

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. Ronald Simon

Prävalenz der Tyrosinkinase-Überexpression in humanen Zelllinien: Eine Gewebe-Mikroarray Analyse von BTK, ZAP70, HER3, HER4, JAK2

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Caroline Elisabeth Eckrich

aus Landau (Pfalz)

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.09.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. A. Block

für meine Mutter,
die mir diese Ausbildung ermöglicht hat

und für meinen Stiefvater

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen	1
1.2 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen	4
1.3 Die Tyrosinkinasen BTK, ZAP70, HER3, HER4, JAK2: Potenzielle Therapieziele?	5
1.4 Zelllinien als Modellsysteme für die Tumorthherapie	14
1.5 Gewebe-Mikroarrays von Zelllinien	14
1.6 Ziel der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Zelllinien	16
2.2 Herstellung der Zelllinienpellets	25
2.2.1 Kultivierung der Zellen	25
2.2.2 Splitten der Zellen	25
2.2.3 Ernte der Zellen	25
2.2.4 Einfrieren der Zellen	26
2.2.5 Fixierung und Einbettung der Zelllinien in Paraffin	26
2.3 TMA-Herstellung	27
2.4 Zelllinien-TMA	29
2.5 Immunhistochemie (IHC)	30
3 Ergebnisse	33
3.1 Auswertbarkeit des Zelllinien-Arrays	33
3.2 BTK	33
3.3 ZAP70	36
3.4 HER3	41
3.5 HER4	41
3.6 JAK2	45
4 Diskussion	53
5 Zusammenfassung	58
6 Abkürzungsverzeichnis	60
7 Literaturverzeichnis	63
8 Danksagung	69
9 Lebenslauf	70
10 Eidesstattliche Erklärung	71

1 EINLEITUNG

Die Entdeckung neuer Ziel-Gene für die Krebstherapie ist von großer Bedeutung für die molekulare Krebsforschung. Vor allem eine Gruppe von Genen hat sich bislang als besonders geeignet gezeigt für solche sogenannten Gen spezifischen Therapien, weil sie direkt zelluläre Signalwege regulieren, die vor allem das Wachstum von Zellen steuern. Diese Familie der Tyrosinkinassen (TK) umfasst mehrere hundert Gene, die je nach ihrer Funktion in Rezeptor-Tyrosinkinassen (RTK) und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinassen (NRTK) unterschieden werden.

1.1 Rezeptor-Tyrosinkinassen

RTKs sind Rezeptoren im Signalweg verschiedenster Wachstumsfaktoren. RTKs bestehen in der Regel aus einer Cystein reichen extrazellulären Liganden bindenden Domäne, einem lipophilen transmembranen Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, die das eigentliche katalytisch aktive Zentrum des Rezeptors bildet (*Abb. 1*).

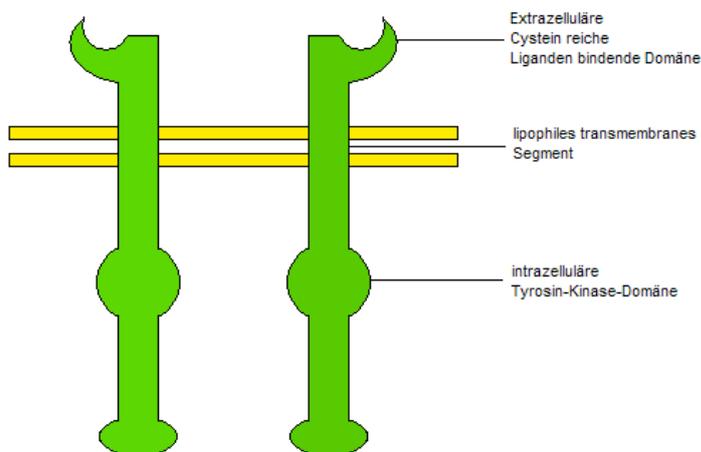


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer typischen RTK (Alberts et al. 2001)

RTKs stehen am Anfang einer ganzen Reihe verschiedener intrazellulärer Signalwege, die für die Regulation von Zellwachstum und Proliferation, aber auch Zelltod (Apoptose) und somit für den Erhalt einer konstanten Zellmasse im Körper verantwortlich sind. Einige dieser Signalwege sind in *Abb. 2* dargestellt.

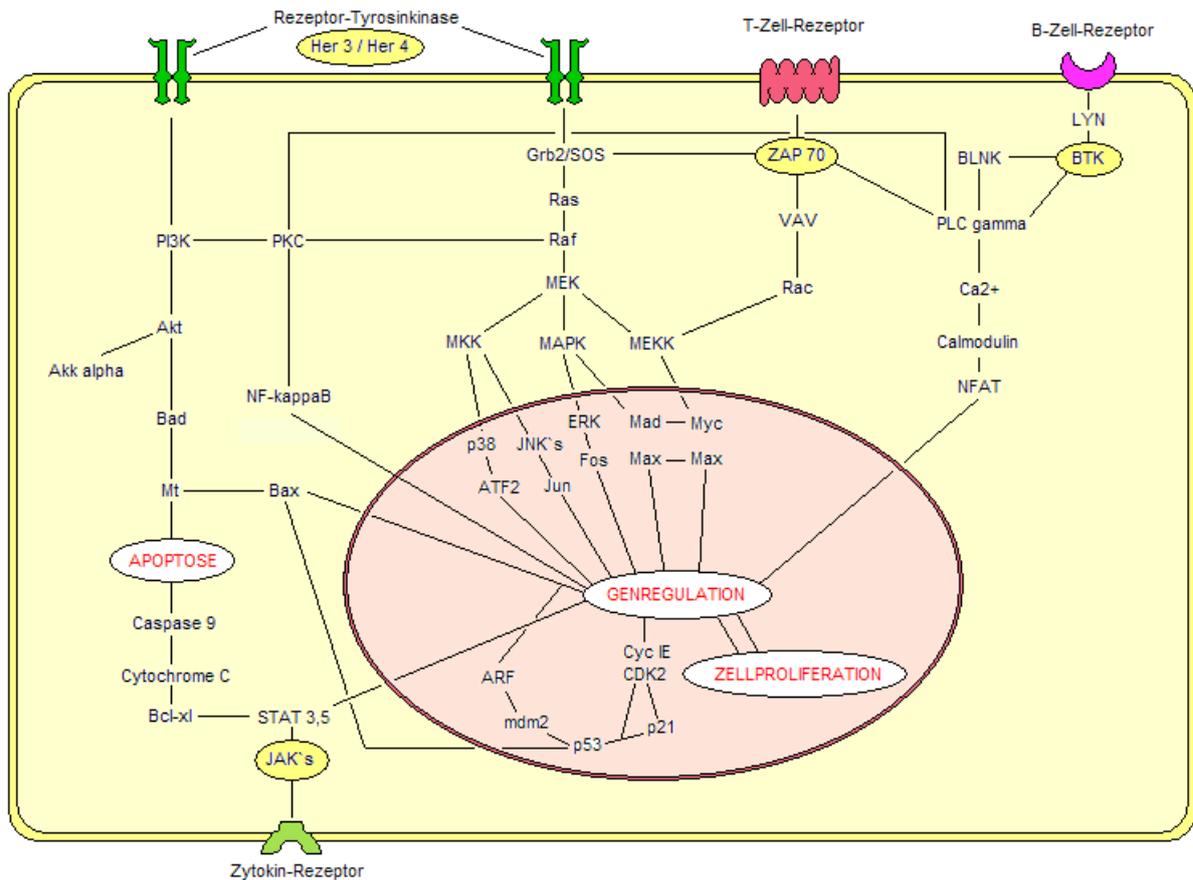


Abb. 2: Signalwege der RTKs

Aufgrund ihrer besonderen Stellung in zellulären Signalwegen, die auf Zellwachstum und Differenzierung abzielen, spielen RTKs eine wichtige Rolle für die Entstehung von Tumorerkrankungen. Viele Tumoren zeigen eine abnorme Erhöhung (Überexpression) der Rezeptormenge oder Veränderungen der katalytischen Aktivität der Rezeptoren, die zu einer gesteigerten Aktivierung der entsprechenden Signalwege und schließlich zum Tumorwachstum führen können.

Insbesondere die membranständigen RTKs haben sich als vielversprechende Therapieziele gezeigt, da sie durch ihre exponierte Lokalisation in der Zellmembran besonders gut für inhibitorische Substanzen, wie z. B. Antikörper oder Ligandenanaloga, zugänglich sind. Tatsächlich zielen alle bisherigen Gen spezifischen Therapien auf Transmembran-RTKs.

Ein Paradebeispiel für das Potential einer solchen Gen spezifischen Therapie ist die Transmembran-RTK HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren mit vier Mitgliedern (HER1, HER2, HER3, HER4 (human epidermal growth factor receptor 1-4)), welche in Signaltransduktionskaskaden involviert sind, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren (Zaczek et al.

2005). Spezifische, aktivierende Liganden für den HER2-Rezeptor konnten bislang nicht identifiziert werden. Allerdings können sich HER2-Rezeptormoleküle gegenseitig durch Dimerisierung autokatalytisch aktivieren. Voraussetzung hierfür ist eine unnatürlich hohe Rezeptordichte auf der Zellmembran. Eine solche starke Überexpression des HER2-Rezeptors kann durch bestimmte Veränderungen des ERBB2-Gens verursacht werden, das für den HER2-Rezeptor kodiert (Pegram et al. 2000). Bei diesen sogenannten Amplifikationen handelt es sich um massive Vermehrungen der Genkopiezahl, die mikroskopisch entweder in Form von verlängerten Chromosomen oder, seltener, als sogenannte „double minutes“ (benannt nach ihrer charakteristischen Form eines „doppelten Kommas“) sichtbar werden.

ERBB2-Amplifikationen sind von großer Bedeutung für die Biologie des Mammakarzinoms. Etwa 20-30% dieser Tumoren sind durch eine Amplifikation auf Chromosom 17q21 gekennzeichnet (Pegram et al. 2000), die das ERBB2 (HER2)-Gen einschließt. Die Amplifikation resultiert meist in einem deutlich verlängerten Chromosom, da ein etwa 6-10 Millionen Basenpaare großer Bereich (Megabasen) bis zu hundertfach kopiert und aneinandergereiht wird, der entsprechend viele ERBB2 Genkopien enthält. Da alle diese Genkopien abgelesen und in Protein translatiert werden, resultiert eine massive Überexpression des HER2-Proteins auf der Zelloberfläche, die zur autokatalytischen Aktivierung des HER2-Signalweges führt. Dieser Signalweg aktiviert die Expression von Genen, die das Zellwachstum stimulieren (*Abb. 2*). Die permanente Aktivierung des Signalweges durch die HER2-Genamplifikation verursacht schließlich überproportionales und unkontrolliertes (Tumor-) Wachstum.

Mit der Entwicklung und Zulassung von Trastuzumab (Herceptin) zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms im Jahre 1998 ist es erstmals gelungen, die enormen Chancen Gen spezifischer Therapien für die Behandlung von Krebserkrankungen zu demonstrieren. Herceptin ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch den Transmembranrezeptor HER2 blockiert und so bei ERBB2-amplifizierten Mammakarzinomen den für die Tumorzellen lebenswichtigen Signalweg unterbricht (Pegram et al. 2000). In klinischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von Herceptin zusätzlich zur Chemotherapie eine deutliche Verlängerung des Lebens der Tumorpatientinnen erreicht werden konnte (Pegram et al. 2004). Erst kürzlich (2005) wurde Herceptin auch zur adjuvanten Therapie nicht-metastasierter Mammakarzinome zugelassen, wodurch das Überleben weiter verbessert und die Rezidivrate nach einer Operation um 50% gesenkt werden konnte (Piccart-Gebhart et al. 2005). Mit dem Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, epidermal growth factor receptor, HER1) und dem Stammzellrezeptor KIT (kitten) sind in den letzten Jahren zwei weitere wichtige TK-Rezeptoren als Therapieziele für Gen spezifische Medikamente zugelassen worden (Lynch et al. 2004, Steinert et al. 2005). EGFR (HER1) ist ein naher molekularer Verwandter des HER2-Rezeptors, die beide denselben Signalweg aktivieren (siehe *Abb. 2*).

Heute sind zwei EGFR-Inhibitoren zugelassen (Iressa, Tarceva), die bei Lungenkarzinomen mit mutationsbedingter permanenter Aktivierung des EGFR eingesetzt werden (Buter und Giaccone 2005), sowie ein inhibitorischer Antikörper (Rituximab) zur Therapie des Kolon-Karzinoms (Giuliani und Colucci 2007).

Der Stammzellrezeptor KIT spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von einer relativ seltenen Tumorentität, dem Gastrointestinalen Stromatumor (GIST). GISTs sind generell durch Über-expression des KIT-Rezeptors gekennzeichnet, wobei dieser in etwa 80-90% der Tumoren Mutationen in den Exons 9, 11 und 13 aufweist. GISTs ohne KIT-Mutationen sind durch Mutationen einer weiteren RTK, nämlich des PDGFR (platelet derived growth factor receptor) gekennzeichnet. Bei all diesen Mutationen in KIT und PDGFR handelt es sich wie beim EGFR um aktivierende Mutationen innerhalb der katalytischen (ATP (Adenosin-Tyrosin-Phosphat)-Bindungs-) Domäne. Auch hier ist ein spezifischer Inhibitor, Glivec, erfolgreich im klinischen Einsatz (Siehl und Thiel 2007).

1.2 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Aufgabe der NRTKs besteht in der Weiterleitung und Verstärkung von Reizen, die z. B. von einer RTK aufgenommen wurden. NRTKs sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, allerdings können einige durch Adaptermoleküle auch an der Innenseite der Zellmembran verankert oder in den Zellkern transloziert werden. Dieser „Rekrutierungsschritt“ ist als eine Form der Aktivierung zu verstehen, weil die Chance erhöht wird, direkt oder indirekt mit der katalytischen Domäne, z. B. einer Transmembran-RTK, in Kontakt zu treten und somit ein Wachstumssignal weiterzuleiten. Ein typisches Beispiel für eine solche NRTK ist das v-SRC (viral-Schmidt-Ruppin-Carcinoma). V-SRC ist die mutierte Form des c-SRC (cellular-Schmidt-Ruppin-Carcinoma), bei dem die C-terminalen Sequenzen der TK-Domäne fehlen, die für die Hemmung der Kinaseaktivität von SRC verantwortlich sind (Courtneidge 2001). SRC ist ebenso wie LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), HCK (hematopoietic cell kinase), FYN (c-syn protooncogene), BLK (B lymphoid tyrosine kinase), LYN (tyrosine protein kinase), FGR (Gardner Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog), YES (Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog) und YRK (York, YES-related kinase) Mitglied der SRC, einer Familie protoonkogener TKs (Cowan-Jacob 2006). Es sind zwei Isoformen bekannt, jeweils bestehend aus den Domänen SH3 (Src-homology-3-domain), SH2 (Src-homology-2-domain) und einer Tyrosinkinasedomäne (Abb. 3, Abb. 4).

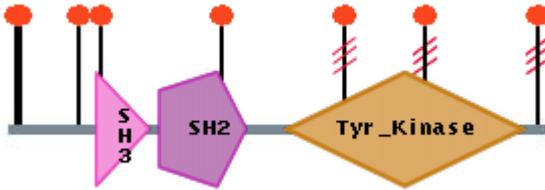


Abb. 3: Struktur einer typischen NRTK am Beispiel des c-SRC, Isoform 1 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005a)

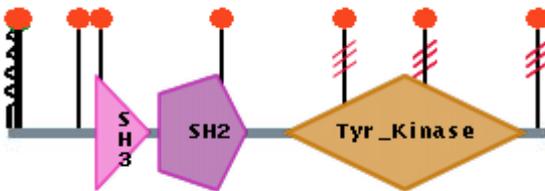


Abb. 4: Struktur einer typischen NRTK am Beispiel des c-SRC, Isoform 2 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005b)

SRC spielt eine wichtige Rolle im RTK-Signalweg, wo es die Signaltransduktion vom PDGFR zu SHC (Src-homology-2-domain containing) katalysiert (Courtneidge 2001, Bowman et al. 2001). Aufgrund dieser Stellung relativ weit oben in der Signalkaskade kann man erwarten, dass eine Mutation von c-SRC zu v-SRC ähnliche Folgen wie die permanente unnatürliche Aktivierung von RTKs - z. B. EGFR - haben sollte.

1.3 Die Tyrosinkinase BTK, ZAP70, HER3, HER4, JAK2: Potenzielle Therapieziele?

Die **Bruton's Tyrosinkinase (BTK)**, auch bekannt unter Agammaglobulinemia tyrosine kinase (ATK), B-cell progenitor kinase (BPK), Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase und Tyrosine protein kinase BTK, ist ein Mitglied der TEC (translocated in extraskeletal chondrosarcoma)-Familie von NRTKs, welches in allen Zelltypen des hämatopoetischen Systems (mit Ausnahme von Plasmazellen und T-Lymphozyten) gefunden wurde (Smith et al. 1994).

BTK ist lokalisiert auf dem Chromosom Xq21.33-q22, besitzt ein Molekulargewicht von 76 281 Da und besteht aus einer PH (pleckstrin homology)-, einer BTK-, einer SH3-, einer SH2- und einer Tyrosinkinase-Domäne (Abb.5).

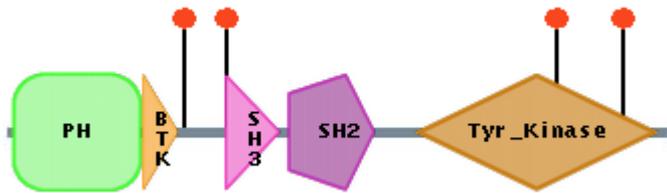


Abb. 5: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von BTK (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005c)

BTK wird physiologisch in zahlreichen Normalgeweben exprimiert, eine pathologische Expression wurde in Brustdrüsen-, Eierstock-, Endometrium-, Gebärmutterhals-, Vorsteherdrüsen-, Hoden-, Lungen-, Magen-, Leber-, Bauchspeicheldrüsen-, Schilddrüsen-, Nieren- und Harnblasenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Malignen Karzinoiden, Gliomen, Lymphomen und Melanomen gefunden.

Die bisher beschriebenen Funktionen dieses Gens beziehen sich in erster Linie auf die B-Zellen, in denen die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors (BCR, B-cell-receptor) zu einer rapiden Rekrutierung von BTK zur Plasmamembran führt, wo die Kinase phosphoryliert und aktiviert wird. BTK ist notwendig für die normale Entwicklung der B-Zellen (Desiderio 1997) und ein defektes BTK-Gen wurde identifiziert als Auslöser der X-gekoppelten Agammaglobulinämie (XLA) beim Menschen, einer immunologischen Erkrankung, welche durch ein Defizit an zirkulierenden B-Zellen und Immunglobulinen aller Klassen charakterisiert ist (Bradley et al. 1994). Bei der Maus führen Mutationen im BTK-Gen zu der etwas mildereren X-gekoppelten Immundefizienz (XID) (Thomas et al. 1993). Obwohl die genaue Rolle von BTK in diesen Signaltransduktionswegen trotz einer wachsenden Menge an Daten immer noch nicht genau definiert werden konnte, gibt es inzwischen Daten, die BTK eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose in B-Zellen zusprechen (Satterthwaite et al. 1998, Islam 2000, Gauld et al. 2002a, Gauld et al. 2002b).

Einige Studien deuten darauf hin, dass BTK eine bedeutende Rolle für die Progression von Tumoren spielen könnte, indem es Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts katalysiert und so die zelluläre Motilität und möglicherweise Metastasierungsfähigkeit stimuliert (Vassilev und Uckun 2004, Yao et al. 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BTK eine wichtige Rolle als Modulator des programmierten Zelltodes (Apoptose) zukommt, einem entscheidenden Prozess bei der Entstehung von malignen Tumoren. BTK ist die erste Tyrosinkinase, für die eine duale Funktion in der Regulation von apoptotischen Prozessen beschrieben wurde (Vassilev und Uckun 2004): In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass BTK die durch Bestrahlung induzierte Apoptose stimuliert, jedoch die FAS (TNF receptor superfamily, member 6)-aktivierte Apoptose inhibiert (Vassilev und Uckun 2004). Die proapoptotische Wirkung von

BTK erfolgt, zumindest zum Teil, durch die Herunterregulation der antiapoptotischen Aktivität des STAT (Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription)-3-Transkriptionsfaktors. Auf der anderen Seite assoziiert BTK mit dem "Todesrezeptor" FAS und hindert so seine Interaktion mit FADD (fas associated protein with death domain). Die duale Rolle von BTK in der Regulation der Apoptose kann besser verstanden werden, wenn man die verschiedenen Signale in Betracht zieht, die die BTK-Familie von Kinasen transduzieren, darunter proapoptotische Signale (z. B. p38MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase)) sowie antiapoptotische (wie z. B. AKT (Serin/Threonin-Kinase) und NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)) (Satterthwaite et al. 1998, Islam 2000, Kawakami et al. 1997, Tan et al. 2001, Bajpai et al. 2000, Kitaura et al. 2000, Petro und Khan 2001, Petro et al. 2000). Abhängig vom Gleichgewicht zwischen diesen Signalen kann die Resultante pro- oder antiapoptotisch sein. Nach wie vor ist die Rolle von BTK für die Tumorentstehung jedoch eher schlecht untersucht. Dies ist insbesondere deshalb erstaunlich, weil ein BTK-spezifischer Inhibitor (LFM-A13) bereits seit längerer Zeit entwickelt ist (Mahajan et al. 1999), der jedoch bislang nur in Leukämie-Zelllinien und Tiermodellen eingesetzt wurde (Vassilev und Uckun 2004, Tibbles 2004, Uckun 2001, Uckun et al. 2001).

Die **Zeta-Ketten-Assoziierte Proteinkinase (ZAP70)**, auch bekannt unter SRK (syk related kinase) oder TZK (truncated ZAP kinase), ist ein Mitglied der Protein-Tyrosinkinase-Familie, lokalisiert auf dem Chromosom 2q11-q13. Von ZAP70 sind zwei Isoformen bekannt; Isoform 1 besitzt ein Molekulargewicht von 69 872 Da und besteht aus zwei SH2- und einer Tyrosinkinase-Domäne A (Abb. 6).

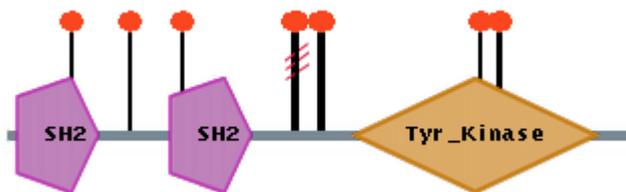


Abb. 6: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von ZAP70, Isoform 1 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005d)

Isoform 2 hat ein Molekulargewicht von 35 647 Da und besteht lediglich aus einer Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 7).



Abb. 7: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von ZAP70, Isoform 2 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005e)

ZAP70 wird physiologisch in T- und NK (Natürliche Killer)-Zellen exprimiert (Chan et al. 1992), eine pathologische Expression wurde in Leukämien (Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)) gefunden (Marjanovic et al. 2008). ZAP70 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen und der Funktion des T-Zell-Rezeptors (T-cell receptor (TCR)). Die Interaktion des TCR mit einer Antigen präsentierenden Zelle führt zur T-Zell-Aktivierung. Die intrazelluläre Tyrosinkinase LCK wird aktiviert und phosphoryliert die intrazellulären Teile des CD (cluster of differentiation)3-Komplexes, die sogenannten ITAM`s (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). ZAP70 bindet über die Tandem-SH2-Domäne an die doppelt phosphorylierten ITAM`s der CD3-Zeta-Kette. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung von LAT (linker of activated T-cells), einem Transmembranprotein. LAT dient vielen weiteren Signalproteinen als Bindungsstelle.

ZAP70 ist letztendlich notwendig für die regelrechte Transkription von Genprodukten, die zur normalen T-Zell-Differenzierung, deren Proliferation und Zytokinsekretion führt. Defekte im ZAP70-Gen führen zur T-Zell-Immundefizienz. So wurde beispielsweise bei Patienten mit Selektivem T-Zell-Defekt (STD) eine Mutation im ZAP70-Gen identifiziert, die zu einem Aktivitätsverlust der Kinase führt und autosomal rezessiv vererbt wird (Arpaia et al. 1994). Periphere CD4(+)-Zellen zeigen hierbei keine Proliferation auf Mitogene beziehungsweise bei Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper (Roifman et al. 1989).

Bei der Maus führen Mutationen im ZAP70-Gen zu einer veränderten Signaltransduktion am TCR mit Schwellenänderung bei der T-Zell-Selektion. Dies führt zu einer Verschiebung des T-Zell-Repertoires in Richtung selbstreaktiver T-Zellen. Für diese Mutation homozygoten Mäuse, vor allem weibliche, erkrankten an chronischer Arthritis mit Veränderung subchondraler Knochen, Gelenkdislokation und Osteoporose (Sakaguchi et al. 2003).

Es wird berichtet, dass die Abwesenheit von ZAP70 beim Menschen zu einem schweren Immundefekt führt, charakterisiert durch völliges Fehlen von CD8(+)-T-Zellen und TCR-unempfindlichen reifen CD4(+)-T-Zellen (Elder et al. 1994).

Die Expression von ZAP70 in B-Zellen kann weiterhin als prognostischer Marker bei der Identifizierung verschiedener Formen der CLL verwendet werden. Wird beispielsweise bei der

aggressiven Form der CLL ein unmutiertes Gen des IgV(H) (variable Region der schweren Kette des Immunglobulins (heavy chains, H; Variable Domäne, V)) und ZAP70 exprimiert, so wird bei der indolenten Form ein mutiertes Gen des IgV(H) exprimiert bei Mangel an ZAP70. Folglich ist die Präsenz eines unmutierten Gens des IgV(H) streng assoziiert mit der Expression von ZAP70. Die ZAP70-Expression kann daher als einfache und zuverlässige Alternative für die Identifikation von Mutationen in IgV(H) eingesetzt werden und damit als Prädiktor für die Behandlung der CLL dienen (Rassenti et al. 2004).

Das **v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (human epidermal growth factor receptor 3, HER3)**, auch bekannt unter ERBB-3 oder c-ERBB3, ist ein Mitglied der EGFR-Familie der RTKs, welches auf Chromosom 12q13 lokalisiert ist. Von HER3 sind zwei Isoformen beschrieben. Isoform 1 (Abb. 8) wird auch ERBB-3-Isoform-1-Precursor genannt und hat ein Molekulargewicht von 148 098 Da.

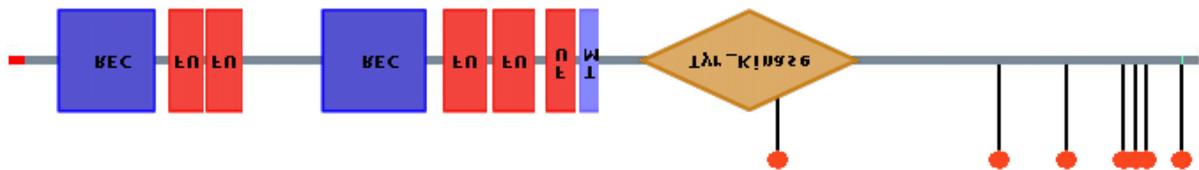


Abb. 8: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von HER3, Isoform 1 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005f)

Isoform 2 (Abb. 9) ist auch bekannt unter ERBB-3-Isoform-S-Precursor und hat ein Molekulargewicht von 20 136 Da. Zudem wurde eine Reihe von alternierenden Splicevarianten beschrieben, die für weitere verschiedene Isoformen kodieren (Tokita et al. 2001).



Abb. 9: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von HER3, Isoform 2 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005g)

Die Aktivierung von HER3 erfolgt durch extrazelluläre Liganden (vor allem HER3 ist ein membranständiges Polypeptid mit einer Neuregulin bindenden Domäne (Rezeptor für Heregulin (NRG1)) (Carraway et al. 1994) aber ohne eigene aktive Kinase-Domäne). Somit kann HER3 nur über Heterodimere mit anderen EGFR-Familienmitgliedern mit Kinaseaktivität wirken. Diese Heterodimerisierung mit nachfolgender Phosphorylierung von ERBB1, ERBB2 oder

ERBB4 führt zur Aktivierung von Signalwegen, die letztendlich zur Proliferation oder Differenzierung von Zellen führen. Ein wichtiger Signalweg, in den HER3 involviert ist, ist der Interleukin-6-Signalweg. Es wird berichtet, dass die Überexpression von ERBB3 mit Tumorgenese assoziiert ist, ebenso, dass die Amplifikation beziehungsweise Überexpression von HER3 in zahlreichen humanen Krebszellen, einschließlich Zellen von Harnblasen- (Rajkumar et al. 1996), Vorsteherdrüsen-, und Brustdrüsenkrebs gefunden wurde (Sithanandam 2008). Nachgewiesen wurde die Expression von HER3 ebenfalls in Gewebe aus Gebärmutterhals-, Endometrium-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Lungen-, Vorsteherdrüsen-, Nieren-, Haut-, Magen-, Hoden-, Schilddrüsen- und Urothelkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Karzinomen im Bereich von Kopf und Nacken, Malignen Karzinoiden, Gliomen und Melanomen. In Studien zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von HER3 bei Harnblasenkrebs mit einem besseren Überleben korreliert (Memon et al. 2004).

Das **v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian) (human epidermal growth factor receptor 4, HER4)**, auch bekannt unter ERBB4, ist ebenso wie HER3 ein Mitglied der Typ1-RTK-Familie und der EGFR-Subfamilie, welches auf Chromosom 2q33.3-q34 lokalisiert ist. Ebenso wie bei HER3 wurden für HER4 zwei Isoformen beschrieben. Isoform 1 (Abb. 10) hat ein Molekulargewicht von 146 808 Da.

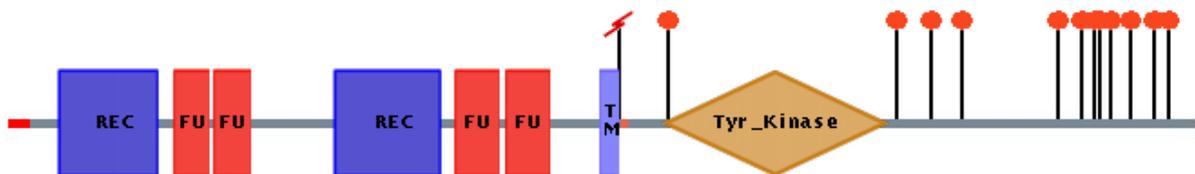


Abb. 10: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von HER4, Isoform 1 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005h)

Isoform 2 (Abb. 11), auch bekannt unter dem Namen Isoform JM-a/CVT-2, hat ein Molekulargewicht von 145 198 Da.

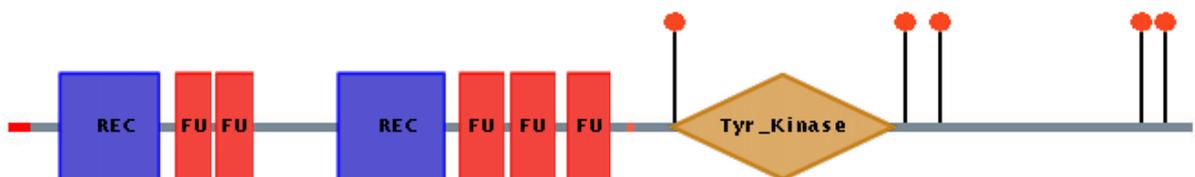


Abb. 11: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von HER4, Isoform 2 (Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, 2005i)

Das HER4-Gen kodiert für ein Single-pass-Typ1-Membranprotein mit multiplen Cystein reichen Domänen, einer Transmembrandomäne, einer Tyrosinkinasedomäne, einer Phosphatidylinositol-3-Kinase-Bindungsstelle und einem PDZ (Dlg homologous region (DHR))-Domäne-Bindungsmotiv.

Die Aktivierung von HER4 erfolgt durch Bindung spezifischer Liganden der Heregulin-/ Neuregulin-Familie (Plowman et al. 1993). Aktiviertes HER4 führt zur Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der EGFR-Subfamilie und letztendlich zur Induktion einer Vielzahl von Zellantworten, einschließlich Mitogenese und Differenzierung. Eine Reihe von Studien hat die Rolle von HER4 im gesunden Gewebe untersucht. So scheint HER4 eine besondere Rolle im Gehirn zu spielen. Bei der Untersuchung von postmortal gewonnenen Gewebeanteilen aus präfrontalem Kortex von Schizophreniepatienten wurde gezeigt, dass eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte NRG1-induzierte Aktivierung von ERBB4 vorlag. Gewebe von Schizophreniepatienten zeigten Anstiege in ERBB4-PSD95-Interaktionen (Hahn et al. 2006). Weitere Studien legen die Vermutung nahe, dass NRG1 und ERBB4 Komponenten eines biologischen Signalwegs bei Schizophrenie darstellen, vermutlich durch Beeinflussung neuronaler Migration, resultierend in einer Änderung der kortikalen Verbindungsfähigkeit (Silberberg et al. 2006). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Knock-out-Mäuse besondere Entwicklungsfehler aufweisen. ERBB4(-/-)-Mäuseembryonen entwickelten Ggll. trigeminale und geniculate/cochleovestibulare, die gegeneinander ausgetauscht waren und axonale Missprojektionen zeigten. Diese morphologischen Veränderungen korrelierten mit aberranter Migration einer Subpopulation kranialer neuronaler Kammzellen. Mit Hilfe von Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass neuronale Kammzellen nur von ihrem normalen Signalweg abweichen, wenn sie in Embryomutanten transplantiert werden. Die ERBB4-Signalübertragung ist demnach, innerhalb definierter Milieubedingungen, notwendig für die exakte Migration neuronaler Kammzellen (Gassmann et al. 1995, Golding et al. 2000). Mäuse mit Deletion im ERBB4-Gen zeigten im ZNS zelluläre Desorganisation der subventrikulären Zone und im rostralen Migrationssystem sowie veränderte Verteilung und Differenzierung der olfaktorischen Interneurone. ERBB4 wird demnach eine entscheidende Rolle bei der Migration von Neuroblasten entlang des rostralen Migrationssystems und der olfaktorischen interneuronalen Platzierung zugewiesen (Anton et al. 2004).

Eine Rolle von HER4 wird auch für die Entstehung maligner Tumoren diskutiert. Allerdings wird HER4 - im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der HER-Familie - vor allem mit Antiproliferations- und Differenzierungssignalen in Verbindung gebracht (Feng et al. 2007, Sartor et al. 2001). Dementsprechend sind die bisherigen Studien zu HER4 in Tumoren oft widersprüchlich. Im Mammakarzinom wird die HER4-Expression meist mit gut differenzierten ER (estrogen receptor)-positiven Tumoren und einer guten Prognose assoziiert (Pawlowski et

al. 2000, Suo et al. 2002, Witton et al. 2003), während andere Studien die HER4-Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziieren (Lodge et al. 2003, Bieche et al. 2003).

Die **Janus-Kinase 2 (JAK2)**, auch bekannt unter Tyrosin protein kinase 2, ist ein Mitglied der JAK-Familie, einer Unterfamilie von intrazellulären NRTKs, der auch JAK1, JAK3 und TYK2 (Tyrosinkinase 2) angehören (Yamaoka et al. 2004).

JAK2 ist lokalisiert auf Chromosom 9p24 und besitzt ein Molekulargewicht von 131 kDa. Das JAK2-Gen kodiert für ein aus 1132 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Sequenzen zu 95% mit denen der Ratte und des Schweins übereinstimmen (Saltzman et al. 1998). JAK2 setzt sich aus den Domänen JH1-7 (Janus homologe Domänen 1-7) zusammen (Abb. 12).

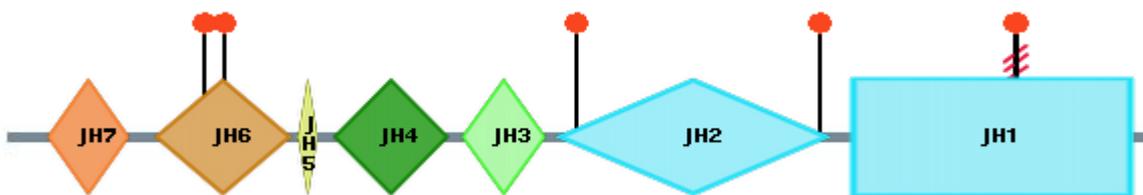


Abb. 12: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von JAK2 Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005k)

JH1 bildet das Carboxyl-Ende von JAK2 und ist eine Kinasedomäne. Sie beinhaltet konservierte Tyrosine, die typischen Charakteristika der TKs, und verleiht JAK2 seine enzymatische Aktivität. Eine Phosphorylierung dieser dualen Tyrosine bewirkt eine Konformationsänderung von JAK2 und erleichtert die Substratbindung. JH2 ist eine Pseudokinasedomäne. Sie ist benötigt für eine normale Kinase- bzw. Enzymaktivität. Es ist möglich, dass JH2 an der Regulation der JH1-Aktivität beteiligt ist. Die beiden JH3- und JH4-Domänen weisen Homologien mit SH2-Domänen auf. JH4-JH7 bilden das Amino-Ende von JAK2. Sie sind bekannt unter dem Namen FERM (4.1-Protein (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne, die ebenfalls in der FAK (fokale Adhäsionskinase)-Familie gefunden wurde. Sie spielt eine Rolle bei der Assoziation von Januskinasen mit Zytokinrezeptoren und anderen Kinasen. Durch Bindung an den Prolaktin-Rezeptor (PRLR) wird JAK2 aktiviert und tyrosinphosphoryliert (Campbell und Green 2005, Campbell et al. 2005). Die aktivierte Form von JAK2 dient der Weiterleitung eines intrazellulären Signals durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, den STATs. Diese STATs dissoziieren vom Rezeptor und dimerisieren, wandern in den Zellkern und regulieren dort die Transkription bestimmter Gene (Leonard 2001, Imada 2000). Da verschiedene Mitglieder der Zytokinrezeptor-Familien (Typ 1 und 2) selbst keine Kinaseaktivität besitzen, benötigen sie die JAK-Familie, um nachgeschaltete Proteine ihres Signalweges zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Ihle 1994, Haan et al. 2008).

Aktivierende Mutationen im JAK2-Gen wurden in Zusammenhang mit verschiedenen myeloproliferativen Erkrankungen (z. B. Idiopathische Myelofibrose) beschrieben (Kralovics et al. 2005a, Kralovics et al. 2005b, Kralovics et al. 2005c). Eine Fusion der Gene JAK2 und TEL (TEL-oncogene, ets variant gene 6 (ETV6)), TEL-JAK2, bzw. JAK2 und PCM1 (pericentriolar material 1) wurde bei Leukämie-Patienten gefunden (Lacronique et al. 1997, Reiter et al. 2005). Weitere Mutationen von JAK2 weisen einen Zusammenhang auf mit der Essentiellen Thrombocythaemie, der Polycythaemia vera und einigen myeloproliferativen Erkrankungen. Es liegt nahe, dass diese Mutation, eine Guanin zu Tyrosin-Transversion im JAK2-Gen, die zum Austausch von Valin zu Phenylalanin an der Position 617 (V617F-Mutation) (JH2-Domäne) führt, die Sensitivität hämatopoetischer Zellen für Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin und Thrombopoetin erhöht (Gakovic et al. 2008). Die Häufigkeit dieser V617F-Mutation liegt, laut Studie, unter den Patienten mit Polycythaemia vera bei 65%, unter Patienten mit Idiopathischer Myelofibrose bei 57% und unter Patienten mit Essentieller Thrombocythaemie bei 23% (Kralovics und Skoda 2005, Kralovics et al. 2005a, Kralovics et al. 2005b). Für die V617F-Mutation-positive Patienten zeigten niedrigere Erythropoetin- und Ferritin-Serumkonzentrationen als Mutations-negative. Es wurde untersucht, dass die Mutations-positiven Patienten in der Therapie sensitiver auf Hydroxyurea (aber nicht auf Anagrelide) reagierten als Patienten ohne JAK2-Mutation (Campbell und Green 2005, Campbell et al. 2005). Weitere Mutationen, wie der Austausch von Lysin durch Leucin an Position 539 im Exon 12 des JAK2-Gens, sowie drei andere JAK2-Exon12-Mutationen, wurden in Verbindung gebracht mit einer isolierten Erythrozytose und pathologischer Knochenmarksmorphologie sowie in einigen Fällen mit reduzierten Erythropoetin-Spiegeln (Scott et al. 2007a, Scott et al. 2007b). Mit AG490 und SD-1008 sind Inhibitoren gegen JAK2 entwickelt worden, die sich zur Tumorthherapie eignen könnten. So konnte in einer kürzlich publizierten Studie gezeigt werden, dass SD-1008 bei Zelllinien aus Ovarialkarzinomen eine erhöhte Sensitivität für die Chemotherapie verursacht (Duan et al. 2007).

1.4 Zelllinien als Modellsysteme für die Tumorthherapie

Die bisherigen Beispiele illustrieren die besondere Bedeutung der RTK für die moderne Gen spezifische Tumorthherapie. Gemessen an der Tatsache, dass mehrere hundert RTKs bislang nur unzureichend untersucht sind, eröffnet sich hier ein weites und vielversprechendes Forschungsfeld für neue Therapieziele. Für die Validierung der funktionellen und biologischen Relevanz von Genveränderungen sind Zelllinienexperimente das Mittel der Wahl. Durch gezielte Überexpression oder Herabregulierung sowie durch experimentelle Mutagenese kann der Einfluss z. B. einer bestimmten RTK auf relevante Funktionen der Zelle - Wachstum, Teilungsrates, Apoptoserate, Motilität, oder Invasivität - untersucht werden. Genauso können gerade bei RTKs die Wirkung neuer, inhibitorischer Medikamente zunächst an Zelllinien getestet werden, ehe aufwändigere und nicht zuletzt teure Tierexperimente oder sogar riskante klinische Versuche mit Testpersonen durchgeführt werden.

Eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg solcher Experimente ist die Wahl geeigneter Zelllinien. Vor allem sollte der Status (Vorhandensein und Stärke der Expression, eventuelle Mutationen) des Testproteins oder -gens geklärt sein. Für ein optimales Experiment sollten mehrere Zelllinien benutzt werden, einschließlich solcher mit unterschiedlichem Expressionsniveau ebenso auch negative Zelllinien. Letztere können als Kontrolle dienen, aber auch, um das Zielprotein experimentell durch Transfektion mit geeigneten Expressionsvektoren kontrolliert zu exprimieren.

1.5 Gewebe-Mikroarrays von Zelllinien

Die Selektion geeigneter Zelllinien ist ein aufwändiger und teurer Prozess, müssen doch alle in Frage kommenden Zelllinien zunächst gesammelt, angezogen, in Kultur gehalten und schließlich molekularbiologisch analysiert werden. Hier wäre es wünschenswert, eine „Gewebebank“ aus kultivierten Zellen von möglichst vielen Zelllinien zur Verfügung zu haben, die dann mit geeigneten Methoden untersucht werden können. Als optimales Verfahren hierfür bietet sich die Gewebe-Mikroarray (Tissue Microarray, TMA)-Technologie an (Kononen et al. 1998). Die TMA-Technologie erlaubt es, bis zu tausend verschiedene Gewebeproben auf einen Objektträger aufzubringen und gleichzeitig zu analysieren. Das Verfahren ist im Abschnitt 2.3 (Material und Methoden) detailliert beschrieben. Obwohl ursprünglich für Formalinfixierte, Paraffin-eingebettete Gewebeproben entwickelt, können auch andere Zellmaterialien, wie z. B. Zellen aus Kulturen, in einen TMA eingebracht werden, wenn sie zunächst in einen

Paraffinblock eingegossen werden (Simon et al. 2002). Ein TMA, der möglichst alle existierenden humanen Zelllinien repräsentiert, wäre ein optimales Werkzeug, um schnell Zelllinien mit geeignetem Expressionsprofil für funktionelle Studien zu identifizieren. Durch die synchrone und somit hochgradig standardisierte Analyse aller Zelllinien könnten auch vergleichbare, quantitative Aussagen über die Expression des Zielproteins erhalten werden.

1.6 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes zur Erstellung eines solchen Zelllinien-TMA's. Über 140 verschiedene Zelllinien konnten gesammelt werden. Die Ziele dieser Arbeit waren, einen Teil dieser Zelllinien zu kultivieren und in einen TMA einzubringen, geeignete Immunhistochemieprotokolle für die Analyse des TMA's zu erarbeiten und mittels Immunhistochemie (IHC) Zelllinien zu identifizieren, die als Modellsysteme zur weiteren Erforschung der Tyrosinkinasen BTK, ZAP70, HER3, HER4 und JAK2 dienen können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien stammen aus dem Laboratory of the Government Chemist (LGC-Promochem), der American tissue culture collection (ATCC), der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), der European Collection of Cell Cultures (ECACC), der Interlab Cell Line Collection (ICLC), dem National Cancer Institute (NCI-60, Liste von 60 verschiedenen humanen Krebszelllinien), von Novartis sowie vom Biochemischen Institut der Universität Regensburg. Es handelt sich überwiegend um humane Zelllinien, daneben wurden ebenso solche vom Rind (*bos taurus*), Affen (*african green; cercopithecus aethiops*) und von der Ratte (*rattus norvegicus*) verwendet.

Bei den Zelllinien handelt es sich um Tumor-, Nicht-Tumor- als auch um präneoplastische Zellen. Diese entstammen verschiedenen Organen wie Knochenmark, Gehirn, Gebärmutterhals, Dickdarm, Niere, Lunge, Brustdrüse, Muskel, Eierstock, Bauchspeicheldrüse, Blut, Haut, Schilddrüse und Harnblase. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Zelllinien sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tab. 1: Zelllinien

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nummer	DSMZ-Nummer	Herkunfts-Gewebe
1a	HCT-116	CCL-247	ACC 581	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
1b	HCT-15	CCL-225	ACC 357	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
1c	Hep-G2	HB-8065	ACC 180	Leber, hepatozelluläres Karzinom
1e	HT-29	HTB-38	ACC 299	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
1h	IGROV 1			Eierstock, Zystadenokarzinom
1i	K-562	CCL-243	ACC 10	Knochenmark, Lymphoblast, Chronische Myeloische Leukämie (Ursprung: Pleuraerguss)

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
1k	LOX-IMVI			Haut, malignes amelanotisches Me- lanom (Ursprung: Lymphknoten)
1l	MCF7	HTB-22	ACC 115	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
1m	MDA-MB-231	HTB-26		Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
1n	NCI-H226 (H226)	CRL-5826		Lunge, squamöses Karzinom, Meso- thelium (Ursprung: Pleuraerguss)
1o	NCI-H460 (H460)	HTB-177		Lunge, großzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
1p	PC-3	CRL-1435	ACC 465	Vorsteherdrüse, Adenokarzinom, Grad IV (Ursprung: Knochenmark)
1r	RPMI 8226	CCL-155	ACC 402	Lymphatisches Gewebe, B- Lymphozyt, multiples Myelom (Ursprung: peripheres Blut)
2a	RXF 393			Niere, klarzelliges Karzinom
2b	SF 268			Gehirn, anaplastisches Astrozytom
2e	SK-MEL-2	HTB-68		Haut, malignes Melanom (Ursprung: Haut vom Oberschenkel)
2f	SK-MEL-28	HTB-72		Haut, malignes Melanom
2g	SK-MEL-5	HTB-70		Haut, malignes Melanom (Ursprung: axillärer Lymphknoten)
2h	SK-OV-3 (SKOV 3)	HTB-77		Eierstock, Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)
2i	SN-12-C			Niere, Karzinom
2k	SNB-19		ACC 325	Gehirn, Glioblastom, links parie- tookzipital

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
2l	SW-620 (SW620)	CCL-227		Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C (Ursprung: Lymphknoten)
2m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
2n	TK 10			Niere, Karzinom
2o	U 251			Gehirn, Glioblastom
2p	UACC 257			Haut, malignes Melanom
2q	UACC 62			Haut, malignes Melanom
2r	A-549	CCL-185	ACC 107	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom
3a	MDA-MB- 435S	HTB-129		Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse
3b	MOLT-4	CRL-1582	ACC 362	Peripheres Blut, T-Lymphoblast, Akute Lymphoblastische Leukämie
3c	NCI-H23 (H23)	CRL-5800		Lunge, Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
3d	NCI-H322-M	CRL-5806		Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom
3e	NCI-H522 (H522)	CRL-5810		Lunge, Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom, Stadium 2
3f	OVCAR-3	HTB-161		Eierstock, Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)
3g	OVCAR-4			Eierstock, Adenokarzinom
3h	OVCAR-5			Eierstock, Adenokarzinom
3i	OVCAR-8			Eierstock, Adenokarzinom
3k	SF 295			Gehirn, Glioblastom
3l	SF 539			Gehirn, Glioblastom
3m	SNB-75			Gehirn, Astrozytom

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
3n	SR	CRL-2262		Lymphatisches Gewebe, großzelliges immunoblastisches Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)
3o	UO 31			Niere, Karzinom
3p	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere, klarzelliges Karzinom
3q	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere, Karzinom
3r	ACHN	CRL-1611		Niere, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
4a	BT-549	HTB-122		Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)
4b	CaKi-1	HTB-46		Niere, klarzelliges Karzinom (Ursprung: Haut)
4c	CCRF-CEM (CCRF CEM)	CCL-119	ACC 240	Peripheres Blut, T-Lymphoblast, Akute Lymphoblastische Leukämie
4d	COLO-205	CCL-222		Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D (Ursprung: Aszites)
4e	EKVX			Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom
4f	HCC 2998			Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
4g	HOP 62			Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom
4h	HOP 92			Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom
4i	Hs 578T	HTB-126		Brustdrüse, duktales Karzinom
4k	KM 12			Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
4l	M 14			Haut, amelanotisches Melanom
4m	Malme-3M	HTB-64		Haut, malignes Melanom (Ursprung: Lunge)
4n	KRIB			Knochen, Osteosarkom
4o	T98G	CRL-1690		Gehirn, Glioblastom

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
4p	U-343 MG			Gehirn, Glioblastom
4q	LN-401			Gehirn, Glioblastom
4r	LN-229	CRL-2611		Gehirn, Glioblastom, rechts frontaler parietookzipitaler Kortex
5a	BS 149			Knochenmark, aplastische Anämie
5b	MEL-HO		ACC 62	Haut, malignes Melanom
5c	COLO-849		ACC 216	Haut, malignes Melanom (Ursprung: axillärer Lymphknoten rechts)
5d	ECV-304		ACC 310	Harnblase, Karzinom (Ursprung: Nabelschnur eines Neugeborenen)
5e	CaKi-2	HTB-47	ACC 54	Niere, klarzelliges Karzinom
5f	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad II
5g	293 (HEK-293)	CRL-1573	ACC 305	Niere, fetal, transformiert durch Adenovirus 5 DNS
5h	A-375 (A375)	CRL-1619		Haut, malignes Melanom
5i	MRC-5	CCL-171		Lunge, Fibroblast, normal
5k	SM			Haut, malignes Melanom
5l	BT-474	HTB-20	ACC 64	Brustdrüse, duktales Karzinom
5m	EYA 2			Brustdrüse, Karzinom
5n	SJCRH30 (RC13; RMS 13; SJRH30)	CRL-2061		Muskel, Rhabdomyosarkom (Ursprung: Knochenmark)
5o	IM-9	CCL-159	ACC 117	Lymphatisches Gewebe, B-Lymphoblast, Multiples Myelom, transformiert durch EBV (Ursprung: peripheres Blut)
5p	VM-CUB 1		ACC 400	Harnblase, Transitionalzellkarzinom
5q	HeLa	CCL-2	ACC 57	Gebärmutterhals, Adenokarzinom

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
5r	HaCaT			Haut, Keratinozyt, normal
6a	KU-19-19		ACC 395	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad III
6b	GAMG		ACC 242	Gehirn, Glioblastom
6c	IGR-1		ACC 236	Haut, malignes Melanom (Ursprung: inguinaler Lymphknoten)
6d	CRL 7930	CRL-7930		Harnblase, Karzinom
6e	A-172 (A172)	CRL-1620		Gehirn, Glioblastom
6f	COS-1	CRL-1650	ACC 63	Niere, Fibroblast, transformiert durch eine origin-fehlerhafte Mutante von SV-40
6g	Hs766T	HTB-134		Bauchspeicheldrüse, Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)
6h	HUT 12			Bindegewebe, Fibrosarkom
6i	HUVEC			Nabelschnurvene, Endothel, normal
6k	IMR-90	CCL-186		Lunge, Fibroblast, normal
6l	U-138 MG	HTB-16	ACC 291	Gehirn, Glioblastom
6m	U-87 MG	HTB-14		Gehirn, Glioblastom
6n	WSS-1 (WS-1)	CRL-2029		Niere, transformiert durch Adenovi- rus 5 DNS
6o	Hs68	CRL-1635		Haut, Vorhaut, Aspartoacylase- Mangel, mögliche Canavan- Erkrankung
6p	MCF 10A	CRL-10317		Brustdrüse, fibrozystische Masto- pathie
6q	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad II
6r	MDA-HER 2			Brustdrüse, Adenokarzinom
7a	MDA-NEO			Brustdrüse, Adenokarzinom

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nummer	DSMZ-Nummer	Herkunfts-Gewebe
7b	CAL-62		ACC 448	Schilddrüse, anaplastisches Karzinom
7c	DBTRG-05MG	CRL-2020	ACC 359	Gehirn, Glioblastom
7d	HBL-100	HTB-124		Brustdrüse, normal (Ursprung: frühe Muttermilch)
7e	HT-1080	CCL-121	ACC 315	Bindegewebe, Fibrosarkom
7f	LN-405		ACC 189	Gehirn, Glioblastom
7g	MDA-MB-453	HTB-131	ACC 65	Brustdrüse, Karzinom (Ursprung: Perikarderguss)
7h	NCI-H82 (H82)	HTB-175	ACC 556	Lunge, kleinzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
7i	CRO-AP3		ACC 275	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom
7k	SW-548			Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
7l	A-431	CRL-2592	ACC 91	Haut, epidermoides Karzinom
7m	CRO-AP2		ACC 48	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)
7n	BHT-101		ACC 279	Schilddrüse, anaplastisches papilläres Schilddrüsenkarzinom (Ursprung: Lymphknoten)
7o	BT 747			Brustdrüse, duktales Karzinom
7p	A-172 (A172)	CRL-1620		Gehirn, Glioblastom
7q	S-117		ACC 266	Schilddrüse, Sarkom
7r	CRO-AP5		ACC 215	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)
8a	B-CPAP		ACC 273	Schilddrüse, papilläres Karzinom

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
8b	BIO-1-1			experimentelle Zelllinie, Friedrich Miescher Institut, Basel
8c	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, ileozökal
8d	SU-DHL-6	CRL-2959	ACC 572	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)
8e	MDA-MB-435 (MD 435)			Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse
8f	OCI-LY-19		ACC 528	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Knochenmark)
8g	ZR-75-1	CRL-1500		Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Aszites)
8h	ML-1		ACC 464	Schilddrüse, follikuläres Karzinom
8i	BT-474	HTB-20	ACC 64	Brustdrüse, duktales Karzinom
8k	8305C		ACC 133	Schilddrüse, Karzinom
8l	NCI-H510A (H510A; NCI-H510)	HTB-184	ACC 568	Lunge, kleinzelliges Karzinom (Ursprung: Nebenniere)
8m	SU-DHL-4		ACC 495	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)
8n	ONCO-DG-1		ACC 507	Schilddrüse, oxyphiles papilläres Karzinom
8o	MDA-MB-435S	HTB-129		Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse
8p	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere, Karzinom

Array Koor- dinate	Zelllinie	ATCC- Nummer	DSMZ- Nummer	Herkunfts-Gewebe
8q	HT-1376	CRL-1472	ACC 397	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad III
8r	Caco-2	HTB-37	ACC 169	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
9a	SK-CO-1	HTB-39		Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)
9b	HT-29	HTB-38	ACC 299	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom
9c	SaOS-2	HTB-85	ACC 243	Knochen, Osteosarkom
9d	SW-480 (SW480)	CCL-228	ACC 313	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B, Grad IV
9e	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere, klarzelliges Karzinom
9f	KARPAS- 1106P		ACC 545	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)
9g	MDA-MB- 415	HTB-128		Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)
9h	8505C		ACC 219	Schilddrüse, papilläres Adenokarzinom
9i	DLD-1	CCL-221	ACC 278	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
9k	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, ileozökal
9l	SW-403 (SW403)	CCL-230	ACC 294	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C, Grad III
9m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)

2.2 Herstellung der Zelllinienpellets

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die in den Kryo-Tubes gefrorenen Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Zusammen mit 10ml Optimem (Dimethylsulfoxid-Medium (DMSO), Nährlösung mit Fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin) werden sie in eine 75cm² Kulturflasche gegeben. Die Kulturflasche wird anschließend bei 37°C und 40% CO₂ inkubiert. Nach wenigen Tagen beginnen die Zellen sich zu teilen. Je nach Zelllinie wachsen sie adhärent oder in Suspension. Die meisten Zellen müssen alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium versorgt werden. Hierzu wird Optimem im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das alte, verbrauchte Medium wird mittels Vakuumpumpe abgesaugt. 10ml frisches, erwärmtes Optimem wird in die Kulturflasche pipettiert. Diese wird nun erneut inkubiert. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis die Zelldichte 70-90% erreicht hat.

2.2.2 Splitten der Zellen

Optimem und Trypsin-Lösung werden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Mittels Vakuumpumpe wird das alte, verbrauchte Medium abgesaugt. 5ml Trypsin-Lösung werden senkrecht in die stehende Flasche pipettiert. Durch Abkippen und leichtes Schwenken wird der Zellrasen kurz gespült. Das Trypsin wird sofort wieder abgesaugt. Danach werden 2ml Trypsin hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken soll der gesamte Zellrasen gleichmässig bedeckt sein. Nach wenigen Minuten lösen sich die Zellen vom Boden. Durch Zugabe von 8ml Optimem in die Kulturflasche wird das Trypsin neutralisiert. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Flüssigkeit dient der Durchmischung der Zellen. Je nach Grad der Verdünnung wird die Zellsuspension auf unterschiedlich viele neue Kulturflaschen verteilt. Mit Optimem werden diese auf 10ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Flaschen werden danach im Inkubator aufbewahrt.

2.2.3 Ernte der Zellen

Zum Ablösen der Zellen bedient man sich dem gleichen Prozedere wie beim Splitten. Der Inhalt einer Kulturflasche wird zügig eingefroren. Der Inhalt der Übrigen wird zusammengesüttet und bei 4°C und 1000 RPM 10 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Mit der Vakuumpumpe wird der Überstand abgesaugt. Am Boden des Tube bleibt ein Zellpellet zurück. In das Tube werden nun 10ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren löst sich das Pellet auf. Das Tube wird erneut bei 4°C und 1000 RPM 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zuletzt werden 10ml Formalin hinzupipettiert, um eine Resuspension der Zellen des Pellets zu verhindern.

2.2.4 Einfrieren der Zellen

Fünf beschriftete Kryo-Tubes werden in Eis vorgekühlt. Die Zellen einer Kulturflasche werden wie beim oben genannten Splitten vom Boden gelöst. Das Trypsin wird durch Zugabe von Optimem neutralisiert. Der Inhalt der Flasche wird bei 4°C und 1000 RPM 10 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Mit der Vakuumpumpe wird der Überstand abgesaugt. Am Boden des Tube bleibt ein Zellpellet zurück. Dieses Pellet wird anschließend in 10ml PBS aufgelöst und nochmals bei 4°C und 1000 RPM 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nach Zugabe von 7,5ml DMSO 20%-Gefriermedium wird das Pellet durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Zellen sollen nun gleichmäßig verteilt sein. Die Zellsuspension wird zügig in die Kryo-Tubes à 2ml pipettiert. Die Zellen können nun entweder direkt fixiert und pelletiert (siehe 2.2.5), oder zur späteren Verwendung zunächst eingefroren werden. Dazu werden die Tubes sofort nach dem Befüllen im Eisschrank vorgekühlt und nach ca. 24 Stunden zur Langzeit-Lagerung in einen - 80°C Kühlschranks überführt.

2.2.5 Fixierung und Einbettung der Zelllinien in Paraffin

Die Zellen aus etwa fünf T75 Kulturflaschen werden in einem 50ml Flacon-Röhrchen gesammelt und bei 1000g 5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wird abgegossen und die Zellen vorsichtig in PBS zweimal gewaschen. Wenn sich das Pellet löst, wird bei 1000g 5 Minuten zentrifugiert. PBS wird abgegossen und das Tube mit 4% gepuffertem Formalin aufgefüllt. Die Zellen werden für etwa 24 Stunden im Fixativ gelassen. Anschließend wird das Formalin abgegossen und das Pellet in eine Zytospin-Kassette überführt (Histocom AG, Zug, CH: Zytoblock Präparate System). Eventuell muss das Pellet vorsichtig aus dem Tube gelöst werden. Die Kassette wird in 70% Ethanol gegeben. Das Pellet kann so für längere Zeit (z. B. über Nacht) gelagert werden, ehe mit der Einbettung fortgefahren wird. Anschließend wird das Pellet in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je eine Minute 80%, 96%, 100% Ethanol) und mit Paraffin ausgegossen. Das fertige Paraffinblöckchen mit dem Zellkulturpellet kann nun, wie unten beschrieben, zur Herstellung eines Gewebearrays benutzt werden.

2.3 TMA-Herstellung

Das Tumorarray-Verfahren erlaubt das Einbringen von bis zu tausend Gewebezylindern (Durchmesser 0,6mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einen einzigen Paraffinblock. Die Funktionsweise des „Arrayers“ ist in *Abb. 13* dargestellt.

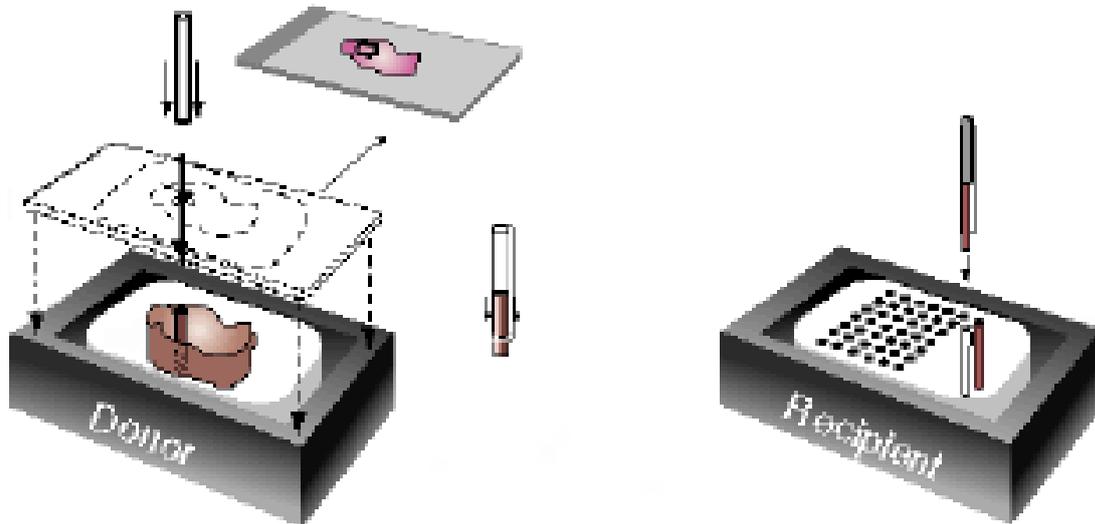


Abb. 13: Tumor-Array-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 μm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von Gewebestücken in vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array), die mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600 μm) vorgefertigt wurden. Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.

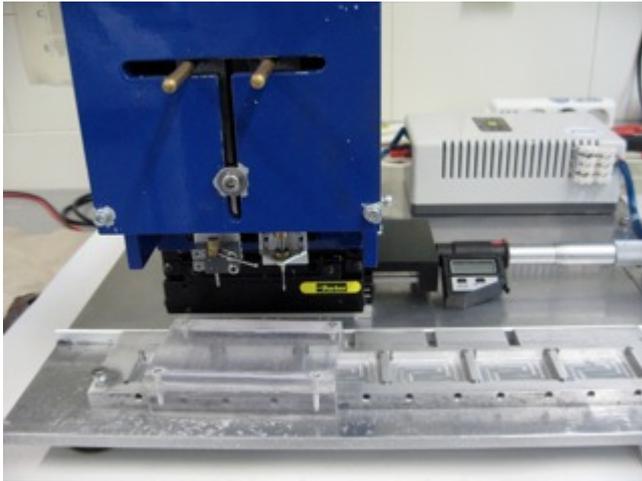


Abb. 14: Gewebe-Array-Stanzgerät. Übersicht.

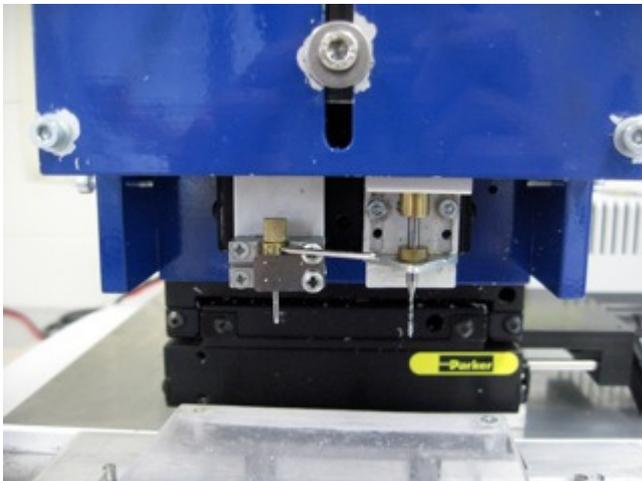


Abb. 15: Gewebe-Array-Stanzgerät. Detailaufnahme. Kernstück der Konstruktion sind ein an der Spitze geschärfter Hohlzylinder und ein Bohrer. Der Bohrer hat einen Durchmesser von 0,6mm. Dieser wird ausschließlich zum Stanzen von Löchern in die Empfängerblöcke verwendet. Der Hohlzylinder dient dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus Spenderblöcken und dem Einbringen dieser Zylinder in den Empfängerblock.

2.4 Zelllinien-TMA

Der fertige Zelllinien-TMA ist in *Abb. 16* dargestellt. Alle Zelllinien konnten in einen einzigen TMA-Block eingebracht werden. Alle Zelllinien können über die Koordinaten (siehe *Tab. 1*) identifiziert werden. *Abb. 17* zeigt eine weitere Vergrößerung eines Zelllinien-Spots.

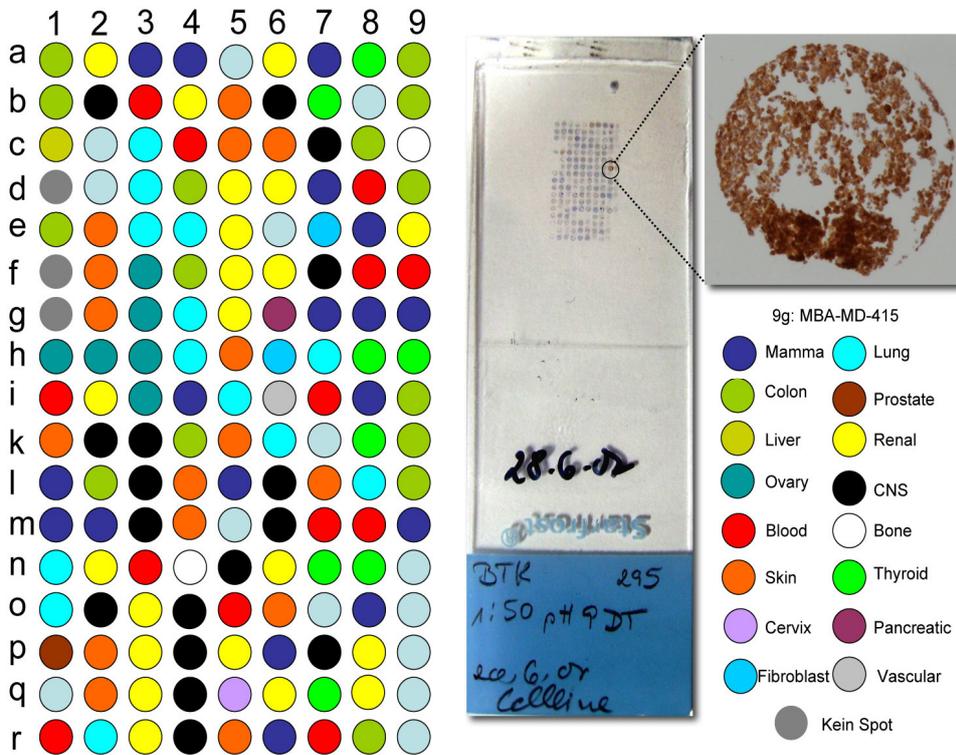


Abb. 16: Zelllinien-TMA. Die schematische Darstellung zeigt die Array-Koordinaten jeder Zelllinie sowie den Typ des Ursprungsgewebes als Farbcode. Mitte: Ein 4 μ m-Schnitt des TMA wurde auf einen Standard-Objekträger zur Mikroskopie aufgezogen und immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen BTK gefärbt. Die Vergrößerung zeigt den Spot der Zelllinie MDA-MB-415.

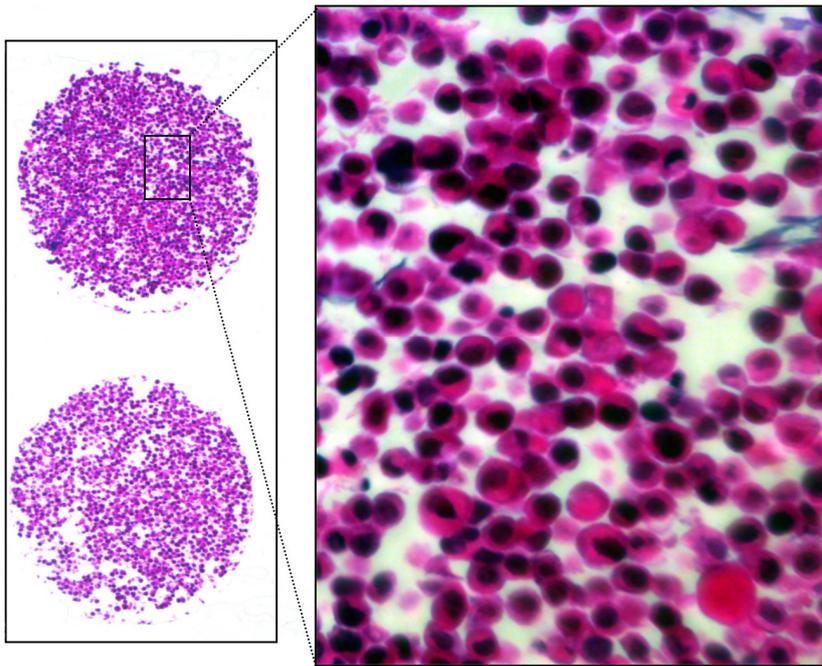


Abb. 17: Zelllinien-TMA. Hämatoxylin-Eosin Färbung. Links: Zwei Spots (0,6mm Durchmesser). Die Vergrößerung (40x) zeigt einzelne Zellen. Die Zellkerne sind an der dunkelblauen Färbung erkennbar, das Zytoplasma ist rot gefärbt.

2.5 Immunhistochemie (IHC)

Für die immunhistochemische Untersuchung der TMAs wurden die folgenden Antikörper, Vorbehandlungen und Verdünnungen (siehe *Tab. 2*) mit dem untenstehenden allgemeinen IHC-Protokoll verwendet.

Die optimale Vorbehandlung und Verdünnung wurde für jeden Antikörper separat etabliert. Hierzu wurden die Gewebeschnitte (Zelllinienpellets) mit unterschiedlichen Temperaturen und z. T. Überdruck (Autoclav 120 °C, Dampfkochtopf 105 °C, Mikrowelle 100 °C) sowie mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (pH2-pH9) vorbehandelt. Das Protokoll wurde als optimal angesehen, wenn die Färbung in dem erwarteten Zellkompartiment (Membran, Zytoplasma, Zellkern) mit maximaler Intensität, aber möglichst geringer Hintergrundfärbung erfolgte. Die TMA-Schnitte wurden vorgängig deparaffiniert und, wie in *Tab. 2* aufgeführt, vorbehandelt. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (Vecta Stain Elite ABC, Vector) verwendet. Die Intensität der Färbung wurde semiquantitativ entsprechend einem Score von 0 bis 3+ für jede Zelllinie geschätzt. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Lokalisation der Immunfärbung (membranös, zytoplasmatisch, nukleär) notiert.

Tab. 2: Verwendete Antikörper und Gewebepreparierung

Protein	Antikörper	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
HER3	DAKO M7297	DAK-H3-IC	1:100	Autoclav, 5min, pH 9.0
HER4	Neo Markers RB-9045-PO	Polyklonal	1:300	Pronase 15min bei 37°C
BTK	Cell Signalling Technology, #3532	Polyklonal	1:50	Dampfkochtopf, 30min, pH 9.0
ZAP70	Upstate Biotechnology, 2F3.2, #16-211	Monoklonal	1:12000	Autoclav, 5min, pH 9.0
JAK2	Upstate Biotechnology #06-255	Polyklonal	1:4050	Autoclav, 5min, pH 7.8

Allgemeines IHC-Protokoll:

a) Vorbereitung der Objektträger:

- Objektträger mit Gewebeschnitten mindestens 1h in Xylol bei Raumtemperatur inkubieren
- Bewässern in absteigender Alkoholreihe: je 1min 100%, 90%, 80%, 70%; dann in H₂O
- Objektträger in TBS-Puffer (TRIS Buffered Saline, pH 7,5) 5min spülen

b) Vorbehandlung des Gewebes / der Zellen:

- Objektträger gemäß Tab. 2 für die entsprechenden Antikörper vorbehandeln
- Objektträger in TBS-Puffer 5min spülen

c) Peroxidase-Block:

- Objektträger 10min in 3% H₂O₂-Lösung (in Methanol) inkubieren
- Objektträger in TBS-Puffer 2 x 5min spülen

d) Antikörper-Inkubation:

- Objektträger mit 100-150µl in TBS vorverdünntem Antikörper (siehe Tab. 2) überschichten, 2h bei 30°C in feuchter Kammer inkubieren
- Objektträger in TBS-Puffer 2 x 5min spülen

- Mit EnVysion Polymer-HRP Konjugat* überschichten, 30min bei 30°C in feuchter Kammer inkubieren
- Objektträger in TBS-Puffer 2 x 5min spülen

e) Farbreaktion:

- Objektträger in destilliertem Wasser 2 x 5min spülen
- Objektträger mit DAB-Chromogen (Liquid DAB DAKO K3468) überschichten, 10min
bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger in destilliertem Wasser 5min spülen
- Objektträger in Haemalaun-Lösung 1min gegenfärben
- Objektträger in Leitungswasser bläuen
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: je 1min 70%, 80%, 90%, 100%; dann in Xylol geben
- Eindeckeln mit Eukit

** für Maus-Antikörper DAKO K4001, für Kaninchen-Antikörper DAKO K4003 einsetzen*

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswertbarkeit des Zelllinien-Arrays

Von den 133 verschiedenen Zelllinien des Arrays konnten je nach Analyse zwischen 121 (90,98%) und 126 (94,74%) ausgewertet werden. Bei jeder Analyse konnten einige Zelllinien nicht ausgewertet werden, weil die Zellen während der Immunfärbung vom Objektträger abgelöst wurden. Dabei handelte es sich jedoch nicht immer um dieselben Spots. So konnten für BTK nicht die Zelllinien A-549, EYA 2, GAMG, HeLa, MCF 10A, T98G und TK 10 analysiert werden. Für HER4 nicht auswertbar waren die Zelllinien KRIB und TK 10, für ZAP70 die Zelllinien KM 12 und T98G sowie für JAK2 die Zelllinien IM-9, MCF 10A und T98G. Bei allen Analysen waren die Zelllinien 8505C, CRO-AP5, DBTRG-05MG, Hs68, OVCAR-8 nicht auswertbar.

3.2 BTK

BTK zeigte eine membranöse Färbung, die mit der bekannten intrazellulären Lokalisation vereinbar ist. Das BTK-Expressionsniveau konnte in 121 Zelllinien bestimmt werden. Bei 12 weiteren Zelllinien des Arrays waren die Zellen während der IHC-Analyse vom Objektträger abgeschwommen und konnten so nicht analysiert werden. Alle 29 Zelllinien mit positiver BTK-Anfärbung sind in *Tab. 3* dargestellt. Die häufigsten Ursprungsgewebe von positiven Zelllinien waren Brustdrüse (n=6/15), Haut (n=5/18), B-Zell-Lymphome (n=4/10), Niere (n=4/12) und Dickdarm (n=3/14). Die stärkste BTK-Expression wurde in den Zelllinien MDA-MB-415 (Brustdrüse, Adenokarzinom), SK-CO-1 (Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom) und NCI-H23 (Lunge, nicht-kleinzelliges Karzinom) gefunden. Beispiele von BTK-exprimierenden Zelllinien sind in *Abb. 18* dargestellt.

Tab. 3: Zelllinien mit BTK-Expression

Zelllinie	Ursprungsgewebe	BTK IHC-Resultat
MDA-NEO	Brustdrüse, Adenoarzinom	1+
MDA-HER 2	Brustdrüse, Adenokarzinom	1+
MDA-MB-415	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	3+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	BTK IHC-Resultat
BT 747	Brustdrüse, duktales Karzinom	1+
ZR-75-1	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Aszites)	2+
T-47D	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
Caco-2	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+
SK-CO-1	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	3+
COLO-205	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D (Ursprung: Aszites)	2+
BIO-1-1	experimentelle Zelllinie, Friedrich Mie- scher Institut, Basel	1+
ECV-304	Harnblase, Karzinom (Ursprung: Nabelschnur eines Neugebo- renen)	1+
A-431	Haut, epidermoides Karzinom	2+
MDA-MB-435S	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	1+
SM	Haut, malignes Melanom	2+
MDA-MB-435	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	1+
SK-MEL-2	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Haut vom Oberschenkel)	2+
NCI-H23	Lunge, nicht-kleinzelliges Karzinom	3+
NCI-H226	Lunge, squamöses Karzinom, Mesotheli- om (Ursprung: Pleuraerguss)	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	BTK IHC-Resultat
CRO-AP2	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
SU-DHL-4	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	1+
SU-DHL-6	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	1+
KARPAS-1106P	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
SJCRH30	Muskel, Rhabdomyosarkom (Ursprung: Knochenmark)	1+
HUVEC	Nabelschnurvene, Endothel, normal	1+
293	Niere, fetal, transformiert durch Adenovirus 5 DNS	1+
COS-1	Niere, Fibroblast, transformiert durch eine origin-fehlerhafte Mutante von SV-40	1+
A-498	Niere, Karzinom	1+
WSS-1	Niere, transformiert durch Adenovirus 5 DNS	1+
ONCO-DG-1	Schilddrüse, oxyphiles papilläres Karzinom	2+

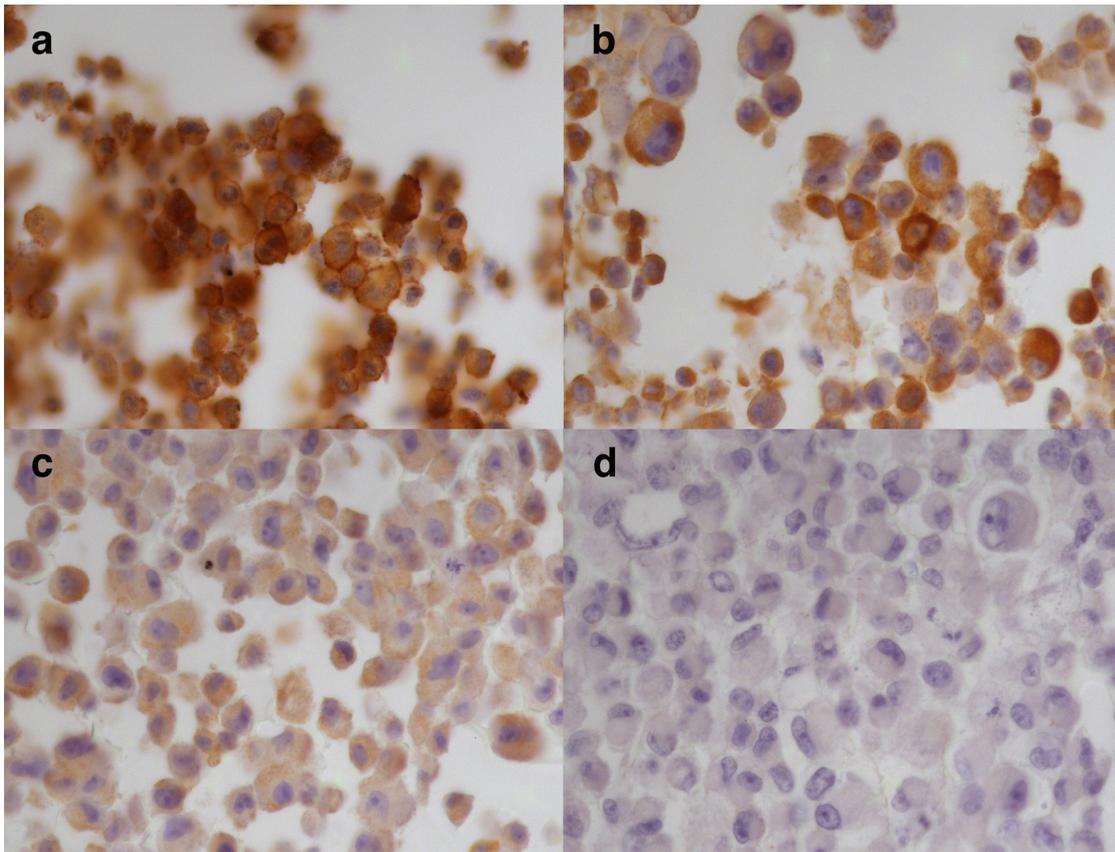


Abb. 18: Beispiele für BTK-Immunfärbungen. a) MDA-MB-415 (3+, starke membranöse Färbung), b) NCI-H23 (3+, starke membranöse Färbung), c) NCI-H226 (1+, schwache, meist zytoplasmatische Färbung), d) RXF 393 (negativ, ohne nachweisbare BTK-Positivität)

3.3 ZAP70

Die ZAP70 Färbung war wider erwarten zytoplasmatisch. Die teils starke zytoplasmatische Koexpression rührt vermutlich von endozytierten Membranfragmenten und/oder Vorstufen des Proteins während der Synthese her. Diese Färbung überlagerte die Membranfärbung und erschwerte die Auswertung. Das ZAP70-Expressionsniveau konnte in 126 Zelllinien bestimmt werden. Bei sieben weiteren Zelllinien des Arrays waren die Zellen während der IHC-Analyse vom Objektträger abgeschwommen und konnten so nicht analysiert werden. Alle 69 Zelllinien mit positiver ZAP70-Anfärbung sind in *Tab. 4* dargestellt.

Die häufigsten Ursprungsgewebe von positiven Zelllinien waren Brustdrüse (n=11/15), Haut (n=11/18), Gehirn (n=9/16), Niere (n=7/12) und Dickdarm (n=7/14). Die stärkste ZAP70-Expression wurde in der Zelllinie SR (Lymphatisches Gewebe, großzelliges immunoblasti-

sches Lymphom) gefunden. Beispiele von ZAP70-exprimierenden Zelllinien sind in *Abb. 19* dargestellt.

Tab. 4: Zelllinien mit ZAP70-Expression

Zelllinie	Ursprungsgewebe	ZAP70 IHC-Resultat
Hs766T	Bauchspeicheldrüse, Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	1+
HT-1080	Bindegewebe, Fibrosarkom	1+
MDA-NEO	Brustdrüse, Adenokarzinom	2+
MCF7	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
MDA-MB-415	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
BT-474	Brustdrüse, duktales Karzinom	1+
BT 747	Brustdrüse, duktales Karzinom	2+
Hs 578T	Brustdrüse, duktales Karzinom	1+
ZR-75-1	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Aszites)	1+
BT-549	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	1+
T-47D	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
MDA-MB-453	Brustdrüse, Karzinom (Ursprung: Perikarderguss)	1+
HBL-100	Brustdrüse, normal (Ursprung: frühe Muttermilch)	1+
HCC 2998	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	1+
HCT-116	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	1+
HT-29	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	1+
SW-480	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B, Grad IV	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	ZAP70 IHC-Resultat
SW-620	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C (Ursprung: Lymphknoten)	1+
SW-403	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C, Grad III	1+
COLO-205	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D (Ursprung: Aszites)	1+
IGROV 1	Eierstock, Zystadenokarzinom	1+
SF 268	Gehirn, anaplastisches Astrozytom	1+
SNB-75	Gehirn, Astrozytom	2+
LN-405	Gehirn, Glioblastom	1+
A-172	Gehirn, Glioblastom	1+
GAMG	Gehirn, Glioblastom	1+
LN 401	Gehirn, Glioblastom	1+
U 251	Gehirn, Glioblastom	1+
SF 539	Gehirn, Glioblastom	2+
SNB-19	Gehirn, Glioblastom, links parietookzipi- tal	1+
ECV-304	Harnblase, Karzinom (Ursprung: Nabelschnur eines Neugebo- renen)	1+
RT-112	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad II	1+
A-431	Haut, epidermoides Karzinom	2+
A-375	Haut, malignes Melanom	1+
SK-MEL-28	Haut, malignes Melanom	1+
UACC 257	Haut, malignes Melanom	1+
UACC 62	Haut, malignes Melanom	1+
MEL-HO	Haut, malignes Melanom	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	ZAP70 IHC-Resultat
MDA-MB-435S	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	1+
MDA-MB-435	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	1+
COLO-849	Haut, malignes Melanom (Ursprung: axillärer Lymphknoten rechts)	2+
SK-MEL-2	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Haut vom Oberschenkel)	2+
Malme-3M	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Lunge)	1+
SaOS-2	Knochen, Osteosarkom	1+
BS 149	Knochenmark, aplastische Anämie	2+
Hep-G2	Leber, hepatozelluläres Karzinom	1+
A-549	Lunge, Adenokarzinom	1+
NCI-H460	Lunge, großzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
NCI-H82	Lunge, kleinzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
NCI-H23	Lunge, Nicht-kleinzelliges Adenokarzi- nom	2+
EKVX	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	2+
NCI-H322-M	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	1+
RPMI 8226	Lymphatisches Gewebe, B-Lymphozyt, multiples Myelom (Ursprung: peripheres Blut)	2+
CRO-AP3	Lymphatisches Gewebe, B-Zell- Lymphom	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	ZAP70 IHC-Resultat
CRO-AP2	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
SU-DHL-6	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	1+
KARPAS-1106P	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
SR	Lymphatisches Gewebe, großzelliges immunoblastisches Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	3+
HUVEC	Nabelschnurvene, Endothel, normal	1+
ACHN	Niere, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
293	Niere, fetal, transformiert durch Adenovirus 5 DNS	1+
A-498	Niere, Karzinom	2+
TK 10	Niere, Karzinom	2+
CaKi-2	Niere, klarzelliges Karzinom	2+
RXF 393	Niere, klarzelliges Karzinom	1+
CaKi-1	Niere, klarzelliges Karzinom (Ursprung: Haut)	2+
MOLT-4	Peripheres Blut, T-Lymphoblast, Akute Lymphoblastische Leukämie	1+
8305C	Schilddrüse, Karzinom	2+
ONCO-DG-1	Schilddrüse, oxyphiles papilläres Karzinom	1+

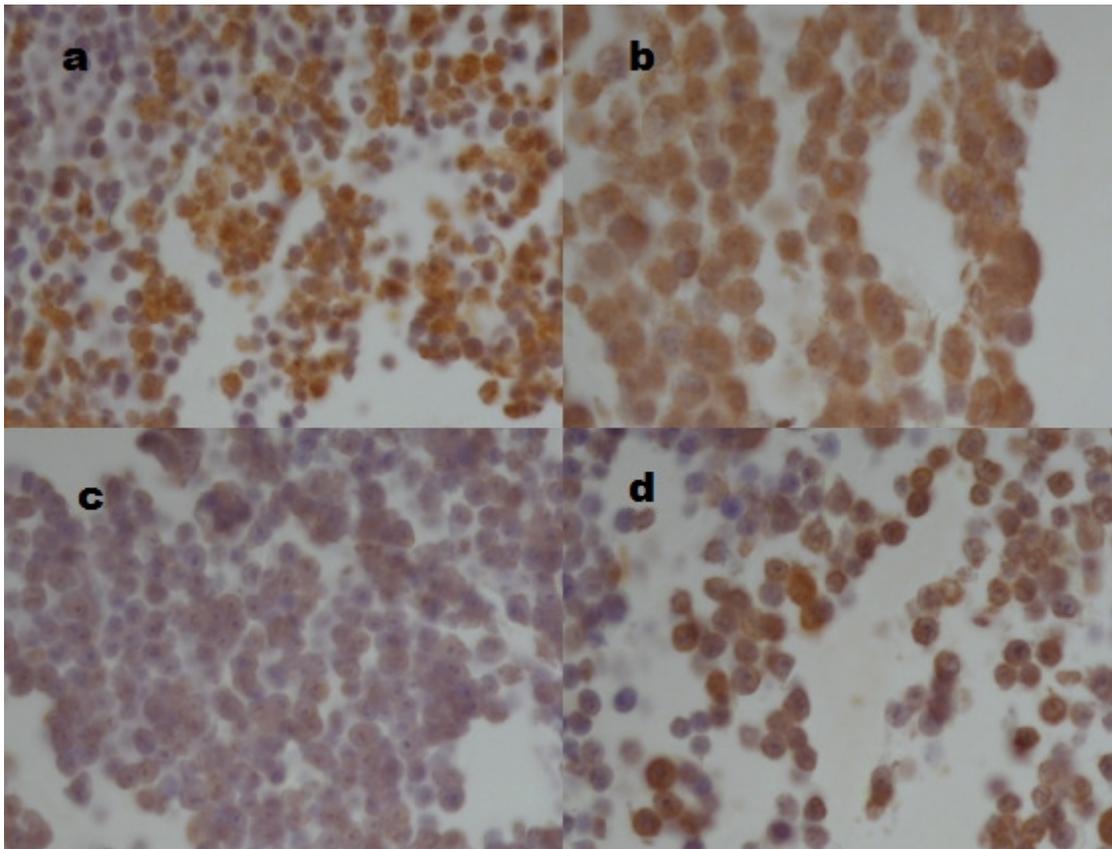


Abb. 19: Beispiele für ZAP70-Immunfärbungen. a) SR (3+, starke zytoplasmatische Färbung mit teils membranöser Koexpression), b) SNB-75 (2+, mäßige zytoplasmatische Färbung), c) A-549 (1+, schwache zytoplasmatische Färbung), d) NCI-H460 (2+, mäßige zytoplasmatische und membranöse Färbung)

3.4 HER3

Eine HER3-Expression wurde mit dem ausgewählten Antikörper bei der Analyse des Zelllinien-TMAs nicht gefunden.

3.5 HER4

HER4 zeigte wie erwartet ein membranöses Expressionsmuster. Eine schwache bis moderate zytoplasmatische Koexpression wurde in den meisten Zelllinien gefunden. Das HER4-Expressionsniveau konnte in 126 Zelllinien bestimmt werden. Bei sieben weiteren Zelllinien des Arrays waren die Zellen während der IHC-Analyse vom Objektträger abgeschwommen und konnten so nicht analysiert werden. Alle 48 Zelllinien mit positiver HER4-Anfärbung sind

in Tab. 5 dargestellt. Die häufigsten Ursprungsgewebe von positiven Zelllinien waren Dickdarm (n=12/14), Brustdrüse (n=10/15), Eierstock (n=4/7), Niere (n=5/12) und Lunge (n=5/13). Die stärkste HER4-Expression wurde in den Zelllinien Hs766T (Bauchspeicheldrüse, Karzinom), MCF7 (Brustdrüse, Adenokarzinom), BT 747 (Brustdrüse, duktales Karzinom) und EYA 2 (Brustdrüse, Karzinom), HCC 2998, HCT-116, SW-480, SW-620, SW-403 und COLO-205 (jeweils Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom), OVCAR-5 und OVCAR-3 (jeweils Eierstock, Adenokarzinom), VM-CUB 1 und RT-112 (jeweils Harnblase, Transitionalzellkarzinom), Hep-G2 (Leber, hepatozelluläres Karzinom), NCI-H322-M (Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom), UO 31 (Niere, Karzinom) und ML-1 (Schilddrüse, follikuläres Karzinom) gefunden. Beispiele von HER4-exprimierenden Zelllinien sind in Abb. 20 dargestellt.

Tab. 5: Zelllinien mit HER4-Expression

Zelllinie	Ursprungsgewebe	HER4 IHC-Resultat
Hs766T	Bauchspeicheldrüse, Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	3+
MDA-HER 2	Brustdrüse, Adenokarzinom	2+
MDA-NEO	Brustdrüse, Adenokarzinom	1+
MCF7	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	3+
MDA-MB-231	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
MDA-MB-415	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
BT 747	Brustdrüse, duktales Karzinom	3+
BT-474	Brustdrüse, duktales Karzinom	2+
ZR-75-1	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Aszites)	2+
T-47D	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
EYA 2	Brustdrüse, Karzinom	3+
DLD-1	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	1+
HCC 2998	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	3+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	HER4 IHC-Resultat
HCT-116	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	3+
HT-29	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+
SW-548	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	1+
SK-CO-1	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	1+
SW-480	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B, Grad IV	3+
HCT-15	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	2+
SW-620	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C (Ursprung: Lymphknoten)	3+
SW-403	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C, Grad III	3+
COLO-205	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D (Ursprung: Aszites)	3+
HCT-8	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, ileozökal	2+
OVCAR-5	Eierstock, Adenokarzinom	3+
OVCAR-4	Eierstock, Adenokarzinom	2+
OVCAR-3	Eierstock, Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	3+
SK-OV-3	Eierstock, Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	2+
IGROV 1	Eierstock, Zystadenokarzinom	2+
HeLa	Gebärmutterhals, Adenokarzinom	1+
VM-CUB 1	Harnblase, Transitionalzellkarzinom	3+
RT-112	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad II	3+
KU-19-19	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad III	2+
HaCaT	Haut, Keratinozyt, normal	2+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	HER4 IHC-Resultat
MDA-MB-435S	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	2+
Hep-G2	Leber, hepatozelluläres Karzinom	3+
NCI-H460	Lunge, großzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
A-549	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	1+
NCI-H322-M	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	3+
HOP 62	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	2+
NCI-H226	Lunge, squamöses Karzinom, Meso- thelium (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
SU-DHL-4	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non- Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	1+
ACHN	Niere, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
UO 31	Niere, Karzinom	3+
A-498	Niere, Karzinom	2+
CaKi-2	Niere, klarzelliges Karzinom	1+
CaKi-1	Niere, klarzelliges Karzinom (Ursprung: Haut)	1+
BHT-101	Schilddrüse, anaplastisches papilläres Schilddrüsenkarzinom (Ursprung: Lymphknoten)	1+
ML-1	Schilddrüse, follikuläres Karzinom	3+

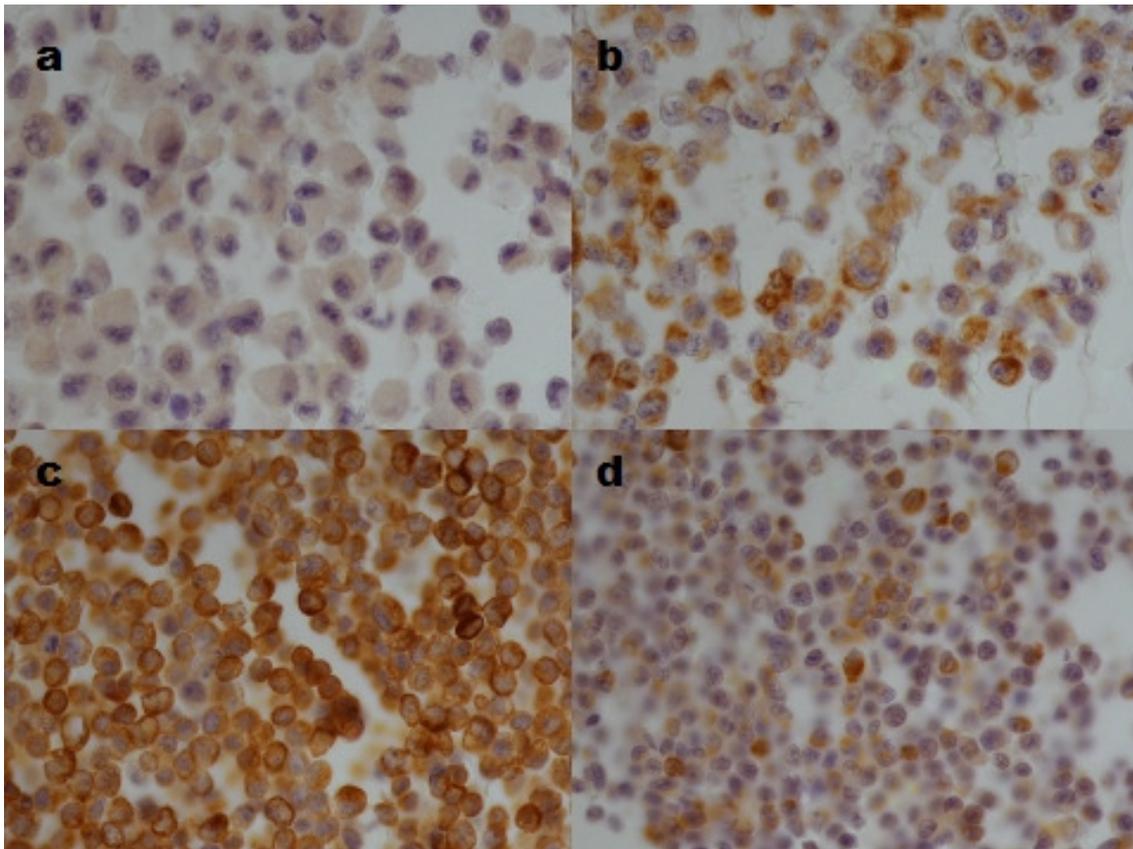


Abb. 20: Beispiele für HER4-Immunfärbungen. a) SK-MEL-5 (negativ, ohne nachweisbare HER4-Positivität), b) ACHN (2+, mäßige zytoplasmatische und membranöse Färbung), c) OVCAR-5 (3+, starke membranöse Färbung), d) A-549 (1+, schwache, meist zytoplasmatische Färbung)

3.6 JAK2

Die JAK2-Färbung war entsprechend der Funktion des Proteins (Transkriptionsfaktor) im Zellkern. Mindestens eine schwache Expression wurde in praktisch allen (n=121/125) auswertbaren Zelllinien des Arrays gefunden. Einzig die Zelllinien NCI-H522 (Lunge, Nichtkleinzelliges Adenokarzinom), OVCAR-3 (Eierstock, Adenokarzinom), ACHN (Niere, Adenokarzinom) und BS 149 (Knochenmark, aplastische Anämie) zeigten keine detektierbare Expression. Beispiele für JAK2-Expression sind in Abb. 21 dargestellt.

Tab. 6: Zelllinien mit JAK2-Expression

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
Hs766T	Bauchspeicheldrüse, Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	1+
HT-1080	Bindegewebe, Fibrosarkom	1+
HUT 12	Bindegewebe, Fibrosarkom	2+
MDA-HER 2	Brustdrüse, Adenokarzinom	3+
MDA-NEO	Brustdrüse, Adenokarzinom	2+
MDA-MB-415	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
MCF7	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	3+
MDA-MB-231	Brustdrüse, Adenokarzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
BT-474	Brustdrüse, duktales Karzinom	3+
BT 747	Brustdrüse, duktales Karzinom	3+
Hs 578T	Brustdrüse, duktales Karzinom	2+
ZR-75-1	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Aszites)	2+
BT-549	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	2+
T-47D	Brustdrüse, duktales Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
EYA 2	Brustdrüse, Karzinom	2+
MDA-MB-453	Brustdrüse, Karzinom (Ursprung: Perikarderguss)	1+
HBL-100	Brustdrüse, normal (Ursprung: frühe Muttermilch)	1+
DLD-1	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	2+
HT-29	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	3+
KM 12	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	3+
Caco-2	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
HCC 2998	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+
HCT-116	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+
SW-548	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	2+
SK-CO-1	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	2+
SW-480	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B, Grad IV	2+
HCT-15	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	2+
SW-620	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C (Ursprung: Lymphknoten)	2+
SW-403	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C, Grad III	2+
COLO-205	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D (Ursprung: Aszites)	2+
HCT-8	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom, ileoözokal	2+
OVCAR-4	Eierstock, Adenokarzinom	2+
OVCAR-5	Eierstock, Adenokarzinom	1+
SK-OV-3	Eierstock, Adenokarzinom (Ursprung: Aszites)	1+
IGROV 1	Eierstock, Zystadenokarzinom	2+
BIO-1-1	experimentelle Zelllinie, Friedrich Mie- scher Institut, Basel	3+
HeLa	Gebärmutterhals, Adenokarzinom	1+
SF 268	Gehirn, anaplastisches Astrozytom	1+
SNB-75	Gehirn, Astrozytom	2+
LN-405	Gehirn, Glioblastom	2+
A-172	Gehirn, Glioblastom	2+
U-138 MG	Gehirn, Glioblastom	2+
U 251	Gehirn, Glioblastom	2+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
GAMG	Gehirn, Glioblastom	1+
U-87 MG	Gehirn, Glioblastom	2+
SF 539	Gehirn, Glioblastom	3+
SF 295	Gehirn, Glioblastom	2+
U-343 MG	Gehirn, Glioblastom	3+
LN-401	Gehirn, Glioblastom	2+
SNB-19	Gehirn, Glioblastom, links parietookzipital	2+
LN-229	Gehirn, Glioblastom, rechts frontaler parietookzipitaler Kortex	2+
CRL 7930	Harnblase, Karzinom	1+
ECV-304	Harnblase, Karzinom (Ursprung: Nabelschnur eines Neugeborenen)	2+
VM-CUB 1	Harnblase, Transitionalzellkarzinom	2+
RT-112	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad II	2+
HT-1376	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad III	1+
KU-19-19	Harnblase, Transitionalzellkarzinom, Grad III	2+
M 14	Haut, amelanotisches Melanom	1+
A-431	Haut, epidermoides Karzinom	3+
HaCaT	Haut, Keratinozyt, normal	1+
LOX-IMVI	Haut, malignes amelanotisches Melanom (Ursprung: Lymphknoten)	2+
SK-MEL-28	Haut, malignes Melanom	3+
A-375	Haut, malignes Melanom	2+
UACC 257	Haut, malignes Melanom	2+
UACC 62	Haut, malignes Melanom	2+
MEL-HO	Haut, malignes Melanom	2+
SM	Haut, malignes Melanom	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
MDA-MB-435S	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	2+
MDA-MB-435	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Pleuraerguss), zuvor beschrieben als duktales Karzinom der Brustdrüse	1+
COLO-849	Haut, malignes Melanom (Ursprung: axillärer Lymphknoten rechts)	2+
SK-MEL-5	Haut, malignes Melanom (Ursprung: axillärer Lymphknoten)	1+
SK-MEL-2	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Haut vom Oberschenkel)	1+
IGR-1	Haut, malignes Melanom (Ursprung: inguinalem Lymphknoten)	2+
Malme-3M	Haut, malignes Melanom (Ursprung: Lunge)	1+
SaOS-2	Knochen, Osteosarkom	3+
KRIB	Knochen, Osteosarkom	1+
K-562	Knochenmark, Lymphoblast, Chronische Myeloische Leukämie (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
Hep-G2	Leber, hepatozelluläres Karzinom	2+
IMR-90	Lunge, Fibroblast, normal	2+
MRC-5	Lunge, Fibroblast, normal	2+
NCI-H460	Lunge, großzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
NCI-H510A	Lunge, kleinzelliges Karzinom (Ursprung: Nebenniere)	1+
NCI-H82	Lunge, kleinzelliges Karzinom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
NCI-H23	Lunge, Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom	1+
A-549	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	3+
EKVX	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	3+
HOP 62	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	2+
HOP 92	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	2+
NCI-H322-M	Lunge, Nicht-kleinzelliges Karzinom	1+
NCI-H226	Lunge, squamöses Karzinom, Mesotheliom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
RPMI 8226	Lymphatisches Gewebe, B-Lymphozyt, multiples Myelom (Ursprung: peripheres Blut)	3+
CRO-AP3	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom	3+
CRO-AP2	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+
SU-DHL-4	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	2+
SU-DHL-6	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Aszites)	2+
OCI-LY-19	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Knochenmark)	2+
KARPAS-1106P	Lymphatisches Gewebe, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	2+
SR	Lymphatisches Gewebe, großzelliges immunoblastisches Lymphom (Ursprung: Pleuraerguss)	1+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
SJCRH30	Muskel, Rhabdomyosarkom (Ursprung: Knochenmark)	2+
HUVEC	Nabelschnurvene, Endothel, normal	1+
293	Niere, fetal, transformiert durch Adenovirus 5 DNS	1+
COS-1	Niere, Fibroblast, transformiert durch eine origin-fehlerhafte Mutante von SV-40	2+
TK 10	Niere, Karzinom	2+
UO 31	Niere, Karzinom	2+
A-498	Niere, Karzinom	1+
SN-12-C	Niere, Karzinom	1+
786-O	Niere, klarzelliges Karzinom	2+
CaKi-2	Niere, klarzelliges Karzinom	3+
RXF 393	Niere, klarzelliges Karzinom	1+
CaKi-1	Niere, klarzelliges Karzinom (Ursprung: Haut)	1+
WSS-1	Niere, transformiert durch Adenovirus 5 DNS	1+
MOLT-4	Peripheres Blut, T-Lymphoblast, Akute Lymphoblastische Leukämie	1+
CCRF-CEM	Peripheres Blut, T-Lymphoblast, Akute Lymphoblastische Leukämie	1+
CAL-62	Schilddrüse, anaplastisches Karzinom	3+
BHT-101	Schilddrüse, anaplastisches papilläres Karzinom (Ursprung: Lymphknoten)	2+
ML-1	Schilddrüse, follikuläres Karzinom	2+
8305C	Schilddrüse, Karzinom	3+
ONCO-DG-1	Schilddrüse, oxyphiles papilläres Karzinom	2+
B-CPAP	Schilddrüse, papilläres Karzinom	2+
S-117	Schilddrüse, Sarkom	3+

Zelllinie	Ursprungsgewebe	JAK2 IHC-Resultat
PC-3	Vorsteherdrüse, Adenokarzinom, Grad IV (Ursprung: Knochenmark)	1+

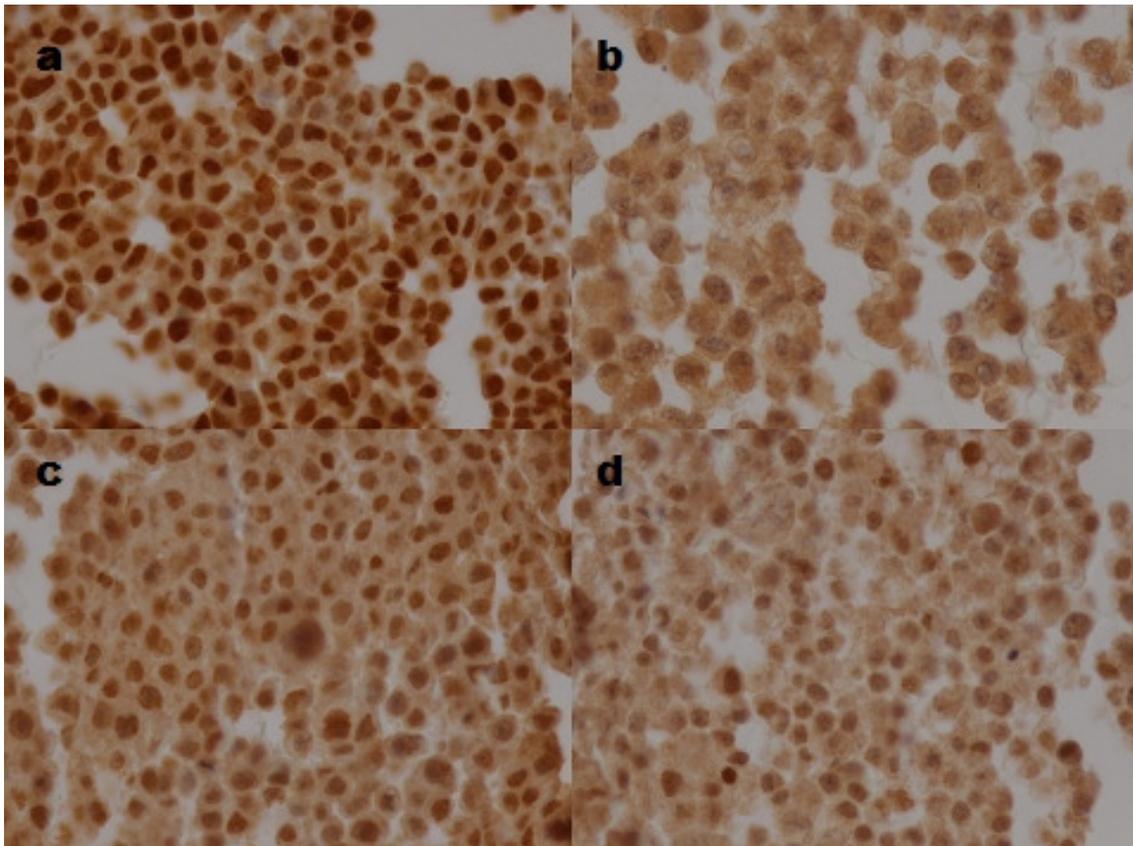


Abb. 21: Beispiele für JAK2-Immunfärbungen. a) A-549 (3+, starke Kernfärbung), b) ACHN (negativ, ohne nachweisbare JAK2-Positivität), c) MDA-NEO (2+, mäßige Kernfärbung), d) MDA-MB-453 (1+, schwache Kernfärbung)

4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, um ein Gewebe-Mikroarray („Tissue Microarray“, TMA) mit Zellen aus Zellkulturen herzustellen. Dieser TMA wurde anschließend mittels Immunhistochemie auf die Expression der Tyrosin- und Nicht-Tyrosinkinase BTK, JAK2, HER3, HER4 und ZAP70 untersucht.

Das gewählte Verfahren der Formalinfixierung und einfachen Zentrifugation zur Pelletierung der Zellen hat sich als äußerst erfolgreich für den gewünschten Zweck der Studie erwiesen. Nach der Paraffineinbettung konnten die Zellen problemlos mit demselben Arrayer gestanzt werden, die auch zur Herstellung konventioneller Gewebearrays benutzt werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen kultivierten Zellen und Zellen im Gewebeverband ist, dass Zellen in Kultur in der Regel keine extrazelluläre Matrix oder einen festen Zellverband ausbilden, der mit einem Gewebeverband von Körperzellen vergleichbar wäre. Somit besteht bei der Entnahme eines Stanzzyinders aus einem Zellpellet grundsätzlich die Gefahr, dass die Zellen nur schlecht auf dem Objektträger haften, insbesondere wenn während der immunhistochemischen Färbungen die Zellen mit Lösungsmittel und Enzymen in Kontakt kommen. Durch das Tape-System konnte jedoch erfolgreich verhindert werden, dass sich eine größere Anzahl von Zellen aus den „Gewebespots“ löst. Tatsächlich hat sich der Standard-Durchmesser von 0,6 mm je Zell-Spot als mehr als ausreichend erwiesen, um eine hohe Auswertbarkeit (90,14 - 93,66% der Spots) des TMAs zu gewährleisten. So waren auf der geringen Fläche von 1,13mm² in der Regel etwa 500 Zellen vorhanden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Zellen im Gewebeverband und Zellen aus Kultur ist, dass kultivierte Zellen Klone mit identischen genetischen Eigenschaften darstellen. Selbst in den wenigen Fällen, in denen sich die Mehrzahl der Zellen eines Zelllinienspots während der immunhistochemischen Experimente abgelöst hatten, waren immer noch zumindest einige Zellen vorhanden, die dann eine erfolgreiche Analyse der Expression des jeweiligen Zielproteins in der entsprechenden Zelllinie erlaubten. In konventionellen Gewebe-Arrays ist die Auswertbarkeit aus diesem Grunde eher etwas geringer (70-80%). Hier ist in der Regel der Tumorzellgehalt im Spot deutlich kleiner als 100%, so dass durch das Abschwimmen selbst schon von Teilen des Gewebespot der Tumor unter Umständen vollständig verloren geht und der Spot somit nicht mehr auswertbar ist.

Mit Ausnahme von HER3 konnten für jedes der im Rahmen dieser Studie untersuchten Proteine mehrere Zelllinien gefunden werden, die das jeweilige Protein in unterschiedlicher Menge exprimierten. Dabei war die Expression in keinem Fall nur auf Zelllinien eines bestimmten

Ursprungsgewebes beschränkt. Dieses Ergebnis deutet nicht nur auf eine wichtige biologische Rolle von TKs für unterschiedlichste Zelltypen hin, sondern gibt auch Hinweise auf Tumortypen, in denen eine veränderte Expression dieser Moleküle von biologischer Relevanz sein könnte. So wurde eine starke Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors BTK interessanterweise nicht nur, wie zu erwarten, in Zelllinien von B-Zell-Lymphomen, sondern überraschenderweise auch in mehreren Zelllinien von Brustdrüsen-, Dickdarm-, Lungen- und Nierenkarzinomen gefunden. Während die Rolle von BTK in lymphatischen Geweben in über 150 Studien untersucht worden ist - z. B. in Zusammenhang mit der Gentherapie bei XLA (Moreau et al. 2008), der Rolle von BTK bei der Entwicklung von B-Zellen und deren Signalwegen (Desiderio 1997) oder der Regulation von B-Zell-Rezeptor vermittelter Antigen-Prozessierung und Präsentation durch Kontrolle der Aktin-Zytoskelett-Dynamik in B-Zellen (Sharma und Song 2009) - sind bisher keine speziellen Studien über die BTK-Expression in soliden Tumoren durchgeführt worden. Sollte sich in den genannten Tumortypen eine mögliche Rolle von BTK ergeben, so könnten die in dieser Studie identifizierten Zelllinien als Modellsysteme für die Untersuchung von BTK-spezifischen Inhibitoren wie z. B. LFM-A13 in Tumorsystemen eingesetzt werden.

Ähnliches gilt auch für ZAP70. Ein erhöhtes Expressionsniveau der Tyrosinkinase ZAP70 wird in der Literatur hauptsächlich in Zusammenhang mit der Funktionsweise des T-Zell-Rezeptors gebracht. Ein Gendefekt von ZAP70 führt zu Immundefekten sowie verschiedenen Formen der CLL. Die Beteiligung von ZAP70 im lymphatischen System lässt vermuten, dass sich eine vermehrte Expression auf Zellen der lymphatischen Reihe beschränken würde, beziehungsweise auf Zellen, die verschiedene Oberflächenrezeptoren wie CD4 oder CD8 besitzen. Tatsächlich konnte in dieser Studie auch eine starke Expression von ZAP70 in lymphatischem Gewebe gefunden werden. Eine Expression von ZAP70 war allerdings auch sehr häufig in Zelllinien von Haut- (11/18 Zelllinien positiv), Brustdrüsen- (11/15 Zelllinien positiv), Gehirn- (9/16 Zelllinien positiv) und Nierenkarzinomen (7/12 Zelllinien positiv). Während die Beteiligung von ZAP70 an der Regulierung der Funktionsweise lymphatischen Gewebes sehr gut untersucht ist (Admirand et al. 2004), finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine Rolle von ZAP70 z. B. bei Brustdrüsen- oder Nierenkarzinomen. Es wäre daher durchaus interessant, auch ZAP70 in diesen Tumortypen näher zu untersuchen.

Als einziges der untersuchten Proteine zeigte der Transkriptionsfaktor JAK2 in praktisch allen Zelllinien eine moderate bis starke Expression. Dies deutet darauf hin, dass JAK2 eine ubiquitäre Funktion in zumindest vielen Gewebetypen haben sollte. Tatsächlich zeigen Expressionsanalysen von JAK2, dass es in vielen humanen Normalgeweben exprimiert sein kann, z. B. im Herzen, im Gehirn oder in der Lunge und der Niere (Saltzman et al. 1998). Bei der Entwicklung von neuen potenziellen Anti-Tumormedikamenten wie z. B. den JAK2 Inhibi-

toren AG490 und SD-1008 sollte daher nicht außer Acht gelassen werden, dass es zu erheblichen Nebenwirkungen kommen könnte. Die Auswirkungen einer solchen Therapie je nach Expressionsniveau oder Aktivierungszustand von JAK2 könnte am Zellkulturmodell simuliert werden.

Der Zellkultur-TMA bietet hierbei optimale Voraussetzungen für die Selektion geeigneter Zelllinien. Die gleichzeitige Analyse aller verschiedener Zelllinien unter exakt denselben experimentellen Bedingungen ist praktisch nur an einem Array möglich. Würde man dieselbe Anzahl von Zelllinien konventionell analysieren, d. h. an mehreren Tagen hintereinander, wäre damit zu rechnen, dass kleinere bis mittlere Unterschiede im JAK2 Expressionsniveau aufgrund von experimentellen Schwankungen nicht sicher gefunden werden könnten. Gerade solche feinen Unterschiede könnten aber für die Entwicklung einer Therapie gegen ein ubiquitär exprimiertes Gen von besonderer Bedeutung sein, um ein optimales therapeutisches Fenster definieren zu können.

Ursächlich für die Entstehung von Krebserkrankungen, welche mit JAK2 in Verbindung gebracht werden, ist die Mutante dieser NRTK. Laut James et al. und Baxter et al. ist die Expression der V617F-Mutante mit der Entstehung von Polycythaemia vera, essentieller Thrombocythaemie und idiopathischer Myelofibrose in Verbindung zu bringen und kann daher auch in hämatopoetischen Stammzellen bei myeloproliferativen Erkrankungen vermehrt nachgewiesen werden (James et al. 2005, Baxter et al. 2005).

Laut James et al. sind hierbei in den hämatopoetischen Stammzellen die Proportionen von mutierter und unmutierter NRTK zugunsten der V617F-Mutante deutlich verschoben (James et al. 2005). Die Inhibition des mutierten JAK2 würde, so Vainchenker et al., die spontane Proliferation und Differenzierung der Erythroblasten von Polycythaemia vera blockieren (Vainchenker et al. 2009). Demnach wäre zu diskutieren, selektiv die mutierte Form von Jak2, Jak2-V617F, als Target für Inhibitoren in Erwägung zu ziehen.

Als einzige der untersuchten TKs war HER3 in allen Zelllinien negativ. Dieser Befund ist insofern schwierig zu interpretieren, als dass kein Kontrollgewebe mit zuverlässiger hoher HER3-Expression gefunden werden konnte. Es ist also nicht auszuschließen, dass die experimentellen Bedingungen (z. B. Antikörperkonzentration, Gewebevorbehandlung) nicht geeignet waren, um HER3 immunhistochemisch sicher nachzuweisen. Alternativ kann vermutet werden, dass zwar viele Zelllinien HER3 exprimieren, aber möglicherweise nur in so geringem Maße, dass es unterhalb der Sensitivitätsgrenze der IHC lag. Für diese Hypothese spricht, dass HER3-Expression in der Literatur in mehreren Zelllinien mit anderen Methoden beschrieben worden ist. So konnte man im Human Protein Atlas bei einer Analyse von 47 Krebszelllinien eine schwache bis mittelstarke Expression in den Zelllinien NB 4, LP 1, PC-3, HaCaT, WM 115 und HEK-293 nachweisen. Von diesen Zelllinien waren PC-3, HaCaT und

HEK-293 ebenfalls auf dem Zelllinien-TMA vertreten. Es ist also davon auszugehen, dass der in dieser Studie verwendete Antikörper nicht geeignet war, um zuverlässig das HER3-Expressionsniveau der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen.

In der Literatur wurde der Nachweis einer Überexpression von HER3 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Phospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289) Rabbit beschrieben.

Eine starke Expression konnte z. B. nach Sithanandam et al. in fünf von sieben Adenokarzinomen der Lunge nachgewiesen werden, hierunter in den Zelllinien H441 und H1373 (Sithanandam et al. 2003).

Ebenso wird in der Literatur eine Expression in Karzinomen der Haut (Wimmer et al. 2008), im Gastrointestinaltrakt (Hayashi et al. 2008) sowie in der Brustdrüse (Dina Yassin et al. 2003) beschrieben. Bei diesem Hintergrund wäre es interessant, die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Hilfe des beschriebenen Antikörpers auf die Expression von HER3 zu untersuchen.

Für die HER3-verwandte Rezeptor-Tyrosinkinase HER4 konnten hingegen zahlreiche Zelllinien mit starker Expression gefunden werden. Für die Spezifität der Immunfärbung spricht nicht nur, dass die Färbung an der Zellmembran - wie für ein Transmembranmolekül zu erwarten - lokalisiert ist, sondern auch, dass der HER4-Status in vielen Zelllinien bereits durch publizierte Daten bekannt und übereinstimmend war. So zeigten in Übereinstimmung mit den Studien von Pontén und Uhlen z. B. die Zelllinien Hep-G2, MCF7 und HaCaT eine starke bis moderate HER4-Expression, während die Zelllinie U 251 auch in der vorliegenden Studie als HER4-negativ gewertet wurde (Pontén und Uhlen 2008).

Die HER4-Daten sind insbesondere in Zusammenhang mit dem Expressionsstatus von anderen Mitgliedern der Familie der EGFR interessant. So werden im Rahmen von parallel durchgeführten Analysen auch der Expressions- und Genkopiezahlstatus von HER1 (EGFR) und HER2 untersucht. Diese Daten können dann benutzt werden, um eine molekulare Datenbank der Zelllinien dieses Arrays aufzubauen. Mit jedem weiteren untersuchten Marker entsteht so ein immer präziseres Bild des Expressionsmusters der verschiedenen Zelllinien. Es wird also in Zukunft möglich sein, Zelllinien nicht nur aufgrund eines einzelnen Markers, sondern vielmehr wegen eines speziellen Expressionsprofils auszuwählen.

So könnte es z. B. interessant sein, Zelllinien mit HER2-Überexpression mit unterschiedlichen EGFR-Veränderungen (keine, wenig oder starke Expression, Mutationen) zu definieren, um die Wirkung von neuen Medikamenten zu testen, die auf mehr als einen molekularen Faktor wirken. Ein Beispiel hierfür wäre der kombinierte HER2/EGFR-Inhibitor Lapatinib (Tykerb/Tyverb). So konnte in den bisherigen klinischen Studien nicht zweifelsfrei belegt werden, unter welchen (molekularen) Bedingungen das Medikament optimal wirkt. Untersuchungen an Zelllinien mit unterschiedlichem HER2/EGFR-Status, die an dem in dieser Studie her-

gestellten TMA leicht identifiziert werden können, könnten dazu beitragen, die molekularen Mechanismen, die das Ansprechen auf eine solche Therapie beeinflussen, besser verstehen zu können.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit der bisher größte existierende Zelllinien-Array mit über hundert verschiedenen humanen Tumorzelllinien generiert werden. Die immunhistochemischen Analysen belegen, dass der TMA geeignet ist, um in kürzester Zeit unter hochgradig standardisierten Bedingungen molekulare Daten von einer Vielzahl von Zelllinien erheben zu können. Der TMA ermöglicht so die rasche Selektion von Zelllinien mit bestimmten molekularen Eigenschaften und somit eine massive Beschleunigung von translationellen Studien.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Viele Tyrosinkinassen spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und –progression und gelten als vielversprechende Kandidaten für Anti-Tumor-Therapien.

Ziel der Studie war es, die Expression der Tyrosinkinassen BTK, ZAP70, HER3, HER4 und JAK2 immunhistochemisch in einer großen Anzahl von Tumorzelllinien zu bestimmen, um einen „Katalog“ von Zelllinien mit bekannten Expressionsstatus für zukünftige funktionelle Analysen zu erstellen.

Im Rahmen dieser Studie wurden 133 verschiedene Zelllinien für die Herstellung eines Gewebe-Mikroarrays (Tissue Microarray, TMA) gesammelt. Bei den Zelllinien handelt es sich um Tumor-, Nicht-Tumor- als auch um präneoplastische Zellen aus Bauchspeicheldrüse (n=1), Bindegewebe (n=2), Brustdrüse (n=15), Dickdarm (n=14), Eierstock (n=6), Gebärmutterhals (n=1), Gehirn (n=16), Harnblase (n=6), Haut (n=18), Knochen (n=2), Knochenmark (n=2), Leber (n=1), Lunge (n=13), Lymphatischem Gewebe (n=10), Muskel (n=1), Nabelschnurvene (n=1), Niere (n=12), peripherem Blut (n=2), Schilddrüse (n=8), Prostata (n=1) und einer experimentellen Zelllinie.

Die Zelllinien wurden kultiviert und in einen Zelllinien-TMA eingebracht. Immunhistochemieprotokolle für die Analyse des TMAs wurden für Antikörper gegen jede der fünf Tyrosinkinassen etabliert, um Schnitte des TMAs auf die Expression der o. g. Tyrosinkinassen zu untersuchen. Für jede Zelllinie wurde die Intensität der Färbung entsprechend einem Score von 0 bis 3+ geschätzt.

Geeignete Immunhistochemieprotokolle konnten für BTK, ZAP70, HER4 und JAK2 etabliert werden. Für HER3 konnte nicht mit Sicherheit ein Protokoll etabliert werden, weil kein Gewebe mit bekannter Positivität vorhanden war.

Expression von BTK wurde in 29/121 (23,97%), von ZAP70 in 69/126 (54,76%), von HER4 in 48/126 (38,10%) und von JAK2 in 121/125 (96,80%) Zelllinien gefunden. Alle Zelllinien waren negativ für HER3. Es ist zu vermuten, dass der verwendete Antikörper nicht geeignet war für die Immunhistochemie im Formalin-fixierten Material. BTK-Expression wurde überraschenderweise nicht nur in lymphatischen Zelllinien (z. B. CRO-AP2, SU-DHL-4, SU-DHL-6 und KARPAS-1106P), sondern auch in mehreren Zelllinien von Brustdrüsenkarzinomen (40%), Karzinomen der Haut (27,78%), der Nieren (33,33%) und des Dickdarm (21,43%) gefunden. Ähnliches galt für ZAP70: Auch hier wurde neben der erwarteten Expression in lymphatischen Zelllinien (z. B. RPMI 8226, CRO-AP3, CRO-AP2, SU-DHL-6, KARPAS-1106P und SR) auch häufig Expression in Zelllinien von Brustdrüsenkarzinomen (73,33%) und Nierenkarzinomen (58,33%) detektiert. HER4-Expression wurde in 38,10% der Zelllinien detektiert, am häufigsten in Karzinomen von Dickdarm (85,71%), Brustdrüse (66,67%) Eierstock

(66,67%), Lunge (38,46%) und Niere (41,67%). Eine positive Immunreaktion für JAK2 fand sich in praktisch allen Zelllinien, was darauf deutet, dass JAK2 eine ubiquitäre Funktion in zumindest vielen Gewebetypen haben könnte.

Zusammenfassend konnte am Beispiel der Tyrosinkinase BTK, JAK2, HER4 und ZAP70 gezeigt werden, dass Zelllinien geeignet sind, um TMAs herzustellen, die dann z. B. mit Immunhistochemie sehr schnell und unter hochgradig standardisierten Bedingungen analysiert werden können. Auf diese Weise können auch geringere Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien sicher detektiert werden. Die in dieser Studie gewonnenen Daten und der hergestellte TMA dienen als Grundlage einer molekularen Datenbank, durch die rasch Zelllinien mit bestimmten Eigenschaften gefunden werden können. Diese Datenbank kann in Form eines „molekularen Kataloges“ genutzt werden, um Zelllinien mit bestimmten Eigenschaften für weiterführende, z. B. funktionelle Analysen zu selektieren.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG490	Inhibitor gegen JAK2
AKT	Serin/Threonin-Kinase
ATCC	American tissue culture collection
ATK	Agammaglobulinemia tyrosine kinase, BTK
ATP	Adenosin-Tyrosin-Phosphat
BCR	B-cell receptor
BLK	B lymphoid tyrosine kinase
BPK	B-cell progenitor kinase, BTK
BTK	Bruton's Tyrosinkinase, ATK, BPK
CD	Cluster of differentiation, Erkennungsmolekül an der Oberfläche von T-Lymphozyten
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
c-SRC	cellular-Schmidt-Ruppin-Carcinoma
Da	Dalton
DAB-Chromogen	Liquid DAB DAKO K3468
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EGFR	epidermal growth factor receptor, HER 1
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian), human epidermal growth factor receptor 2, HER2
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian), human epidermal growth factor receptor 3, HER3
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian), human epidermal growth factor receptor 4, HER4
ER	estrogen receptor
ETV6	ets variant gene 6, TEL
FADD	fas associated protein with death domain
FAK	fokale Adhäsionskinase
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
FERM-Domäne	4.1-Protein (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin-Domäne

FGR	Gardner Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog
FU	Furin-like repeats
FYN	c-syn protooncogene
Ggll.	Ganglien
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HCK	hematopoietic cell kinase
HER1	human epidermal growth factor receptor 1, EGFR
HER2	human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2
HER3	human epidermal growth factor receptor 3, ERBB3
HER4	human epidermal growth factor receptor 4, ERBB4
ICLC	Interlab Cell Line Collection
IgV(H)	variable Region der schweren Kette des Immunglobulins (heavy chains, H; Variable Domäne, V)
IHC	Immunhistochemie
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK1	Janus kinase 1
JAK2	Janus kinase 2, Tyrosin protein kinase 2
JAK3	Janus kinase 3
JH1-7	Janus homologe Domänen 1-7
KIT	kitten
LAT	linker of activated T-cells
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFM-A13	BTK-spezifischer Inhibitor
LGC-Promochem	Laboratory of the Government Chemist
LYN	tyrosine protein kinase
NCI	National Cancer Institute
NF-KB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRG 1	Neuregulin bindende Domäne (Rezeptor für Heregulin)
NRTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCM1	pericentriolar material 1
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PDZ	DHR (Dlg homologous region)
PH	pleckstrin homology

PRLR	Prolaktin-Rezeptor
PSD95	Postsynaptic density protein 95
REC	cheY-homologous receiver domain
RPM	rounds per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD-1008	Inhibitor gegen JAK2
SH2-Domäne	Src-homology-2-domain
SH3-Domäne	Src-homology-3-domain
SHC	Src-homology-2-domain containing
SRC	Schmidt-Ruppin Carcinoma
SRK	syk related kinase
SRTK	syk related tyrosine kinase
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
STD	Selektiver T-Zell-Defekt
Tab.	Tabelle
TBS-Puffer	TRIS Buffered Saline, pH 7.5
TCR	T-cell receptor
TEC	translocated in extraskeletal chondrosarcoma
TEL	ETV6
TK	Tyrosinkinase
TM	Transmembrane domain
TMA	Tissue Microarray
Tyr-Kinase	Tyrosinkinase
TZK	truncated ZAP kinase
v-SRC	viral-Schmidt-Ruppin-Carcinoma, mutierte Form des c-SRC
XID	X-linked Immundefizienz
XLA	X-linked Agammaglobulinemia
YES	Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog
YRK	York, YES-related kinase
ZAP70	Zeta-Ketten-Assoziierte Proteinkinase, SRK, STD, TZK, SRTK

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Admirand, JH., et al., Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol*, 2004. 17(8): p. 954-961.
- Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 2001. 2. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, p. 543.
- Anton, E.S.G., H.T.; Weber, J.L.; McCann, C.; Fischer, T.M.; Cheung, I.D.; Gassmann, M.; Messing, A.; Klein, R.; Schwab, M.H.; Lloyd, K.C.K.; Lai, C., Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult fore-brain. *Nat Neurosci*, 2004. 7: p. 1319-1328.
- Arpaia, E.S., M.; Dadi, H.; Cohen, A.; Roifman, C.M., Defective T cell receptor signaling and CD8(+) thymic selection in humans lacking Zap-70 kinase. *Cell*, 1994. 76: p. 947-958.
- Bajpai, U.D., et al., Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J Exp Med*, 2000. 191(10): p. 1735-1744.
- Baxter, E.J., et al., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005. 365(9464): p. 1054-1061.
- Bieche, I., et al., Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer*, 2003. 106(5): p. 758-765.
- Bowman, T., B.M.; Sinibaldi, D.; Wharton, W.; Pledger, W.J.; Sedivy, J.M.; Irby, R.; Yeatman, T.; Courtneidge, S.A.; Jove, R., Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(13): p. 7319-7324.
- Bradley, L.A., et al., Mutation detection in the X-linked agammaglobulinemia gene, BTK, using single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet*, 1994. 3(1): p. 79-83.
- Buter, J. and G. Giaccone, EGFR inhibitors in lung cancer. *Oncology (Williston Park)*, 2005. 19(13): p. 1707-1711; discussion: p. 1711-1712, 1720-1723.
- Campbell, P.J. and A.R. Green, Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005. p. 201-208.
- Campbell, P.J.S., L.M.; Buck, G.; Wheathley, K.; East, C.L.; Marsden, J.T.; Duffy, A.; Boyd, E.M.; Bench, A.J.; Scott, M.A.; Vassiliou, G.S.; Milligan, D.W.; Smith, S.R.; Erber, W.N.; Bareford, D.; Wilkins, B.S.; Reilly, J.T.; Harrison, C.N.; Green, A.R., Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 2005. 366: p. 1945-1953.
- Carraway, K.L., III; Sliwkowski, M.X.; Akita, R.; Platko, J.V.; Guy, P.M.; Nuijens, A.; Diamonti, A.J.; Vandlen, R.L.; Cantley, L.C.; Cerione, R.A., The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem*, 1994. 269: p. 14303-14306.
- Chan, A.C.I., M.; Turck, C.W.; Weiss, A., ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 1992. 71: p. 649-662.
- Courtneidge, S.A., Role of Src in signal transduction pathways. The Jubilee Lecture. *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(2): p. 11-7.
- Cowan-Jacob, S.W., Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(22): p. 2608-2625.
- Desiderio, S., Role of Btk in B cell development and signaling. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(4): p. 534-540.

Dina Yassin, M.D., et al., HER Family Expression in Egyptian Breast Cancer Patients. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2003. 15(4): p. 373-380.

Duan, Z., et al., 8-benzyl-4-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene-6,7-dicarboxylic acid (SD-1008), a novel janus kinase 2 inhibitor, increases chemotherapy sensitivity in human ovarian cancer cells. *Mol Pharmacol*, 2007. 72(5): p. 1137-1145.

Elder, M.E.L., D.; Clever, J.; Chan, A.C.; Hope, T.J.; Weiss, A.; Parslow, T.G., Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science*, 1994. 264: p. 1596-1599.

Feng, S.M., S.C.; Hunter, D.; Zhou, H.; Yang, X.; Caskey, L.S.; Dy, R.; Muraoka-Cook, R.S.; Earp, H.S., 3rd., The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(8): p. 1861-1876.

Gakovic, M., R.J.; Francois, V.; Constantinescu, S.N.; Pellegrini, S., The Stat3-activating Tyk2 V678F mutant does not up-regulate signaling through the type I interferon receptor but confers ligand hypersensitivity to a homodimeric receptor. *J Biol Chem*, 2008. 283(27): p. 18522-18529.

Gassmann, M.C., F.; Orioli, D.; Simon, H.; Lai, C.; Klein, R.; Lemke, G., Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*, 1995. 378: p. 390-394.

Gauld, S.B.; Blair, D.; Moss, C.A.; Reid, S.D.; Harnett, M.M., Differential roles for extracellularly regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in B cell antigen, receptor-induced apoptosis and CD40-mediated rescue of WEHI-231 immature B cells. *J Immunol*, 2002a. 168(8): p. 3855-3864

Gauld, S.; Dal Porto, J.M.; Cambier, J.C., B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*, 2002b. 296(5573): p. 1641-1642.

Giuliani, F. and G. Colucci, Cetuximab in colon cancer. *Int J Biol Markers*, 2007. 22(1 Suppl 4): p. 62-70.

Golding, J.P.T., P.; Krumlauf, R.; Gassmann, M., Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4. *Nat Cell Biol*, 2000. 2: p. 103-109.

Haan, S., M.C.; Engrand, A.; Rolvering, C.; Schmitz-Van de Leur, H.; Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, C., Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation. *J Immunol*, 2008. 180(2): p. 998-1007.

Hahn, C.G.W., H.Y.; Cho, D.S.; Talbot, K.; Gur, R.E.; Berrettini, W.H.; Bakshi, K.; Kamins, J.; Borgmann-Winter, K.E.; Siegel, S.J.; Gallop, R.J.; Arnold, S.E., Altered neuregulin 1 - erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med*, 2006. 12: p. 824-828.

Hayashi, M., et al., High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(23): p. 7843-7849.

Ihle, J., The Janus kinase family and signaling through members of the cytokine receptor superfamily. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1994. 206(3): p. 268-272.

Imada, K., L.W., The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*, 2000. 37(1-2): p. 1-11.

Islam, T.C., S.C., The cellular phenotype conditions Btk for cell survival or apoptosis signaling. *Immunol Rev*, 2000. 178: p. 49-63.

James, C., et al., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005. 434(7037):p. 1144-1148.

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005a), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01819_2.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005b), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01819_1.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005c), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/02248_1.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005d), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01495_1.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005e), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01495_2.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005f), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01820_1.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005g), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/01820_2.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005h), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/02767_1.png] URL: [Stand: 13.01.2010, 12:00Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005i), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/02767_2.png] URL: [Stand: 13.01.2010, 12:00Uhr]

Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics, Bangalore, India (2005k), Human Protein Reference Database [http://www.hprd.org/graph/00993_1.png] URL: [Stand: 12.01.2010, 19:20Uhr]

Kawakami, Y., et al., Bruton's tyrosine kinase regulates apoptosis and JNK/SAPK kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(8): p. 3938-3942.

Kitaura, J., et al., Akt-dependent cytokine production in mast cells. *J Exp Med*, 2000. 192(5): p. 729-740.

Kononen, J., et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998. 4(7): p. 844-847.

Kralovics, R.C., M. and R.C. Skoda, Reply to Tefferi et al. *N Engl J Med*, 2005. 353: p. 1417.

Kralovics, R.P., F.; Buser, A.S.; Teo, S.S.; Tiedt, R.; Passweg, J.R.; Tichelli, A.; Cazzola, M.; Skoda, R.C., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005a. 352(17): p. 1779-1790.

Kralovics, R., et al., Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*, 2005b. 106(10): p. 3374-3376.

Lacronique, V.B., A.; Valle, V.D.; Poirel, H.; Quang, C.T.; Mauchauffé, M.; Berthou, C.; Lescard, M.; Berger, R.; Ghysdael, J.; Bernard, O.A., A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 1997. 278(5341): p. 1309-1312.

Leonard, W.J., Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*, 2001. 73(3): p. 271-277.

Lodge, A.J., et al., Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol*, 2003. 56(4): p. 300-304.

Lynch, T.J., et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004. 350(21): p. 2129-2139.

Mahajan, S., et al., Rational design and synthesis of a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [α -cyano- β -hydroxy- β -methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propanamide]. *J Biol Chem*, 1999. 274(14): p. 9587-9599.

Marjanovic, G., S.I.; Jankovic-Velickovic, L.; Hubl, W.; Marjanovic, V., Detection of ZAP-70 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J BUON*, 2008. 13(4): p. 543-546.

Memon, A.A.S., B.S.; Melgard, P.; Fokdal, L.; Thykjaer, T.; Nexø, E., Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. *Br J Cancer*, 2004. 91: p. 2034-2041.

Moreau, T., B.V.; Bardin, F.; Nunes, J.A.; Calmels, B.; Chabannon, C.; Tonnelle, C., Development of an enhanced B-specific lentiviral vector expressing BTK: a tool for gene therapy of XLA. *Gene Ther*, 2008. 15(12): p. 942-952.

Pawlowski, V., et al., Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(11): p. 4217-4225.

Pegram, M.D., et al., Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(10): p. 759-769.

Pegram, M.D.; G. Konecny and D.J. Slamon, The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res*, 2000. 103: p. 57-75.

Petro, J.B. and W.N. Khan, Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *J Biol Chem*, 2001. 276(3): p. 1715-1719.

Petro, J.B., et al., Bruton's tyrosine kinase is required for activation of I kappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J Exp Med*, 2000. 191(10): p. 1745-1754.

Piccart-Gebhart, M.J., et al., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005. 353(16): p. 1659-1672.

Plowman, G.D., G.J.; Culouscou, J.M.; Carlton, G.W.; Rothwell, V.M.; Buckley, S., Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, 1993. 366(6454): p. 473-475.

Pontén, F., J.K. and Uhlen, M., The Human Protein Atlas - a tool for pathology. *J Pathol*, 2008. 216(4): p. 387-393.

Rajkumar, T., S.G.; Pandha, H.S.; Waxman, J.; Gullick, W.J., Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer. *J Pathol*, 1996. 179(4): p. 381-385.

Rassenti, L.Z.H., L.; Toy, T.L.; Chen, L.; Keating, M.J.; Gribben, J.G.; Neuberg, D.S.; Flinn, I.W.; Rai, K.R.; Byrd, J.C.; Kay, N.E.; Greaves, A.; Weiss, A.; Kipps, T.J., ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*, 2004. 351: p. 893-901.

Reiter, A.W., C.; Watmore, A.; Schoch, C.; Blau, I.; Schlegelberger, B.; Berger, U.; Telford, N.; Aruliah, S.; Yin, J.A.; Vanstraelen, D.; Barker, H.F.; Taylor, P.C.; O'Driscoll, A.; Benedetti, F.; Rudolph, C.; Kolb, H.J.; Hochhaus, A.; Hehlmann, R.; Chase, A.; Cross, N.C., The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res*, 2005. 65(7): p. 2662-2667.

Roifman, C.M.H., D.; Martinez-Valdez, H.; Thorner, P.; Doherty, P.J.; Pan, S.; Cohen, F.; Cohen, A., Depletion of CD8(+) cells in human thymic medulla results in selective immune deficiency. *J Exp Med*, 1989. 170: p. 2177-2182.

Sakaguchi, N.T., T.; Hata, H.; Nomura, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Matsutani, T.; Negishi, I.; Nakatsuru, S.; Sakaguchi, S., Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 2003. 426: p. 454-460.

Saltzman, A., S.M.; Franks, C.; Searfoss, G.; Munro, R.; Jaye, M.; Ivashchenko, Y., Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1998. 246(3): p. 627-633.

Sartor, C., Z.H.; Kozłowska, E.; Guttridge, K.; Kawata, E.; Caskey, L.; Harrelson, J.; Hynes, N.; Ethier, S.; Calvo, B.; Earp, H.S., 3rd, Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(13): p. 4265-4275.

Satterthwaite, A.B.; Z. Li and O.N. Witte, Btk function in B cell development and response. *Semin Immunol*, 1998. 10(4): p. 309-316.

Scott, L.M.T., W.; Levine, R.L.; Scott, M.A.; Beer, P.A.; Stratton, M.R.; Futreal, P.A.; Erber, W.N.; McMullin, M.F.; Harrison, C.N.; Warren, A.J.; Gilliland, D.G.; Lodish, H.F.; Green, A.R., JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Eng J Med*, 2007a. 356: p. 459-468.

Scott, L.M., et al., Prevalence of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *Br J Haematol*, 2007b. 139(3): p. 511-512.

Sharma, S., O.G. and W. Song, Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *J Immunol*, 2009. 182(1): p. 329-339.

Siehl, J. and E. Thiel, C-kit, GIST, and Imatinib. *Recent Results Cancer Res*, 2007. 176: p. 145-151.

Silberberg, G.D., A.; Pinkas-Kramarski, R.; Navon, R., The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. *Am J Med Genet*, 2006. 141B: p. 142-148.

Simon, R., et al., Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene*, 2002. 21(16): p. 2476-2483.

Sithanandam, G., A.L., The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2008. 15(7): p. 413-448.

Sithanandam, G., et al., Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Carcinogenesis*, 2003. 24(10): p. 1581-1592.

Smith, C.I., et al., Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol*, 1994. 152(2): p. 557-565.

Steinert, D.M.; J.C. McAuliffe and J.C. Trent, Imatinib mesylate in the treatment of gastrointestinal stromal tumour. *Expert Opin Pharmacother*, 2005. 6(1): p. 105-113.

Suo, Z., et al., EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*, 2002. 196(1): p. 17-25.

Tan, J.E., et al., The adaptor protein BLNK is required for b cell antigen receptor-induced activation of nuclear factor-kappa B and cell cycle entry and survival of B lymphocytes. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20055-20063.

Thomas, J.D., et al., Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, 1993. 261(5119): p. 355-358.

Tibbles, H.E.; Samuel, P.; Erbeck, D.; Mahajan, S.; Uckun, F.M., In vivo toxicity and antithrombotic profile of the oral formulation of the antileukemic agent, LFM-A13-F. *Arzneimittelforschung*, 2004. 54(6): p. 330-339.

Tokita, Y., K.H.; Matsui, F.; Aono, S.; Ishiguro, H.; Higashiyama, S.; Oohira, A., Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *Neuroscience*, 2001. 21(4): p. 1257-1264.

Uckun, F.M., Rationally designed antimitotic agents with proapoptotic activity. *Curr Pharm Des*, 2001. 7(16): p. 1627-1639.

Uckun, F.M., et al., Structure-based design of novel anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 2001. 1(1): p. 59-71.

Vassilev, A.O. and F.M. Uckun, Therapeutic potential of inhibiting Bruton's tyrosine kinase, (BTK). *Curr Pharm Des*, 2004. 10(15): p. 1757-1766.

Vainchenker et al., PatentDe [<http://www.patent-de.com/20090212/DE602005004008T2.html>] URL: [Stand 20.11.2010, 18:00Uhr]

Wimmer, E., et al., HER3 expression in cutaneous tumors. *Anticancer Res*, 2008. 28(2A): p. 973-979.

Witton, C.J., et al., Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 2003. 200(3): p. 290-297.

Yamaoka, K., S.P.; Pesu, M.; Holt, V.E., 3rd; Silvennoinen, O.; O'Shea, J.J., The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol*, 2004. 5(12): p. 253.

Yao, L., et al., Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. *J Biol Chem*, 1999. 274(28): p. 19752-19761.

Zaczek, A.; B. Brandt and K.P. Bielawski, The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol*, 2005. 20(3): p. 1005-1015.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Überlassung des Dissertationsthemas,

Herrn Dr. rer. nat. Ronald Simon für die freundschaftliche und fachliche Betreuung bei der Ausarbeitung des Themas,

Herrn Martin Oeggerli und Christian Ruiz für die fachliche Betreuung im Zelllabor des Pathologischen Instituts der Universität Basel,

Frau Sandra Schneider und Frau Hedvika Novotny für die freundschaftliche und motivierende Betreuung der Laborarbeit,

Herrn Michael Übersax, Frau Adriana Sorger und Frau Antje Becker für die motivierte Zusammenarbeit im Labor sowie

Herrn Marcel Bopp für die bereitwillige und unermüdliche Unterstützung bei der Formatierung meiner Arbeit.

9 LEBENSLAUF

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: