Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Ulm
Abteilung Innere Medizin II
Sektion Nephrologie
Leiter: Prof. Dr. med. F. Keller

Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren Hepatocyte Growth Factor, Epidermal Growth Factor und Insulin-like Growth Factor-I in renalen proximalen Tubuluszellen des Kaninchens

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin, Dr. med.
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Simone Kerstin Hetzel
aus Göppingen

2003

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Keller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Haug

Tag der Promotion: 23.10.2003

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung 1

1.1. Hepatocyte growth factor 1

1.2. Epidermal growth factor 2

1.3. Insulin-like growth factor-I 3

1.4. Rezeptoren 4

1.5. Signaltransduktion 6

1.6. Zielsetzung der Arbeit 10

2. Material und Methoden 11

2.1. Material 11

2.2. Methoden 18

3. Ergebnisse 23

3.1. Konzentrationsabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung 24

3.2. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise der Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I 25

3.3. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise der Proteinkinase *Src* 27

3.4. Inhibition der Phosphorylierung der *Src* Kinasen 29

3.5. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise von STAT3 31

3.6. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Bereich zwischen 55 und 205 kDa 33

3.7. Beziehung zwischen Rezeptorzahl, Tyrosinphosphorylierung und biologischer Wirkung 35

3.8. Beziehung zwischen Rezeptorzahl und Tyrosinphosphorylierung von *Src* 36

4. Diskussion 37

4.1. Konzentrationsabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung 37

4.2. Rezeptoren 38

4.3. Die Tyrosinkinase *Src* 39

4.4. STAT3 41

4.5. Rezeptorzahl – biologische Wirkung 44

4.6. Zelltyp als Baustein der Spezifität 45
4.7. Kinetik als Baustein der Spezifität 45
4.8. Phosphatasen 47
4.9. Zelldichte als limitierender Faktor.....48
4.10. Therapieansätze.....49

5. Zusammenfassung.....54

6. Literaturverzeichnis 56

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	zytoplasmatische Komponente
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
Csk	C-terminal Src kinase
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
E	Effektor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fötales Kälberserum
G	G-Protein = Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
Gab1	Grb2-associated binding protein 1
GGT	γ-Glutamyltransferase
GH	Wachstumshormon = growth hormone
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
HGF	hepatocyte growth factor
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC_{50}	halbmaximale Bindung
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IGF-I R	insulin-like growth factor-I receptor
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus Kinase
k	kinetische Konstante
K	Kinase
kDa	Kilodalton
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LDL	low density lipoprotein
MAP Kinase	mitogen-activated protein kinase
MDC	Methyl-2,5-dihydroxycinnamat
MDCK	Madin Darby canine kidney
mk	monoklonal
MTT	3 (4, 5 Dimethylthiazol-2-yl) – 2, 5 diphenyl-Tetrazoliumbromid
N	Nukleinsäure
P	Proteinkomponente im Kern
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol 3' Kinase
pk	polyklonal
PLCγ	Phospholipase Cγ
PP1	4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PT-1	proximale Tubuluszellen der Kaninchenniere
PTKI	Proteintyrosinkinaseinhibitor
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
R	Rezeptor
$RP_{max.}$	maximale Rezeptorphosphorylierung

$RP_{rel.}$	relative Rezeptorphosphorylierung
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RZ	Rezeptorzahl
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	scatter factor
SH-Domäne	Src Homologie Domäne
$SP_{max.}$	maximale Phosphorylierung von Src
$SP_{rel.}$	relative Phosphorylierung von Src
Src	Onkogen aus dem Rous sarcoma virus
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV-40	Simian Virus-40
T	Transkriptionsfaktor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Temed	NNN'N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-α	transforming growth factor-α
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	Western-Blot

1. Einleitung

Wachstumsfaktoren sind in viele biologische Prozesse involviert. Bei der Proliferation einer Zelle, ihrer Differenzierung und ihrer Motilität spielen sie eine wichtige Rolle. Sie vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an membranständige Rezeptortyrosinkinasen, die in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich exprimiert werden (Ullrich und Schlessinger 1990, Heldin 1995). Auch in der Niere werden Entwicklung, Wachstum, Funktion und Regeneration nach Organschädigung von Wachstumsfaktoren reguliert (Hammerman und Miller 1994). Im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung von Wachstumsfaktoren stellen proximale Tubuluszellen ein geeignetes Untersuchungsmodell dar, da sie unter den Nierenzellen die geringste Ischämietoleranz besitzen und im Verlauf des Akuten Nierenversagens sehr früh geschädigt werden (Lieberthal und Nigam 1998, Tsao et al. 1995). Diese Arbeit konzentriert sich auf die Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) in proximalen Nierentubuluszellen des Kaninchens (PT-1).

1.1. Hepatocyte growth factor

HGF, früher auch als *scatter factor* (SF) bezeichnet, wurde primär als Wachstumsfaktor für Hepatozyten identifiziert (Nakamura et al. 1986). Es gliedert sich in eine α-Untereinheit (69 kDa) und eine ß-Untereinheit (34 kDa), die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Leber und Pankreas sind die Hauptbildungsorte von HGF, es kann jedoch auch aus dem Mesangium der Niere isoliert werden. HGF wird als inaktive Vorstufe produziert und erst durch extrazelluläre Proteolyse mit Hilfe von Urokinase oder Gewebeplasminogenaktivator in seine biologisch wirksame Form umgewandelt (Naldini et al. 1992, Mars et al. 1993).

Die vielfältigen biologischen Wirkungen von HGF umfassen die Stimulation von Wachstum, Motilität und Differenzierung verschiedener Epithelien, zeigen aber keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies.
In der Leber stimuliert HGF die Proliferation von Hepatozyten, für die es das stärkste bisher bekannte Mitogen darstellt (Nakamura et al. 1986). Nach Leberteilresektion wurden

erhöhte HGF Werte gemessen, ebenso bei akuten und chronischen Hepatitiden sowie beim Leberversagen (Tsubouchi et al. 1989, Tsubouchi et al. 1991).
Auch in der Niere spielt HGF endokrin und parakrin eine große Rolle. Es ist bereits in die Organogenese involviert (Blazer-Yost et al. 1992). In der Kultur differenzierter proximaler Tubuluszellen des Kaninchens (PT-1) beeinflusst der Wachstumsfaktor die Mitogenese, die Motogenese, sowie die morphologische Entwicklung und die epitheliale Differenzierung. Außerdem führt HGF zu vermehrtem Aussprossen (*scattering*) der Zellen (Stracke et al. 1998, Hammerman et al. 1987, Bagley et al. 1989).
HGF gilt derzeit als einer der potentesten renotropen Faktoren. Es beschleunigt die Regeneration der Niere nach Akutem Nierenversagen, ausgelöst durch renale Ischämie (Matejka et al. 1992) oder durch nephrotoxische Substanzen wie Cisplatin oder $HgCl_2$ (Flyvbjerg et al. 1993). Bei Mäusen kann durch intravenöse Verabreichung von HGF sogar die Entstehung eines Akuten Nierenversagens verhindert werden (Kawaida et al. 1994). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass HGF nach einseitiger Nephrektomie vermehrt in der Leber synthetisiert wird und die Tubuluszellen in der verbliebenen Niere zu verstärkter Proliferation anregt (Nagaike et al. 1991).

1.2. Epidermal growth factor

EGF besteht aus 53 Aminosäuren und entsteht durch proteolytische Spaltung aus einem langen Vorläuferprotein (1207 Aminosäuren), das selbst biologische Aktivität besitzt. Menschliches EGF wurde bereits 1975 aus dem Urin schwangerer Frauen isoliert und erhielt damals den Namen Urogastron, da ein hemmender Effekt auf die Magensäuresekretion festgestellt werden konnte (Gregory 1975). Gebildet wird es in vielen Organen wie zum Beispiel im Gehirn, im Magen, in der Tränendrüse und in der Niere, dort hauptsächlich im distalen Tubulus (Fisher et al. 1989). EGF kommt nicht nur im Urin sondern auch in fast allen anderen Körperflüssigkeiten vor, beispielsweise in der Muttermilch. Die biologischen Wirkungen von EGF zeigen ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies. Sowohl für Zellen ektodermalen, mesodermalen als auch endodermalen Ursprungs stellt EGF ein starkes Mitogen dar (Carpenter und Cohen 1990).

In der Niere liegt EGF im Vergleich zum Blutplasma in sehr hoher Gewebekonzentration vor (Fisher et al. 1989). EGF vermittelt seine mitogene Wirkung an verschiedenen

Nierenzelltypen über die Bindung an spezifische Rezeptoren im Rahmen von parakrinen und autokrinen Mechanismen (Carpenter und Cohen 1990). Auch in proximalen Tubuluszellen wirkt EGF mitogen, stimuliert den Na^+/H^+-Austausch und hemmt die Glukoneogenese sowie die Reabsorption von Phosphat (Hamm et al. 1993).
An Ratten konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von EGF nach Akutem Nierenversagen, ausgelöst durch Ischämie oder durch $HgCl_2$, die Regeneration der Tubuluszellen und die Wiedererlangung der Funktionsfähigkeit beschleunigt (Humes et al. 1989, Coimbra et al. 1990).

1.3. Insulin-like growth factor-I

IGF-I, früher als Somatomedin C bezeichnet, setzt sich aus 70 Aminosäuren zusammen. Seine Sequenz ist zu 47% der des Insulin homolog. IGF-I wird als einsträngige Vorstufe gebildet und erlangt durch Spaltung am amino- und carboxy-terminalen Ende seine eigentliche Form. Es besteht dann aus vier Regionen, von denen die C-Region für die hoch affine Bindung an den Rezeptor verantwortlich ist (Bayne et al. 1988). Gebildet wird es nach Stimulation durch Wachstumshormon (GH) in Hepatozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und in der Niere und vermittelt so einen Großteil der von GH abhängigen Wachstumsprozesse. IGF-I kann in verschiedenen Geweben (z. B. Niere, Knochen) auch GH unabhängig gebildet werden. Im Plasma zirkuliert IGF-I nicht kovalent gebunden an sogenannte IGF-Bindungsproteine. Bisher sind sechs solcher Bindungsproteine mit positiven oder negativen regulatorischen Funktionen bekannt (Hammerman und Miller 1994).
Durch Bindung an den IGF-I Rezeptor stimuliert IGF-I sowohl Wachstum als auch Differenzierung vieler Zelltypen, wobei parakrine und autokrine Mechanismen eine besondere Rolle spielen (Jehle et al. 1996). In gesunden Individuen kann IGF-I durch Bindung an den Insulinrezeptor auch Insulin-ähnliche Wirkungen aufweisen, wie beispielsweise die Auslösung einer Hypoglykämie oder die Senkung der freien Fettsäuren im Serum. Auf den Knochenstoffwechsel wirkt IGF-I anabol, was sich unter anderem in vermindertem Kollagenabbau, gesteigerter Ablagerung von Knochenmatrix und vermehrter Rekrutierung von Osteoblasten äußert (McCarthy et al. 1989, Mohan 1993). Auch das kardiovaskuläre System wird von IGF-I beeinflusst, indem es die Proliferation und die Migration endothelialer glatter Muskelzellen stimuliert, Makrophagen aktiviert, die

zelluläre Aufnahme von LDL (*low density lipoprotein*) steigert und so die Atherosklerose fördern kann (Bayes-Genis et al. 2000).

Schon während der Organentwicklung der Niere kommt IGF-I große Bedeutung zu. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass nach Hemmung der IGF-I Rezeptor-expression in der metanephrogenen Phase ein Weiterwachsen des Organs verhindert und die Zahl der Nephrone reduziert wird (Feld und Hirschberg 1996). In der adulten Niere wird IGF-I in erster Linie in den Sammelrohren und zu geringen Teilen auch im Mesangium sowie im proximalen Tubulus gebildet (Hammerman und Miller 1994, Matejka et al. 1992). Unter physiologischen Bedingungen steigert IGF-I die glomeruläre Filtrationsrate. In proximalen Tubuluszellen stimuliert IGF-I das Wachstum, die Differenzierung und die Reabsorption von Natrium und Phosphat und erhöht die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine (Johnson et al. 1997, Feld und Hirschberg 1996).

In Rattentubuluszellen konnten drei Tage nach ischämischem Nierenversagen gesteigerte IGF-I Spiegel gemessen werden (Andersson und Jenische 1988). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von IGF-I eine schnellere Regeneration des proximalen Tubulusepithels und eine frühere Wiederherstellung der Nierenfunktion bewirkt (Hammerman und Miller 1994). Auch nach unilateraler Nephrektomie kam es zu einem Anstieg des IGF-I Spiegels in der verbliebenen Niere (Fagin und Melmed 1987).

1.4. Rezeptoren

Die Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I gehören zur großen Familie der Rezeptor-tyrosinkinasen, die ihr Signal über die Tyrosinphosphorylierung nachgeschalteter Peptide weiterleiten. Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem hydrophoben transmembranären Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, wie in Abbildung 1 am Beispiel des HGF Rezeptors gezeigt. Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne (Vargas et al. 2000). Die Rezeptortyrosinkinasen bilden eine Familie aus mehr als 60 verschiedenen Proteinen und können in 14 Untergruppen eingeteilt werden.

Der HGF Rezeptor ist ein Produkt des Proto-Onkogens *c-met*, das für ein heterodimeres Protein (190 kDa) kodiert, bestehend aus einer extrazellulären α-Untereinheit (45-50 kDa) und einer ß-Untereinheit (145 kDa), die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind (Giordano et al. 1989). Die ß-Untereinheit besitzt sowohl extrazelluläre als auch transmembranäre und intrazelluläre Anteile. HGF ist der bisher einzig bekannte Ligand, der an diesen Rezeptor bindet. *C-met* findet man in fast allen Epithelien, so auch im renalen Tubulus, in Endothelzellen und in mehreren menschlichen Tumorarten (Vargas et al. 2000).

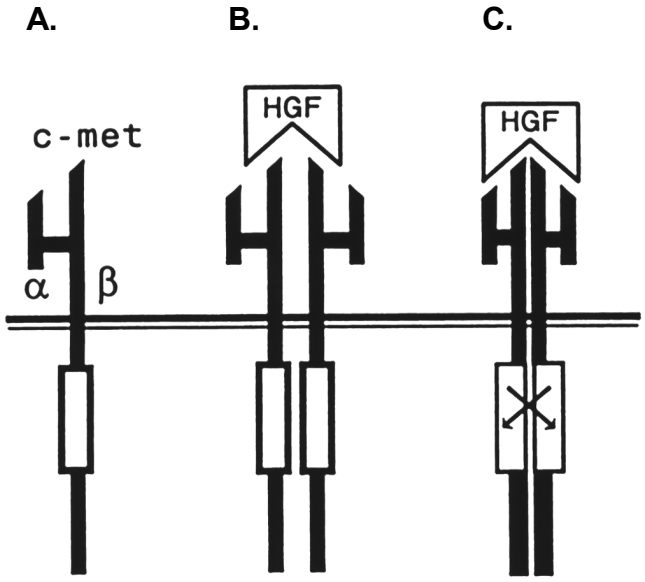


Abbildung 1: Struktur des HGF Rezeptors.
A. Das Produkt des Onkogens *c-met* ist ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität bestehend aus einer α- und einer ß-Untereinheit, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. **B.** Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung der Kinasedomäne **(C)**.
Nach Vargas et al. 2000.

Der EGF Rezeptor wird in fast allen Gewebetypen und vielen Tumorarten exprimiert. In der Niere kommt er im Glomerulus, im proximalen Tubulus, in interstitiellen Zellen des Nierenmarks und im Sammelrohr vor (Hammerman und Miller 1994). Außer EGF bindet er auch *transforming growth factor-α* (TGF-α) und EGF-ähnliche Proteine. Im Gegensatz zum HGF Rezeptor stellt er ein monomeres transmembranäres Protein dar und verfügt über ein Molekulargewicht von 170 kDa. Er besitzt ein verwandtes Genprodukt, das durch das

Onkogen *c-erbB-2* kodiert wird. Dieses 190 kDa Glykoprotein sieht wie ein verkürzter EGF Rezeptor aus und stimmt in über 50% mit dessen Aminosäuresequenz überein (McCann et al. 1990).

Anders als die Rezeptoren für HGF und EGF besteht der IGF-I Rezeptor bereits im unstimulierten Zustand aus zwei α- und zwei ß-Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und so ein 350 kDa Heterotetramer bilden. Wie beim HGF Rezeptor liegt auch beim IGF-I Rezeptor die α-Untereinheit extrazellulär (130 kDa), die ß-Untereinheit (95 kDa) reicht von extrazellulär nach intrazellulär (Yarden und Ullrich 1988). Nach Ligandenbindung an der α-Untereinheit kommt es nicht zur Anlagerung weiterer Rezeptorteile sondern nur zu einer Konformationsänderung und Autophosphorylierung der ß-Untereinheiten (White et al. 1997). In der Niere kommt der IGF-I Rezeptor größtenteils in proximalen Tubuluszellen und in mesangialen Zellen der Glomeruli vor (Hammerman und Miller 1994).

1.5. Signaltransduktion

Mit der Bindung eines Liganden an einen bestimmten Rezeptor beginnt ein komplexes Zusammenspiel zellulärer Komponenten, das auch heutzutage nur unzureichend aufgeklärt ist. Wie in Abbildung 2 veranschaulicht, ergibt sich bereits eine Vielzahl an möglichen Interaktionen, selbst wenn man nur den Signalfluss zwischen einem transmembranären Rezeptor, einem G-Protein (Guanin-Nukleotid-bindendes Protein) und einem Effektor betrachtet. Mit zwei Interaktionspaaren, drei verschiedenen Konzentrationen und vier kinetischen Konstanten erscheint dieses Modell noch überschaubar, die Kombination von nur zwei dieser Modelle erhöht die Zahl an möglichen Interaktionen bereits erheblich. Trägt man nun der biologischen Kompartimentierung von Signalwegen Rechnung, so ist die Signalkaskade in ein membranständiges, ein zytoplasmatisches und ein nukleäres Kompartiment zu unterteilen und es ergeben sich 69 Interaktionspaare, 24 Konzentrationen und 138 kinetische Konstanten. Dieses vereinfachte Modell lässt bereits erahnen, wie komplex sich die Weiterleitung von biologischen Signalen in der Zelle gestaltet (Weng et al. 1999).

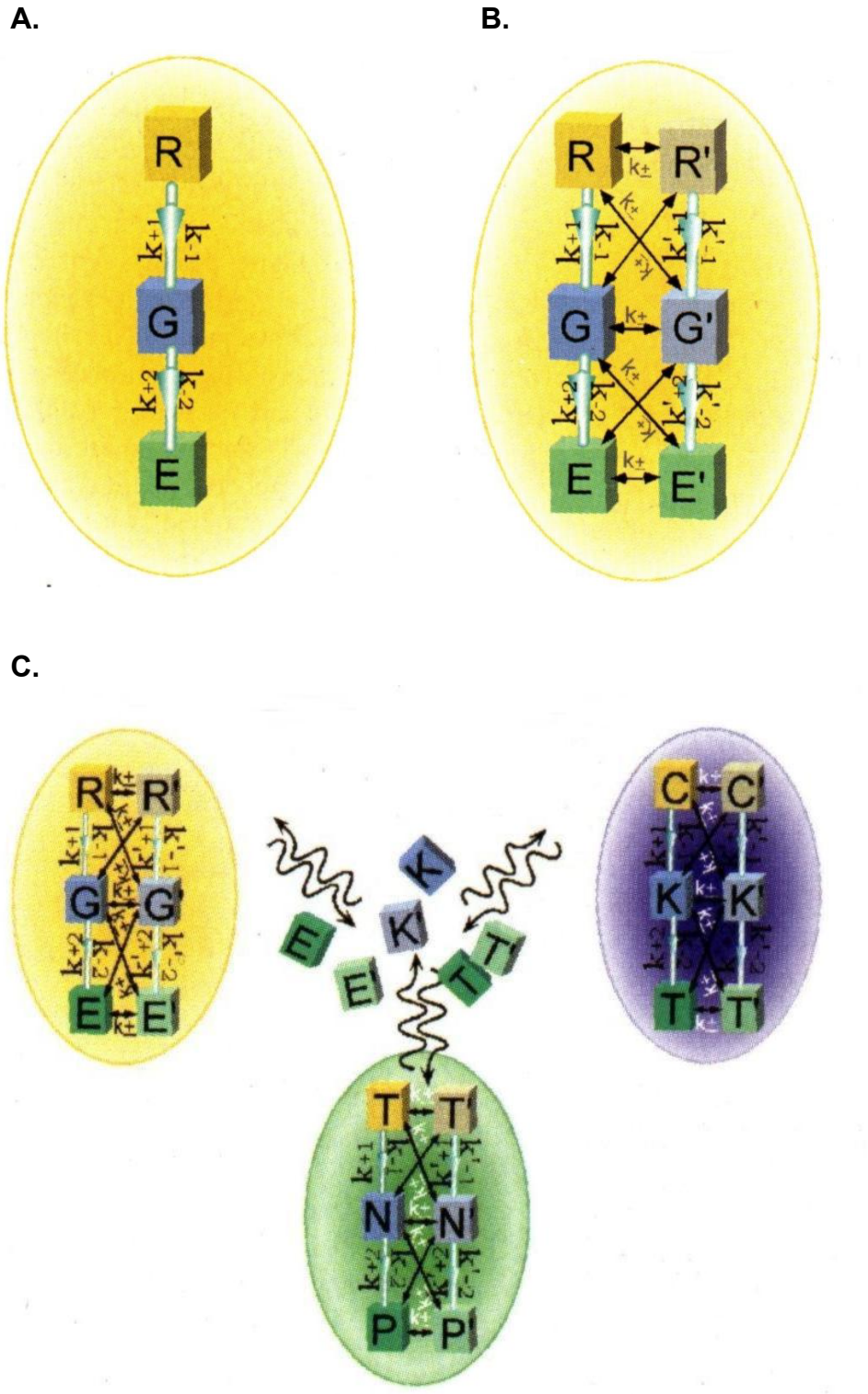


Abbildung 2: Die Komplexität intrazellulärer Signalwege.
R = Rezeptor, G = G-Protein, E = Effektor, C = zytoplasmatische Komponente, K = Kinase, T = Transkriptionsfaktor, N = Nukleinsäure, P = Proteinkomponente im Kern, k = kinetische Konstante, ± = vorwärts/rückwärts. **A.** Signalweg aus drei Komponenten. **B.** Zwei interaktive Signalwege in einem Kompartiment. **C.** Komplexes System aus je zwei Signalwegen in drei verschiedenen Kompartimenten. Nach Weng et al. 1999.

Bei der Kommunikation der Signalproteine kommt der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bestimmter Aminosäurereste eine große Bedeutung zu. Über Konformationsänderungen bewirkt die (De-)Phosphorylierung eine (De-)Aktivierung des Proteins und wird zum Erkennungsmerkmal für mögliche Interaktionspartner. Serin-, Threonin- und Tyrosinreste können phosphoryliert werden, wobei die Tyrosinphosphorylierung zwar nur 0,03% der gesamten Phosphorylierung in der Zelle ausmacht aber trotzdem entscheidend an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt ist (Druker et al. 1989). Katalysiert werden die Phosphorylierungen von Kinasen, die Dephosphorylierungen von Phosphatasen. Tyrosinkinasen können Bausteine eines membranständigen Rezeptors sein (Rezeptortyrosinkinasen), wie beispielsweise die ß-Untereinheit der oben beschriebenen Rezeptoren. Ihre Funktion kann aber auch an das Zytosol gebunden sein (Nicht-Rezeptortyrosinkinasen). Letztere spielen eine Vermittlerrolle und sind häufig mit transmembranären Rezeptoren assoziiert. Ein Vertreter dieser Gruppe ist die zytosolische Tyrosinkinase *Src* (Onkogen aus dem *Rous sarcoma virus*; Tatosyan und Mizenina 1999). Hergestellt wird der Kontakt der Signalproteine unter anderem über bestimmte Aminosäuresequenzen und Oberflächenmerkmale, wie beispielsweise die regulatorischen *Src* Homologie Domänen (SH-Domänen), die bei *Src* erstmalig entdeckt wurden. SH2-Domänen erkennen phosphorylierte Tyrosinreste. Kommt es nun nach Ligandenbindung zur Autophosphorylierung eines Rezeptors, interagieren zelluläre Proteine wie *Src*, das Adaptorprotein *growth factor receptor binding protein 2* (Grb2), STAT Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) oder die Phospholipase Cγ (PLCγ) über ihre SH2-Domänen mit dem Rezeptor (Schlessinger et al. 1992). Auch Proteine ohne SH-Domänen werden nach Rezeptorstimulation an Tyrosinresten phosphoryliert. Zu ihnen gehört unter anderem *focal adhesion kinase* (FAK, 125 kDa), ein regulatorisches Protein der fokalen Adhäsion (Matsumoto et al. 1994). Anschließend vermitteln diese Proteine die Information entweder direkt an den Kern oder an andere Mediatoren, woraus sich ein verzweigtes Reaktionsgeflecht entwickeln kann.

Die Proteinkinase *Src*

Die zytosolische, Membran assoziierte Proteinkinase *Src* (60 kDa) ist das Musterbeispiel einer nach ihr benannten Gruppe von strukturell ähnlichen Tyrosinkinasen, die an Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und an Adhäsionsmoleküle binden und deren Signale weiterleiten. Hauptsächlich werden diese

Tyrosinkinasen in hämatopoetischen Zellen exprimiert, spielen aber auch in anderen Geweben eine große Rolle (Lutz et al. 1998).

Aktiviertes *Src* reguliert Wachstum, Differenzierung, Migration und Adhäsion von Zellen und kann als transformierendes Onkogen wirken (Brown et al. 1996). Die Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I interagieren alle mit *Src*, beim EGF und IGF-I Rezeptor besteht nach bisherigem Kenntnisstand sogar eine bidirektionale Interaktion, d.h., dass *Src* vom Rezeptor aktiviert werden kann, selbst aber auch zur Rezeptoraktivierung fähig ist (Belsches et al. 1997, Peterson et al. 1996). Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion kommen als Zielproteine von *Src* beispielsweise FAK, Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase) und Phospholipase Cγ in Betracht. Über eine Kommunikation mit dem Signalweg der MAP Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) und den STAT Proteinen hat *Src* auch Einfluss auf die Transkription. In einigen Zelllinien konnte sogar beobachtet werden, dass virales *Src* die Zellen vor der Realisierung verschiedener Apoptose-programme bewahrt (Tatosyan und Mizenina 1999, Cooper et al. 1993). Mit PP1, einem Pyrazolopyrimidin, wurde 1996 ein potenter selektiver Inhibitor der *Src* Tyrosin-kinasefamilie entdeckt. Außer der Phosphorylierung von *Src* werden auch viele andere Vertreter der Familie wie *Shc*, *Lck* und *Fyn* gehemmt (Hanke et al. 1996).

STAT Proteine

Signal transducers and activators of transcription (STATs) sind latente zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die Signale mittels Tyrosinphosphorylierung von der Zellmembran zum Kern weiterleiten können. Nach Rekrutierung in den Rezeptorkomplex über SH2-Domänen werden die Transkriptionsfaktoren von Rezeptor assoziierten Kinasen wie den Janus Kinasen (JAKs) oder vom Rezeptor selbst tyrosinphosphoryliert und dimerisieren. Anschließend wandern sie in dieser Form in den Kern, um dort entsprechende DNA Elemente zu aktivieren. Auch die Tyrosinkinasen der *Src* Familie können STAT Proteine phosphorylieren. Bisher sind sieben verschiedene STAT Proteine und mindestens 35 Liganden als Aktivatoren bekannt (Darnell 1997).

STAT3 (92 kDa) wurde als Teil der Signalwege von Interleukin 6 und EGF entdeckt (Zhong et al. 1994). Unter seinen bisher bekannten Funktionen sind die Kontrolle des Zellwachstums über die Gene *c-myc* und *cyclin D1* und die HGF induzierte Tubulogenese epithelialer Zellen zu nennen (Odajima et al. 2000, Boccaccio et al. 1998).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Wachstumsfaktoren sind auch in der Niere wesentlich an Mitogenität, Zelldifferenzierung und Aufrechterhaltung der Organfunktionen beteiligt. Proximale Tubuluszellen werden im Verlauf des Akuten Nierenversagens sehr früh geschädigt und stellen so ein gutes Untersuchungsmodell für renoprotektive Faktoren dar. Auch in PT-1 Zellen, die typische Merkmale hoch differenzierter proximaler Tubuluszellen aufweisen, konnten durch Stimulation mit HGF, EGF und IGF-I positive Effekte hinsichtlich Wachstum, Migration und Differenzierung erzielt werden. Da in Bindungsstudien bereits spezifische Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I nachgewiesen werden konnten, war es Ziel dieser Arbeit, an PT-1 Zellen die Signaltransduktion der genannten Wachstumsfaktoren auf Ebene der Rezeptortyrosinkinasen und der nachgeschalteten Signalwege zu untersuchen. Die Kenntnis der durch die Wachstumsfaktoren ausgelösten Signalkaskaden stellt einen wichtigen Schritt im Verständnis der Tubulusfunktion und in der Weiterentwicklung von Therapieansätzen des Akuten Nierenversagens dar. Die Weiterleitung von Signalen in der Zelle erfolgt unter anderem über die Tyrosinphosphorylierung von Aminosäureresten, die so zum Erkennungsmerkmal für mögliche Reaktionspartner werden. In ersten Experimenten wurde deshalb die Konzentration der Wachstumsfaktoren ermittelt, die zur Phosphorylierung der Rezeptoren und nachgeschalteter Peptide führt. Im nächsten Schritt wurde der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung und eine mögliche Hemmung durch den Tyrosinkinaseinhibitor PP1 untersucht. Um nun den Verlauf des Signals näher zu charakterisieren und eventuelle Unterschiede zwischen den Wachstumsfaktoren darzustellen, wurden Nachweise für *Src* und STAT3 unternommen und die Kinetik der Phosphorylierung dieser Proteine analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Proximale Tubuluszellen PT-1

PT-1 Zellen wurden aus proximalen Tubuluszellen der Kaninchenniere als stabile Zelllinie von Dr. Scott am Max-Planck-Institut für Epithelphysiologie in Dortmund (Leiter Prof. Dr. R. K. H. Kinne) generiert. Zur Immortalisierung wurde eine Transfektion mit der DNA der frühen Region von SV-40 (Simian Virus-40) durchgeführt. Um die Zelle in der Langzeitkultur in der ursprünglichen Weise zur erhalten, erfolgte zusätzlich eine Transfektion mit dem Plasmid pSV2-neo DNA, das eine Resistenz gegen das toxische Antibiotikum Geneticin (G 418 Sulfat) bewirkt. Die Zellen besitzen morphologische und funktionelle Charakteristika bipolar differenzierter proximaler Tubuluszellen (Jehle et al. 1996). Dazu gehören lange Mikrovilli auf der apikalen Membran, laterale *tight junctions* in Serie und mitochondrienreiche Einfaltungen der basolateralen Membran (Stracke et al. 1998, siehe Abbildung 3). Mit dem Bürstensaum assoziierte Enzyme wie die γ-Glutamyltransferase (GGT), die Leucin-Aminopeptidase (LAP), die Maltase und die alkalische Phosphatase (AP) stellen ebenfalls spezifische Merkmale des proximalen Tubulus dar (siehe Tabelle 1). Außerdem exprimieren die Zellen Zytokeratin und verfügen über ein apikales Natrium gekoppeltes und ein basolaterales Natrium unabhängiges Glukosetransportsystem. Weitere Besonderheiten proximaler Tubuluszellen, wie beispielsweise hohe Konzentrationen an lysosomalen und mitochondrialen Enzymen und die Fähigkeit zur Glukoneogenese (siehe Tabelle 2) und ausgeprägter Betainsynthese, weisen zudem auf die hohe Differenzierung der PT-1 Zellen hin (Grunewald et al. 1997). Mit spezifischen Immunoassays konnten geringe Mengen IGF-I im PT-1 Zellüberstand nachgewiesen werden. Eine Expression von HGF konnte des Weiteren in der RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ausgeschlossen werden.

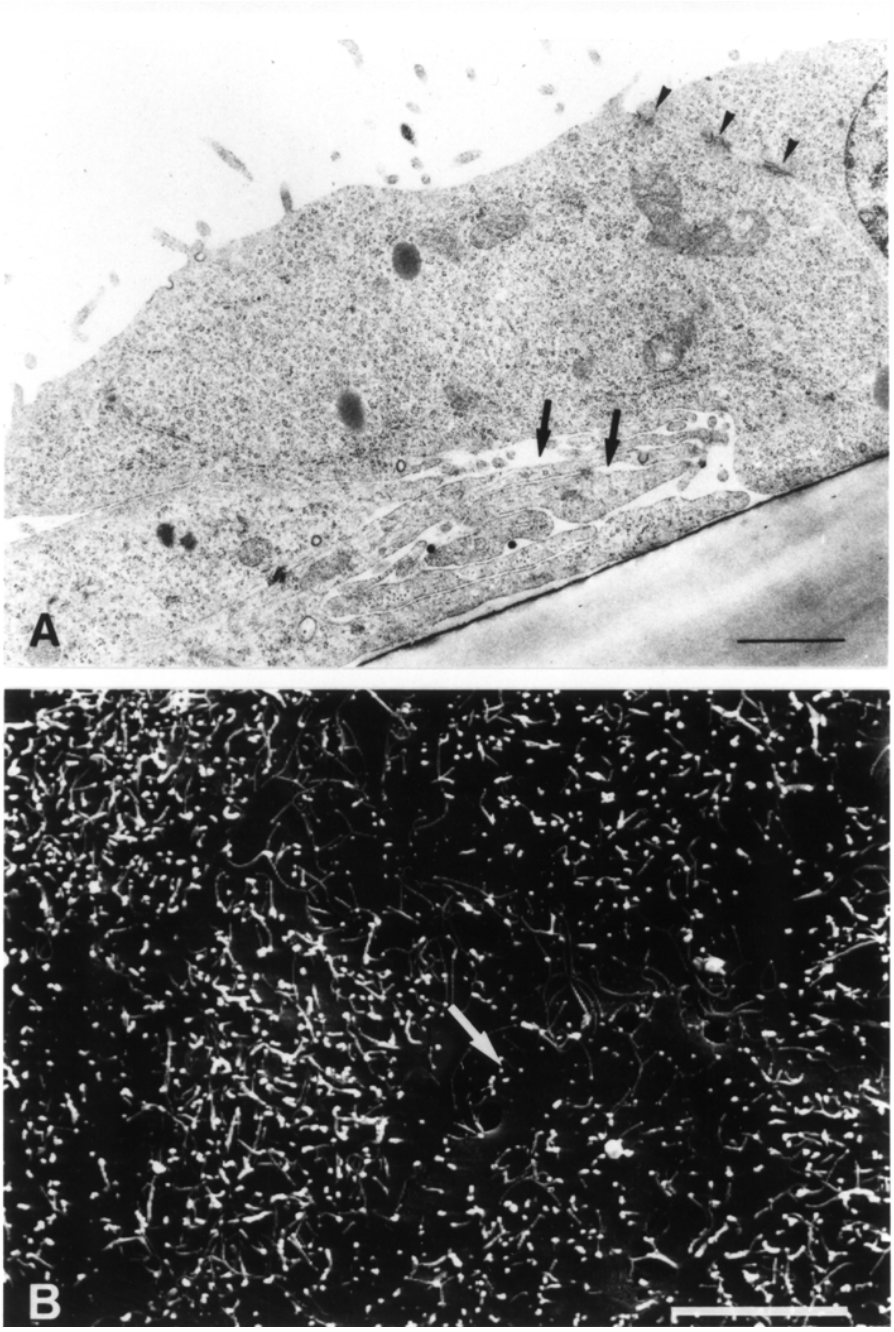


Abbildung 3: Morphologie von PT-1 Zellen.
A. Transmissionselektronenmikroskopisches Bild konfluenter PT-1 Zellen mit Mikrovilli am apikalen Zellpol. Die Pfeilspitzen markieren laterale *tight junctions* in Serie, die Pfeile mitochondrienreiche Einfaltungen der basolateralen Membran. Der Bildbalken entspricht 5 µm. **B.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme mit apikalen Mikrovilli und einer interzellulären Kontaktstelle (Pfeil). Der Bildbalken entspricht 10 µm.
Nach Stracke et al. 1998.

Tabelle 1: Charakteristika der Bürstensaum assoziierten Enzyme (nach R. W. Grunewald, unveröffentlichte Daten).

Enzym	Aktivität (U/g Protein) ± SD
GGT	8 ± 0,8
LAP	7 ± 0,7
Maltase	48 ± 10
AP	6 ± 0,6

Tabelle 2: Charakteristika der Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels (nach R. W. Grunewald, unveröffentlichte Daten).

Enzym	Aktivität (µmol/min x g Protein) ± SD
Hexokinase	11 ± 2
Laktatdehydrogenase	1045 ± 85
Glukose-6-phosphatase	10 ± 2
Glukose-6-phosphatdehydrogenase	112 ± 8
Succinatdehydrogenase	7 ± 0,8
Saure Phosphatase	27 ± 2

2.1.2. Zellkultur

- Kulturmedium: DMEM/HAM'S F-12 (1:1) (0,648 g N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin/l, pH 7,4) (Biochrom KG, Berlin)
- fötales Kälberserum (Biochrom KG, Berlin)
- Penicillin / Streptomycin (100x) 10 000 E / 10 mg/ml (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Geneticin (G 418 Sulfat) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- Viralex Trypsin / EDTA (1x) (0,5 g Trypsin/l, 0,2 g EDTA/l, 0,85 g NaCl/l, w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- PBS DULBECCO'S (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4) (GibcoBRL, Eggenstein)
- Gewebekulturflaschen mit Filter, 250 ml (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
- Petrischalen: Primaria Tissue Culture Dish, 100x20 mm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)

2.1.3. Wachstumsfaktoren und Tyrosinkinaseinhibitoren

- EGF (rekombinant, human) (Bachem, Heidelberg)
- HGF (rekombinant, human) (R&D Systems, Wiesbaden)

- IGF-I (rekombinant, human) (Bachem, Heidelberg)
- PP1: 4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (Calbiochem, Bad Soden)

2.1.4. Herstellung von Proteinextrakten

- Tris-HCl (Boehringer, Mannheim)
- $Na_4O_7P_2$ (Fluka, Buchs, Schweiz)
- NaCl (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen)
- Leupeptin Hemisulfat (Sigma, Deisenhofen)
- Pepstatin A (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Benzamidin (Sigma, Deisenhofen)
- Phenylmethylsulfonyl Fluorid (Sigma, Deisenhofen)
- Natrium-Orthovanadat (Sigma, Deisenhofen)
- Soybean Trypsin Inhibitor (Boehringer, Mannheim)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Tris-Base (USB, Cleveland, Ohio, USA)
- Glycerin (Sigma, Deisenhofen)
- SDS (Serva, Heidelberg)
- Zentrifuge: Biofuge-A (Heraeus, Osterode)

Lysispuffer (pH 7,4):

Tris-HCl	20 mM
$Na_4O_7P_2$	30 mM
NaCl	95 mM
Triton X-100	1%
Leupeptin Hemisulfat	10 µg/ml
Pepstatin A	5 µg/ml
Benzamidin	0,5 mM
Phenylmethylsulfonyl Fluorid	1 mM
Natrium-Orthovanadat	250 µM
Soybean Trypsin Inhibitor	0,1 mg/ml

SDS-Probenpuffer (4x, pH 6,8; nach Lämmli 1970):

Tris-HCl	250 mM
Glycerin	40%
SDS	10%
2-Mercaptoethanol	20%
Bromphenolblau	1 mg

2.1.5. Proteinkonzentrationsbestimmung

- BSA (Fraction V) (Biomol, Hamburg)
- BioRad Protein Assay (BioRad, München)
- Mikroküvetten (Ratiolab, Dreieich)
- Photometer: DU® 640 Spectrophotometer (Beckman, München)
- Bradford-Lowry-Proteinbestimmung Version 1.3 (Universität Ulm)

2.1.6. Immunpräzipitation

- Protein A Sepharose® CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Antikörper siehe Tabelle 4

TBS-Earp (pH 7,2):

Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM

2.1.7. Eindimensionale Gelelektrophorese

- Acrylamid 30% (Roth, Karlsruhe)
- Temed (Sigma, Deisenhofen)
- APS (BioRad, München)
- Butanol (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Glycin (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Elektrophoresekammer: Minigel-Twin G 42 (Biometra, Göttingen)
- Spannungsgerät: Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Molekulargewichtstandard: SigmaMarker®, High Molecular Weight Range, 205-36 kDa (Sigma, Deisenhofen)

Die einzelnen Proteine des Molekulargewichtstandards sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3: Relatives Molekulargewicht der Markerproteine.

Markerprotein	relatives Molekulargewicht
Myosin	205 kDa
ß-Galaktosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97 kDa
Fruktose-6-phosphat-kinase	84 kDa
Rinder-Albumin	66 kDa
Glutamatdehydrogenase	55 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	36 kDa

Puffer für die Gelelektrophorese nach Lämmli (1970):

Sammelgelpuffer (pH 6,8):	Tris-HCl	0,5 M
	SDS	0,4%
Trenngelpuffer (pH 8,8):	Tris-Base	1,5 M
	SDS	0,4%
Laufpuffer (10x, pH 8,3):	Tris-Base	250 mM
	Glycin	1,91 M
	SDS	1%

2.1.8. Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen (Western-Blotting)

- 6-Aminocapronsäure (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Methanol (Merck, Darmstadt)
- Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell, Dassel)
- PVDF-Membranen: Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Blotgerät: Fastblot B34 (Biometra, Göttingen)

Anodenpuffer 1:	Tris-Base	0,3 M
	Methanol	20%

Anodenpuffer 2: Tris-Base 25 mM

Kathodenpuffer: 6-Aminocapronsäure 40 mM

2.1.9. Detektion der Proteine mit Antikörpern

- Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
- Tween20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate; Sigma, Deisenhofen)

Folgende Blockpuffer wurden verwendet:

A: TBS-Earp, 2% BSA, 0,1% Tween20; für monoklonale Antikörper

B: TBS-Earp, 2% BSA, 2% Magermilchpulver; für polyklonale Antikörper

C: TBS-Earp, 1% BSA, 1% Magermilchpulver; für STAT3, IGF-I R ß

Die Detektion der Proteine wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Tabelle 4: Eigenschaften der primären Antikörper. RT = Raumtemperatur, mk = monoklonal, pk = polyklonal, WB = Western-Blot, IP = Immunpräzipitation.

Bezeichnung	Art	Spezies	Verdünnung, Inkubationszeit, Temperatur	Block-puffer	Hersteller
Anti-Human EGF Receptor	IgG	Schaf, pk	1:700; 2 h; RT	B	GibcoBRL, Eggenstein
Anti-Human Met	IgG	Maus, mk	1:500	A	Upstate, Lake Placid,
intracellular domain					NY, USA
IGF-I R ß (C-20)	IgG	Kaninchen, pk	WB: 1:2000; IP: 0,1 µg/100 µg	C	St. Cruz, Heidelberg
			über Nacht; 4°C		
Phosphotyrosin (PT-66)	IgG	Maus, mk	1:3000; 2 h; RT	A	Sigma, Deisenhofen
v-Src	IgG	Maus, mk	1:200	B	Calbiochem, Bad Soden
STAT3 (K-15)	IgG	Kaninchen, pk	1:2000; über Nacht; 4°C	C	St. Cruz, Heidelberg

Alle sekundären Antikörper waren Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, wurden in einer Verdünnung von 1:10 000 eingesetzt und von Dianova (Hamburg) bzw. von Pierce (Rockford, IL, USA) bezogen.

Waschlösung: TBS-Earp

Tween20 0,25%

2.1.10. Filmentwicklung

- Chemilumineszenz: SuperSignal™ Substrate, Western Blotting Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Röntgenfilme: X-OMAT AR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)

2.1.11. Färben der Membranen

- NaOH (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure (100%; Roth, Karlsruhe)
- Ecoline® (Schwarz und Himmelblau; Royal Taleus, Apeldoorn, Niederlande)

Ink-Stain-Lösung:	PBS	100 ml
	Essigsäure (100%)	200 µl
	Ecoline	100 µl von jeder Farbe

2.1.12. Densitometrische Auswertung

- Videokamera: Sony CCCD, Modell AVC-D5CE (Sony, Köln)
- Durchlichtscanner: Sharp JX-330 (Sharp, Hamburg)
- Video Densitometry Version 3.1 by Wojciech Warchol (Universität Posen, Polen)
- Elektrophoresis 1D Software (Phoretix, New Castle upon Tyne, Großbritannien)

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zelllinie

Die PT-1 Zellen wurden als einschichtiger Zellrasen in DMEM/HAM'S F-12 (1:1) bei 21% O_2, 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Das Medium wurde zusätzlich noch mit 10% FCS und den Antibiotika Geneticin-Sulfat (1 mg/ml), Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) versetzt und jeden zweiten Tag gewechselt. Alle sieben Tage wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 5 ml Medium aufgenommen. Davon wurde 1 ml in eine neue Gewebekulturflasche übernommen und mit 11 ml neuem Medium versehen.

2.2.2. Aussaat in Petrischalen

Zur Vorbereitung der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden 3 x 10^6 Zellen in eine Petrischale ausgesät und zwei bis drei Tage weiterkultiviert. Über Nacht erfolgte dann eine zehnstündige Aushungerung mit serumfreiem Medium, an die sich die Stimulation anschloss.

2.2.3. Herstellung von Proteinextrakten

Vor der Stimulation wurden die Wachstumsfaktoren und der Tyrosinkinaseinhibitor in PBS verdünnt. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen mit PP1 (10 µM) 30 Minuten im Brutschrank vorinkubiert. Das Medium bzw. der Tyrosinkinaseinhibitor wurde abgesaugt, der Wachstumsfaktor in entsprechender Konzentration zugegeben und anschließend die Petrischale wieder in den Brutschrank zurückgestellt. Nach der vorgesehenen Stimulationszeit wurde der Wachstumsfaktor wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 400 µl Lysispuffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis lysiert.

In der darauf folgenden Zentrifugation (10 Minuten, 10 000 x g, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Zur Verwendung als Volllysate wurden 120 µl des Überstandes mit 40 µl vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und in Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Für die Immunpräzipitation wurden die Überstände entweder unbehandelt bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

2.2.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach einer Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierzu wurden 790 µl aqua dest., 10 µl Lysat und 200 µl BioRad Protein Assay® (1:5 verdünnt) in eine Mikroküvette pipettiert und anschließend im Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

BSA-Verdünnungen dienten der Bestimmung von Standardwerten und der nachfolgenden Erstellung einer Eichgerade, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration des jeweiligen Extrakts bestimmt werden konnte.

2.2.5. Immunpräzipitation

300 µl Lysat (2,5 mg/ml) wurden mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration (siehe Tabelle 4) versetzt und über Nacht bei 4°C kontinuierlich gemischt. Danach wurden 20 µl gewaschene Protein-A-Sepharose-Beads zugesetzt und 2 Stunden

auf dieselbe Weise inkubiert. Durch Zugabe von Lysispuffer, Zentrifugation (1 Minute, 13 000 x g, 4°C) und vorsichtiges Abnehmen des Überstandes wurden die Proben insgesamt 3 mal gewaschen. Danach wurde 1 mal mit TBS-Earp gewaschen. Das so gereinigte Protein wurde mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und erneut zentrifugiert (1 Minute, 13 000 x g, 20°C). Der Überstand wurde zum Auftrag auf das Gel verwendet.

2.2.6. Eindimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine wurde mit dem System der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Sie basierte auf einer leicht veränderten Form der klassischen Lämmli Methode (Lämmli 1970). Nach Vorbereitung der Gelkammer wurde das Trenngel gegossen, wobei die Endkonzentration des Acrylamid je nach Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine festgelegt wurde. Hauptsächlich wurden Anteile zwischen 7,0 und 7,5% Acrylamid gewählt. Sofort nach dem Einfüllen wurde die Trenngellösung mit Butanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Nach 10-minütiger Polymerisation wurde das Butanol abgegossen, die Oberfläche mit aqua dest. nachgespült, die Wassertropfen mit Filterpapier entfernt und anschließend das Sammelgel und der Probenkamm zugegeben. Als Polymerisationsstarter wurden für beide Gellösungen Temed und APS verwendet. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde das komplette Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die einzelnen Teilkammern mit Laufpuffer aufgefüllt.

Während der Herstellung des Gels wurden die Proben aufgetaut und zur Denaturierung 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach ihrem Abkühlen wurden sie entsprechend der Proteinbestimmung in gleichen Mengen in die Geltaschen pipettiert. Die erste Geltasche wurde mit einem Markerproteingemisch bestückt.

Auf Grund der starken Wärmeentwicklung wurde die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt. Für den 10-minütigen Sammelvorgang wurde eine Stromstärke von 10 mA eingestellt, die anschließend für das Durchlaufen des Trenngels auf 25 mA erhöht wurde. Nachdem die Lauffront nach ca. 2,5 Stunden den unteren Gelrand fast erreicht hatte, wurde der Trennvorgang abgebrochen. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in den Kathodenpuffer gelegt.

2.2.7. Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen (Western-Blotting)

Das Blotten wurde nach dem ”semi-dry” Verfahren durchgeführt.

Vor der Verwendung wurden die Kohleplatten mit aqua dest. befeuchtet. Die Schichtung des Blots erfolgte ausgehend von der Anode. Zuerst wurden zwei mit Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere aufgelegt, dann zwei Filterpapiere mit Anodenpuffer 2. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol geschwenkt, 2 mal mit aqua dest. gewaschen und vor dem Auflegen mit Anodenpuffer 2 befeuchtet. Dann folgte das Gel und drei mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Zur Übertragung der Proteine auf die Membran wurde für 40 Minuten eine Stromstärke von 0,85 mA pro cm² appliziert.

2.2.8. Detektion der Proteine mit Antikörpern

Um unspezifischen Bindungen des Antikörpers entgegenzuwirken, wurde die Membran gemäß des Protokolls des Herstellers zwischen 1 und 10 Stunden bei 4 oder 20°C auf einem Schwenktisch in Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde der primäre Antikörper entsprechend den Angaben des Herstellers in Blockpuffer verdünnt und zusammen mit der Membran in einer Folie eingeschweißt. Nach abgelaufener Inkubationszeit (siehe Tabelle 4) wurden nicht gebundene Antikörper durch 3-maliges Waschen entfernt. Dieser und alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper (1:10 000) wurde stets im selben Blockpuffer verdünnt wie der primäre und für 1 Stunde hinzugegeben. Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal gewaschen.

2.2.9. Filmentwicklung

Zur Visualisierung des Ergebnisses diente der Chemilumineszenz-Kit SuperSignal®. Hierzu wurden je 5 ml der Luminol/Enhancer-Lösung und der Peroxid-Lösung gleichzeitig 1 Minute lang auf die Membran gegeben. Die so entstandenen Signale wurden durch Auflegen und anschließende Entwicklung eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.10. Färben der Membranen

Nach der Filmentwicklung wurde die Membran 10 Minuten in 0,2 M NaOH gelegt, 3 mal 10 Minuten mit PBS gewaschen und über Nacht mit Ink-Stain-Lösung gefärbt. So konnte zusätzlich zur rechnerischen Proteinbestimmung festgestellt werden, ob in jede Geltasche dieselbe Menge Protein pipettiert worden war.

2.2.11. Densitometrische Auswertung und Statistik

Zum Vergleich der Intensität der Phosphorylierungen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Die Filme wurden mit einem Scanner oder einer Videokamera aufgenommen. Die anschließende Analyse erfolgte mit der Elektrophoresis 1D Software von Phoretix oder mit der Software Video Densitometry Version 3.1 (Entwicklung von Wojciech Warchol und Dr. D. Breitig, Isotopenanwendung). Sofern nicht anders angegeben, sind alle Ergebnisse als arithmetischer Mittelwert mit einer Standardabweichung (± SD) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3. Ergebnisse

Die bisherigen von der Arbeitsgruppe an PT-1 Zellen durchgeführten Untersuchungen zur Rezeptorbindung und biologischen Wirkung von HGF, EGF und IGF-I bilden den Ausgangspunkt der eigenen Experimente und sollen deshalb kurz dargestellt werden.

In Bindungsstudien konnten spezifische Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I an PT-1 Zellen nachgewiesen werden. Die Scatchard Analyse (mathematische Darstellungsweise von Ligandenbindungsdaten zur Bestimmung von Affinität und Bindungsstellen pro Zelle) ergab die in Tabelle 5 dargestellten Bindungskapazitäten und -affinitäten.

Tabelle 5: Rezeptorzahl und Bindungsaffinität von HGF, EGF und IGF-I an PT-1 Zellen.

	HGF	EGF	IGF-I
Rezeptoren/Zelle ± SD	68.500 ± 3.000	16.000 ± 3.000	165.450 ± 5.240
Halbmaximale Bindung IC50 (nM) ± SD	1 ± 0,5	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,3

Im MTT-Assay, einem indirekten Zellproliferationsnachweis durch Messung von Zellaktivität und -vitalität, zeigte HGF bereits nach vier Stunden eine 1,3fache Stimulation der Zellproliferation, wohingegen EGF und IGF-I nur einen 1,1fachen Anstieg bewirkten. Nach drei Tagen stieg die Zellzahl unter HGF Stimulation auf das 1,8fache, unter EGF auf das 1,6fache und unter IGF-I auf das 1,4fache. HGF beschleunigte zudem die Migration, förderte das Aussprossen der PT-1 Zellen, ihre tubuläre Differenzierung und die Bildung von Mikrovilli. Diese Effekte werden größtenteils über Tyrosinkinasen vermittelt, was durch die gleichzeitige Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Geldanamycin, Herbimycin A, Genestein und MDC (Methyl-2,5-dihydroxycinnamat) gezeigt werden konnte.

3.1. Konzentrationsabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung

Um nun die intrazellulären Mediatoren der biologischen Wirkung von HGF, EGF und IGF-I an PT-1 Zellen näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Rezeptoren und der nachgeschalteten Signalproteine untersucht. Im ersten Schritt sollte die Konzentration der Wachstumsfaktoren ermittelt werden, bei der es zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung der jeweiligen Rezeptortyrosinkinasen kommt. Ausgehend von Vorexperimenten wurde primär eine Stimulationsdauer von zehn Minuten gewählt. In Analogie zu den Proliferationsexperimenten wurden Konzentrationen zwischen 10 pM und 1 µM eingesetzt. Wie in Abbildung 4 zu sehen, kommt es bei einer Konzentration von 1 nM EGF zu einer deutlichen Stimulation einer 170 kDa Proteinbande, die dem EGF Rezeptor entspricht (Immunoblot, siehe folgende Experimente). Auch bei anderen Proteinbanden wie p75 und p60 (*Src*, siehe folgende Experimente) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung. HGF und IGF-I induzierten ebenfalls bei Gabe von je 1 nM eine vergleichbare Intensitätszunahme verschiedener Phosphoproteinbanden, so dass in den folgenden Experimenten keine supraphysiologischen Konzentrationen (höher als 1 nM) eingesetzt wurden.

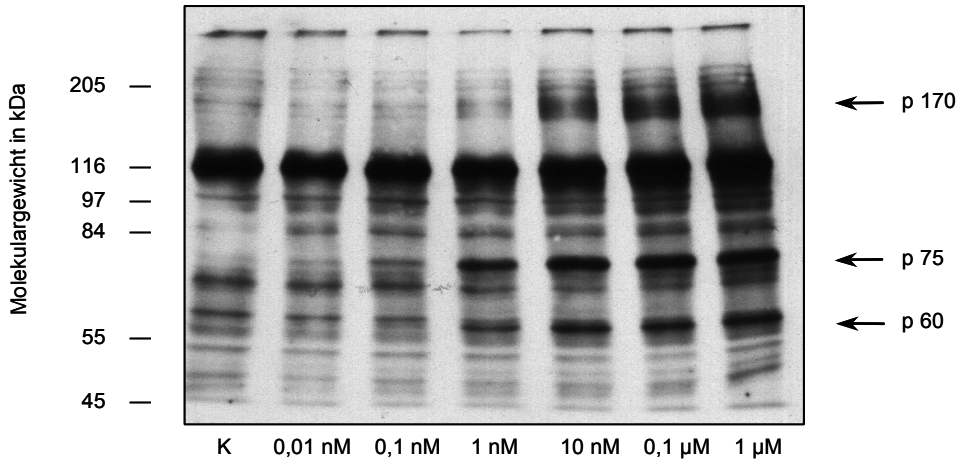


Abbildung 4: Konzentrationsabhängige Tyrosinphosphorylierung.
PT-1 Zellen wurden zehn Minuten mit EGF in der angegebenen Konzentration stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT66) inkubiert. K = unstimulierte Kontrolle.

3.2. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise der Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I

Da die Rezeptoren die entscheidende Kontaktstelle zwischen Wachstumsfaktor und Zelle darstellen, wurde zunächst der Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung der HGF, EGF und IGF-I Rezeptoren untersucht. Hierzu wurden PT-1 Zellen zwischen 1 und 60 Minuten mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor (1 nM) stimuliert (Abbildung 5, A, C, E). Die anschließende densitometrische Analyse ergab bei allen Wachstumsfaktoren eine Intensitätszunahme der Rezeptorbanden zwischen ein und zehn Minuten. Nach 30 Minuten zeigte sich bereits ein Rückgang der Tyrosinphosphorylierung, der sich nach 60 Minuten weiter fortsetzte. Hinsichtlich der Höhe der Intensitätszunahme bestanden erhebliche Unterschiede. Nach HGF Stimulation stieg die Phosphorylierung bereits nach einer Minute auf das 23 ±8fache der Basalphosphorylierung an und erreichte nach zehn Minuten ihr Maximum ($RP_{max.}$: 26 ±12fach). Die EGF induzierte Rezeptorphosphorylierung war nach fünf Minuten bereits maximal (9 ±2fach). Im Gegensatz dazu trat nach 1-minütiger Stimulation mit IGF-I bereits die stärkste Bandenintensität des IGF-I Rezeptors auf (15 ±5fach). Somit bewirkte HGF eine stärkere Intensitätszunahme seiner Rezeptorphosphorylierung als IGF-I und EGF, erreichte diese aber auch erst nach einer Stimulationszeit von zehn Minuten (IGF-I Rezeptor nach einer Minute, EGF Rezeptor nach fünf Minuten).

Um die Identität der phosphorylierten Rezeptorbanden zu überprüfen, wurden Membranen mit gelelektrophoretisch getrennten Volllysaten oder Immunpräzipitaten mit einem entsprechenden Antikörper gegen den HGF, den EGF bzw. den IGF-I Rezeptor inkubiert. In den PT-1 Zelllysaten konnten so eine 145 kDa Bande als ß-Untereinheit des HGF Rezeptors, eine 170 kDa Bande als EGF Rezeptor und eine 95 kDa Bande als ß-Untereinheit des IGF-I Rezeptors identifiziert werden (Abbildung 5, B, D, F).

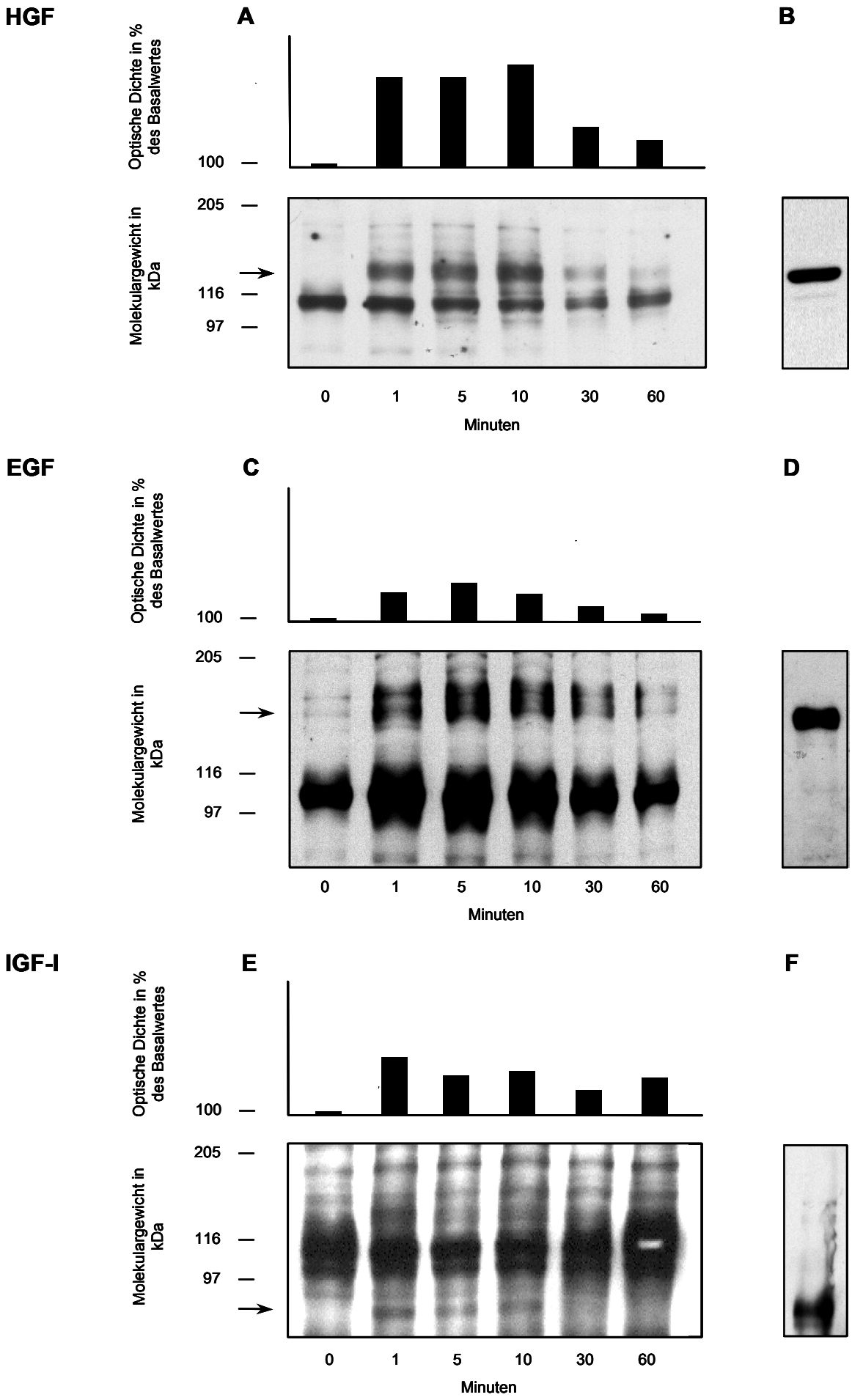

HGF
A
B
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
205
116
97
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten
EGF
C
D
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
205
116
97
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten
IGF-I
E
F
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
205
116
97
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten

Abbildung 5 (Seite 26):

Linke Spalte:
(A,C,E) Zeitabhängige Rezeptorphosphorylierung und densitometrische Auswertung. PT-1 Zellen wurden jeweils mit 1 nM HGF (A), EGF (C) bzw. IGF-I (E) stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT-66) inkubiert. Die Pfeile markieren die jeweiligen Rezeptoren. Nach der Entwicklung der Filme wurden die Rezeptorbanden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Phosphorylierung der unstimulierten Proben wurde als 100% angenommen.

Rechte Spalte:
(B,D,F) Immunoblotanalysen zum Rezeptornachweis. PT-1 Zellen wurden nach 5-minütiger Stimulation mit jeweils 1 nM HGF (B) bzw. EGF (D) lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden jeweils mit einem Antikörper gegen die Rezeptoren für HGF oder EGF inkubiert. Im Falle des IGF-I Rezeptornachweises (F) wurde das Lysat unstimulierter PT-1 Zellen mit einem Antikörper gegen die ß-Untereinheit des IGF-I Rezeptors immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch getrennt. Der Western-Blot wurde mit demselben Antikörper inkubiert.

3.3. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise der Proteinkinase *Src*

Für die Rezeptoren von HGF, EGF und IGF-I stellt die zytosolische Proteinkinase *Src* ein mögliches Substrat dar. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung von *Src* (60 kDa) untersucht. Wiederum wurden PT-1 Zellen zwischen 1 und 60 Minuten mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor (1 nM) stimuliert. Wie in Abbildung 6 (A, C, E) zu sehen, wurde *Src* nach Gabe von EGF wesentlich stärker phosphoryliert als nach Gabe von HGF oder IGF-I. Bereits nach 5-minütiger EGF Stimulation kam es zeitgleich mit der unter 3.2. dargestellten Rezeptorphosphorylierung zu maximaler Tyrosinphosphorylierung von *Src*. Die densitometrische Auswertung ergab zu diesem Zeitpunkt eine 8 ±3fache Intensität gegenüber der Basalphosphorylierung. Auch bei HGF wurde das Intensitätsmaximum (2,6 ±1fach) analog zur Rezeptorphosphorylierung nach zehn Minuten erreicht. Auf IGF-I Stimulation reagierte die *Src* Phosphorylierung jedoch nicht so schnell wie die Rezeptorphosphorylierung und stieg erst nach 60 Minuten auf das 3,6 ±0,7fache an. Die Nachweise der 60 kDa Bande erfolgten mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen *Src*, mit dem die Membranen nach Gelelektrophorese und Western-Blotting inkubiert wurden (Abbildung 6, B, D, F).

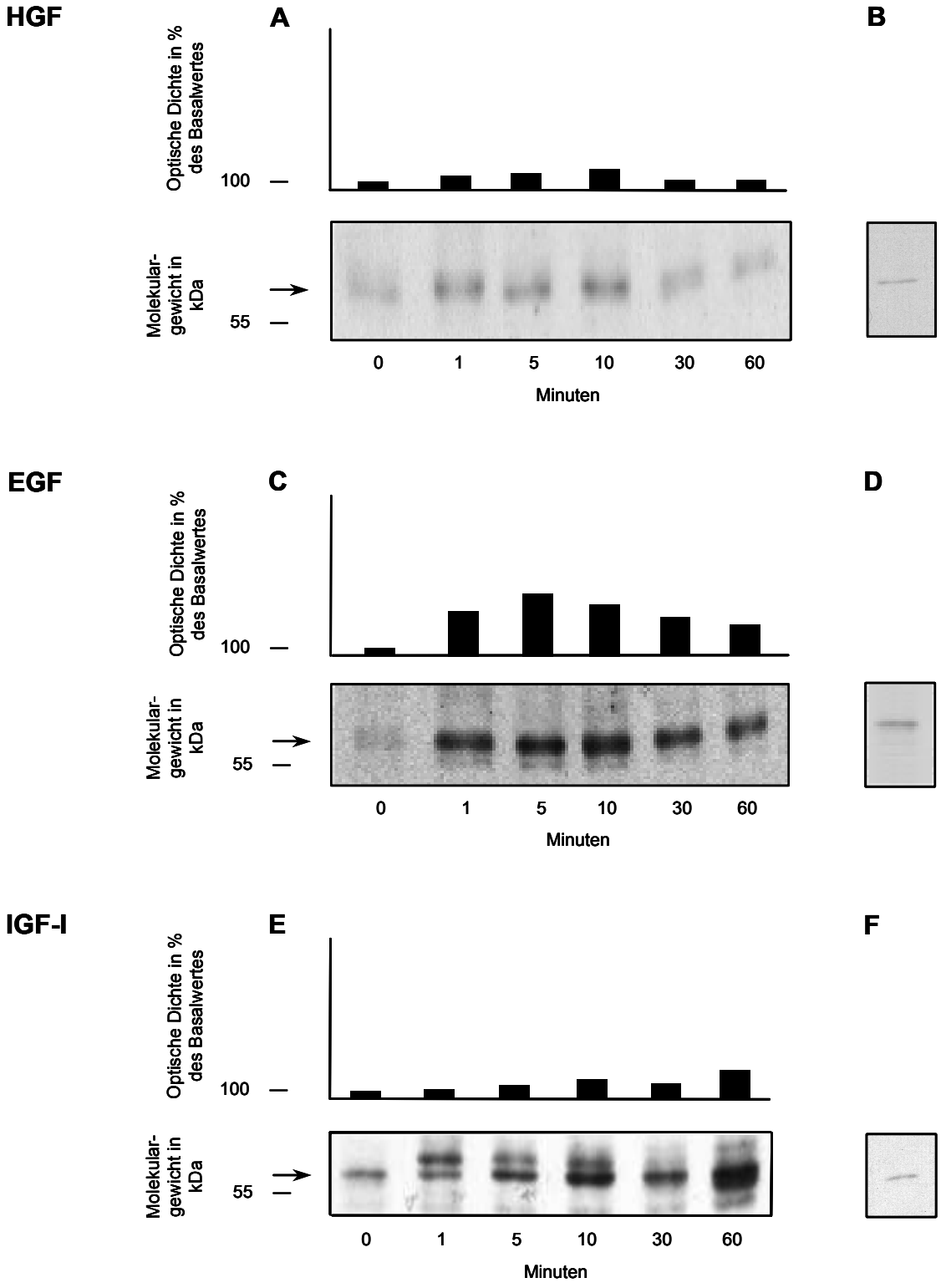

HGF
A
B
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
Molekular-gewicht in kDa
55
0
1
5
10
30
60
Minuten
EGF
C
D
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
Molekular-gewicht in kDa
55
0
1
5
10
30
60
Minuten
IGF-I
E
F
Optische Dichte in % des Basalwertes
100
Molekular-gewicht in kDa
55
0
1
5
10
30
60
Minuten

Abbildung 6 (Seite 28):

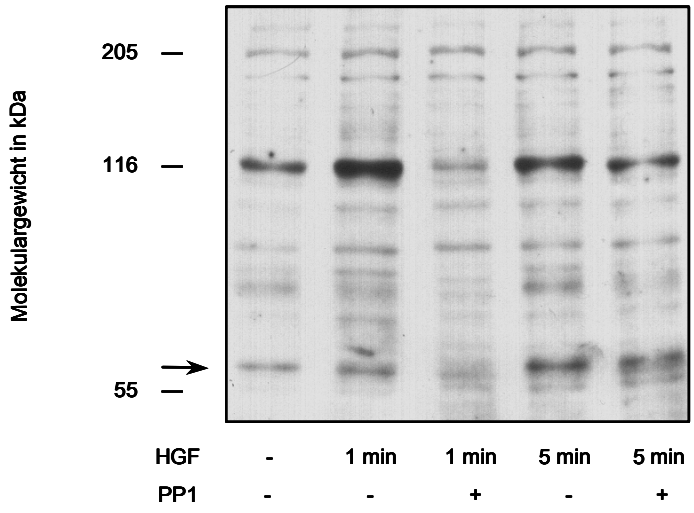
Linke Spalte:
(A,C,E) Zeitabhängige Phosphorylierung von *Src* und densitometrische Auswertung. PT-1 Zellen wurden mit HGF, EGF bzw. IGF-I (jeweils 1 nM) stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT-66) inkubiert. Die Pfeile markieren *Src*. Nach der Entwicklung der Filme wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Rechte Spalte:
(B,D,F) Nachweise der Tyrosinkinase *Src*. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen *Src* inkubiert. (B) und (F) zeigen die Ergebnisse einer 10-minütigen Stimulation mit HGF bzw. IGF-I, (D) das Ergebnis einer 5-minütigen Stimulation mit EGF.

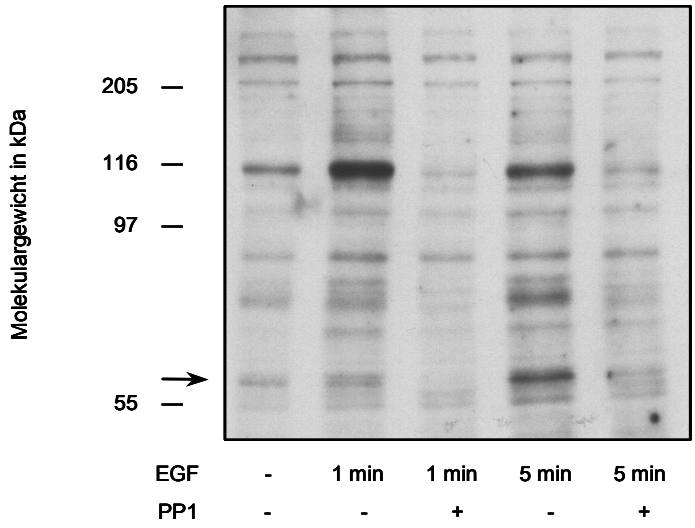
3.4. Inhibition der Phosphorylierung der *Src* Kinasen

Durch Vorinkubation mit PP1, einem potenten selektiven Inhibitor der Tyrosinkinasen der *Src* Familie, sollte nun untersucht werden, ob eine Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der beobachteten Proteine im Western-Blot sichtbar ist. PT-1 Zellen mit und ohne PP1 Vorinkubation (10 µM, 30 Minuten) wurden eine bzw. fünf Minuten mit Wachstumsfaktor (1 nM) stimuliert. Abbildung 7 zeigt, dass eine Inkubation mit PP1 vor einer Stimulation mit HGF, EGF und IGF-I eine deutliche Verringerung der Phosphorylierung von *Src* bewirkte. Außerdem wiesen auch sehr viele andere tyrosinphosphorylierte Proteine im Bereich zwischen 55 und 205 kDa eine schwächere Bandenintensität auf, wenn die Zellen vorher mit PP1 behandelt wurden. Dabei bestanden hinsichtlich der Stärke der Hemmung bei HGF, EGF und IGF-I nur geringfügige Unterschiede.

HGF


Molekulargewicht in kDa
205
116
55
HGF - 1 min 1 min 5 min 5 min
PP1 - - + - +

EGF


Molekulargewicht in kDa
205
116
97
55
EGF - 1 min 1 min 5 min 5 min
PP1 - - + - +

IGF-I

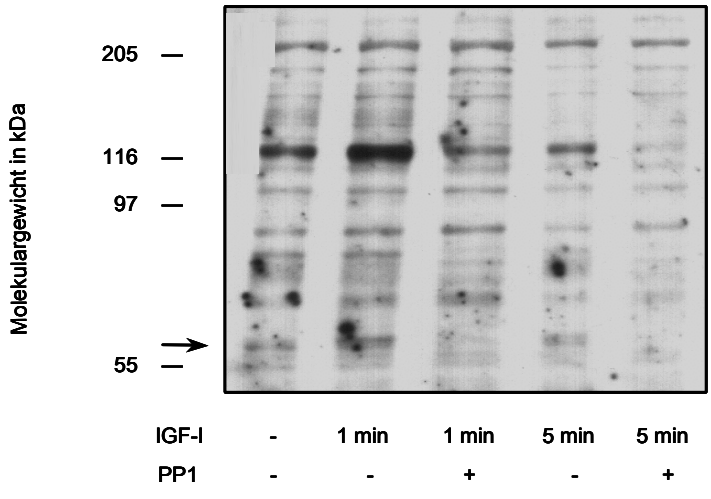

Molekulargewicht in kDa
205
116
97
55
IGF-I - 1 min 1 min 5 min 5 min
PP1 - - + - +

Abbildung 7 (Seite 30): Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch PP1.
PT-1 Zellen wurden 30 Minuten mit 10 µM PP1 vorinkubiert, mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor (1 nM) stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT-66) inkubiert. Die Zellen für die Kontrollproben wurden nur mit dem Wachstumsfaktor stimuliert. Die Pfeile markieren *Src*.

In später durchgeführten Zellzahlexperimenten konnte von Oktay Temiz (Doktorand, Arbeitsgruppe PD Dr. med. Jehle) gezeigt werden, dass PP1 in Langzeitexperimenten eine Proliferationshemmung bewirkt. PT-1 Zellen wurden eine Stunde mit 10 µM PP1 vorinkubiert und dann über 48 Stunden mit HGF, EGF bzw. IGF-I (1 nM) stimuliert. Dabei sank die Zellzahl bei allen drei Wachstumsfaktoren auf ca. 65% des Ausgangswertes. Zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren gab es wie auch in den Western-Blots kaum Unterschiede.

Tabelle 6: Zellzahl nach 48-stündiger Wachstumsfaktorstimulation und PP1 Vorinkubation in Prozent des Ausgangswertes. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

	HGF	EGF	IGF-I
Zellzahl ohne PP1 in %	95	93	97
Zellzahl mit PP1 in %	63	66	66

3.5. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung und Nachweise von STAT3

In einem nächsten Schritt sollte STAT3 als Mediatorprotein zwischen dem zytosolischen und dem nukleären Kompartiment untersucht werden. Aus diesem Grund wurden Lysate von PT-1 Zellen, die zwischen ein und zehn Minuten mit Wachstumsfaktor (1 nM) stimuliert worden waren, zum einen hinsichtlich ihrer Tyrosinphosphorylierung im Bereich von 92 kDa und zum anderen hinsichtlich des Vorhandenseins von STAT3 getestet. STAT3 konnte in gelelektrophoretisch getrennten Volllysaten oder Immunpräzipitaten durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden und erwies sich als die in der Tyrosinphosphorylierung sichtbare 92 kDa Bande. Wie in Abbildung 8 dargestellt, nahm die Phosphorylierung der 92 kDa Bande nach 10-minütiger HGF Stimulation auf das Doppelte des Basalwertes zu (2,2 ±0,4). Unter EGF Stimulation ließ sich nach fünf Minuten nur eine geringfügige Änderung auf das 1,4 ±0,8fache beobachten. Bei Zugabe von IGF-I blieb die Phosphorylierung im beobachteten Zeitraum sogar konstant.

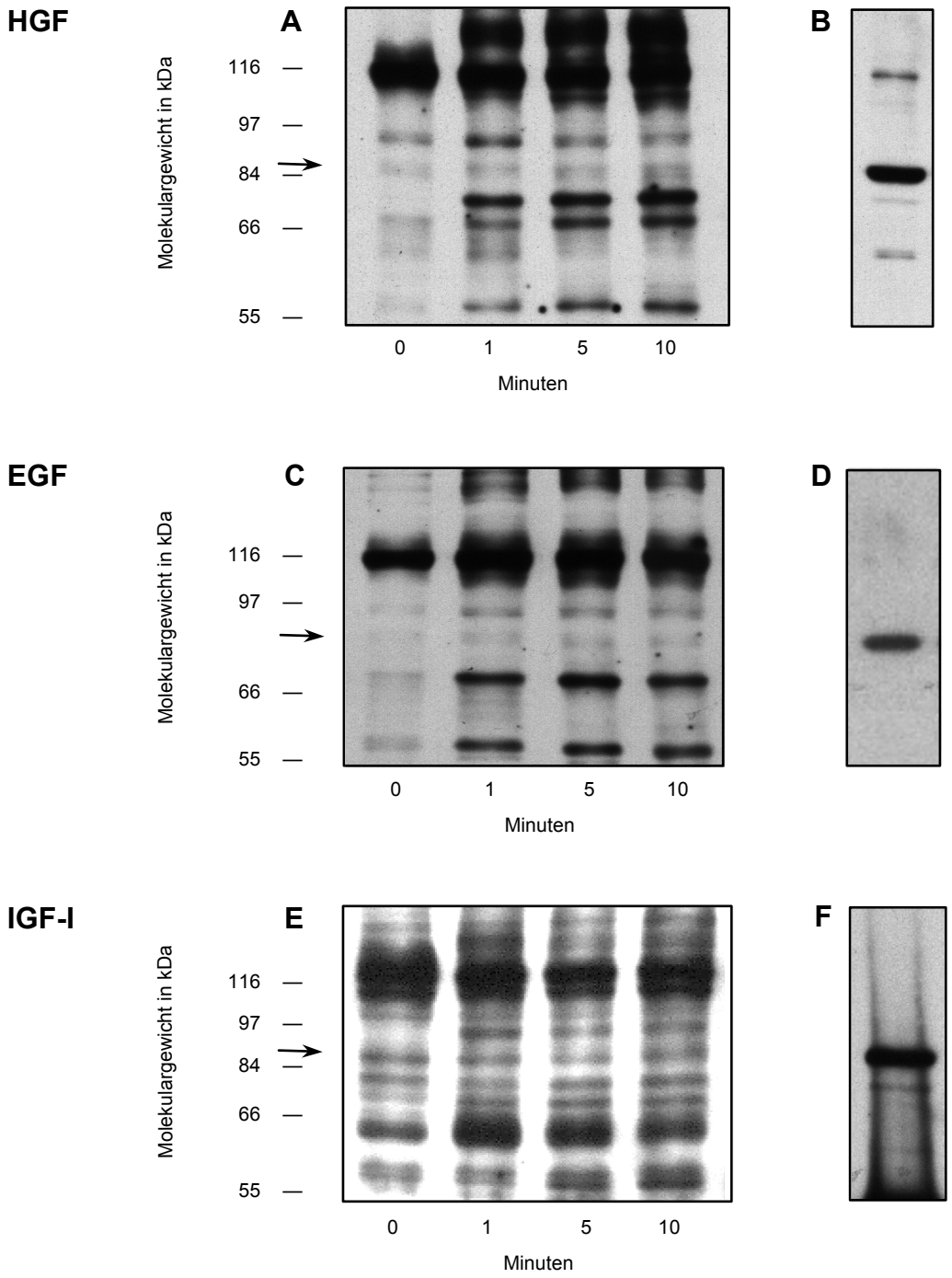


Abbildung 8:

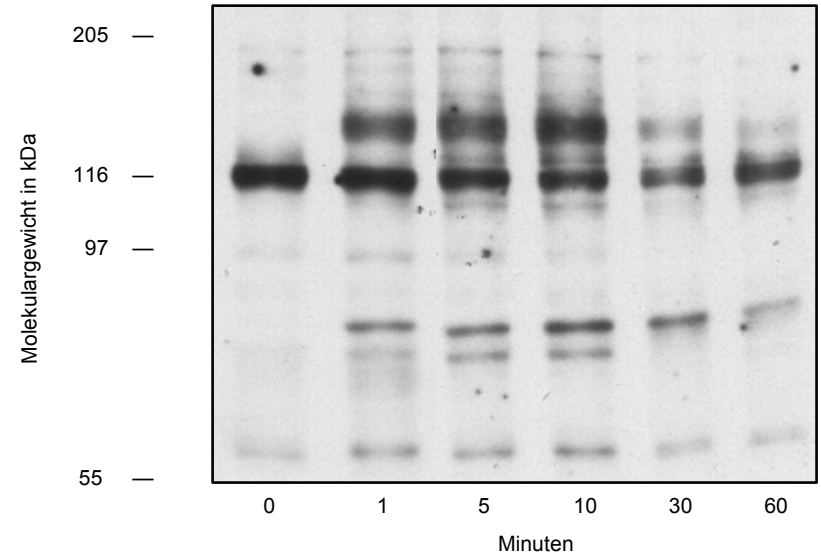
Rechte Spalte: (A,C,E) Tyrosinphosphorylierung von STAT3. PT-1 Zellen wurden mit HGF, EGF bzw. IGF-I (jeweils 1 nM) stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT-66) inkubiert. Die Pfeile markieren die 92 kDa Bande STAT3.
Linke Spalte: (B,D,F) Nachweise von STAT3. Unstimulierte PT-1 Zellen wurden lysiert, im Falle von (F) zusätzlich mit einem Antikörper gegen STAT3 immunpräzipitiert und anschließend gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit demselben Antikörper inkubiert.

3.6. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Bereich zwischen 55 und 205 kDa

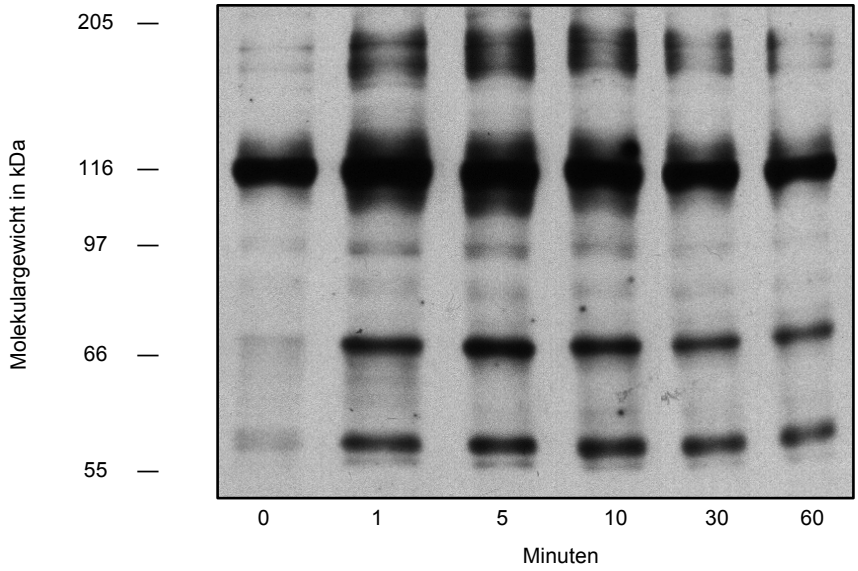
Da außer den bisher nachgewiesenen Proteinen noch viele andere an der Signaltransduktion in PT-1 Zellen beteiligt sind, wurden weitere tyrosinphosphorylierte Proteine im Bereich zwischen 55 und 205 kDa dargestellt. Die Zellen wurden dazu wiederum mit 1 nM Wachstumsfaktor über denselben Zeitraum stimuliert. Bei HGF und EGF ließ sich ein relativ ähnliches Phosphorylierungsmuster beobachten, nach IGF-I Stimulation waren die Banden zahlreicher und zeigten ein etwas anderes kinetisches Verhalten (siehe Abbildung 9). Bei allen Wachstumsfaktoren erreichte die Intensität der einzelnen Banden in den ersten zehn Minuten ihr Maximum und war in der Regel nach 30 Minuten rückläufig.

Abbildung 9 (Seite 34): Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Bereich zwischen 55 und 205 kDa. PT-1 Zellen wurden mit HGF, EGF bzw. IGF-I (jeweils 1 nM) stimuliert, lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Die Western-Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (PT-66) inkubiert.

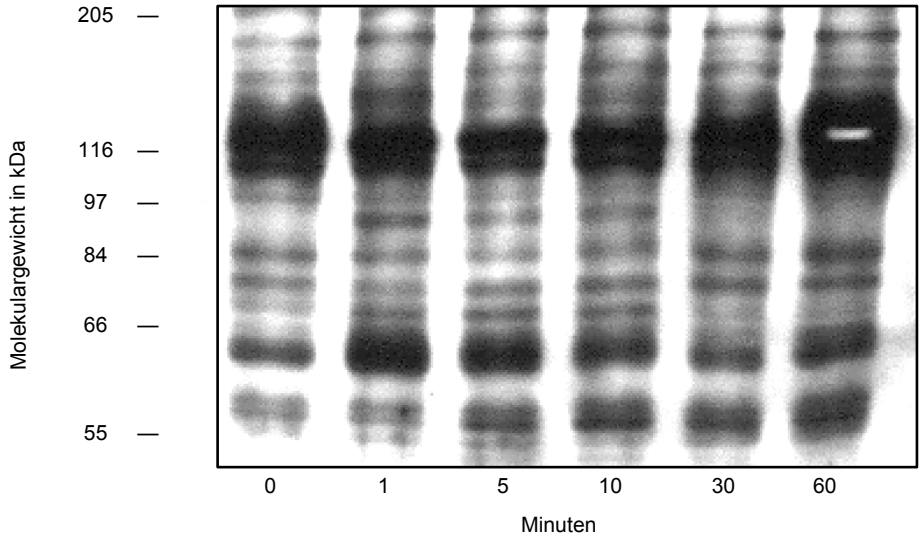
HGF


205
116
97
55
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten

EGF


205
116
97
66
55
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten

IGF-I


205
116
97
84
66
55
Molekulargewicht in kDa
0
1
5
10
30
60
Minuten

3.7. Beziehung zwischen Rezeptorzahl, Tyrosinphosphorylierung und biologischer Wirkung

Unter normalen Bedingungen führt die Bindung eines HGF, EGF oder IGF-I Ligandenmoleküls an den entsprechenden Rezeptor zu dessen Autophosphorylierung. Die Intensität der im Western-Blot nachweisbaren Phosphorylierung hängt neben der Ligandenmenge auch entscheidend von der Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche ab. Deshalb wurde die relative Phosphorylierung ($RP_{rel.}$) als Quotient aus maximaler Rezeptorphosphorylierung ($RP_{max.}$) und Rezeptorzahl (RZ) nach folgender Formel errechnet:

$$RP_{rel.} = \frac{RP_{max.}}{RZ} \times 1000$$

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dargestellt:

Tabelle 7: Gegenüberstellung von Rezeptorzahl und -phosphorylierung.

	HGF	EGF	IGF-I
Rezeptorzahl	68.500	16.000	165.450
Maximale Rezeptorphosphorylierung	26	9	15
Relative Rezeptorphosphorylierung	0,38	0,56	0,09

Berücksichtigt man die Zahl der verfügbaren Rezeptoren für HGF, EGF und IGF-I, so kann man erkennen, dass die HGF und EGF Rezeptoren ähnlich effektiv phosphoryliert werden. Im Gegensatz dazu kommt bei Gabe von IGF-I in physiologisch ausreichender Konzentration trotz der hohen Rezeptordichte an der Zelloberfläche eine wesentlich geringere Gesamtphosphorylierung der Rezeptoren zustande.

3.8. Beziehung zwischen Rezeptorzahl und Tyrosinphosphorylierung von *Src*

Die Proteinkinase *Src* ist als Substrat der HGF, EGF und IGF-I Rezeptoren bekannt und greift als zytosolischer Mediator unter anderem in die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Migration ein. Rezeptorphosphorylierung führt zur Aktivierung von *Src*, dessen Effekte also indirekt ebenfalls von der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche abhängig sind. Aus diesem Grund soll auch hier das Verhältnis ($SP_{rel.}$) von maximaler *Src* Phosphorylierung ($SP_{max.}$) zu relativer Rezeptorphosphorylierung ($RP_{rel.}$) nach folgender Formel errechnet werden:

$$SP_{rel.} = \frac{SP_{max.}}{RP_{rel.}} \times 1000$$

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dargestellt:

Tabelle 8: Rezeptorzahl, Phosphorylierung der Rezeptoren und von *Src* im Vergleich zur Zellproliferation. Proliferationsdaten aus Ernst et al. 2001.

	HGF	EGF	IGF-I
Rezeptorzahl	68.500	16.000	165.450
Maximale Phosphorylierung von *Src*	2,6	8,0	3,6
Relative Rezeptorphosphorylierung	0,38	0,56	0,09
Relative Phosphorylierung von *Src*	6,84	14,28	40
Zellproliferation nach 48 h (% versus Kontrolle)	200	190	174

Vergleicht man die relative Phosphorylierung der entsprechenden Rezeptoren mit der relativen Phosphorylierung von *Src*, so fällt auf, dass zwar unter IGF-I Stimulation eine wesentlich geringere Rezeptorphosphorylierung zustande kommt, die davon abhängige relative Phosphorylierung von *Src* jedoch bei IGF-I (40,0) deutlich höher ist als bei HGF (6,84) und EGF (14,28).

4. Diskussion

Vielfältige Signalwege erlauben es der Zelle, Informationen aufzunehmen, weiterzuleiten und darauf zu antworten. Ein zentraler Mechanismus der Signaltransduktion ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Signalproteinen durch Kinasen bzw. Phosphatasen. Andere Möglichkeiten bestehen in der Regulation der enzymatischen Aktivität, der Produktion von *second messenger* Proteinen und der Signalweitergabe durch Komponenten des Zytoskeletts. Diese Vorgänge lassen sich in positive oder negative Regelkreise (*feedback loops*) einordnen und werden von der Stärke und Dauer des auf die Zelle einwirkenden Stimulus entscheidend beeinflusst (Bhalla und Iyengar 1999). In den durchgeführten Experimenten wurde deshalb der zeitliche Verlauf der Tyrosinphosphorylierung als Antwort auf eine physiologische Wachstumsfaktorstimulation an proximalen Tubuluszellen untersucht.

4.1. Konzentrationsabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung

In den eigenen Experimenten wurde zuerst die Konzentration der Wachstumsfaktoren bestimmt, bei der es zu einer deutlichen Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen kommt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte für HGF, EGF und IGF-I an PT-1 Zellen eine spezifische Rezeptorbindung im nanomolaren Bereich gezeigt werden (Ernst et al. 2001). Bei einer Inkubationsdauer von zehn Minuten waren 1 nM HGF, EGF oder IGF-I für die eindeutige Stimulation der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase ausreichend. Alle drei Wachstumsfaktoren zirkulieren in nanomolaren Konzentrationen im menschlichen Plasma (Tsubouchi et al. 1989, Carpenter und Cohen 1990, LeRoith 1997). Somit sind die Phosphorylierungszunahmen in den eigenen Experimenten nicht durch supraphysiologische Wachstumsfaktorkonzentrationen bedingt.

4.2. Rezeptoren

HGF, EGF und IGF-I werden nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor internalisiert und degradiert (Yang et al. 1996). Bei insgesamt vergleichbaren Verhältnissen der Kinetik der Rezeptor-Liganden-Interaktion soll hier beispielhaft auf den EGF Rezeptor eingegangen werden. Die EGF induzierte Rezeptorphosphorylierung erreichte in den eigenen Versuchen bei Stimulation mit 1 nM nach fünf Minuten ihr Maximum und nahm in der folgenden Stunde kontinuierlich ab. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an menschlichen Leberzellen, die ebenfalls nach 5-minütiger EGF Stimulation eine maximale Rezeptorphosphorylierung aufwiesen (Yang et al. 1996). Im Verlauf der nächsten 120 Minuten war auch hier die Phosphorylierung langsam rückläufig. Unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Rezeptornachweise zeigten jedoch, dass EGF Stimulation zu einer Rezeptordegradation führte, die sich in densitometrischen Bestimmungen nach 15 Minuten bereits als 20%iger Signalrückgang bemerkbar machte. Diese Rezeptordegradation war nicht nur zeit- sondern auch konzentrationsabhängig. Nach 2-stündiger Exposition waren in der Untersuchung von Yang bei einer Konzentration von 62 nM EGF noch ca. 50% der EGF Rezeptoren erhalten, wohingegen bei einer Konzentration von 620 nM EGF die Rezeptorbande auf dem Blot kaum noch sichtbar war (Yang et al. 1996).

Es ist also davon auszugehen, dass der zeitabhängige Rückgang der Rezeptor-phosphorylierung nicht nur durch die während der Stimulation aktiven Phosphatasen sondern auch durch Degradation zustande kommt. Bei der Degradation werden die nach der Ligandenbindung entstandenen Rezeptordimere sehr schnell endozytotisch aufgenommen und in den Lysosomen abgebaut (Yang et al. 1996).

Im Vergleich zu EGF und HGF bewirkte IGF-I die schwächste relative Rezeptorphosphorylierung. Hierfür könnte neben Speziesunterschieden (Zelle/Rezeptor: Kaninchen; Ligand: humanes IGF-I) unter anderem das Vorliegen von IGF-I/Insulin-Hybridrezeptoren verantwortlich sein, die in vielen Zelltypen beschrieben werden und eine schwächere IGF-I Bindung aufweisen (Siddle et al. 1994). Die nicht linearen Scatchard Analysen der IGF-I Rezeptorbindungsstudien würden diese Hypothese stützen (PD Dr. med. Jehle, unveröffentlichte Daten). Um zu klären, wie hoch der Anteil der IGF-I/Insulin-Hybridrezeptoren an der IGF-I Bindung ist, müssen weiterführende Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen den Hybridrezeptor durchgeführt werden.

4.3. Die Tyrosinkinase *Src*

Src steht als direkter Interaktionspartner von Wachstumsfaktorrezeptoren und als wichtiger Vermittler von Mitogenese und Motogenese häufig im Mittelpunkt untersuchter Signalwege. Bereits frühere Experimente der eigenen Arbeitsgruppe deuteten auf die mitogene Rolle von *Src* in PT-1 Zellen hin (Jehle et al. 1998). Durch den Einsatz von Proteintyrosinkinaseinhibitoren (PTKIs) wie Geldanamycin, Herbimycin-A, Genistein oder MDC wurde *Src* gehemmt und die HGF induzierte Zellproliferation dosisabhängig reduziert. Außerdem schränkten die PTKIs die durch HGF vermittelte Migration und das Aussprossen der PT-1 Zellen (*scattering*) ein (Stracke et al. 1998). In den eigenen Western-Blots sollte deshalb als nächster Schritt auf Signaltransduktionsebene eine entsprechende Phosphorylierungszunahme von *Src* nach Stimulation sowohl mit HGF als auch mit EGF und IGF-I nachgewiesen werden. EGF induzierte die höchste absolute Phosphorylierungszunahme. Nach der Verrechnung mit der Rezeptorphosphorylierung relativierte sich dieser Befund jedoch. Unter IGF-I Stimulation kam zwar eine sehr geringe Rezeptorphosphorylierung zustande, die davon abhängige relative Phosphorylierung von *Src* war aber bei IGF-I deutlich höher als bei HGF und EGF. Dieser Befund könnte erklären, warum IGF-I in ebenfalls von der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten Proliferationsexperimenten (Ernst et al. 2001) als Wachstumsfaktor letztlich ähnlich potent war wie HGF und EGF, obwohl die aus den densitometrischen Daten errechnete relative Phosphorylierung des IGF-I Rezeptors wesentlich geringer war. Die Experimente mit PP1 zeigten wie erwartet eine deutliche Unterdrückung der Phosphorylierung von *Src*. Diese Ergebnisse unterstützen die publizierten Befunde, die PP1 als spezifischen Hemmer der *Src* Kinasefamilie darstellen (Hanke et al. 1996). Inwieweit sich PP1 oder modifizierte Moleküle dieser Klasse für die gezielte Unterdrückung von *Src* bei Tumoren eignen, müssen weitere Studien zeigen.

Die Interaktion zwischen regulatorischen Domänen der *Src* Kinase und Phosphotyrosinresten aktivierter Rezeptoren kann durch eine Komplexbildung zustande kommen. Im carboxy-terminalen Teil des HGF Rezeptors sind zwei Tyrosinreste (Y1349 und Y1356) bekannt, die nach ihrer Phosphorylierung hoch affine Bindungsstellen für die SH2-Domänen von *Src* darstellen (Ponzetto et al. 1994). In den von Ponzetto dargestellten Experimenten an MDCK Zellen (*Madin Darby canine kidney*) konnte diese Bindung durch Stimulation mit HGF induziert werden, was zu einem Anstieg der Kinaseaktivität von *Src* führte. Nach Mutation beider Bindungsstellen war ein Andocken von *Src* an den HGF

Rezeptor nicht mehr möglich. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte auch die Kinetik dieser Bindung und beobachtete hohe Assoziations- und Dissoziationsraten. Auf diese Weise ist ein schneller Austausch von gebundenen Molekülen gewährleistet, zumal an diese Stelle außer *Src* auch noch andere Signalproteine wie PI-3 Kinase und Phospholipase Cγ (PLCγ) binden (Ponzetto et al. 1994).
Für die Bindung von *Src* an den carboxy-terminalen Teil des aktivierten EGF Rezeptors ist ebenfalls die SH2-Domäne der Tyrosinkinase zuständig (Schlessinger et al. 1992). Dabei wird *Src* selbst phosphoryliert und aktiviert. Weitere Bindungen von Signalproteinen können über eine SH3-Domäne zustande kommen, die sich im *Src* Molekül in der Nähe der SH2-Domäne befindet (Broome und Hunter 1996). Broome und Hunter untersuchten NIH 3T3 Fibroblasten und konnten nach Mutation zweier in der SH3-Domäne liegender Tyrosine (Y133 und Y138) und anschließender EGF Stimulation keine DNA Synthese mehr nachweisen. Ebenso wiesen Fibroblasten, deren *Src* Kinasedomäne inaktiviert worden war, eine längere Verdopplungszeit auf, möglicherweise wegen eines verzögerten Eintritts der Zellen in die Mitosephase des Zellzyklus (Broome und Hunter 1996).

Bei der Bindung von *Src* an den EGF Rezeptor entsteht außerdem eine Verstärkung des Signals im Sinne einer positiven Rückkoppelung: *Src* phosphoryliert den Rezeptor an nicht autophosphorylierten Stellen zusätzlich und schafft auf diese Weise Bindungsstellen für weitere *Src* Moleküle oder SH2-Domänen anderer Tyrosinkinasen (Broome und Hunter 1996).

Beim Übergang von *Src* vom inaktiven in einen aktiven Zustand ist ebenfalls die SH2-Domäne von großer Bedeutung (Abram und Courtneidge 2000). Im inaktiven Zustand nimmt das Molekül durch Anlagerung der SH2-Domäne an einen eigenen phosphorylierten Tyrosinrest (Y527) am carboxy-terminalen Ende eine Konformation ein, die seine Kinaseaktivität unterdrückt. Entstehen nun neue Interaktionen zwischen SH2- oder SH3-Domänen und einem zweiten Molekül, wird dieser Tyrosinrest dephosphoryliert und *Src* in einen aktiven Zustand überführt.

Schließlich kann *Src* das Signal an andere Transduktionswege weitergeben, wie beispielsweise an den *myc* Signalweg, die MAP Kinase, an STAT3 und andere Transkriptionsfaktoren oder auch an Integrine wie beispielsweise FAK (Abram und Courtneidge 2000).

4.4. STAT3

Mit STAT3 wurde ein Mediator untersucht, der eine Brücke vom zytosolischen zum nukleären Kompartiment schlagen kann. In seiner Funktion als Transkriptionsaktivator reguliert STAT3 die Differenzierung und Proliferation von Zellen (Darnell 1997). In den untersuchten proximalen Tubuluszellen kam es bei Stimulation durch HGF zu deutlicher Aktivierung von STAT3, bei EGF und IGF-I zeigten sich jedoch nur geringe Veränderungen des Phosphorylierungsgrades. An anderen renalen Zelllinien wie beispielsweise den MDCK Zellen konnte bei HGF induzierter Stimulation ebenfalls eine Tyrosinphosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden, die für die Tubulogenese ursächlich verantwortlich war (Boccaccio et al. 1998). In der Arbeit von Boccaccio wurden drei verschiedene Schritte der HGF Stimulation untersucht: Die erste Phase, das Aussprossen der Zellen (*scattering*), war von der Aktivierung der PI-3 Kinase abhängig. Das Zellwachstum, die zweite Phase, benötigte die Stimulation des *Ras*-MAP Kinase Signalweges. In der dritten Phase, der Ausbildung tubulärer Strukturen, war STAT3 der entscheidende Mediator, was durch die Anwendung inhibitorischer Phosphopeptide bewiesen werden konnte. Sie hemmten die Assoziation von STAT3 mit dem HGF Rezeptor, die Dimerisierung von STAT3 und auch seine Bindung an die entsprechende Promotorsequenz. So blieb die Bildung tubulärer Strukturen aus, während das Aussprossen der Zellen und ihr Wachstum nicht beeinflusst wurden. Der Informationsfluss zwischen Rezeptor und STAT3 kam dabei entweder durch direkte Bindung zustande oder wurde indirekt durch das Adaptorprotein *Gab1* vermittelt (Boccaccio et al. 1998).

In bereits veröffentlichten Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls der Einfluss von HGF auf Proliferation, Migration und Differenzierung an PT-1 Zellen untersucht (Jehle et al. 1998, Stracke et al. 1998). Durch Präinkubation mit Proteintyrosin-kinaseinhibitoren (PTKIs) konnten zwar Mitogenese und Motogenese gehemmt werden, nicht aber die Formation tubulärer Strukturen. Es müssen also Signalproteine involviert sein, die strukturell mit den *Src* Kinasen nicht verwandt sind. Auffällig war in weiteren morphologischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, dass HGF im Vergleich zu EGF und IGF-I hinsichtlich der Bildung tubulärer Strukturen etwas potenter war (Ernst et al. 2001). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Phosphorylierungsexperimenten der vorliegenden Arbeit, bei denen STAT3 nach HGF Stimulation stärker phosphoryliert wurde als nach EGF oder IGF-I Stimulation. Weitere Experimente an PT-1 Zellen müssen

klären, in welchem Ausmaß der STAT Signalweg auch hier an der Vermittlung der HGF induzierten Tubulogenese beteiligt ist.

In Versuchen mit MDCK Zellen konnte weiter gezeigt werden, dass die Verzweigung der Zellen (*branching*) in dreidimensionaler Kollagengelmatrix spezifisch an die Aktivierung des HGF Rezeptors gekoppelt ist (Sachs et al. 1996). Dieses morphologische Phänomen entspricht der Bildung tubulärer Epithelien während der Organentwicklung. Die Aktivierung anderer Rezeptortyrosinkinasen, wie beispielsweise *c-neu* (strukturell mit dem EGF Rezeptor verwandt), konnte diese morphologischen Veränderungen von Nieren-tubuluszellen nicht induzieren (Sachs et al. 1996). Insgesamt sind diese Befunde mit den eigenen Ergebnissen gut vereinbar, die an PT-1 Zellen unter EGF Stimulation eine schwächere Phosphorylierungszunahme von STAT3 zeigen als unter HGF Stimulation.

Die Interaktion des EGF Rezeptors mit dem STAT Signalweg scheint je nach Zelltyp unterschiedlich zu sein. In mit HGF bzw. EGF stimulierten Hepatozyten konnte eine Koimmunpräzipitation von STAT3 mit dem jeweiligen Rezeptor nachgewiesen werden, es kam also eine direkte Bindung von Rezeptor und STAT3 zustande (Runge et al. 1999). In malignen menschlichen Lungenepithelzellen war die durch EGF bzw. TGF-α eingeleitete konstitutive Aktivierung von STAT3 an das Vorhandensein des mit dem EGF Rezeptor verwandten *ErbB-2* Rezeptors gebunden. Als sog. Hilfsmolekül kann dieser Rezeptor die Wirkung des EGF Rezeptors (*ErbB-1*) potenzieren. Aus *ErbB-1* und *ErbB-2* bilden sich Heterodimere, die für die Aktivierung von STAT3 notwendig sind. Durch spezifische Hemmung der *ErbB-2* Kinaseaktivität durch Tyrphostin AG825 konnte diese Aktivierung blockiert werden (Fernandes et al. 1999). Es bleibt nun in weiteren Experimenten an PT-1 Zellen zu untersuchen, ob eine EGF induzierte Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT3 auch bei diesen Zellen der Bildung eines Rezeptorheterodimeres bedarf. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Untersuchungen, die eine Stimulation von STAT3 durch EGF zeigen, wurde an Fibroblasten ein bestimmter Abschnitt der carboxy-terminalen Region des EGF Rezeptors identifiziert, dessen Aktivierung zur Hemmung der STAT Kinasen führt (David et al. 1996).

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung von STAT3 besteht in der Interaktion mit der Tyrosinkinase *Src*. In verschiedenen mit EGF stimulierten Hepatozyten konnte eine Abhängigkeit der STAT3 Aktivierung von *Src* Kinasen nachgewiesen werden, indem

durch den Einsatz des *Src* Kinase Inhibitors Csk (*C-terminal Src kinase*) eine Reduktion der STAT3 vermittelten Geninduktion erzielt wurde (Wang et al. 1999).

An PT-1 Zellen konnte durch IGF-I Stimulation keine eindeutige Veränderung der STAT3 Phosphorylierung gezeigt werden. An NIH 3T3 Fibroblasten mit konstitutiv aktiviertem IGF-I Rezeptor wurde dagegen eine Aktivierung von STAT3 nachgewiesen (Zong et al. 1998). In diesen Untersuchungen bildeten die Zellen nach IGF-I Stimulus Kolonien, die wiederum durch die Koexpression einer dominant negativen STAT3 Mutante verhindert werden konnten. Dieselbe Arbeitsgruppe berichtete in weiterführenden Untersuchungen, dass STAT3 nach Zugabe von IGF-I auch in menschlichen Nierenzellen (293T) aktiviert wurde, die mit einem nicht konstitutiv aktivierten IGF-I Rezeptor und dem STAT Expressionsvektor transfiziert waren (Zong et al. 2000). Die Aktivierung von STAT3 scheint dabei jedoch nicht an die Überexpression des IGF-I Rezeptors gebunden zu sein, da auch 293T Zellen mit endogenem IGF-I Rezeptor eine IGF-I induzierte STAT3 Aktivierung zeigten. In diesen Zellen ist die Phosphorylierung von STAT3 von den Adaptorproteinen JAK1 und JAK2 abhängig, was durch den Einsatz dominant negativer JAK Varianten nachgewiesen wurde. Außerdem induzierte IGF-I in dieser Versuchsreihe die Phosphorylierung von STAT3 in C2C12 Muskelzellen und in verschiedenen embryonalen und adulten Mäuseorganen wie beispielsweise auch in der Niere (Zong et al. 2000).

In den eigenen Untersuchungen an PT-1 Zellen stellte sich die Bande für STAT3 im Western-Blot relativ schwach dar. Bei der Durchführung der Zelllyse wurde hauptsächlich das zytosolische Kompartiment erfasst, so dass über das nukleäre Kompartiment keine definitiven Aussagen gemacht werden können. An MDCK Zellen wurde gezeigt, dass zytosolisches STAT3 bereits wenige Minuten nach Aktivierung eines membranständigen Rezeptors dimerisiert und in den Zellkern wandert. In diesen Experimenten blieb die Bandenstärke von STAT3 in zytosolischen Extrakten über 60 Minuten konstant, in nukleären Extrakten ließ sich nach 15 Minuten eine deutliche Intensitätszunahme der Banden beobachten (Boccaccio et al. 1998). Weiterführende Untersuchungen an PT-1 Zellen sind nötig, um die Kinetik und die Kompartimentierung von STAT3 nach Stimulation mit den untersuchten Wachstumsfaktoren näher zu charakterisieren.

4.5. Rezeptorzahl – biologische Wirkung

Die Intensität eines weitergegebenen Signals hängt unmittelbar von der Konzentration der Rezeptoren an der Zelloberfläche ab. Beschrieben wurde dieses Phänomen beispielsweise für EGF Rezeptoren an transfizierten menschlichen Leberzellen, deren Rezeptorkonzentration über die Menge an eingeschleusten Expressionsvektoren beeinflusst werden konnte (Wang et al. 1999). In denselben Versuchen konnte auch eine partielle Abhängigkeit der STAT3 Phosphorylierung von der Menge an phosphorylierten EGF Rezeptoren festgestellt werden. In embryonalen Mäusefibroblasten wurde der Einfluss der IGF-I Rezeptorzahl auf Mitogenese und Transformation der Zellen untersucht (Rubini et al. 1997). Die einzelnen Klone unterschieden sich nur in der Rezeptorzahl (null bis eine Million pro Zelle). Es zeigte sich, dass Zellen mit 15 000 und weniger IGF-I Rezeptoren in mit IGF-I versetztem serumfreiem Medium nicht wuchsen. Erst ab einer Rezeptorzahl von 30 000 konnte dann ein Wachstum der Zellen beobachtet werden. Außerdem zeigten diese Experimente, dass schon geringe Veränderungen der Rezeptorzahl in physiologischen Bereichen die Zellantwort modulieren.

Die Zelle verfügt über vielfältige Möglichkeiten, die von der Rezeptorexpression abhängige Menge an phosphorylierbaren Rezeptortyrosinkinasen zu verändern. Beispielsweise kann die Zytokinrezeptoruntereinheit gp130 in Hepatozyten bei der Bindung von *Src* in ihrer Struktur so verändert werden, dass sie Tyrosinphosphatasen binden kann, die sonst keinen Zugriff auf das Molekül hätten. Dadurch wird die Rezeptoruntereinheit dephosphoryliert und die Weiterleitung des Signals beeinträchtigt (Wang et al. 1999).

Der HGF Rezeptor besitzt in seinem transmembranären Segment einen Serinrest, der nach Rezeptorphosphorylierung zum Auseinanderweichen der intrazellulären Domänen zweier benachbarter Rezeptoren führt und möglicherweise eine Transphosphorylierung der beiden Rezeptortyrosinkinasen unmöglich macht (siehe Abbildung 1, Maffè und Comoglio 1998). So verfügt der Rezeptor über einen moleküleigenen Mechanismus, die Weitergabe des eingehenden Signals zu verhindern. Diese und andere bislang nicht bekannte Interaktionen könnten auch die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede der Phosphorylierungskinetik sowohl des HGF als auch des EGF und IGF-I Rezeptors erklären.

4.6. Zelltyp als Baustein der Spezifität

In der Vergangenheit wurde vielfach versucht, die spezielle Wirkung eines Wachstumsfaktors an einer bestimmten Zelle einem bestimmten Signalweg bzw. einzelnen Proteinen zuzuordnen. Die Bemühungen zielten meist auf die Ermittlung eines oder mehrerer weniger Proteine ab, die in der Vermittlung eines Signals die Schlüsselrolle einnehmen und deren Hemmung zur Wirkungsabschwächung oder zum Wirkungsausfall führt. In der Zwischenzeit zeigte sich an mehreren Zellsystemen, dass derselbe Signalweg in zwei verschiedenen Zelltypen ganz unterschiedliche biologische Ziele verfolgen kann. So triggert beispielsweise die PI-3 Kinase nach IGF-I Stimulus in menschlichen Fibroblasten deren Proliferation, wohingegen dieses Enzym in braunen Adipozyten die Differenzierung vermittelt (Petley et al. 1999). Umgekehrt lassen sich für die Proliferation einer Zelle je nach Typ unterschiedliche Signalwege verantwortlich machen. Bestimmte Myoblasten und Adipozyten proliferieren nur bei aktivierter MAP Kinase. MCF-7 Mammakarzinomzellen und gewisse Kapillarzellen des Gehirns benötigen die PI-3 Kinase und die p70 S6 Kinase zur Proliferation (Petley et al. 1999). Diese Beispiele veranschaulichen, dass der durch den Wachstumsfaktor aktivierte Signalweg keine direkten Rückschlüsse auf die biologische Wirkung zulässt, sondern vor allem der Zelltyp und wahrscheinlich auch andere Faktoren wie die Zellzyklusphase und Quervernetzungen verschiedener Signalwege berücksichtigt werden müssen.

4.7. Kinetik als Baustein der Spezifität

Eine weitere Möglichkeit der Variation eines Signals besteht in der Interaktionskinetik von Rezeptor und Ligand. An PC-12 Nervenzellen konnte gezeigt werden, dass die Applikationsdauer des Wachstumsfaktors entscheidend dazu beiträgt, welcher biologische Effekt erzielt wird (Marshall 1995). Ein und dasselbe Signalprotein, die MAP Kinase, führte bei vorübergehender Aktivierung zur Proliferation, bei Daueraktivierung jedoch zur Differenzierung der Zellen. Diese Beobachtung könnte möglicherweise auch über die Intensität der Rezeptorphosphorylierung erklärt werden.

In der Anfangszeit nach Beginn einer Stimulation kommen nur Interaktionen zwischen Rezeptoren und Signalproteinen zustande, für die eine sehr hohe Affinität besteht (Ponzetto et al. 1994). Dauert die Stimulation an und steigt damit die Zahl an phosphorylierten Rezeptoren, können auch Signalmoleküle mit geringer Affinität an die

intrazellulären Bindungsstellen andocken und somit andere Signaltransduktionswege eingeschlagen werden. In Untersuchungen zur Aktivierung von *c-met* durch HGF und HGF-ähnliche Liganden, die jeweils unterschiedliche Dauer und Stärke der *met* Rezeptorkinaseaktivität bewirkten, war eine Dissoziation der Zellen nur bei schwacher, kurz andauernder Kinaseaktivität auslösbar (Comoglio 2001). Eine Proliferation der Zellen stellte sich bei kurzer und starker Kinaseaktivität ein, wohingegen die Ausbildung tubulärer Strukturen nur unter lang andauernder, schwacher Rezeptoraktivität induzierbar war. Auf diese Weise ließe sich auch erklären, warum bei den eigenen Versuchen Diskrepanzen zwischen dem über 72 Stunden beobachteten Zellwachstum und den Western-Blot Ergebnissen bestehen. In den Wachstumsexperimenten zeigte sich HGF deutlich potenter als EGF und IGF-I, wohingegen die densitometrischen Bestimmungen der innerhalb einer Stunde erreichten Maximalwerte der Rezeptorphosphorylierung diese Ergebnisse nicht unterstützen. HGF und EGF waren in den einstündigen Untersuchungen an PT-1 Zellen hinsichtlich der Phosphorylierung ihrer Rezeptortyrosinkinasen ähnlich wirksam und deutlich potenter als IGF-I. Bei der Phosphorylierung von *Src* war dagegen IGF-I potenter als EGF und dieses wiederum potenter als HGF. Dies widerspricht auf den ersten Blick den Wachstumsversuchen, lässt sich aber analog zu den von Comoglio durchgeführten Experimenten über die längere Expositionsdauer der Wachstumsfaktoren und die dadurch induzierte differentielle Signaltransduktion erklären.

In manchen Fällen benötigt eine biologische Antwort auch die synchrone Aktivierung mehrerer Signalkaskaden. So konnte an Nacktmäusen gezeigt werden, dass die Dissoziation von Tumorzellen, die Invasion extrazellulärer Matrix und die Metastasen-bildung nur möglich waren, wenn die Signalwege über *Ras* und die PI-3 Kinase gleichzeitig aktiviert wurden (Giordano et al. 1997). Es ist deshalb eher unwahrscheinlich, dass so komplexe biologische Effekte wie das Zellwachstum nur durch einen Zelltyp- oder Wachstumsfaktor-spezifischen Signalweg ausgelöst werden können.

Es bestehen jedoch auch Möglichkeiten, die Abhängigkeit der Zellantwort vom primär benötigten Stimulus zu modulieren (Bhalla und Iyengar 1999). Der EGF Rezeptor ist in der Lage, sowohl den Signalweg über die Proteinkinase C als auch den Weg über die MAP Kinase zu aktivieren. Diese Signalwege können an zwei Stellen miteinander kommunizieren und weitere Proteine binden, die die Proteinkinase C erneut aktivieren. So entsteht ein Netzwerk mit der Fähigkeit einer positiven Rückkoppelung (*feedback loop*),

das auf das Fortbestehen des initialen Signals, die EGF Stimulation, nicht mehr angewiesen ist. Interessanterweise bildet sich diese positive Rückkoppelung andererseits nur aus, wenn der primäre Stimulus eine bestimmte Konzentration und Dauer überschreitet. So wird das System vor unnötigem Energieverbrauch geschützt, indem eine Zellreaktion bei früh abbrechender Stimulation von Anfang an nicht ausgeführt wird. Es besteht letztlich also doch eine gewisse Abhängigkeit von der Kinetik des auslösenden Wachstumsfaktors. Diese positiven oder auch negativen Regelkreise sind beispielhaft für die Überlegenheit eines Netzwerkes gegenüber einem einzelnen Signalweg (Bhalla und Iyengar 1999). Dabei werden Umfang und Dauer der kreisenden Aktivierung bzw. Deaktivierung von der Konzentration der Komponenten, der Anwesenheit von Phosphatasen und von weiteren auf das Netzwerk einwirkenden Faktoren bestimmt. Hemmende Rückkoppelung bewahrt das System vor überschießender Aktivität, positive Regelkreise können die induzierte Reaktion verstärken und beschleunigen. Das Netzwerk ist im Gegensatz zum Einzelsignalweg außerdem in der Lage, mehrere Endprodukte in Form von Signalproteinen zu liefern. Dies kann als eine Art Sicherheitsmechanismus verstanden werden: Die Zelle setzt das eingehende Signal nur um, wenn das Netzwerk vollständig funktionsfähig ist, also alle Phosphorylierungsschritte hierarchisch durchlaufen werden und alle zugehörigen Endprodukte vorhanden sind. Treten in einem Signalweg Störungen auf, die nicht durch Quervernetzungen kompensiert werden können, und fehlt so eines der Endprodukte, kann die Reaktion gestoppt werden (Bhalla und Iyengar 1999).

4.8. Phosphatasen

Proteintyrosinphosphatasen sind die großen Gegenspieler der Proteintyrosinkinasen. Bis zu 45 verschiedene Phosphatasen wurden bisher in einem Zelltyp entdeckt (Dayton und Knobloch 1997). Wie bei vielen Signalproteinen ist auch bei den Phosphatasen ihre Konzentration und die Dauer der Aktivität von entscheidender Bedeutung für ihre Wirkung (Bhalla und Iyengar 1999). In A431 Plattenepithelkarzinomzellen führt beispielsweise eine Konzentrationszunahme der induzierbaren Proteintyrosinphosphatase SHP-1 zu einer Abschwächung der EGF Rezeptorautophosphorylierung und zu einer reduzierten Aktivierung nachgeschalteter Signalproteine wie unter anderem STAT3 (Tenev et al. 2000).

In den eigenen Experimenten wurden zum Lysispuffer mehrere Proteaseinhibitoren zugesetzt, die nach dem Beenden der Wachstumsfaktorstimulation einen möglichen enzymatischen Abbau der Proteine verhindern sollten. Jedoch wurden keine Phosphatase-inhibitoren zugesetzt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Absaugen des Wachstumsfaktors und dreimaliges Spülen mit eiskaltem PBS, bevor der Lysispuffer und nach einem Zentrifugationsschritt dann der fixierende SDS-Probenpuffer zugegeben wurden. Obwohl die Proben bei allen Schritten auf Eis gelagert waren, ist ein Weiterwirken von zelleigenen Phosphatasen nicht auszuschließen. In Versuchen an menschlichen Leberzellen wurde zum Reaktionsstop kochend heißer SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben direkt im Anschluss daran fünf Minuten gekocht, was eine sofortige Proteindenaturierung bewirkt (Yang et al. 1996). So können etwaige Dephos-phorylierungen noch besser gestoppt werden, was sich auch an den Ergebnissen der oben genannten Studie zeigte: Die Rezeptorphosphorylierung erreichte schon in den ersten Minuten der Wachstumsfaktorstimulation ein sehr hohes Niveau. Möglicherweise könnten die Phosphorylierungsergebnisse durch diese prompte Denaturierung auch bei PT-1 Zellen noch verbessert werden.

4.9. Zelldichte als limitierender Faktor

In vielen Kulturen ist die Zellteilungsrate abhängig von der Dichte des Zellrasens. So konnte an renalen Tubulusepithelzellen des Kaninchens unter HGF Stimulation eine Abnahme der DNA Synthese bei wachsender Zelldichte nachgewiesen werden (Igawa et al. 1991). Bei einer Ausgangszelldichte von 10 000 pro Quadratzentimeter war die DNA Synthese bei gleich bleibender HGF Konzentration doppelt so hoch wie bei 100 000 Zellen pro Quadratzentimeter. In den eigenen Versuchen wurde eine Ausgangszelldichte von 30 000 pro Quadratzentimeter gewählt. Bei einer bekannten Verdopplungszeit der PT-1 Zellen von ca. 24 Stunden war der Zellrasen zum Zeitpunkt der Wachstumsfaktor-stimulation möglicherweise schon in einem Zustand, in dem das Zellwachstum und somit auch die Proteinphosphorylierung nicht mehr maximal stimulierbar waren. Auch für EGF finden sich in der Literatur Berichte, die einen Rückgang der DNA Synthese bei ansteigender Zelldichte zeigen (Zhang et al. 1991). Bei diesen Versuchen wurde das verminderte Ansprechen der proximalen Tubuluszellen auf den Wachstumsfaktor über niedrigere Rezeptorzahlen bei dichtem Zellrasen erklärt. Dabei blieb die Affinität des EGF zu seinem Rezeptor jedoch gleich.

4.10. Therapieansätze

Tumorzellen zeichnen sich unter anderem durch die Fähigkeit aus, unabhängig von Adhäsionsmechanismen zu wachsen, Proteasen zu sezernieren und in die extrazelluläre Matrix einzudringen (Bardelli et al. 1997). Technisch ist es möglich, diese Fähigkeiten auf gesunde Zellen zu übertragen, indem sie beispielsweise mit aktivierten HGF Rezeptoren transfiziert werden. Auf diese Weise können künstliche Tumorzellen produziert werden, die in ihren Eigenschaften den natürlich vorkommenden sehr ähnlich sind und sich für die Entwicklung von Antikörpern gegen Wachstumsfaktorrezeptoren eignen (Bardelli et al. 1997). Klinische Ansätze für die Entwicklung von therapeutisch einsetzbaren Antikörpern finden sich in verschiedenen Tierversuchen. Bei Nacktmäusen, die menschliche Nierenkarzinomzellen als Xenotransplantat erhalten hatten, konnte durch die Applikation eines Antikörpers gegen den EGF Rezeptor das Weiterwachsen des Tumors und die Bildung von Metastasen in der anderen Niere und in der Lunge gehemmt werden. Daraus resultierte ein signifikant verlängertes Überleben der Mäuse (Prewett et al. 1998). Vermittelt wurden diese Effekte über eine dosisabhängige Hemmung der Phosphorylierung der EGF Rezeptortyrosinkinase. In humanen primären Nierenzellkarzinomen ist der EGF Rezeptor in 40-85% der Fälle überexprimiert und korreliert mit hohem Grading und schlechtem klinischen Verlauf. Zusätzlich kann mit der Anwendung des EGF Rezeptorantikörpers eine autokrine Aktivierung der Tumorzellen ausgeschaltet werden, da das von ihnen produzierte TGF-α, ebenfalls ein Ligand des EGF Rezeptors, bei Rezeptorblockierung nicht mehr wirken kann. In der Arbeit von Prewett zeigte sich jedoch auch ein Nachteil des Antikörperkonzeptes. Zwar verblieben während der Zeit der Antikörpergabe durch Zunahme eines Zellzyklusinhibitors (p27KIP1) überproportional viele Zellen in der G1 Phase, einer Ruhephase ohne DNA Replikation, es konnte jedoch keine komplette Elimination des Tumors erzielt werden. Außerdem wuchsen die Tumoren nach Abbruch der Therapie nach kurzer Latenz weiter.

Ein weiterer klinisch interessanter Aspekt ist die Beeinträchtigung des angiogenetischen Potentials von A431 Plattenepithelkarzinomzellen durch EGF Rezeptorantikörper (Petit et al. 1997). Die Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) konnte durch den EGF Rezeptorantikörper vermindert werden und damit auch die für das Tumorwachstum notwendige VEGF vermittelte Angiogenese. Derselbe Effekt konnte auch in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden (Prewett et al. 1998), wo dieser Therapie-option möglicherweise noch größeres Gewicht zukommt, da Nierenzellkarzinome

besonders gut vaskularisiert sind und eine unzureichende Blutversorgung das Weiterwachsen des Tumors noch stärker als bei anderen Karzinomen beeinträchtigen würde.

Eine Überexpression des HGF Rezeptors findet sich bei zahlreichen Tumoren wie beispielsweise der Schilddrüse, des Ovars, des Kolons und auch der Niere (Vargas et al. 2000). Auffällig ist dabei jedoch, dass das HGF Rezeptorgen (*Met*) deutlich häufiger in den Metastasen überexprimiert ist als in den zugehörigen Primärtumoren. Dies könnte das aggressivere und invasivere Wachstum der Metastasen im Vergleich zum Primärtumor erklären.
Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine geringe Expression des HGF Rezeptors in gesunden Zellen des Harntraktes, während in Nierenzellkarzinomen 87% der Zellen HGF Rezeptoren besaßen, unabhängig von Wachstumseigenschaften und Differenzierungsgrad (Natali et al. 1996). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte an anderen Nierenkarzinomzellen (KJ29) außerdem zeigen, dass die Präsenz von HGF im Kulturmedium die Motilität der Zellen steigert. Diese Ergebnisse könnten ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der HGF Rezeptor invasives Wachstum von Tumorzellen vermitteln kann. Bei einem weiteren Nierentumor, dem erblichen Nierenpapillenkarzinom, wurden auf Chromosom sieben an der sonst für *Met* kodierenden Stelle mehrere Mutationen entdeckt, die die Kinasedomäne des Rezeptors betrafen (Bardelli et al. 1997). Da diese Region die Aktivität des Rezeptors bestimmt, erlangt die Zelle auf diese Weise onkogenes Potential im Sinne von überschießender Kinaseaktivität. Beim HGF Rezeptor sind beispielsweise die Tyrosine Y1234 und Y1235 für die maximale Aktivierung der Kinasefunktion verantwortlich.

Strategien zur Therapie maligner Tumore werden in den nächsten Jahren möglicherweise dahin gehen, die Signalwege bestimmter Wachstumsfaktoren in Organ- bzw. Gewebespezifischer Weise zu modulieren. Viele Wachstumsfaktoren, darunter auch HGF, EGF und IGF-I, vermitteln ihre Stimulation der Zellproliferation über die Tyrosinkinaseaktivität der entsprechenden Rezeptoren. Diese Effekte können durch die Anwendung von Proteintyrosinkinaseinhibitoren (PTKIs) gehemmt werden. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an PT-1 Zellen zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Wachstumsfaktor induzierten Zellproliferation (Ernst et al. 2001). Dabei konnten für die einzelnen Wachstumsfaktoren relativ spezifische PTKIs bestimmt werden. Tyrphostin und Emodin erwiesen sich für HGF potenter als für EGF und IGF-I, MDC hemmte die EGF Wirkung

relativ spezifisch. Geldanamycin, ein sehr potenter PTKI, zeigte deutliche Effekte auf die IGF-I induzierte Zellproliferation. Außerdem wurde die unspezifische Toxizität der PTKIs durch Inkubation ohne Wachstumsfaktoren überprüft, die jedoch erst in Konzentrationen relevant wurde, die 10 bis 100fach über der IC_{50} lagen. Somit könnten PTKIs durch ihre relativ spezifische Hemmung der Proliferation neue Ansätze für die Entwicklung Tumor-inhibitorischer Substanzen darstellen. Erfolgversprechende Ansätze gibt es bereits in der Entwicklung von selektiven kleinmolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren, die sich teilweise schon in klinischer Erprobung befinden. Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) sprachen deutlich auf die Anwendung eines Inhibitors der sogenannten *Bcr-Abl* Kinase an, deren Vorhandensein für den Ausbruch der Krankheit entscheidend ist (Druker und Lydon 2000). An diesem Beispiel werden einige Besonderheiten des Einsatzes von Tyrosinkinaseinhibitoren deutlich. Analog zur Anwendung von Rezeptorantikörpern musste eine Langzeittherapie angestrebt werden, da der Inhibitor zwar die Proliferation von *Bcr-Abl* positiven Zellen begrenzen, nicht aber ihren Zelltod auslösen konnte. Ein therapeutischer Vorteil bei der Behandlung der CML besteht darin, dass das Krankheitsbild durch einen einzigen molekularen Defekt ausgelöst wird, was nur bei sehr wenigen malignen Erkrankungen der Fall ist, aber die Entwicklung von Medikamenten entscheidend vereinfacht. Andere unkompliziertere Therapieziele sind beispielsweise Inhibitoren für Kinasen, die nur Gewebe-spezifisch exprimiert werden. Schwieriger wird es bei Kinasen, die zusätzlich bei der Regulation nicht-pathologischer Zellfunktionen eine elementare Rolle spielen (Druker und Lydon 2000). Ausschlaggebend für eine selektive Bindung an das Zielprotein ist außerdem eine genaue Analyse seiner Quartärstruktur. Es besteht dann unter anderem die Möglichkeit, ATP Bindungsstellen mit einem Inhibitor zu besetzen und so die Anlagerung eines für die Funktion elementaren Kofaktors sterisch zu verhindern (Druker und Lydon 2000).

Eine weitere Stufe der Entwicklung von Therapieansätzen stellt die *antisense* Strategie dar. Dabei handelt es sich um Nukleotidsequenzen, die zu *messenger* RNA Strängen komplementär sind und diese über eine Komplexbildung so beeinträchtigen, dass eine intrazelluläre Weiterverarbeitung des primären Transkripts, sein Transport oder seine Translation nicht mehr möglich oder zumindest stark eingeschränkt sind. Durch die Einführung solcher Sequenzen in Tumorzellen kann die Aktivität eines Gens sehr selektiv ausgeschaltet werden. Die Expression von autokrin wirksamen Zytokinen kann so beispielsweise reduziert und die Proliferation des Tumors vermindert werden. Klinisch

relevante Ansätze zielen darauf ab, auch Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren oder Onkogene auf diese Weise bereits auf der Ebene der Transkription zu hemmen. Voraussetzungen hierfür sind jedoch eine größtmögliche Übereinstimmung von *messenger* RNA und *antisense* Nukleotid sowie ein relativer Überschuss des letzteren (Carter und Lemoine 1993, Khachigian 2000).

Während die Anwendung von Wachstumsfaktoren bei gutartigen Nierenerkrankungen an Tiermodellen früher fast ausschließlich positiv bewertet wurde, mehren sich inzwischen Studien, die eine Verschlechterung des Krankheitsbildes durch Wachstumsfaktoren darlegen. Für EGF wurde nach künstlicher 30-minütiger renaler Ischämie eine Beschleunigung der Organregeneration nachgewiesen (Humes et al. 1989). Die untersuchten Ratten erhielten eine Stunde nach Beendigung der Ischämie eine einmalige Dosis EGF subkutan und zeigten nach 24 bis 72 Stunden eine deutliche Zunahme der DNA Replikation im Vergleich zu Tieren, die kein EGF erhalten hatten. Außerdem normalisierte sich das Serumkreatinin signifikant früher. Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen verbesserte Organregeneration durch Ausschaltung der EGF Wirkung nachweisen. An transgenen Mäusen mit einem am carboxy-terminalen Ende veränderten, dominant negativen EGF Rezeptor ohne Tyrosinkinasedomäne wurden zwei Nieren schädigende Modelle untersucht (Terzi et al. 2000). Nach subtotaler Nephrektomie (25% Parenchymrest) waren die Zellen von Tieren mit dominant negativem Rezeptor wesentlich weniger hypertrophiert, die Tubuli weniger dilatiert und die Mikrovilli größtenteils erhalten. Vor Beginn der Experimente unterschieden sich die transgenen Mäuse hinsichtlich Nierenfunktion und -morphologie jedoch nicht von den Kontrolltieren. Auch nach verlängerter renaler Ischämie (50 Minuten) profitierten die Tiere mit verändertem Rezeptor von verringerter tubulärer Atrophie und weniger stark ausgeprägter interstitieller Fibrose. Es bleibt nun in weiteren Untersuchungen zu klären, ob eine frühe einmalige Anwendung von EGF vorteilhaft für die Organregeneration ist oder eine Fibrosierung der Niere verstärkt.

Experimente mit dem Ziel der therapeutischen Blockade von Wachstumsfaktorrezeptoren gestalten sich insofern schwierig, als beispielsweise Versuchstiere ohne EGF Rezeptoren postnatal nicht überlebensfähig sind (Terzi et al. 2000). Beim EGF Rezeptor ergibt sich zusätzlich noch das Problem, dass außer EGF noch eine Menge anderer Liganden binden und zur Rezeptorautophosphorylierung führen können. Eine primäre Ausschaltung von

EGF allein kann also auch keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern. Aus diesen Gründen scheint das Prinzip der dominant negativen Rezeptoren bisher ein geeignetes Untersuchungsmodell zu sein, wenn sich wie oben beschrieben die transgenen Tiere hinsichtlich Nierenfunktion und -morphologie nicht von den anderen unterscheiden (Terzi et al. 2000).

Bevor die Wachstumsfaktoren HGF, EGF und IGF-I in der Medizin angewandt werden können, bleiben vor allem die Bedenken hinsichtlich ihrer kanzerogenen Potenz zu klären, die sich bereits aus ihrer potenten Inhibition der Apoptose ergibt. Bis zum Beweis des Gegenteils muss davon ausgegangen werden, dass die Anwendung von Wachstumsfaktoren beim Menschen das Risiko maligner Tumoren erhöht (Vargas et al. 2000). Andererseits konnten beispielsweise für HGF in Melanomen, Plattenepithelkarzinomen und Hepatozellulären Karzinomen antiproliferative Effekte nachgewiesen werden (Tajima et al. 1991). Außerdem lassen sich nach der oben beschriebenen *antisense* Strategie immer selektivere Therapieansätze entwickeln, die durch eine Gewebe-spezifische Wirkung die Gefahr einer Tumorinduktion relativieren. Es bleibt zu hoffen, dass das Wachstumsfaktorkonzept auf diese Weise in naher Zukunft zu gezieltem Einsatz kommen kann.

5. Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren wie *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) spielen bei der Proliferation einer Zelle, ihrer Differenzierung und Motilität eine bedeutende Rolle. An renalen proximalen Tubuluszellen des Kaninchens (PT-1) konnten in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe spezifische Rezeptortyrosinkinasen für HGF, EGF und IGF-I nachgewiesen werden. Diese bipolar differenzierten proximalen Tubuluszellen stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung der biologischen Effekte und Signaltransduktionsmechanismen der oben genannten Wachstumsfaktoren dar.

Zunächst wurde in Western-Blots gezeigt, dass physiologische Konzentrationen der Wachstumsfaktoren zur Phosphorylierung der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase führen. In diesen Versuchen wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Phosphorylierung der Rezeptoren und nachgeschalteter Signalpeptide herausgearbeitet. HGF und EGF stimulierten ihre Rezeptortyrosinkinasen mit vergleichbarer Potenz, während IGF-I eine deutlich schwächere Wirkung zeigte.

Um die Weitergabe des Signals von der Rezeptor-Ligand-Interaktion bis zum Erreichen des Zellkerns näher zu charakterisieren, wurde zuerst das kinetische Phosphorylierungsverhalten der zytosolischen Tyrosinkinase *Src* untersucht (Onkogen aus dem *Rous sarcoma virus*), die als Substrat der HGF, EGF und IGF-I Rezeptortyrosinkinasen bekannt ist. Alle drei untersuchten Wachstumsfaktoren induzierten die Phosphorylierung von *Src*, wobei unter EGF Stimulation die höchste absolute Phosphorylierungszunahme erreicht wurde. Der Vergleich des Phosphorylierungsgrades der Rezeptoren und der Tyrosinkinase *Src* zeigte, dass die vom Rezeptor abhängige relative Phosphorylierung von *Src* bei IGF-I deutlich höher war als bei HGF und EGF. Dieser Befund könnte erklären, warum IGF-I trotz schwacher Rezeptorphosphorylierung in den von der eigenen Arbeitsgruppe bereits veröffentlichten Proliferationsexperimenten ähnlich potent war wie HGF und EGF. Durch den Einsatz von PP1 (4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin), einem spezifischen Inhibitor der *Src* Kinasefamilie, konnte die durch HGF, EGF und IGF-I induzierte Phosphorylierung von *Src* und anderer Signalproteine gehemmt werden.

Mit STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) wurde anschließend in den PT-1 Zellen ein Transkriptionsaktivator nachgewiesen, der eine Brücke vom zytosolischen zum nukleären Kompartiment schlagen und die tubuläre Differenzierung und Proliferation von Nierenzellen vermitteln kann. Die Experimente zur Phosphorylierungskinetik zeigten unter Stimulation mit HGF eine Zunahme der Phosphorylierung von STAT3 auf das Doppelte des Basalwertes. Bei EGF und IGF-I waren dagegen kaum Unterschiede zur unstimulierten Probe zu erkennen.

Auf Grund ihres Einflusses auf Wachstum, Migration und Differenzierung von proximalen Tubuluszellen stellen die untersuchten Rezeptortyrosinkinasen und ihre Mediatoren wie *Src* und STAT3 klinische Ansatzpunkte sowohl für eine positive (z. B. Renoprotektion bei Akutem Nierenversagen) als auch negative Modulation (z. B. Tumortherapie) dar. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen Rezeptortyrosinkinasen konnte gezeigt werden, dass sich das Wachstum von Nierenkarzinomzellen und die Entstehung von Metastasen einschränken lässt. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind Tyrosinkinaseinhibitoren und die *antisense* Strategie, mit der bereits eine gewisse Gewebespezifität erzielt werden kann. Sollen dagegen die Wachstumsfaktoren selbst zu therapeutischem Einsatz beim Menschen kommen, muss zuvor in Langzeitstudien ihre potentielle Kanzerogenität geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abram CL, Courtneidge SA: Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. Exp Cell Res 254: 1-13 (2000)

Andersson G, Jennische E: IGF-I immunoreactivity is expressed by regenerating renal tubular cells after ischaemic injury in the rat. Acta Physiol Scand 132: 453-457 (1988)

Bagley CJ, May BL, Szabo L, McNamara PJ, Ross M, Francis GL, Ballard FJ, Wallace JC: A key functional role for the insulin-like growth factor 1 N-terminal pentapeptide. Biochem J 259: 665-671 (1989)

Bardelli A, Pugliese L, Comoglio PM: "Invasive growth" signaling by the Met/HGF receptor. The hereditary renal cell carcinoma connection. Biochim Biophys Acta 1333: M41-M51 (1997)

Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS: The insulin-like growth factor axis. A review of atherosclerosis and restenosis. Circ Res 86: 125-130 (2000)

Bayne ML, Applebaum J, Underwood D, Chicchi GG, Green BG, Hayes NS, Cascieri MA: The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor. J Biol Chem 264: 11004-11008 (1988)

Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ: Role of c-src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. Front Biosci 2: d501-d518 (1997)

Bhalla US, Iyengar R: Emergent properties of networks of biological signaling pathways. Science 283: 381-387 (1999)

Blazer-Yost BL, Watanabe M, Haverty TP, Ziyadeh FN: Role of insulin and IGF-1 receptors in proliferation of cultured renal proximal tubule cells. Biochim Biophys Acta 1133: 329-335 (1992)

Boccaccio C, Andò M, Tamagone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM: Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. Nature 39: 285-288 (1998)

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254 (1976)

Broome MA, Hunter T: Requirement for c-src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. J Biol Chem 271: 16798-16806 (1996)

Brown MT, Cooper JA: Regulation, substrates and functions of src. Biochim Biophys Acta 1287: 121-149 (1996)

Carpenter G, Cohen S: Epidermal growth factor. J Biol Chem 265: 7709-7712 (1990)

Carter G, Lemoine NR: Antisense technology for cancer therapy: does it make sense? Br J Cancer 67: 869-876 (1993)

Coimbra TM, Cieslinski DA, Humes HD: Epidermal growth factor accelerates renal repair in mercuric chloride nephrotoxicity. Am J Physiol 259: F438-F443 (1990)

Comoglio PM: Pathway specificity for met signalling. Nat Cell Biol 3: E161-E162 (2001)

Cooper JA, Howell B: Reveiw: The when and how of src regulation. Cell 73: 1051-1054 (1993)

Darnell JE: STATs and gene regulation. Science 277: 1630-1635 (1997)

David M, Wong L, Flavell R, Thompson SA, Wells A, Larner AC, Johnson GR: STAT activation by epidermal growth factor and amphiregulin. J Biol Chem 271: 9185-9188 (1996)

Dayton MA, Knobloch TJ: Multiple phosphotyrosine phosphatase messenger-RNAs are expressed in the human lung fibroblast cell line wi-38. Rec Signal Transd 7: 241-256 (1997)

Druker BJ, Lydon NB: Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. J Clin Invest 105: 3-7 (2000)

Druker BJ, Mamon HJ, Roberts TM: Oncogenes, growth factors, and signal transduction. N Engl J Med 321: 1383-1391 (1989)

Ernst F, Hetzel S, Stracke S, Czock D, Vargas G, Lutz MP, Keller F, Jehle PM: Renal proximal tubular cell growth and differentiation are differentially modulated by renotropic growth factors and tyrosine kinase inhibitors. Eur J Clin Invest 31: 1029-1039 (2001)

Fagin JA, Melmed S: Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. Endocrinology 120: 718-724 (1987)

Feld S, Hirschberg R: Growth hormone, the insulin-like growth factor system and the kidney. Endocrine Rev 17: 423-480 (1996)

Fernandes A, Hamburger AW, Gerwin BI: ErbB-2 kinase is required for constitutive STAT 3 activation in malignant human lung epithelial cells. Int J Cancer 83: 564-570 (1999)

Fisher DA, Salido EC, Barajas L: Epidermal growth factor and the kidney. Annu Rev Physiol 51: 67-80 (1989)

Flyvbjerg A, Nielsen D, Dheikh MI, Jacobsen C, Orskow H, Christensen EI: Luminal and basolateral uptake and receptor binding of IGF-1 in rabbit renal proximal tubules. Am J Physiol 265: F624-F633 (1993)

Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM: Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. Oncogene 4: 1383-1388 (1989)

Giordano S, Bardelli A, Zhen Z, Menard S, Ponzetto C, Comoglio PM: A point mutation in the met oncogene abrogates metastasis without affecting transformation. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13868-13872 (1997)

Gregory H: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. Nature 257: 325-328 (1975)

Grunewald RW, Schots J, Jehle P, Stracke S, Scott DM, Kinne RK, Müller GA: Characterisation of immortalized rabbit renal proximal tubular cells (PT-1). Nieren Hochdruck 26: 405 (Abstract) (1997)

Hamm LL, Hering-Smith KS, Vehaskari VM: Epidermal growth factor and the kidney. Semin Nephrol 13: 109-115 (1993)

Hammerman MR, Rogers S: Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cells. Am J Physiol 253: F841-F847 (1987)

Hammerman MR, Miller SB: Therapeutic use of growth factors in renal failure. J Am Soc Nephrol 5: 1-11 (1994)

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA: Discovery of a novel, potent, and src family-selective tyrosine kinase inhibitor. J Biol Chem 271: 695-701 (1996)

Heldin CH: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. Cell 80: 213-223 (1995)

Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C: Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic renal failure. J Clin Invest 84: 1757-1761 (1989)

Igawa T, Kanda S, Kanetake H, Saitoh Y, Ichihara A, Tomita Y, Nakamura T: Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 174: 831-838 (1991)

Jehle PM, Fußgänger RD, Stracke S, Grunewald RW, Keller F: Different binding and degradation of proinsulin, insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in cultured renal proximal tubular cells. Acta Diabetol 33: 159-165 (1996)

Jehle PM, Stracke S, Ernst F, Jehle DR, Grunewald RW, Haller H, Keller F: Pleiotropic effects of hepatocyte growth factor in proximal tubule involve different signaling pathways. Kidney Int 54: S152-S154 (1998)

Johnson DW, Brew BK, Poronnik P, Cook DI, Gyory AZ, Field MJ, Pollock CA: Insulin-like growth factor-I stimulates apical sodium-hydrogen exchange in human proximal tubule cells. Am J Physiol 272: F484-F490 (1997)

Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4357-4361 (1994)

Khachigian LM: Catalytic DNAs as potential therapeutic agents and sequence-specific molecular tools to dissect biological function. J Clin Invest 106: 1189-1195 (2000)

Kim YN, Wiepz GJ, Guadarrama AG, Bertics PJ: Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. Enhanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. J Biol Chem 275: 7481-7491 (2000)

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

LeRoith D: Insulin-like growth factors. N Engl J Med 336: 633-640 (1997)

Lieberthal W und Nigam SK: Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. Am J Physiol 275: F623-F632 (1998)

Lutz MP, Eßer IBS, Flossmann-Kast BBM, Vogelmann R, Lührs H, Friess H, Büchler MW, Adler G: Overexpression and activation of the tyrosine kinase src in human pancreatic carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 243: 503-508 (1998)

Maffè A, Comoglio PM: HGF controls branched morphogenesis in tubular glands. Eur J Morphol 36: 74-81 (1998)

Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK: Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. Am J Pathol 143: 949-958 (1993)

Marshall M: Interactions between ras and raf: key regulatory proteins in cellular transformation. Mol Reprod Dev 42: 493-499 (1995)

Matejka GL, Eriksson PS, Carlsson B, Jennische E: Distribution of IGF-1 mRNA and IGF-1 binding sites in the rat kidney. Histochem J 97: 173-180 (1992)

Matejka GL, Jennische E: Local infusion of IGF-I into the kidney of pituitary intact rats induces renal growth. Acta Physiol Scand 145: 7-18 (1992)

Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH: Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase ($p125^{FAK}$) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. J Biol Chem 269: 31807-31813 (1994)

McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN: C-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. Cancer 65: 88-92 (1990)

McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Insulin-like growth factor (IGF) and bone. Connect Tissue Res 20: 277-282 (1989)

Mohan S: Insulin-like growth factor binding proteins in bone cell regulation. Growth Reg 3: 67-70 (1993)

Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6489-6493 (1986)

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T: Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. FEBS Lett 224: 311-316 (1987)

Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. EMBO J 11: 4825-4833 (1992)

Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, Di Renzo MF: Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. Int J Cancer 69: 212-217 (1996)

Odajima J, Matsumura I, Sonoyama J, Daino H, Kawasaki A, Tanaka H, Inohara N, Kitamura T, Downward J, Nakajima K, Hirano T, Kanakura Y: Full oncogenic activities of v-src are mediated by multiple signaling pathways; ras as an essential mediator for cell survival. J Biol Chem 275: 24096-24105 (2000)

O‘Shea M, Miller SB, Hammerman MR: Insulin-like growth factor I and the kidney. Semin Nephrol 13: 96-108 (1993)

Peterson JE, Kulik G, Jelinek T, Reuter CW, Shannon JA, Weber MJ: Src phosphorylates the insulin-like growth factor type I receptor on the autophosphorylation sites. Requirement for transformation by src. J Biol Chem 271: 31562-31571 (1996)

Petit AMV, Rak J, Hung M-C, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS: Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and erbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo. Am J Pathol 151: 1523-1530 (1997)

Petley T, Graff K, Jiang W, Yang H, Florini J: Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. Horm Metab Res 31: 70-76 (1999)

Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, Dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM: A multifunctional docking site mediates signalling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. Cell 77: 261-271 (1994)

Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman M, Bander NH, Hicklin DJ: Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. Clin Cancer Res 4: 2957-2966 (1998)

Rubini M, Hongo A, D'Ambrosio C, Baserga R: The IGF-I receptor in mitogenesis and transformation of mouse embryo cells: Role of receptor number. Exp Cell Res 230: 284-292 (1997)

Runge DM, Runge D, Dorko K, Pisarov LA, Leckel K, Kostrubsky VE, Thomas D, Strom SC, Michalopoulos GK: Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes. J Hepatol 30: 265-274 (1999)

Sachs M, Weidner KM, Brinkmann V, Walther I, Obermeier A, Ullrich Axel, Birchmeier W: Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. J Cell Biol 133: 1095-1107 (1996)

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ: Signaling through focal adhesion kinase. Prog Biophys Mol Biol 71: 435-478 (1999)

Schlessinger J, Mohammadi M, Margolis B, Ullrich A: Role of SH2-containing proteins in cellular signaling by receptor tyrosine kinases. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 57: 67-74 (1992)

Siddle K, Soos MA, Field CE, Navé BT: Hybrid and atypical insulin/insulin-like growth factor I receptors. Horm Res 41: 56-65 (1994)

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD: FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol 2: 249-257 (2000)

Stracke S, Ernst F, Jehle D, Grunewald RW, Haller H, Keller F, Jehle PM: Differentiating and proliferative effects of HGF in renal tubular cells are mediated via different signalling pathways. Nephrol Dial Transplant 13: 1398-1405 (1998)

Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. FEBS Lett 291: 229-232 (1991)

Tatosyan AG, Mizenina OA: Review: Kinases of the src family: Structure and functions. Biochemistry (Mosc) 65: 49-58 (1999)

Tenev T, Böhmer S-A, Kaufmann R, Frese S, Bittorf T, Beckers T, Böhmer F-D: Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. Eur J Cell Biol 79: 261-271 (2000)

Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, Friedlander G: Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. J Clin Invest 106: 225-234 (2000)

Tsao T, Wang J, Fervenza FC, Vu TH, Jin ICH, Hoffman AR, Rabkin R: Renal growth hormone - Insulin-like growth factor-I system in acute renal failure. Kidney Int 47: 1658-1668 (1995)

Tsubouchi H, Hirono S, Gohda E, Nakayama H, Takahashi K, Sakiyama O, Miyazaki H, Sugihara J, Tomita E, Muto Y, Daikuhara Y, Hashimoto S: Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. Hepatology 96: 875-881 (1989)

Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S, Nakayama H, Gohda E, Arakaki N, Sakiyama S, Takahashi K, Kimoto M, Kawakami S, Setoguchi M, Tachikawa T, Shin S, Arima T, Dasikuhara Y: Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. Hepatology 13: 1-5 (1991)

Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61: 203-212 (1990)

Vargas GA, Wolf E, Jehle PM: Hepatocyte growth factor in renal failure: Promise and reality. Kidney Int 57: 1426-1436 (2000)

Wang S, Hirschberg R: Role of growth factors in acute renal failure. Nephrol Dial Transplant 12: 1560-1563 (1997)

Wang Y, Ripperger J, Fey GH, Samols D, Kordula T, Wetzler M, Van Etten RA, Baumann H: Modulation of hepatic acute phase gene expression by epidermal growth factor and src protein tyrosine kinases in murine and human hepatic cells. Hepatology 30: 682-697 (1999)

Weng G, Bhalla US, Iyengar R: Complexity in biological signaling systems. Science 284: 92-96 (1999)

White MF: The insulin signaling system and the IRS proteins. Diabetologia 40: 2-17 (1997)

Yang E-B, Wang D-F, Mack P, Cheng L-Y: Detection of EGF-induced EGF receptor degradation and tyrosine phosphorylation in intact cells. J Biochem Biophys Methods 32: 97-108 (1996)

YardenY, Ullrich A: Growth factor receptor tyrosine kinases. Ann Rev Biochem 57: 443-478 (1988)

Zhang G, Ichimura T, Wallin A, Kan M, Stevens JL: Regulation of rat proximale tubule epithelial cell growth by fibroblast growth factors, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-ß, and analysis of fibroblast growth factors in rat kidney. J Cell Physiol 148: 295-305 (1991)

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE: Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science 264: 95-98 (1994)

Zong CS, Zeng L, Jiang Y, Sadowski HB, Wang L-H: STAT3 plays an important role in oncogenic ros- and insulin-like growth factor I receptor-induced anchorage-independent growth. J Biol Chem 273: 28065-28072 (1998)

Zong CS, Chan J, Levy DE, Horvath C, Sadowski HB, Wang L-H: Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. J Biol Chem 275: 15099-15105 (2000)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Peter Jehle, der mir das Thema dieser Dissertation überließ und mir in allen Phasen der Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Begeisterungsfähigkeit, sein Engagement und seine Herzlichkeit hatten großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. F. Keller möchte ich mich für die Hilfe in der Endphase der Promotion, die Überlassung der Laboreinrichtung und der Materialien bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Rosi Herzog und Frau Elke Schilly, die mir die praktische Laborarbeit beibrachten, mich tatkräftig unterstützten und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. biol. hum. Gustavo Vargas für die Unterstützung bei molekularbiologischen Problemen und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Manfred Lutz für methodische Tipps und Tricks.

Mein Dank geht auch an Herrn Oktay Temiz und Frau Friedlinde Ernst, die mir ihre Ergebnisse zur Verfügung gestellt haben.

Für die Korrektur und die Mithilfe beim Layout sage ich allen herzlich Dank, die sich dafür Zeit genommen haben.