Mock-Kontrolle. B, Klone 2/4 von FGFR4(G388). C, Klone 6/11 von FGFR4(R388). D, Klone 1/5 von FGFR4(K503M). E, Klone 8/10 von FGFR4_{sol}. F, Klone 8/10 von FGFR4_{ex}TM(G388). G, Klone 5/10 von FGFR4_{ex}TM(R388).

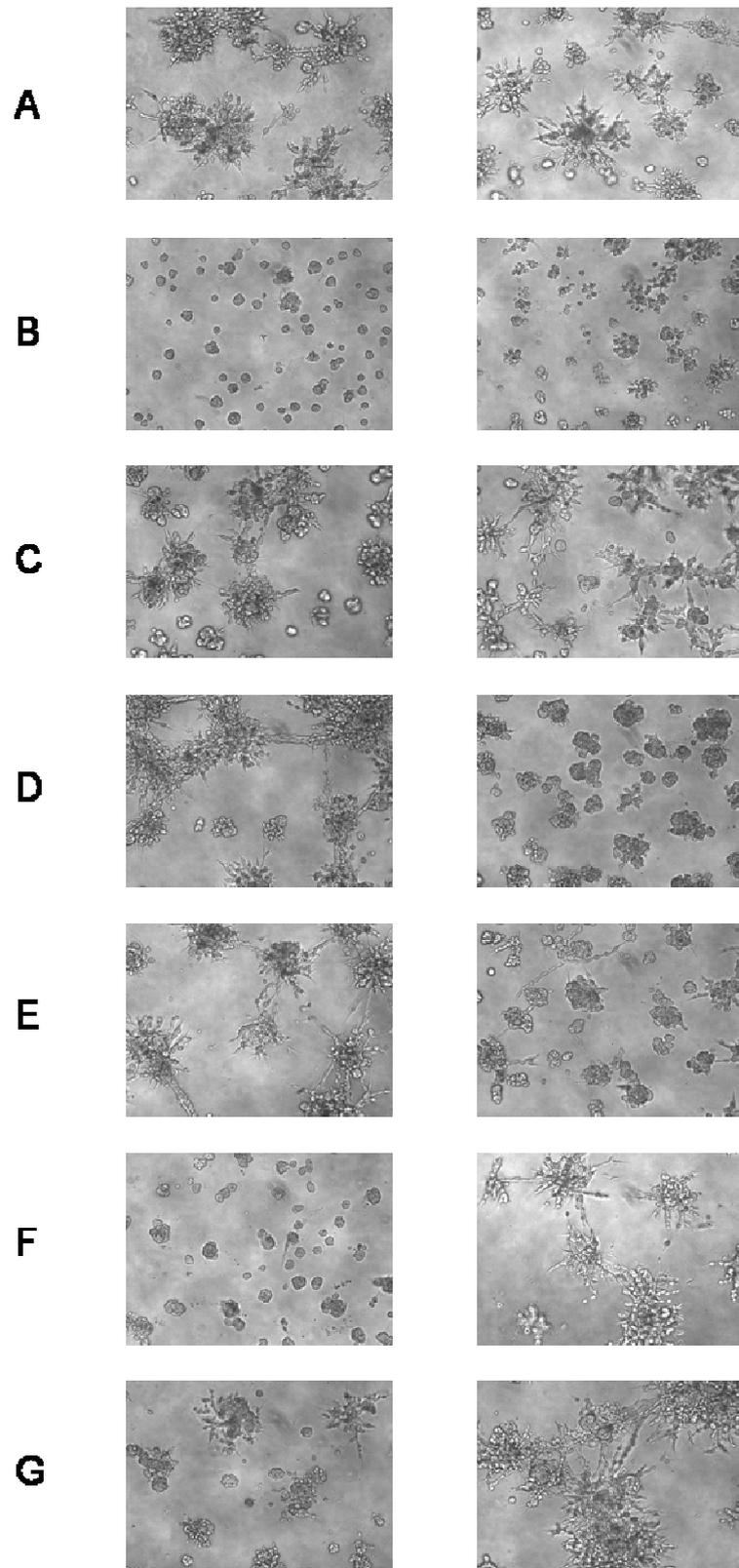


Abb. 25: Branching-Assay von MDA-MB-435S Zellklonen. A, Gezeigt wird 2 x die Mock-Kontrolle. B, Klone 2/13 von FGFR4(G388). C, Klone 3/11 von FGFR4(R388). D, Klone 1/9 von FGFR4(K503M). E, Klone 1/3 von FGFR4_{sol}. F, Klone 2/10 von FGFR4_{ex}TM(G388). G, Klone 2/4 von FGFR4_{ex}TM(R388).

Für die gesamten Experimente der Migrations-, Invasions- und Branchingassays kann zusammengefasst werden, dass der FGFR4(G388) suppressorisch wirkte, während das Arginin-Allel keinen Einfluss auf die Zellphysiologie offenbarte und sich quasi wie die Mock-Kontrolle der Zellen verhielt. Die cytoplasmatisch-deletierten FGFR4-Isoformen oder kinase-inaktiver FGFR4 reduzierten das Migrations-, Invasions- und Branchingpotential der untersuchten Zellen deutlich.

III.4 Der FGFR4 in der Apoptose

Branching-Assays der MDA-MB-231 bzw. MDA-MB-435S Zellklone, aber auch die cDNA-Makro-Array Analysen der polyklonalen MCF7 und MDA-MB-231 Zellen deuteten bereits auf einen Einfluss des FGFR4 auf das Überleben von Krebszellen bzw. deren Apoptose hin. Außerdem zeigten cDNA-Makro-Array Analysen (Korrespondenz Roidl A) von Zelllinien, welche eine Chemotherapeutika-Resistenz im Rahmen eines Doxorubicin-Screenings über einen bestimmten Zeitraum entwickelten, dass dadurch die Expression des FGFR4 mitunter am stärksten im Vergleich mit der Vielzahl weiterer Gene induziert wurde.

In nachfolgenden Untersuchungen sollte deshalb genauer geklärt werden, ob sich die Hypothese mit entsprechenden Experimenten bestätigen lässt, dass der FGFR4 eine Apoptoseresistenz von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika wie Doxorubicin (DXR/Dox) begünstigt.

III.4.1 Stabile Repression der FGFR4-Expression in Zellsystemen

Da in den cDNA-Makro-Array Analysen (Korrespondenz Roidl A) die Doxorubicin-resistenten Klone (z. B. R1/R9) der Zelllinie MDA-MB-453 eine erhöhte FGFR4-Expression entwickelten, sollte ein umgekehrter FGFR4-Knockdown in endogen FGFR4-exprimierenden Zelllinien den entgegengesetzten Effekt bewirken und eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Chemotherapeutika, gleichbedeutend mit einer erhöhten Apoptoserate, hervorrufen.

Deshalb wurden die Klone R1 und R9 der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453, sowie die Zelllinien 769-P (Nierenkarzinoma) und TE671 (Glioblastoma) durch die retroviralen pSUPER-

Retro (Mock-Kontrolle) und verschiedenen pSUPER-Retro-FGFR4siRNAs(66-74) infiziert, mit dem Ziel stabil die Expression von FGFR4 zu supprimieren. Während die Mock-Kontrolle und die siRNA70 eine in etwa gleiche und somit unveränderte FGFR4-Expression aufwiesen, konnte die FGFR4-Expression durch die Infektion mit siRNA66 und siRNA74 dauerhaft unterdrückt werden. Dies wurde auf Proteinebene in Immunpräzipitationen und Immunoblots gegen FGFR4 gezeigt (Abb. 26 und 27).

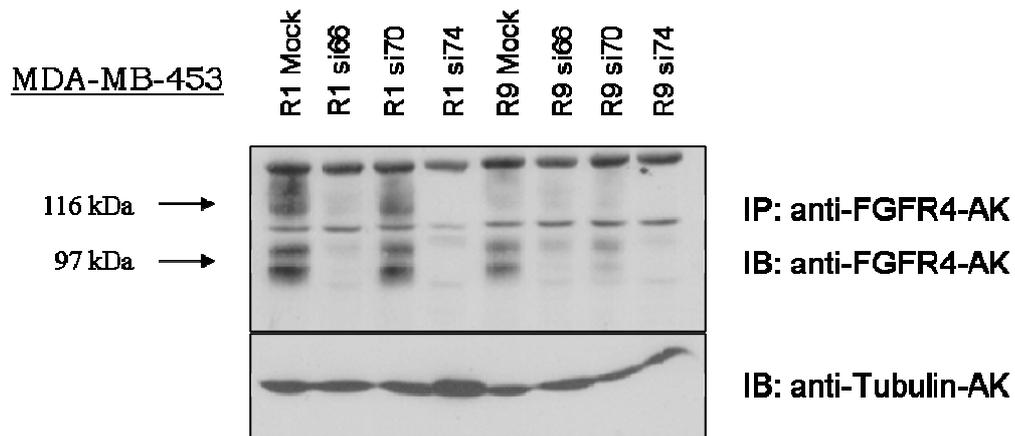


Abb. 26: FGFR4-Expression in MDA-MB-453 R1/R9 Knockdown Zellen. Immunpräzipitationen wurden mit einem anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK), die Immunoblots mit dem polyklonalen anti-FGFR4-AK (1171-AK) durchgeführt. Als Kontrolle diente ein TL-Immunoblot gegen Tubulin.

Die FGFR4-siRNA70 wurde deshalb in den weiteren Experimenten als Kontrolle verwendet, da diese zwar gegen eine FGFR4 cDNA-Sequenz gerichtet ist, jedoch kaum die FGFR4-Expression beeinflusste. Aus diesen Vorexperimenten wurde außerdem deutlich, dass die endogene FGFR4-Proteinexpression/Knockdown von Klon R1 stärker als die von R9 war (Abb. 26). Die verschiedenen FGFR4-siRNA-Konstrukte bewirkten in den beiden anderen Zelllinien 769-P (Abb. 27) und TE671 (an dieser Stelle nicht gezeigt, vgl. Abb. 35) dieselben Effekte für die FGFR4-Proteinexpression.

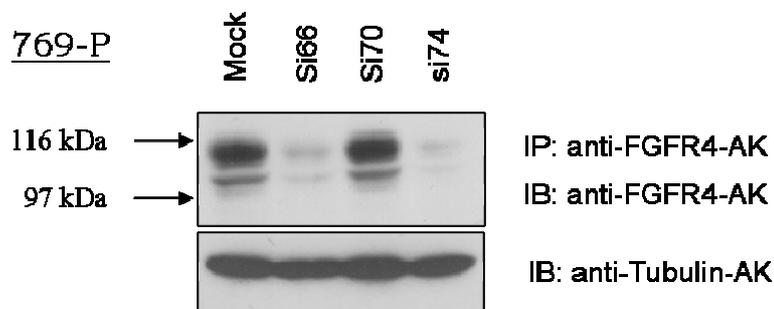


Abb. 27: FGFR4-Expression in 769-P Knockdown Zellen. Immunpräzipitationen wurden mit einem anti-FGFR4-AK (4FA6D3C10-AK), die Immunoblots mit dem polyklonalen anti-FGFR4-AK (1171-AK) durchgeführt. Als Kontrolle diente ein TL-Immunoblot gegen Tubulin.

III.4.2 Apoptoseverhalten von stabilen FGFR4-reprimierten Zelllinien

Nachdem die supprimierte Expression von FGFR4 in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen worden war, sollte untersucht werden, ob sich auch deren Apoptoseverhalten im Vergleich zum Wildtyp änderte. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien für 48 h mit Doxorubicin, welches speziell die DNA-Transkription durch eine DNA-Interkalation, sowie die DNA-Synthese durch die Inhibition der Topoisomerase II unterbindet, behandelt. Danach wurde die DNA der lebenden Zellen mit Propidium-Jodid angefärbt und die Zellverteilung in Bezug auf den DNA-Gehalt pro Zelle durch Durchflusszytometrie erfasst. Apoptotische Zellen zeichneten sich durch eine geringere DNA-Menge infolge von Fragmentierungsprozessen aus, während in gesunden Zellen entweder ein diploider Chromosomensatz ($G_{0/1}$ -Phase) oder ein tetraploider Chromosomensatz (nach S-Phase in G_2/M) vorlag. Die normal proliferierenden Zellen werden in FACS-Spektren entweder im G_1 - oder G_2 -Peak erfasst. Die apoptotischen Zellen bilden in derartigen Spektren eine $G_{0/1}$ -Subpopulation vor dem eigentlichen G_1 -Peak. In Abb. 28 werden die FACS-Spektren aus den Apoptose-Assays der MDA-MB-453 R1 Zellen mit und ohne FGFR4-Knockdown gezeigt, wobei als Ergänzung nochmals die Proteinexpression von FGFR4 der Zellen dargestellt wurde. Ähnlich sahen die FACS-Spektren der MDA-MB-453 R9 Zellen aus (Daten nicht gezeigt). Diese Art von Apoptose-Assay wurde auch für die 769-P FGFR4-siRNA-Zellen durchgeführt (Abb. 29).

Jedes Bild zeigt dabei außerdem ein Overlay von Zellpopulationen aus Doxorubicin-nicht-induzierten Zellen (blau) und Doxorubicin-induzierten Zellen (orange). Um einen Vergleich der einzelnen polyklonalen Zelllinien mit FGFR4-Expression (Mock und siRNA70) bzw. ohne FGFR4-Expression (siRNA66 und siRNA74) vorzunehmen, wurde der Anteil von apoptotischen Zellen (in Prozent) an der Gesamtzahl der im Experiment gemessenen Zellen bestimmt und zusammengefasst (Abb. 30 A und B). Während im Falle von FGFR4-exprimierenden R1 Zellen die Apoptoserate deutlich unter 20 % lag, erhöhte sich diese für die Zellen der FGFR4-siRNA66 auf ca. 23 % und im Falle der FGFR4-siRNA74 auf über 40 %. Ebenso nahm für die 769-P Zellen die Apoptoserate um ca. 5 % in den Fällen der FGFR4-siRNA66 und 74 im Vergleich zu den Mock- bzw. FGFR4-siRNA70-Kontrollzellen zu.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass der FGFR4-Knockdown tatsächlich einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Krebszelllinien hat. Zelllinien, deren FGFR4-Expression stabil supprimiert wurde, wurden sensitiver für eine Doxorubicin-Behandlung, während die Apoptoseraten von Zellen mit endogener FGFR4-Expression niedriger ausfielen.

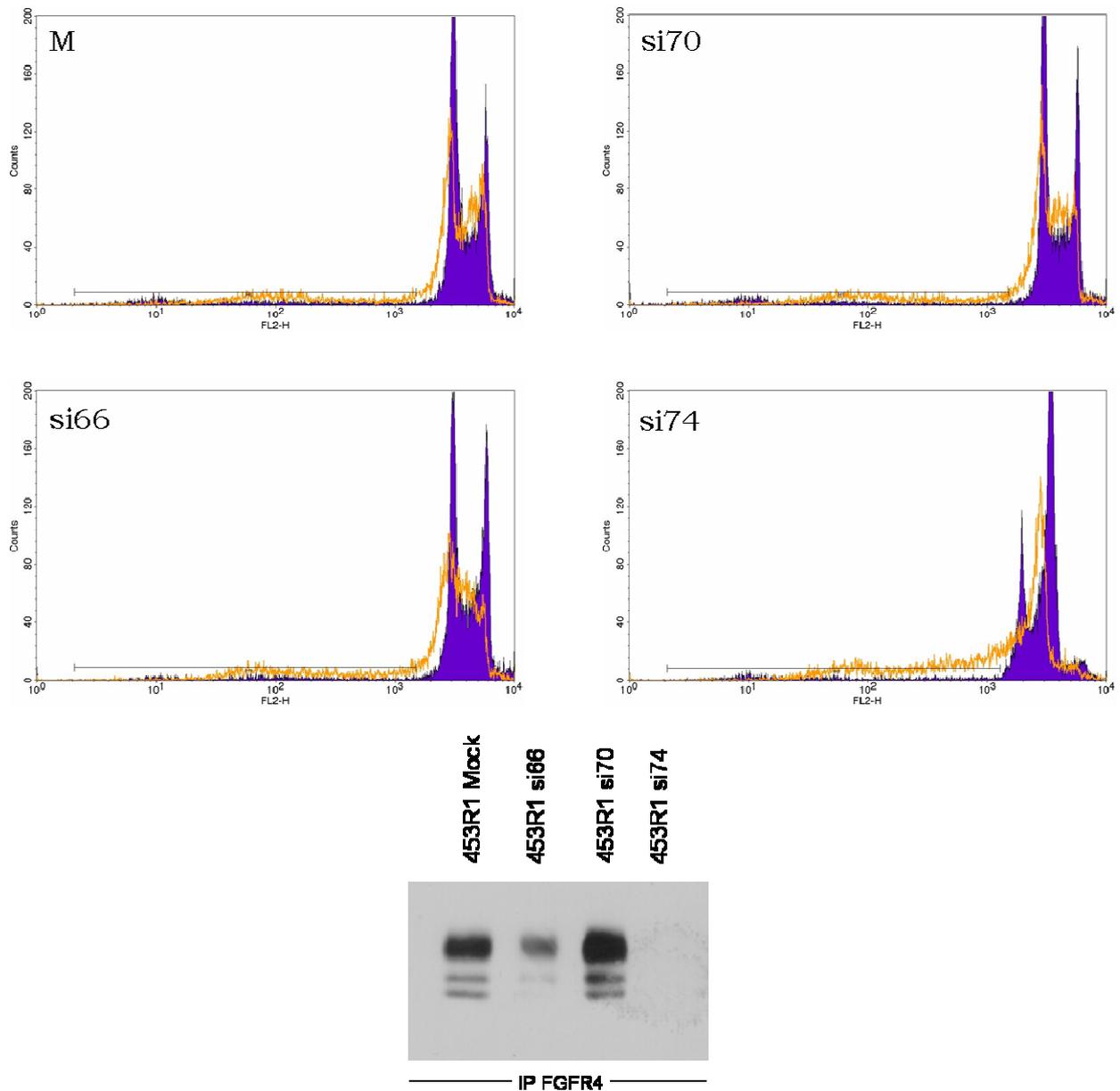


Abb. 28: Apoptose-Assays von MDA-MB-453 R1 Knockdown Zellen. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 7 % CO₂ mit Doxorubicin inkubiert. Nach Trypsinierung und einer 2,5 h / 4°C Inkubation in hypotonischem Propidium-Jodid Puffer wurde die Zellverteilung entsprechend ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts im FACS bestimmt. Zellen ohne Doxorubicin-Behandlung in blauer Farbe, mit Chemotherapeutikum in oranger Darstellung. Zur Illustration wird nochmals der Immunoblot mit der FGFR4-Expression (IP: 4FA6D3C10-AK, IB: 1171-AK) gezeigt.

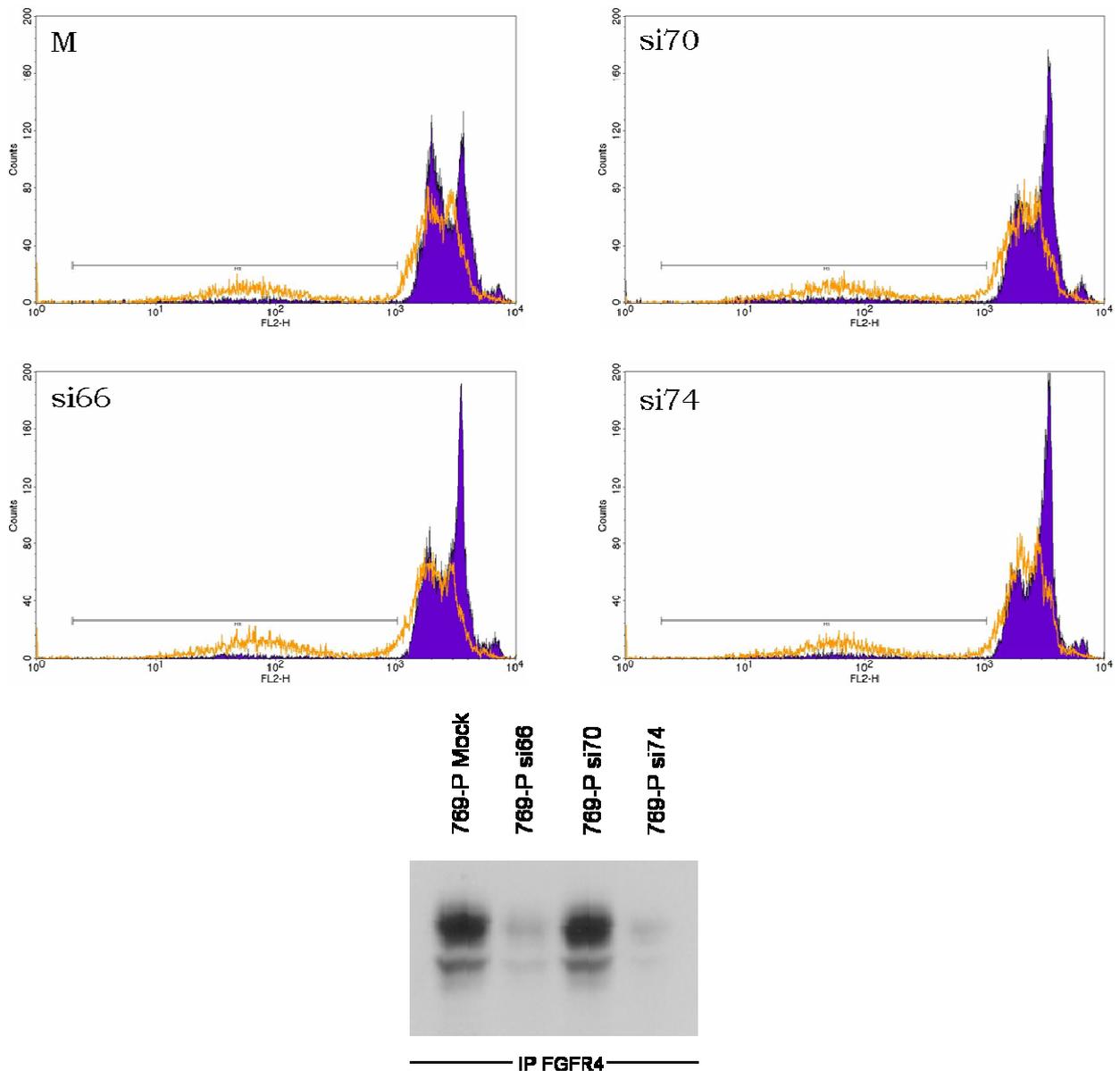


Abb. 29: Apoptose-Assays von 769-P Knockdown Zellen. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 7 % CO₂ mit Doxorubicin inkubiert. Nach Trypsinierung und einer 2,5 h / 4°C Inkubation in hypotonischem Propidium-Jodid Puffer wurde die Zellverteilung entsprechend ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts im FACS bestimmt. Zellen ohne Doxorubicin-Behandlung in blauer Farbe, mit Chemotherapeutikum in oranger Darstellung. Zur Illustration wird nochmals der Immunoblot mit der FGFR4-Expression (IP: 4FA6D3C10-AK, IB: 1171-AK) gezeigt.

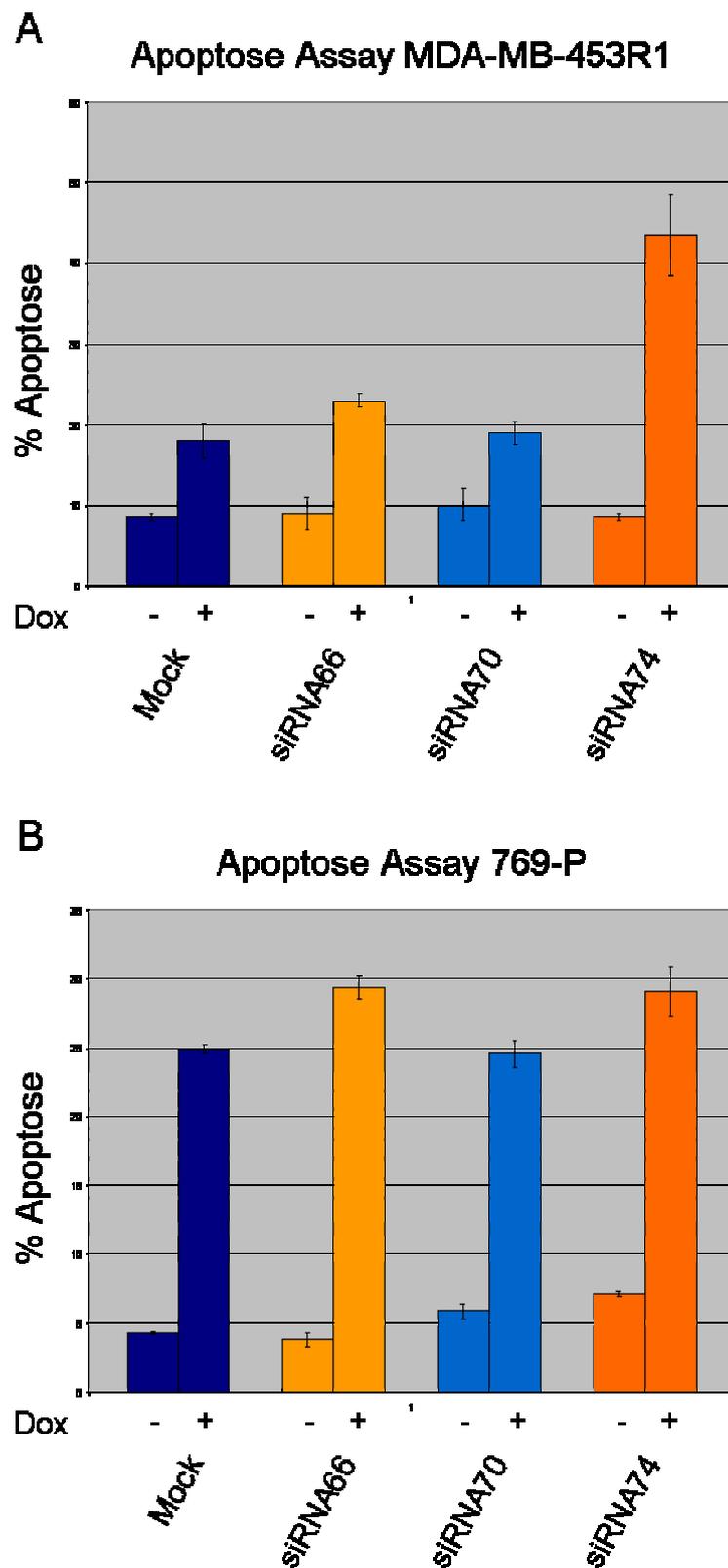


Abb. 30: Quantifizierung der Apoptose-Assays von MDA-MB-453 R1 und 769-P FGFR4-Knockdown Zellen. A, Gezeigt wird die Quantifizierung der polyklonalen R1 Zellen. B, Gezeigt wird die Quantifizierung der 769-P Zellen.

In einem Dosis-Response-Experiment sollte gezeigt werden, dass im Vergleich zu FGFR4-exprimierenden Kontrollen eine erhöhte Sensitivität von FGFR4-Knockdown Zellen gegenüber einer Doxorubicin-Inkubation nicht nur bei einer bestimmten, festen DXR-Konzentration gefunden werden kann, sondern über eine konstante Erhöhung der Chemotherapeutikum-Dosis hinweg bestehen bleibt. Die stabilen FGFR4-Knockdown Zelllinien wurden analog den früheren Apoptose-Assays mit Doxorubicin zwischen 0,1 bis 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ inkubiert und die Apoptoseraten nach 48 h und Propidium-Jodid-Färbungen in FACS-Messungen ermittelt. In TE671 Zellen wurde grundlegend bei Konzentrationen größer 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ DXR eine höhere Apoptoserate in FGFR4-Knockdown Zellen (siRNA66 und 74) als in den Kontrollzellen (Mock und siRNA70) beobachtet (Abb. 31)

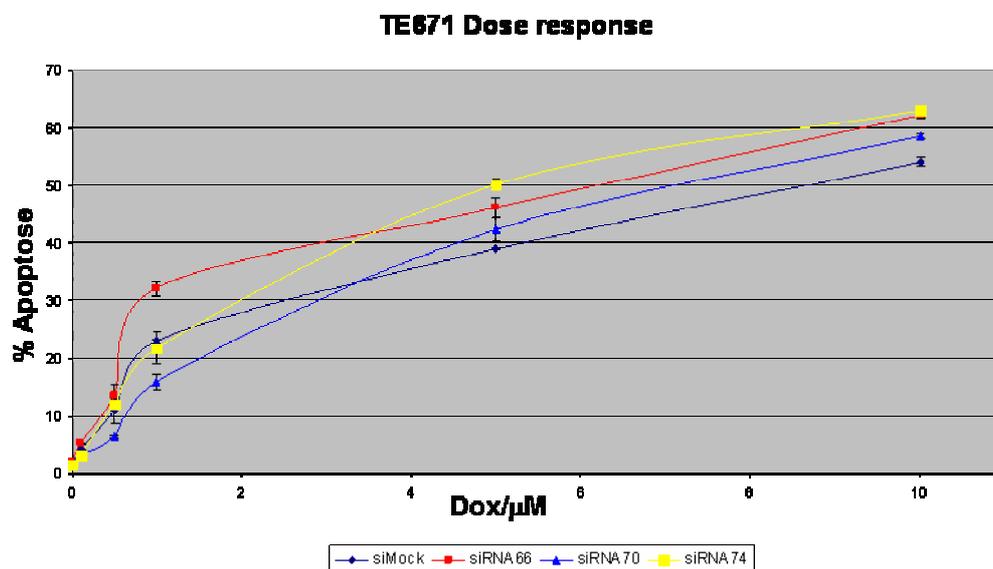


Abb. 31: Dosis-Response-Experiment von TE671 Knockdown Zellen. Die verschiedenen polyklonalen FGFR4-Knockdown Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Doxorubicin (0,1 – 10 μM) behandelt und anschließend die Apoptoserate im FACS bestimmt.

Auch für die 769-P Zellen mit FGFR4-Knockdown konnte in Dosis-Response-Experimenten bei entsprechend hohen DXR-Konzentrationen eine höhere Apoptoserate festgestellt werden als für die FGFR4-exprimierenden Kontrollzellen (Abb. 32).

MDA-MB-453 R1 Zellen mit FGFR4-Knockdown zeigten in Dosis-Response-Experimenten die gleichen Effekte, nämlich per se eine erhöhte Sensitivität gegenüber DXR im Vergleich zu den Kontrollen. Im umgekehrten Fall führte eine Überexpression von FGFR4 in MCF7 Zellen zu einer erhöhten Apoptoseresistenz im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Korrespondenz Roidl A).

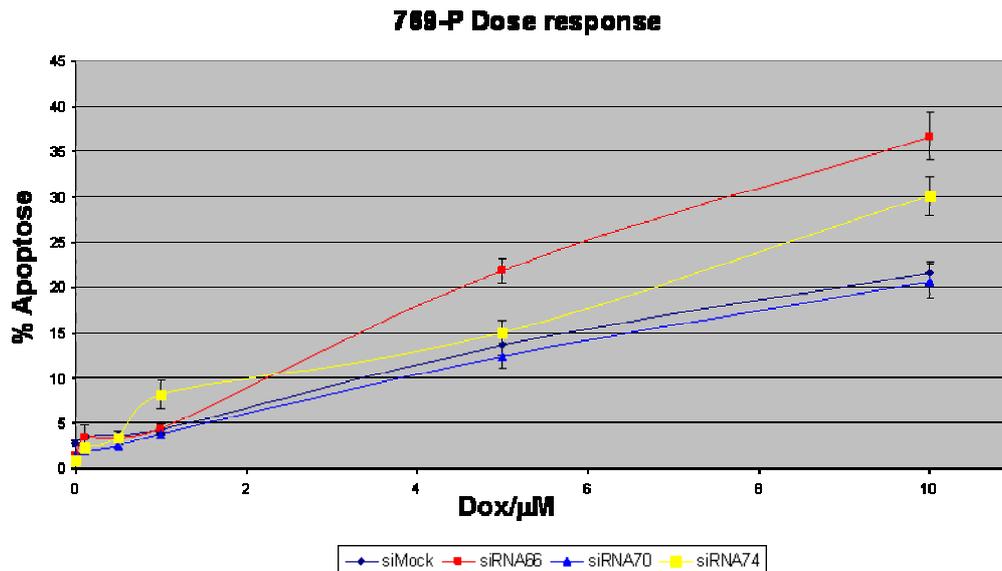


Abb. 32: Dosis-Response Experiment von 769-P Knockdown Zellen. Die verschiedenen polyklonalen FGFR4-Knockdown Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Doxorubicin (0,1 – 10 μM) behandelt und anschließend die Apoptoserate im FACS bestimmt.

Die FGFR4-Expression korrelierte folglich in Apoptose-Assays mit einer Verminderung der Apoptoserate von DXR-behandelten Zellen, während in Zellen mit unterdrückter FGFR4-Expression eine höhere Apoptoserate beobachtet werden konnte.

III.4.3 Beeinflussung der Signaltransduktion in stabilen FGFR4-Zelllinien

Da nachgewiesen werden konnte, dass der FGFR4 eine Rolle in der Apoptoseresistenz von Krebszellen spielt, stellte sich die Frage, wie dieser Effekt in den Zellen vermittelt wird. Welche Signaltransduktionswege sind für die Ausprägung dieser Eigenschaft verantwortlich? Aus den cDNA-Makro-Array Untersuchungen ergab sich eine erhöhte BclX_L-Expression unter ektoptischer FGFR4-Überexpression in MCF7 Zellen. In MDA-MB-231 Zellen kam es zu einer verminderten BclX_L-Expression, wenn cytoplasmatisch-deletierte und somit funktionell-inaktive FGFR4-Isoformen in den Zellen überexprimiert wurden. BclX_L gehört bekanntlich zur Bcl2-Familie und vermittelt anti-apoptotische Eigenschaften (I.3.2). Die Ergebnisse der cDNA-Makro-Arrays wurden zuerst durch semi-quantitative PCR-Versuche validiert. Es konnte gezeigt werden, dass in MCF7 Zellen eine hohe BclX_L-Expression bei einer ektoptischen FGFR4-Überexpression eintrat (Abb. 33 A). Im umgekehrten Fall wurde die BclX_L-Expression in MDA-

MB-453 R1 Zellen mit FGFR4-Knockdown (siRNA66 und 74) gesenkt, während für die Mock-Kontrolle und die siRNA70 BclX_L detektiert werden konnte (Abb. 33 B).

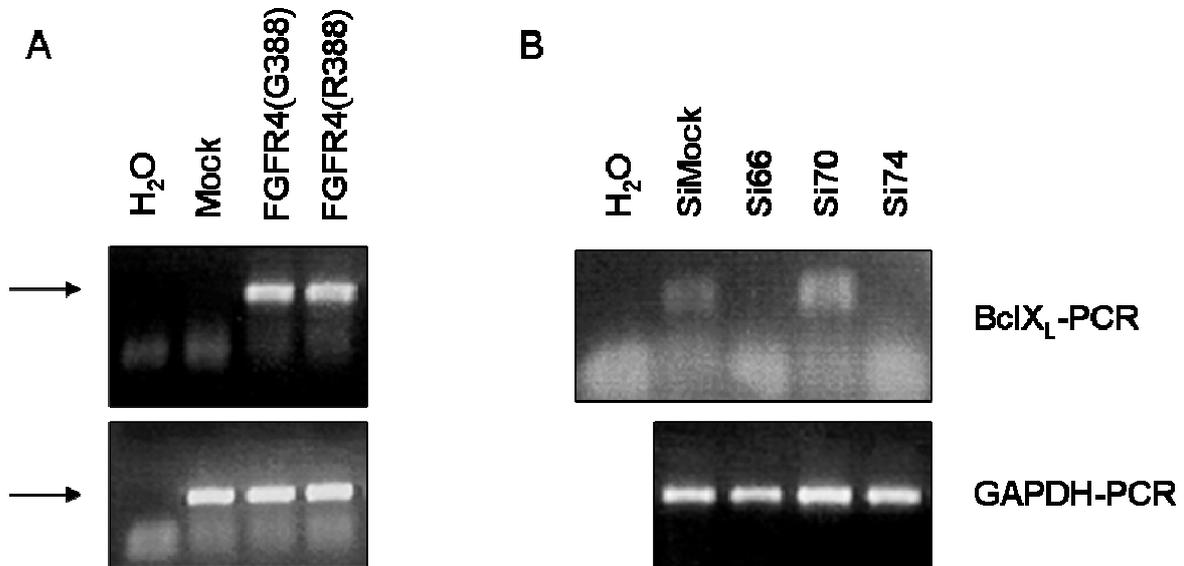


Abb. 33: Semi-quantitative PCR für BclX_L-Expression in MCF7 und MDA-MB-453 R1 Zellen. A, BclX_L-Expression in MCF7 Mock und ektopisch exprimierten FGFR4(G388/R388) Zellen. B, Expression von BclX_L in R1 Kontroll-(Mock/si70) und FGFR4-Knockdown Zellen. Als Ladungskontrolle wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle diente in beiden Fällen H₂O als Templatequelle.

Die BclX_L-Expression wurde jedoch nicht nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Auch eine Beeinflussung der Proteinkonzentration in den Zellen wurde überprüft. In MCF7 Zellen fand man eine Erhöhung der BclX_L-Proteinmenge infolge einer FGFR4-Überexpression, was durch einen TL-Immunoblot gezeigt werden konnte (Abb. 34).

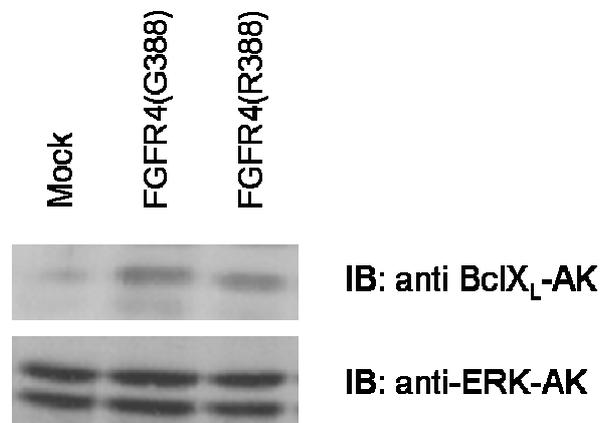


Abb. 34: Proteinexpression von BclX_L in MCF7 Zellen. TL-Immunoblot gegen BclX_L aus polyklonalen MCF7 Zellen ohne (Mock) und mit FGFR4(G388/R388)-Expression. Als Ladungskontrolle diente ein ERK-Reblot.

Analog zu den MCF7 Zellen wurden die FGFR4-Knockdown Zellen und deren Kontrollen auf ihre BclX_L-Expression hin untersucht. Während für die MDA-MB-453 R1 Zellen nicht ganz klar war, ob BclX_L wirklich für die Ausbildung einer Apoptoseresistenz verantwortlich war, da die BclX_L-Proteinmengen kaum beeinflusst wurden, konnte für die TE671 und 769-P Zellen eine Abhängigkeit der BclX_L-Expression von FGFR4 beobachtet werden (Abb. 35 A und D). Die Zelllinien mit unterdrückter FGFR4-Expression (siRNA66 und 74) wiesen tendenziell geringere Mengen an BclX_L als die entsprechenden Kontrollzellen (Mock und siRNA70) auf.

Desweiteren zeigten die 769-P und TE671 Zellen mit endogener FGFR4-Expression eine höhere AKT-Phosphorylierung als die FGFR4-Knockdown Zelllinien (Abb. 35 B und C). Die MDA-MB-453 R1 Zellen verhielten sich bezüglich der AKT-Phosphorylierung genau umgekehrt wie die TE671 und 769-P Zellen, was unter anderem im Zusammenhang mit der unveränderten BclX_L-Expression und einer per se hohen HER2-Expression in MDA-MB-453 Zellen (Korrespondenz Knyazev P) diskutiert werden kann.

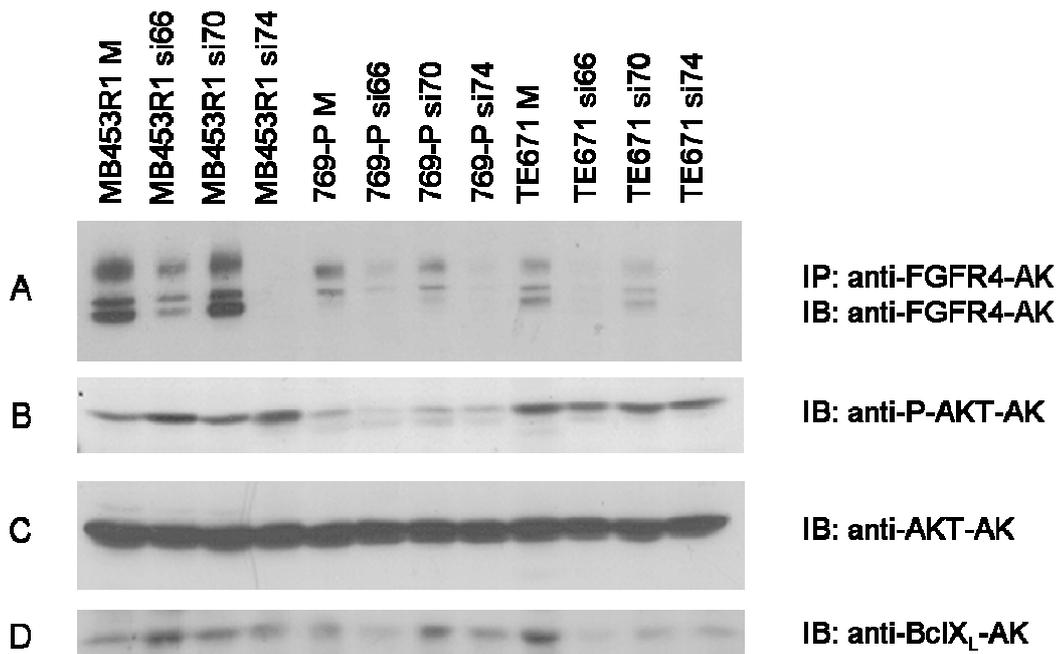


Abb. 35: Proteinexpression von BclX_L in FGFR4-Knockdown Zelllinien. A, Immunpräzipitationen gegen FGFR4 (4FA6D3C10-AK) und Immunoblot mit anti-FGFR4-AK (1171-AK). B, TL-Immunoblot mit anti-P-AKT-AK. C, TL Reblot mit anti-AKT-AK. D, TL-Immunoblot mit anti-BclX_L-AK.

Die Apoptoseresistenz der verwendeten, stabilen Zelllinien wird demnach durch die vorhandene Co-Expression von BclX_L und FGFR4 vermittelt.

III.4.4 Transiente Repression der endogenen FGFR4-Expression

Um zu beweisen, dass die BclX_L-Expression direkt von der FGFR4-Expression abhängt, wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt und die Veränderung der BclX_L- und FGFR4-Proteinmengen beobachtet. Hierfür wurden endogen FGFR4-exprimierende 769-P und Wildtyp-Zellen einerseits mit Luciferase-siRNA (GL2) als Kontrolle, andererseits mit FGFR4-siRNA (ID1412, Ambion) transfiziert. Die BclX_L- und die FGFR4-Expression wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 und 168 h nach erfolgter siRNA-Transfektion überprüft. In diesem Experiment konnte durch Immunopräzipitation bzw. Immunoblots nachgewiesen werden, dass die FGFR4-Expression nach 48 h der Transfektion stark abgenommen hatte und anschließend bis zum Zeitpunkt 168 h wieder stetig zunahm (Abb. 36 A). Gleichzeitig wurde auch die BclX_L-Expression zum Zeitpunkt 48 h nach der Transfektion im Vergleich zu den Kontrollen (GL2 und Kontrolle 0 h) stark vermindert. Danach stieg die BclX_L-Expression analog zur zunehmenden FGFR4-Expression ebenfalls wieder bis zum Zeitpunkt 168 h nach erfolgter Transfektion an (Abb. 36 B).

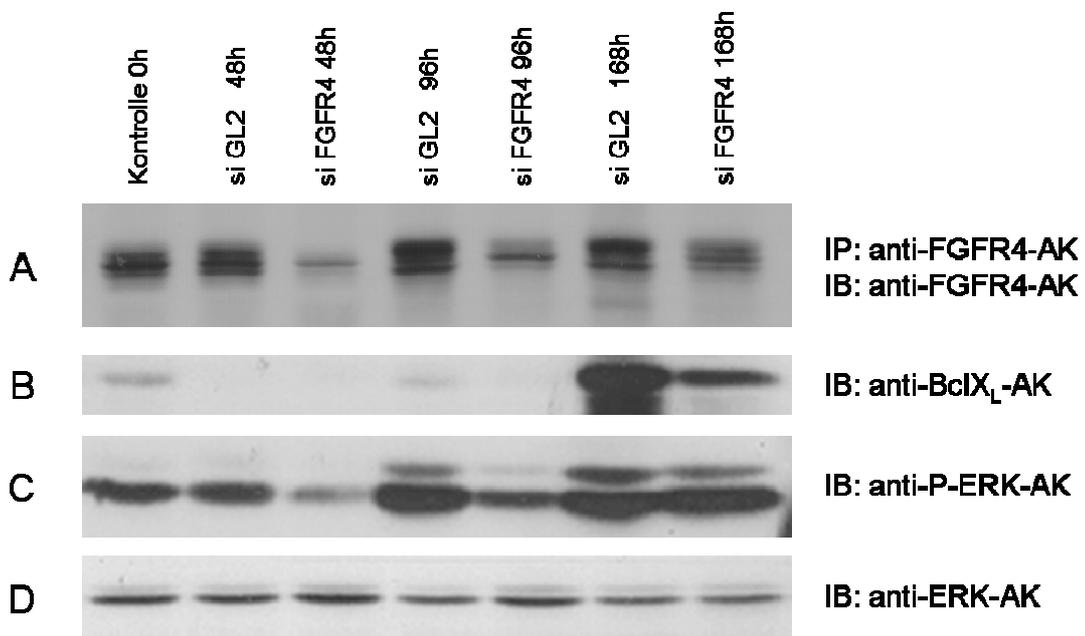


Abb. 36: Transienter FGFR4-Knockdown in 769-P Zellen. 769-P Zellen transfiziert mit Luciferase(GL2)-Kontroll-siRNA oder FGFR4-siRNA (siFGFR4) und Lyse nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0-168 h) der Transfektion. A, Immunopräzipitationen gegen FGFR4 (4FA6D3C10-AK) und Immunblot mit einem anti-FGFR4-AK (1171-AK). B, TL-Immunoblot mit anti-BclX_L-AK. C, TL-Immunoblot mit anti-P-ERK-AK. D, TL-Reblot mit anti-ERK-AK als Kontrolle.

Darüber hinaus konnte auch eine geringere ERK-Phosphorylierung in den Zellen mit FGFR4-Knockdown und supprimierter BclX_L-Expression gefunden werden (Abb. 36 C), was auf eine Abhängigkeit der BclX_L-Expression von der MAPK-Signaltransduktion und somit vermutlich auf die Apoptoseresistenz schließen lässt. Als Kontrolle wird ein ERK-Reblot gezeigt (Abb. 36 D). Analog wurde der FGFR4-Knockdown auch in TE671 Wildtypzellen durchgeführt. Hier konnten dieselben Effekte bezüglich der BclX_L-Expression bzw. ERK-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der FGFR4-Expression beobachtet werden (Abb. 37 A-D).

Eine Beeinflussung der AKT-Phosphorylierung wie in stabilen Knockdown-Zellen (Abb. 35) konnte in den transienten Zellsystemen nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

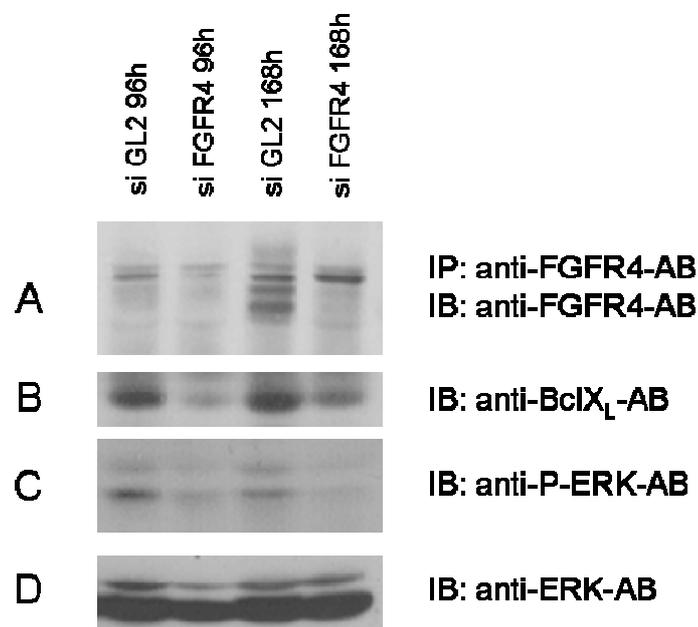


Abb. 37: Transienter FGFR4-Knockdown in TE671 Zellen. TE671 Zellen transfiziert mit Luciferase(GL2)-Kontroll-siRNA oder FGFR4-siRNA (siFGFR4) und Lyse nach unterschiedlichen Zeitpunkten (96-168 h) der Transfektion. A, Immunopräzipitationen gegen FGFR4 (4FA6D3C10-AK) und Immunblot mit einem anti-FGFR4-AK (1171-AK). B, TL-Immunoblot mit anti-BclX_L-AK. C, TL-Immunoblot mit anti-P-ERK-AK. D, TL-Reblot mit anti-ERK-AK als Kontrolle.

Der transiente Knockdown von FGFR4 ist als Experiment deshalb besonders aussagekräftig, da es sich in diesem Fall quasi um ein induzierbares System handelte, welches nach einer bestimmten Zeit wieder den Ausgangszustand speziell in den 769-P Wildtyp-Zellen erreichte. Dabei konnte die direkte Abhängigkeit der BclX_L-Expression von der FGFR4-Expression verfolgt werden. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass der FGFR4 eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Apoptoseresistenz von Krebszellen spielt.

IV Diskussion

Für den FGF-Rezeptor 4 wurde in dieser Arbeitsgruppe ein „Single-Nukleotid-Polymorphismus“ beschrieben, welcher homolog zur AS-Konversion in der Transmembrandomäne des FGFR3 von Glycin 380 zu Arginin 380 war. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Arginin-Allel des Rezeptors die Zellmigration begünstigt, während das Glycin-Allel die Zellmigration supprimiert. In klinischen Studien zeigten Träger des Glycin-Allels eine höhere rezidiv-freie Überlebenszeit im Vergleich zu Trägern des Arginin-Allels (Bange et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bindungseigenschaften die extrazelluläre Domäne des Rezeptors aufweist, um erklären zu können, auf welche Art und Weise die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften des Glycin- und Arginin-Allels des FGFR4 in der Zellmigration und Krebszellinvasion zustande kommen können. Die Expression der cytoplasmatisch-deletierten Form des Rezeptors in Verbindung mit physiologischen Assays zeigte, welche Rolle die extrazelluläre Domäne des FGFR4(G388) oder FGFR4(R388) allein in der Vermittlung der Zellmigration und der Krebszellinvasion spielt. Durch cDNA-Makro-Array Analysen wurde geklärt, welche Gene mit ektopisch-exprimiertem FGFR4 co-exprimiert werden und unter Umständen außerdem für die verschiedenen Eigenschaften des Glycin- und Arginin-Allels des Rezeptors verantwortlich sind. Apoptose-Assays zeigten, dass der FGFR4 auch eine Rolle im Überlebensprozess von Krebszellen spielt.

IV.1 Die Bindungseigenschaften der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Studien zur Interaktion des FGFR4 mit den einzelnen NCAM-Isoformen zeigten entgegen anderer Erwartungen keinen Unterschied in den Bindungsaffinitäten zwischen dem Glycin- und Arginin-Allel des Rezeptors, wobei diese per se relativ schwach im Überexpressionssystem ausfielen. Dies kann jedoch daran liegen, dass die ursprünglich beschriebenen Interaktionen in Maus-Pankreastumorzellen gefunden und charakterisiert wurden.

Um andere Interaktionspartner für die extrazelluläre Domäne des FGFR4 zu finden, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Sowohl t-PA als auch Annexin II konnten nicht als Interaktionspartner in Co-Immunopräzipitationen validiert werden, obwohl in Prostatakrebstudien eine erhöhte uPAR-Co-Expression mit dem FGFR4(R388) beobachtet wurde (Wang et al., 2004) und deshalb die vermuteten Interaktionen anfangs vielversprechend erschienen. Auch TAP-Pulldown-Experimente brachten nicht den erwarteten Erfolg. Einerseits handelt es sich bei Tubulin bzw. IKK α um keine Membranproteine, welche man allerdings aufgrund des FGFR4-Bait-Proteindesigns erwarten sollte; außerdem werden ATP-Synthase, sowie MTHSP75 nur in Mitochondrien jedoch nicht in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert (www.genecards.org). Andererseits wurde der T-Zell-Rezeptor (TCL) bisher nicht als Interaktionspartner von FGF-Rezeptoren charakterisiert. Allerdings wurde eine Induktion der Interleukin 2 (IL2) Produktion durch eine Interaktion von FGFR1 mit NCAM (CD56) und unter gleichzeitiger Mobilisierung von TCL in Jurkat T Zellen beschrieben (Kos and Chin, 2002).

Dennoch darf man davon ausgehen, dass bestimmte Proteine selektiv an die extrazelluläre Domäne des FGFR4 binden können. Für andere FGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen konnten entsprechende Zusammenhänge bereits nachgewiesen werden. Die Bindung von FGF-Rezeptoren an Cadherine wurde im Allgemeinen schon früher durch die Identifizierung des HAV-Motivs in der extrazellulären Domäne des FGF-Rezeptors vermutet (Byers et al., 1992) und schließlich für FGFR1 schlüssig bewiesen (Suyama et al., 2002). Ein neuronales Wachstum von Zellen wird unter anderem mit der Co-Lokalisation von N-Cadherin mit dem FGF-Rezeptor diskutiert, wobei hier ein funktionell aktiver FGF-Rezeptor notwendig ist (Utton et al., 2001). Auch NCAM ist an der Ausbildung dieses Phänotyps beteiligt. Dieser Effekt wird allerdings durch die Expression des VASE-Exons, d.h. zusätzliche 10 AS in der vierten Ig-Domäne von NCAM-Proteinen, unterdrückt und verhindert unter Umständen auch die Bindung von FGF-Rezeptoren an NCAM (Saffell et al., 1994). Ob dadurch die FGFR4-NCAM-Interaktionsstudien in dieser Arbeit beeinflusst wurden, bleibt momentan unklar.

Darüber hinaus spielen auch die extrazellulären Domänen von anderen RTK wie EGFR, VEGFR oder PDGFR eine besondere Rolle in Zelladhäsionsprozessen. Der EGFR wird zum Beispiel durch eine Assoziation mit der extrazellulären Domäne von E-Cadherin (jedoch nicht N-Cadherin) aktiviert, und eine Phosphorylierung von zahlreichen EGFR-Substraten wird neben einer Reduktion von Fokalkontakten beobachtet (Fedor-Chaiken et al., 2003). Andererseits führt eine Überexpression von EGFR bzw. eine Stimulation mit EGF zu einer Suppression der E-Cadherin-Expression durch die Induktion des Transkriptionsrepressors Snail (Lu et al., 2003). E-Cadherin kontrolliert und negativ-reguliert in einem adhäsionsabhängigen Prozess umgekehrt

auch EGFR, indem die Ligandenbindung an den Rezeptor unterdrückt wird (Qian et al., 2004; Andl and Rustgi, 2005). Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet in einem anderen Zusammenhang ein Fragment des ECM-Makromoleküls Laminin-5, generiert aus einer matrix-metalloproteinase-vermittelten Spaltung, wodurch die Zellen ihrerseits die MMP2-Expression und dabei die Zellmigration erhöhen (Schenk et al., 2003). Ähnlich dem EGFR wird die Halbwertszeit von VEGFR durch Überexpression von VE-Cadherin erhöht (Calera et al., 2004). Eine hohe Zelldichte beeinträchtigt auch die VEGFR-Phosphorylierung durch stark ausgebildete VE-Cadherin-Zellkontakte (Rahimi and Kazlauskas, 1999). Nicht nur Cadherine, sondern auch Endostatin, ein Fragment des ECM-Moleküls Kollagen XVIII, bindet an die extrazelluläre Domäne von VEGFR2 und unterdrückt dadurch die Rezeptoraktivität über eine Hemmung der VEGF-Liganden-Bindung (Kim et al., 2002). VEGFR2 und VEGFR3 bilden zusätzlich Interaktionen mit verschiedenen Integrinen (Borges et al., 2000; Wang et al., 2001). Neben den Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR und VEGFR besitzt der PDGFR ebenfalls eine Affinität für Zelladhäsionsmoleküle. Die extrazelluläre Domäne des PDGFR assoziiert mit der extrazellulären Domäne des Integrins $\alpha_v\beta_3$ und dadurch wird auch die Migration von Zellen beeinflusst (DeMali et al., 1999; Borges et al., 2000). In Analogie zu diesen Ergebnissen besteht also durchaus die Wahrscheinlichkeit, dass der FGFR4 über seine extrazelluläre Domäne Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen eingeht.

Neben klassischen Pulldown- bzw. Co-Immunopräzipitationsexperimenten sind theoretisch natürlich noch andere Ansätze denkbar, um Interaktionspartner des FGFR4 zu finden. Als eine dieser Methoden wäre die Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems denkbar. Auf diese Art und Weise wurde bereits FRS2 oder RSK1, eine 90 kDa große ribosomale S6Kinase, neben einigen anderen Proteinen als Interaktionspartner von FGFR1 identifiziert (Xu et al., 1998; Hu et al., 2004). Auf ähnliche Art wurde die Bindung des Adapterproteins SH2-B an FGFR3 (Kong et al., 2002) und die Interaktion des N-terminalen Bereiches der cytoplasmatischen Kinasedomäne von EphA4 mit der Juxtamembranregion aller FGF-Rezeptoren gezeigt (Yokote et al., 2005). Um speziell Bindungspartner von Membranproteinen nachzuweisen, wurde vor einiger Zeit das Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-System entwickelt, um Interaktionen von integralen Membranproteinen direkt in ihrem natürlichen Milieu, nämlich in der Plasmamembran, anstelle im Zellkern zu zeigen (Thaminy et al., 2004). Für HER3/ErbB3 wurde dieses System bereits erfolgreich angewendet, und es wurden eindeutig drei Interaktionspartner gefunden (Thaminy et al., 2003). Eine *in silico* Analyse mit einem eigens dafür entwickelten Computerprogramm, um mögliche Interaktionspartner von integralen Membranproteinen zu finden, wurde auf der Grundlage der Verwendung des Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-Systems als

Softwareparameter durchgeführt. Diese Auswertung ergab, dass für 536 Membranproteine der Datenbank eine Anzahl von 1.985 Interaktionen in der Theorie vorherberechnet wurde, die in 131 Fällen die höchste Wahrscheinlichkeiten des Programms erhielten (Miller et al., 2005).

Auch die Massenspektrometrie wird mittlerweile zum Nachweis von Interaktionen von Proteinen verwendet (Aebersold and Mann, 2003; Tyers and Mann, 2003). Vor allem die SILAC-Technologie, in welcher ein nicht-radioaktiv-markierter (hier unstimulierter Zustand) mit einem radioaktiv-markierten Ansatz (hier stimulierter Zustand) verglichen wird, erwies sich als effektive Methode, um z.B. Bindungspartner für den EGFR zu finden. Dadurch konnten beispielsweise 228 potenzielle und davon 28 speziell nach EGF-Stimulation am EGFR-gebundene Proteine identifiziert werden (Blagoev et al., 2003). Eine entsprechende Untersuchung wurde auch für den FGFR1 durchgeführt, wodurch einerseits neue Rezeptor-Phosphorylierungsstellen und andererseits ein neuer Interaktionspartner, nämlich Insulin-Rezeptor Substrat 4, gefunden werden konnten (Hinsby et al., 2003; Hinsby et al., 2004).

Das Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-System oder die Massenspektrometrie stellen also mögliche, technische Alternativen für zukünftige Versuche der Identifizierung von Interaktionspartnern für den FGFR4 und dessen extrazelluläre Domäne dar.

IV.2 Die Überexpression von FGF-Rezeptor 4-Isoformen beeinflusst das Genexpressionsprofil von Brustkrebszellen

Verschiedene Brustkrebszelllinien, welche ektopisch unterschiedliche Isoformen des FGFR4 exprimieren, wurden durch cDNA-Makro-Arrays auf ihr entsprechendes Genexpressionsprofil untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression des funktionellen, vollständigen FGFR4 die gleichzeitige Überexpression von BclX_L in MCF7 Zellen bedingte. In MDA-MB-231 Zellen führte die ektopische Expression von nicht-funktionellen, cytoplasmatisch-deletierten FGFR4-Isoformen zu einer Suppression der BclX_L-Expression. Dies deutet auf eine regulierte Co-Expression beider Moleküle hin. Da die BclX_L- und FGFR4-Co-Expression in molekular- und zellbiologischen Experimenten genauer untersucht wurde, soll an späterer Stelle nochmals genauer darauf eingegangen werden.

Desweiteren konnte eine erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteinasen bei gleichzeitiger Expression von FGFR4(R388) nachgewiesen werden, was sich mit früheren Untersuchungen

deckte und die besondere Rolle des Arginin-Allels des Rezeptors in der Zellmigration belegte (Bange et al., 2002; Stadler et al., 2005). Wie deren Regulation genau funktioniert, wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, da in den verwendeten polyklonalen FGFR4-Zelllinien die Expression von jeweils verschiedenen MMPs betroffen waren.

Außerdem konnte in den Experimenten kaum ein Einfluss auf die Genexpression von Zelladhäsionsmolekülen festgestellt werden, obwohl eigens für diese Experimente eine ganze Reihe von Vertretern aus der Cadherin-, Integrin- oder CAM-Familie in die cDNA-Makro-Arrays aufgenommen wurden. In MCF7 Zellen kam es lediglich zu einer erhöhten Expression von Syndecan 4 bei beiden Rezeptor-Allelen, und in MDA-MB-231 führte die Überexpression von FGFR4(R388) bzw. FGFR4_{ex}TMGly zu einer Zunahme der Expression von Cadherin 12. Dies lässt lediglich die Schlussfolgerung zu, dass Zelladhäsionsmoleküle weitestgehend unbeeinflusst von der FGFR4-Expression transkribiert werden. Außerdem konnte kein konserviertes Genexpressionsprofil für alle drei Zelllinien MCF7, MDA-MB-231 und MDA-MB-435S mit den verschiedenen exprimierten FGFR4-Isoformen gefunden werden. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der genetische Hintergrund der drei Brustkrebszelllinien zu verschieden war und ein unterschiedliches Expressionsspektrum von Genen unter Umständen durch den Mechanismus der Hypermethylierung von Promotorsequenzen hervorgerufen wurde (Baylin, 2005).

Durch die Verwendung von cDNA-Makro-Arrays konnte allerdings eine Vielzahl von anderen molekularbiologischen Mechanismen aufgeklärt werden. So wurde z.B. in dieser Arbeitsgruppe eine anti-apoptotische Wirkung von MMP15 in Verbindung mit dem Einfluss auf die Invasion von Krebszellen festgestellt (Abraham et al., 2005). Auch allgemeine Cluster-Analysen mit Prostata- und Nierenkarzinomproben wurden bereits früher mittels cDNA-Array-Technologie erprobt und bestimmte Gengruppen der Proliferation, der Angiogenese oder der Invasivität von Krebszellen zugeordnet (Cheburkin et al., 2002; Kniazev et al., 2003). Weiter konnten so durch cDNA-Arrays wichtige Einblicke in die Signaltransduktion und die Rolle einzelner FGF-Rezeptoren in der Krebsentwicklung gewonnen werden. Die reduzierte FGFR4-Expression in Lungenadenokarzinoma im Vergleich zum normalen bronchialen Gewebe wurde ebenfalls durch die Verwendung von cDNA-Arrays aufgedeckt (Nakamura et al., 2004). Auf gleiche Art und Weise konnte man aufklären, dass neben FGFR3 auch die Expression von c-Jun, Cyclin D oder NFκB in FGF-stimulierten Chondrozyten induziert wird (Rozenblatt-Rosen et al., 2002). In Harnröhrenkarzinoma wird FGFR3 überexprimiert und sorgt für die abnormale Proliferation von Krebszellen (Gomez-Roman et al., 2005). Die Suppression der FGFR3-Expression in multiplen Myelomzelllinien zeigte zusätzlich eine reduzierte Bcl2- oder Mcl1-Expression, während die

Expression von Bid, Caspase 2 oder Caspase 6 in cDNA-Arrays nachweislich erhöht wurde (Zhu et al., 2005). Für den FGFR1 wurde die cDNA-Array-Technologie ebenfalls eingesetzt, um in Primärzellen von Blasenkrebspatienten die Kopienzahl des FGF-Rezeptors zu bestimmen, wodurch sich neue Anwendungsmöglichkeiten für diese Methode ergaben (Veltman et al., 2003).

Letztendlich dient die cDNA-Array-Technologie also der Erforschung von gekoppelten Expressionsmustern in vielen verschiedenen biologischen Zusammenhängen und verschiedenen Modellorganismen wie z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* (Lashkari et al., 1997). Im Allgemeinen wurde die cDNA-Array-Technologie in der Krebsforschung schon erfolgreich eingesetzt, um zu zeigen, dass z.B. die Stat3-Überexpression die MEK5-Expression induziert (Song et al., 2004), p21 unabhängig von Smad4 reguliert wird (Ijichi et al., 2004), Vimentin die Invasivität von Prostatakrebszellen beeinflusst (Singh et al., 2003) oder die Stimulation durch den Liganden CXCL12 (des Chemokinrezeptors CXCR4) die Expression von bestimmten Zellzyklus- oder Apoptosegenen induziert (Schrader et al., 2002).

Die cDNA-Micro-Arrays eignen sich auch besonders zur Überprüfung und Charakterisierung der Expression spezifischer Krebsmarkergene in Tumorproben, was in klinischen Untersuchungen ihre Anwendung findet. Hier konnte z.B. für Prostatakrebs die PSA-Expression (Feroze-Merzoug et al., 2001), für Brustkrebs die uPA/PAI- und die HER2-Expression (Weigelt et al., 2005), für Lungenkrebs die CyclinB/E- und die p21/27-Expression (Singhal et al., 2005), für Leberkarzinoma die E-Cadherin- und die Laminin-5-Expression (Qin and Tang, 2004) oder für Nierenkarzinoma die FGF5- und die HER2-Expression (Seliger et al., 2003) als tumor-signifikant eingestuft werden. Durch derartige Tumorcharakterisierungen lassen sich leichter geeignete Behandlungsmöglichkeiten für die Patienten finden.

In der Praxis wird in den Kliniken zunehmend eine andere Art von Array-Technologie in der Form sog. Tissue-Micro-Arrays (TMA) als Ergänzung dazu verwendet, welche auf immunhistochemischen Analysen basieren. Dadurch können eine Vielzahl von Tumorbiopsien gleichzeitig auf die Expression bestimmter Krebsmarkergene hin getestet werden (Milanes-Yearsley et al., 2002; Gulmann et al., 2003; Seligson, 2005). Die quantitative Auswertung solcher TMAs wird seit 2003 digital vorgenommen, nachdem ein spezieller Flachbett-Scanner eigens für diese Applikation entwickelt wurde (Vrolijk et al., 2003).

FGFR4 bietet sich aufgrund zahlreicher Untersuchungen schließlich auch als prognostischer Marker für Brustkrebspatienten an, wobei die cDNA-Micro-Array Technologie oder TMA als Methoden verwendet werden können, um dessen Gen- oder Proteinexpression nachzuweisen.

IV.3 Die Krebszellinvasion wird durch die Expression bestimmter FGF-Rezeptor 4-Isoformen supprimiert

Durch die Expression von verschiedenen FGFR4-Isoformen in den MDA-MB-231 und MDA-MB-435S Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass das Glycin-Allel des Rezeptors die Zellmigration supprimiert, während sich die Zellen des Arginin-Allels des FGFR4 wie die Leervektor-infizierten Mock-Kontrollzellen verhalten. Auch die cytoplasmatisch-deletierten bzw. kinase-inaktiven FGFR4-Isoformen führten zu einer Suppression der Migration, ähnlich wie FGFR4(G388)-exprimierende Zellen. Das Verhaltensmuster der einzelnen Zellklone fiel im Vergleich untereinander in nachfolgenden Invasions- und Branchingassays ähnlich aus wie in den anfangs durchgeführten Migrationsassays. Frühere physiologische Experimente zur Analyse des FGFR4 SNP wurden demzufolge einerseits bestätigt, indem eine anti-migratorische Wirkung des FGFR4(G388)-Allels gezeigt werden konnte. Andererseits lassen die Ergebnisse der Zelllinien mit exprimierter cytoplasmatisch-deletierter oder der kinase-inaktiven FGFR4-Isoform vermuten, dass die Kinasedomäne des Rezeptors eine grundlegend wichtige Rolle in der Vermittlung bzw. Suppression der Zellmigration und Krebszellinvasion spielt, was auch im Hinblick auf die Eigenschaften des vollständigen Rezeptors FGFR4(G388) gelten könnte. Dies würde bedeuten, dass sich das Glycin- und Arginin-Allel des FGF-Rezeptors 4 in ihrer Aktivität unterscheiden und deshalb auch ein FGFR4(G388) Knockdown prinzipiell einen Migrationseffekt in endogenen Systemen hervorrufen kann. Dem widersprechen allerdings Kinaseassays, wonach die Kinaseaktivitäten des Glycin- und Arginin-Allels in FGFR4-Überexpressionssystemen identisch sind (Dissertation Bange, 2001).

Die physiologisch inhibitorische Funktion von dominant-negativen FGF-Rezeptoren wurde ähnlich in früheren Untersuchungen beschrieben. Dominant-negativer (dn) FGFR1 besitzt im Vergleich zum Wildtyp keine mitogene Aktivität und wird ebenso wie sein Substrat PLC γ nicht phosphoryliert (Wang et al., 1996). DnFGFR2 blockiert z.B. die Alveolenentwicklung und epitheliale Differenzierung (Peters et al., 1994), dnFGFR1 unterdrückt das Axonwachstum von neuronalen PC12 Zellen und dnFGFR4 in *Xenopus* die neuronale Differenzierung (Saffell et al., 1998; Hardcastle et al., 2000), dnFGFR1 supprimiert in Prostatakrebszellen außerdem die MMP7 (Matrilysin)- und MT1-MMP-Expression (Udayakumar et al., 2001 and 2004) und dnFGFR1 bzw. dnFGFR2 blockieren anhaftungsabhängiges und anhaftungsunabhängiges Wachstum von Gliomazellen (Auguste et al., 2001).

Die oben aufgestellte Hypothese wird desweiteren dadurch gestützt, dass sich die FGFR4_{ex}TM(G388)- und FGFR4_{ex}TM(R388)-Zellen kaum in ihrer suppressorischen Wirkung unterscheiden. Bei einem nicht-funktionellen, inaktiven FGFR4 zeigte der Glycin/Arginin Polymorphismus des Rezeptors also kaum eine unterschiedliche Wirkung mehr in Migrations- und Invasionsprozessen, abgesehen von der generellen Suppression. Dies kann aber auch bedeuten, dass extrazelluläre Bindungspartner des FGFR4 jetzt nicht mehr unterschiedlich gut vom Glycin- oder Arginin-Allel dieser Rezeptor-Isoformen gebunden werden oder durch den Verlust der cytoplasmatischen Domäne keine unterschiedlich gute Bindung von intrazellulären Adapterproteinen mehr erfolgen kann, um dabei eine besondere Rolle zu spielen. Um diese Theorie zu bestätigen, müssten allerdings noch weitere Versuche durchgeführt werden. Desweiteren kann der molekularbiologische Mechanismus für die Vermittlung der supprimierten Zellmigration bzw. -invasion nicht erklärt werden, da entsprechende Daten zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen und auch keine Interaktionspartner der extrazellulären Domäne des FGFR4 gefunden werden konnten. Vielleicht wäre auch ein Ansatz zur Identifizierung von Bindungspartnern für den C-Terminus des FGFR4 denkbar, um die Unterschiede in der Signaltransduktion von FGFR4(G388) und FGFR4(R388) aufzuklären.

Eine andere Möglichkeit, wodurch die Suppression der Zellmigration und Krebszellinvasion in den Experimenten zustande kommen könnte, liegt in der Tatsache begründet, dass die verschiedenen FGF-Rezeptoren ein unterschiedlich großes Spektrum an FGF-Liganden binden können (Itoh and Ornitz, 2004). Dadurch können die ektopisch exprimierten FGFR4-Isoformen Liganden für andere FGF-Rezeptoren wegtitrieren und so deren Stimulation unterbinden. Neben FGFR4 werden nämlich auch FGFR1 und FGFR2 im Zusammenhang mit Migrationsprozessen genannt. FGFR1 ist nachweislich an der Expression von ECM-Proteasen wie uPA, MMP1, MMP3 oder MMP9 beteiligt (Miralles et al., 1998; Partridge et al., 2000; Suyama et al., 2002; Xian et al., 2005), wobei die FGFR1-induzierte Migration über die Aktivierung des PI3-Kinase-Signaltransduktionsweges und nicht über die MAPK erfolgt (Landgren et al., 1998; La Vallee et al., 1998). Auch FGFR2 vermittelt die Migration von Zellen nach einer FGF7(KGF)-Stimulation und einer daraus resultierenden MAPK-Aktivierung (Ropiquet et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Zang et al., 2002). Hauptverantwortlich für die Beteiligung der FGF-Signaltransduktion an Zellmigrationsprozessen ist allgemein wahrscheinlich entweder die Aktivierung des Src-Tyrosinkinase-Signalweges (La Vallee et al., 1998; Liu et al., 1999) oder des MAPK-Signalweges über ERK1/2 (Jaakkola et al., 1998; Dell'Era et al., 1999). Für MDA-MB-231 Zellen ist im Zuge von cDNA-Array Analysen tatsächlich eine Expression von FGFR2 bekannt (Korrespondenz Knyazev P; Nurcombe et al., 2000), während aber MDA-MB-435S Zellen

keinen der FGF-Rezeptoren exprimieren (Korrespondenz Knyazev P). Zusätzlich supprimiert die Expression von löslichen oder cytoplasmatisch-deletierten FGF-Rezeptoren bekanntermaßen die physiologische Funktion der Rezeptor-Tyrosinkinase. Entweder wird dadurch z.B. die Differenzierung (Tanimoto et al., 2004), die MAPK-Aktivierung (Ezzat et al., 2001) oder die Proliferation von Zellen (Sturla et al., 2003; Gowardhan et al., 2004) unterdrückt.

Wie bereits weiter oben angedeutet, wird im Zusammenhang mit Migrations- und Invasionsprozessen besonders die Expression von Matrix-Metalloproteinasen durch die FGF-Signaltransduktion beeinflusst. In den cDNA-Makro-Array Experimenten konnte ebenfalls eine Beeinflussung durch die FGFR4-Expression und insbesondere durch das Arginin-Allel des Rezeptors nachgewiesen werden. Dies könnte auch das unterschiedliche Verhalten des Glycin- und Arginin-Allels des FGFR4 in Transwell-Migrations- und Transwell-Invasionsexperimenten erklären. Auch Suyama et al. (2002) haben von einer Regulation der MMP9-Expression durch FGFR1 berichtet. Da in den FGFR4_{ex}-GST Pulldown-Experimenten ursprünglich auch t-PA und Annexin II gefunden wurde, kann das Plasminogen-Aktivator-System auch eine Rolle in FGFR4-beeinflusster Migration spielen.

Ähnlich wie uPA, gebunden an dessen Rezeptor uPAR, spaltet t-PA, gebunden an den Membranrezeptor Annexin II, Plasminogen durch Proteolyse und ermöglicht dadurch die nachfolgende Aktivierung bzw. Mobilisierung von Matrix-Metalloproteinasen, ECM-Proteinen oder Pro-Hormonen aus der ECM (Myöhänen and Vaheri, 2004; Duffy and Duggan, 2004). Es wurde für Prostatakrebs gezeigt, dass das Arginin-Allel des FGFR4 eine höhere uPAR-Expression und eine höhere Invasivität der Krebszellen zur Folge hat (Wang et al., 2004). Die Induktion der uPA-Expression wird vorwiegend durch eine Stimulation mit FGF2 und einer anschließend eingeleiteten FGF-Signaltransduktion erreicht, wodurch die Invasivität von Krebszellen erhöht wird (Reuning et al., 1996; Cavallaro et al., 1998; Mori et al., 2000; Billottet et al., 2002 and 2004). Dabei wird ebenfalls der MAPK-Signalweg über MEKK1 bzw. ERK1/2 aktiviert, wobei auch speziell eine Beteiligung von FGFR4 neben FGFR1 gezeigt werden konnte (Besser et al., 1995; Miralles et al., 1998; Giuliani et al., 1999; Witowsky et al., 2003). PLC γ ist dabei nicht an der FGF2-induzierten uPA-Expression beteiligt (Roghani et al., 1996) und eine Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges führt eher zu einer Suppression der uPA-Expression (Mochizuki et al., 2002). Schließlich nimmt wahrscheinlich auch das Integrinheterodimer $\alpha_v\beta_3$ eine wichtige Funktion in der FGF2-vermittelten uPA-Expression ein (Rusnati et al., 1997). Zwischen der Expression von uPA und FGF2 scheint es einen Rückkopplungsmechanismus zu geben, da aktiviertes Plasmin ECM-gebundenes FGF2 mobilisieren kann (Ribatti et al., 1999;

George et al., 2001). Abschließend werden uPA und PAI-1 auch als prognostische Marker in Brustkrebs angesehen (Han et al., 2005).

Da die Array-Experimente keine unterschiedlichen Cadherin-Expressionen zwischen der Glycin- und Arginin-Isoform des FGFR4 bzw. den cytoplasmatisch-deletierten/kinase-inaktiven FGFR4-Isoformen ergaben, kann wohl ein sog. Cadherin-Switch von E-Cadherin zu N-Cadherin und umgekehrt ausgeschlossen werden, wodurch das unterschiedliche Verhalten in Migrations- und Invasionsexperimenten der einzelnen FGFR4-Klone erklärt werden kann (Cavallaro et al., 2002; Hazan et al., 2004).

Die Signaltransduktion von FGF-Rezeptoren kann allerdings, wie in der Einleitung bereits zusammengefasst, sehr unterschiedlich ausfallen. Durch eine veränderte Bindung von cytoplasmatischen Adapterproteinen kann deshalb ebenfalls das unterschiedliche Verhalten des Glycin- und Arginin-Allels des FGFR4 in physiologischen Experimenten erklärt werden. Proteine wie Frs2, Shp2, Grb2, Shc, Src, Gab1 oder Pyk2 können auf unterschiedliche Art und Weise im FGF-Rezeptor-Signalkomplex gebunden sein. Außerdem kann dies theoretisch ebenso bedeuten, dass die Signaltransduktion von FGFR4(G388) bzw. FGFR4(R388) über die selektive Aktivierung von verschiedenen Signalwegen wie z.B. RAS/MAPK, PI3-Kinase/AKT oder PLC γ erfolgen kann (Meyer et al., 2004; Dailey et al., 2005).

Da in den cDNA-Array Experimenten eine Beeinflussung der BclX_L-Expression durch FGFR4 nachgewiesen werden konnte, die später auch eine entscheidende Rolle in den Apoptose-Experimenten spielte, stellt sich abschließend die Frage, ob die BclX_L-Coexpression mit FGFR4 auch das Migrations- und Invasionsverhalten von Krebszellen entscheidend neben anderen Faktoren mitbestimmen könnte. Bcl-2 und BclX_L induzieren z.B. eine Suppression der MMP9-Expression und beeinflussen in Rattenglioma Zellen nachweislich das MMP9/TIMP-1 Verhältnis (Oliver et al., 2000). Es konnte desweiteren eine Interaktion von Bcl-2/BclX_L mit Paxillin gezeigt werden (Sorenson, 2004). Paxillin ist als Interaktionspartner von Integrinen und FAK/SRC bekannt und wird während der Ausbildung von Lamellipodien bzw. Fokalkontakten im Migrationsprozess phosphoryliert (Mitra et al., 2005). In den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 konnte bei einer erhöhten BclX_L-Expression noch ein verbessertes Metastasierungspotenzial von Krebszellen beobachtet werden (Fernandez et al., 2000; Martin et al., 2004). In klinischen Studien mit Brustkrebs- und Leberkarzinomproben wurde deutlich, dass durch die BclX_L-Expression die rezidiv-freie Überlebenszeit verkürzt und die Lymphknotenmetastasierung begünstigt wird; es wird deshalb angenommen, dass BclX_L demzufolge ein schlechter prognostischer Faktor für die Krebsprogression ist (Olopade et al., 1997; Watanabe et al., 2004).

Eine TGF α -Stimulation und eine dadurch erhöhte BclX_L-Expression sorgt schließlich für eine Suppression der Anoikis von Epithelzellen (Rosen et al., 2001), wodurch die apoptose-resistenten Zellen ihren entscheidenden Vorteil in der Metastasierung gewinnen können.

Anhand dieser Beispiele wird klar, dass BclX_L nicht nur als Apoptoseresistenzgen, sondern auch als wichtiges Molekül im Metastasierungsprozess von Krebszellen angesehen werden muss. BclX_L wird deshalb bereits als Zielgen für therapeutische Ansätze eingestuft, da es überexprimiert in Brustkrebszellen *in vivo* mit einer erhöhten Lymphknotenmetastasierung in Nacktmausexperimenten korreliert (Espana et al., 2004). Die unterschiedlichen Eigenschaften des FGFR4 Glycin- oder Arginin-Allels in Migrations- und Invasionsexperimenten können also auch durch eine veränderte BclX_L-Expressionsstärke zustande kommen, was in zukünftigen Experimenten jedoch erst noch überprüft werden muss.

IV.4 Der FGF-Rezeptor 4 vermittelt Apoptose-Resistenz von Krebszellen durch eine regulierte Co-Expression von BclX_L

Es wurde bereits in der Einleitung erklärt, dass die FGF-Rezeptoren 1-3 die Apoptose von Zellen beeinflussen können (I.3.2). Ebenso konnte eine derartige Abhängigkeit auch für FGFR4 in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Krebszelllinien MDA-MB-453 R1/9, 769-P und TE671 wiesen nach einem Knockdown von FGFR4 eine erhöhte Apoptoserate bzw. eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Doxorubicin-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzelllinien auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass FGFR4 die Chemotherapeutika-Resistenz moduliert, indem die Co-Expression von BclX_L, wie in der Einleitung kurz dargestellt ein Protein mit anti-apoptotischer Wirkung, induziert wird. Die unveränderten Expressionsniveaus von BclX_L und die gleichzeitig beobachteten Apoptosesensitivitäten der MDA-MB-453 R1 FGFR4-Knockdown Zellen könnten mit BclX_L-Deaminierungen vermittelt durch die Tyrosinkinase Lck zusammenhängen. In diesem Fall entstehen nachweislich Aktivitätsunterschiede von BclX_L und es werden Effekte hervorgerufen, welche sonst nur mit verschiedenen BclX_L-Expressionen assoziiert werden könnten (Zhao et al., 2004a).

Die besondere Wirkung von BclX_L wurde im Allgemeinen auch besonders in dessen früheren Überexpressionsuntersuchungen deutlich, in denen normal-proliferierende oder auch Krebszellen dem natürlichen programmierten Zelltod entgehen konnten (Boise et al., 1993; Gottschalk et al.,

1994; Schott et al., 1995). Jedoch nicht nur Überexpressions-, sondern auch Knockdown- bzw. Antisense-RNA-Studien verdeutlichen den Einfluss von BclX_L auf die Apoptose. So führte z.B. in Brustkrebs (Simoes-Wust et al., 2000), in Kolonkarzinoma (Rashmi et al., 2005), in Kehlkopfkrebs (Liu et al., 2005), in Magenkrebs (Lei et al., 2005), in Melanoma (Strasberg Rieber et al., 2001), in Blasenkrebs (Lebedeva et al., 2001), in Lungenadenoma (Leech et al., 2000) und in Prostatakrebs (Lebedeva et al., 2000) eine Suppression der BclX_L-Expression zu einer erhöhten Apoptoserate bzw. Sensitivität gegenüber einer Chemotherapeutika-Behandlung. Dies erklärt, warum BclX_L als prognostischer Marker für verschiedene Krebsformen diskutiert wird und zwar nicht nur im Zusammenhang mit der Metastasierung von Krebszellen, sondern auch bezüglich seiner anti-apoptotischen Wirkung während der Chemotherapiebehandlung von Krebspatienten (Liu et al., 1998; Schaich et al., 2001; Zhao et al., 2004b).

In den Experimenten dieser Arbeit konnte insbesondere eine Beeinflussung des MAPK-Signalweges und eine FGFR4-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Der AKT-Signalweg scheint dabei bei der Vermittlung der Apoptoseresistenz eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch in anderen früheren Untersuchungen konnte bei Verwendung eines Inhibitors gegen den PI3-Kinase-Signalweg und die S6-Kinase (p70) eine davon unabhängige Expression von BclX_L festgestellt werden (Aronica et al., 2000), was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Andererseits wurde auch schon von einer AKT-abhängigen Aktivierung von NFκB und einer dadurch induzierten BclX_L-Expression berichtet (Gauthier et al., 2001a/b). Zusätzlich sorgt eine FGF1/2 Stimulation von Zellen über Aktivierung der Kinase ERK2 für eine entsprechende BclX_L-Expression und einer damit verbundenen Apoptoseresistenz (Bryckaert et al., 1999).

Abgesehen davon wird die BclX_L-Expression auch durch die STAT-Proteinfamilie (STAT1/3/5) reguliert und induziert (Grad et al., 2000; Battle and Frank, 2002). In unseren Zelllinien konnte keine erhöhte Phosphorylierung und Aktivität von STAT3 und 5 im Zusammenhang mit einer erhöhten BclX_L-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), wobei dies nochmals einer genaueren Untersuchung bezüglich STAT1 bedarf.

Die BclX_L-Expression kann jedoch noch durch andere Stimuli wie z.B. IL2/3/6, GM-CSF, CSF, LIF oder EPO induziert werden, wobei neben NFκB und STATs auch die Transkriptionsfaktoren aus der Ets-Familie oder c-Fos und c-Jun an dessen Aktivierung beteiligt sein können (Sevilla et al., 2001).

Prinzipiell wurden die FGFR4-Knockdown Zelllinien MDA-MB-453, TE671 und 769-P nur auf ihre Apoptosesensitivität und nicht auch auf Zellzykluseffekte hin untersucht, obwohl im Zusammenhang mit FGFR4 (und HER2) schon von einer Regulation der CyclinD-Expression

berichtet wurde (Koziczak et al., 2004). Das Protein BclX_L spielt nämlich auch eine Rolle im Zellzyklus. Die Regulation der BclX_L-Expression und dessen Suppression wird dabei wahrscheinlich entscheidend von dem Tumorsuppressor p53, welcher für Zellzyklusarrest und Apoptose bei entsprechenden „Stimuli“ verantwortlich ist, bestimmt (Yu and Zhang, 2005). Daneben wurde eine Interaktion von p53 mit BclX_L oder Bcl2 an der Mitochondrienmembran nachgewiesen, wodurch die anti-apoptotischen Proteine inaktiviert und Apoptose induziert wurde (Mihara et al., 2003; Haupt et al., 2003; Schuler and Green, 2005). Die anti-proliferatorischen Eigenschaften finden sich konserviert in der ganzen Bcl2-Familie von anti-apoptotischen Proteinen (Bonney-Berard et al., 2004). In früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wurde tatsächlich eine anti-proliferatorische Eigenschaft von FGFR4 unabhängig von dessen Allelstatus festgestellt (Dissertation Bange, 2001).

Zudem wurde auch noch beobachtet, dass BclX_L und Bcl2 den Myc-induzierten Zellzykluseintritt von ruhenden G₀-Zellen verzögern können, indem die p27-Expression erhöht wird (Greider et al., 2002). BclX_L und Bcl2 werden z.B. auch in Paclitaxel/Taxol-behandelten Zellen mit einem induzierten G₂/M-Arrest in phosphorylierter Form gefunden (Scatena et al., 1998; Yamamoto et al., 1999).

Die FGFR4-Knockdown Zelllinien zeigten erstaunlicherweise in den Apoptose-Assays nur eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Chemotherapeutika-Behandlung mit Doxorubicin oder Cyclophosphamide, jedoch nicht gegenüber Cis-Platin und Taxotere (Korrespondenz Roidl A). Wenn die Apoptoseresistenz entscheidend durch eine erhöhte BclX_L-Konzentration in der Zelle bedingt wird, sollte auch bei anderen Chemotherapeutika ein Effekt gegeben sein. Ein Einfluss von BclX_L auf das Überleben von Krebszellen wurde bereits für ein ganzes Spektrum von verschiedenen verwendeten Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubicin (Luo et al., 2000; Broome et al., 2002; Simoes-Wust et al., 2002; Emi et al., 2005), Cis-Platin (Dole et al., 1995; Minn et al., 1995), Paclitaxel (Poruchynsky et al., 1998; Simoes-Wust et al., 2002; Emi et al., 2005), Docetaxel (Emi et al., 2005), Cyclophosphamide (Dole et al., 1995; Simoes-Wust et al., 2002) oder Etoposide (Dole et al., 1995; Minn et al., 1995) nachgewiesen. Dies kann bedeuten, dass neben FGFR4 und BclX_L noch andere Proteine eine wichtige Funktion in der Ausbildung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in den hier verwendeten Zelllinien einnehmen.

Zu diesen Molekülen können insbesondere HER2 und Prolactin zählen. HER2 wird einerseits häufig mit FGFR4 co-exprimiert, die FGFR4-Signaltransduktion aktiviert andererseits den Prolactin-Promotor und induziert dessen Expression (I.2.2/3; Yu et al., 2002a). Außerdem findet man bei HER2-Überexpression und konstitutiver Aktivierung eine autokrine Prolactin-Expression und eine dadurch bedingte Aktivierung des JAK2-Signalweges (Yamauchi et al.,

2000). Durch EGF-Stimulation wird desweiteren eine Induktion der Prolactin-Expression festgestellt, welche über eine EGFR- oder eine HER2-Signaltransduktion vermittelt werden kann (Manfroid et al., 2005).

Durch Prolactin wird jedoch auch die Expression von BclX_L erhöht (Kochendoerfer et al., 2003), was erklären könnte, auf welche Art und Weise FGFR4 die BclX_L-Expression reguliert. Die BclX_L-Expression kann durch zusätzliche Her2-Aktivierung verstärkt werden. BclX_L wird nachweislich mit HER2 co-exprimiert (Kumar et al., 1996). Durch eine Inhibition des HER2-Signalweges durch den blockierenden Antikörper Herceptin oder durch Inhibition des SRC-Signalweges durch siRNA bzw. einen selektiven Kinaseinhibitor kann die BclX_L-Expression seinerseits supprimiert werden (Karni et al., 1999; Grazette et al., 2004; Guo et al., 2004; Dubska et al., 2005).

Auch Experimente mit einem blockierenden FGFR4-Antikörper könnten die Apoptose-Resistenz von FGFR4-exprimierenden Krebszelllinien gegenüber einer Doxorubicin-Behandlung supprimieren. Blockierende Antikörper gegen HER2 (Herceptin), gegen EGFR (Erbix) oder gegen CD20 (Rituxan), dem B-Lymphozyten-Antigen, werden heute bevorzugt während der Chemotherapie eingesetzt, um quantitativ und effektiv das Überleben von Krebszellen zu verringern und deren Apoptose auszulösen (Trikha et al., 2002; Houshmand and Zlotnik, 2003; Hynes and Lane, 2005).

Für BclX_L wurden zwar erfolgreich einige chemische Verbindungen wie z.B. 2-Methoxy Antimycin A als Inhibitor getestet, um die Apoptosesensitivität von Krebszellen zu erhöhen (Huang, 2000; O'Neill et al., 2004); es bietet sich allerdings aufgrund der Erfahrungen mit anderen bereits erfolgreich eingesetzten, therapeutischen Antikörpern auch die Verwendung eines blockierenden Antikörpers gegen den FGF-Rezeptor 4 (und u.U. HER2) an, um die Apoptoseresistenz von Brustkrebszellen während einer gleichzeitig durchgeführten Chemotherapie zu unterdrücken. In der Zukunft wären deshalb Apoptose-Assays von besonderem Interesse, in denen die Krebszellen neben einem Chemotherapeutikum mit einem derartigen FGFR4 Antikörper co-inkubiert werden und anschließend auf ihr Apoptoseverhalten hin untersucht werden. Insbesondere eine Kombinationstherapie der Krebspatienten mit Herceptin und einem blockierenden FGFR4-Antikörper könnte dann eine bedeutende Verbesserung in der Behandlung von Brustkrebs, verbunden mit einer Verlängerung der rezidiv-freien Überlebenszeit bewirken und somit neue Perspektiven in der Brustkrebstherapie eröffnen.

V Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Interaktion von FGFR4 mit NCAM zeigten keinen Unterschied in den Bindungseigenschaften des Glycin- und Arginin-Allels des FGFR4 für dieses Zelladhäsionsmolekül. Eine Interaktion von FGFR4 und NCDH konnte nicht nachgewiesen werden. In GST-Pulldown-Experimenten konnte eine Interaktion der extrazellulären Domäne des FGFR4 mit FGFR3, t-PA und Annexin II gefunden werden. TAP-Pulldown-Experimente lassen T-Zell Rezeptor beta, MTHSP 75, ATP-Synthase-F1-Komplex, Tubulin, sowie IKK alpha als potenzielle FGFR4-Bindungspartner vermuten.

Durch cDNA-Makro-Array Analysen wurde die Co-Expression von BclX_L mit FGFR4 identifiziert. Insbesondere eine eindeutige Co-Expression von FGFR4 mit den dabei untersuchten klassischen Zelladhäsionsmolekülen konnte nicht nachhaltig festgestellt werden. Die Expression von FGFR4(R388) führte allerdings zu einer erhöhten Expression von Matrix-Metalloproteinasen im Vergleich zum FGFR4(G388) bzw. der Mock-Kontrolle.

Die Untersuchungen zur Zellmigration und Krebszellinvasion validierten die suppressorische Wirkung des Glycin-Allels des FGFR4 in MDA-MB-231 und MDA-MB-435S Zellen, während das Arginin-Allel des FGFR4 die Migration, die Krebszellinvasion und das Branching begünstigte. Cytoplasmatisch-deletierte und kinase-inaktive Isoformen des FGFR4 verhielten sich in diesen physiologischen Assays ähnlich suppressorisch wie das Glycin-Allel des Rezeptors, wobei durch die cytoplasmatische Deletion des FGFR4 kein signifikanter Unterschied im Allelstatus dieser FGF-Rezeptor-Isoformen mehr beobachtet werden konnte.

Durch Apoptose-Assays konnte gezeigt werden, dass der FGFR4 die Chemoresistenz von Krebszellen erhöht, bzw. durch Knockdown des Rezeptors umgekehrt die Sensitivität von Krebszellen gegenüber einer Chemotherapeutikum-Behandlung verstärkt wird. Dabei werden die physiologischen Effekte in den verschiedenen Zelllinien durch eine Steigerung der eingesetzten Doxorubicin-Dosen verstärkt. Die Beeinflussung der Chemoresistenz oder Sensitivität von Krebszellen wird durch die grundlegende Co-Expression von BclX_L und FGFR4 vermittelt. Die Signaltransduktion der FGFR4-induzierten BclX_L-Expression erfolgt dabei über den ERK1/2-MAPK-Signalweg, was durch transiente, induzierbare Zellsysteme nachgewiesen wurde.

VI Literaturverzeichnis

- Abraham R, Schäfer J, Rothe M, Bange J, Knyazev P and Ullrich A (2005). Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. *J Biol Chem* 280(40). 34123-34132
- Adams JC (2001). Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci* 58, 371-392
- Aebersold R and Mann M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207
- Ahmed NU, Ueda M, Ito A, Ohashi A, Funasaka Y and Ichihashi M (1997). Expression of fibroblast growth factor receptors in naevus-cell naevus and malignant melanoma. *Melanoma Res* 7, 299-305
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB and Cohen P (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol* 7, 261-269
- Alitalo K (2001). The fatal detachment. *Nat Cell Biol* 3, E157-E159
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171
- Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR and Hawkins PT (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8, 684-691
- Andl CD and Rustgi AK (2005). No one-way street: cross-talk between E-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol Ther* 4(1), 28-31
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B and Martinou JC (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276, 11615-11623
- Armand AS, Launay T, Pariset C, Gaspera BD, Charbonnier F and Chanoine C (2003). Injection of FGF6 accelerates regeneration of the soleus muscle in adult mice. *Biochim Biophys Acta* 1642, 97-105
- Armstrong E, Partanen J, Cannizzaro L, Huebner K and Alitalo K (1992). Localisation of the fibroblast growth factor receptor-4 gene to chromosome region 5q33-qter. *Gen Chrom Cancer* 4(1), 94-98
- Aronica MA, Goenka S and Boothby M (2000). IL-4-dependent induction of Bcl-2 and Bcl-X(L) in activated T lymphocytes through a STAT6- and PI3-kinase-independent pathway. *Cytokine* 12(6), 578-587
- Auguste P, Gursel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP and Bikfalvi A (2001). Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 61(4), 1717-1726
- Avraham KB, Givol D, Avivi A, Yayon A, Copeland NG and Jenkins NA (1994). Mapping of murine fibroblast growth factor receptors refines regions of homology between mouse and human chromosomes. *Genomics* 21, 656-658
- Bachelder RE, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S and Mercurio AM (1999). Activation of p53 function in carcinoma cells by the $\alpha_6\beta_4$ integrin. *J Biol Chem* 274, 20733-20737
- Bange J (2001). Untersuchungen zur Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der Tumorentwicklung. Dissertation an der LMU München
- Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, Knyazeva T, Müller S, Gärtner S, Sures I, Wang H, Imyanitov E, Häring HU, Knyazev P, Iacobelli S, Höfler H and Ullrich A (2002). Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg³⁸⁸ allele. *Cancer Res* 62, 840-847

- Battle E (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89
- Battle TE and Frank DA (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2, 381-392
- Baylin SB (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice (Oncology)* 2 (Supplement1), S4-S11
- Becker M, Bräuninger A, Wolf G, Kaufmann M and Strebhardt K (2000). Identification and functional characterization of the human and murine fibroblast growth factor receptor 4 promoters. *Biochem Biophys Res Comm* 276, 493-501
- Ben-Zvi T, Yayon A, Gertler A and Monsonego-Ornan E (2006). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 interact with and modulate fibroblast growth factor receptor signaling. *J Cell Sci* 119, 380-387
- Besser D, Presta M and Nagamine Y (1995). Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth Differ* 6(8), 1009-1017
- Billottet C, Elkhatib N, Thiery JP and Jouanneau J (2004). Targets of fibroblast growth factor 1 (FGF-1) and FGF-2 signaling involved in the invasive and tumorigenic behavior of carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 15(10), 4725-4734
- Billottet C, Janji B, Thiery JP and Jouanneau J (2002). Rapid tumor-development and potent vascularization are independent events in carcinoma producing FGF-1 or FGF-2. *Oncogene* 21(53), 8128-8139
- Birchmeier W and Behrens J (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26
- Blagoev B, Kratchmarova I, Ong SE, Nielsen M, Foster LJ and Mann M (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotech* 21, 315-318
- Blasi F and Carmeliet P (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 932-943
- Boise LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G and Thompson CB (1993). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74(4), 597-608
- Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marcais A and Marvel J (2004). Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644, 159-168
- Borges E, Jan Y and Ruoslahti E (2000). Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* 275(51), 39867-39873
- Bottcher RT, Pollet N, Delius H and Niehrs C (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signaling. *Nat Cell Biol.* 6, 38-44
- Breckenridge DG and Xue D (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by Bcl-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 647-652
- Brooks PC, Strombald S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP and Chersesh DA (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α V β 3. *Cell* 85, 683-693
- Broome HE, Yu AL, Diccianni M, Camitta BM, Monia BP and Dean NM (2002). Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes T-cell acute lymphoblastic leukemia cells to chemotherapeutic drugs. *Leuk Res* 26(3), 311-316

- Bryckaert M, Guillonneau X, Hecquet C, Courois Y and Mascarelli F (1999). Both FGF1 and bcl-x synthesis are necessary for the reduction of apoptosis in retinal pigmented epithelial cells by FGF2: role of the extracellular signal-regulated kinase 2. *Oncogene* 18(52), 7584-7593
- Burgess WH, Dionne CA, Kaplow J, Mudd R, Friesel R, Zilberstein A, Schlessinger J and Jaye M (1990). Characterization and cDNA cloning of phospholipase C- γ , a major substrate for Heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 10, 4770-4777
- Byers S, Amaya E, Munroe S and Blaschuk O (1992). Fibroblast growth factor receptors contain a conserved HAV region common to cadherins and influenza strain A hemagglutinins: a role in protein-protein interactions? *Dev Biol* 152(2), 411-414
- Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ and Plow EF (2000). A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 6, 851-860
- Cai J, Wu Y, Mirua T, Pierce JL, Lucero MT, Albertine KH, Spangrude GJ and Rao MS (2002). *Dev Biol* 251, 221-240
- Calera MR, Venkatakrishnan A and Kazlauskas A (2004). VE-cadherin increases the half-life of VEGF receptor 2. *Exp Cell Res* 300(1), 248-256
- Cancilla B, Ford-Perriss MD and Bertram JF (1999). Expression and localization of fibroblast growth factors and fibroblast growth factor receptors in the developing rat kidney. *Kid Int* 56, 2025-2039
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, et al., (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23, 18-20
- Cavallaro U and Christofori G (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-Cams in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 118-132
- Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M and Christofori G (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 3, 650-657
- Cavallaro U, Schaffhauser B and Christofori G (2002). Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Letters* 176, 123-128
- Cavallaro U, Wu Z, Di Palo A, Montesano R, Pepper MS, Maier JA and Soria MR (1998). FGF-2 stimulates migration of Kaposi's sarcoma-like vascular cells by HGF-dependent relocalization of the urokinase receptor. *FASEB J* 12(11), 1027-1034
- Chapman HA and Wei Y (2001). Protease crosstalk with integrins: the urokinase receptor paradigm. *Thromb Haemost* 86, 124-129
- Cheburkin IuV, Kniazeva TG, Peter S, Kniazev IuP, Karelin MI, Shkol'nik MI, Evtushenko VI, Hanson KP, Ullrich A and Kniazev PG (2002). Molecular portrait of human kidney carcinomas: the gene expression profiling of protein-tyrosine kinases and tyrosine phosphatases which controlled regulatory signals in the cells. *Mol Biol (Mosk)* 36(3), 480-490
- Chen C and Okayama H (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752
- Chen R, Kim O, Li M, Xiong X, Guan JL, Kung HJ, Chen H, Shimizu Y and Qiu Y (2001). Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. *Nat Cell Biol* 3, 439-444
- Chenais F, Virella G and Patrick CC and Fudenberg HH (1977). Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcus protein A-sepharose as substrate. *J Immunol Methods* 18, 183-192

- Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM et al., (1997). Frequent translocation t(4 ;14)(p16.3 ;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16, 260-264
- Choi HH, Jong HS, Park JH, Choi S, Lee JW, Kim TY, Otsuki T, Namba M and Bang YJ (2003). A novel ginseng saponin metabolite induces apoptosis and down-regulates fibroblast growth factor receptor 3 in myeloma cells. *Int J Oncol* 23(4), 1087-1093
- Christofori G (2003). Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule- mediated signalling during tumour progression. *EMBO J* 22(10), 2318-2323
- Chung CT and Miller RH (1993). Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol* 218, 621-627
- Citores L, Wesche J, Kolpakova E and Olsnes S (1999). Uptake and intracellular transport of acidic fibroblast growth factor: evidence for free and cytoskeleton-anchored fibroblast growth factor receptors. *Mol Biol Cell* 10, 3835-3848
- Cochet C, Gill GN, Meisenhelder J, Cooper JA and Hunter T (1984). C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259, 2553-2558
- Comijn J (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278
- Cool S, Jackson R, Pincus P, Dickinson I and Nurcombe V (2002b). Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) expression in newborn murine calvaria and primary osteoblast cultures. *Int J Dev Biol* 46, 519-523
- Cool SM, Sayer RE, van Heumen WR, Pickles JO and Nurcombe V (2002). Temporal and spatial expression of fibroblast growth factor receptor 4 isoforms in murine tissues. *Histochem J* 34, 291-297
- Cory S and Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656
- Cramer LP (1999). Organization and polarity of actin filament networks in cells: implication for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 65, 173-205
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A and Basilico C (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 233-247
- Dailey L, Laplantine E, Priore R and Basilico C (2003). A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J Cell Biol* 161, 1053-1066
- Davis RJ and Czech MP (1985). Tumor-promoting phorbol esters cause the phosphorylation of epidermal growth factor receptors in normal human fibroblasts at threonine 654. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1974-1978
- De Cecco L, Marchionni L, Gariboldi M, Reid JF, Lagonigro MS, Caramuta S, Ferrario C, Bussani E, Mezzanzanica D, Turatti F, Delia D, Daidone MG, Oggioni M, Bertuletti N, Ditto A, Raspagliesi F, Pilotti S, Pierotti MA, Canevari S and Schneider C (2004). Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2. *Oncogene* 23, 8171-8183
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O and Bazzoni G (2000). The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44, 743-748
- Delfini MC and Duprez D (2004). Ectopic Myf5 or MyoD prevents the neuronal differentiation program in addition to inducing skeletal muscle differentiation, in the chick neural tube. *Development* 131, 713-723
- Dell'Era P, Mohammadi M and Presta M (1999). Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Mol Biol Cell* 10, 23-33

- DeMali KA, Balciunaite E and Kazlauskas A (1999). Integrins enhance platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent responses by altering the signal relay enzymes that are recruited to the PDGF beta receptor. *J Biol Chem* 274(28), 19551-19558
- Demiroglu A, Steer EJ, Heath C, Taylor K, Bentley M, Allen SL et al., (2001). The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood* 98, 3778-3783
- Dichmann DS, Miller CP, Jensen J, Heller RS and Serup P (2003). Expression and misexpression of members of the FGF and TGF β families of growth factors in the developing mouse pancreas. *Dev Dyn* 226, 663-674
- Dode C and Hardelin JP (2004). Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? *J Mol Med* 82, 725-734
- Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N et al., (2003). Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33, 463-465
- Dole MG, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G and Castle VP (1995). Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 55(12), 2576-2582
- Dubska L, Andera L and Sheard MA (2005). HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 579(19), 4149-4158
- Duffy MJ and Duggan C (2004). The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clinical Biochem* 37, 541-548
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25), 14863-14868
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide siRNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836), 428-429
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC et al., (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544-1548
- Emi M, Kim R, Tanabe K, Uchida Y and Toge T (2005). Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7(6), 940-952
- Espana L, Fernandez Y, Rubio N, Torregrosa A, Blanco J and Sierra A (2004). Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 87(1), 33-44
- Eswarkumar VP, Lax I and Schlessinger J (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 139-149
- Ezzat S, Huang P, Dackiw A and Asa SL (2005). Dual inhibition of RET and FGFR4 restrains medullary thyroid cancer cell growth. *Clin Cancer Res* 11, 1336-1341
- Ezzat S, Yu S and Asa SL (2003). Ikaros isoforms in human pituitary tumors. Distinct localisation, histone acetylation, and activation of the 5' fibroblast growth factor receptor-4 promoter. *Amer J Path* 163(3), 1177-1184
- Ezzat S, Zheng L and Asa SL (2004). Pituitary tumor-derived fibroblast growth factor receptor 4 isoform disrupts Neural Cell-Adhesion Molecule/N-Cadherin signaling to diminish cell adhesiveness: a mechanism underlying pituitary neoplasia. *Mol Endocrin* 18(10), 2543-2552
- Ezzat S, Zheng L, Yu SJ and Asa SL (2001). A soluble dominant negative fibroblast growth factor receptor 4 isoform in human MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 287, 60-65
- Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, Wu GE and Asa SL (2002). Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest* 109, 69-78

- Fedor-Chaiken M, Hein PW, Stewart JC, Brackenbury R and Kinch MS (2003). E-cadherin binding modulates EGF receptor activation. *Cell Commun Adhes* 10(2), 105-118
- Feng S, Xu J, Wang F, Kan M and McKeehan WL (1996). Nuclear localization of a complex of fibroblast growth factor(FGF)-1 and an NH₂-terminal fragment of FGF receptor isoforms R4 and R1 α in human liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1310, 67-73
- Fernandez Y, Espana L, Manas S, Fabra A and Sierra A (2000). Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ* 7(4), 350-359
- Feroze-Merzoug F, Schober MS and Chen YQ (2001). Molecular profiling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 20(3-4), 165-171
- Fioretos T, Panagopoulos I, Lassen C, Swedin A, Billstrom R, Isaksson M, et al., (2001). Fusion of the BCR and the fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) genes as a result of t(8;22)(p11;q11) in a myeloproliferative disorder: the first fusion gene involving BCR but not ABL. *Genes Chrom Cancer* 32, 302-310
- Friedl P and Bröcker EB (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57, 41-64
- Friedl P and Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanism. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374
- Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M, Williams PM, Soriano R, Corpuz R, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Foster J, Stephan JP, Tsai SP and Stewart TA (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145(6), 2594-2603
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T and Birchmeier W (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-231
- Gao G and Goldfarb M (1995). Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. *EMBO J* 14(10), 2183-2190
- Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A and Vachon PH (2001a). Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanism. *Am J Physiol, Cell Physiol* 280, 1540-1554
- Gauthier R, Laprise P, Cardin E, Harnois C, Plourde A, Reed JC, Vezina A and Vachon PH (2001b). Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of Bcl-2 homologs and involvement of signaling pathways. *J Cell Biochem* 82, 339-355
- Gavarrá-Niecko V, Schaller MD and Dunty JM (2003). FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22, 359-374
- George SJ, Johnson JL, Smith MA and Jackson CL (2001). Plasmin-mediated fibroblast growth factor-2 mobilisation supports smooth muscle cell proliferation in human saphenous vein. *J Vasc Res* 38(5), 492-501
- Gershoni JM and Palade GE (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131, 1-15
- Gianelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG and Quaranta V (1997). Induction of cell migration by matrix-metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-228
- Giri D, Ropiquet F and Ittmann M (1999). Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1063-71
- Giuliani R, Bastaki M, Coltrini D and Presta M (1999). Role of endothelial cell extracellular signal-regulated kinase 1/2 in urokinase-type plasminogen activator upregulation and *in vitro* angiogenesis by fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci* 112(15), 2597-2606
- Givol D and Yayon A (1992). Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 6, 3362-3369

- Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG and Pollard TD (1991). Regulation of phospholipase C- γ 1 by profiling and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233
- Gomez-Roman JJ, Saenz P, Gonzales JC, Escuredo K, Santa Cruz S, Junquera C, Simon L, Martinez A, Gutierrez Banos JL, Lopez-Brea M, Esparza C and Val-Bernal JF (2005). Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* 11, 459-465
- Gottschalk AR, Boise LH, Thompson CB and Quintas J (1994). Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(15), 7350-7354
- Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, McKie AB, McCracken SRC, Robson CN and Leung HY (2005). Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer* 92, 320-327
- Gowardhan B, West AF, Robson CN and Leung HY (2004). Adenovirus-mediated expression of a soluble fibroblast growth factor receptor inhibits in vitro growth of prostate DU145 cells. *Prostate* 61(1), 50-59
- Grad JM, Zeng XR and Boise LH (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* 12(6), 543-549
- Graham FL and van der Eb AJ (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539
- Grazette LP, Boecker W, Matsui T, Semigran M, Force TL, Hajjar RJ and Rosenzweig A (2004). Inhibition of ErbB2 causes mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes: implications for herceptin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44(11), 2231-2238
- Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL and McDonald N (1989). Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J* 8, 4115-4123
- Greider C, Chattopadhyay A, Parkhurst C and Yang E (2002). BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 21(51), 7765-7775
- Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A and Leader M (2003). Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology* 42(1), 70-76
- Guo G, Wang T, Gao Q, Tamae D, Wong P, Chen T, Chen WC, Shively JE, Wong JY and Li JJ (2004). Expression of ErbB2 enhances radiation-induced NF-KappaB activation. *Oncogene* 23(2), 535-545
- Guo W and Giancotti FG (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 816-826
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP and Dikic I (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466
- Hajra KM, Chen DY and Fearon ER (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613-1618
- Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y and Kakudo K (2005). Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer. *Oncol Rep* 14(1), 105-112
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T and Nishida E (2002). Sprouty 1 and Sprouty 2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signaling pathway. *Nat Cell Biol* 11, 850-858
- Hanahan D and Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364
- Hardcastle Z, Chalmers AD and Papalopulu N (2000). FGF-8 stimulates neuronal differentiation through FGFR-4a and interferes with mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *Curr Biol* 10(23), 1511-1514

- Harmer NJ, Pellegrini L, Chirgadze D, Fernandez-Recio J and Blundell TL (2004). The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry* 43, 629-640
- Hart KC, Robertson SC, Kanemitsu MY, Meyer AN, Tynan JA and Donoghue DJ (2000). Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3 and FGFR4. *Oncogene* 19, 3309-3320
- Haugsten EM, Sorensen V, Brech A, Olsnes S and Wesche J (2005). Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors. *J Cell Sci* 118, 3869-3881
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z and Haupt Y (2003). Apoptosis – the p53 network. *J Cell Sci* 116, 4077-4085
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L and Aaronson SA (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol* 148, 779-790
- Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I and Suyama K (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 155-163
- Heldin CH (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223
- Hinsby AM, Olsen JV and Mann M (2004). Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling. A role for insulin receptor substrate-4. *J Biol Chem* 279(45), 46438-46447
- Hinsby AM, Olsen JV, Bennett KL and Mann M (2003). Signaling initiated by overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 investigated by mass spectrometry. *Mol & Cell Proteomics* 2.1, 29-36
- Hirohashi S (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153, 333-339
- Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliever SA, Goodwin B and Jones SA (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes & Dev* 17, 1581-1591
- Houshmand P and Zlotnik A (2003). Targeting tumor cells. *Curr Opin Cell Biol* 15, 640-644
- Hu Y, Fang X, Dunham SM, Prada C, Stachowiak EK and Stachowiak MK (2004). 90-kDa ribosomal S6 kinase is a direct target for the nuclear fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): a role in FGFR1 signaling. *J Biol Chem* 279(28), 29325-29335
- Huang Z (2000). Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 19, 6627-6631
- Hubbard SR, Mohammadi M and Schlessinger J (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 273, 11987-11990
- Hughes SE (1997). Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem & Cytochem* 45(7), 1005-1019
- Hunter T (1998). The Croonian lecture, 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosines: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 583-605
- Hynes NE and Lane HA (2005). ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-354
- Hynes RO (2002). A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8, 918-921
- Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM and Mohammadi M (2001). Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7182-7187
- Igney FH and Krammer PH (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288

- Ijichi H, Otsuka M, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Kanai F, Arakawa Y, Seki N, Shimizu K, Miyazono K, Kawabe T and Omata M (2004). Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 23(5), 1043-1051
- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M and Yamamoto T (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544
- Inglis-Broadgate SL, Thomson RE, Pellicano F, Tartaglia MA, Pontikis CC, Cooper JD and Iwata T (2005). FGFR3 regulates brain size by controlling progenitor cell proliferation and apoptosis during embryonic development. *Dev Biol* 279(1), 73-85
- Itoh N and Ornitz DM (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* 20(11), 563-569
- Jaakkola P, Kontusaari S, Kauppi T, Maata A and Jalkanen M (1998). Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. *FASEB J* 12, 959-969
- Jaakkola S, Salmikangas P, Nylund S, Partanen J, Armstrong E, Pyrhonen S, Lehtovirta P and Nevanlinna H (1993). Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer* 54(3), 378-382
- Jaye M, Schlessinger J and Dionne CA (1992). Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1135, 185-199
- Jiang Yu S, Zheng L, Ladanyi M, Asa SL and Ezzat S (2004). Sp1-mediated transcriptional control of fibroblast growth factor receptor 4 in sarcomas of skeletal muscle lineage. *Clin Cancer Res* 10, 6750-6758
- Jin MH, Sawamoto K, Ito M and Okano H (2000). The interaction between the Drosophila secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor. *Mol Cell Biol* 20, 2098-2107
- Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Leverson JD, Hunter T and Liu YC (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 8, 309-312
- Johnson DE and Williams LT (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advanc Cancer Res* 60, 1-41
- Johnston CL, Cox HC, Gomm JJ and Coombes C (1995b). Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. *J Biol Chem* 270, 30643-30650
- Johnston CL, Cox HC, Gomm JJ and Coombes RC (1995a). bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. *Biochem J* 306, 609-616
- Kaabeche K, Guenou H, Bouvard D, Didelot N, Listrat A and Marie PJ (2005). Cbl-mediated ubiquitination of alpha5 integrin subunit mediates fibronectin-dependent osteoblast detachment and apoptosis induced by FGFR2 activation. *J Cell Sci* 118(6), 1223-1232
- Kan M, Wu X, Wang F. and McKeehan L (1999). Specificity for fibroblast growth factors determined by heparan sulfate in a binary complex with the receptor kinase. *J Biol Chem* 274(22), 15947-15952
- Karni R, Jove R and Levitzki A (1999). Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18(33), 4654-4662
- Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ and Parise LV (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390, 632-636
- Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim CK, Schlessinger J and Rhee SG (1991). PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma phosphorylation on residues 783 and 1254. *Cell* 65,435-441
- Kim I, Moon S, Yu K, Kim U and Koh GY (2001). A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas(1). *Biochim Biophys Acta* 1518(1-2), 152-156

- Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Ghos YS and Kwon YG (2002). Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 277(31), 27872-27879
- Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V and Bock E (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem* 94, 1169-1179
- Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Khnykin D, Citores L and Osnes S (2000). Requirement for C-terminal end of fibroblast growth factor receptor 4 in translocation of acidic fibroblast growth factor to cytosol and nucleus. *J Cell Sci* 113, 1827-1838
- Kniazev IuP, Cheburkin IuV, Spikermann K, Peter S, Jenster G, Bangma KH, Karelin MI, Shkol'nik MI, Urbanskii AI, Evtushenko VI, Ullrich A and Kniazev PG (2003). Gene expression profiles of protein kinases and phosphatases obtained by hybridization with cDNA arrays: molecular portrait of human prostate carcinoma. *Mol Biol (Mosk)* 37(1), 97-111
- Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ and Buckley AR (2003). Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol* 178(2), 265-273
- Kong M, Wang CS and Donoghue DJ (2002). Interaction of fibroblast growth factor receptor 3 and the adapter protein SH2-B. A role in STAT5 activation. *J Biol Chem* 277(18), 15962-15970
- Koritschoner NP, Bartunek P, Knespel S, Blendinger G and Zenke M (1999). The fibroblast growth factor receptor FGFR-4 acts as a ligand dependent modulator of erythroid cell proliferation. *Oncogene* 18, 5904-5914
- Kos FJ and Chin CS (2002). Costimulation of T cell receptor-triggered IL-2 production by Jurkat T cells via fibroblast growth factor receptor 1 upon its engagement by CD56. *Immunol and Cell Biol* 80, 364-369
- Kostrzewa M and Müller U (1998). Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Gen* 9, 131-135
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I and Schlessinger J (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation of the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702
- Koziczak M and Hynes N (2004). Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and erbB2 in regulation of cyclin D1 translation. *J Biol Chem* 279(48), 50004-50011
- Kumar R, Mandal M, Lipton A, Harvey H and Thompson CB (1996). Overexpression of HER2 modulates bcl-2, bcl-XL, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2(7), 1215-1219
- Kurose H, Okamoto M, Shimizu M, Bito T, Marcelle C, Noji S and Ohuchi H (2005). FGF19-FGFR4 signaling elaborates lens induction with the FGF8-L-Maf cascade in the chick embryo. *Dev Growth Differ* 47, 213-223
- La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D and Capella C (2005). Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 54, 37-41
- La Vallee TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X and Maciag T (1998). Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *J Cell Biol* 141(7), 1647-1658
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C et al., (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822), 860-921
- Landgren E, Klint P, Yokote K and Claesson-Welsh L (1998). Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding. *Oncogene* 17(3), 283-291

- Langren E, Blume-Jensen P, Courtneidge SA and Claesson-Welsh L (1995). Fibroblast growth factor receptor-1 regulation of Src family kinases. *Oncogene* 10, 2027-2035
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO and Davis RW (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(24), 13057-13062
- Lauffenburger DA and Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369
- Lax I, Wong A, Lamothe B, Lee A, Frost A, Hawes J and Schlessinger J (2002). The docking protein FRS2 α controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Mol Cell* 10, 709-719
- Lebedeva I, Raffo A, Rando R, Ojwang J, Cossum P and Stein CA (2001). Chemosensitization of bladder carcinoma cells by bcl-xL antisense oligonucleotides. *J Urol* 166(2), 461-469
- Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P and Stein CA (2000). Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res* 60(21), 6052-6060
- Lee J, Dull TJ, Lax I, Schlessinger J and Ullrich A (1989). HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *EMBO J* 8, 167-173
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA and Williams LT (1989). Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245, 57-60
- Leech SH, Olie RA, Gautschi O, Simoes-Wust AP, Tschopp S, Haner R, Hall J, Stahel RA and Zangenmeister-Wittke U (2000). Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *Int J Cancer* 86(4), 570-576
- Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Delezoide AL, Munnich A and Bonaventure J (1998). Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia. *J Biol Chem* 273, 13007-13014
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16 (21), 4743-4751
- Lei XY, Zhong M, Feng LF, Yan CY, Zhu BY, Tang SS and Liao DF (2005). Silencing of Bcl-XL expression in human MGC-803 gastric cancer cells by siRNA. *Acta Biochim Biophys Sin* 37(8), 555-560
- Lim YP, Low BC, Lim J, Wong ESM and Guy GR (1999). Association of atypical protein kinase C isoforms with the docking protein FRS2 in fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* 274, 19025-19034
- Liu D, Aguirre-Ghiso J, Estrada Y and Ossowski L (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for *in vivo* growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* 1, 445-457
- Liu F, He CW, Zhang YF and Zhou KY (2005). RNA interference by expression of short hairpin RNAs suppresses bcl-xL gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 26(2), 228-234
- Liu J, Huang C and Zhan X (1999). Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* 18, 6700-6706
- Liu JR, Fletcher B, Page C, Hu C, Nunez G and Baker V (1998). Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecol Oncol* 70(3), 398-403
- Loo BM, Darwish K, Vainikka S, Saarikettu J, Vihko P, Hermonen J, Goldman A, Alitalo K and Jalkanen M (2000). Production and characterization of the extracellular domain of recombinant human fibroblast growth factor receptor 4. *Int J Biochem & Cell Biol* 32, 489-497

- Loo BM, Kreuger J, Jalkanen M, Lindahl U and Salmivirta M (2001). Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4. *J Biol Chem* 276(20), 16868-16876
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z and Hunter T (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499-515
- Luo D, Cheng SC, Xie H and Xie Y (2000). Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem Cell Biol* 78(2), 119-126
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490
- Manfroid I, van de Weerd C, Baudhuin A, Martial JA and Muller M (2005). EGF stimulates Pit-1 independent transcription of the human prolactin pituitary promoter in human breast cancer SK-BR-3 cells through its proximal AP-1 response element. *Mol Cell Endocrinol* 229(1-2), 127-139
- Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M and Basilico C (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 149(6), 1297-1308
- Marics I, Padilla F, Guillemot JF, Scaal M and Marcelle C (2002). FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development* 129, 4559-4569
- Mariotti A, Kedeshian PA, Dans M, Curatola AM, Gagnoux-Palacios L and Giancotti FG (2001). EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin $\alpha_6\beta_4$ at hemidesmosomes: a role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* 155(3), 447-458
- Martin SS, Ridgeway AG, Pinkas J, Lu Y, Reginato MJ, Koh EY, Michelman M, Daley GQ, Brugge JS and Leder P (2004). A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. *Oncogene* 23(26), 4641-4645
- Mercurio AM and Rabinovitz (2001). Towards a mechanistic understanding of tumor invasion - lessons from the $\alpha_6\beta_4$ integrin. *Semin Cancer Biol* 11, 129-141
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ and Hung MC (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8, 361-367
- Meyer AN, Gastwirt RF, Schlaepfer DD and Donoghue DJ (2004). The cytoplasmic tyrosine kinase Pyk2 as a novel effector of fibroblast growth factor receptor 3 activation. *J Biol Chem* 279(27), 28450-28457
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P and Moll UM (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590
- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA and Saikumar P (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276, 18361-18374
- Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM et al., (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 246-250
- Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, Nelson D, Laramore G and Pilepich M (2002). Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol* 15(12), 1366-1373
- Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, Noble WS and Fields S (2005). Large-scale identification of Yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(34), 12123-12128
- Minn AJ, Rudin CM, Boise LH and Thompson CB (1995). Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86(5), 1903-1910

- Miralles F, Ron D, Baiget M, Felez J and Munoz-Canoves P (1998). Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by basic fibroblast growth factor and serum in myogenesis. *J Biol Chem* 273(4), 2052-2058
- Mitra SK, Hanson DA and Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68
- Mochizuki Y, Tsuda S, Kanetake H and Kanda S (2002). Negative regulation of urokinase-type plasminogen activator production through FGF-2-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase. *Oncogene* 21(46), 7027-7033
- Mohammadi M, Cिकic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M and Schlessinger J (1996b). Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol* 16, 977-989
- Mohammadi M, Dionne CA, Li W, Li N, Spivak T, Honegger AM, Jaye M and Schlessinger J (1992). Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without effecting mitogenesis. *Nature* 358, 681-684
- Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fischer R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M and Schlessinger J (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C- γ 1. *Mol Cell Biol* 11, 5068-5078
- Mohammadi M, Olsen SK and Ibrahimi OA (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 107-137
- Mohammadi M, Schlessinger J and Hubbard SR (1996a). Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* 86, 577-587
- Mori T, Abe T, Wakabayashi Y, Hikawa T, Matsuo K, Yamada Y, Kuwano M and Hori S (2000). Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor correlates with enhanced invasion activity of human glioma cells mediated by transforming growth factor- α or basic fibroblast growth factor. *J Neurooncol* 46(2), 115-123
- Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, Umehara N, Ohata N, Yoshida A, Shimizu K and Inoue H (2003). Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer* 98(10), 2245-2250
- Morrison RS, Yamaguchi F, Bruner JM, Tang M, McKeehan W and Berger MS (1994). Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 54, 2794-2799
- Mosesson Y, Shtiegman Keren, Katz M, Zwang Y, Vereb G, Szollosi J and Yarden Y (2003). Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 278(24), 21323-21326
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt1, 263-273
- Myamoto T, Leconte I, Swain JL and Fox JC (1998). Autocrine FGF signaling is required for vascular smooth muscle cell survival in vitro. *J Cell Physiol* 177(1), 58-67
- Myöhänen H and Vaheri A (2004). Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci* 61, 2840-2858
- Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Kan M, McKeehan WL, Nakahara M and Takada K (1996). Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF-receptor-1 in human malignant salivary gland tumors. *J Pathology* 178, 429-436

- Nakamura N, Lijima T, Mase K, Furuya S, Kano J, Morishita Y and Noguchi M (2004). Phenotypic differences of proliferating fibroblasts in the stroma of lung adenocarcinoma and normal bronchus tissue. *Cancer Sci* 95(3), 226-232
- Nakamura T, Mochizuki Y, Kanetake H and Kanda S (2001). Signals via FGF receptor 2 regulate migration of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289 (4), 801-806
- Nakata S (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33, 29-55
- Nawrocki-Raby B (2003). Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* 105, 790-795
- Neilson KM and Friesel R (1996). Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane and kinase domain. *J Biol Chem* 271, 25049-25057
- Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, Pham TA, Dillard-Telm L, Tsai SP, Stephan JP, Stinson J, Stewart T and French DM (2002). A mouse model of hepatocellular carcinoma. Ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Path* 160(6), 2295-2307
- Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boilly B and Hondermarck H (2000). The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J Biol Chem* 275(39), 30009-30018
- O'Neill J, Manion M, Schwartz P and Hockenbery DM (2004). Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1705, 43-51
- Okada H and Mak TW (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603
- Oliver L, Tremblais K, Guriec N, Martin S, Meflah K, Menanteau J and Vallette FM (2000). Influence of bcl-2-related proteins on matrix metalloproteinase expression in a rat glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 273(2), 411-416
- Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB and Recant WM (1997). Overexpression of Bcl-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastasis. *Cancer J Sci Am* 3(4), 230-237
- Olsen SK, Ibrahimi OA, Raucci A, Zhang F, Eliseenkova AV, Yayon A et al., (2004). Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 935-940
- Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Lakx S, Gotoh N, Schlessinger J and Lax I (2000). FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 20, 979-989
- Ong SH, Lim YP, Low BC and Guy GR (1997). SHP2 associates directly with tyrosine phosphorylated p90 (SNT) protein in FGF-stimulated cells. *Biochim Biophys Res Commun* 238, 261-266
- Ornitz DM and Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3), 3005-3012
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G and Goldfarb M (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292-7
- Ostrovsky O, Berman B, Gallagher J, Mulloy B, Fernig DG, Delehede M and Ron D (2002). Different effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor complexes. *J Biol Chem* 277(25), 2444-2453
- Ozen M, Giri D, Ropiquet F, Mansukhani A and Ittmann M (2001). Role of fibroblast growth factor receptor signaling in prostate cancer cell survival. *J Natl Cancer Inst* 93(23), 1783-1790

- Partridge CR, Hawker JR Jr and Forough R (2000). Overexpression of a secretory form of FGF-1 promotes MMP-1-mediated endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 78(3), 487-499
- Patarroyo M, Tryggvason K and Virtanen I (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12, 197-207
- Pawson T and Schlessinger J (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* 3, 434-442
- Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H and Christofori G (1999). Reduced expression of neuronal cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med* 5(3), 286-291
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H and Christofori G (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193
- Peter ME and Krammer PH (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35
- Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J and Williams L (1994). Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J* 13(14), 3296-3301
- Plath T, Detjen K, Welzel M, von Marshall Z, Murphy D, Schirner M, Wiedenmann B and Rosewicz S (2000). A novel function for the tumor suppressor p16^{INK4a}: induction of anoikis via upregulation of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor. *J Cell Biol* 150, 1467-1478
- Ponta H, Sherman L and Herrlich PA (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33-45
- Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV and Fojo T (1998). Bcl-xl is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 58(15), 3331-3338
- Puscheck EE, Patel Y and Rappolee DA (1997). Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Mol Cell Endocrin* 132, 169-176
- Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J and Lowy DR (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 23(8), 1739-1748
- Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Horiguchi H, Tashiro T, Li CC, Hirokawa M, Kovacs K and Ezzat S (2004). Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas: relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *J Clin Endocrin & Metabol* 89(4), 1904-1911
- Qin LX and Tang ZY (2004). Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 130(9), 497-513
- Raffioni S, Thomas D, Foehr ED, Thompson LM and Bradshaw RA (1999). Comparison of the intracellular signaling response by three chimeric fibroblast growth factor receptors in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci* 96, 7178-7183
- Raftopoulou M and Hall A (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32
- Rahimi N and Kazlauskas A (1999). A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 10(10), 3401-3407
- Rappsilber J, Siniosoglou S, Hurt EC and Mann M (2000). A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. *Anal Chem* 72(2), 267-275
- Rashmi R, Kumar S and Karunakaran D (2005). Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL. *Carcinogenesis* 26(4), 713-723

- Rathmell JC and Thompson CB (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 17, 781-828
- Reuning U, Dixon EP, Little SP and Bang NU (1996). Mitogen crosstalk accompanying urokinase receptor expression in stimulated vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 392(2), 125-128
- Ribatti D, Leali D, Vacca A, Giuliani R, Gualandris A, Roncali L, Nolli ML and Presta M (1999). In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci* 112(23), 4213-4221
- Riedl SJ and Shi Y (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907
- Roghani M, Mohammadi M, Schlessinger J and Moscatelli D (1996). Induction of urokinase-type plasminogen activator by fibroblast growth factor (FGF)-2 is dependent on expression of FGF receptors and does not require activation of phospholipase Cgamma 1. *J Biol Chem* 271(49), 1154-1159
- Ron D, Reich R, Chedid M, Lengel C, Cohen OE, Chan AML, Neufeld G, Miki T and Tronick SR (1993). Fibroblast growth factor receptor 4 is a high affinity receptor for both acidic and basic fibroblast growth factor but not for keratinocyte growth factor. *J Biol Chem* 268(8), 5388-5394
- Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A and Ittmann M (2000). Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 60, 4245-4250
- Ropiquet F, Huguenin S, Villette JM, Ronfle V, Le Brun G, Maitland NJ, Cussenot O, Fiet J and Berthon P (1999). FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostate epithelial PNT1A cells. *Int J Cancer* 82(2), 237-243
- Rosen K, Coll ML, Li A and Filmus J (2001). Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 276(40), 37273-37279
- Roumiantsev S, Krause DS, Neumann CA, Dimitri CA, Asiedu F, Cross NC et al., (2004). Distinct stem cell myeloproliferative/T lymphoma syndromes induced by ZNF198-FGFR1 and BCR-FGFR1 fusion genes from 8p11 translocations. *Cancer Cell* 5, 287-298
- Rozenblatt-Rosen O, Mosonogo-Ornan E, Sadot E, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Ginsberg D and Yayon A (2002). Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J Cell Sci* 115, 553-562
- Rusnati M, Tanghetti E, Dell'Era P, Gualandris A and Presta M (1997). Alpha3 beta3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol Biol Cell* 8(12), 2449-2461
- Ryungsa K (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-X_L in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 336-343
- Saffell JL, Walsh FS and Doherty P (1994). Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum. *J Cell Biol* 125(2), 427-436
- Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS and Doherty P (1998). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18(2), 231-242
- Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D and Basilico C (1999). FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 13(11), 1361-1366
- Sahni M, Raz R, Coffin JD, Levy D and Basilico C (2001). STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* 128, 2119-2129

- Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, Saito M, Uchida Y, Inose M, Kasai T, Niiyama T, Fukunaga H, Arimura K and Osame M (2000). An overexpression of fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor 4 in a severe clinical phenotype of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 23, 490-497
- Savill J and Fadok V (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788
- Scangos G and Ruddle FH (1981). Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review. *Gene* 14, 1-10
- Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD and Pietenpol JA (1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J Biol Chem* 273, 30777-30784
- Schaich M, Illmer T, Seitz G, Mohr B, Schakel U, Beck JF and Ehninger G (2001). The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 86(5), 470-477
- Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokka R and Quaranta V (2003). Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 161(1), 197-209
- Schlessinger J (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103, 211-225
- Schlessinger J (2003). Signal transduction. Autoinhibition control. *Science* 300, 750-752
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A et al., (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 6, 743-750
- Schott AF, Apel IJ, Nunez G and Clarke MF (1995). Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 11(7), 1389-1394
- Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodi J, Buer J and Lauber J (2002). CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer* 86(8), 1250-1256
- Schuler M and Green DR (2005). Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends in Genetics* 21(3), 182-187
- Seliger B, Lichtenfels R and Kellner R (2003). Detection of renal cell carcinoma-associated markers via proteome- and other 'ome'-based analyses. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2(3), 194-212
- Seligson DB (2005). The tissue micro-array as a translational research tool for biomarker profiling and validation. *Biomarkers* 10(Suppl 1), 77-82
- Sevilla L, Zaldumbide A, Pognonec P and Boulukos KE (2001). Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-XL protein by Ets, Rel/NFκB, STAT and AP1 transcription factor families. *Histol Histopathol* 16, 595-601
- Shah RNH, Ibbitt JC, Alitalo K and Hurst HC (2002). FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1α. *Oncogene* 21, 8251-8261
- Shi Y (2002). Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB and Tsujimoto Y (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228
- Shingu K, Fujimori M, Ito K, Hama Y, Kasuga Y, Kobayashi S, Ito N and Amano J (1998). Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 in thyroid diseases: difference between neoplasms and hyperplastic lesions. *Endocrine J* 45, 35-43

- Shiotsugu J, Katsuyama Y, Arima K, Baxter A, Koide T, Song J, Chandraratna RAS and Blumberg B (2004). Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. *Development* 131, 2653-2667
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH and Schlaepfer DD (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256
- Simoes-Wust AP, Olie RA, Gautschi O, Leech SH, Haner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA and Zangenmeister-Wittke U (2000). Bcl-xl antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 87(4), 582-590
- Simoes-Wust AP, Schurpf T, Hall J, Stahel RA and Zangenmeister-Wittke U (2002). Bcl-2/Bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* 76(2), 157-166
- Singh S, Sadacharan S, Su S, Belldegrun A, Persad S and Singh G (2003). Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res* 63(9), 2306-2311
- Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR and Albelda SM (2005). Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 11(11), 3974-3986
- Song H, Jin X and Lin J (2004). Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 23(50), 8301-8309
- Sorenson CM (2004). Interaction of bcl-2 with Paxillin through its BH4 domain is important during ureteric bud branching. *J Biol Chem* 279(12), 11368-11374
- Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U and Dragani TA (2005). The functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 23(29), 7307-7311
- Spivak-Kroizman T, Mohammadi M, Hu P, Jaye M, Schlessinger J and Lax I (1994). Point mutation in the fibroblast growth factor receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 269, 14419-14423
- St. Bernard R, Zheng L, Liu W, Winer D, Asa SL and Ezzat S (2005). Fibroblast growth factor receptors as molecular targets in thyroid carcinoma. *Endocrinology* 146(3), 1145-1153
- Stadler CR (2005). Charakterisierung der Signaltransduktion und Funktion der Rezeptortyrosin-Kinase FGFR4 in der Krebsprogression. Dissertation an der TU München
- Stadler CR, Knyazev P, Bange J and Ullrich A (2005). FGFR4 Gly388 isotype suppresses motility of MDA-MB-231 breast cancer cells by EDG-2 gene repression. *Cell Signal* epub ahead of print
- Steger K, Tetens F, Seitz J, Grothe C and Bergmann M (1998). Localization of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) protein and the receptors FGFR 1-4 in normal human seminiferous epithelium. *Histochem Cell Biol* 110, 57-62
- Sternlicht MD and Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516
- Strasberg Rieber M, Zangenmeister-Wittke U and Rieber M (2001). p53-Independent induction of apoptosis in human melanoma cells by a bcl-2/bcl-xL bispecific antisense oligonucleotide. *Clin Cancer Res* 7(5), 1446-1451
- Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W and Ullrich A (2004). Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111, 213-217
- Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM and Cheresch DA (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155, 459-470

- Sturla LM, Merrick AE and Burchill SA (2003). FGFR3IIIS: a novel soluble FGFR3 spliced variant that modulates growth is frequently expressed in tumour cells. *Br. J Cancer* 89(7), 1276-1284
- Suyama K, Shapiro I, Guttman M and Hazan RB (2002). A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and FGF receptor. *Cancer Cell* 2, 301-314
- Swanson JA and McNeil PL (1987). Nuclear reassembly excludes large macromolecules. *Science* 238, 548-550
- Takaishi S, Sawada M, Morita Y, Seno H, Fukuzawa H and Chiba T (2000). Identification of a novel alternative splicing of human FGF receptor 4: soluble-form splice variant expressed in human gastrointestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 267, 658-662
- Tanimoto Y, Yokozeki M, Hiura K, Matsumoto K, Nakanishi H, Matsumoto T, Marie PJ and Moriyama K (2004). A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. *J Biol Chem* 279(44), 45926-45934
- Thaminy S, Auerbach D, Arnoldo A and Stagljar I (2003). Identification of novel ErbB3- interacting factors using the split-ubiquitin membrane Yeast two-hybrid system. *Genome Res* 13, 1744-1753
- Thaminy S, Miller J and Stagljar I (2004). The split-ubiquitin membrane-based Yeast two-hybrid system. *Meth Mol Biol* 261, 297-312
- Thomas SM and Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609
- Thornberry NA and Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316
- Tomita K (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60, 3650-3654
- Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D and Stewart TA (2005). Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* 143(5), 1741-1747
- Trikha M, Yan L and Nakada MT (2002). Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr Opin Biotech* 13, 609-614
- Trudel S, Ely S, Farooqi Y, Affer M, Robbiani DF, Chesi M and Bergsagel PL (2004). Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 103(9), 3521-3528
- Trusolino L, Bertotti A and Comoglio PM (2001). A signaling adapter function for $\alpha_6\beta_4$ integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-654
- Tsujimoto Y and Shimizu S (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7, 1174-1181
- Tuominen H, Heikinheimo P, Loo BM, Kataja K, Oker-Blom C, Uutela M, Jalkanen M and Goldman A (2001). Expression and glycosylation studies of human FGF receptor 4. *Prot Expr and Purif* 21, 275-285
- Tyers M and Mann M (2003). From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197
- Udayakumar TS, Klein RD, Maliner MS, Nagle RB and Bowden GT (2001). Aberrant expression of fibroblast growth factor receptor-1 in prostate epithelial cells allows induction of promatrilysin expression by fibroblast growth factors. *Int J Cancer* 91(2), 187-192
- Udayakumar TS, Nagle RB and Bowden GT (2004). Fibroblast growth factor-1 transcriptionally induces membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in prostate carcinoma cell line. *Prostate* 58(1), 66-75
- Ullrich A and Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212

- Utton MA, Eickholt B, Howell FV, Wallis J and Doherty P (2001). Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *J Neurochem* 76(5), 1421-1430
- Vainikka S, Joukov V, Klint P and Alitalo K (1996). Association of a 85-kDa serine kinase with activated fibroblast growth factor receptor-4. *J Biol Chem* 271(3), 1270-1273
- Vainikka S, Joukov V, Wennström S, Bergman M, Pelicci PG and Alitalo K (1994). Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). *J Biol Chem* 269(28), 18320-18326
- Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Basilico C, Jaye M and Alitalo K (1992). Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J* 11(12), 4273-4280
- Valesky M, Spang AJ, Fisher GW, Farkas DL and Becker D (2002). Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis. *Mol Med* 8(2), 103-112
- Valve E, Martikainen P, Seppänen J, Oksjoki S, Hinkka S, Anttila L, Grenman S, Klemi P and Härkönen P (2000). Expression of fibroblast growth factor (FGF)-8 isoforms and FGF receptors in human ovarian tumors. *Int J Cancer* 88, 718-725
- van der Geer P, Hunter T & Lindberg RA (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathway. *Annu Rev Cell Biol* 10, 251-337
- van Heuman WRA, Claxton C and Pickles JO (1999). Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine. *IUBMB Life* 48, 73-78
- Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN and Waldman FM (2003). Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 63, 2872-2880
- Vrolijk H, Sloos W, Mesker W, Franken P, Fodde R, Morreau H and Tanke H (2003). Automated acquisition of stained tissue microarrays for high-throughput evaluation of molecular targets. *J Mol Diagn* 5(3), 160-167
- Wagenaar GTM, ter Horst SAJ, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van der Velden PA, de Heer E, Hiemstra PS, Poorthuis BJHM and Walther FJ (2004). Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Rad Biol & Med* 36(6), 782-801
- Wang J, Stockton DW and Ittmann M (2004). The fibroblast growth factor receptor-4 Arg³⁸⁸ allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 10, 6169-6178
- Wang JF, Zhang XF and Groopman JE (2001). Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem* 276(45), 41950-41957
- Wang JK and Goldfarb M (1994). Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. *Oncogene* 14, 1767-1778
- Wang JK, Gao G and Goldfarb M (1994). Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials. *Mol Cell Biol* 14(1), 181-188
- Wang JK, Xu H, Li HC and Goldfarb M (1996). Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. *Oncogene* 13, 721-729
- Wang LY, Edenson SP, Yu YL, Senderowicz L and Turck CW (1996). A natural kinase-deficient variant of fibroblast growth factor receptor 1. *Biochemistry* 35(31), 10134-10142
- Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933

- Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Sugita A, Tateishi N, Mominoki K, Matsuda S and Kobayashi N (2004). Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma. *Surgery* 135(6), 604-612
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT and Horwitz AF (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161
- Webster MK and Donoghue DJ (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* 15, 520-527
- Webster MK and Donoghue DJ (1997). FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet* 13, 178-182
- Weigelt B, Peterse JL and van't Veer LJ (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5(8), 591-602
- Weinstein M, Xu X, Ohoyama K and Deng CX (1998). FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125, 3615-3623
- Wessel D and Flügge UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-143
- Wilkie AO (1997). Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum. Mol Genet* 6, 1647-1656
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS and Doherty P (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13, 583-594
- Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper SD, Walsh FS and Doherty P (2001). Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem* 276(17). 43879-43886
- Witowsky J, Abell A, Johnson NL, Johnson GL and Cuevas BD (2003). MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression. *J Biol Chem* 278(8), 5941-5946
- Wong A, Lamothe B, Lee A, Schlessinger J and Lax I (2002). FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb-2 mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6684-6690
- Wright TJ, Hatch EP, Karabagli H, Karabagli P, Schoenwolf GC and Mansour SL (2003). Expression of mouse fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor genes during early inner ear development. *Dev Dyn* 228, 267-272
- Xian W, Schwertfeger KL, Vargo-Gogola T and Rosen JM (2005). Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J Cell Biol* 171(4), 663-673
- Xie MH, Holcomb I, Deuel B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, Liang J, Brush J, Gu Q, Hillan K, Goddard A and Gurney AL (1999). FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* 11(10), 729-735
- Xu H, Lee KW and Goldfarb M (1998). Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adaptor proteins. *J Biol Chem* 273, 17987-17990
- Xu J (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 154, 1069-1080
- Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ and Harrison SC (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* 3, 629-638
- Yamamoto K, Ichijo H and Korshmeier SJ (1999). Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478

- Yamauchi T, Yamauchi N, Ueki K, Sugiyama T, Waki H, Miki H, Tobe K, Matsuda S, Tsushima T, Yamamoto T, Fujita T, Taketani Y, Fukayama M, Kimura S, Yazaki Y, Nagai R and Kadowaki T (2000). Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J Biol Chem* 275(43), 33937-33944
- Yarden J and Ullrich A (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57, 443-478
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y and Nakao K (2004). Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10, 80-86
- Yasumoto H, Matsubara A, Mutaguchi K, Usui T and McKeehan WL (2004). Restoration of fibroblast growth factor receptor 2 suppresses growth and tumorigenicity of malignant human prostate carcinoma PC-3 cells. *Prostate* 61(3), 236-242
- Yayon A, Zimmer Y, Shen GH, Avivi A, Yarden Y and Givol D (1992). A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J* 11, 1885-1890
- Yokote H, Fujita K, Jing X, Sawada T, Liang S, Yao L, Yan X, Zhang Y, Schlessinger J and Sakaguchi K (2005). Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(52), 18866-18871
- Yoshimura N, Sano H, Hashiramoto A, Yamada R, Nakajima H, Kondo M and Oka T (1998). The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol and Immunopathology* 89, 28-34
- Yu C, Wang F, Jin C, Huang X and McKeehan WL (2005). Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J Biol Chem* 280(18), 17707-17714
- Yu C, Wang F, Jin C, Wu X, Chan W and McKeehan WL (2002b). Increased carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *Am J Pathol* 161(6), 2003-2010
- Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX and McKeehan WL (2000b). Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem* 275(20), 15482-15489
- Yu J and Zhang L (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Comm* 331, 851-858
- Yu K, Herr AB, Waksman G and Ornitz DM (2000). Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14536-14541
- Yu S, Asa SL and Ezzat S (2002b). Fibroblast growth factor receptor 4 is a target for the Zinc-finger transcription factor Ikaros in the pituitary. *Mol Endocrinol* 16(5), 1069-1078
- Yu S, Asa SL, Weigel RJ and Ezzat S (2003). Pituitary tumor AP-2 α recognizes a cryptic promoter in intron 4 of fibroblast growth factor receptor 4. *J Biol Chem* 278(22), 19597-19602
- Yu S, Zheng L, Asa SL and Ezzat S (2002a). Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) mediates signaling to the prolactin but not the FGFR4 promoter. *Am J Phys Endocrinol Metab* 283, E490-E495
- Zang XP, Nguyen TN and Pento JT (2002). Specific and non-specific KGF inhibition of KGF-induced breast cancer cell motility. *Anticancer Res* 22(5), 2539-2545
- Zhan X, Hu X, Hampton B, Burgess WH, Friesel R and Maciag T (1993). Murine cortactin is Phosphorylated in response to fibroblast growth factor-1 on tyrosine residues late in the G1 Phase of the BALB/c 3T3 cell cycle. *J Biol Chem* 268, 24427-24431

-
- Zhan X, Plourde C, Hu X, Friesel R and Maciag T (1994). Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin. *J Biol Chem* 269, 20221-20224
- Zhang F, Clarke JDW, Santos-Ruiz L and Ferretti P (2002). Differential regulation of fibroblast growth factor receptors in the regenerating amphibian spinal cord *in vivo*. *Neuroscience* 114(4), 837-848
- Zhang L, El-Hodiri HM, Ma HF, Zhang X, Servetnick M, Wensel TG and Jamrich M (2003). Targeted expression of the dominant-negative FGFR4a in the eye using Xrx1A regulatory sequences interferes with normal retinal development. *Development* 130, 4177-4186
- Zhang Y, Wang H, Toratani S, Sato JD, Kan M, McKeegan WL and Okamoto T (2001). Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20), 11336-11340
- Zhao P and Hoffman EP (2004). Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn* 229, 380-392
- Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeegan WL, Boskey AL, Pachman LM, Sartorelli V and Hoffman EP (2005). Fgfr4 is required for effective muscle regeneration *in vivo*: delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem* epub ahead of print
- Zhao R, Yang FT and Alexander DR (2004). An oncogenic tyrosine kinase inhibits DNA repair and DNA-damage-induced Bcl-xL deamidation in T cell transformation. *Cancer Cell* 5(1), 37-49
- Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, Briere J, Leboeuf C, Plassa LF, Turpin E, Cayuela JM, Ameisen JC, Gisselbrecht C and Janin A (2004b). Prognostic significance of bcl-xL gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma. *Blood* 103(2), 695-697
- Zhu L, Somlo G, Zhou B, Shao J, Bedell V, Slovak ML, Liu X, Luo J and Yen Y (2005). Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 4(5), 787-798
- Zutter MM, Santoro SA, Staats WD and Tsung YL (1995). Re-expression of the $\alpha_2\beta_1$ integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7411-7415
- Zwick E, Bange J and Ullrich A (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 8, 161-173

VII Abkürzungsverzeichnis

ACH	Achandroplasie
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Cell adhesion molecule
CAT	Kollektiv-amoeboide Transition
CML	Chronische myeloische Leukämie
COL	Kollagen
CSF	Colony stimulating factor
DISC	Death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant-negativ
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DXR/Dox	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acedic-acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMS	8p11 myeloproliferatives Syndrom
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoietin
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FPLC	Fast performance liquid chromatography
FSHD	Facioscapulohumeral muscular dystrophy
FXR	Farnesyl-X-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony stimulating factor
HCH	Hypochondroplasie
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
IL	Interleukin
ITGA	Integrin alpha
ITGB	Integrin beta
KGF	Keratinocyte growth factor
KO	Knock-out
LAMC	Laminin gamma
LIF	Leukemia inhibitory factor
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAT	Mesenchymal-amoeboide Transition
MM	Multiples Myelom
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSP	Maspin

MTHSP	Mitochondriales Heat Shock Protein
NCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NCDH	N-Cadherin
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PRL	Prolactin
PTB	Phosphotyrosine binding
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDC	Syndecan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2	Src-homology domain
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAP	Tandem affinity purification
TCA	Trichlor Acetic Acid
TD I/II	Thanatophorische Dysplasie I und II
TL	Totallysat
TMA	Tissue-Micro-Array
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
uPA	Urokinase plasminogen activator
VDAC	Voltage dependent anion channel
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Universität Regensburg zu betreuen.

Danken möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich während meiner Promotion auch fachlich in meinem Laboralltag unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Pjotr Knyazev, Tatjana Knyazeva, Silvia Gärtner, Uta Eichelsbacher, Renate Gautsch, Heike Stubbe, Ingrid Bohrer und Rudolfine Illmensee.

Ein weiteres Dankeschön geht an alle (jetzigen und auch ehemaligen) Office- und Laborkollegen, die sowohl für ein angenehmes Arbeitsklima als auch für fruchtbare Diskussionen sorgten – danke insbesondere Sepp, Kurt, Johannes, Jens, Horst, Nina, Sushil, Indi, Olli, Kunkel und G-Punkt.

Darüber hinaus danke ich dem Montagsjournalclub für die interessanten Exkursionen in andere fachverwandte Themen. Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Iris Gmeinder für die Organisation der zahlreichen Verwaltungsangelegenheiten bedanken.

Ein besonders liebes Dankeschön gilt meiner Frau Boglarka und meiner ganzen Familie, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vor allem für ihre immerwährende emotionale Unterstützung während der ganzen Zeit.

Hiermit erkläre ich, Hans-Jürgen Berger, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

München, den 10. April 2006

(Hans-Jürgen Berger)