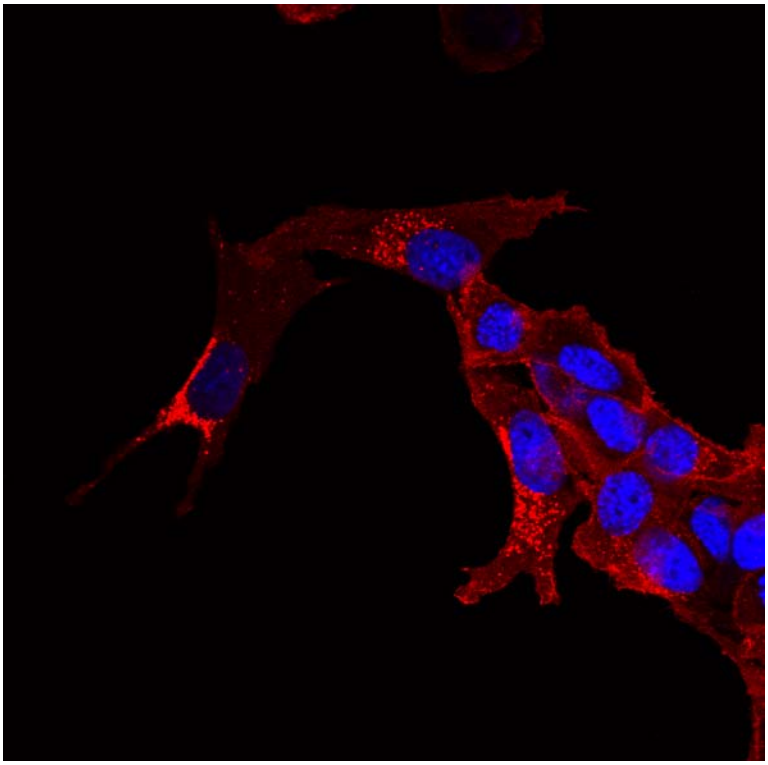
Regulation der Proliferation und Differenzierung in einem Mammakarzinom-Tumorstammzellsystem durch die Rezeptortyrosinkinase Met

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg
vorgelegt von



Dipl.-Biologin Katharina Gruner
geboren am 14.01.1983
in Hamburg
Hamburg 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis Mai 2012 am Heinrich-Pette-Institut - Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung Tumorvirologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert angefertigt und von Herrn Dr. Genrich Tolstonog betreut. Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht, bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

Wegwitz F., Kluth M. A., Manz C., Otto B., **Gruner K.**, Heinlein C., Kuhl M., Warnecke G., Schumacher U., Deppert W. and Tolstonog G. V. (2010). "Tumorigenic WAP-T Mouse Mammary Carcinoma Cells: A Model for a Self-Reproducing Homeostatic Cancer Cell System." PLoS One 5(8).

Otto B*., **Gruner K*.,** Heinlein C., Wegwitz F., Nollau P., Ylstra B., Pantel K., Schumacher U., Baumbusch L.O., Martin-Subero J.I., Siebert R.,Wagener C., Streichert T.,Deppert W., and Tolstonog G.V.(2012). „Low-grade and high-grade mammary carcinomas in WAP-T transgenic mice are independent entities distinguished by Met expression“. Manuskript eingereicht.

Gruner K., Babu S., Nollau P., Deppert W., and Tolstonog G.V. (2012). „Met signaling regulates the metastability of differentiation states”. Manuskript in Arbeit.

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 20.07.2012

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Katharina Gruner, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Des Weiteren erkläre ich, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, den 11.05.2012 Katharina Gruner

für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I

ZUSAMMENFASSUNG VIII

ABSTRACT X

1.EINLEITUNG 1

1.1 Das WAP-T Mausmodell zur Analyse des Mammakarzinoms 2

1.2 Das WAP-T Zellkulturmodell 3

1.3 Einordnung des G-2 Zellkulturmodells in bekannte Tumormodelle 6

1.4 Die Rezeptortyrosinkinase Met 7

1.4.1 Grundlegende Prinzipien der Met-Aktivierung 8

1.4.2 Wechselwirkung von Met mit Adapterproteinen 10

1.4.3 Die wichtigsten Met-abhängigen Signalwege 13

1.4.3.1 Der Mapk-Signalweg 13

1.4.3.2 Der Pi3k-Akt-Signalweg 14

1.4.3.3 Der Stat-Signalweg 15

1.4.3.4 Der Nfκb-Signalweg 15

1.4.4 Modulation des Met-Signals 16

1.4.4.1 Endosomale Signale nach Met-Internalisierung 17

1.4.4.2 Signalabbruch durch Met-Internalisierung 18

1.4.4.3 Gesteuerte Proteolyse von Met 19

1.4.5 Invasives Wachstum 20

1.4.6 Met in der Embryonalentwicklung 20

1.4.7 Met im adulten Organismus 21

1.4.7.1 Met im Mammagewebe 23

1.4.8 Met in Tumoren 25

1.4.8.1 Met in Mammakarzinomen 27

1.4.9 Met als therapeutisches Zielprotein 29

1.5 Aufgabenstellung 31
2.MATERIAL 33
2.1 Chemikalien und andere Materialien 33
2.2 Puffer und Lösungen 34
2.3 Verbrauchsmaterialien 37
2.4 Geräte 38
2.4.1 Waagen 38
2.4.2 Schüttler und Mischgeräte 38
2.4.3 Zentrifugen 38
2.4.4 Mikroskope 38
2.4.5 Gelanalyse-Systeme 39
2.4.6 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System 39
2.4.7 Geräte für Arbeiten im prokaryotischen System 39
2.4.8 Spannungsquellen 39
2.4.9 Weitere Geräte 39
2.5 Kits 40
2.6 Größenstandards 40
2.6.1 Protein-Größenstandards 40
2.7 Plasmide 40
2.8 shRNA-Sequenzen 41
2.9 Oligonukleotide 41
2.10 Versuchstiere 43
2.11 Eukaryotische Zellen 44
2.12 Prokaryotische Zellen 45
2.13 Antikörper 45
2.14 Fluoreszenzfarbstoffe für die DNA Färbung 48
2.15 Enzyme/dNTPs 48
2.16 Computer-Software, Datenbanken und verwendete Web-Seiten 49

3. METHODEN 50

3.1 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen 50

3.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen in Flüssigmedium 50

3.1.2 Anlegen von Glycerindauerkulturen 50

3.1.3Maxipräparation von Plasmid-DNA 50

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen - Zellbiologische Methoden 50

3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen 50

3.2.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen (2D-Kultur) 51

3.2.1.2 Kultivierung von verankerungsunabhängig wachsenden Zellen in Methylzellulose 51

3.2.2 Analyse der Zellmotilität mittels scratch-assay 52

3.2.3 Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit 53

3.2.4 Behandlung von Zellen mit dem Met-TKD-Inhibitor PHA-665752 54

3.2.5 Behandlung von Zellen mit Retinsäure oder Retinsäure und Met-Inhibitor 55

3.2.6 Langzeit-Kultivierung der behandelten Zellen 55

3.2.7 Fixieren von Zellen auf Objektträgern durch Zentrifugation 56

3.2.8 Überprüfen der Aktivierbarkeit von Met in den G-2C9 Zellen durch Zugabe von Hgf 56

3.2.9 Bestimmung der Zellzahl 57

3.2.10 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen 57

3.2.11 Transiente Transfektion von DNA 57

3.2.11.1 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin 58

3.2.12 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) 58

3.2.12.1 Durchflusszytometrie zur Erfassung der Expression von spezifischen Oberflächenmarkern 60

3.2.12.2 Durchflusszytometrie zur Erfassung der TurboGFP-Expression 60

3.2.12.3 Durchflusszytometrie basierter Repopulationsassay 61

3.3 Immunzytochemie und Konfokale-Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie 61

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung 61

3.3.2 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie 63
3.4 Arbeiten mit Versuchstieren 64
3.4.1 Gewebeentnahme 64
3.4.2 Arbeiten am Kryotom 65
3.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren 66
3.5.1 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren 66
3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese 66
3.5.3 Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen 67
3.5.4 RNA-Isolierung 67
3.5.5 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese) 68
3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion 68
3.5.6.1 Standard-PCR 69
3.5.7 Sequenzierung von PCR-Produkten 70
3.5.8 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) 70
3.6 Arbeiten mit Proteinen 72
3.6.1 Herstellung von Zelllysaten und Zellextrakten 72
3.6.2 SDS-Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 73
3.6.3 Western-Blot 74
3.6.4 Immundetektion von Proteinen 74
3.6.4.1 Detektion von Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern 75
3.6.4.2 Detektion von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern 75
3.7 Arbeiten mit Viren 76
3.7.1 Lentiviraler Gentransfer 76
3.7.2 Herstellung Lentiviraler Partikel 76
3.7.3 Transduktion von G-2C9 Zellen mit lentiviralen Partikeln 77
3.7.4 Puromycin Killkurve 77

4. ERGEBNISSE 79

4.1 Die Expression und Aktivität von Met in WAP-T Mammakarzinomen 79

4.1.1 Validierung der Microarray-Daten der Met-Signaturgene durch qRT-PCR 79

4.1.2 Analyse der Gen-Expression von Hgf in *low*- und *high-grade* WAP-T Tumoren 81

4.1.3 Vergleichende Analyse der Proteinexpression von Met und dessen Aktivität in WAP-T Tumoren und normalem Mammagewebe 81

4.2 Die Expression und Aktivität von Met in WAP-T Zelllinien 83

4.2.1 Analyse der Hgf-induzierten Met Aktivität in G-2C9 Zellen 85

4.2.2 Sequenzierung von Met cDNA Fragmenten aus WAP-T Tumoren und G-2C9 Zellen 87

4.3 Analyse der Met-Expression in den G-2C9 Subpopulationen 87

4.3.1 Expressionsanalyse der Met^+ und Met^- Subpopulationen mittels qRT-PCR 88

4.3.2 Vergleichende Expressionsanalyse von Met und Thy1 in den G-2C9 Subpopulationen 90

4.4 Analyse des Differenzierungspotentials der Met^+ und Met^- Subpopulationen 94

4.4.1 Repopulationsstudien der Met^+ und Met^- Subpopulationen 94

4.5 Die Rolle des Met-Liganden Hgf in G-2C9 Mammakarzinomzellen 97

4.5.1 Hgf-Proteinexpression und Verteilung in der G-2C9 Gesamtkultur 97

4.5.2 Analyse der Expression von Hgf und Hgf-assoziierten Genen 99

4.5.3 Analyse der Met-Aktivität in getrennt kultivierten Met^+ und Met^- Zellen 102

4.6 Unterbrechung des Met-Signalweges und dessen biologische Effekte 105

4.6.1 Etablierung einer stabilen G-2C9 Zellkultur mit shRNA vermitteltem Met-*knockdown* 105

4.6.2 Analyse der Met-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Met-TKD-Inhibitor PHA-665752 108

4.6.3 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Proliferation der G-2C9 Zellen 110

4.6.4 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die in vitro Tumorigenität der G-2C9 Zellen 112

4.6.5 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Migrationsfähigkeit von G-2C9 Zellen 114

4.7 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Subpopulationen der G-2C9 Zellkultur 121

4.7.1 Expression von epithelialen und mesenchymalen Markergenen nach Met-Inhibition und shRNA-vermittelten Met-*knockdown* 122

4.7.2 Einfluss der pharmakologischen Met-Inhibition und der shRNA vermittelten Met-Reduktion auf die Expression von Hgf 124

4.7.3 Beeinflussung des Met-Umsatzes durch die pharmakologische Inhibition der Met-Aktivität 126

4.8 Analyse der Met-Signaturgene in G-2C9 Zellen 129

4.8.1 Vergleichende Expressionsanalyse der Met-Signaturgene in Met^+ und Met^- Subpopulationen 129

4.8.2 Einfluss der pharmakologischen Met-Inhibition und der shRNA vermittelten Met-Reduktion auf die Expression der Met-Signaturgene 130

4.8.3 Regulation des Rbp7 Proteins in Abhängigkeit der Met-Aktivität 132

4.9 Met- und Retinsäure-Signalwege: additive, kooperative oder autarke Signalwege in G-2C9 Zellen? 133

4.9.1 Vergleichende Expressionsanalyse von RA-Signalweg assoziierten Genen 135

4.9.2 Vergleichende Analyse der biologischen Effekte von PHA-665752, RA oder kombinierter Applikation in G-2C9 Zellen 136

4.9.3 Vergleichende Analyse der biologischen Effekte von PHA-665752, RA oder kombinierter Applikation nach Langzeit Exposition 140

5. DISKUSSION 143

5.1 Met ist in *high-grade* WAP-T Mammakarzinomen überexprimiert und aktiv 143

5.2 G-2C9 Zellen liefern ein Modell zur Analyse des Met-Signalweges 144

5.3 Met spielt eine Rolle in der Differenzierung von G-2C9 Mammakarzinomzellen 145

5.4 Met und Hgf werden in verschiedenen Zellen der G-2C9 Mammakarzinomzellen exprimiert 148

5.5 Met beeinflusst die Kontaktinhibition in G-2C9 Zellen und unterstützt dadurch deren Proliferation und verankerungsunabhängiges Wachstum 152

5.6 Die Aktivität und Lokalisation von Met beeinflusst das Migrationsverhalten der G-2C9 Zellen 153

5.7 Rbp7 als Bindeglied zwischen dem Met- und Retinsäuresignalweg 156

5.8 Ausblick 162

6. LITERATURVERZEICHNIS 164

7.ANHANG i

7.1 Abbildungsverzeichnis i

7.2 Tabellenverzeichnis iii

7. 3 Abkürzungen iv

7.4 Sicherheitstechnische Daten viii

7.4.1 Gefahrenstoffe viii

7.4.2 Liste der GHS-Kodierungen und der zugehörigen Piktogramme x

7.4.3 Verzeichnis der H- und P-Sätze xi

7.4.3.1 H-Sätze (*hazard statemts*) xi

7.4.3.2 P-Sätze (*precautionary statements*) xii

7.5 Protein-Alignment der Sequenzierungen der TKD, JMD und SEMD xiii

LEBENSLAUF xiv

DANKSAGUNG xv

ZUSAMMENFASSUNG

Brustkrebs ist die am weitesten verbreitete Krebserkrankung innerhalb der weiblichen Weltbevölkerung und die am häufigsten zum Tode führende Krebsart dieser Bevölkerungsgruppe. Die Ursache für die hohe Sterblichkeit der Brustkrebspatientinnen ist jedoch nicht die primäre Läsion, sondern deren Fähigkeit zum invasiven Wachstum, in der das hohe Metastasierungspotential einiger Brustkrebsarten begründet ist. Voraussetzung für ein invasives Wachstum von Tumorzellen ist die Transition der epithelialen Zellen des Primärtumors in bewegliche, in das umliegende Gewebe einwandernde Zellen mit mesenchymalem Phänotyp (EMT). Neueste Studien brachten die Fähigkeit zur Veränderung einer epithelialen Zelle hin zu einem mesenchymalen Differenzierungszustand und zurück (EMT-MET), mit Stammzelleigenschaften, wie z.B. einem hohen Differenzierungspotential und einer erhöhten Lebensdauer sowie der Anreicherung aggressiver, Tumor-initiierender Zellen in Verbindung.

Ein in den letzten zehn Jahren im Fokus der Forschung stehendes Protein, das als Angriffspunkt für neue Therapien der aggressivsten und am schlechtesten therapierbaren Brustkrebsarten dienen könnte, ist die Rezeptortyrosinkinase Met. Eine gesteigerte Met-Expression ist in 15-20% aller humanen Mammakarzinome zu finden und geht immer mit einer schlechten Prognose einher. Die Rezeptortyrosinkinase Met gilt als einer der entscheidenden Induktoren von invasivem Wachstum und EMT und beeinflusst damit die Aggressivität dieser Tumoren grundlegend. Trotz intensiver Studien von Met und dessen zellulärer Signalnetzwerke konnte die Rolle von Met in der Entstehung, Progression und Differenzierung von Mammakarzinomen aufgrund fehlender, die *in vivo* Situation humaner Mammakarzinome repräsentierender Zellkulturmodelle, bisher nicht ausreichend geklärt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten, murinen Mammakarzinomzellen der G-2C9 Kultur spiegeln die phänotypische Heterogenität primärer, in ihrem Aufbau humanen, basalen Mammakarzinomen ähnelnder Tumoren wider und weisen ausgeprägte tumorinitiierende Eigenschaften sowie Eigenschaften von Stamm- bzw. Tumorstammzellen auf. Die Kultur setzt sich aus distinkten, unterschiedlich differenzierten Subpopulationen zusammen, welche in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage sind, durch EMT- und MET-Prozesse die Heterogenität der Kultur und somit die Homöostase des Tumorzellsystem aufrecht zu erhalten.

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit lagen darin, den Einfluss der Met-Expression und Aktivität auf die Differenzierung muriner WAP-T Mammakarzinomzellen zu ermitteln, die G-2C9 Zellkultur als Modellsystem für die prä-klinische Analyse Met-abhängiger Signalwege zu

etablieren und durch die Identifizierung neuer Met-*Downstream-Targets* den Met-Signalweg weiter zu entschlüsseln.

In dieser Arbeit konnte die Rolle der Rezeptortyrosinkinase Met an der Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichtes zwischen epithelialen und mesenchymalen Differenzierungszuständen der G-2C9 Zellen gezeigt werden. Hierzu wurde zunächst die Expression und Funktionalität von Met *in vitro* überprüft, dessen Verteilung in den Subpopulationen der G-2C9 Kultur analysiert sowie der Einfluss von Met auf Proliferation, Differenzierung und Motilität der Zellen mittels Met-Inhibition, Met-Proteinexpressions abhängiger Zellsortierung und shRNA vermitteltem Met-*knockdown* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass erstens, Met primär in epithelial differenzierten Zellen exprimiert wird und zweitens, die Inhibition des Met-Signalweges zu einem Verlust des homöostatischen Gleichgewichtes zwischen den Differenzierungszuständen führt. Somit führte die Inhibition von Met zu einer Vereinheitlichung des Differenzierungszustands der Zellen in der G-2C9 Kultur über die Selektion quasi-mesenchymaler Zellen.

Im Zuge der Aktivitätsanalyse des Rezeptors konnte ebenfalls die Expression des Met-Liganden Hgf innerhalb der G-2C9 Zellkultur festgestellt werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass zum einen Met und Hgf innerhalb einer Zellkultur exprimiert werden und zum anderen die Expression von Met und Hgf auf verschiedene Differenzierungszustände beschränkt ist.

Parallel führte die Analyse einer Gruppe von in *high-grade* WAP-T Tumoren mit Met ko-expremierter Gene zur Identifikation des Retinolbindeproteins Rbp7 als neuem *Downstream-Target* des Met-Signalweges. Es konnte gezeigt werden, dass die *Rbp7*-Expression von einem intakten Met-Signalweg abhängt. Dieser beeinflusst ebenfalls das Gleichgewicht zwischen den vorliegenden Retinoidbindeproteinen und damit direkt den Retinsäuremetabolismus der Zelle. Hierdurch konnte eine neue Verbindung zwischen dem Met- und Retinsäuresignalweg in G-2C9 Mammakarzinomzellen geknüpft werden, welche die Basis für weitere Analysen liefert.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most widespread diseases in women worldwide, particularly in western countries. Breast cancer is also the most frequent cause of cancer death in the female population. The reason for this high mortality rate is not the primary lesion itself, but the ability of the tumors to grow invasively, which is connected to a high metastatic potential of some subtypes of breast cancer. A prerequisite for invasive growth of tumor cells is the transition of tumor cells from an epithelial to mesenchymal differentiation state (EMT) which endows cells with the ability to invade into the surrounding tissue, disseminate and metastasize. Recent publications connected the ability of cells to undergo a bidirectional transition between epithelial and mesenchymal differentiation states (EMT-MET) to acquisition of stem cell properties featured by a high differentiation potential and longer survival, and thereby correlating EMT-MET processes with the enrichment of highly aggressive, tumor-initiating cells.

In the past years, scientific research has drawn interest in the Met receptor tyrosine kinase as a suitable target for the most aggressive and hence most difficult to treat subtypes of breast cancer. 15-20% of all human breast cancers show an elevated expression of the Met protein, connected with a poor clinical outcome. A large number of clinical studies established a strong relationship between Met-pathway hyperactivation and tumor progression. Met is one of the major inductors of invasive growth and promotes EMT, thus enhancing tumor aggressiveness. In spite of the intensive research on Met and its cellular signaling network, the role of Met in tumor initiation, progression and differentiation is not fully understood. This is due to a lack of suitable *in vitro* models reflecting the *in vivo* situation of human basal-like breast cancer.

The WAP-T tumor derived mouse G-2C9 cell culture model analyzed in this study is a highly tumorigenic mammary carcinoma cell line displaying stem-like traits and features of epithelial and mesenchymal differentiation. G-2C9 cells are closely related to primary tumors reflecting their heterogeneity and gene expression profiles. The G-2C9 cell culture comprises cell populations of distinct differentiation states ranging from quasi-epithelial to quasi-mesenchymal phenotypes and constitutes a homeostatic, self-reproducing cancer cell system, maintained by a bidirectional conversion of the cellular subsets.

The aim of this study was (i) to test the applicability of the G-2C9 cell line as a suitable model for pre-clinical research on Met-signaling, (ii) to analyze the influence of Met-expression and activity on the differentiation of mouse G-2C9 mammary carcinoma cells; and (iii) to identify new Met downstream targets to further decipher the Met-signaling pathway in breast cancer cells.

In this study emphasis was on characterization of Met activity as well as on studying the cellular distribution of Met protein expression and on exploring the role of Met in maintaining the homeostatic balance between epithelial and mesenchymal differentiation states. The influence of Met on proliferation, migration and differentiation was investigated in Met inhibitor treated, FACS-sorted Met-positive and Met-negative G-2C9 subpopulations as well as in Met-shRNA expressing cells. It could be shown that the expression of Met is restricted to the subpopulation featured by an epithelial differentiation state, and that inhibiting Met-signaling facilitated the acquisition of a mesenchymal differentiation state. In addition to the differential expression of the Met receptor, the expression of its ligand Hgf could also be detected within the G-2C9 cells. Interestingly, the expression of Hgf was restricted to cells of a quasi-mesenchymal differentiation state, implying a paracrine activation loop between the subpopulations within the cell culture.

Simultaneous analysis of a group of genes, co-expressed with Met in high-grade WAP-T tumors identified the retinol-binding protein Rbp7 as a new downstream-target of the Met-signaling-pathway. Furthermore, Rbp7-expression is dependent on an intact Met-signaling as well as the balance between the expressed retinoid-binding proteins, thus directly affecting the retinoic acid metabolism within the cell. These data highlight a link between the Met- and the retinoic acid pathway in G-2C9 cells, providing a platform for further experimental analysis.

1. EINLEITUNG

Krebs stellt nicht nur in den hochentwickelten Industrienationen der westlichen Welt eine der am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten dar, sondern gilt auch weltweit als eine der führenden Todesarten mit bis zu 8 Millionen Opfern pro Jahr (WHO, 2008). Laut Prognosen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird ein Anstieg der Todesrate bis zum Jahr 2030 auf über 11 Millionen Menschen jährlich erwartet.

Eine der weit verbreitetesten Krebsarten ist Brustkrebs. Brustkrebs steht nicht nur mit ca. 1,5 Millionen Betroffenen an erster Stelle der Krebserkrankungen innerhalb der weiblichen Weltbevölkerung, sondern stellt auch die Krebsart mit der höchsten Sterblichkeitsrate innerhalb dieser Gruppe dar. In Deutschland erkranken jährlich um die 57.000 Frauen an Brustkrebs; demzufolge erkrankt ca. jede zehnte Frau einmal innerhalb ihres Lebens. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter der Frauen bei 63 und somit sechs Jahre, unter dem mittleren Erkrankungsalter der meisten anderen Krebsarten (Gesundheitsberichterstattung des Bundes1990-2010). Ein Drittel der weltweit durch Brustkrebs verursachten Todesfälle, das entspricht 150.000 Menschen pro Jahr, hätte durch frühere Diagnosen und effizientere medizinische Behandlungen verhindert werden können (Danaei et al., 2005). Neben einer verbesserten Diagnose ist die Erforschung der zellulären und biochemischen Eigenschaften bzw. der Signalwege, die zur Entwicklung und Progression von Brusttumoren führen, für deren eindeutige Klassifizierung und somit zielgerichteten Behandlung unabdingbar. Das übergeordnete Ziel der Tumorforschung liegt in der Entwicklung personalisierter Therapien durch die Analyse neuer, das Signalnetzwerk der Tumorzelle beeinflussender, zellulärer Angriffspunkte. Ein in den letzten zehn Jahren in den Fokus der Forschung geratenes Protein, welches als Angriffspunkt für eine der aggressivsten und am schlechtesten therapierbaren Brustkrebsarten das Interesse der Wissenschaft geweckt hat, ist die Rezeptortyrosinkinase Met. Met ist einer der entscheidenden Induktoren des invasiven Wachstums von Tumoren und beeinflusst zahlreiche Prozesse und Signalwege, welche sich maßgeblich auf die Prognose des Patienten auswirken. Grundlage für die Entwicklung erfolgreicher Therapien ist es, die zellulären und biochemischen Veränderungen innerhalb eines hoch komplexen Tumorsystems zu kennen. Hier liefern Tiermodelle und auf ihnen basierende Zellkultursysteme ein zeitsparendes und praktisches Werkzeug für die detaillierte Analyse und Manipulation von Tumorzellsystemen bei gleichzeitig hoher Übertragbarkeit auf die humane Situation.

1.1 Das WAP-T Mausmodell zur Analyse des Mammakarzinoms

Im Jahre 1906 entwickelte Hugo Apolant mit seinem ausführlichen Bericht über epitheliale Spontantumoren der murinen Brust und deren Metastasierung ins Lungengewebe die Grundlage für die Erforschung spontaner und induzierter Brusttumoren an Inzuchtmausstämmen (Apolant, 1906). Zu Beginn der achtziger Jahre wurden diese Arbeiten zum Grundstein der Entwicklung erster transgener Mausmodelle in denen entweder Gene gezielt ausgeschaltet (konditioneller *knockout*) oder regulatorische Gene unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren eingebracht werden konnten (Cardiff and Kenney, 2007). Die grundlegende Strategie transgener Mausmodelle basiert auf der gewebespezifischen Expression, sog. Onkogene oder viraler Genome bzw. dem Ausschalten Tumor-supprimierender Gene zur Analyse der durch diese Manipulationen induzierten Tumorigenese.

Eines dieser Mausmodelle ist das WAP-T Mausmodell (Schulze-Garg et al., 2000). Dieses Modell wurde zur Analyse der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms entwickelt. WAP-T Mäuse exprimieren die frühe Genregion des Simian 40 Virus (SV40) unter Kontrolle des gewebespezifischen *WAP*-Promotors (WAP: *Whey Acidic Protein)*. Der *WAP*-Promotor wird während der späten Schwangerschaft und Laktation durch laktotrophe Hormone in Mammaepithelzellen aktiviert (Robinson et al., 1995). Das *Wap*-Gen kodiert ein sekretiertes Protein mit Proteinase-hemmender Aktivität aber zurzeit noch nicht geklärter biologischer Funktion (Nukumi et al., 2007), (Triplett et al., 2005). *Wap* gehört neben den *β-casein* und *α-lactalbumin*-kodierenden Genen zu einer Gruppe hormonell regulierter Gene die spezifisch in den Brustepithelzellen während einer Schwangerschaft (Robinson et al., 1995) bzw. in der Östrus-Phase des Sexualzyklus nulliparer Tiere (Kordon et al., 1995; Robinson et al., 1996) transkriptionell aktiviert werden. Die hormonelle Aktivierung des Promotors führt zur Expression der frühen SV40-Genregion (Pipas, 2009; Schulze-Garg et al., 2000) und damit zur Expression des großen (T) und kleinen (t) Antigens sowie des 14kT Proteins (Ahuja et al., 2005; Pipas, 2009).

Während das große T-Antigen (*large T*, LT) in der Lage ist, einen Komplex mit den Tumorsuppressoren p53 und pRB zu bilden und diese dadurch funktionell zu eliminieren (Ahuja et al., 2005; Pipas, 2009), inhibiert bzw. verändert das kleine t-Antigen die Funktion der Proteinphosphatase 2A (Sablina and Hahn, 2008). Die Wechselwirkung des großen T-Antigens mit p53 führt durch die Begünstigung genetischer Veränderungen in Form von Aneuploidie (Li et al., 2009) zur Entstehung von multiplen intraepithelialen Neoplasien der terminalen Milchgänge

und der Drüsenendstücke (Schulze-Garg et al., 2000). Diese Neoplasien weisen in ihrer Genese und Morphologie große Ähnlichkeit mit dem beim Menschen häufig anzutreffenden duktalen Karzinomen *in situ* (DCIS) auf. Wenige dieser DCIS entwickeln sich in Richtung invasiv wachsender Karzinome unterschiedlicher Differenzierungsstadien. Molekulare, Spezies-übergreifende Analysen verschiedener humaner und muriner Datensätze konnten die Tumoren des WAP-T Modells einer Gruppe in ihrer Entstehung und ihrem Aufbau invasiven, basalen menschlichen Brusttumoren stark ähnelnden Tumoren zuordnen (Otto et al., eingereicht)
Die histologische Klassifizierung von WAP-T Tumoren führt zur Unterteilung der Tumoren in zwei sich unterscheidende Gruppen von Adenokarzinomen: Zum einen die *low-grade* Tumoren, die sich durch eine stark differenzierte Tumormasse auszeichnen und zum anderen die *high-grade* Tumoren, die demgegenüber einen deutlich schwächer differenzierten Phänotyp zeigen. Vorangegangene Arbeiten zur SV40 induzierten Tumorigenese und Progression von Mammakarzinomen, die in der Abteilung für Tumorvirologie von Herrn Prof. Deppert durchgeführt wurden, konnten die Ausprägung eines undifferenzierten Phänotyps mit einer Amplifikation des *Met*-Lokus in Verbindung bringen. So konnten durch bioinformatische Analysen eines *Array-CGHs* aus 25 *low*- und *high-grade* Tumoren chromosomale Abberationen untersucht und eine Amplifikation der *Met*-Lokus umfassenden 6qA2 Region primär in undifferenzierten *high-grade* Tumoren festgestellt werden. Vergleichende Studien zwischen der Amplifikation des *Met*-Lokus und *Array*-basierten Expressionsprofilen verbinden die *Met*-Lokusamplifikation mit einer einhergehenden Überexpression des *Met*-Transkripts in *high-grade* Tumoren (Otto et al., eingereicht). Aufgrund der eingeschränkten, experimentellen Möglichkeiten, molekulare Mechanismen in Primärtumoren zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Deppert eine aus einem undifferenzierten WAP-T Tumor gewonnene Primärzelllinie etabliert (Wegwitz et al., 2010).

1.2 Das WAP-T Zellkulturmodell

Die aus einem undifferenzierten Mammakarzinom einer transgenen WAP-T Maus etablierte, klonale, Stammzelleigenschaften aufweisende und hoch-tumorigene Zelllinie G-2 ist aufgrund ihrer histologischen und molekularbiologischen Ähnlichkeiten zu den Primärtumoren das ideale Modell zur Analyse der tumoreigenen Signalnetzwerke (Wegwitz et al., 2010). Die G-2 Zellkultur bildet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Subpopulationen verschieden differenzierter Zellen aus und spiegelt so in hohem Maße die Heterogenität der primären Tumoren wieder. Die

Subpopulationen der verschiedenen Differenzierungszustände lassen sich durch die Ko-Expression spezifischer zytoskelettaler Proteine, Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren identifizieren. Die Zellen der G-2 Kultur lassen sich in drei unterschiedliche Populationen unterteilen: (i) die quasi-epithelial differenzierte Subpopulation, (ii) die quasi-mesenchymal differenzierte Subpopulation und (iii) eine intermediäre Subpopulation, deren Zellen sich in einem Übergangszustand befinden (siehe Abbildung 1).

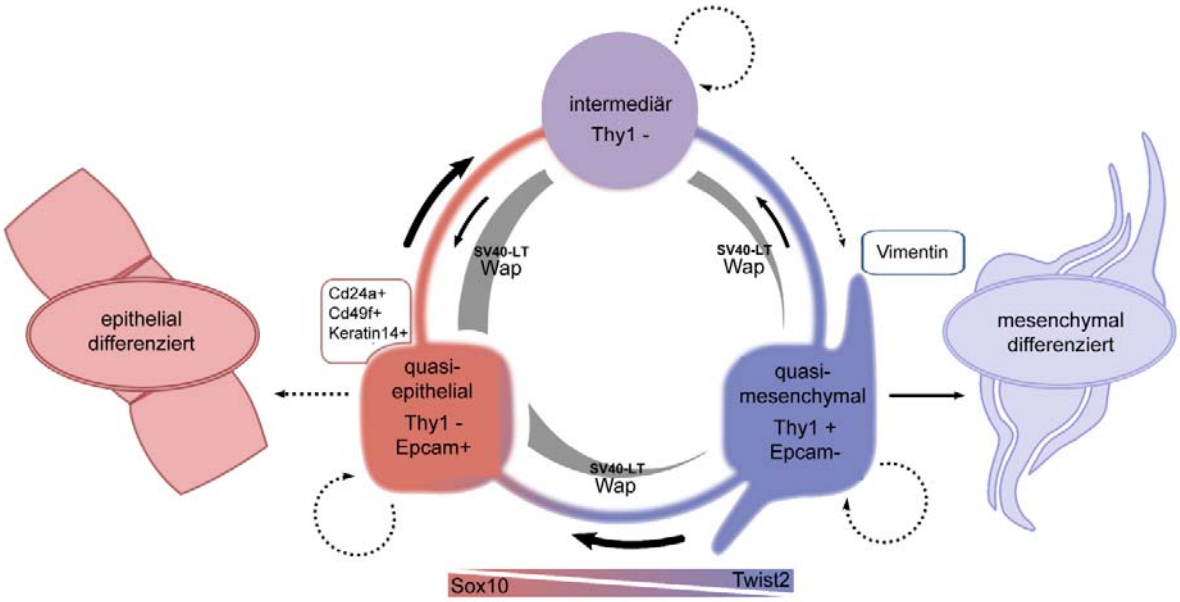


Abbildung 1: Schematische Übersicht über das G-2 Zellkultur-System.

Das G-2 Zellkultur-System (*cancer cell system* = CCS) setzt sich aus den Subpopulationen dreier verschiedener Differenzierungsstadien zusammen: dem quasi-epithelialen Differenzierungsstadium, dem quasi-mesenchymalen Differenzierungsstadium und einem intermediären Übergangsstadium. Die Zellen jedes Stadiums sind in der Lage, durch expressionelle Veränderungen in Abhängigkeit verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sox10 und Twist2 in einen der anderen Differenzierungszustände überzugehen. Die einzelnen Differenzierungsstadien sind durch die Expression bestimmter Marker wie z.B. CD24a, CD49f, Keratin 14 und Epcam für die quasi-epitheliale Subpopulation sowie Vimentin und Thy1 für die quasi-mesenchymale Subpopulation charakterisiert. Das Transgen SV40-LT steht unter Kontrolle des mammaspezifischen Wap-Promotors, dessen Aktivität wiederum von epithelialen Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Demzufolge führt die Reduktion epithelialer Transkriptionsfaktoren zu einer reduzierten Wap-Aktivität und damit zu einer verminderten SV40-LT Expression und einer abschließenden, irreversiblen mesenchymalen Differenzierung. Eine irreversible epitheliale Differenzierung wird gleichermaßen postuliert. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Konvertierbarkeit der einzelnen Differenzierungsstadien ineinander, wobei die Dicke der Pfeile die entsprechende Häufigkeit des Ereignisses darstellt. Demzufolge ist die Re-Differenzierung von einem quasi-epithelialen in einen quasi-mesenchymalen Differenzierungszustand ein seltener bzw. umgekehrt ein häufiger Effekt. Modifiziert nach (Wegwitz et al., 2010)

Die einzelnen Populationen sind unter anderem durch die Expression bestimmter mesenchymaler und epithelialer Marker charakterisiert. Zu der Gruppe der mesenchymalen Marker zählen (i) Vimentin, ein Intermediärfilamentprotein und etablierter Marker für eine mesenchymale Differenzierung und epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) (Thompson et al., 2005; Zeisberg and Neilson, 2009), (ii) Sca1 (*stem cell antigen 1*), ein muriner Stammzellmarker (Vaillant et al., 2008), (iii) Twist2, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression weiterer mesenchymaler Gene veranlasst und eine unterstützende Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen spielt (Ansieau et al., 2008) sowie (iv) Thy1 (*Thymus Zell Antigen 1*, CD90.2), ein wichtiger Oberflächenmarker für myoepitheliale Zellen und Fibroblasten, der für die Erhaltung des Stammzellsystems der G-2 Zellkultur relevant ist. Thy1 wird sowohl in der Adhäsionsfähigkeit von Zellen als auch bei der Extravasationsfähigkeit (die Fähigkeit von Zellen zur Einwanderung in Gewebe) von Leukozyten während einer bestehenden Entzündung eine entscheidende Rolle zugeordnet (Schubert et al., 2011). Für $Thy1^{+}/CD24a^{+}$, aus MMTV-Wnt-1 Mammakarzinomen isolierten Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaften von Tumor-initiierenden Zellen aufweisen (Cho et al., 2008). Ausführliche Analysen der $Thy1^{+}$, aber $CD24a^{-}$ Zellen in der G-2 Kultur brachten die Thy1-Expression mit einer quasi-mesenchymalen Differenzierung und Eigenschaften von Tumorstammzellen, wie z.B. einer ausgeprägten Selbsterneuerung und phänotypischen Plastizität in Verbindung (Wegwitz et al., 2010).

Zur Gruppe der epithelialen Marker zählen Epcam (*epithelial cell adhesions molecule*), einer der am häufigsten verwendeten Marker für Epithelzellen (Al-Hajj et al., 2003; Stingl et al., 2005) sowie das Intermediärfilamentprotein Keratin 14, dessen Expression auf die Bereiche des basal- bzw. myoepithelialen-Kompartiments beschränkt ist. Ein weiterer Marker ist der Transkriptionsfaktor Sox10, welcher eine reprimierende Wirkung auf *Twist2* besitzt (Wegwitz et al., 2010). Einhergehend mit der Expression von Epcam konnte eine Ko-Expression der beiden Marker CD24a und CD49f (Integrin alpha 6) im quasi-epithelialen Subkompartiment der G-2 Zellkultur festgestellt werden. Weiterhin konnte eine stärkere Expression des brustdrüsenspezifischen *Wap*-Gens und des unter der Kontrolle des WAP-Promotors stehenden Transgens SV40-LT-Antigen in den quasi-epithelial differenzierten Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 1).

Die ausgesprochene Besonderheit der G-2 Zellkultur ist die Aufrechterhaltung eines homöostatischen Gleichgewichts zwischen den Subpopulationen verschiedener Differenzierungsstadien. So ist jede Subpopulation - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß -

in der Lage, durch die epithelial-mesenchymale bzw. mesenchymal-epitheliale Transition (EMT-MET) das Gleichgewicht zwischen den Populationen zu erhalten.

1.3 Einordnung des G-2 Zellkulturmodells in bekannte Tumormodelle-hierarchisches Stammzellmodell versus phänotypischer Plastizität

Zurzeit gibt es verschiedene Theorien über die Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren bzw. die Entstehung von Metastasen und sekundären Tumoren. Das Tumorstammzellmodell (TSZ) geht von einer hierarchischen Organisation des Tumorgewebes aus, wobei der Ursprung der gesamten Tumormasse in einigen wenigen Stamm- bzw. Progenitor-ähnlichen Zellen liegt. Die eigentliche Tumormasse bilden differenzierte Zellen, die sich von den Tumorstammzellen ableiten (Dick, 2008; Ward and Dirks, 2007). Diese sog. Tumorstammzellen oder Tumor-initiierenden Zellen können durch eine Kombination verschiedenster Oberflächenmarker in unterschiedlichen Geweben identifiziert werden (Lobo et al., 2007) und werden aufgrund ihrer Chemo- und Strahlenresistenz für das Wiederauftreten der Tumorerkrankung nach beendeter Therapie verantwortlich gemacht. Die Erkenntnis, dass ein signifikanter Anteil der Tumorzellen in Transplantationsstudien Tumor-initiierende Eigenschaften zeigte, stellt die Existenz dieser strikt gegliederten Organisation sowie die Existenz einer nur kleinen Population an Tumor-initiierenden Zellen in Frage (Shackleton et al., 2009).

Im Gegensatz zur hierarchischen Organisation im TSZ-Modell setzt das Plastizitäts-Modell eine phänotypische Plastizität der Tumorzellen voraus. Diese wird durch Wechselwirkungen der Tumorzellen untereinander, sog. *feedback*-Kontrollmechanismen, beeinflusst und aufrecht erhalten (Lander, 2009). So bildet vielmehr die Gesamtheit der Tumorzellen ein den Tumor erhaltendes Tumorstammzell-System (TSZS) als die differenzierten Nachkommen einer kleinen Gruppe von Tumorstammzellen. Die Zusammensetzung dieses TSZS wird durch geregelte Transition verschiedener Differenzierungszustände untereinander aufrecht gehalten. Überträgt man dieses Model auf epitheliale Tumore, sog. Karzinome, so finden sich neben epithelial und mesenchymal differenzierten Zellen auch Zellen eines intermediären Übergangszustandes. Die Fähigkeit zur Veränderung einer epithelialen Zelle hin zu einem mesenchymalen Differenzierungszustand (EMT) oder die umgekehrte Transition (MET) konnte durch neueste Daten mit dem Besitz von Stammzelleigenschaften, wie z.B. einem hohen Differenzierungspotential und einer erhöhten Lebensdauer in Verbindung gebracht werden (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass die Induktion

einer EMT in humanen, epithelialen Brustkrebszellen zur Anreicherung von Tumor-initiierenden Zellen führte (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Diese mit sich selbst und mit dem ausdifferenzierten epithelialen Kompartiment des Tumors im Gleichgewicht stehende Subpopulation wäre in der Lage, die gesamte Heterogenität des Tumors zu regenerieren (Gupta et al., 2009). Dies ist jedoch nur unter der Voraussetzung eines flexiblen Genregulationsnetzwerkes denkbar, welches das Umschalten von einem spezifischen Signalweg eines Differenzierungszustandes hin zu einem anderen erlaubt (Huang, 2009). Die detaillierte Charakterisierung und Analyse der G-2 Zellen bestätigten zum einen deren hohe Tumorigenität - jede zehnte Zelle ist in der Lage in syngenen Mäusen einen Tumor zu induzieren - zum anderen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der G-2 Zellkultur um ein heterogenes, im Gleichgewicht stehendes Zellsystem handelt, deren verschieden differenzierte Subpopulationen durch EMT- und MET-Prozesse die gesamte zelluläre Vielfalt wiedererstellen können (Wegwitz et al., 2010). Dabei konnten die molekularen und biochemischen Prozesse und Signalwege die hinter den *feedback*-Kontrollmechanismen stehen und den Anstoß zur EMT/MET liefern, bislang nicht geklärt werden.

Aufgrund der eindeutigen Korrelation der *Met*-Expression mit dem Differenzierungszustand in WAP-T Tumoren und der Tatsache, das Met als Rezeptortyrosinkinase an der Modulation zellulärer Signalverarbeitungsprozesse sowie an der Induktion von EMT-Prozessen beteiligt ist, kann man annehmen, das ein konstitutiv aktiver Met-Signalweg einer der entscheidenden Faktoren zur Aufrechterhaltung des G-2 TSZS ist.

1.4 Die Rezeptortyrosinkinase Met

Rezeptortyrosinkinasen sind sog. „*single pass*“ Transmembranproteine die eine intrazelluläre Kinase-Domäne aufweisen und somit potente Signalmodulatoren zwischen Zelloberfläche und interner Signalverarbeitung darstellen. Voraussetzung für ihre Aktivierung ist die Bindung eines spezifischen Liganden, die Dimerisierung der Rezeptoren und die anschließende Aktivierung der Kinase-Domäne durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste. Zu der Gruppe der Rezeptortyrosinkinase gehören zahlreiche Hormon-, Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren, wie z.B. der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR), der Insulinrezeptor und der Rezeptor für den *hepatocyte growth factor* Hgfr oder Met.

Met fördert im Zuge der Embryonalentwicklung, der Wundheilung, der Organ-Homöostase und der Metastasierung von Tumoren die Umstrukturierung der betroffenen Gewebe durch die

gesteuerte Beeinflussung von Proliferation, Migration und Lebensdauer der Zellen als Antwort auf externe Signale der Umgebung oder interne Reize fehlgesteuerter, zellulärer Signalwege. Die Vielseitigkeit der Met-vermittelten biologischen Antworten wird durch qualitative und quantitative Signalmodulationen aufrecht erhalten. Qualitative Mechanismen umfassen dabei eine Vielzahl untergeordneter Signalproteine sowie die subzelluläre Bereichsbildung des Met-Signalweges, also die Lokalisation und Zugänglichkeit des Rezeptors innerhalb der Zellmembran bzw. Organellen. Dagegen beinhalten quantitative Mechanismen die Wechselwirkung des Rezeptors mit signalverstärkenden Adapterproteinen, bzw. die Degradation des Rezeptors durch Abspaltung der extrazellulären Domäne oder durch intrazelluläre Ubiquitinierung. Die kontrollierte Aktivierung des Met-Signalweges könnte demzufolge in der regenerativen Medizin von Vorteil sein, wohingegen die Inhibition des Met-Signalweges zu einer Verminderung des Tumorwachstums führen könnte.

1.4.1 Grundlegende Prinzipien der Met-Aktivierung

Die Biochemie des Met-Signalweges vereint zahlreiche Met-spezifische Signalwege und nur eine geringe Anzahl an allgemeingültigen, auf andere Rezeptortyrosinkinasen zutreffenden Gesetzmäßigkeiten.

Die Rezeptortyrosinkinase Met wird als einkettiges Vorläuferprotein exprimiert und post-translationell durch die Proproteinkonvertase Furin zwischen den Aminosäuren 307 und 308 gespalten. Der reife Rezeptor besteht aus einer die Membran durchspannenden β-Kette und einer extrazellulären α-Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die extrazelluläre Region des Met-Rezeptors beinhaltet drei funktionelle Domänen: (i) Die Sema-Domäne, welche eine hohe Homologie zu den entsprechenden Domänen der Semaphorine und Plexine zeigt und aus den ersten 500 Aminosäuren des N-Terminus der gesamten α- und Teilen der β-Kette besteht, (ii) die 50 Aminosäuren umfassende PSI-Domäne (**P**lexin, **S**emaphorin, **I**ntegrin =PSI), und (iii) die aus vier IPT-Domänen (***i**mmunglobuline-like fold shared by **p**lexins and **t**ranscription factors*) bestehenden restlichen 400 Aminosäuren, welche die extrazellulären Domänen mit der Membran-durchspannenden Helix verbinden (zusammengefasst in (Trusolino et al., 2010)).

Der intrazelluläre Teil des Rezeptors enthält ebenfalls drei wichtige regulatorische Bereiche, (i) die Juxtamembran-Domäne, die zur Herunterregulation der Kinase-Aktivität nach Phosphorylierung des Serins 975 (Gandino et al., 1994) und zur Rekrutierung der Ubiquitinligase

Cbl (*casitas B-lineage lymphoma* eine E3 Ubiquitinprotein-Ligase) nach Phosphorylierung des Tyrosins 1003 beim Menschen bzw. Tyrosin 1001 bei der Maus führen kann (Peschard et al., 2001), (ii) die katalytische Tyrosinkinase-Domäne, die nach Aktivierung zur trans-Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste Tyr1234 und Tyr1235 beim Menschen bzw. Tyr1232 und Tyr1233 bei der Maus und damit zur Aktivierung der Kinase führt, und (iii) die als multifunktionelle Plattform für Adapterproteine fungierende carboxyterminale Multisubstrat-Bindungsstelle mit den zwei Protein-Andock-Stellen Tyr1349 und Tyr1356 beim Menschen bzw. Tyr1347 und Tyr1354 bei der Maus, die nach Phosphorylierung in der Lage sind, stromabwärts gelegene, SH2-Domänen (*Scr homology-2*) enthaltende Signalproteine zu rekrutieren (Ponzetto et al., 1994) (siehe Abbildung 2 A).

Der natürliche Ligand des Met-Rezeptors ist das Hgf-Protein (*hepatocyte growth factor*). Hgf wird vornehmlich von mesenchymalen Zellen exprimiert und wirkt parakrin auf die Met-exprimierenden Zellen meist epithelialer Herkunft (Sonnenberg et al., 1993). Hgf wird ebenfalls als inaktive Vorstufe exprimiert und sekretiert, so dass erst die Spaltung in funktionelles aus α- und β-Kette bestehendes, heterodimeres Hgf durch die extrazellulären Proteasen des perizellulären Raums das Hgf aktiviert (siehe Abbildung 2 B).

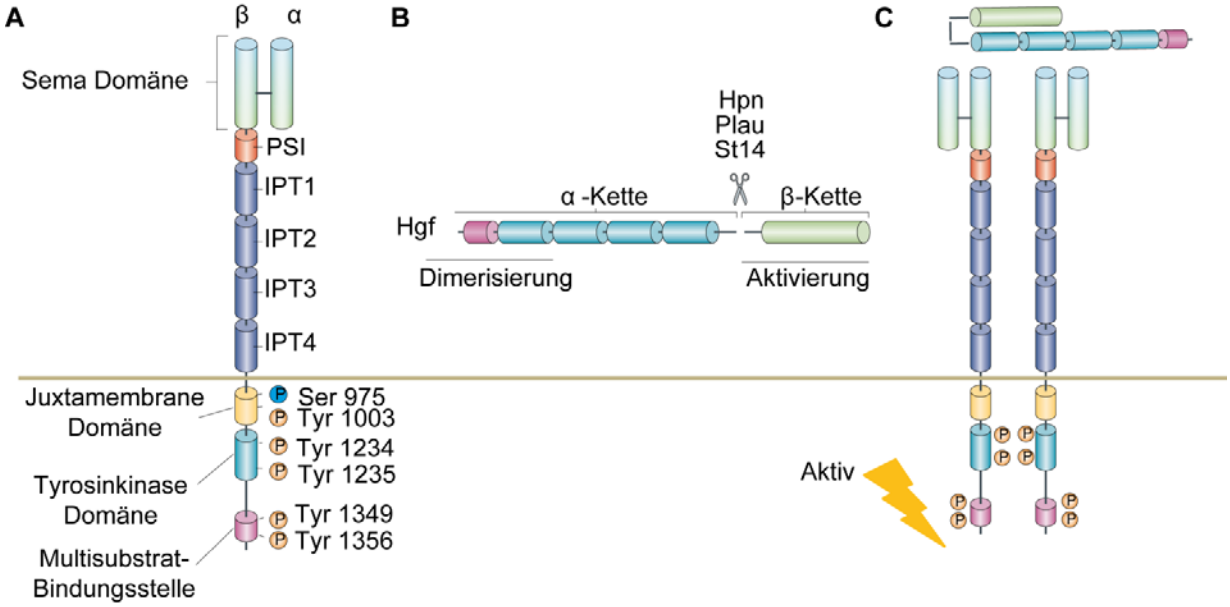


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Met-Rezeptors und seines Liganden Hgf und deren Interaktion.

(A) Met ist eine Rezeptortyrosinkinase die aus einer membrandurchspannenden β- und einer über eine Disulphidbrücke verbundene, extrazelluläre α-Kette besteht. Der extrazelluläre Teil besteht aus einer Sema-, einer PSI- und vier IPT-Domänen. Der intrazelluläre Teil aus der Juxtamembran- und der Tyrosinkinase-Domäne sowie der Multisubstrat-Bindungsstelle. (B) Pro-Hgf wird durch Spaltung in die Dimerisierungsdomäne tragende α- und die Aktivierungsdomäne tragende β-Kette mittels extrazellulärer Proteasen wie Hpn, Plau und St14 zu funktionellem Hgf prozessiert. (C) Die Bindung von Hgf führt zur

Dimerisierung des Met-Rezeptors und somit zur Aktivierung der Kinase-Domäne mit anschließender Phosphorylierung der Multisubstrat-Bindungsstelle und Aktivierung des Met-Signalweges. Modifiziert nach (Trusolino et al., 2010).

Wichtigster Vertreter der Hgf-prozessierenden Enzyme ist das Protein Matriptase/Epithin (St14) (Lee et al., 2009). Matriptase ist eine Typ-II Transmembran-Serin-Protease, die vornehmlich auf Epithelzellen exprimiert wird und eine entscheidende Rolle beim Wachstum und der Morphogenese von Epithelzellen der Mamma spielt (Lee et al., 2009). Durch Spaltung von Pro-Hgf zu funktionellem Hgf vermittelt die Serin-Protease St14 die bekannten Met-*Downstream*-Effekte wie z.B. Zell-Motilität, Differenzierung, Proliferation und Tubulogenese und spielt somit sowohl bei der Entwicklung des Mammagewebes also auch bei der Tumorentwicklung und Progression als Co-Aktivator des Met-Signalweges eine entscheidende Rolle. Hepsin (Hpn), eine weitere Typ-II-Transmembran-Serin-Protease, wurde ebenfalls mit der Aktivierung von funktionellem Hgf in Verbindung gebracht (Owen et al., 2009). Eine mögliche Rolle bei der Spaltung von pro-Hgf zu Hgf wurde dem Protein Plasminogen Aktivator/Urokinase (uPa/Plau) zugesprochen. Urokinase ist eine sekretierte, aber an der Oberfläche von Zellen gebundene Protease, die aufgrund verschiedenster Wechselwirkungen mit membrangebundenen Proteinen zur Degradation der extrazellulären Matrix sowie zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten beitragen kann und so die Zell-Migration bzw. Invasion innerhalb eines Gewebeverbandes begünstigt. Durch seine Matrix-degradierenden Eigenschaften kann die Urokinase entweder direkt oder über die Ausschüttung von Plasmin zur Freisetzung von Matrix-gebundenem Hgf und anderer Wachstumsfaktoren führen (Stepanova and Tkachuk, 2002).
Die Bindung von Hgf an Met führt über die Dimerisierung des Rezeptors zur Aktivierung der Kinase-Domäne und schlussendlich zur Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste (Tyr 1356 und Tyr 1349 beim Menschen, Tyr 1354 und Tyr 1347 bei der Maus) am carboxyterminalen Ende der β-Kette, welche die Rekrutierung zahlreicher Adapter-Proteine veranlassen (siehe Abbildung 2 C). Zusätzlich zu dieser grundlegenden Aktivierung des Met-Signalweges kann der Rezeptor selbst mit weiteren Ko-Rezeptoren und Signalmodulatoren wechselwirken und so sowohl die Dauer und Intensität als auch die Vielseitigkeit der Signalwege beeinflussen.

1.4.2 Wechselwirkung von Met mit Adapterproteinen

Zusätzlich zur Aktivierung der Met-Kinase-Aktivität durch Bindung seines Liganden Hgf kann der Rezeptor mit Met spezifischen Gerüstproteinen, mit transmembranen Proteinen, die den

Rezeptor mit dem Zytoskelett verbinden und mit strukturhomologen Ko-Rezeptoren wechselwirken (siehe Abbildung 3).

Die Multisubstrat-Bindungsstelle am C-terminalen Ende des Rezeptors ist in der Lage, eine Vielfalt an Proteinen zu rekrutieren. Dazu gehören verschiedene SH2-Domänen tragende Effektoren wie z.B. die Pi3-Kinase, die Tyrosinkinase Src, das Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundene Protein 2 (Grb2), Shc (SH2 *domain-containing transforming protein*), Shp2, Phospholypase Cγ1 und der Transkriptionsfaktor Stat3.

Eine der Besonderheiten und zugleich Schlüsselkomponenten des Met-Signalweges ist das Gab1-Multi-Adapter-Protein (*Grb2-associated binding protein1)* (siehe Abbildung 3 A). Dieses bietet nach der Phosphorylierung durch Met zusätzliche Bindungsstellen für Shc, Pi3k, Shp2, Crk, Phospholypase Cγ1 und p120 Ras-GTPase-aktivierendes Protein (p120-Ras-Gap). Die Bindung von Gab1 an das C-terminale Ende des Met-Rezeptors erfolgt dabei über zwei Arten. Zum einen direkt über eine einzigartige 13-Aminosäuren umfassende Met-Bindungsstelle (MBS) im Gab1-Protein und zum anderen indirekt über Met-gebundenes Grb2. Diese Verbindung ermöglicht es zahlreichen stromabwärts gelegenen Signalproteinen sich auf verschiedene Weise am Met-Signalweg zu beteiligen. Dies erfolgt entweder über direkte Interaktion mit dem Rezeptor bzw. Interaktionen über Gab1 oder beides. Der Phänotyp von Gab1 *knockout*-Mäusen spiegelt die phänotypischen Besonderheiten sowohl von Hgf- als auch Met-*knockout*-Tieren wider (Sachs et al., 2000).

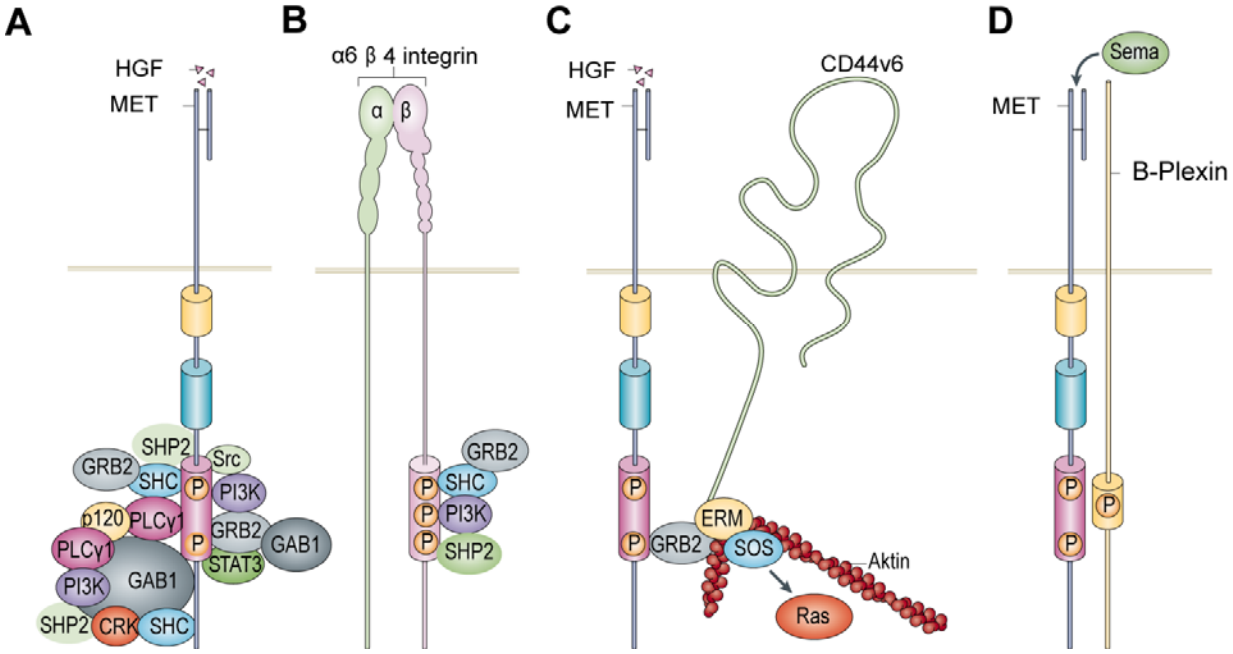


Abbildung 3: Wechselwirkungen von Met mit verschiedenen Adapterproteinen.

Die Bindung bzw. Assoziation von (A) Gab1 und (B) α6β4-Integrin mit dem Met-Rezeptor führt zur Etablierung zusätzlicher Bindungsstellen für weitere Adapterproteine, deren Rekrutierung die Intensivierung des Met-Signals zur Folge haben. (C) Die Interaktion von Met, Hgf und CD44v6 dient der vollständigen Aktivierung des Met-Rezeptors durch die Bildung eines ternären Komplexes sowie der Vernetzung zwischen Met und dem Aktin-Zytoskelett und dadurch der erleichterten Aktivierung von Ras. (D) Die Wechselwirkung zwischen Met und den durch Semaphorinen aktivierten Plexinen führt hingegen zur alleinigen, Hgf-unabhängigen Aktivierung des Met-Rezeptors. Modifiziert nach (Trusolino et al., 2010).

Neben Gab1 kann die Signalintensität in Tumoren noch zusätzliche durch Interaktionen von Met mit α6β4-Integrin erhöht werden. Die intrazelluläre β4-Kette bietet nach der Phosphorylierung durch aktives Met eine weitere Andock-Plattform für die Rekrutierung von Shc, Pi3k und Shp2 (Bertotti et al., 2005; Bertotti et al., 2006; Comoglio et al., 2003; Trusolino et al., 2001). α6β4-Integrin und Gab1 konzentrieren so signalgebende Proteine, die in Wechselwirkung mit den von Met selbst rekrutierten Proteinen treten und eine Amplifikation des vorhandenen Met-Signals sowie eine andauernde Aktivierung stromabwärts (*downstream*) gelegener Effektoren vermitteln (siehe Abbildung 3 B).

Ein weiteres mit Met kooperierendes Protein ist CD44 (Hyaluron-Rezeptor), ein transmembranes Adhäsionsmolekül, welches als Bindeglied zwischen extrazellulärer Matrix und dem Aktin-Zytoskelett fungiert (siehe Abbildung 3 C) (Ponta et al., 2003). Die Splicevariante 6 von CD44 (CD44v6) kann ebenfalls auf zweierlei Weisen mit dem Met-Rezeptor interagieren. So ist zum einen die extrazelluläre Domäne für die Ausbildung eines ternären Komplexes aus Met, CD44v6 und Hgf und der darauf folgenden Met-Aktivierung notwendig (Orian-Rousseau et al., 2002), zum anderen dient der zytoplasmatische Teil von CD44v6 zur Aktivierung von Ras durch Met (Hanai and Lin, 1990). Die intrazelluläre CD44v6-Domäne begünstigt die Bildung eines submembranösen Netzwerkes aus Met, Grb2, F-Aktin, Ezrin, Radixin und Moesin (ERM), die der Verbindung zwischen CD44v6 und den Aktin Mikrofilamenten dienen. Gleichzeitig wird die Verbindung zu dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos (*son of sevenless*), über den eine effiziente Aktivierung des Ras-Proteins erfolgt, begünstigt. Die Zusammenarbeit zwischen Met und CD44 führt also eher zur Rekrutierung weiterer Proteine und daher zu struktureller und topographischer Regulation innerhalb der Zellen als zur direkten Aktivierung weiterer Adapter-Proteine.

Eine Sonderstellung nimmt die Wechselwirkung zwischen Met und der Gruppe der Semaphorine und Plexine ein. Diese sind im Gegensatz zu den anderen Interaktionspartnern in der Lage, den Rezeptor völlig autonom, d.h. ohne die Anwesenheit von Hgf zu aktivieren. Bei Plexinen handelt

es sich um Rezeptoren deren Aktivierung durch Bindung von Semaphorinen veranlasst wird. Bei den von ihnen verursachten Effekten handelt es sich im Normalfall um eine Reduktion von Migration und Proliferation (Capparuccia and Tamagnone, 2009). Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen der Sema-Domäne von Met und der Klasse der B-Plexine sind diese in der Lage, mit Met zu oligomerisieren und die Kinase-Domäne nach Bindung von Semaphorin zu aktivieren (siehe Abbildung 3 D).

1.4.3 Die wichtigsten Met-abhängigen Signalwege

Met-abhängige Signale werden von der Oberfläche der Zelle über verschiedene Signalwege zum Kern weitergeleitet und resultieren dort in der veränderten Expression verschiedenster Zielgene. Während der in Abschnitt 1.4.2 beschriebene Rezeptor-assoziierte Signalapparat einzigartig für Met ist, gehören die von ihm stromabwärts aktivierten Proteine den klassischen von Rezeptortyrosinkinasen in Gang gesetzten Signalkaskaden an. Zu den wichtigsten von Met-aktivierten Signalwegen gehören der Mapk-Signalweg (Mapk: *mitogen-activated protein kinase),* der Pi3k-Akt Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinasen-Proteinkinase B), der Stat-Signalweg *(signal transducers and activators of transcription)* und der Nfκb–Signalweg *(nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*).

1.4.3.1 Der Mapk-Signalweg

Der Mapk-Signalweg umfasst mindestens drei in Reihe geschaltete Kinasen (Johnson and Lapadat, 2002) (siehe Abbildung 4). Die Mapk selbst lassen sich in drei Gruppen aufteilen: (i) Die extrazellulär regulierten Kinasen Erk1 und Erk2, (ii) die p38-mitogenaktivierten Kinasen und (iii) die c-Jun-N-terminalen Kinasen (Jnk), die jeweils über eigene Phosphorylierungskaskaden, die auch miteinander interagieren können, aktiviert werden. Met ist in der Lage, alle diese Signalwege zu aktivieren. Die Aktivierung von Erk1 bzw. Erk2 erfolgt über Ras, welches entweder über den direkt an Met oder indirekt über den durch gebundenes Shc aktivierten Grb2-Sos-Komplex aktiviert wird (Pelicci et al., 1995; Ponzetto et al., 1994). Alternativ kann Ras auch über die Tyrosinphosphatase Shp2 aktiviert werden. Diese dephosphoryliert die p120-Ras-Gap Bindungsstelle in Gab1, was dessen Rekrutierung und damit die Deaktivierung von Ras verhindert (Maroun et al., 2000; Montagner et al., 2005). Die aktive Form von Ras ist in der Lage, über die Interaktion mit Raf die mittleren Kinasen der Kaskade (Mek1 und Mek2) zu

aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von Erk1 und Erk2 führt. Diese wandern daraufhin in den Kern um dort verschiedene Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und zu stabilisieren. Diese spielen eine Rolle in der frühen Phase des G1- zu S-Überganges des Zellzyklus.

In einer von Met ausgehenden, aufeinander folgenden Aktivierungskaskade wird Ras aktiviert, welches die Aktivierung der Pi3k veranlasst die über verschiedene Zwischenschritte folglich zur Aktivierung der terminalen Kinasen p38 und Jnk führt. P38 und die Jnk kontrollieren eine breite Palette zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose (Coltella et al., 2006; Lamorte et al., 2000; Rasola et al., 2004; Recio and Merlino, 2002; Rodrigues et al., 1997).

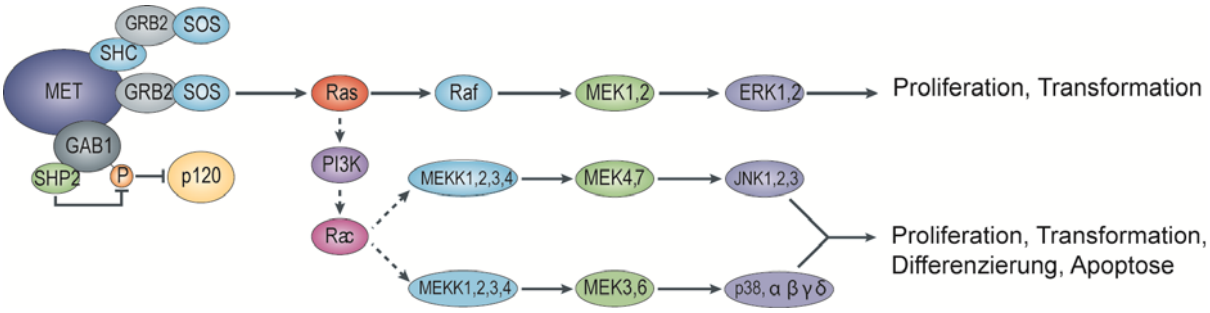


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Met-abhängigen Mapk-Signalwege.

Die Aktivität des Met-Rezeptors führt über verschiedene Adapterproteine zur Signalweiterleitung über den Mapk-Signalweg. Die Signalweiterleitung erfolgt sowohl über die extrazellulär regulierten Kinasen Erk1 und Erk2, die p38-mitogenaktivierten Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen (Jnk). Die Effekte des Mapk-Signalwegs reichen von der Transformation der Zelle über eine Steigerung der Proliferation bis hin zur Differenzierung und Induktion der Apoptose. Abbildung aus (Trusolino et al., 2010).

1.4.3.2 Der Pi3k-Akt-Signalweg

Die Pi3k kann auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden, entweder direkt durch Met oder indirekt durch Met-aktiviertes Ras (Ponzetto et al., 1994) (siehe Abbildung 5). Die Aktivierung der Pi3-Kinase resultiert in der Bildung von Phosphatydilinositol-3,4,5-Triphosphat (Pip_3), welches in der Lage ist, PH-Domänen tragende Moleküle, wie die Serin/Threonin-Kinase Akt, an die Plasmamembran zu rekrutieren. Dort wird Akt durch die Phosphorylierung zweier weiterer Kinasen aktiviert. Akt kann daraufhin eine Vielzahl weiterer Proteine phosphorylieren. So kann Akt durch die Phosphorylierung von Bad (*BCL-2 antagonist of cell death*) und Mdm2 (E3 Ubiquitin-Protein-Ligase) die Apoptose verhindern oder durch die Inaktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase 3β (Gsk3β) die Expression von Zellzyklusaktivatoren wie Myc und Zyklin D1

fördern. Darüber hinaus kann Akt das Protein mTor (*mammalian target of rapamycin*) aktivieren, welches wiederum die Proteinsynthese und Vergrößerung der Zellen stimuliert.

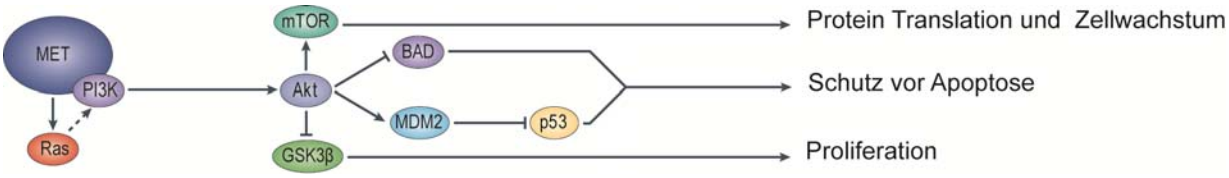


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Met-abhängigen Pi3k-Signalwege.

Die Aktivität des Met-Rezeptors führt entweder direkt über die Pi3k oder indirekt über Ras zur Signalweiterleitung über den Pi3k-Signalweg. Die phosphorylierte Akt-Kinase kann über Aktivierung von mTor die Protein-Translation und das Zellwachstum regulieren, wohingegen die Aktivierung von Bad und Mdm2 die Zelle vor Apoptose schütz bzw. die Aktivierung von Gsk3β zu einer Steigerung der Proliferation führt. Abbildung aus (Trusolino et al., 2010).

1.4.3.3 Der Stat-Signalweg

Die phosphorylierte Multisubstrat-Bindungsstelle des Met-Rezeptors führt zur Bindung und Tyrosin-Phosphorylierung von Stat3 über dessen SH2-Domäne (Boccaccio et al., 1998; Zhang et al., 2002). Dies wiederum hat die Dissoziation von Stat3 und dessen Dimerisierung über die SH2-Domäne eines weiteren Stat3-Moleküls zur Folge. Im Anschluss daran wandert das Stat3-Dimer in den Kern, um als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener, die Proliferation und Differenzierung beeinflussender Gene zu veranlassen (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Met-abhängigen Stat3-Signalwegs.

Stat3 ist in der Lage direkt an der phosphorylierten Multisubstrat-Bindungsstelle des Met-Rezeptors zu binden und durch diesen aktiviert zu werden. Nach Dimerisierung von Stat3 und dessen Wanderung in den Kern beeinflusst Stat3 die Induktion der Proliferation und Transformation sowie den komplexen Prozess der Tubulogenese. Abbildung aus (Trusolino et al., 2010).

1.4.3.4 Der Nfκb–Signalweg

Der Nfκb-Signalweg umfasst eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die mit Ifκbs komplexiert in ihrer inaktiven, zytoplasmatischen Form vorliegen (Karin et al., 2002). Erst die Phosphorylierung der Ifκbs durch die Iκb-Kinase (Ikk) resultiert in der Ubiquitinylierung und anschließenden proteasomalen Degradation der inhibitorischen Proteine. Dies wiederum führt zur

Freisetzung von Nfκb, dass in den Kern wandert und dort die Transkription verschiedener mitogener und anti-apototischer Gene veranlasst (Fan et al., 2005; Muller et al., 2002). Die Iκb-Kinase wird dabei selbst durch den Met-aktivierten Signalweg Pi3k-Akt oder direkt über Met-gebundenes Src aktiviert (Fan et al., 2005) (siehe Abbildung 7).

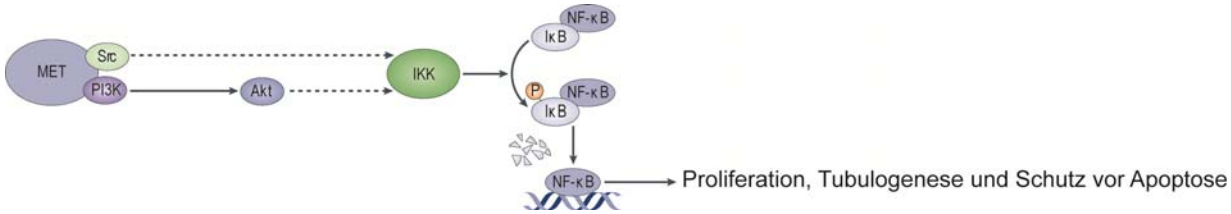


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Met-abhängigen Nfκb –Signalwegs.

Die Met-abhängige Aktivierung des Nfκb-Signalweges führt zunächst über die Aktivierung der Iκb-Kinase (Ikk), die entweder über Met gebundenes Scr oder den Met-aktivierten Pi3k-Signalweg erfolgen kann. Die Transduktion des Signals resultiert in einer Steigerung der Proliferation sowie dem Schutz vor Apoptose und beeinflusst ebenso wie der Stat3-Signalweg die Tubulogenese. Abbildung aus (Trusolino et al., 2010).

1.4.4 Modulation des Met-Signals

Die Modulation von Signalwegen *downstream* membrangebundener Rezeptortyrosinkinasen ist nicht nur von der direkten Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und verschiedenen Effektormolekülen abhängig, sondern in gleichem Maße von deren Ko-Lokalisation und Transport in Membran-umhüllten Kompartimenten wie Organellen und Vesikeln (Scita and Di Fiore, 2010).

Diese Tatsache trifft ebenso auf Met zu, da der aktivierte Rezeptor in der Lage ist, Mitglieder des Met-Signalweges an die Plasmamenbran zu rekrutieren, welche ihrerseits wiederum in der Lage sind, diffus im Zytoplasma verteilte intermediäre Signalproteine zu stimulieren.

Zusätzlich zu diesen klassischen Interaktionsmöglichkeiten zeigten kürzlich erschienene Arbeiten, dass der Met-Rezeptor selbst in der Lage ist, auch nach dessen Internalisierung und Translokation in endosomale Strukturen ein anhaltendes Signal abzugeben (siehe Abschnitt 1.4.4.1).

Neben der Internalisierung des Rezeptors können verschiedene andere, fein regulierte Mechanismen die Präsenz und Aktivität des Rezeptors in der Zellmembran an der Oberfläche der Zellen beeinflussen. So kann die Internalisierung des Rezeptors ebenso zur Ubiquitin-abhängigen Degradierung des Rezeptors führen oder dessen Aktivität durch enzymvermittelte

Prozesse wie *„extracelluar shedding“* und *„intracellular cleavage“* unterbrochen werden (siehe Abschnitt 1.4.4.2 und 1.4.4.3).

1.4.4.1 Endosomale Signale nach Met-Internalisierung

Intensive Studien über Internalisierung und endosomale Signalaktivität konnten den Zusammenhang zwischen endosomalem Met-Transport und der Aktivierung von Erk1/2 sowie Stat3 herstellen und sogar den endosomalen Signalweg direkt mit dem tumorigenen Potential der Zellen in Verbindung bringen (Joffre et al., 2011; Kermorgant and Parker, 2008; Kermorgant et al., 2003; Kermorgant et al., 2004). Nach der Bindung seines Liganden wird Met über Clathrin-vermittelte Endozytose in dicht unter der Membran gelegene frühe Endosomen rekrutiert (Kermorgant and Parker, 2005) und kann von hier aus eine anhaltende Aktivierung von Erk1/2 veranlassen (siehe Abbildung 8 A). Erk1/2 verlagert sich im Zuge der Aktivierung in sogenannte fokale Komplexe in den Randbereichen von fokalen Adhäsionen. Diese stellen verankernde Zellverbindungen dar, die das Aktin-Zytoskelett der Zelle an die extrazelluläre Matrix koppeln. Der Transport von aktiviertem Erk1/2 in die fokalen Komplexe dient dabei der Hgf-vermittelten Zellmigration, vermutlich durch die Phosphorylierung von Paxillin oder anderen Proteinen des fokalen Adhäsions-Komplexes (Liu et al., 2002).
Met ist in der Lage, von den dicht unter der Membran gelegenen peripheren Endosomen entlang eines Netzwerkes aus Mikrotubuli bis zum Kern zu wandern und sich dort in nicht-degradierenden, perinukleären Endomembran-Kompartimenten zu akkumulieren (Kermorgant et al., 2004). Dieser gerichtete Transport von Met ist zur optimalen Aktivierung von Stat3 und dessen nukleären Transport erforderlich (Kermorgant and Parker, 2008) (siehe Abbildung 8 B). Die Met-vermittelte Aktivierung von Stat3 an der Plasmamembran oder durch frühe Endosomen scheint unterhalb des Schwellenwertes für den nukleären Transport zu liegen. Die hohe Aktivität der im Zytoplasma vorliegenden Phosphotyrosin-Phosphatasen ist für den Abbau der Stat3-Phosphorylierung während dessen Passage von der Zellmembran zum Zellkern verantwortlich. Andererseits kann jedoch die Wanderung des internalisierten Met-Rezeptors diesen in direkte Nähe des Zellkerns bringen und so vor Ort aktiviertes Stat3 zur nukleären Akkumulation verhelfen, ohne dessen Transport durchs Zytoplasma zu erfordern.

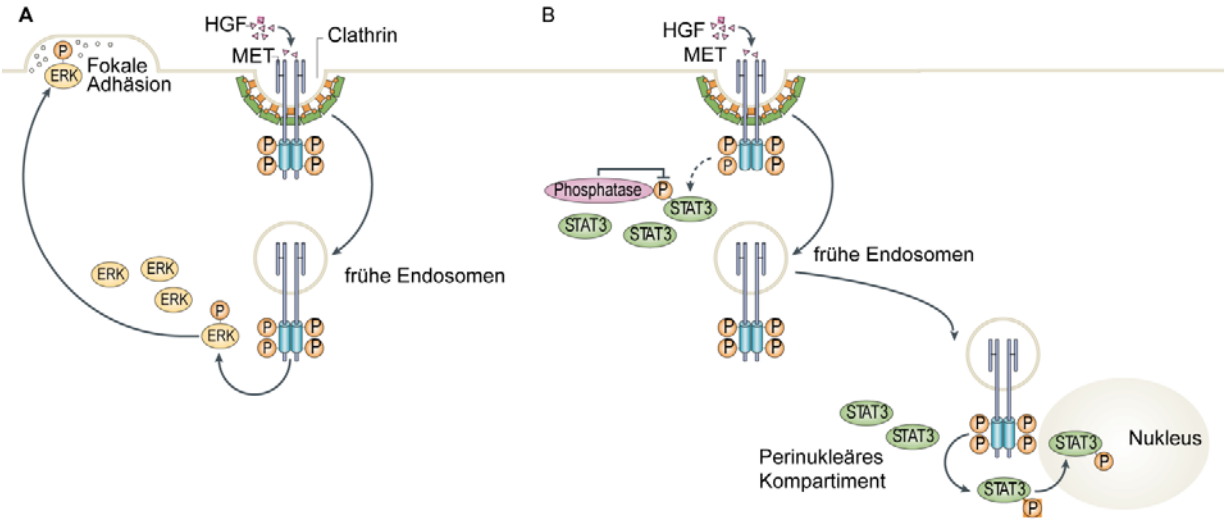


Abbildung 8: Endosomale Signalweiterleitung nach Clathrin-vermittelter Met-Internalisierung.

Der aktivierte Met-Rezeptor kann durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden und akkumuliert in sogenannten frühen Endosomen. Von hier aus kann der Met-Rezeptor zum einen eine anhaltende Aktivierung von (A) Erk1/2 veranlassen und zu dessen Akkumulation in fokalen Adhäsionen und damit der Induktion der Met-vermittelten Zellmigration führen und zum anderen (B) durch weitere Passage in sog. perinukleäre Kompartimente zur nukleären Anhäufung von aktiviertem Stat3 führen. Modifiziert nach (Sorkin and von Zastrow, 2009; Trusolino et al., 2010).

1.4.4.2 Signalabbruch durch Met-Internalisierung

Obwohl der Rezeptor in der Lage ist, auch nach seiner Internalisierung noch anhaltende Signale zu senden, führt normalerweise die Liganden-aktivierte Internalisierung und anschließende lysosomale Degradierung des Rezeptors zum Signalabbruch (Sorkin and von Zastrow, 2009). Voraussetzung für den lysosomalen Abbau von Liganden-aktiviertem Met ist die Phosphorylierung von Met an Tyrosin 1003 durch die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Cbl (Peschard et al., 2001). Dies führt zur Mono-Ubiquitinierung von Met an verschiedenen Stellen des Rezeptors (Carter et al., 2004), was über die Bindung endozytotischer Adapterproteine zur Rekrutierung des Rezeptors in Clathrin-reichen Arealen der Zellmembran und zur darauffolgenden Integration in frühe Endosomen führt (siehe Abbildung 9 A). Der Transport über das endosomale Netzwerk endet mit der Akkumulation von Met in den inneren Bereichen sog. *multivesicular bodies*, die den Rezeptor vom Zytoplasma trennen und eine Re-Integration des Rezeptors in die Zellmembran verhindern. Schlussendlich verschmelzen die *multivesicular bodies* mit Lysosomen, in denen der proteolytische Abbau des Rezeptors erfolgt.

Die entscheidenden Mechanismen, die entweder über ein anhaltendes Signal nach Internalisierung des Rezeptors oder über dessen Abbau entscheiden, sind bis dato nicht bekannt.

1.4.4.3 Gesteuerte Proteolyse von Met

Aktiviertes Met wird nicht durch Poliubiquitinylierung markiert und demzufolge nicht für den proteasomalen Abbau erkannt (Carter et al., 2004). Allerdings kann der proteasomale Abbau von Met auch über einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus ablaufen.

Der erste Schritt dabei ist die durch Metalloproteasen vermittelte Abspaltung der extrazellulären Domäne. Daraufhin spaltet die γ-Sekretase den verbleibenden membranverankerten Teil kurz unterhalb der Zytoplasmamembran ab, woraufhin der restliche Rezeptor über Proteasomen abgebaut wird (Foveau et al., 2009; Galvani et al., 1995; Nath et al., 2001; Petrelli et al., 2006; Prat et al., 1991; Schelter et al., 2010; Wajih et al., 2002) (siehe Abbildung 9 B).

Im Gegensatz zur Cbl-vermittelten Degradierung des Rezeptors handelt es sich hier um einen Liganden- bzw. Aktivitätsunabhängigen basalen Prozess, der allerdings durch die Zugabe verschiedenster Agenzien, wie z.B. monoklonalen Antikörpern, verstärkt werden kann. Dies führt zum einen zu einer Reduktion des Rezeptors auf der Zelloberfläche, zum anderen kann das lösliche N-terminale Fragment an andere Met-Rezeptoren bzw. Hgf binden und eine weitere Aktivierung verhindern (Michieli et al., 2004; Pacchiana et al., ; Pacchiana et al., 2010; Vigna et al., 2008; Zhang et al., 2004). Aus diesem Grund ist der Prozess der gesteuerten Proteolyse von Met für die medizinische Forschung von Interesse.

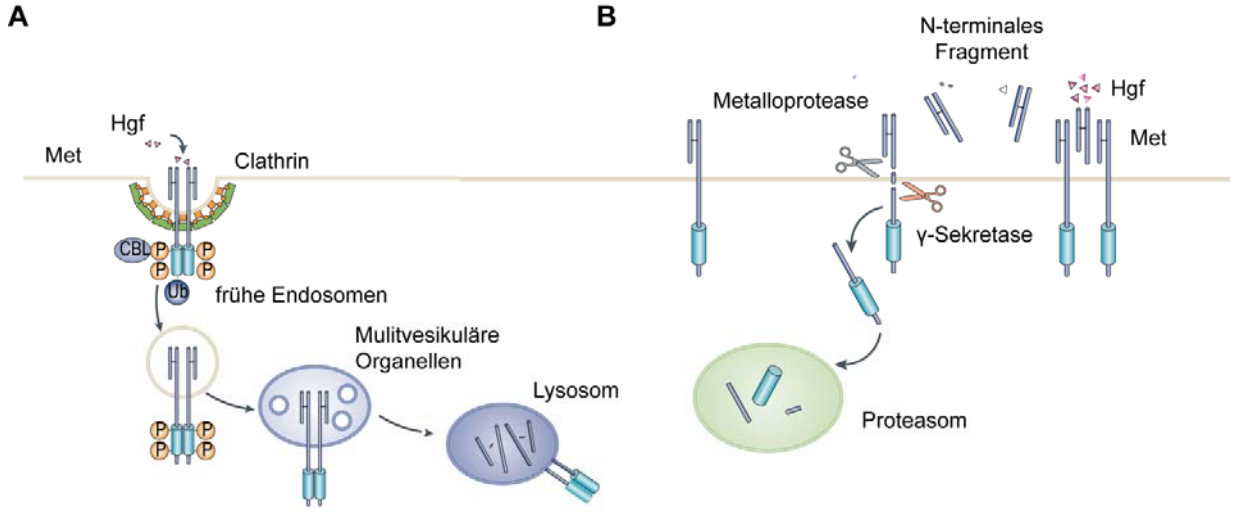


Abbildung 9: Signalabbruch durch Rezeptor-Internalisierung oder gesteuerter Proteolyse.

(A) Nach Aktivierung des Rezeptors führt dessen Phosphorylierung an Tyr 1003 durch Cbl zur Monoubiquitinylierung und somit zur Clathrin-vermittelten Internalisierung von Met. Die frühen Endosomen sammeln sich nach Transport über das endosomale Netzwerk in sog. multivesikulären

Organellen, deren Verschmelzung mit Lysosmen zur Proteolyse des Rezeptors führt. (B) Liganden- und Aktivitätsunabhängige Degradierung des Rezeptors durch Metalloprotease-vermittelte Abspaltung der extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne bildet ein lösliches N-terminales Fragment, welches die Aktivierung verbliebener Met-Rezeptoren negativ beeinflussen kann. Die intrazelluläre Domäne wird mit Hilfe der γ-Sekretase von der Zellmembran gelöst und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Modifiziert nach (Trusolino et al., 2010).

1.4.5 Invasives Wachstum

Alle im Abschnitt 1.4.3 genannten Signalwege führen zu einer hoch komplexen Zellantwort die mit zahlreichen morphologischen und physiologischen Änderungen einhergeht. Inbegriff dieser Änderungen sind die Steigerung der Proliferation, die Induktion eines motilen Phänotyps, die Fähigkeit zur Invasion sowie eine verlängerte Lebensdauer der Zellen und deren Fähigkeit zur Tubulogenese bzw. Angiogenese. Zusammenfassend lassen sich alle diese Effekte unter dem Begriff invasives Wachstum *(invasive growth*) zusammenführen und spielen eine entscheidende Rolle während der frühen Entwicklung des Embryos, der Wundheilung und Organregeneration im adulten Organismus sowie in der Aggressivität und Metastasenbildung von Tumoren.

1.4.6 Met in der Embryonalentwicklung

Der Hgf-Met Signalweg ist entscheidend an der vollständigen Entwicklung des Embryos beteiligt. Er ist unabdingbar für die vollständige Entwicklung von Plazenta und Leber (Schmidt et al., 1995), für die Migration von Muskelvorläuferzellen zur Ausbildung der Extremitäten-Muskulatur (Bladt et al., 1995) und für die korrekte Ausbildung des neuronalen Netzwerkes (Maina et al., 2001). Studien an Hgf- bzw. Met-*knockout*-Mäusen zeigen, das der Embryo nicht zuletzt aufgrund eines gestörten Stofftransportes über die unvollständig entwickelte Plazenta bereits im Uterus verstirbt (Uehara et al., 1995).

Die Entwicklung der zweischichtigen Blastozyste zu einem aus verschiedenen Geweben bestehenden, dreidimensionalen Embryo erfordert die temporäre Umwandlung epithelialer Zellen des Ektoderms hin zu spindelförmigen und beweglichen Zellen eines mesenchymalen Phänotyps (EMT) (siehe Abbildung 10 A). In den frühen Phasen der Embryonalentwicklung werden sowohl Hgf als auch Met in den Zellen des Endo- und Mesoderms entlang der rostrokaudalen Achse unter Ausbildung autokriner Signalwege ko-exprimiert und dienen der Migration und Positionierung mesodermaler Zellen (Andermarcher et al., 1996). Im Zuge der Organentwicklung wird die autokrine Stimulation eingestellt und die Expression des Met-Rezeptors auf epitheliale-

und Muskel-Vorläuferzellen beschränkt, die parakrin durch von mesenchymalen Zellen produziertes Hgf aktiviert werden können (Andermarcher et al., 1996) (siehe Abbildung 10 B). Die Entwicklung der Muskelgruppen von Extremitäten und sonstigen distalen Muskelgruppen erfolgt durch gezielte Wanderung myogener Vorläuferzellen des Dermomyotoms in die entstehenden Gliedmaßen. Die Wanderung dieser Muskelvorläuferzellen beruht auf einer anhaltenden Expression und Sekretion von Hgf in den Mesenchymzellen der Extremitäten-Knospen (Dietrich et al., 1999; Schmidt et al., 1995), welche über die Aktivierung des Met-Signalweges in den Zellen des Dermomyotoms eine zielgerichtete Motilität und chemotaktische Anlockung verursacht (Bladt et al., 1995; Stoker et al., 1987; Yang et al., 1996)

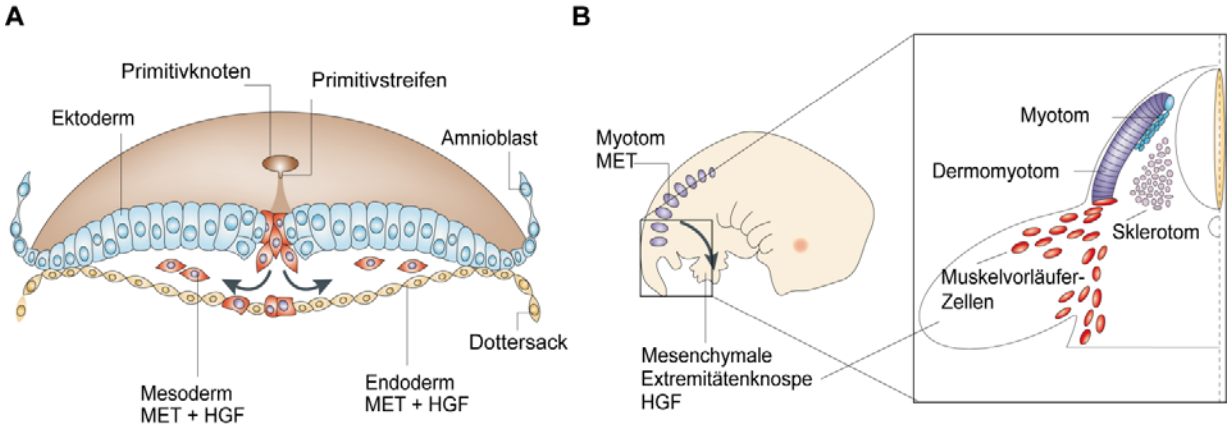


Abbildung 10: Die Rolle des Met-Signalweges in der Embryonalentwicklung.

(A) In der frühen Phase der Embryonalentwicklung führt die gemeinsame Expression von Hgf und Met in den Zellen des Endo- und Mesoderms unter Ausbildung autokriner Signalwege zur Migration und Positionierung mesodermaler Zellen. (B) In einer späteren Phase der Embryonalentwicklung im Zuge der Organogenese wird die autokrine Stimulation eingestellt und die Expression von Met beschränkt sich auf epitheliale und Muskelvorläuferzellen des Myotoms und Dermomyotoms, während sich die Hgf-Expression auf die Mesenchymzellen der Extremitätenknospen beschränkt. Letztere führt zu einer Aktivierung und chemotaktischen Anlockung der Zellen des Dermomyotoms, welche als Muskelvorläufer-Zellen in die Extremitätenknospen wandern und dort die Muskulatur bilden. Modifiziert nach (Birchmeier and Brohmann, 2000) und (Boccaccio and Comoglio, 2006).

1.4.7 Met im adulten Organismus

Im adulten Organismus sind einige Epithelzellen in der Lage, das embryonale Wachstums-Programm des Met- Signalweges zu übernehmen und komplexe Prozesse, wie z.B. Wundheilung, Organregeneration und Tubulogenese, zu ermöglichen (siehe Abbildung 11).

Die meisten Epithelzellen können *in vitro* in einer Kollagenmatrix proliferieren und zu rundlichen Kolonien mit einem zentralen Hohlraum heranwachsen (Debnath and Brugge, 2005).

Die Gegenwart von Hgf verursacht eine komplexe Kette zellulärer Veränderungen, die schlussendlich zur Dissoziation der Zellen und zur Bildung von verzweigten Tubuli führen (Pollack et al., 1998). Der Met-Signalweg bewirkt hierbei simultan eine erhöhte Zellmotilität, eine gesteigerte Proliferation, die Fähigkeit zu verankerungsunabhängigem Wachstum und führt zu einer tiefgreifenden morphologischen Veränderung. Zu Beginn durchlaufen die Zellen eine unvollständige EMT und erlangen einen invasiven, spindelförmigen Phänotyp mit langen zytoplasmatischen Fortsätzen, die sich in die umgebene Matrix austrecken. Diese Fortsätze bilden im nächsten Schritt Ketten aufeinander folgender Zellen, welche die Apoptose in Form von Anoikis (Induktion der Apoptose nach Kontaktverlust der Zelle zum Gewebe) umgehen müssen, um sich zu verdicken und zu verlängern. Abschließende Re-Differenzierung und Re-Polarisierung dieser Zellen führt zur Formation solider Zellstränge die durch Bildung eines Lumens zu funktionsfähigen Tubuli umgestaltet werden (Pollack et al., 1998). In *vivo* ist dieser Prozess der Tubulogenese epithelialer Zellen für die Bildung parenchymaler, tubulärer Organe, wie z.B. Brustdrüse, Leber und Pankreas, unabdingbar und ebenso für die Bildung neuer Blutgefäße entscheidend (Angiogenese).

Die Regeneration von Leber- und Nierengewebe ist ebenfalls im entscheidenden Maße von einem intakten Met-Signalweg abhängig. Im Zuge einer akuten oder chronischen Leberverletzung nimmt die Expression von Hgf deutlich zu und veranlasst die Hepatozyten der Leber zur verstärkten Proliferation bzw. reduzierten Apoptose und damit zur Wiederherstellung des Gewebes (Miyazawa et al., 1991; Nakamura et al., 1989; Zarnegar and Michalopoulos, 1989). Der konditionelle *knockout* von Met in der Leber führt zu einem eindeutigen Verlust dieser regenerativen Fähigkeiten (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004).

Das invasive Wachstum von Keratinozyten, also deren anhaltende Proliferation und Migration zur Besiedelung einer entstandenen Wunde an den Rändern einer akuten Hautverletzung, wird ebenso durch ein intaktes Met-Signal verursacht (Chmielowiec et al., 2007). Die die Wunde umgebenden Keratinozyten bilden ein sog. hyperproliferatives Epithelium, welches durch zahlreiche Zellteilungen zur Bildung neuen Gewebes beiträgt (Blanpain and Fuchs, 2009). Der konditionelle *knockout* von Met führt hier ebenfalls zum Verlust der regenerativen Fähigkeiten und verhindert so die Ausbildung eines hyperproliferativen Epitheliums *in vivo* (Chmielowiec et al., 2007). *In vitro* konnte mittels Wundheilungs-Versuchen sog. *scratch-Assays* gezeigt werden, das Hgf zur Re-Orientierung der Keratinozyten sowie deren Proliferation und Migration notwendig ist. Im Zuge der Re-Orientierung richten sich die Komponenten der fokalen

Adhäsionen, die Aktin-Fasern und Mikrotubuli in Richtung der Wunde aus und bereiten so eine gerichtete Migration vor.

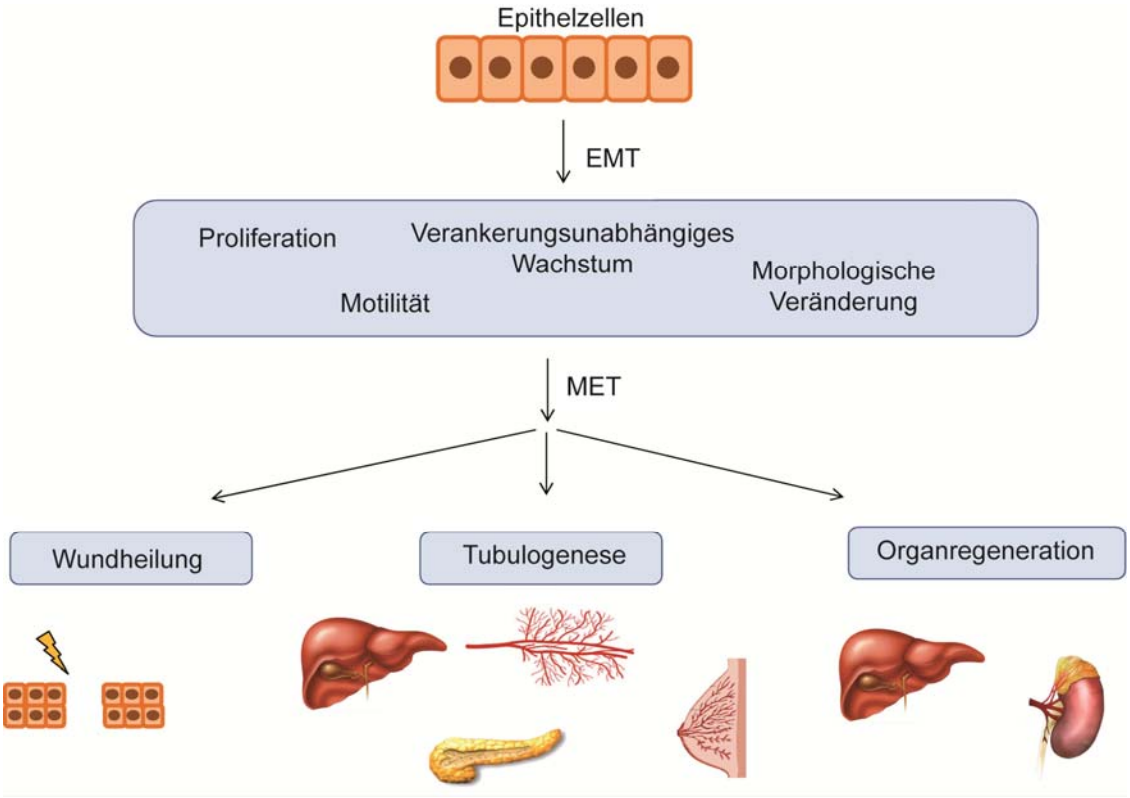


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Rolle von Met im adulten Organismus.

Die Expression von Met in den Epithelzellen des adulten Organismus verleiht diesen Zellen die Fähigkeit zur Koordination komplexer Mechanismen, wie Wundheilung, der Bildung von Tubuli und der Regeneration. Eine Aktivierung des Met-Rezeptors führt über entsprechende Signalweiterleitung zur mesenchymalen Transition der Epithelzellen (EMT). Einhergehend mit morphologischen Veränderungen kommt es zur koordinierten Proliferation und Migration der Zellen sowie zur Reduktion von Apoptose und Anoikis. Eine entsprechende Re-Differenzierung zu den Epithelien der entsprechenden Organe (MET) nach erfolgreicher Migration der Zellen führt zur Bildung neuen Gewebes und zu den oben genannten Effekten der Wundheilung, Tubulogenese und Organregeneration.

1.4.7.1 Met im Mammagewebe

Die Verteilung der Met- und Hgf-Transkripte im Mammagewebe konnte mittels *in situ* Hybridisierung zwei eindeutigen Gewebeschichten zugordnet werden. Die Expression von Hgf findet in einer dünnen, die Dukte umkleidenden Schicht aus mesenchymalen Zellen statt, wohingegen die Met-Expression auf die basalen Epithelzellen reduziert ist (Yang et al., 1995) (siehe Abbildung 12).

Verschiedene Studien zeigten, dass die Expression von Met und Hgf im Mammagewebe mit den Entwicklungsstadien der aktiven Tubulogenese korreliert (Yang et al., 1995). Die Transkripte beider Gene sind bereits in 6 Wochen alten Tieren nachweisbar und steigen bis zur 12. Woche deutlich an. Ab der 12. Woche ist die Entwicklung der Brustdrüse, einhergehend mit dem Ende der Pubertät, abgeschlossen und es findet kein weiteres Wachstum der Drüsengänge statt (Watson and Khaled, 2008). Die Expression beider Gene bleibt bis zum 12. Tag der Schwangerschaft unverändert, sinkt dann jedoch während Schwangerschaft und Laktation auf nicht mehr detektierbare Mengen ab, um mit abgeschlossener Involution wieder auf die ursprüngliche Expressionsmenge anzusteigen (Niranjan et al., 1995) (siehe Abbildung 12).

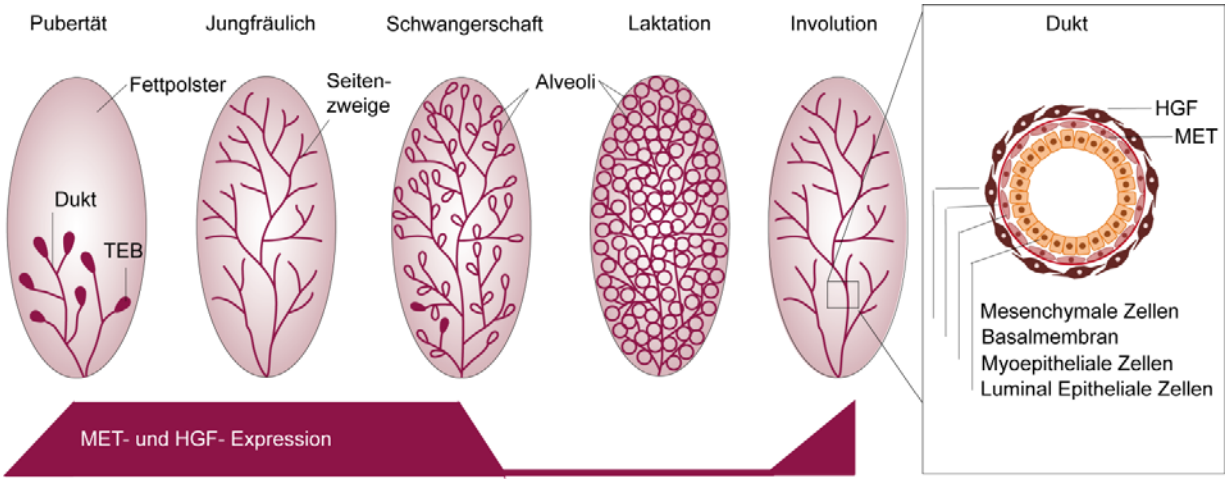


Abbildung 12: Die Expression von Met während der verschiedenen Entwicklungsstadien der Mamma.

Die Expression von Met und Hgf im Mammagewebe korreliert mit den Entwicklungsstadien der aktiven Tubulogenese. So steigt die Expression beider Gene während der Pubertät stark an und sinkt während der Schwangerschaft und Laktation. Im Anschluss an die Involution steigt die Expression beider Gene wieder auf den Ausgangswert. Die Schematische Darstellung eines Duktquerschnittes zeigt, das die Expression von Hgf und Met in der Mamma auf bestimmte Gewebeschichten beschränkt ist. Die Expression von Hgf konnte den die Dukte umkleidenden mesenchymalen Zellen zugeordnet werden, während die Met-Expression auf die basalen Epithelzellen beschränkt ist. Entwicklungsstadien der Mamma modifiziert nach (Hennighausen and Robinson, 2005).

Gezielter konditioneller *knockout* von Met in den Epithelzellen der Mamma führt zu einer deutlichen Reduktion von duktalen und sekundären Seitenzweigen, wohingegen die Furchung der terminalen Endknospen sowie die Anzahl der primären Dukte, deren Wachstum während der Pubertät abgeschlossen ist, weitestgehend unbeeinflusst bleiben (Garner et al., 2011).

Die Überexpression von humanem Hgf in primären Mammaepithelzellen und deren Transplantation in das vom Epithel befreite Fettgewebe der Mamma konnten die Rolle des Met-

Signalweges während der Entwicklung des Mammagewebes weiter verdeutlichen (Yant et al., 1998). Die Transplantation dieser Zellen führte zur Rekonstruktion des gesamten Drüsenepithels, wobei jedoch 30% der rekonstruierten Brustdrüsen morphologische Unterschiede zu nicht-Hgf-exprimierendem Gewebe aufwiesen. So führte die Überexpression von Hgf in der juvenilen Mamma zu einer vermehrten Anzahl terminaler duktaler Endknöpfchen (TEB) und deren zum Teil kleeblattförmigen Morphologie. Des Weiteren konnte eine hyperplastische Verzweigung der Dukte beobachtet werden (Yant et al., 1998).
Zur gezielten Überexpression von Hgf in den Epithelzellen der Mamma wurde ein Mausmodell entwickelt, welches die Expression von Hgf unter der Kontrolle des WAP-Promotors auf das Mammagewebe beschränkt (Gallego et al., 2003). Das Drüsengewebe unverpaarter Mäuse zeigte dabei hyperplastische Verzweigungen der Dukte, die Ausbildung lobulärer Strukturen entlang der Dukte und eine deutlich verdickte Schicht der die Dukte umkleidenden fibrösen Zellen. Die Entwicklung des Drüsengewebes während Schwangerschaft und Laktation ließ sich indessen nicht von der von Wildtyp-Tieren unterscheiden. Durch die Aktivierung des WAP-Promotors vornehmlich in der Schwangerschaft entwickelte die Mehrzahl der Mäuse multifokale Karzinome nach multiplen Schwangerschaften sowie etwa 20% der Tiere Lungenmetastasen. Das Tumorgewebe sowie die laktierende Brustdrüse zeigten sowohl die Expression von Hgf und Met als auch nachweislich dessen Phosphorylierung, wohingegen die Aktivierung von c-Myc und Akt vornehmlich in Tumoren detektierbar war.

1.4.8 Met in Tumoren

Das Met-induzierte invasive Wachstum spielt nicht nur bei der Regeneration und Entwicklung verschiedener Organe eine entscheidende Rolle, sondern fördert ebenso Wachstum, Invasivität und Metastasierung verschiedenster Tumorerkrankungen. Zahlreiche experimentelle Ansätze liefern Beweise für das tumorigene Potential des Met-Signalweges: (i) sowohl murine als auch humane Zelllinien führen nach ektopischer Expression von Met und/oder Hgf zur Tumorbildung und Metastasierung in immundefizienten Nacktmäusen (Rong et al., 1994), wohingegen die Runterregulation von Hgf oder Met zu einer Reduktion des tumorigenen Potentials humaner Glioblastomzellen (Abounader et al., 2002), Rabdomyosarkomzellen (Taulli et al., 2006) und Lungenkrebszellen führt (Lutterbach et al., 2007). (ii) Die ektopische Hgf- oder Met-Expression in transgenen Tieren hat die Bildung verschiedener, unter Umständen metastasierender Tumorarten zur Folge (Takayama et al., 1997; Wang et al., 2001) und (iii) eine erhöhte Met-

bzw. Hgf-Expression korreliert mit einem aggressiveren Phänotyp und damit einhergehend mit einer schlechten Prognose, wie z.B. für Prostata-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Schilddrüsen- und Mammakarzinome gezeigt werden konnte (Amemiya et al., 2002; Birchmeier et al., 2003; Camp et al., 1999; Di Renzo et al., 1995; Humphrey et al., 1995; Yao et al., 1996). (iv) Der unmissverständliche Beweis für den Zusammenhang zwischen dem Met-Signalweg und humanen Krebserkrankungen sind humane Tumoren, bei denen sich aktivierende Met-Mutationen finden lassen. Beispiele für diese Tumorarten sind die sporadischen und vererbten humanen papilliären Nierenzellkarzinome, die eine Mutation der Kinase-Domäne aufweisen (Danilkovitch-Miagkova and Zbar, 2002; Lee et al., 2000), vereinzelte Fälle von Magenkarzinomen mit Mutationen der Juxtamembran-Domäne (Lee et al., 2000) oder Mutationen der Met-Kinase-Domäne in Metastasen von Kopf-Hals-Karzinomen (Di Renzo et al., 2000).

Die bei Tumoren gängige konstitutive Aktivierung des Met-Signalweges kann verschiedene Ursachen haben. Die Etablierung eines autokrinen Met-Hgf-Signalweges innerhalb von Tumorzellen kann ebenso wie die Amplifikation der Met-Expression oder der Erwerb aktivierender Mutationen zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptors führen. Tumoren mit autokriner Hgf-Produktion sind vollständig unabhängig von der Aktivierung durch in der Nachbarschaft produziertes Hgf. Diese Art der Met-Aktivierung konnte in einer breiten Palette von Tumoren beobachtet werden, wie z. B. in Osteosarkomen (Ferracini et al., 1995), Rhabdomyosarkomen (Ferracini et al., 1996), Glioblastomen (Koochekpour et al., 1997) und Mammakarzinomen (Tuck et al., 1996). Die exzessive autokrine aber auch parakrine Expression von Hgf geht im Regelfall mit einer verstärkten Aggressivität des Tumors einher. Eine stark erhöhte Met-Expression korreliert ebenfalls mit einer negativen Prognose und ist der häufigste Grund der onkogenen Met-Aktivierung in humanen Tumoren. Die quantitative Hochregulation des Rezeptors führt zum einen zu einer gesteigerten Hgf-Sensitivität, zum anderen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung durch autonome Rezeptor-Oligomerisierung und darauffolgende Rezeptor-Aktivierung. Die Überexpression von Met kann dabei entweder durch eine Amplifikation des *Met*-Lokus erfolgen oder durch transkriptionelle Regulation. Die transkripitonelle Hochregulation von Met konnte in zahlreichen Tumoren, wie z.B. in Tumoren des Magens, (Kijima et al., 2002) der Lunge (Engelman et al., 2007; Lutterbach et al., 2007) und der Galle (Nakazawa et al., 2005) nachgewiesen werden. Punktmutationen können zu einer Veränderung der Rezeptorstruktur und damit zu einem konstitutiv aktiven Signal führen (Danilkovitch-Miagkova and Zbar, 2002; Park et al., 1999; Schmidt et al., 1997; Schmidt et al.,

1999), was im Vergleich zur Gen-Amplifikation zumindest in Brustkrebs jedoch eher selten der Fall ist (http://www.vai.org/met).

1.4.8.1 Met in Mammakarzinomen

Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, deren komplexes Krankheitsbild sich durch unterschiedliche biochemische Eigenschaften und demzufolge unterschiedliche Therapieansätze und Erfolge charakterisieren lässt. Die Gruppierung humaner Mammakarzinome erfolgt aufgrund molekularer Gen- und Proteinexpressionsprofile inklusive Hormonrezeptorstatus, was sich bei verschiedenen Tumorklassen mit unterschiedlichen klinischen Prognosen widerspiegelt (siehe Abbildung 13). Mit ca. 60% aller Brusttumoren umfasst die größte Gruppe der humanen Mammakarzinome die Östrogenrezeptor-Alpha positiven Tumoren (ESR1), die sich durch molekulare Expressionsanalysen in die Untergruppen Luminal A und Luminal B gliedern (Da Silva et al., 2007; Goncalves et al., 2008; Parker et al., 2009; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Die luminalen Tumoren spiegeln das Expressionsprofil luminaler Zellen des Mammagewebes wider, die sowohl die Dukte als auch die Lobuli auskleiden. Die Tumoren der Klasse Luminal A reagieren gut auf hormonelle Therapieansätze und haben eine relativ gute Prognose, wohingegen die Tumoren der Klasse Luminal B eine niedrigere ESR1-Expression, ein schnelleres Wachstum und eine stärkere Resistenz gegenüber hormonellen Therapien zeigen (Brenton et al., 2005). Die verbleibenden ESR1-negativen Tumoren gliedern sich wiederum in zwei Untergruppen, in die Her2/neu-positiven und die Her2/neu-negativen Tumoren. Letzere beeinhalten die basalen (*basal-like*) und die Claudin-negativen (*claudin-low*) Tumoren. Der Rezeptor Her2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ist Ziel der Therapie dieser Tumoren durch humanisierte, monoklonale anti-Her2/neu Antikörper oder niedermolekulare Kinase-Inhibitoren, die in ca. 50% aller Fälle eine gute Wirksamkeit zeigen (Bedard and Piccart-Gebhart, 2008; Hu et al., 2009; Kao and Pollack, 2006; Slamon et al., 2001). Die Gruppe der *basal-like* Tumoren zeigt expressionelle Ähnlichkeiten mit den basalen Zellen des Mammaepithels. Diese umkleiden die luminalen Zellen der Dukte und Lobuli, liegen am dichtesten an der Basalmembran und umfassen sowohl epitheliale als auch myoeptheliale Zellen (siehe Abbildung 12). Diese ca. 20-25% aller humanen Mammakarzinome umfassende Gruppe zeichnet sich durch die Abwesenheit hormoneller Rezeptoren wie ESR1, Her2/neu und Progesteronrezeptor (PR) aus und wird deshalb auch als triple-negativ bezeichnet (Abd El-Rehim et al., 2004; Nielsen et al., 2004; Perou et al., 2000; Potemski et al., 2005; Sorlie et al., 2001;

Sorlie et al., 2003; Sotiriou et al., 2003). *Basal-like* Brusttumoren zählen zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose, da sie zum einen stark proliferieren und einen aggressiven Phänotyp aufweisen und zum anderen aufgrund der meist fehlenden Hormonrezeptor-Expression bislang keine gezielten Therapien für diese Untergruppe humaner Mammakarzinome entwickelt werden konnten (Rakha et al., 2008; Yehiely et al., 2006). Das grundlegende Verständnis über die molekularen Mechanismen, welche die Entwicklung und Progression der *basal-like* Tumoren vorantreibt, ist dabei entscheidend für die Suche nach geeigneten Markern und Proteinen als therapeutische Targets.

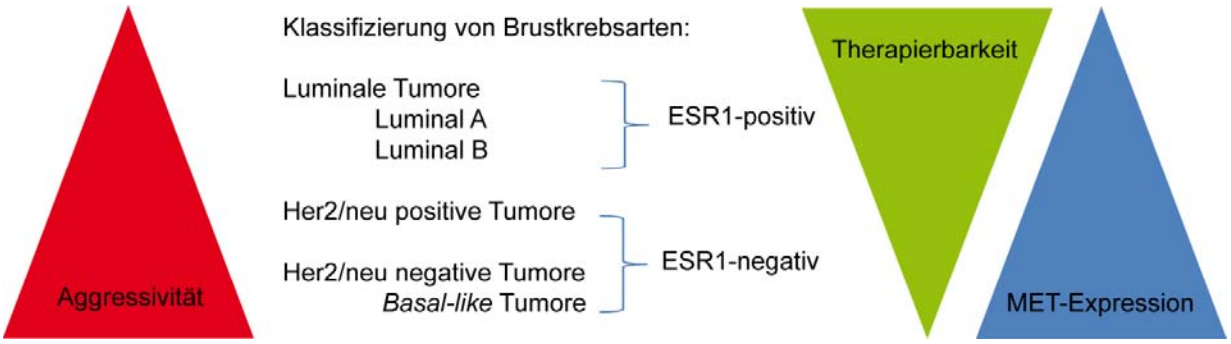


Abbildung 13: Klassifizierung von Mammakarzinomen.

Humane Brusttumoren können aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften verschiedenen Subtypen von Mammakarzinomen zugeordnet werden. Basis dieser molekularen Klassifizierung ist die Expression der Hormon-Rezeptoren, des Östrogenrezeptors (ESR1), des Progesteronrezeptors und des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (Her2/neu). Die Aggressivität der aufgelisteten Klassen steigt gemeinsam mit der Met-Expression von oben nach unten an, während ihre momentane Therapierbarkeit sich gegenläufig verhält.

Genomweite Studien zur Gen- und Protein-Expression in Brustkrebs-Zelllinien konnte diese in zwei Gruppen mit entweder einem luminalen oder basalen Expressionsprofil gliedern. Eines der zwischen diesen beiden Gruppen am stärksten regulierten Gene ist der Met-Rezeptor, dessen Expression eindeutig der basalen Gruppe zugeordnet werden kann (Charafe-Jauffret et al., 2006; Goncalves et al., 2008). Diese Ergebnisse wurden durch zahlreiche klinische Studien an einer großen Gruppe von humanen Brusttumoren bestätigt. Diese bringen die Expression von Met ebenfalls mit der Expression von basalen Markern in Verbindung (Garcia et al., 2007; Goncalves et al., 2008; Ponzo and Park, 2010; Wu et al., 2008). Zwei verschiedene Mausmodelle konnten die Rolle des Met-Rezeptors bei der Tumorigenese von Mammakarzinomen inklusive basalen Brusttumoren weiter verdeutlichen. Transgene Mäuse, die entweder durch *knock-in* Technologien eine mutierte Variante des Met-Rezeptors unter Kontrolle des endogenen Met-Promotors exprimieren oder solche Tiere, die die Expression onkogener Met-Varianten durch Verwendung

des Mamma-spezifischen MMTV-Promotors (*mouse mammary tumor virus*) auf das Mammagewebe beschränken, entwickeln neben Tumoren mit basalen Eigenschaften ein breites Spektrum an Brusttumoren verschiedener morphologischer Phänotypen (Graveel et al., 2009; Ponzo et al., 2009).

Generell ist eine gesteigerte Met-Expression in 15-20% aller humanen Mammakarzinomen zu finden, wobei diese vornehmlich in basalen aber auch in Her2/neu- und ESR1-positiven Tumoren vorkommen (Camp et al., 1999) und die Met-Überexpression immer mit einer schlechten Prognose einhergeht (Ghoussoub et al., 1998; Graveel et al., 2009; Lengyel et al., 2005; Ponzo et al., 2009). Ebenso korrelieren erhöhte Hgf-Werte im Serum von Brustkrebs-Patientinnen mit einer schlechteren Tumor/Lymphknoten/Metastasen-Klassifizierung (TNM-System) (Taniguchi et al., 1995) sowie einer kürzeren krankheitsfreien Zeit nach erfolgreicher Therapie (Yamashita et al., 1994). Patienten mit dieser Art von Tumoren könnten von der Entwicklung einer gezielten, gegen Met-gerichteten Therapie profitieren und ihre Prognose deutlich verbessert werden.

1.4.9 Met als therapeutisches Zielprotein

Zur Bekämpfung Met-exprimierender Tumoren wurden bereits viele verschiedene Strategien zum Angriff des Met-Rezeptors verfolgt, wobei jede dieser Strategien an einem definierten Punkt des Met-Signalweges ansetzt (siehe Abbildung 14). Einer dieser Ansätze ist die Unterbindung der Interaktion zwischen Met und seinem Liganden Hgf. Die Interaktion beider Proteine lässt sich zum einen durch Hgf-Antagonisten, die mit funktionellem Hgf um die freien Met-Bindungsstellen kompetitieren, unterbinden, zum anderen durch die direkte Inaktivierung von sowohl Hgf als auch Met durch die Bindung an sog. neutralisierende Antikörper verhindern. Die biologischen Antagonisten gegen Hgf nutzen die Tatsache, dass sowohl pro-Hgf als auch trunkiertes Hgf an den Rezeptor binden können, diesen so blockieren aber nicht aktivieren. Demzufolge wurden verschiedene trunkierte Formen von Hgf wie etwa Nk2 und Nk4 (Chan et al., 1991; Matsumoto and Nakamura, 2003; Matsumoto and Nakamura, 2008; Montesano et al., 1998) und nicht spaltbares pro-Hgf (*uncleavable Hgf*) (Mazzone et al., 2004) entwickelt, deren Wirksamkeit zumindest in präklinischen Studien bestätigt werden konnte (Comoglio et al., 2008). Die Wirksamkeit neutralisierender Met- bzw. Hgf-Antikörper konnte ebenfalls in präklinischen Studien bestätigt werden (Burgess et al., 2006; Kim et al., 2006; Martens et al., 2006; Petrelli et al., 2006). Einige von ihnen haben bereits den Sprung in klinische Studien (Phase I und II) geschafft (Jun et al., 2007; Schiavon and Tonini, 2010). Die Wirkung neutralisierender Met-

Antikörper beruht dabei auf der induzierten Abspaltung der extrazellulären Met-Domäne und führt damit zum einen zu einer reduzierten Rezeptordichte und zum anderen zur Bildung eines löslichen Met-Fragments. Dieses Fragment ist wiederum in der Lage, mit Hgf und anderen Met-Rezeptoren zu interagieren, die Verfügbarkeit des Liganden herunterzusetzen und so die Dimerisierung intakter Met-Rezeptoren zu verhindern (Petrelli et al., 2006).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Blockierung der Kinase-Aktivität durch sog. niedermolekulare Met-Kinase-Inhibitoren. Diese kompetitieren direkt mit ATP in der Kinase-Domäne des Met-Rezeptors und verhindern dessen Aktivierung. Die Wirksamkeit dieser Inhibitoren auf Tumorwachstum und Neoangiogenese konnte für zahlreiche Wirkstoffe in verschiedenen präklinischen Studien bestätigt werden. Klinische Studien der Phase I konnten für bestimmte Wirkstoffe, wie ARQ197, einem nicht ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitor, eine anti-proliferative und anti-invasive Wirkung feststellen (Munshi et al., 2010). So zeigten 40 von 100 Patienten nach der Behandlung mit ARQ197 eine Stabilisierung des Tumors während 3 von 100 eine teilweise Verbesserung erlangen konnten (Rosen et al., 2011). Dieser und andere spezifische Met-Kinase-Inhibitoren als auch Breitband-Kinase-Inhibitoren befinden sich zurzeit in der zweiten bzw. dritten Phase der klinischen Evaluation (siehe Onlinetabelle http://www.vai.org/metclinicaltrials/).

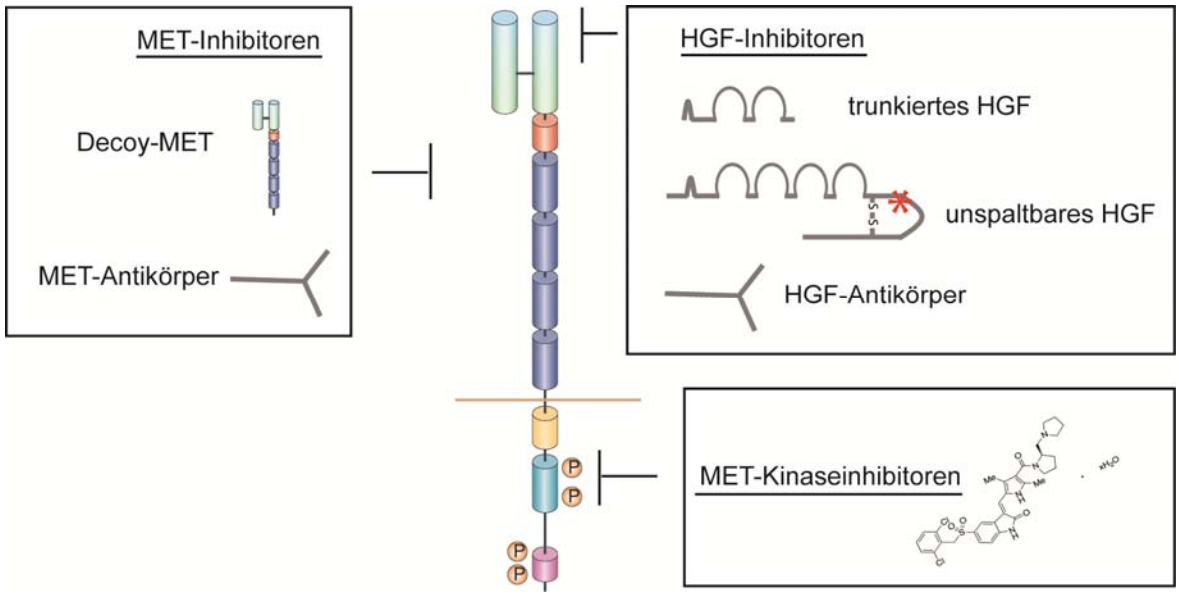


Abbildung 14: Therapeutische Ansätze zur Inhibition des Met-Signalweges.

Zur Bekämpfung Met-exprimierender Tumoren wurden verschiedene Strategien entwickelt deren Ziel jeweils unterschiedliche, definierte Punkte des Met-Proteins darstellen. Die Verfügbarkeit des Rezeptors kann durch induzierte Abspaltung des Rezeptors, durch verschiedene Met-Inhibitoren, wie monoklonalen Antikörpern und Decoy-Met (einem löslichen N-terminalen Fragment) reduziert werden. Die Aktivität des

Rezeptors lässt sich gezielt durch niedermolekulare Met-Kinase-Inhibitoren ausschalten. Ein anderer Ansatz ist die Inhibition der Hgf-Met-Interaktion durch Blockierung des Rezeptors durch trunkiertes oder nicht-spaltbares Hgf oder der Neutralisation von Hgf durch monoklonale Antikörper. Modifiziert nach (Gentile et al., 2008).

Die nächsten Ziele einer Met-gerichteten Tumortherapie liegen nun in der genauen Klassifizierung und Identifizierung derjenigen Patienten deren Erkrankung auf die Inhibition des Met-Signalweges anspricht sowie in der Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Met und anderen Onkogenen bzw. Onkosuppressoren, welche die Met-Inhibition beeinflussen können und demzufolge im Rahmen einer kombinierten Therapie von Bedeutung sind.

1.5 Aufgabenstellung

Die murinen Mammakarzinomzellen der G-2 Kultur spiegeln die phänotypische Heterogenität der Primärtumoren wider und setzten sich aus distinkten, unterschiedlich differenzierten Subpopulationen zusammen. Die G-2 Zellen haben ausgeprägte tumorinitiierende Eigenschaften und weisen indes Eigenschaften von Stamm- bzw. Tumorstammzellen auf. Die Subpopulationen sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, die Heterogenität der Kultur zu erhalten. So besitzen die Zellen eines fortgeschrittenen EMT-Phänotyps (mesenchymal > epithelial) die ausgeprägte Fähigkeit, in Zellen eines eher moderaten Phänotyps überzugehen (epithelial > mesenchymal), und somit die Homöostase des Tumorzellsystem aufrecht zu erhalten. Met, als einer der entscheidenden Induktoren der epithelialen zu mesenchymalen Transition könnte somit Einfluss auf den Differenzierungszustand dieser Zellen und damit auf den Anteil des tumorerhaltenden Kompartiments nehmen. Diese Möglichkeit bedarf gerade im Rahmen einer bevorstehenden medizinischen Anwendung von Met-Inhibitoren bzw. -Antagonisten zur Therapie von humanem Brustkrebs dringender und umfassender Analysen. Die Frage nach der Rolle von Met in der Differenzierung von Mammakarzinomzellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an dem Modellsystem der G-2 Zellen eingehend untersucht werden. Zur Analyse des Einflusses von Met auf den Phänotyp der G-2 Zellen sollte zum einen eine stabile Met-*knockdown*-Zelllinie etabliert werden und zum anderen das Met-Signal durch einen spezifischen Met-Kinase-Inhibitor abgeschaltet werden. Grundlegend hierzu musste zunächst die Aktivität des Met-Rezeptors und deren Ursachen sowie die Verteilung des Rezeptors auf die Subpopulationen der G-2 Kultur geklärt werden. Parallel sollte die Met-Abhängigkeit einer Gruppe von Genen, die in WAP-T Tumoren eine Ko-Expression mit Met zeigen (Met-

Signaturgene) und mit einem hohen Tumorgrad sowie einer geringen morphologischen Differenzierung korrelieren, analysiert werden. Es sollte geklärt werden, ob die Gene der Met-Signatur ebenfalls zwischen den Subpopulationen differenziell reguliert werden und wenn ja, deren Expression durch die Inhibition eines intakten Met-Signalweges bzw. der Depletion von Met beeinflusst wird. Hierdurch sollen potenzielle Met-*Downstream-Targets* innerhalb der Gruppe der Met-Signaturgene identifiziert und Aufschluss über die in den G-2 Zellen ablaufenden Met-Signalwege erlangt werden. Die Identifikation neuer Met-abhängiger Zielproteine könnte eventuell zur Etablierung neuer effektiver Kombinations-Therapien durch gezielte Inhibition von Met und gleichzeitiger Manipulation Met-assoziierter Signalwege führen.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien und andere Materialien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Life Technologies GmbH (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Darüber hinaus wurden weitere Chemikalien von folgenden Herstellern verwendet:

Chemikalien	Lieferant
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA , Fraktion V	Roche, Mannheim
Boric acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (jeweils 100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd, mind. 37%	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Glycerol	Serva, Heidelberg
rhuHGF-C	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kryomatrix	Shandon®, Frankfurt a.M.
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg

Methanol	Merck, Darmstadt
Methylzellulose-Stock-Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
NaF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefablock SC	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PHA-665752	Sigma-Aldrich, Steinheim
Power SYBR Green PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems, Darmstadt
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
9 cis-Retinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Serva, Heidelberg
SeaKem Agarose	Lonza, Basel, CH
Sodium Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetra-Natriumdiphosphat-decahydrat	Merck, Darmstadt
Trasylol	Bayer HealthCare, Montville, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield™ H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders deklariert, wurde alle Puffer und Lösungen mit sterilem Milli-Q-Wasser angesetzt und durch autoklavieren sterilisiert.

DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat)
0,01% (w/v) DEPC
über Nacht stehen lassen

DMEM
133,8 g DMEM Pulver
37 g NaHCO3,
pH 7,1 (HCl)
ad 10 L Wasser
steril filtrieren
Lagerung bei 4°C

Einfriermedium
10% DMSO
50% FCS
40% DMEM

Ethidiumbromid Stammlösung
10 mg/ml Ethidiumbromid in H_2O

Ladepuffer (10 x DNA-Ladepuffer)
0,1% Xylencyanol
50% Glycerin
10 x TAE
0,1 M EDTA
0,1% SDS

LB-Medium
10 g NaCl
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g Bacto-Trypton
pH 7,0
ad 1000 ml Wasser

NP40-Extraktionspuffer
ddH2O
50 mM Hepes pH 7,5
150 mM NaCl
1%NP-40
2% Trasylol
2 mM EDTA
50 mM NaF
10 mM tetra Natriumdiphosphat-decahydrat
10% Glycerol
1 mM Sodium Orthovanadat
1 mM Pefabloc

PBS
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4
pH 7,4

Pefablock Stammlösung
10 mM Pefablock in 50 % Glycerol
Lagerung bei -20°C

1x SDS-Laufpuffer
25 mM Trizma Base (Tris)
200 mM Glycin (pH 8,3)
0,1% SDS

2x SDS-Probenpuffer (Lysepuffer)
130 mM Tris-HCl (pH 8)
20% Glycerin
4,6% SDS
10%β-Mercaptoethanol
0,2g Bromphenolblau

6x SDS-Probenpuffer
300 mM Tris-HCl (pH 6.8)
60% Glycerin
12% SDS
600mM DTT
10% β-Mercaptoethanol
0,6% Bromphenolblau

SDS-Sammelgel
3,75 ml 30% Acrylamid/Bisacryamid
6,25 ml Upper Gel Stammlösung
15 ml Aqua dest.
150 µl 10% APS
50 µl TEMED

SDS-Trenngel (10 %)
13,25 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid
10 ml Bottom Gel Stammlösung
16,75 ml Aqua dest.
200 µl 10% APS
20 µl TEMED

TAE 50 x
2M Tris-HCl (pH 8,0)
1 M Essigsäure
0,05 M EDTA

TBS-Puffer (10X)
20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
150 mM NaCl

TBST-Puffer (Western Blot-Waschpuffer)
20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
150 mM NaCl
0,05 % Tween 20

TE-Puffer
10mM Tris-HCl (pH 8,0)
1mM EDTA

Trypsin-Lösung
2 % Trypsin-Stammlösung
5 mM EDTA in PBS (pH 8,0)

Upper Gel Stammlösung 8x
1 M Tris-HCl (pH 6,8)
0,8% SDS

Western-Blot-Blockpuffer
5% Magermilchpulver in TBST

Western-Blot-Transferpuffer (10X)
292,8 g Glycine
121,1 g Trizma Base (Tris)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Lieferant
Amicon Ultra- 15 Zentrifugen-Filtern	Millipore, Billerica, USA
6-*well*-Platten, unbeschichtet	Nunc/Thermo Scientific, Langenselbold
Deckgläser (18x18 mm)	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen (4 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Falcon®-Röhrchen 15 ml	Becton Dickinson, USA
Falcon®-Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, USA
Gewebekulturschalen	Nunc/Thermo Scientific, Langenselbold
Hydrophoben-Stift	Immunotech, Marseille, FR
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventum, Belgien
µ-Dish 35mm, high with Culture-Insert	Ibidi GmbH, Martinsried
MicroAmp Fast Optical 96-*well* Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Cryoröhrchen 2 ml	Nunc/Thermo Scientific, Langenselbold
Membranfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
PVDF- Membran Immobilon-P	Millipore, Billerica, USA
Objektträger	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Objektträger SuperFrost/	Plus Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim
Parafilm „M”	American National Can, Greenwich
Pipettenspitzen	VWR, Hannover
PCR Reaktionsgefäß (200 µl)	Biozym, Oldendorf
Röntgenfilm Super RX	Fuji, Düsseldorf
Superfrost-Objektträger	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig

2.4 Geräte

2.4.1 Waagen

Feinwaage H54AR	Mettler-Toledo, Giessen
Oberschalenwaage PE360	Mettler-Toledo, Giessen

2.4.2 Schüttler und Mischgeräte

Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Vortex-Mixer Certomat MV	B.-Braun Biotech, Melsungen
Horizontalschüttler 3015	GFl, Haake, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

2.4.3 Zentrifugen

Evaporationszentrifuge SpeedVac®	Savant, NY, USA
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5810R (Kühlung)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotanta 96R	Hettich, Tuttlingen
Standzentrifuge RC 5C Plus	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Sorvall RC 5C Plus	Kendro, Hanau
Cytospin 3	Shandon®, Frankfurt a.M.

2.4.4 Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop DMRA	Leica, Solms
Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 B	Leica, Solms
Konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg

2.4.5 Gelanalyse-Systeme

Geldokumentation BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese-System Horizon 11.14	Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK
SDS-Page Mighty Small II SE250	Hoefer, San Francisco, USA
Western-Blot Mini Trans Blot™ Cell	BioRad, München

2.4.6 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System

Brutschrank (Begasung) Hera cell	Heraeus, Hanau
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau

2.4.7 Geräte für Arbeiten im prokaryotischen System

Brutschrank T5042 E	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler Multitron	Infors, Basel, Schweiz

2.4.8 Spannungsquellen

Power Pac 200	BioRad, München
Power Pac 3000	BioRad, München

2.4.9 Weitere Geräte

Kryotom CM 3050	Leica, Solms
Entwicklermaschine Classic E.O.S.	AGFA, Köln
FACS Aria BD	Biosciences, Heidelberg
FACS EPICS XL-MCL	Beckman Coulter, USA
Heizblock Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, UK
Heizblock compact	Eppendorf, Hamburg
Reinstwassersystem Milli-Q® Academic	MilliPore, Eschborn
PCR Cycler PTC 200	MJ Reserach, Massachusetts, USA
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo, Giessen
Real-Time PCR 7500 Fast System	Applied Biosystems, Darmstadt
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH,Erlangen
Spektrophotometer DU-600	Beckman Coulter, Krefeld

Tankblotapparatur Mini Trans Blot	BioRad, München
Wasserbad GFl	Haake, Karlsruhe

2.5 Kits

innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München
Lipofectamine™ Transfection Reagent	Invitrogen, Darmstadt
NucleoSpin Plasmid®	Macherey-Nagel, Düren
NucleBond PC500®	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy®Plus Micro	Qiagen, Hilden
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
High-Capacity cDNA Reverse Transcription	Applied Biosystems, Darmstadt
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
SuperSignal West Dura Extended Duration	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.6 Größenstandards

2.6.1 Protein-Größenstandards

SDS-7B Prestained SDS Molecular Weight Marker, #MWM-105A	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, #SM1812	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.6.2 DNA-Größenstandards

Gene Ruler 100bp DNA Ladder, #SM0311;	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler 1kb DNA Ladder, #SM0241	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.7 Plasmide

psPax2	Lentivirales Verpackungsplasmid der Zweiten Generation. Kodiert für die viralen Verpackungsproteine gag/pol und rev.

pVSV-G	Lentivirale Hüllproteine kodierendes Expressionsplasmid zur Produktion infektiöser Lentiviraler Vektoren.
pGIPZshRNAmir control vector RHS4346	Replikationsinkompetentes lentivirales Vektorkonstrukt welches zur Transkription eines bicistronischen *non-silencing* shRNAmir und TurboGFP Transkriptes führt. Stabil selektionierbar über Puromycin.
pGIPZshMetmir 2770	Replikationsinkompententes lentivirales Vektorkonstrukt welches zur Transkription eines bicistronischen shRNAmir Konstrukts gegen Met und TurboGFP Transkriptes führt. Stabil selektionierbar über Puromycin.

2.8 shRNA-Sequenzen

shMet 70 – 4053bp 5' CGCTACTTATGTGAATGTAAA 3' - 4073 bp

2.9 Oligonukleotide

Gen	Primer	Sequenz (5‘→ 3‘)	Anwendung
Cd24a	Cd24a-Q1	TGCTTCTGGCACTGCTCCTA	qRT-PCR
Cd24a	Cd24a-Q2	CCTCTGGTGGTAGCGTTACTT	qRT-PCR
Cdkn1a	mCdkn1a-Q1	GATCCACAGCGATATCCAGAC	qRT-PCR
Cdkn1a	mCdkn1a-Q2	ACCGAAGAGACAACGGCACAC	qRT-PCR
Crabp1	Crabp1-Q1	CAGCAGCGAGAATTTCGACGA	qRT-PCR
Crabp1	Crabp1-Q2	CGCACAGTAGTGGATGTCTTGA	qRT-PCR
Crabp2	Crabp2-Q1	ATGCCTAACTTTTCTGGCAACT	qRT-PCR
Crabp2	Crabp2-Q2	GCACAGTGGTGGAGGTTTTGA	qRT-PCR
Cyp26a1	Cyp26a1-Q1	CTCTCCAACCTGCACGATTC	qRT-PCR
Cyp26a1	Cyp26a1-Q2	CTTAGCCACTGCTCCAGACA	qRT-PCR
Epcam	Epcam-Q1	GAGTCCGAAGAACCGACAAGG	qRT-PCR
Epcam	Epcam-Q2	CTGATGGTCGTAGGGGCTTTC	qRT-PCR

Gapdh	Gapdh-NH-1	GGTGAAGGTCGGTGTGAAC	qRT-PCR
Gapdh	Gapdh-NH-2	GGGGTCTCGCTCCTGGAA	qRT-PCR
Hgf	mHGF-Q3	ACCATCAAGGCAAGGTGACT	qRT-PCR
Hgf	mHGF-Q4	CATCCACGACCAGGAACAAT	qRT-PCR
Hpn	Hpn-Q1	TGGGCCATTGTGACCATCCTA	qRT-PCR
Hpn	Hpn-Q2	TCCGTCTTGTCCAACACTGC	qRT-PCR
Igfbp2	Igfbp2-Q1	CAGACGCTACGCTGCTATCC	qRT-PCR
Igfbp2	Igfbp2-Q2	CCCTCAGAGTGGTCGTCATCA	qRT-PCR
Itga6	Cd49f-Q1	AGAGGGCGAACAGAACAGG	qRT-PCR
Itga6	Cd49f-Q2	ACGTGCTGCCGTTTCTCAT	qRT-PCR
Krt14	Krt14-Q1	CAGAGCGGCAAGAGTGAGAT	qRT-PCR
Krt14	Krt14-Q2	TGCCGATCATCTCCTGGATCT	qRT-PCR
Ly6a	Sca1-Q1	AGGAGGCAGCAGTTATTGTGG	qRT-PCR
Ly6a	Sca1-Q2	CGTTGACCTTAGTACCCAGGA	qRT-PCR
Met	MetTKD-S1	CCCGAATTCCAAGCAGTTCAGCACGTAGT	PCR
Met	MetTKD-S2	CTGGGATCCGTTCACGTGGACGTAGTGTTC	PCR
Met	Met-Seq-KG1	GACTTCAGCCATCCCAATGTTCTC	Sequenzierung
Met	Met-Seq-KG2	TTCGCAGATCTCCATGCTTC	Sequenzierung
Met	Met-Seq-KG3	GGTGCCAAGCTACCAGTAAAGTG	Sequenzierung
Met	Met-Seq-KG4	GTTTGTCCACAGAGACTTAGCTGC	Sequenzierung
Met	Met-JMD1	GGTCCAATCACTACGTGCTGAAC	Sequenzierung
Met	Met-JMD2	TTCGCTATGACGCAAGAGTACAC	Sequenzierung
Met	Met-SemD1	CCATCCAGAATGTCGTCCTACAC	Sequenzierung
Met	Met-SemD2	GTCCAGGAGGAAGTTCACATGAG	Sequenzierung
Met	Met-SemD3	CATGGCTCTGCTTGTTGACAC	Sequenzierung
Met	Met-SemD5	ATATCCTCCAAGCCGCGTATG	Sequenzierung
Met	Met-SemD6	AACTCTTCCGGCTGTGAAGCG	Sequenzierung
Met	Met-SemD7	GAAGGACATGCCGCTGGCAAGT	Sequenzierung
Met	NH-Met-1	CAACGTGAGATGTCTCCAGC	qRT-PCR
Met	NH-Met-2	GCGACCTTCTGACGTCCCT	qRT-PCR
Met	Met-SemD4	ATCGGTGAGACGGCTGAAGGA	Sequenzierung
Muc1	Muc1-Q1	GGCATTCGGGCTCCTTTCTT	qRT-PCR
Muc1	Muc1-Q2	TGGAGTGGTAGTCGATGCTAAG	qRT-PCR
Plau	Plau-Q1	CCTTCAGAAACCCTACAATGCC	qRT-PCR
Plau	Plau-Q2	CAAACTGCCTTAGGCCAATCT	qRT-PCR
Rarb	Rarb-Q1	CACTAGGAACCGATGCCAGTA	qRT-PCR
Rarb	Rarb-Q2	CCGCTGTCATCTCATAGCTCT	qRT-PCR
Rbp1	Rbp1-Q1	CTGAGCAATGAGAATTTCGAGGA	qRT-PCR
Rbp1	Rbp1-Q2	GCGGTCGTCTATGCCTGTC	qRT-PCR

Rbp7	Rbp7-Q1	CTGGTTACCTGGGAGAATGACA	qRT-PCR
Rbp7	Rbp7-Q2	GGCCTTCGCAGAACATTTCC	qRT-PCR
Sox10	Sox10-Q1	ACACCTTGGGACACGGTTTTC	qRT-PCR
Sox10	Sox10-Q2	TAGGTCTTGTTCCTCGGCCAT	qRT-PCR
St14	St14-Q1	GCGGGACTCAAGTACAACTCC	qRT-PCR
St14	St14-Q2	CATTCCGATAATGGAAGTGCCA	qRT-PCR
SV40LTag	SV40LTag-Q1	TCCTGGCTGTCTTCATCATC	qRT-PCR
SV40LTag	SV40LTag-Q2	TACAGACCTGTGGCTGAGTT	qRT-PCR
Tes	Tes-Q1	CTGCCAAGAAGAACGTCTCC	qRT-PCR
Tes	Tes-Q2	CAGCTGCTTCTTCCGGTACT	qRT-PCR
Thy1	Thy1-Q1	CAAGGTCCTTACCCTAGCCAA	qRT-PCR
Thy1	Thy1-Q2	CCAGCTTGTCTCTATACACACTG	qRT-PCR
Twist2	Twist2-Q1	GGCCGCCAGGTACATAGAC	qRT-PCR
Twist2	Twist2-Q2	GTAGCTGAGACGCTCGTGA	qRT-PCR
Upp1	Upp1-Q1	ACAGGAACTGAAGCAAAGGAC	qRT-PCR
Upp1	Upp1-Q2	GTTGAAATGGTAGAGCACGTCTT	qRT-PCR
Vim	Vim-Q1	CGGCTGCGAGAGAAATTGC	qRT-PCR
Vim	Vim-Q2	CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG	qRT-PCR
Wap	mWap-Q1	CGCTCAGAACCTAGAGGAACA	qRT-PCR
Wap	mWap-Q2	CGGGTCCTACCACAGGAACC	qRT-PCR

2.10 Versuchstiere

Die Tiere wurden gemäß offizieller Regeln für Labortiere unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen in einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus bei Futter und Wasser *ad libitum* in der tierexperimentellen Einrichtung des Heinrich-Pette-Institutes gehalten. Alle Tierversuche und Organentnahmen wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg genehmigt. Zu Versuchszwecken wurden Tiere der Mausstämme Balb/c und Balb/c WAP-T-NP8 (Schulze-Garg et al., 2000) aus institutseigener Züchtung verwendet. Die Mäuse des Balb/c Inzucht-Stammes wurden ursprünglich im Jackson Labor entwickelt (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Die weiblichen Tiere wurden ab Tag 30 nach Absetzten des Nachwuchses, bzw. unverpaart für die Experimente eingesetzt.

2.11 Eukaryotische Zellen

293T	humane Nierenepithelzellen, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurden und das SV40 large T-Antigen exprimieren. Zur Verf. gestellt von C. Stocking (HPI). Kultivierung in *DMEM* mit 10% FCS. (DuBridge et al., 1987) Als Produktionszelllinie für infektiöse lentivirale Vektoren genutzt**.**
BALB/3T3 clone A31	aus Balb/c Mausembryofibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie; ATCC: #CCL-163. Kultivierung in *DMEM* mit 10% FCS. (Aaronson and Todaro, 1968) Als Negativ-Kontrolle für alle eingesetzten Met-Antikörper genutzt.
G-2	aus einem Mammakarzinom einer WAP-T1-H22 Maus gewonnene heterogene Zellkultur mit EMT-Charakter und Tumorstammzelleigenschaften sowie stabiler Expression des SV40 *large* T-Antigens (Wegwitz et al., 2010). Zur Verf. gestellt von G. Tolstonog (HPI). Kultivierung in DMEM mit 10% FCS. (Krepulat et al., 2005)
G-2C9	Subklon der parentalen G-2 Zellkultur mit vergleichbaren Eigenschaften. Etabliert und zur Verf. gestellt von MA. Kluth (Wegwitz et al., 2010).
HeLa	Immortalisierte humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms. Durch die Expression des Met-Rezeptors als Kontrollzelllinie zur Überprüfung der Hgf-Responsiveness geeignet.

mKSA	Mit SV40-transformierte BALB/c Maus Fibroblasten (Kit et al., 1969).

2.12 Prokaryotische Zellen

***E.coli* DH5α**	F-; *end*A1, hsdR17(rk-, mk+); supE44; thi-1; λ-; recA1; gyrA96; relA1; Δ[argF-lacZYA]U169; [Φ80dlacZM15] (Hanahan, 1983)

2.13 Antikörper

<u>Primärantikörper unkonjugiert</u>

Anti-p-Met (Tyr1349-R)	Antikörper aus Kanninchen, polyklonal Antigen: phosphoryliertes Tyr 1349 des humanen Met-Proteins, Santa Cruz, #sc-34086-R IF: 1:100, WB: 1:500
Anti-Met (B2)	Antikörper aus Maus, monoklonal Antigen: Epitop zwischen AS 1350-1379 des murinen Met C-terminus Santa Cruz, # sc-8057 IF: 1:100, WB: 1:500
Anti-Hgf-Rezeptor	Antikörper aus Ziege, polyklonal Antigen: Extrazelluläre Domäne von rekombinantem murinen Met Gen Tex Inc., # GTX10681 IF: 1:100, WB: 1:1000
Anti- HGF (H-170)	Antikörper aus Kanninchen, polyklonal Antigen: AS 1-170 des humanen *Hepatocyte Growth Factors (HGF)* Santa Cruz, # sc-13087 IF: 1:100, WB: 1:500

Anti- HGF (rmHgf)	Antikörper aus Ziege, polyklonal, Antigen: Rekombinantes murines Hgf R&D Systems, #AF2207 IF: 1:100, WB: 1:500
Anti-HSC70 (K19)	Antikörper aus Ziege, polyklonal, Antigen: C-terminus von humanem HSC70 Santa Cruz, # sc-1059 WB: 1:1000
Anti-Rbp7	Antikörper aus Kanninchen, polyklonal, Antigen: Rbp7 Fusionsprotein Acris, #14541-1-AP WB: 1:1000
Anti-P27	Antikörper aus Kanninchen, polyklonal, Antigen: Synthetisches Peptid der C-terminalen Region des humanen p27. Thermo Fisher Scientific, # RB-9019 WB: 1:1000

Primärantikörper-Fluorochrom konjugiert

Anti-CD 90.2 (Thy1)	Antikörper aus Ratte, monoklonal Antigen: Aus Maus Thymus oder Milz, Konjugat: APC BioLegend, # 105312
Anti-c-Met (Hgf Rezeptor)	Antikörper aus Ratte, monoklonal Antigen: Murines Met-Ig Fusionsprotein, Konjugat: PE BioLegend, # 105312
Anti-Epcam	Antikörper aus Ratte, monoklonal Antigen: aus Thymus Epithelzellen der Linie TE-71,Konjugat: APC BioLegende, # 118214

Sekundärantikörper – Fluorochrom-gekoppelt

Esel anti Maus	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 555, Mol. Probes, # A-31570 IF: 1:500
Esel anti Maus	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 488, Mol. Probes, # A-21202 IF: 1:500
Esel anti Kanninchen	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 555, Mol. Probes, # A-21429 IF: 1:500
Esel anti Kanninchen	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 488, Mol. Probes, # A-21206 IF: 1:500
Esel anti Ziege	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 555, Mol. Probes, # A-21432
Esel anti Ziege	IgG (H+L), konjugiert mit Alexa 488, Mol. Probes, # A-11055 IF: 1:500
Esel anti Ziege	IgG (H+L) Konjugiert mit IRDye680 LI-COR # 926-32224 WB: 1:5000

Esel anti Kanninchen	IgG (H+L) Konjugiert mit IRDye800CW LI-COR # 926-32213 WB: 1:5000

Sekundärantikörper – Enzym gekoppelt

Esel anti Ziege	IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase, Biomol, Hamburg WB: 1:5000
Esel anti Kaninchen	IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase, Biomol, Hamburg WB: 1:10.000
Esel anti Maus	IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase, Biomol, Hamburg WB: 1:10.000

2.14 Fluoreszenzfarbstoffe für die DNA Färbung

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DRAQ5™	Biostatus, Shepshed, UK
TO-PRO3™	Invitrogen, Darmstadt

2.15 Enzyme/dNTPs

Benzonase	Merck, Darmstadt
DnaseI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Fraktion V)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNaseA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin
dNTPs	Eppendorf, Hamburg

2.16 Computer-Software, Datenbanken und verwendete Web-Seiten

MS Office (Word, Excel)	Microsoft, USA
7500 Fast System v1.4.0	Applied Biosystems, USA
LSM 5 Image Browser	Zeiss, Göttingen
Clone Manager 5	Scientific & Educational Software,USA
Imaris 4.1.3	Bitplane AG, Schweiz
Huygens Essential 2.7.2p0	Scientific Volume Imaging, Holland
Jalview 2.7	(Waterhouse et al., 2009)
dChip	http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip
Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
PubMed NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Primer Bank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/
PlasMapper	http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper

3. METHODEN

3.1 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

3.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen in Flüssigmedium

Die Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium diente der Produktion größerer Bakterienmengen zur Plasmidisolation. Die Kultivierung fand in LB-Medium statt, welches bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt wurde. Für eine Plasmid-Maxipräparation wurden 200 ml LB-Selektionsmedium mit 5 ml einer Übertagkultur angeimpft. Die Kulturen wurden ÜN bei 37° im Schüttler bei 140 U/min inkubiert.

3.1.2 Anlegen von Glycerindauerkulturen

Zur Langzeitlagerung transformierter Bakterien wurden 800 µl Bakterienkulturen mit 200 µl Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.1.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA dient zur Isolation größerer Mengen qualitativ hochwertiger Plasmide zur Verwendung für weitere Versuche. Hierfür wurde das *Plasmid DNA purification kit Nucleobond PC500®* der Firma Macherey Nagel verwendet. Die Plasmidisolation basiert auf dem Aufschluss der Bakterien durch alkalische Lyse und der anschließenden Bindung und Isolation der Plasmid-DNA durch Anionenaustausch-Chromatographie.

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen - Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit auf 37°C vorgewärmten Lösungen und Medien und unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus HERA safe) durchgeführt. Alle Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus HERAcell CO_2-Inkubator) bei 37°C, 5% CO2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen (2D-Kultur)

Die adhärent wachsenden Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in 10 cm Ø Zellkulturschalen (Nunclon™ Δ Surface, Nunc) in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) versetzt mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 2 – 3 Tage passagiert und in Verhältnissen von 1:3 bis 1:5 verdünnt. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Behandlung des Zellrasens mit Trypsin/EDTA Lösung. Das Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 3 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und eine kurze Inkubation im Brutschrank, bis sich der Zellrasen löste. Der Gesamtzellansatz wurde mit 8 ml Medium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml gebracht und bei 300 x g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Pellets in vorgewärmtem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in neuen Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.1.2 Kultivierung von verankerungsunabhängig wachsenden Zellen in Methylzellulose

Die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum in Methylzellulose oder Weichagar ist eine spezifische Eigenschaft von Tumorzellen. Das *in vitro* Wachstum von Zellkolonien ohne die Bindung der einzelnen Zellen an eine etwaige Matrix lässt eine Abschätzung des tumorigenen Potentials maligner Zellen *in vivo* zu. Die Methylzellulose-Stock-Lösung der Firma R&D Systems wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen wurde die Flasche kräftig geschüttelt um eine ausreichende Durchmischung der Einzelkomponenten zu gewährleisten. Eine einstündige Inkubation bei 4°C ermöglicht das Entweichen der entstanden Luftblasen, um die Methylzellulose dann luftblasenfrei mittels Spritze und Kanüle in 15ml Falcons a 9 ml Volumen zu aliquotieren. Die Aliquoten wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Verwendung der Aliquoten wurden diese ebenfalls bei 4°C über Nacht aufgetaut und am nächsten Tag nach erneutem Durchmischen und entweichen der Luftblasen je 3 ml in 3x 15 ml Falcons überführt. Die Methylcellulose wurde mit je 2 ml DMEM/10% FCS und 1x fach Penicillin/Streptomycin sowie je nach Experimentellem Ansatz mit weiteren Reagenzien versetzt und gründlich durchmischt. In der Zwischenzeit wurden die zuvor über Trypsin vereinzelten (siehe Abschnitt 3.2.1.1) oder bereits FACS-sortierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.12), gezählt, pelletiert und in einem adäquaten Volumen DMEM/10% FCS aufgenommen. Es wurden je $3x10^4$ Zellen auf die vorbereiteten Methylzellulose-Ansätze pipettiert und durch

vortexen und invertieren gründlich im viskösen Medium verteilt. Nach dem Entweichen der entstandenen Luftblasen wurde das Methylzellulose-Zellgemisch gleichmäßig auf drei *wells* einer unbeschichteten 6 *well*-Platte der Firma Nunc aufgeteilt. Die fehlende Beschichtung der Oberfläche unterbindet das Anheften der Zellen am Boden der Zellkulturschale. Dieses gewährleistet auch bei eventuellem Absinken oder aktivem Wandern der Zellen ein verankerungsunabhängiges Wachstum. Die Bildung von Kolonien wurde über maximal 4 Wochen verfolgt und regelmäßig fotographisch dokumentiert.

Es wurden drei experimentelle Ansätze durchgeführt. Zum einen wurden G-2C9 Zellen mit shMet- oder Kontroll-shRNA-kodierenden Lentiviren transduziert und selektioniert, und auf ihr verankerungsunabhängiges Wachstum untersucht. Hierbei wurde der Methylzellulose DMEM/10% FCS inklusive 5 µg/ml Puromycin zugesetzt. Das Antibiotikum Puromycin führt zu einem Selektionsdruck innerhalb der Zellen, welcher das Wachstum von Zellen ohne die Expression der shRNA und der damit verbundenen Expression des Puromycin-Resistenzsgens, verhindert.

Zum anderen sollte die Fähigkeit zur Koloniebildung von G-2C9 Zellen, die entweder mit einem Met-Tyrosinkinasedomäne-Inhibitor PHA-665752 oder mit einer entsprechenden Menge DMSO behandelt wurden, untersucht werden. Dafür wurden 4 µl einer 100 mM Stocklösung mit den 2 ml DMEM/10% FCS versetzt und zusammen unter die Methylzellulose gemischt. Im dritten experimentellen Ansatz wurden G-2C9 Zellen nach Durchflusszytometrischer Sortierung anhand ihrer Met-Expression in Met-positive (Met^+) und Met-negative (Met^-) Subpopulationen getrennt. Diese Zellen wurden direkt nach dem Sort gezählt und ohne Zugabe weiterer Reagenzien in der oben genannten Konzentration mit der Methylzellulosemischung versetzt. Als Kontrolle wurde eine sortierte Mischpopulation aller lebenden G-2C9 Zellen ebenfalls unter den gleichen Bedingungen in Methylcellulose ausgesät.

3.2.2 Analyse der Zellmotilität mittels *scratch-assay*

Der *in vitro scratch-assay* ist eine gut etablierte Methode, um die Motilität von Zellen unter Zellkulturbedingen zu untersuchen. Die Methode basiert darauf, einen zellfreien Spalt innerhalb eines geschlossenen Zellrasens zu erzeugen um dann zu definierten Zeitpunkten die Migration einzelner Zellen oder Zellverbände zu beobachten und zu dokumentieren. Mit dieser Methode lässt sich der Einfluss verschiedener experimenteller Manipulationen auf die Beweglichkeit von Zellen verfolgen und gleichzeitig mit der, nicht manipulierter Kontrollzellen vergleichen. Ein

Vorteil dieser Methode gegenüber anderen bekannten Migrationsassays, wie z.B. *Boyden-Chamber*-Experimenten liegt darin, dass die Zellen nicht zunächst vereinzelt und in Suspension genommen werden müssen, sondern dass die Zellen intakte Zell-Zell-Kontakte sowie eine intakte Extrazelluläre Matrix vorweisen, die das Migrationsverhalten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* entscheidend beeinflussen. Aus diesem Grund spiegelt dieser Migrations-Assay, auch Wundheilungs-Assay genannt, die *in vitro* Situation wie z.B. das einwandern von Endothezellen nach der Verletzung eines Blutgefäßes, recht gut wieder.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Met-Signalweges auf die Motilität der G-2C9 Zellen untersucht. Dazu wurden (I) Zellen entweder durchflusszytometrisch in Met^+, Met^- oder eine Mischpopulation der lebenden Gesamtkultur sortiert, (II) Zellen mit einem spezifischen Met-Tyrosinkinase-Domänen-Inhibitor PHA-665752 oder dessen Solvent DMSO behandelt, oder (III) Zellen stabil mit shRNA gegen Met oder *non-silencing* shRNA transduziert und in das Insert einer µ-Dish Zellkulturschale von Ibidi ausgesät. Die Zellen wurden bis zu einer Konzentration von $5*10^5$ Zellen/ml verdünnt und davon jeweils 70 µl pro *well* eines µ-*dish* Einsatzes ausgesät und über Nacht bis zur 100% Konfluenz kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde der Einsatz der Zellkulturschale entfernt und der Nullpunkt der Zellwanderung fotografisch dokumentiert. Die Migration wurde daraufhin im Abstand von jeweils 24 Stunden, bis zum vollständigen Verschluss des Spaltes, dokumentarisch festgehalten. Die Behandlung der Zellen mit PHA-665752 bzw. DMSO erfolgte einmalig zum Zeitpunkt 0 der Dokumentation am Tag der Entfernung des Einsatzes um eine einheitliche Zelldicht zu Beginn des Experiments zu gewährleisten.

3.2.3 Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung und zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeiten von (I) durchflusszytometrisch sortierten Met^+ und Met^- Zellen der G-2C9 Kultur, (II) stabil mit shRNA gegen Met oder einer non-silencing shRNA transduzierten G-2C9 Zellen oder (III) G-2C9 Zellen die mit PHA-665752 oder mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, wurden die entsprechenden Zellen a 1×10^5 Zellen pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. Zellen die mit PHA-665752 bzw. DMSO behandelt werden sollten wurden direkt in PHA-665752 bzw. DMSO haltigem Medium ausgesät. Die Medien aller Zellen wurden während der Versuchsreihe nicht gewechselt, es erfolgte ebenfalls keine erneute Zugabe des PHA-665752 Inhibitors. Die Zellen wurden nach 24, 48, 72, 96, 168 und 196 Stunden mittels Trypsin vereinzelt und gezählt. Die mit

PHA-665752 bzw. DMSO behandelte Versuchsreihe wurde im Doppelansatz durchgeführt und zur Herstellung von Proteinlysaten in 200 µl SDS-Lysepuffer auf Eis lysiert und nach dem etablierten Protokoll über SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert (siehe Abschnitt 3.6.).

3.2.4 Behandlung von Zellen mit dem Met-TKD-Inhibitor PHA-665752

PHA-665752 ist ein klein molekularer, direkt an der Kinasedomäne mit ATP konkurrierender Inhibitor der katalytischen Aktivität des c-Met Rezeptors. Die Behandlung verschiedener Krebs-Zelllinien führte zu einer Reduktion der Proliferation und Motilität sowie unter Umständen zur Apoptose der behandelten Zellen (Christensen et al., 2003; Smolen et al., 2006).
Der Met-TKD-Inhibitor PHA-665752 wurde als 1 mM Stocklösung in sterilem DMSO angesetzt und in Aliquoten von 20 µl bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Die zur vollständigen Inhibition der katalytischen Aktivität von Met notwendige minimale Konzentration wurde durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen des Inhibitors und die anschließende Überprüfung der Phosphorylierung von Met an Tyrosin 1347 (entspricht Tyr 1349 beim Menschen) über Western-Blot-Analyse ermittelt. Im Folgenden wurde für alle Versuche die Konzentration von 1 µM Inhibitor eingesetzt. Die Inhibitorstocklösung wurde 1:1000 in DMEM/10% FCS verdünnt eingesetzt. Die Kontrollzellen wurden mit derselben Verdünnung von DMSO in DMEM/10% FCS inkubiert.
Zur Probenvorbereitung für die Isolation von RNA oder Proteinen wurden die G-2C9 Zellen am Tag vor der Inhibitor-Behandlung als Triplikate in einer Dichte von 1x 10^5 Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und entweder durch die das Inhibitor oder DMSO enthaltende Medium ersetzt. Die Inkubation der Zellen betrug 24 oder 72 Stunden. Im Anschluss daran wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.5.4 bzw. 3.6.1 beschrieben geerntet und deren RNA isoliert, welche nach Reverser Transkription mittels qRT-PCR analysiert wurde (siehe Abschnitte 3.5.5 und 3.5.8) bzw. deren Proteine mittels Western-Blot analysiert (sieh Abschnitt 3.6.2). Die Einzelheiten der Inhibitor-Behandlung im Rahmen des Scratch-Assays, des Methylzellulose-Assays und der Proliferations- bzw. Proteinexpressions Zeitreihe sind den einzelnen Abschnitten zu entnehmen.

3.2.5 Behandlung von Zellen mit Retinsäure oder Retinsäure und Met-Inhibitor

Retinsäure (RA) ist ein Vitamin-A Derivat und entscheidend an der Differenzierung verschiedener Stammzellen beteiligt. Der Großteil der durch RA verursachten Zellantwort wird durch nukleäre RAR- und RXR- Rezeptoren vermitteln. Der Retinsäure-Signalweg wird schon häufig während der frühen Phasen der Tumorentwicklung außer Kraft gesetzt, weshalb vermutet wird, dass eine Reduktion des RA-Signalweges zur Entwicklung des Tumors notwendig ist. Einige Tumorarten sprechen recht gut auf die Behandlung mit RA an, da RA die Differenzierung induzieren und den Stopp der Proliferation veranlassen kann.
Die 9-cis-Retinsäure (RA) wurde als $1x10^{-4}$ M Stocklösung in sterilem DMSO angesetzt und in Aliquoten von 1ml bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren.
Die RA-Stocklösung wurde 1:1000 in DMEM/10% FCS verdünnt eingesetzt. Im Folgenden wurde für alle Versuche die Konzentration von 100 nM RA bzw. eine Kombination aus 100 nM RA und 1 µM Met-TKD-Inhibitor PHA-665752 eingesetzt. Die Kontrollzellen wurden mit derselben Verdünnung von DMSO in DMEM/10% FCS inkubiert.
Zur Probenvorbereitung für die Isolation von RNA oder Proteinen wurden die G-2C9 Zellen am Tag vor der RA bzw. RA + PHA-665752- Behandlung als Triplikate in einer Dichte von $1x\ 10^5$ Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und entweder durch die das RA, RA + PHA-665752 oder DMSO enthaltende Medium ersetzt. Die Inkubation der Zellen betrug 72 Stunden. Im Anschluss daran wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.5.4 bzw. 3.6.1 beschrieben geerntet und deren RNA isoliert, welche nach reverser Transkription mittels qRT-PCR analysiert wurde (siehe Abschnitte 3.5.5 und 3.5.8).

3.2.6 Langzeit-Kultivierung der behandelten Zellen

Die Zellen wurde unter den in Abschnitt 3.2.4 und 3.2.5 beschriebenen Bedingungen in DMEM/10% FCS mit RA, PHA-665752, RA + PHA-665752 oder DMSO kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen nach dem in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenem Protokoll passagiert und direkt in frischem Medium inkl. der entsprechenden Zusätze ausgesät. Wiesen die Zellen keine ausreichende Konfluenz auf so wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in frisch angesetztem Medium inkl. Zusätzen weiterkultiviert. Die Zellen wurden über 14 Tage in Kultur gehalten und deren Morphologie regelmäßig durch Fotos dokumentiert. Nach 14-tägiger Kultur

wurde ein Teil der Zellen per FACS-Analyse (siehe Abschnitt 3.2.12.1) untersucht. Die verbleibenden Zellen wurden nun für weiter 7 Tage ohne Zugabe von Zusätzen in frischem DMEM/10% FCS kultiviert und in dieser Zeit mehrfach passagiert. Nach 7 Tagen Regenerationszeit wurden die Zellen erneut per FACS-Analyse untersucht.

3.2.7 Fixieren von Zellen auf Objektträgern durch Zentrifugation

Um Zellen direkt nach der durchflusszytometrischen Sortierung oder enzymatischer Entfernung des extrazellulär gebundenen Hgfs durch Trypsin mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung untersuchen zu können, wurden die vereinzelten Zellen per Zentrifugation direkt auf einen Objektträger aufgebracht. Die Zellsuspension wurde auf $1x10^5$ Zellen in 200 µl PBS verdünnt und bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Objektträger zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen gemäß Abschnitt 3.3.1 auf die Expression bestimmter Proteine untersucht.

3.2.8 Überprüfen der Aktivierbarkeit von Met in den G-2C9 Zellen durch Zugabe von Hgf

Dieser Versuchsansatz dient zur Bestimmung der sog. *Hgf-Responsiveness*, also der Anregbarkeit der katalytischen Met-Aktivität durch die Zufuhr von rekombinantem Hgf. Es wurden je $1x10^5$ HeLa bzw. G-2C9 Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte in DMEM/10% FCS ausgesät. Um sicherzustellen, dass der Met-Rezeptor nicht durch eventuell im FCS enthaltenes Hgf aktiviert wird, wurden die Zellen am Tag nach der Aussaat für weitere 48 Stunden in DMEM ohne FCS kultiviert. Das rekombinante Hgf wurde in einer Endkonzentration von 40 ng/ml mit DMEM/10% FCS verdünnt und in je 5 *wells* der 6-*well*-Platten gegen das FCS-freie Medium ausgetauscht. Das Medium des jeweils verbleibenden *wells* wurde durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt und unmittelbar als Hgf-Nullwert der beiden Versuchsreihen geerntet. Die restlichen Proben wurden 7,5, 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Hgf Zugabe geerntet. Die Probenentnahme und Proteinisolation erfolgte wie in Abschnitt 3.6.1 für die Herstellung von Zellextrakten in NP40-Puffer beschrieben.

3.2.9 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der trypsinierten und in 1 ml Medium resuspendierten Zellen 1:1 mit Trypanblau-Lösung vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der resultierende Mittelwert (MW) zur Berechnung der Zellzahl pro ml verwendet:

1) MW-Zellzählung*10^4 Zellen/ml * 2 Verdünnungsfaktor = Zellzahl/ml

3.2.10 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren eukaryotischer, adhärenter Zellen wurden diese zunächst trypsiniert (siehe Abschnitt 3.2.1.1), in 8 ml Medium aufgenommen und bei 300 x g für 5 Minuten und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde der Gesamtansatz in Kryoröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen während des Kühlungsprozesses, jedoch hat der Einfriervorgang selbst starke physiologische Auswirkungen zur Folge. Zur Minimierung des mechanischen Stresses wurden die Zellen in einer Styroporbox vorerst bei –80°C weggefroren. Styropor wirkt dabei isolierend, so dass ein langsamer Kühlungsprozess gewährleistet ist. Zur Konservierung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingelagert (-196°C).
Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden diese bei 37°C im Wasserbad möglichst schnell erwärmt, um die schädigende Wirkung des DMSO zu minimieren. Zur Entfernung von DMSO wurde die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen und bei 300 x g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Medium aufgenommen und die Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät.

3.2.11 Transiente Transfektion von DNA

Unter einer transienten Transfektion, versteht man das vorübergehende Einschleusen fremder DNA in eine eukaryotische Zelle.

3.2.11.1 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) ist ein kationisches Polymer, welches im Gegensatz zu Lipiden keine hydrophoben Reste besitzt und demzufolge wasserlöslich ist. Polyethylenimine gehören zu den Dendrimeren, also positiv geladenen, stark verzweigten Polymeren. Diese formen positiv geladene, sphärische Kugeln die in der Lage sind, sich an der Plasmid-DNA anzulagern und diese zu komplexieren. Diesen DNA-Dendrimer-Komplex nehmen die Zellen endozytotisch auf. Im Allgemeinen wird diese Methode der Transfektion durch kationische Polymere von den Zellen besser vertragen als die kationische Lipofektion.
Die transiente Transfektion mit PEI wurde zum einschleusen von Verpackungsplasmiden und lentiviralen Vektoren zur Produktion von Viruspartikeln eingesetzt (siehe Abschnitt 3.7). Für die Transfektion der Produktionszelllinie 293T wurden die Zellen bis zu einer 50%igen Konfluenz unter Standardbedingungen (Ø 10cm Zellkulturschale) kultiviert. Es wurden 1 ml DMEM ohne FCS in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß vorgelegt. Die Plasmide wurden gemäß Tabelle 1 zugegeben und mit 70 µl PEI nach kurzer Zentrifugation für 10 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Platten abgenommen und durch 6 ml frisches DMEM/10%FCS ersetzt und mit dem Plasmidgemisch versetzt.
Der virale Überstand wurde nach 72 Stunden geerntet und mit einem Filter der Porengröße 45 µm steril filtriert. Die Überstände wurden entweder direkt für die Transduktion der Zielzellen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

Tabelle 1: Übersicht über die transfizierten Plasmide

Konzentration	Plasmid	
1µg	pVSV-G	+ **PEI 70µl 1mg/ml**
5µg	psPAX2	
5µg	pGIPZshRNA Kontrolle oder pGIPZshMet	

3.2.12 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Erfassung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, und ermöglicht eine schnelle und genaue Multiparameter-Bestimmung und Sortierung verschiedener Zelltypen und Subpopulationen von Zellen in Suspension (Shapiro, 2003). Dafür werden entweder charakteristische Oberflächenproteine mit einem fluoreszierendem Antikörper markiert (siehe

Abschnitt 3.2.12.1), die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert, oder die Fluoreszenz von Proteinen nachgewiesen, die von den Zellen selbst produziert wird, wie z.B. TurboGFP (siehe Abschnitt 3.2.12.2). Dafür werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge tropfenweise vorbeigeführt. Die Zellen werden dazu in einer Kammer (*flow chamber*) durch eine feine Nadel als Probenstrom (*core*) in die Mitte eines breiten Mantelstroms (*sheat*) injiziert. Über eine sich verjüngende Düse (*nozzle*) verlassen die Zellen die Kammer, fliegen tropfenweise mit hoher Geschwindigkeit (ca. 10 m/s) am Beobachtungs- bzw. Abfragepunkt durch einen Laserstrahl hindurch und landen schließlich in einem Auffangbehälter. Während die Zellen den Abfragepunkt passieren, treten sie in Wechselwirkung mit dem Anregungslicht. Das daraufhin von den Zellen ausgestrahlte Streu- und Fluoreszenzlicht wird durch Detektorsysteme erfasst und gibt Aufschluss über die verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zelle. Diese Streuung wird von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht, engl. *sideward scatter*, SSC) Linse gesammelt und photometrisch detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Anhand dieser Kriterien wird die gewünschte Zellpopulation ausgewählt und im Folgenden weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

Jede einzelne Zelle kann im Rahmen einer zweidimensionalen Punktwolkendarstellung (*dot plot*) anhand ihrer x- und y- Signalintensität als einzelner Punkt dargestellt werden. Anhand dieser Darstellungen können Zellen mit bestimmten Parametern durch das Legen sog. *gates* ausgewählt werden.

Anhand dieser vorgegebenen Grenz-Parameter, die in Abhängigkeit spezifischer Eigenschaften wie z.B. der Intensität des Fluoreszenzsignal von TurboGFP, oder der eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers gewählt wurden, bekommen diese Zellen kurz nach dem Tropfenabriss von den seitlich angebrachten Deflektoren einen elektrischen Puls, werden somit in ihrer Flugbahn verändert und können demzufolge in verschiedene Auffangbehälter getrennt einsortiert werden.

3.2.12.1 Durchflusszytometrie zur Erfassung der Expression von spezifischen Oberflächenmarkern

Die durchflusszytometrische Erfassung der Expression bestimmter Oberflächenproteine wie z.B. des Met Rezeptors oder des Oberflächenantigens Thy1 ermöglicht die genaue Bestimmung der Anzahl an Zellen die ein bestimmtes bzw. eine Kombination verschiedener Oberflächenproteine tragen. Gleichermaßen kann die Intensität der Proteinexpression und die Verteilung der positiven Zellen über die Gesamtkultur sowie schlussendlich die Sortierung von Zellen anhand der definierter Expression bestimmter Marker erfolgen. Die G-2C9 Zellen wurden sowohl zur Analyse, als auch zur Zellsortierung nach dem gleichen Protokoll vorbereitet. Eine oder mehrere 10 cm Ø Zellkulturschalen wurden zunächst nach dem herkömmlichen Protokoll vereinzelt und gezählt (siehe Abschnitte 3.2.1.1 und 3.2.9). Nach Zentrifugation der Zellen bei 300 x g und Raumtemperatur wurden die Zellen in vorgewärmten PBS mit einer Endkonzentration von $1x10^6$ Zellen/ml resuspendiert. 100 µl der Zellsupension wurde in ein 1 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und die Zellen, genau wie die verbleibende Zellsuspension bei 300 x g und Raumtemperatur pelletiert. Das kleinere Pellet wurde als ungefärbte Kontrolle in 100 µl 0,5% BSA/PBS aufgenommen. Dass verbleibende Zellpellet wurde in einer der Zellzahl entsprechenden Menge Antikörpermischung in einem 15 ml Röhrchen resuspendiert. Es wurden pro $1x\ 10^6$ Zellen 100 µl 0,5% BSA/PBS mit 1 µl Met-PE oder, bzw. und 1,5 µl Thy1-APC Antikörpern vermischt. Die Inkubation der Zellen erfolgte auf einem Orbitalschüttler für 20 Minuten im Brutschrank. Im Anschluss wurden die gefärbten Zellen drei Mal mit 10 ml PBS gewaschen. Die ungefärbten Kontrollzellen wurden in ca. 200 µl PBS aufgenommen, die gefärbten Zellen je nach Größe des Pellets in bis zu 800 µl PBS. Die Zellsuspensionen wurden durch ein Gitter zu Vereinzelung der Zellen in ein 4 ml FACS-Röhrchen überführt und der Analyse bzw. Zellsortierung zugeführt.

3.2.12.2 Durchflusszytometrie zur Erfassung der TurboGFP-Expression

Die durchflusszytometrische Erfassung der TurboGFP-Expression der transduzierten Zellen bietet gegenüber der optischen Analyse im Fluoreszenzmikroskop einige Vorteile. So können zum einen bereits schwach positive Zellen, die am Mikroskop nicht als positiv wahrgenommen werden, detektiert werden, zum anderen kann der Prozentsatz an positiven Zellen und deren Intensität über mehrere Passagen verfolgt werden. Des Weiteren lässt sich durch das Sorten positiver Zellen die Anzahl an TurboGFP-positiven Zellen pro Zelllinie steigern. Für die

Vorbereitung einer FACS-Analyse bzw. Sortierung der TurboGFP-positiven Zellen wurden die transduzierten Zellen in PBS gewaschen, trypsiniert und in ca. 200 µl PBS resuspendiert. Die Suspension wurde zur Vereinzelung der Zellen durch ein feinmaschiges Gitter in ein 4 ml FACS-Röhrchen gegeben und der FACS-Analyse zugeführt. Bei Sortierung der Zellen wurden diese in DMEM in 1,5 ml sterilen Eppendorf Gefäßen aufgefangen und später nach gängigen Methoden der Zellkultur ausgesät. Sämtliche durchflusszytometrischen Arbeiten wurden mit einem FACS Aria™ Flow Cytometer der Firma BD Bioscience durchgeführt und dokumentiert.

3.2.12.3 Durchflusszytometrie basierter Repopulationsassay

Die Met^+ und Met^- Subpopulationen der G-2C9 Zellkultur wurden wie in Abschnitt 3.2.12.1 beschrieben durchflusszytometrisch voneinander getrennt und für 3-8 Tage separat kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde nach 4 Tagen, der andere nach 8 Tagen Kultur über Trypsin vereinzelt und mittels Durchflusszytometrie auf die Met und Thy1 Expression untersucht (siehe Abschnitt 3.2.12). Zur weiteren Analyse der Proteinexpresssion wurden die Zellen nach der FACS-Sortierung auf sterilen Deckgläschen kultiviert und nach 3 Tagen mit 4% PFA in PBS fixiert und nach dem üblichen Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenmarkierung weiterbehandelt (siehe Abschnitt 3.3.1).

3.3 Immunzytochemie und Konfokale-Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Grundlage der indirekten Immunfluoreszenz ist die Detektion zellulärer Komponenten mit Hilfe spezifischer Antigen-Antikörper Interaktionen. Der Antikörper bindet dabei an das entsprechende Epitop auf der Oberfläche des Antigens. Zur Visualisierung des Zielproteins mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops wird ein zusätzlicher, sekundärer Antikörper verwendet. Dieser ist an ein Fluorochrom gekoppelt und bindet an ein Epitop des primären Antikörpers. Die Detektion spezifischer zellulärer Proteine wurde an kultivierten Zellen, FACS-sortierten und über *Cytospin* auf Objekträger gebrachten Zellen sowie an Kryoschnitten von gefrorenem Tumor- und Mammagewebe durchgeführt.

Zur Fluoreszenzmarkierung von kultivierten Zellen wurden diese auf sterilen Deckgläsern, die sich auf dem Boden einer 6 *well*-Platte befanden, ausgesät und bis zu einer 50-100%igen

Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Deckgläser für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit vorgewärmten PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläser für 10 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) bei RT behandelt (800 µl/*well*). Essentiell für den Nachweis intrazellulär lokalisierter Proteine ist die Permeabilisierung der Membranen. Dazu wurde das PFA abgesaugt und die auf den Deckgläsern befindlichen, fixierten Zellen für 10 Minuten bei RT mit 1% Triton-X100 in PBS inkubiert (1 ml/*well*). Beim Nachweis von GPI-verankerten Zellmembranproteinen, oder sezernierten Proteinen muss auf die Permeabilisierung verzichtet werden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (3 Minuten/Waschschritt). Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperreaktionen wurden die Deckgläser mit 0,5% BSA in PBS für 30 Minuten bei RT blockiert. Die entsprechenden Primärantikörper wurde mit 0,5% BSA in PBS verdünnt und die blockierten Deckgläser anschließend mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen mit Parafilm beschichteten Deckel einer 6 *well*-Platte mit 100 µl des verdünnten Antikörpers für eine Stunde bei RT, oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Deckgläser in eine saubere 6 *well*-Platte überführt und dreimal mit PBS/0,1% Tween 20 für jeweils 3 Minuten gewaschen, bevor die Inkubation des Zweitantikörpers erfolgte. Die Verdünnung, Applikation und Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgt analog zur der des Primärantikörpers. Anschließend wurden die Deckgläser erneut in eine neue 6 *well*-Platte überführt, dreimal mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und der Sekundärantikörper für 10 Minuten bei RT mit 800 µl/*well* 4% PFA fixiert. Die Deckgläser wurden nach bereits genanntem Prinzip ein weiteres Mal gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen für mindestens 10 Minuten mit einem, in PBS verdünnten, sich an die DNA anlagernden, Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Bei den Farbstoffen handelte es sich entweder um 4′,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer 1:200 Verdünnung, Stock: 1mg/ml, *Draq5*^{TM} (Verd. 1:500) Stock: 5mM, *ToPro3*^{TM} (Verd. 1:750) Stock: 1mM oder einer Mischung von DAPI und einem der beiden anderen Farbstoffe in ihren entsprechenden Verdünnungen. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen in *„Vectashield® Mounting“* Medium auf einem Objektträger eingebettet und nach Absaugen des überschüssigen Mediums mit Nagellack fixiert. Die Präparate wurden nach dem Aushärten mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie oder durch Konfokale-Laser-Scanning- Mikroskopie (*CLSM*) analysiert (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Immunfluoreszenzmarkierung von Kryo-Gefrierschnitten und über Cytospin fixierten Zellen funktioniert nach genau denselben Prinzipien. Alleiniger Unterschied ist die Durchführung der Waschschritte in einer, mit entsprechender Lösung gefüllten, Küvette und das direkte Beträufeln

der Schnitte oder Zellen mit PFA bzw. den verdünnten Antikörpern. Um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu vermeiden wurde die zu färbende Probe zu Beginn mit einem hydrophoben Stift (PAP-PEN) umrandet.

3.3.2 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie macht es möglich, die Lokalisation, Dynamik und Interaktionen von Molekülen in lebenden Zellen zu untersuchen (Matsumoto, 2002). Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ist die Auflösung in z-Ebene dadurch beschränkt, dass Emissionssignale oberhalb und unterhalb der Fokusebene ebenfalls detektiert werden. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ist es möglich, das von einer Probe emittierte Licht aus der Fokusebene zu sammeln. Dabei wird das helle Licht eines Lasers über ein Objektiv auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene der Probe fokussiert. Das von dort emittierte Licht wird auf eine als *pinhole* bezeichnete variable Lochblende fokussiert und von einem hinter dem *pinhole* liegenden Detektor *(Photomultiplier)* detektiert. Da der Fokuspunkt und das *pinhole* in konjugierten Ebenen liegen, also konfokal sind, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt das *pinhole* passieren. Streulicht, dass ober- und unterhalb der Fokusebene von der Probe emittiert wird, wird durch das konfokale *pinhole* wirksam unterdrückt. Analog zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop verfügt auch ein Laser-Scan-Mikroskop über einen dichroitischen Spiegel. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, bei der das gesamte Sichtfeld angeregt und detektiert wird, erfolgt die Anregung und Detektion mit Hilfe der CLSM rasterartig (Punkt für Punkt oder Linie für Linie). Durch galvanometrische Scanspiegel wird das Laserlicht sequentiell durch die Probe geführt, es entsteht ein kontrastreicher, hoch aufgelöster optischer Schnitt. Durch das schrittweise Verschieben der Fokusebene lassen sich Stapel optischer Schnitte in der z-Ebene anfertigen, die anschließend zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengesetzt und digital verarbeitet werden können. Damit ermöglicht die CLSM die räumliche und zeitliche Auflösung von morphologischen Details von Zellverbänden in Geweben sowie auf subzellulärer Ebene. Mit Hilfe des sogenannten *„Multitracking“,* einem Scanverfahren zur Detektion von Mehrfachfluoreszenzen, bei dem die Überlagerung der Emissionen durch ein schnelles Umschalten der Anregung vermieden wird, ist es möglich, aus einem Punkt quasi eine simultane Fluoreszenz zweier Farbstoffe zu ermitteln. Durch eine spätere Überlagerung der Einzelfluoreszenzen lässt sich bei entsprechender Farbdarstellung eine Kolokalisaiton der Fluoreszenzfarbstoffe oder der mit ihnen markierten Moleküle nachweisen.

Zur Durchführung der CLSM wurde das LSM 510 META von Zeiss verwendet. Die digitalen Aufnahmen wurden mit Hilfe der LSM-Software, welche das Forschungsmikroskop Axiovert 200M und die Scan-Module steuert, ausgewertet. Um eine optimale Auflösung zu erreichen wurde das Immersionsöl-Objektiv Plan-Neofluar Ph3 63x NA 1.4 verwendet. Das Mikroskop war mit folgenden Lasern ausgestattet: Ar-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm, 25 mW), HeNe-Laser (543 nm, 1 mW) und HeNe-Laser (633 nm, 5 mW). Nach Aufnahme der Bilder wurden die Rohdaten in die Huygens Essential Software (Version 2.7.2p0, Scientific Volume Imaging B.V) exportiert, um eine Dekonvolution unter Anwendung des *Maximum Likelihood Estimation* (MLE) Algorithmus durchzuführen. Die dekonvoluierten Daten wurden dann mit Hilfe der Imaris Software (Version 4.1.3, Bitplane AG) bearbeitet und 3D-rekonstruiert. Die Kolokalisation wurde mit dem Imaris Coloc Modul analysiert, und für die Darstellung als separate Kanäle abgespeichert und ins 3D-Bild integriert.

3.4 Arbeiten mit Versuchstieren

3.4.1 Gewebeentnahme

Das Versuchstier wurde vor der Präparation mit Diethylether betäubt und getötet. Anschließend wurden die 8 Brustdrüsen (zervikale, thorakale, abdominale und inguinale) der Maus auf makroskopische Veränderungen untersucht und das unveränderte Gewebe inklusive umgebendem Fettpolster sowie die Gesamtmasse der entstandenen Mammatumoren entnommen. Die unveränderten Brustdrüsen sowie die Tumoren wurden zum Teil in Kryomatrix eingebettet und zum andern Teil zur RNA-Gewinnung für weiterer Untersuchungen eingesetzt. Zum einbetten der Tumoren und Mammae wurde eine Plastikkapselhülle einer herkömmlichen Medikamentenkapsel zur Hälfte mit Kryomatrix gefüllt. Auf dieser Matrix wurde dann das Tumor- Mammagewebe ausgebreitet und die Kapsel mit der gelartigen Matrix aufgefüllt. Die Kapsel wurde langsam in Trockeneis gekühltem 2-Methylpentan eingefroren und bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert. Zur Präparation von RNA wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schickgefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert. 50-100 mg in Stickstoff gefrorenes Gewebe wurden in 1 ml Trizol (Invitrogen) angetaut, in Lysin Matrix D Tubes (Qbiogene) mit Hilfe eines Fast Prep Homogenisators (Qbiogene) 2 x 15 s homogenisiert, und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 s lang kräftig geschüttelt, nochmals ca. 3 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C). Die obere

wässrige Phase wurde anschließend in einem neuen Eppendorf- Gefäß mit 500 µl 2-Propanol versetzt, invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 12000 g, 4°C) wurde die RNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70% EtOH (mit 0,1% (v/v) DEPC-H2O) gewaschen, und wieder zentrifugiert (5 min, 8000 g, 4°C). Das RNA-Pellet wurde nach Abpipettieren des Ethanols bei RT ca. 5-10 min getrocknet und je nach Pellet-Größe in 45-90 µl 0,1% (v/v) DEPC-H2O bei 50°C für 10 min gelöst. Eventuell noch vorhandene DNA wurde mit Hilfe des Turbo DNA-*free*TM Kits (Ambion) nach Herstellerangaben verdaut. Die in dieser Arbeit verwendete RNA verschiedener WAP-T-Tumoren wurde freundlicherweise von Christina Heinlein zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Arbeiten am Kryotom

Von den in Kryomatrix eingefrorenen und bei -80°C gelagerten Mammae wurden mit einem CM 3050 Kryotom der Firma Leica 10-14 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Aufgrund der fettreichen Beschaffenheit des Mammagewebes musste die Kammertemperatur des Kryotoms auf -30°C und die Temperatur des Objekttisches auf -50°C heruntergeregelt werden. Die dicke der Schnitte wurde auf die individuelle Beschaffenheit der jeweiligen Probe abgestimmt. Für eine spätere Immunfluoreszensmarkierung (siehe Abschnitt 3.3.1), wurden die Schnitte auf SuperFrost/Plus Objektträgern (Karl Hecht KG) aufgezogen. Vor der gängigen Färbeprozedur wurden die Schnitte kurze Zeit im Kühlschrank gelagert und unmittelbar vor der Fixierung mit 4% PFA ca. ein halbe Stunde bei RT getrocknet. Aufgrund der fettreichen Beschaffenheit des Mammagewebes wurden die Mammaschnitte nach der Fixierung in PFA in -20°C kaltem Aceton für 15 Minuten „entfettet“, daraufhin 15 Minuten mit PBS gewaschen und dann nach dem gängigen Protokoll mit 1% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Für die Isolation von RNA aus den gefrorenen Mammae wurden mehrere Schnitte gesammelt und direkt nach dem Schneiden in 350 µl RLT+ Puffer aus dem *RNeasy®Plus Micro Kit* der Firma Qiagen vereint. Die Isolation der RNA erfolgt nach Angaben des Herstellers (siehe Abschnitt 3.5.4)

3.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.5.1 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der nach Maxipräparation isolierten Plasmid-DNA und aufgereinigter RNA wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleobasen) an einem ND1000 (*NanoDrop*®) Spektrophotometer der Firma Nanodrop Technologies gemessen. Vor der Messung wurden die Proben mit TE-Puffer (pH 8,0) verdünnt, weil Schwankungen im pH die Messungen beeinflussen können. Der Extinktionskoeffizient (ε) für DNA-Messungen ist 50, für RNA-Messungen 40. Über das Lambert-Beersche Gesetzt (Konz. $_{\text{Nukleinsäure}}$ [µg/ml]= OD_{260} * ε * Verdünnungsfaktor) konnte die Konzentration der Proben errechnet werden. Um eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen auszuschließen wird das Verhältnis der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm (Absorptionsmaximum des Tyrosins) bestimmt. Liegt dieses Verhältnis im Bereich zwischen 1,8 und 1,9 handelt es sich um reine DNA, und zwischen 2,0 und 2,2 handelt es sich um reine RNA.

3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung einzelner DNA-Moleküle z.B. nach der Amplifikation über PCR zum Zweck der Identifizierung oder Aufreinigung spezifischer Fragmente. Die unter neutralen Bedingungen negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in Richtung der Anode und werden durch ihr unterschiedliches Laufverhalten, welches sich umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts verhält, in einzelne Banden aufgetrennt.

Standardgemäß wurden 1%ige Agarosegele für die Elektrophorese verwandt. Zur Herstellung der Gele wurde je nach Größe des Gels, bzw. der Gelkammer 50-100 ml 1xTAE Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose versetzt und bis zur vollständigen Homogenisierung in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf unter 60°C wurden der Gellösung ca. 1,5 µl (1 µg/µl) Ethidiumbromid (EtBr) zugefügt und diese in die Gelkammer gegossen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurden die Proben mit 1/10 des Probenvolumens 1 x DNA Ladepuffer versetzt und neben einem entsprechenden DNA-Marker in die Kammern pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 10 V/cm für 20 - 45 Minuten. Nach

Beendigung der Laufzeit konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines videogestützten Systems dokumentiert werden. Bei Gelen, die der Aufreinigung eines einzelnen Fragments dienten wurde die entsprechende Bande auf dem UV-Tisch ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben aus dem Gel eluiert.

3.5.3 Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die über PCR amplifizierte cDNA der Met-Tyrosinkinase-Domäne (TKD), Fragmentlänge: 888 bp, Met-Juxtamembran-Domäne (JMD), Fragmentlänge: 313 bp und der Met-Sema-Domäne (SEMD) Fragmentlänge: 1292 bp wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.5.2). Im Anschluss daran wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution des ausgeschnittenen Fragments wurde mit dem *NucleoSpin® Extract II* Kit der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigten Fragmente wurden zwecks Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon geschickt (siehe Abschnitt 3.5.7).

3.5.4 RNA-Isolierung

Zur Isolation von RNA aus herkömmlichen Probenvolumina wurde das innuPREP MiniKit der Firma Jena Analytik nach Angaben des Herstellers genutzt. Die Zellen wurden in dem der Zellzahl entsprechenden Volumen an Extraktionspuffer auf Eis abgeschabt und deren RNA nach Angaben des Herstellers weiter aufbereitet.
Aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial nach der durchflusszytometrischen Isolation von Subpopulationszellen wurde das *RNeasy®Plus Micro Kit* der Firma Qiagen verwandt. Dieses Kit ist hocheffektiv und extra auf die Isolation von RNA aus sehr geringen Zellmengen ausgelegt. Die Isolierung der RNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration und Qualität der präparierten RNA wurde gemäß der photometrischen Quantifizierung bestimmt (siehe Abschnitt 3.5.1).

3.5.5 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese)

Zur Vorbereitung des Vergleichs der mRNA Konzentration zwischen verschiedenen Zellpopulationen mittels quantitativer Real-Time PCR muss die mRNA zunächst in cDNA (*complementary DNA*) revers transkribiert werden.
Für die Synthese der cDNA wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Gemäß Vorgaben wurde wenn möglich 1 µg Gesamt-RNA, z.B. aus kultivierten Zellen, in 10 µl Wasser für die Synthese eingesetzt. Der RNA-Gehalt aus den durchflusszytometrisch getrennten Subpopulationen konnte aufgrund der geringen Konzentration z.T. nicht bestimmt werden. In diesen Fällen wurde die Gesamtheit an isolierter RNA in cDNA umgeschrieben. Die nachfolgende Tabelle gibt einem Überblick über die Komponenten des cDNA Synthese Ansatzes:

Tabelle 2: Überblick über die Komponenten des cDNA-Synthese Ansatzes

Volumen	Komponente	
2µl	10x RT Puffer	**Mastermix von 10 µl/Ansatz**
0,8µl	25x dNTP-Mix (100mM)	
2µl	10x RT Random primers	
1µl	MulitSrcibe™ Reverse Transcriptase	
4,2µl	Nuclease-free H_2O	
10-13µl	RNA	

Die Synthese der cDNA erfolgte in einem PTC-200 Thermocycler nach folgenden Programm:

Tabelle 3: Überblick über das zur cDNA-Synthese eingesetzte Temperaturprogramm

Schritt	Temperatur	Dauer
1	25°C	10 min
2	37°C	120 min
3	85°C	5 sec
4	4°C	∞

3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der *in vitro* Vervielfältigung (*amplification*) von doppelsträngiger Ziel-DNA (dsDNA) zu verschiedenen Zwecken, z.B. zur Anreicherung eines zu sequenzierenden Produktes in ausreichender Menge.

Die PCR ist ein sich zyklisch wiederholender Prozess von drei Einzelschritten, die zur Synthese doppelsträngiger Kopien einer Ziel-DNA führen: (1) Denaturierung der dsDNA; (2) Primerhybridisierung (*primer annealing*) mit der Basensequenz der Ziel-DNA. Die Temperatur dieses Teilschrittes muss in Abhängigkeit der Primerlänge- bzw. Beschaffenheit angepasst werden, um die Sequenzgenauigkeit der PCR zu gewährleisten. (3) *Elongation* der Primer, durch eine thermostabile DNA-Polymerase, wie z.B. die Taq-Polymerase. Die Polymerase beginnt die Verlängerung der DNA am 3`-Ende des Primers. Das zyklische Wiederholen der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation führt zu einer exponentiellen Amplifikation der durch spezifische Primer ausgewählten Ziel-DNA.

3.5.6.1 Standard-PCR

In der Standard-PCR wurden bis zu 300 ng DNA zur Amplifikation eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Standard-PCR betrug 50 µl. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Komponenten der PCR und deren Konzentration:

Tabelle 4: Überblick über die Komponenten einer Standard-PCR und deren Konzentration

Volumen	Komponente	Endkonzentration
Variabel	Template DNA	bis zu 300 ng
5 µl	10 x Taq Puffer mit Mg^{2+}	1 x
1 µl	10 mM dNTP-Mix	0,2 mM
0,2 µl	Forward Primer	0,4 µM
0,2 µl	Reverse Primer	0,4 µM
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase	1U
variabel	ddH_2O	----------

Die PCR- Reaktion fand in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research statt. Das PCR Programm für eine Standard-PCR ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 5: Überblick über das Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	96°C	20 sec	**30 Zyklen**
Hybridisierung	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	2 min	
----------	4°C	∞	

3.5.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde von der Firma Eurofins MWG Operon nach der *cycle sequencing* Technologie auf einem ABI 3730XL-Gerät durchgeführt. Die PCR-Produkte und Sequenzierungsprimer wurden entsprechend aliquotiert und verschickt. Bei der Auswahl der Sequenzierprimer wurde das Program Clone Manager 5 benutzt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

3.5.8 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht eine genaue Quantifizierung von PCR Produkten und somit eine exakte Erfassung der Genexpression (Dorak, 2006). Bei der relativen Quantifizierung, wie sie hier angewandt wurde, wird im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung die Expression der Zielgene anhand eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens, wie z.B. der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) normalisiert. Dadurch ist die Bestimmung des relativen Expressionsunterschieds zwischen RNA-Proben, wie z.B. der Met^+ und Met^- Subpopulation möglich. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR finden Amplifikation und Detektion der PCR Produkte simultan statt. Die Detektion der PCR Produkte erfolgt mit dem fluoreszierenden Farbstoff *Sybr®Green*. Dieser lagert sich unspezifisch an dsDNA an, wodurch sich die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA verhält. Übersteigt das Fluoreszenzsignal eine gewisse basale Fluoreszenz, setzt sich also nach dem Erreichen des Fluoreszenzschwellenwertes gegenüber dem Grundrauschen ab, wird die Anzahl der Zyklen beim Überschreiten dieses Schwellenwerts als sog. Schwellenwertzyklus, bzw. *cycle threshold* oder kurz Ct-Wert detektiert. Diese Werte wiederum verhalten sich indirekt proportional zur Menge der eingesetzten DNA. Die Intensität der Fluoreszenz wird gegen die Anzahl der Amplifikationszyklen aufgetragen. Die Kurve bzw. Amplifikation befindet sich nach Überschreiten des Schwellenwertes in ihrer exponentiellen Phase. Währenddessen verdoppelt sich die Anzahl an Molekülen pro Zyklus. Nach der exponentiellen Phase geht die Amplifikation in eine Plateauphase über, in der die Reaktionsteilnehmer verbraucht sind und die Detektion der Fluoreszenz nicht mehr gegeben ist. Da der *Sybr®Green* Farbstoff in der Lage ist, sich an sämtliche dsDNA anzulagern, kann er auch in Primer-Dimere, oder unspezifische Amplifikate interkalieren und so als vermeintliches Amplikon detektiert werden. Aufschluss über die Reinheit eines Amplifikats, bzw. über die Bildung von Primer-Dimeren kann eine Analyse der

Schmelzkurve jedes entsprechenden Amplikons liefern. Jedes DNA- Fragment hat in Abhängigkeit seiner Länge und seines spezifischen GC-Gehalts eine bestimmte Schmelztemperatur. Verunreinigungen oder Primer-Dimere können in der Schmelzkurve durch zusätzliche Amplituden identifiziert werden. Genauso kann die Reinheit eines Amplifikats durch eine korrekte Schmelzkurve sichergestellt werden.

Bei den durch qRT-PCR analysierten Proben handelt es sich hier um die durchflusszytometrisch in Met^+ und Met^- getrennten Subpopulationen der G-2C9 Zellen sowie um Zellen der G-2C9 Zellkultur die entweder mit PHA-665752 bzw. DMSO behandelt wurden oder mit shRNA gegen Met bzw. einem *non-silencing* Konstrukt transduziert wurden. Alle Analysen wurden mit in cDNA umgeschriebener mRNA in technischen Triplikaten durchgeführt. Jede Messung wurde durch eine Negativkontrolle ohne cDNA (*no template control* (NTC)) ergänzt. Die Schmelzkurven jeder Probe wurden auf das Vorkommen von Primerdimeren überprüft. Die nachfolgende Tabelle gibt einem Überblick über die Komponenten des qRT-PCR Reaktions-Ansatzes:

Tabelle 6: Überblick über die Komponenten eines qRT-PCR Reaktions Ansatzes

Volumen	Komponente	
5 µl	2 x Power Sybr®Green PCR Mastermix	**Mastermix von 9 ul/Ansatz**
2 µl	DEPC-Wasser	
1 µl	Primer A	
1 µl	Primer B	
1 µl	cDNA	

Die Reaktionen wurden in 96 *well*-Platten angesetzt. Die cDNA wurde in jedes *well* einzeln vorgelegt und im Anschluss daran mit 9 µl des Mastermixes aus den restlichen Komponenten vereint. Die einzelnen Schritte der qRT-PCR Reaktion sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 7: Überblick über das qRT-PCR Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	95°C	10 min	
2	95°C	30 sec	**40 Zyklen**
3	60°C	1 min	
4	95°C	15 sec	**Schmelzkurve**
5	60°C	1 min	
6	95°C	15 sec	
7	60°C	15 sec	

Zur Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse wurde die *7500 Fast System v1.4.0* Software von Applied Biosystems genutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte über die sog. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Ein relativer Vergleich der Expression zweier Proben wird durch die Kalibrierung der Ct-Werte auf den Ct-Wert einer endogenen Kontrolle ermöglicht. Die Normierung erfolgt nach folgender Formel:

1) Normierung für Probe 1 und Probe 2:
   $\Delta Ct = Ct\ (Zielgen) - Ct\ (Referenzgen/Gapdh)$

Darauf folgend wird die Differenz der beiden ΔCt-Werte gebildet:

2) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (Probe1) - \Delta Ct\ (Probe\ 2)$

Da sich theoretisch die Anzahl der Moleküle pro Zyklus verdoppelt, kann man die Verdopplung potenziert mit dem negativen Wert für ΔΔCt mit den relativen Expressionsunterschieden (RQ) gleichsetzen. Formal geschrieben bedeutet dies:

3) $2^{-\Delta\Delta Ct} = RQ$

Die von der Software errechneten Minimal und Maximalwerte für RQ wurden zur Berechnung der Fehlerindikatoren herangezogen.
Dieser errechnet sich aus folgernder Formel:

4) RQ –RQ Min = negativer Fehler; RQ Max-RQ = positiver Fehler

3.6 Arbeiten mit Proteinen

3.6.1 Herstellung von Zelllysaten und Zellextrakten

Die Zellen einer adhärent wachsenden Kultur wurden vom Medium befreit, mit kaltem PBS gespült, auf Eis und in Gegenwart von ca. 200 µl 2 x SDS-Lysepuffer mit einem Kunststoffschaber abgeschabt, in ein 1 ml Eppendorf Gefäß überführt und anschließend mit 5% beta-Mercaptoethanol versetzt. Zur Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen ebenfalls zunächst mit kaltem PBS gespült, in Gegenwart von 200 µl frisch angesetztem,

Proteaseinhibitoren enthaltenden NP40-Extraktionspuffer wie üblich mit einem Kunststoffschaber auf Eis abgeschabt und in ein 1 ml Eppendorftube überführt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die Protein enthaltenden Überstände wurden im Anschluss an die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford zu 10% mit 6xfach SDS-Probenpuffer und ebenfalls mit 5% beta-Mercaptoethanol versetzt.
Sowohl die Zelllysate als auch Extrakte wurde zum Abbau von Nukleinsäuren mit *Benzonase®* (10 U/ml) versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 5 Minuten im Wasserbad aufgekocht und entweder direkt in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt, oder bei -20°C eingefroren.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Größe und unabhängig ihrer jeweiligen Ladung. Nach der Denaturierung der Proteine binden sich Dodecylsulfat-Anionen in Abhängigkeit der Proteingröße an das Proteinmolekül und bilden negativ geladene Komplexe, welche eine Auftrennung der einzelnen Proteine ausschließlich nach ihrer Größe ermöglichen. Die Wandergeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld der Elektrophorese-Apparatur verhält sich dabei umgekehrt proportional zu ihrer molekularen Masse.
Im Rahmen dieses Versuches wurde eine diskontinuierliche SDS Polyacrylamid–Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode handelt es sich um Elektrophorese durch ein sog. Sammel-und Trenngel unter Verwendung einer Puffer-Kombination mit unterschiedlichen pH-Werten (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Zur Herstellung der Gele wurde zunächst das SDS-Trenngel bis ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatte gegossen. Um eine exakte und Luftblasen freie Kante zwischen den beiden Gelschichten zu erlangen, wurde das Trenngel mit ddH_2O überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde das Wasser entfernt und die Kammer bis zum Rand der Glasplatte mit Sammelgel gefüllt. Die Kämme für die Probentaschen wurden möglichst zügig und luftblasenfrei ins Sammelgel eingeführt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die vorbereiteten Zelllysate entsprechend in SDS-Puffer verdünnt und in einem Volumen von 20 µl pro Tasche aufgetragen. Um die Proteinbanden später zweifelsfrei zuordnen zu können wurden 3-5 µl eines Protein-Standards aufgetragen.

Die Elektrophorese fand in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Apparatur statt. Währen der Wanderung der Proteine im Sammelgel betrug die Spannung konstant 60 mV und wurde während der Passage durch das Trenngel auf 100 mV erhöht.

3.6.3 Western-Blot

Unter einem Western-Blot versteht man den Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran, um sie der Immundetektion zugänglich zu machen (Burnette, 1981). Der in diesem Versuch durchgeführte Elektroblot basiert auf dem Anlegen einer Spannung quer zu Gel und Membran. Die Membran wurde zunächst durch kurze Inkubation in Methanol aktiviert und anschließend wie Schwämmchen und Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt. Gel und Membran wurden zwischen je zwei Whatman-Papieren und aufliegenden Schwämmchen in die elektrische und mit Transferpuffer gefüllte Tankblot-Apparatur eingespannt. Die angelegte Spannung betrug konstant 100 V, der Transfer dauerte ca. eine Stunde.

3.6.4 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion von Proteinen funktioniert grundlegend nach denselben Prinzipien wie die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung. Um die Membran zu blockieren und so freie Bindungsstellen für die Antikörper unzugänglich zu machen, wurde die Membran 1 Stunde in 5%iger Magermilchlösung in TBS auf einem Orbitalschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 x 5 Minuten in 1 x TBST-Puffer gewaschen und darauf folgend mit dem Erstantikörper, 1:1000 verdünnt in 5%igem Milchpulver, über Nacht bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut vier Mal je 5 Minuten gewaschen und daraufhin für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper, 1:10.000 verdünnt in 5%igem Milchpulver, versetzt. Es wurden zwei verschiedene Arten von Sekundärantikörpern verwendet. Die klassische Art der Detektion erfolgt über die Kopplung der Sekundärantikörper mit Meerrettich Peroxidase *(HRP, horseradish peroxidase)*. Eine weitere Möglichkeit ist die Detektion über Fluorochrom gekoppelte Sekundärantikörper. In letzterem Fall findet die Inkubation der Sekundärantikörper im Dunkeln statt. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Membran wie gewohnt 3 x 20 Minuten in TBST-Puffer gewaschen.

3.6.4.1 Detektion von Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt über die ECL (*enhanced chemiluminescence)* Methode (Kricka, 1991). Diese basiert auf einer durch eine enzymatische Reaktion ausgelösten Chemilumineszenz. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase spaltet das in der ECL Lösung enthaltene H_2O_2 was zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt, die ihrerseits wiederum die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) vermitteln. Diese Reaktion führt zur Emission von Lichtquanten die einen Röntgenfilm entsprechend schwärzen. Zur Detektion wurde das SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Membran wurde in 500 µl einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Reagenzien zwischen zwei Klarsichtfolien für eine Minute bei RT inkubiert. Anschließend wurden Membran und Klarsichtfolien zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette überführt. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms wurde in Abhängigkeit der Emissionsintensität angepasst und umfasste mehrere Sekunden bis 20 Minuten. Die Banden des Proteingrößenstandards wurden unmittelbar nach der Entwicklung des Films per Folienstift auf den Röntgenfilm übertragen.

3.6.4.2 Detektion von Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörpern

Die Detektion von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte mit Hilfe des *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma LI-COR Bioscience. Diese Art der Detektion bietet einige Vorteile gegenüber der klassischen Chemilumineszenz-Methode. Neben den praktischen Vorteilen wie der Ersparnis von Zeit durch die direkte Detektion ohne Entwickler und Entwicklerchemikalien, ist die Möglichkeit der Quantifizierung der Proteinbanden und der Detektion mehrere Proteine gleichzeitig durch simultane Fluoreszenz in zwei verschiedenen Kanälen gegeben. Die Fluoreszenz der Antikörper liegt im Infrarotbereich, wodurch eine Detektion mit wenig Hintergrundrauschen ermöglicht wird. Die mit den Antikörpern behandelte Membran wird nach dem Waschen direkt, ohne Entwicklung, auf die Glasfläche des *Odyssey®* Systems gelegt und eingescannt. Die Einstellungen wurden mit der zugehörigen Software angepasst und die Banden entsprechend ausgewertet.

3.7 Arbeiten mit Viren

3.7.1 Lentiviraler Gentransfer

Lentiviren stellen eine Gattung innerhalb der Retroviren dar. Die Gattung der Lentiviren unterscheidet sich allerdings von den meisten anderen Retroviren durch ihre Fähigkeit, auch nicht proliferierende Zellen zu infizieren. Die Erbinformation der Retroviren liegt in Form von RNA vor und wird nach der Infektion der Wirtszelle als DNA-Provirus in das Genom der Zelle integriert. Rekombinante lentivirale Vektoren wurden für den experimentellen Gentransfer entwickelt (Buchschacher, 2003). Diesen Vektoren fehlen die Gene für die Produktion sämtlicher viraler Proteine was sie somit replikationsinkompetent macht. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren handelt es sich um lentivirale Vektoren mit einem shRNAmir 30 Konstrukt im pGIPZ Rückgrat. Diese Vektoren kodieren für eine bicistronische mRNA die sowohl das shRNAmir Konstrukt, als auch die TurboGFP kodierende Sequenz enthält. So kann die Expression der shRNA über die Fluoreszenz des TurboGFP-Proteins visualisiert werden. Zusätzlich trägt der Vektor ein Puromycin-Resistenzgen, wodurch die shRNA exprimierenden Zellen über die Zufuhr von Puromycin stabil selektioniert werden können. Dieser Vektor gehört zu den lentiviralen Vektor der zweiten Generation, welcher nicht für virale Proteine kodiert, sondern *cis*-aktive Elemente für Verpackung, reverse Transkription und Integration enthält. Zur Produktion der viralen Proteine gag/pol, rev und env und damit zur Bildung infektiöser viraler Partikel, müssen die für diese Proteine notwendigen Gene in *trans* zugeführt werden. Dies bedeutet eine Transfektion der Produktionszelllinie mit einem HIV gag, pol, rev, und tat exprimierenden Verpackungsplasmid der zweiten Generation wie z.B. psPax2.

3.7.2 Herstellung Lentiviraler Partikel

Die Herstellung der viralen Partikel erfolgte über eine transiente Transfektion von 293T Zellen mit den replikationsinkompetenten lentiviralen Vektoren *pGIPZshRNAmir non-silencing* control vector RHS4346 oder pGIPZshMetmir2770 und Ko-Transfektion mit den Verpackungsplasmiden psPax2 und pVSV-G unter Anwendung von Polyethylenimin (PEI) (siehe Abschnitt 3.2.11.1).
Diese Plasmide gehören zum Verpackungssystem der zweiten Generation. Das psPax2 Plasmid kodiert für sämtlich notwendigen lentiviralen Strukturproteine wie gag und env sowie für die für die Replikation der Viren notwendigen viralen Enzyme pol sowie tat und rev. Das pVSV-G

Plasmid exprimiert das G Glycoprotein des Vesicular Stomatits Virus (VSV-G) unter der Kontrolle des CMV *immediate-early* Promoters. VSV-G interagiert mit Phospholipiden in der Membran der Zielzellen und vermittelt so die Fusion der viralen und zellulären Membranen und somit die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, das VSV-G umhüllte Vektoren keine Oberflächenrezeptoren zur Bindung an die Wirtszelle benötigen und so generell in der Lage sind Zellen jeden Vertebratenstammes zu infizieren.
Die Verpackungszelllinie 293T wurde wie in Abschnitt 3.2.11.1 mit den in Tabelle 1 genannten Plasmiden transfiziert, der virale Überstand nach 72 Stunden geerntet und steril filtriert. Die Überstände wurden entweder direkt für die Transduktion der Zielzellen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

3.7.3 Transduktion von G-2C9 Zellen mit lentiviralen Partikeln

Zur Transduktion von G-2C9 Zellen wurden die Zellen bis zu einer 80-90%igen Konfluenz unter Standardbedingungen (Ø 10-cm Zellkulturschale) kultiviert. Die Zellen wurden durch Trypsin vereinzelt, in FCS haltigem Medium aufgenommen, in entsprechender Zellzahl aufgeteilt und pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss daran direkt in 2,5 ml Virenüberstand resuspendiert und in eine Ø 6-cm Zellkulturschale ausgesät. Nach 6-stündiger Inkubation wurde der Virenüberstand mit DMEM/10% FCS auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt und für 72 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Mindestens 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen mikroskopisch auf die Expression von TurboGFP und der damit verbundenen Expression der shRNA überprüft. Die Zellen wurden weiterhin nach dem üblichen Protokoll, aber unter dem Selektionsdruck von 5 µg/ml Puromycin, kultiviert. Der Anteil der TurboGFP-positiven Zellen an der Gesamtkultur wurde in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch gegen nicht transduzierten Zellen (Negativkontrolle) überprüft (siehe Abschnitt 3.2.12.2). Die *knockdown* Effizienz der shRNA gegen Met wurde mittels qRT-PCR, Western-Blot und indirekter Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert (siehe Abschnitte 3.5.8 ,3.6.3 und 3.3.1).

3.7.4 Puromycin Killkurve

$1x10^5$ der wie in Abschnitt 3.7.3 beschriebenen transduzierten Zellen wurden in je ein *well* einer 6-*well*-Platte in DMEM/10% FCS ausgesät. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellen für weiter 24 Stunden in einer aufsteigenden Konzentration von Puromycin in DMEM/10% FCS

kultiviert. Die eingesetzten Puromycin-Konzentrationen umfassten 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml und 12 µg/ml.

Bereits bei 5µg/ml konnte eine Anreicherung der positiv transduzierten Zellen durch Apoptose nicht transduzierter Zellen beobachtet werden. Die weitere Kultivierung der transduzierten Zellen erfolgte in DMEM/10%FCS in Gegenwart von 5µg/ml Puromycin.

4. ERGEBNISSE

4.1 Die Expression und Aktivität von Met in WAP-T Mammakarzinomen

Einhergehend mit der Amplifikation und Überexpression von *Met* - insbesondere in der Gruppe der *high-grade* Tumoren - konnte ein Set von Genen identifiziert werden, deren Expression mit der *Met*-Expression korreliert (Otto et all., eingereicht). Dieses Set von Genen, im Folgenden als Met-Signatur bezeichnet, umfasst die Gene *Upp1, Tes, Igfbp2* und *Rbp7*. Diese Signatur setzt sich aus Genen zusammen, die eine potenzielle Rolle als Met-*Downstream-Target* haben und Aufschluss über die in diesem Modell bestehenden Met-Signalwege liefern könnten.

4.1.1 Validierung der Microarray-Daten der *Met*-Signaturgene durch qRT-PCR

Zur Validierung der *Met*-Expression sowie der *Met*-Signaturexpression nach Microarray-Analysen von WAP-T-Tumorproben wurde die qRT-PCR verwendet. Dafür wurde die RNA von 19 Tumoren und 3 unveränderten Maus-Brustdrüsen (Wildtyp Balb/c 30 Tage nach dem Absetzen des Nachwuchses), deren Expression in den Arrays analysiert wurde, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, revers transkribiert und die resultierende cDNA in der qRT-PCR zur Analyse der Genexpression eingesetzt.

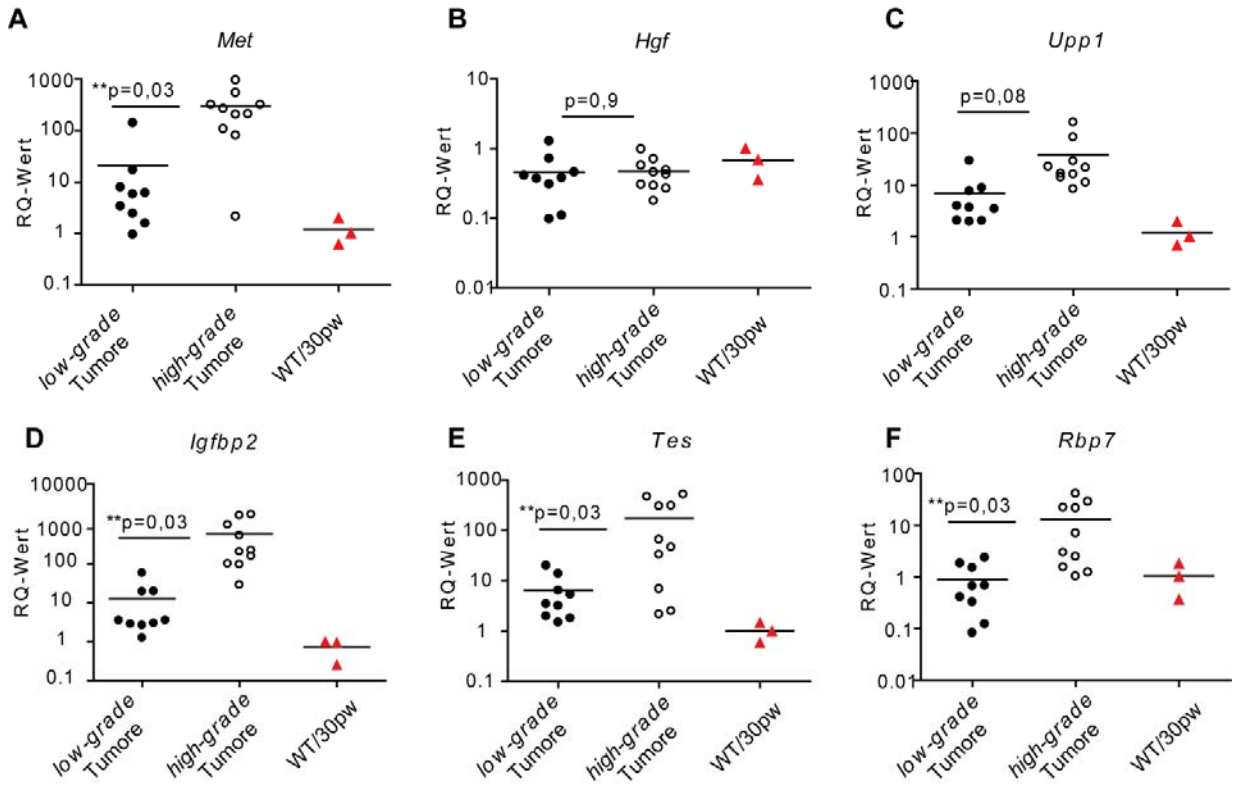


Abbildung 15: Validierung der Microarray-Expressionsanalyse der Gene *Met, Hgf* und der Met-Signaturgene im Vergleich zwischen *low-grade* und *high-grade* WAP-T Tumoren.

QRT-PCR Analyse einer Gruppe von 19 *low-grade* und *high-grade* Tumoren und drei unveränderten Brustdrüsen 30 Tage nach dem Absetzen der Nachkommen. Die Proben wurden auf die mRNA-Menge des jeweils untersuchten Gens einer der drei unveränderten Gewebeproben normiert. Als *housekeeping*-Gen wurde *Gapdh* eingesetzt. Die Mittelwerte der Analysen sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Signifikanz des Unterschiedes zwischen *low*- und *high-grade* Tumoren wurde über den zweiseitigen t-Test ermittelt. Vergleich der (A) *Met*-Expression, (B) *Hgf*-Expression, (C) *Upp1*-Expression, (D) *Igfbp2*-Expression, (E) *Tes*-Expression und (F) *Rbp7*-Expression zwischen *low*- und *high-grade* Tumoren und unverändertem Mammagewebe (WT: Wildtyp Balb/c Maus; pw – post weaning; **p: signifikanter Expressionsunterschied).

Die Expressionsdaten konnten die Ergebnisse der Microarray-Analysen bestätigen. So zeigten die qRT-PCR-Ergebnisse eine im Vergleich zum normalen Mammagewebe signifikante Überexpression des *Met*-Gens in beiden Tumorgruppen (siehe Abbildung 15). Die Spanne der Überexpressionen bewegte sich bei den *low-grade* Tumoren zwischen den Faktoren 2 und 17 (ein Ausreißer bei RQ 140) während die in den *high-grade* Tumoren feststellbaren Expressionswerte um das 80- bis fast 1000-fache gegenüber dem Normalgewebe erhöht waren (ein Ausreißer bei RQ 2). Gleichermaßen ließen sich signifikante Expressionsunterschiede der *Met*-Signaturgene zwischen der Gruppe der *low-grade* und *high-grade* Tumoren feststellen. Dabei zeigten alle

untersuchten Gene eine deutlich stärkere Expression in der Gruppe der *high-grade* Tumoren. Signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der *low*- und *high-grade* Tumoren ließen sich jedoch nur für die Expression von *Met, Igfbp2* und *Tes* feststellen. Im Falle des *Upp1*-Gens ließ sich ein leichter Unterschied (p= 0,08) zwischen den Expressionsprofilen der beiden Gruppen erkennen. *Rbp7* war in der Gruppe der *high-grade* Tumoren ebenfalls stark exprimiert (**p= 0,03), während einige der *low-grade* Tumoren sogar eine niedrigere Gesamtexpression von *Rbp7* zeigten als im Drüsengewebe detektierbar.

4.1.2 Analyse der Gen-Expression von *Hgf* in *low*- und *high-grade* WAP-T Tumoren

Obwohl die Microarray-Analysen der 25 *low*- und *high-grade* Tumoren keine expressionellen Unterschiede von *Hgf* in diesen Tumoren nachweisen konnten (Otto et al., eingereicht) wurden ebenfalls 19 Tumoren über qRT-PCR auf die Expression des Met-Liganden *Hgf* überprüft. In jeder der analysierten Tumorproben ließ sich die Expression des *Hgf*-Gens nachweisen. Im Vergleich zur *Hgf*-Transkriptmenge in unveränderten Brustdrüsen nach abgeschlossener Involution zeigten die Tumoren beider Gruppen sogar zum Teil eine bis um den Faktor 10 reduzierte Transkription. Die statistische Analyse der drei Gruppen zeigte, dass es aufgrund der Streuung der einzelnen Werte im Mittel keinen signifikanten Unterschied in der *Hgf*-Expression der beiden Tumorgruppen und dem Mammagewebe gibt (siehe Abbildung 15 B).

4.1.3 Vergleichende Analyse der Proteinexpression von Met und dessen Aktivität in WAP-T Tumoren und normalem Mammagewebe

Um zu überprüfen, ob die expressionelle Regulation des *Met*-Gens auch in einer unterschiedlichen Proteinexpression zwischen *low*- und *high-grade* Tumoren resultiert, wurden drei in Cryomatrix eingefrorene Tumoren jeder Gruppe sowie 3 Brustdrüsen aus verschiedenen Entwicklungsstadien von Wildtyp Balb/c Mäusen nach dem in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Protokoll für die Detektion von Met und durch Phosphorylierung des Tyr1347 Restes (entspricht Tyr1349 beim Menschen) aktiviertes Met (im Folgenden p-Met genannt) mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung (IF) analysiert.

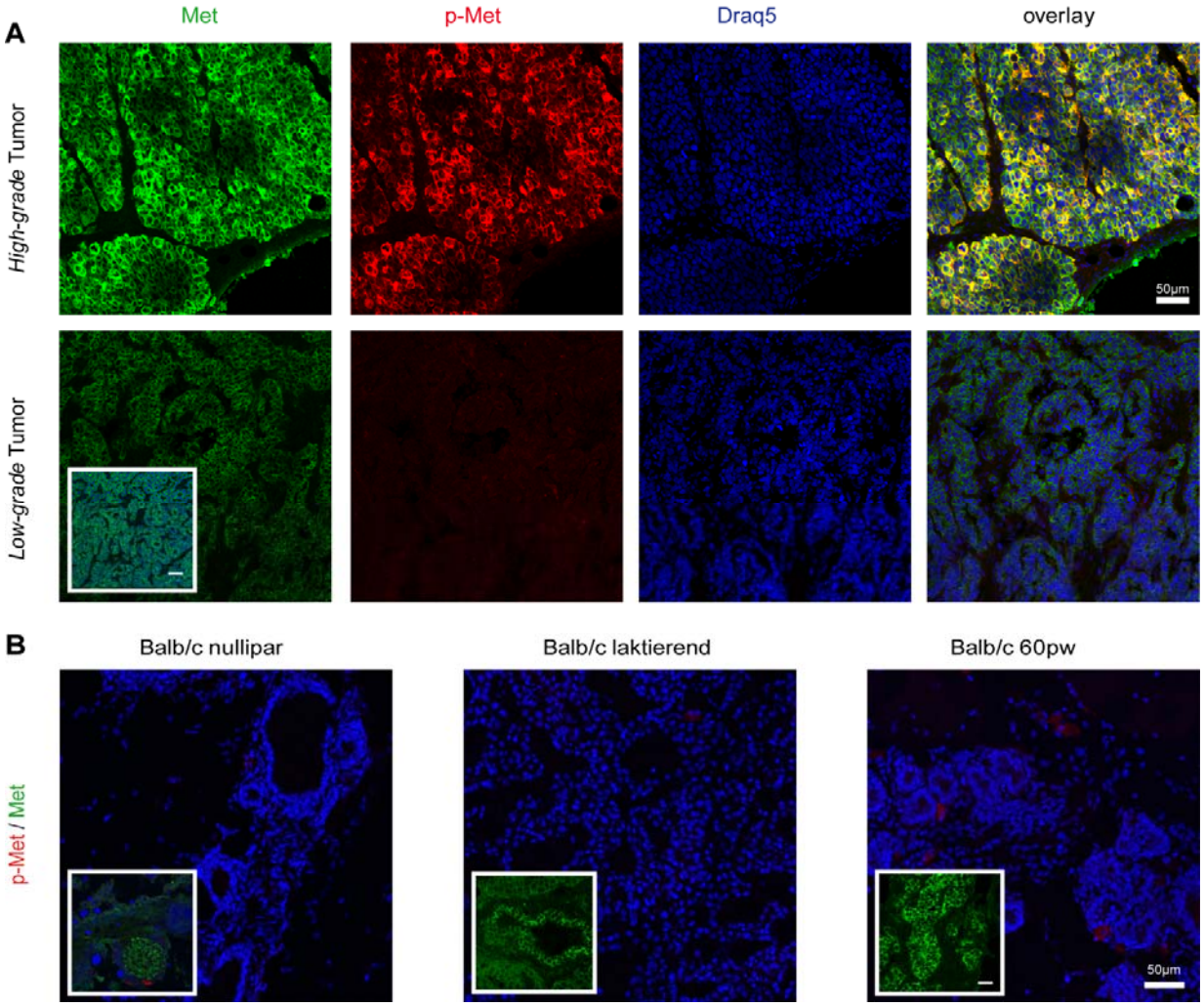


Abbildung 16: Expression und Aktivität des Met-Rezeptors in *low*- und *high-grade* Tumoren sowie in der normalen Brustdrüse.

Die Expression und Aktivität von Met wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Markierung in (A) *high-grade* und *low-grade* Tumoren sowie (B) unverändertem Mammagewebe nulliparer, laktierender und post-Involutions Mäusen analysiert. Bei den Präparaten handelte es sich um ca. 8-14 µm dicke Cryo-Gefrierschnitte. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-Proteins über Alexa-488 und im Falle von p-Met über Alexa-555 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss AG) mittels 20x-Objektiv aufgenommen. Die Einfügungen in den Abbildungen zeigen die Expression des Met-Rezeptors des jeweiligen Gewebeschnittes nach Verstärkung der Laserintensität bzw. erhöhter Belichtungszeit. Die Kerne wurden mit Draq5 (Tumoren) oder ToPro3 (Mammagewebe) visualisiert. Verwendete Met-Antikörper: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R.

Abbildung 16 A zeigt die IF-Färbung von Met und p-Met der *low*- und *high-grade* Tumoren. Es ist deutlich erkennbar, dass die über Microarray und qRT-PCR ermittelte Überexpression des Met-Gens in *high-grade* Tumoren (siehe Abschnitt 4.1.1) gleichermaßen zu einer Überexpression des Met-Proteins in dieser Tumorgruppe führt. Einhergehend mit der starken Met-

Proteinexpression konnte eine intensive Phosphorylierung des Tyr1347 der *multisubstrate-docking-site* (MSD) von Met gezeigt werden. Die Phosphorylierung von Tyr1347 ist ein Indikator für die Aktivität des Met-Rezeptors und der Funktionalität der MSD bezüglich der Rekrutierung diverser nachgeschalteter Effektoren.

Die *low-grade* Tumoren zeigten gegenüber den *high-grade* Tumoren eine deutlich schwächere Expression des Met-Proteins. Nach einer Verlängerung der Belichtungszeit bzw. Intensivierung des Fluoreszenssignals durch Verstärken der Laserintensität war auch in diesen Tumoren eine eindeutige Expression des Met-Rezeptors in nahezu jeder Zelle der Tumormasse nachweisbar (eingefügte Abbildungen in Abbildung 16 A). Die Phosphorylierung des Rezeptors war jedoch sehr schwach und nahezu nicht erkennbar. Betrachtet man hingegen die Expression von Met in den aus verschiedenen Entwicklungsstufen der Mamma entnommenen Brustdrüsen, so ließ sich unter gleichen Aufnahmeeinstellungen mit beiden Met-Antikörpern keinerlei Fluoreszenz nachweisen (siehe Abbildung 16 B). Eine Verstärkung der Laserintensität um ein Vielfaches ließ aber auch in diesen Geweben eine basale Expression des Met-Proteins in den Epithelzellen der Mamma erkennen (eingefügte Abbildungen in Abbildung 16 B). Der Nachweis einer Phosphorylierung des Met-Rezeptors konnte im nulliparen Mammagewebe und in der laktierenden Brustdrüse nicht erbracht werden. Zum Zeitpunkt der abgeschlossenen Involution 60 Tage nach dem Abstillen des Nachwuchses, ließ sich in wenigen Zellen der Brustdrüse eine zytoplasmatische Verteilung des phosphorylierten Met-Proteins erkennen (siehe Abbildung 16 B).

4.2 Die Expression und Aktivität von Met in WAP-T Zelllinien

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich die beiden histologisch und molekular unterschiedlichen Gruppen der WAP-T Tumoren ebenfalls hinsichtlich ihrer Met-Expression und Aktivität unterscheiden. Dabei zeichneten sich die EMT-Eigenschaften aufweisenden *high-grade* Tumoren durch eine charakteristische Überexpression und vor allem verstärkte Aktivität des Met-Rezeptors aus. Um die Rolle des Met-Signalweges am Differenzierungszustand und der damit einhergehenden Aggressivität des Tumors eingehend zu klären, bedarf es weiterführender experimenteller Möglichkeiten.

Die aus einem *high-grade* WAP-T Tumor entwickelte klonale Zelllinie G-2 spiegelt in hohem Maße die Heterogenität der Primärtumoren wider und liefert somit ein ideales Werkzeug für die

detaillierte Analyse definierter zellulärer Prozesse in murinen Mammakarzinomzellen bei gleichzeitig hoher Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation (siehe Abschnitt 1.2).

Zunächst wurde die Eignung der G-2 Zellen bzw. der klonalen Tochterzelllinie G-2C9 zur Analyse des Met-Signalweges ermittelt. Als erstes wurde die *in vitro* Expression und Aktivität des Met-Rezeptors in der G-2 und G-2C9 Zelllinie untersucht. Die meisten Met-exprimierenden Zelllinien zeigen keine autonome Aktivierung des Met-Rezeptors, sondern erfordern zu dessen Aktivierung die Zugabe von Hgf-Protein. Liegt dennoch eine von äußeren Faktoren unabhängige Aktivierung der Met-exprimierenden Zellen vor, so kann die Ursache dafür in verschiedenen zellulären Veränderungen begründet sein. Beispielsweise können zum einen Rezeptor-interne Mutationen in einer regulatorisch entscheidenden Domäne, wie etwa der Tyrosin-Kinase-Domäne (TKD), der Juxtamembran-Domäne (JMD), welche die Rezeptorstabilität und dessen Internalisierung maßgeblich beeinflusst, und/oder der extrazellulären Sema-Domäne (SEMD), die für die korrekte Bindung des Liganden und der etwaigen Wechselwirkung weiterer Oberflächen-Adapterproteine unabdingbar ist, ein Grund für die autonome Rezeptorkinaseaktivität sein. Zum anderen ist für einige Tumorzelllinien die *de novo* Expression des Hgf-Proteins beschrieben, was seinerseits zur Ausbildung einer autokrinen Aktivierungsschleife innerhalb des Zellsystems führen kann. Des Weiteren kann die Induzierung des Met-Signalweges auch unabhängig von aktivierenden Mutationen bzw. in- oder externer Liganden-Bindung durch die starke Überexpression des Rezeptors erfolgen. Die Überexpression des Rezeptors führt zu einer zunehmenden Rezeptor-Dichte an der Oberfläche der Zellen und im Zuge dessen zu einer autonomen Clusterbildung und Autophosphorylierung der Kinase-Domäne mit darauf folgender Aktivierung des Met-Signalweges.

Die Expression, Verteilung und Aktivität des Met-Rezeptors in der G-2 und G-2C9 Zelllinie wurde zunächst über indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von Met und p-Met (Tyr1347) analysiert. Wie in Abbildung 17 zu sehen, zeigen sowohl die parentalen G-2 als auch die klonierten G-2C9 Zellen eine starke Expression des Met-Proteins. Zusätzlich konnte mit Hilfe des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers eine eindeutige Phosphorylierung des Rezeptors nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der Met-MSD impliziert eine endogene Aktivierung des Rezeptors ohne Zugabe von rekombinantem Hgf. Allerdings ist nicht klar, ob es sich bei der vorliegenden Rezeptor-Aktivität um die maximal mögliche Aktivierung oder um eine basale Aktivität und einer daraus resultierenden schwachen Signalstärke handelt, die durch die externe Zufuhr von rekombinantem Hgf intensiviert und zu ihrem vollen Ausmaß gebracht werden könnte.

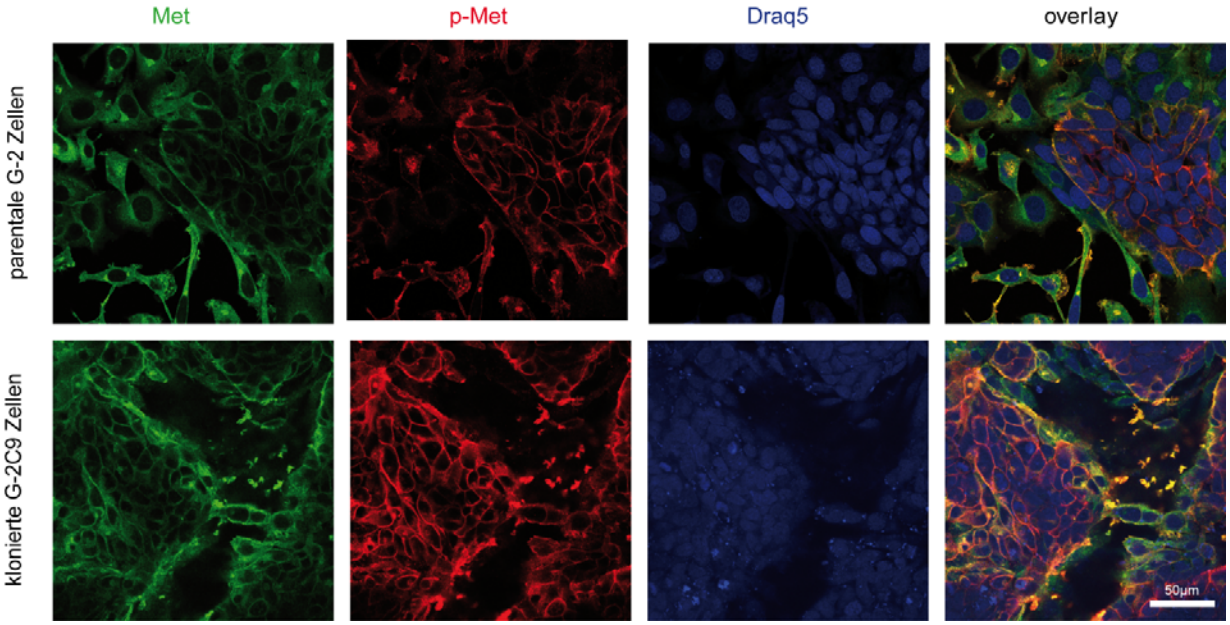


Abbildung 17: Expression und Aktivität des Met-Rezeptors in parentalen und klonierten G-2 Zellen.

Die Expression und Aktivität von Met wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Markierung in parentalen G-2 und klonierten G-2C9 Mammarkzinomzellen analysiert. Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert und nach PFA-Fixierung mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-Proteins über Alexa-488 und im Falle von p-Met über Alexa-555 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss AG) mittels 40x-Immersions-Objektiv aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. Verwendete Met-Antikörper: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R.

4.2.1 Analyse der Hgf-induzierten Met-Aktivität in G-2C9 Zellen

Um eine mögliche Zunahme der autonomen Aktivität des Met-Rezeptors durch externes Hgf zu überprüfen, wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden unter Serumentzug kultiviert und im Anschluss daran in Anwesenheit von FCS und Hgf im Rahmen einer Zeitreihe kultiviert. Zur Überprüfung der Funktionalität des rekombinanten Hgf wurden HeLa Zellen als Kontrolle verwendet, die zwar Met exprimieren aber wie in Abbildung 18 A zu erkennen, keine autonome Met-Aktivität aufweisen. Die Proteinextrakte wurden zusammen mit der Hgf-freien Probe zum Zeitpunkt 0 über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im quantitativen Western-Blot (qWB) vergleichend auf die Phosphorylierung der Met-MSD untersucht (siehe Abbildung 18 A-B).

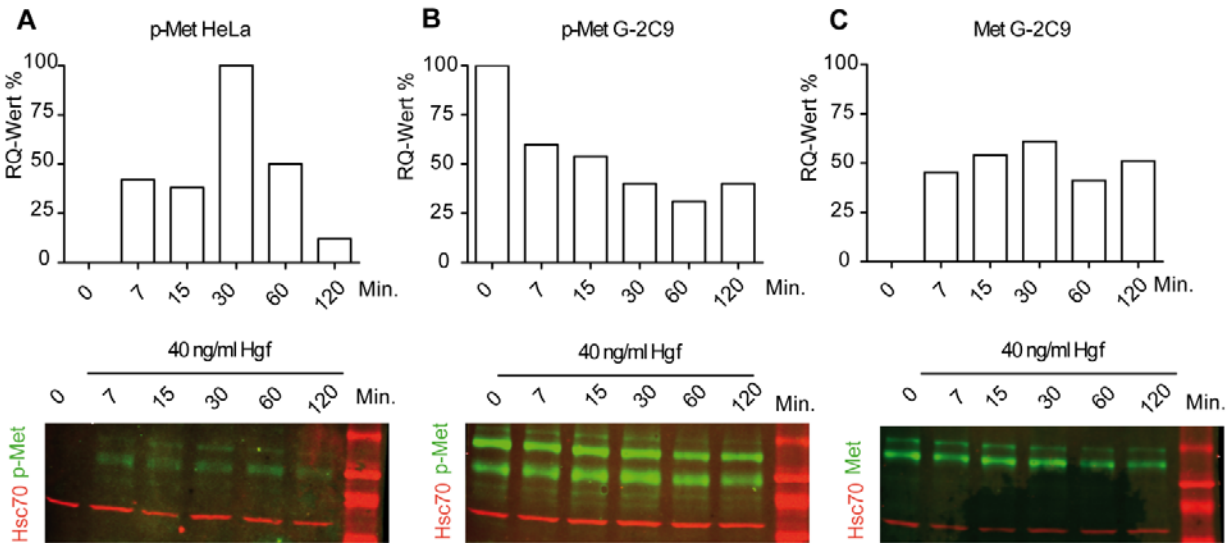


Abbildung 18: Effekt von rekombinantem Hgf auf die Phosphorylierung des Met-Rezeptors in HeLa und G-2C9 Zellen.

Analyse der katalytischen Met-Aktivität. 48 Stunden unter Serumentzug kultivierte HeLa (A) und G-2C9 (B, C) Zellen wurden in frisches, FCS-haltiges Medium überführt. Anschließend wurden 40 ng/ml Hgf zugegeben. Die Proteinproben wurden 7, 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Hgf-Zugabe entnommen und die Menge an phosphoryliertem Met (A, B) bzw. Gesamt-Met (C) über qWB ermittelt. Zusätzlich wurde eine Hgf-freie Probe zum Zeitpunkt 0, also ohne die Zugabe von Hgf in die Analyse mit einbezogen. Die Detektion und Auswertung der Blots erfolgte mit dem *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma LI-COR Bioscience über Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper. Die Detektion von Hsc70 (*housekeeping*-Protein) erfolgte über IRDye 700 (rot), die von Met und p-Met erfolgten über IRDye 800 (grün). Die Normierung der Proben erfolgte auf den Wert mit dem stärksten p-Met-Signal, welches gleich 100% gesetzt wurde. Verwendete Met-Antikörper: Met # GTX10681; p-Met # sc-34086-R.

Die Ergebnisse des qWBs zeigen, dass die maximal mögliche Phosphorylierung von Met in der Hgf-freien Probe zum Zeitpunkt 0 der G-2C9 Zellen zu finden ist (siehe Abbildung 18 B). Desweiteren ließ sich sogar eine leichte Reduktion des Signals nach 60 bis 120 Minuten Inkubationszeit detektieren. Die zusätzlich durchgeführte Analyse der generellen Rezeptor-Expression - unabhängig von dessen Phosphorylierung - wies eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenzintensitäten auf (siehe Abbildung 18 C). So zeigte die unbehandelte Probe (die Hgf-freie Probe zum Zeitpunkt 0) nicht nur die größte Menge an aktivem Met, sondern generell auch den höchsten Met-Proteinanteil. Auch die Proben der 60 und 120 minütigen Inkubation zeigten eine Korrelation zwischen Gesamt-Met und phosphoryliertem Met-Rezeptor. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die zusätzliche Zugabe von Hgf keinen aktivierenden Effekt auf den Met-Rezeptor in den G-2C9 Zellen hat. Die Funktionalität des eingesetzten Hgf ließ sich jedoch anhand der Phosphorylierung der HeLa Zellen bestätigen. So zeigte die unbehandelte

Referenzprobe der HeLa Zellen zum Zeitpunkt 0 kein nachweisbares Signal, wohingegen bereits 7 Minuten nach der Zugabe von Hgf und auch nach 120 Minuten noch nachweisbare Phosphorylierung des Met-Rezeptors detektiert werden konnte (siehe Abbildung 18 A). Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuches wurden im Folgenden alle Experimente ohne die zusätzliche Zugabe von rekombinantem Hgf durchgeführt.

4.2.2 Sequenzierung von Met cDNA Fragmenten aus WAP-T Tumoren und G-2C9 Zellen.

Die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* anhaltende Aktivität des Met-Rezeptors ließ vermuten, dass diese durch eine signalverstärkende Mutation im Met-Rezeptor verursacht werden könnte. Die DNA-Sequenzen von aus anderen Zelllinien für Mutationen bekannte Bereiche wie die Kinase-Domäne kodierende Sequenz, die Juxtamembran-Domäne kodierende Sequenz und die Sema-Domäne kodierende Sequenz wurden über entsprechende Primer aus der cDNA von je 3 *low*- und *high-grade* Tumoren sowie parentalen G-2 und klonierten G-2C9 Zellen amplifiziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten keine Aminosäure modifizierende Mutationen der Nukleotide. Allerdings wiesen einige Positionen des *Met*-Gens sogenannte *Wobble*-Sequenzen auf, bei denen es zwar zum Austausch einer Base gekommen ist, diese aber nicht zur Veränderung der kodierenden Aminosäure führte (siehe Anhang Seite xiii).

4.3 Analyse der Met-Expression in den G-2C9 Subpopulationen

Die G-2 wie auch die G-2C9 Zellkultur zeigen einen EMT/MET-Phänotyp und beinhalten Zellen verschiedener Differenzierungsstufen, die entweder einer quasi-mesenchymalen, einer quasi-epithelialen Subpopulation oder einem Übergangzustand zwischen beiden Differenzierungszuständen zugeordnet werden können (siehe Abschnitt 1.2). Da sich unter physiologischen Bedingungen und im adulten Organismus die Expression des Met-Rezeptors nahezu ausschließlich auf Zellen epithelialer Herkunft nachweisen lässt, sollte untersucht werden, ob die Expression von Met auch in diesem Zellsystem und im Rahmen der EMT/MET differentiell reguliert und zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien unterschiedlich exprimiert wird. Um die Expression des Met-Proteins bestimmten Subpopulationen zuordnen zu können, wurden G-2C9 Zellen mit einem direkt-markierten Fluorochrom-konjugierten Met- bzw. Thy1-spezifischen Antikörper markiert, deren Verteilung analysiert und die resultierenden

Populationen von Met^+/Met^- bzw. $Thy1^+/Thy1^-$ Zellen durchflusszytometrisch separiert. Nach anschließender RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde die Expression von Epithel- und Mesenchym-spezifischen Genen zwischen den Subpopulationen mithilfe der qRT-PCR verglichen.

4.3.1 Expressionsanalyse der Met^+ und Met^- Subpopulationen mittels qRT-PCR

Über die Markierung eines extrazellulären Epitops des Met-Rezeptors mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper lässt sich die Verteilung des Proteins in der Gesamtkultur im FACS darstellen. Die in Abbildung 19 A dargestellte Punktwolken-Verteilung der analysierten Zellen zeigt eine heterogene Expression des Met-Rezeptors innerhalb der Zellkultur. Anhand ungefärbter Kontrollzellen wurde sowohl die Existenz einer Met-negativen (Met^-) als auch einer Met-positiven (Met^+) Subpopulation innerhalb der G-2C9 Zellkultur nachgewiesen. Die Met^+ Zellen umfassen dabei eine Gruppe von Zellen, die alle Expressionszustände von schwach positiv bis stark positiv kontinuierlich darstellen. Zum weiteren Vergleich der Met^- und Met^+ Subpopulationen wurden die Zellen gemäß des in Abbildung 19 A dargestellten *gatings* sortiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in etwa gleiche Zellzahlen sortiert wurden. Bei der Definition der zu sortierenden Gruppen wurde ein entsprechend großer Abstand zwischen eindeutig Met-negativen und stark Met-positiven Zellen sichergestellt, um eine kontaminationsfreie Separierung zu gewährleisten. Die voneinander getrennten Subpopulationen wurden nach dem in Abschnitt 3.6.1 beschriebenem Protokoll lysiert und nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels qRT-PCR auf die Expression mesenchymaler und epithelialer Marker untersucht. Die Analyse wurde in vier unabhängigen Replikaten durchgeführt. Unter der Annahme, dass der Subklon G-2C9 die Eigenschaften der parentalen G-2 Zellen widerspiegelt, wurden zunächst zwei Gruppen von Genen analysiert, die bei der Klassifikation der parentalen G-2 Kultur den quasi-epithelialen bzw. quasi-mesenchymalen Zustand definieren (siehe Abschnitt 1.2). Zur Gruppe der untersuchten mesenchymalen Markergene zählen: (i) *Sca1*, (ii) *Thy1*, (iii) *Twist2* und (iv) *Vim* (Gen von Vimentin). Die Gruppe der untersuchten epithelialen Markergene beinhaltet allgemeingültige Marker der epithelialen Differenzierung und solche die spezifisch für das G-2-CCS etabliert wurden. Zu den hier verwendeten Markern zählen: (i) *Cd24a*, (ii) *Cd49f,* (iii) *Epcam*, (iv) *Krt14* (Gen von Keratin14), (v) *SV40 LT* und (vi) *Wap*.

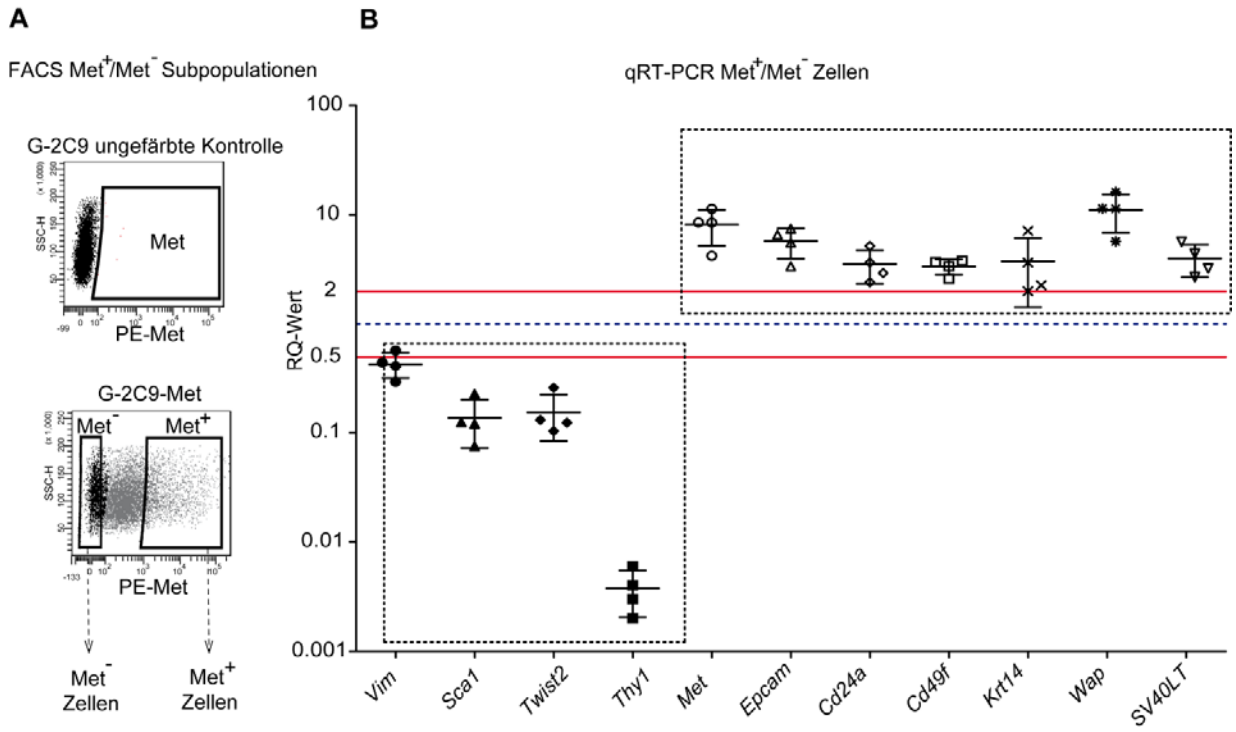


Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker in Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen.

(A) FACS-Analyse und Sortierung der Met$^+$/Met$^-$ Subpopulationen aus G-2C9 Zellen. Gatingstrategie: Die Punktwolken-Diagramme zeigen die Fluoreszenz des Fluorochrom gekoppelten Met-Antikörpers (PE) aufgetragen gegen den SSC. Ausgehend von ungefärbten Kontrollzellen wurden die Met-positiven und Met-negativen *gates* definiert. Zur Sortierung der Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen wurden die *gates* auf die stark Met-positiven bzw. -negativen Zellen reduziert. Nach Sortierung, RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden die Proben mittels qRT-PCR auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker untersucht. Der Versuch wurde in vier biologischen Replikaten durchgeführt (n=4) (B). Dargestellt sind die RQ-Werte der vier biologischen Replikate der Met$^+$ Proben für das jeweilige Gen. Jeder Punkt stellt einen RQ-Wert dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige Met$^-$ Population, deren RQ-Werte somit 1 betrugen. Die RQ-Werte der Met$^-$ Populationen sind als blaue gestrichelte Linie dargestellt. Die roten Linien bei RQ 2 und 0,5 dienen als Hilfslinien und markieren die Grenzen einer 2-fachen Reduktion bzw. Anreicherung der Transkripte gegenüber 1. Liegen die RQ-Werte über bzw. unter der roten Linie bedeutet diese eine zweifache Anreicherung bzw. Reduktion der Transkriptmenge eines Gens in der Met$^+$ Population gegenüber der Met$^-$ Population. RQ-Werte die zwischen den beiden roten Linien liegen, zeigen keine signifikante Regulation zwischen den Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen. Die Mittelwerte der einzelnen Proben sind als Querbalken mit Standard-Fehler (SD) dargestellt. Als *housekeeping*-Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Der Vergleich der Expressionswerte der epithelialen bzw. mesenchymalen Markergene sowie der *Met*-mRNA zwischen den Met$^+$ und Met$^-$ separierten Subpopulationen der G-2C9 Zellen zeigte deutlich, dass sich der unterschiedliche Proteinstatus der Met$^+$ und Met$^-$ Zellen in einer entsprechenden Expression der *Met*-mRNA widerspiegelt und somit das *Met*-Gen zwischen den

Populationen transkriptionell unterschiedlich reguliert wird. Zusätzlich ließ sich auch die Expression mesenchymaler und epithelialer Marker mit den Met^+ und Met^- Subpopulationen korrelieren (siehe Abbildung 19 B). Obwohl für jeden der untersuchten Marker ein Transkript in beiden Subpopulationen nachgewiesen werden konnte, zeigten die epithelialen Marker eine verstärkte Expression in der Met^+ Subpopulation, wohingegen die mesenchymalen Marker deutlich in ihrer Expression reduziert waren. Die spezifische Regulation der einzelnen Marker variierte dabei untereinander erheblich. Dennoch ließen sich innerhalb der Gruppe der mesenchymalen Marker signifikante Expressionsunterschiede nachweisen. So war die Transkription von *Vim* um das bis zu 3-fache in den Met^+ Zellen reduziert, wohingegen die Expression von *Thy1* eine bis zu 1000-fache Reduktion gegenüber der Met^- Population aufwies. Demgegenüber zeigte die Gruppe der epithelialen Marker eine einheitliche Hochregulation der einzelnen Gene. Die epithelialen Marker zeigten allgemein eine 2- bis 13-fache Anreicherung ihrer Transkripte in der Met^+ Subpopulation. Die *Met*-mRNA selbst zeigte ebenfalls eine von Experiment und Zustand der Zellen abhängige 4- bis 11-fache Regulation auf transkriptioneller Ebene.

Zusammenfasssend lässt sich feststellen, dass (i) das *Met*-Gen sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene in den G-2C9 Zellen differentiell exprimiert wird, (ii) sich die Annahme, das Gleichgewicht und Expressionsprofil der parentalen und gut charakterisierten G-2 Zellen im Subklon der G-2C9 Zellen wiederzufinden, bestätigen lässt und (iii) sich die Met-positiven Zellen aufgrund ihres Transkriptionsprofils den eher epithelial differenzierten Zellen der G-2C9 Kultur zuordnen lassen, bzw. dass sich Met als Marker der epithelialen Differenzierung in die Gruppe epithelialer Marker aufnehmen lässt.

Als Konsequenz aus (ii) wurde im weiteren Verlauf der Experimente ausschließlich die klonale Tochterzelllinie G-2C9 eingesetzt, da diese Zelllinie als Subklon einer Primärzelllinie den Vorteil der Klonalität unter Beibehaltung der spezifischen Eigenschaften der parentalen G-2 Zellen liefert.

4.3.2 Vergleichende Expressionsanalyse von Met und Thy1 in den G-2C9 Subpopulationen

Die Expressionsanalysen der Markergene der Met^- und Met^+ Subpopulationen ermöglichten deren Zuordnung zum quasi-mesenchymalen bzw. quasi-epithelialen Kompartiment. Inwieweit lassen sich aber die detektierten transkriptionellen Unterschiede auch auf die resultierenden

Proteinmengen übertragen? Wie in Abschnitt 4.3.1 erläutert, zeigt *Thy1* als Marker der quasi-mesenchymalen Differenzierung in Verbindung mit Stammzelleigenschaften eine um ca. 1000-fach reduzierte Transkriptmenge in der Met^+ Subpopulation. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Expression von *Thy1* stellvertretend für das quasi-mesenchymal differenzierte Kompartiment der G-2C9 Zellen analysiert. Um der Frage nachzugehen, ob sich die *Met*- und *Thy1*- Genexpression auch auf Proteinebene den verschiedenen Differenzierungsstadien der Zellen zuordnen lassen, wurde die Gesamtkultur der G-2C9 Zellen durchflusszytometrisch analysiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung auf ihre Met und Thy1 Protein-Expression untersucht. Des Weiteren wurden die Zellen gemäß ihrer Thy1 Expression sortiert und die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker mittels qRT-PCR verglichen.

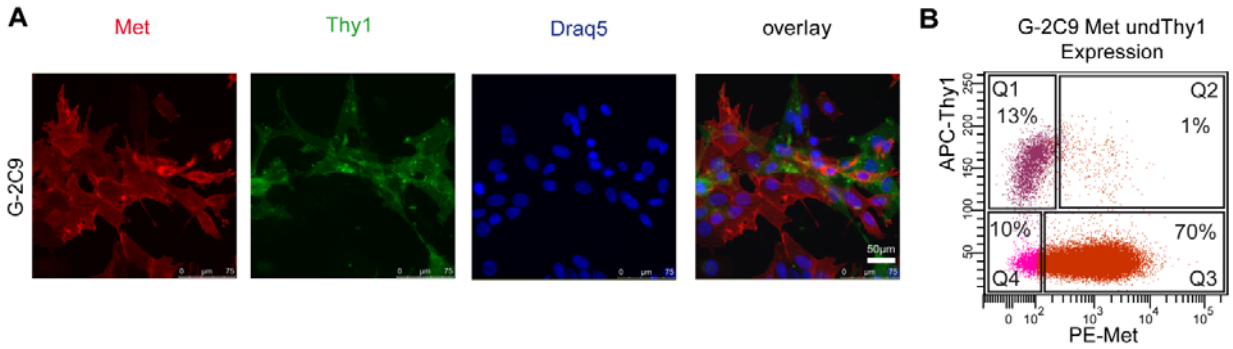


Abbildung 20: Analyse der Expression der Met- und Thy1-Proteine in G-2C9 Zellen.

Die Lokalisation von Met und Thy1 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Markierung (A) und FACS-Analyse (B) untersucht. (A) Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert, mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-Proteins über Alexa-555 und im Falle von Thy1 über Alexa-488 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Immersions-Objektiv aufgenommen. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. (B) Die Zellen wurden im FACS nach Färbung mit direkt-markierten Antikörpern auf die Expression des Met- und Thy1-Proteins analysiert. Gatingstrategie: Anhand einer ungefärbten Kontrolle wurden die positiven und negativen *gates* ausgehend von der Population an lebenden Zellen gelegt. Das Punktwolken-Diagramm stellt die Met-Expression in Abhängigkeit der Thy1-Expression eines Versuches exemplarisch dar. Q1= $Thy1^+$ /Met^- Zellen; Q2= doppelt positive Zellen; Q3= Met^+/$Thy1^-$ Zellen; Q4= doppelt negative Zellen. Verwendeter Met-Antikörper: Met # sc-8057.

Die in Abbildung 20 A dargestellte IF-Färbung des Met und Thy1 Proteins lässt den Schluss zu, dass die Expression beider Proteine nur auf unterschiedlichen Zellen vorkommt und die Präsenz des einen Proteins ein Ausschlusskriterium für die Expression des jeweils anderen darstellt. Die exakte Verteilung der Proteinexpressionen ließ sich aber noch deutlicher nach der

durchflusszytometrischen Analyse der markierten Zellen bestimmen. Zu diesem Zweck wurden G-2C9 Zellen nach dem in Abschnitt 3.2.12.1 beschriebenen Protokoll vereinzelt und die Expression von Met bzw. Thy1 über deren Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern visualisiert. Abbildung 20 B stellt eine durchflusszytometrische Analyse nach Met- und Thy1-Färbung der G-2C9 Zellen als Punktwolken-Diagramm exemplarisch dar. Die Analyse zeigt deutlich, dass es sich bei dem größten Teil der Met- und Thy1-positiven Zellen um getrennte Subpopulationen handelt. Der Prozentsatz der doppelt positiven Zellen war sehr gering und umfasste ca. 1% der lebenden Zellen, während doppelt negative Zellen 5-10% der Gesamtkultur umfassten. Die Anzahl an Met-positiven Zellen variierte zwischen 70% und 90%, die der Thy1-positiven zwischen 3% und 15%.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die quasi-mesenchymale Thy1-positive Subpopulation zu 99% Met-negativ ist. Demzufolge stellen die quasi-mesenchymal differenzierten und quasi-epithelial differenzierten Zellen zwei getrennte Subpopulationen dar. Allerdings exprimieren nicht alle Met-negativen Zellen das Oberflächenprotein Thy1, vielmehr stellen die Thy1-positiven Zellen eine eigene Subpopulation innerhalb der Met-negativen Teilpopulation dar.

Der Vergleich zwischen den $Thy1^+$ und $Thy1^-$ sortierten Subpopulationen zeigte, dass die $Thy1^-$ Zellen zu einem Großteil ein positives Signal für Met aufweisen und keinerlei Expression für Thy1 selbst (Abbildung 21 A). Die als $Thy1^+$ sortierten Zellen weisen naturgemäß eine starke Färbung des Thy1 Proteins auf, enthalten aber auch einige Zellen die positiv für die Expression des Met Proteins sind. Bei genauer Betrachtung ist aber kaum eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale zu erkennen. Da die Detektion des FACS-Gerätes viel sensibler ist als die Wahrnehmung durch die Kamera des Mikroskops, handelt es sich bei den Met^+ Zellen der $Thy1^+$ Population möglicherweise um solche Zellen, die vom FACS als schwach Thy1 positiv erkannt wurden. Durch die Fluoreszensintensität der stark positiven Zellen bei der Immunfluoreszenzfärbung lässt sich ein schwach positives Fluoreszenzsignal nicht darstellen und geht zugunsten einer korrekten Belichtung des Großteils an Zellen verloren.

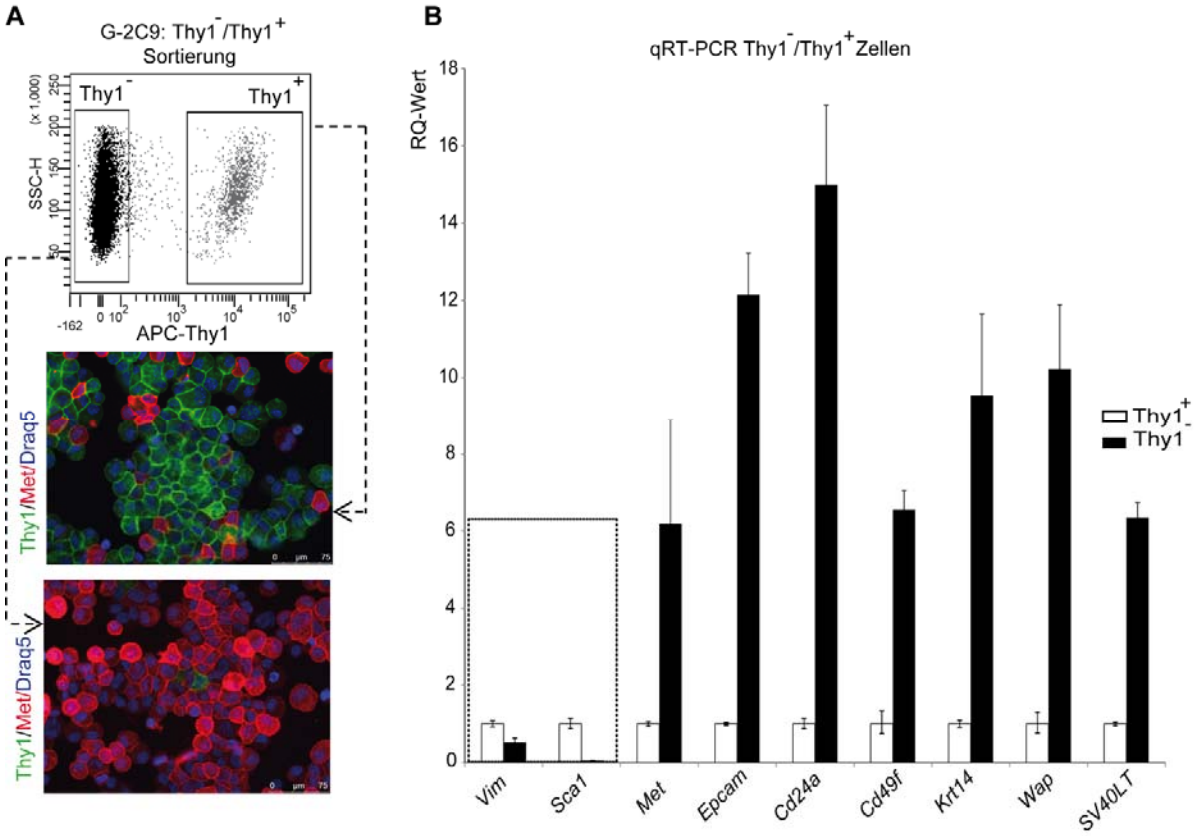


Abbildung 21: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker in Thy1$^+$ und Thy1$^-$ Subpopulationen.

(A) Analyse des Met und Thy1 Proteins nach FACS-Sortierung der Thy1$^+$/Thy1$^-$ Population durch IF-Färbung. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-Proteins über Alexa-555 und im Falle von Thy1 über Alexa-488 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 75 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Immersions-Objektiv aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. (B) Vergleichende qRT-PCR-Analyse epithelialer und mesenchymaler Marker. Dargestellt sind die RQ-Werte der Thy$^+$/Thy1$^-$ Probenpaare, wobei auf die Thy1-positive Population (RQ = 1) normiert wurde. Als *housekeeping*-Gen wurde *Gapdh* verwendet. Verwendeter Met-Antikörper: Met # sc-8057

Vergleichende Expressionsanalysen der beiden Subpopulationen, die in Abbildung 21 B dargestellt sind, zeigen zum einen eine reduzierte Expression der *Met*-mRNA in Thy1$^+$ Zellen und zum anderen das exakte Spiegelbild des Transkriptionsprofils von Met$^+$ und Met$^-$ Zellen (vergleiche Abbildung 19 B). Demzufolge zeigen alle untersuchten Gene der mesenchymalen Gruppe eine stärkere Expression in Thy1$^+$ Zellen, während die Expression der epithelialen Marker reduziert ist. Diese Analyse der Thy1$^+$/Thy1$^-$ Subpopulationen bestätigt zum einen die Trennung der Met$^+$ und Thy1$^+$ Subpopulationen voneinander, lässt aber zum anderen durch die Expression der *Met*-mRNA in den Thy1$^+$ Zellen den Gedanken der Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen hin zum Met$^+$ Kompartiment zu. Die basale Expression aller untersuchten

epithelialen Marker, inklusive *Met* in der quasi-mesenchymal differenzierten Thy1$^+$ bzw. Met$^-$ Population deutet auf eine nicht vollständig abgeschlossene EMT und die Fähigkeit zur epithelialen Redifferenzierung dieser Zellen hin. Somit könnte die Veränderung spezifischer innerer bzw. äußerer Faktoren das Gleichgewicht zwischen der Transkription von epithelialen und mesenchymalen Genen beeinflussen und durch die bereits bestehende basale Transkription zu einer schnellen Veränderung des zellulären Phänotyps führen.

4.4 Analyse des Differenzierungspotentials der Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen

Die Charakterisierung der parentalen G-2 Zellen zeigte, dass die verschiedenen Subpopulationen der G-2 Zellen in der Lage sind, unabhängig voneinander zu proliferieren, die entsprechende fehlende Subpopulation erneut zu generieren und so die phänotypische Heterogenität der Ausgangspopulation wieder herzustellen (Wegwitz et al., 2010). Eine Ausnahme stellte dabei die Thy1-negative Population dar, die nur begrenzt die Fähigkeit besitzt, Nachkommen mit Thy1-Expression zu produzieren. Eine besondere Rolle wird dabei der Thy1-positiven Subpopulation zuteil, die in der Lage ist, aus ihrer quasi-mesenchymalen Differenzierung Nachkommen eines epithelialen Phänotyps zu generieren, während die Population der Thy1$^-$ Zellen zum Großteil weiterhin negativ für Thy1 bleibt. Dennoch existiert ein geringer Anteil an Zellen, welcher nach einer gewissen Zeit der Kultivierung die Expression des epithelialen Markers Epcam einstellt, was insgesamt für eine Plastizität der G-2 Kultur spricht. Aufgrund der Tatsache, dass die Met-positiven Zellen keine Thy1-Expression zeigen, wurde analog zu den publizierten Repopulationsexperimenten das Kultivierungs- und Repopulationspotenzial der separierten Met$^+$/Met$^-$ Subpopulationen untersucht.

4.4.1 Repopulationsstudien der Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen

Die in Abschnitt 4.3.2 beschriebene durchflusszytometrische Charakterisierung der G-2C9 Zellen zeigte, dass die Met-positive Population zwischen 70% und 90% der Gesamtkultur ausmacht und sich der Anteil an Thy1-positiven Zellen zwischen 3% und 13% bewegt. Für die Analyse der Repopulationsfähigkeit der Met-exprimierenden Zellen wurden G-2C9 Zellen entsprechend ihrer Met-Expression in eine stark Met-positive und eine eindeutig Met-negative Gruppe aufgetrennt (siehe Abbildung 22 A) und unter den herkömmlichen Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach 4 und 8 Tagen wurde die Morphologie der Zellen dokumentiert und deren Expression der Met und

Thy1 Proteine durchflusszytometrisch vermessen. Zum Zeitpunkt der Met-abhängigen Zellsortierung zeigten 80% der Zellen eine Expression des Met-Proteins, während ca. 7% der Zellen positiv für die Expression von Thy1 waren (siehe Abbildung 22 A).

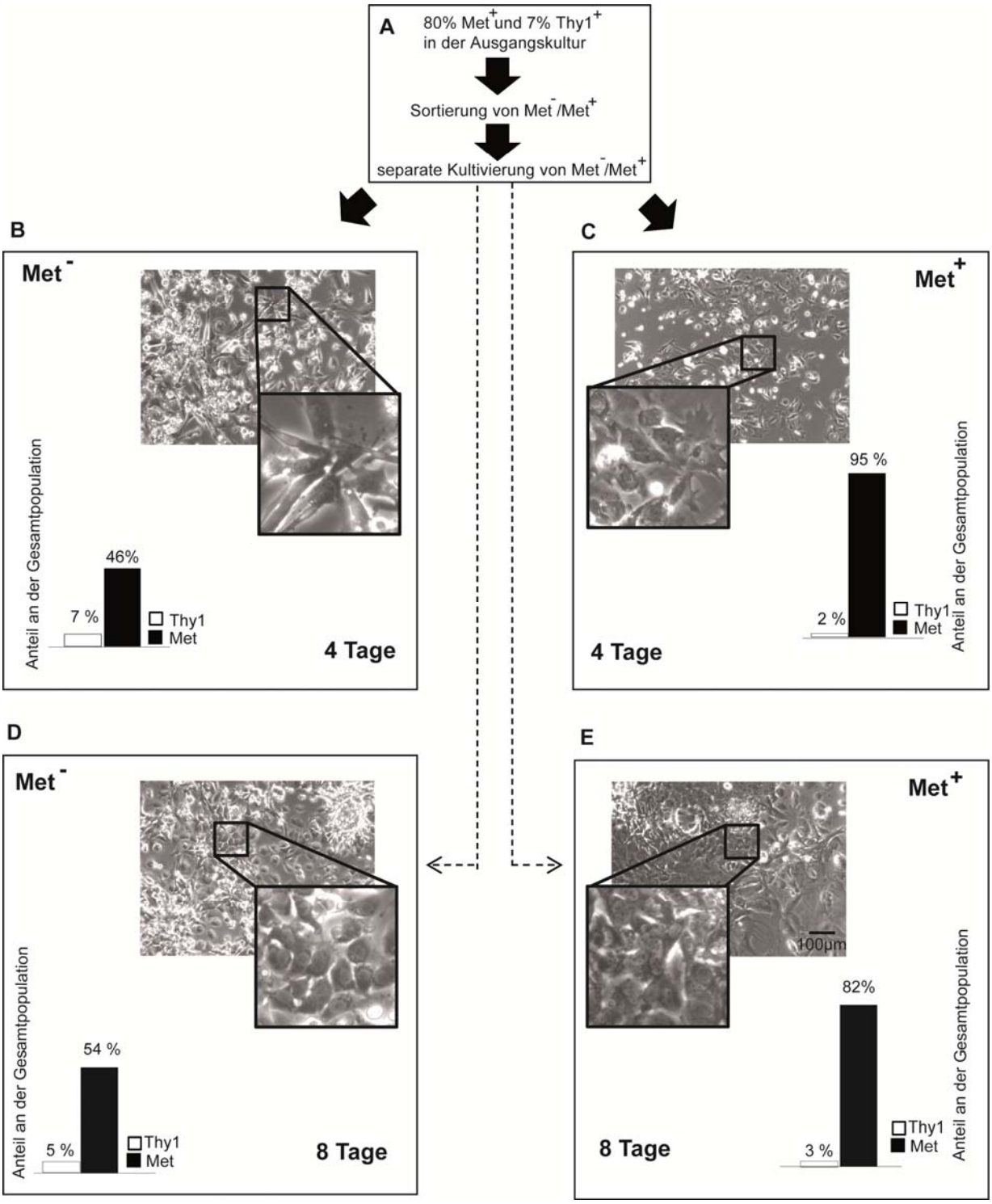


Abbildung 22: Repopulationsstudie der Met$^+$ und Met$^-$ Zellen nach 4 und 8 Tagen separater Kultivierung.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Zusammensetzung der Ausgangspopulation. Die Re-Analyse der sortierten und separat kultivierten Zellen fand nach 4 (B und C) und 8 Tagen (D und E) per FACS-Analyse statt. Die Ergebnisse wurden in Balkendiagrammen zusammengefasst. Die Aufnahme der Zellen nach 4 (B und C) und 8 Tagen (D und E) erfolgte am Durchlicht-Mikroskop, der Größenstandard beträgt 100 µm. Die Ergebnisse der Re-Analyse der als Met^+ sortierten Zellen sind auf der rechten Seite (C und E), die Ergebnisse der als Met^- sortierten Zellen auf der linken Seite der Abbildung dargestellt (B und D).

Die Re-Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Met- und Thy1-Expressionen nach 4 Tagen zeigte, dass die Met^+ Zellen immer noch zu etwa 95% positiv für Met waren aber bereits eine kleine Population an Thy1-positiven Zellen entstanden ist (siehe Abbildung 22 C). Dagegen zeigten über 40% der ehemals Met-negativen Zellen eine Expression des Met-Proteins, wobei sich der Prozentsatz der Thy1-positiven Zellen mit 7% kaum von dem der Ausgangspopulation unterschied (siehe Abbildung 22 B). Vergleicht man die Morphologie beider Populationen so fällt auf, dass die ehemals Met-positiven Zellen (Abbildung 22 C) einen eher rundlich epithelialen und Kolonien-bildenden Phänotyp aufweisen, während die ehemals Met-negativen Zellen (Abbildung 22 B) größtenteils ein spindelförmiges, mesenchymales Aussehen zeigen und als Einzelzellen vorliegen. Nach 8-tägiger Kultivierung verändert sich allerdings dieser spindelförmige Phänotyp zugunsten eines eher epithelialen Erscheinungsbildes, was mit der weiteren Zunahme der eher epithelialen, Met-positiven Zellpopulation auf über die Hälfte aller Zellen einhergeht (siehe Abbildung 22 D). Die Anzahl der Thy1-positiven Zellen bleibt sowohl in den ehemals Met^- als auch den Met^+ Zellen mehr oder weniger unverändert. Die ehemals Met-positive Subpopulation zeigt nach 8 Tagen der Kultivierung eine Reduktion der Met-positiven Zellen auf ca. 80%, was im Allgemeinen den Verhältnissen der Ausgangspopulation entspricht. Die Thy1-Expression war allerdings weiterhin nur auf 3% aller Zellen zu finden (siehe Abbildung 22 E).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Met^- als auch die Met^+ Subpopulation in der Lage sind, Zellen der entsprechenden Komplementärpopulation bereits ab 4 Tagen nach der Separierung zu generieren. Die Repopulation erfolgte jedoch in Met^- Zellen deutlich schneller als in Met^+ Zellen, was im Kontext mit der für die Thy1-positive Subpopulation der G-2 Zellen beschriebenen Repopulationsfähigkeit steht (siehe Abbildung 1).

4.5 Die Rolle des Met-Liganden Hgf in G-2C9 Mammakarzinomzellen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfolgt die Aktivierung des Met-Rezeptors in Zellen des adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen *in vivo* durch Bindung von Hgf und ist somit Liganden-abhängig. Ebenso benötigen die meisten Zellkulturmodelle zur *in vitro* Analyse des Met-Signalweges die Zugabe von rekombinantem Hgf, um den Met-Rezeptor zu aktivieren. In Tumorzellen kann es neben der Liganden-abhängigen Aktivierung allerdings noch zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung durch onkogene Mutationen und vielfacher Überexpression des Rezeptors kommen. Ebenso konnte in einigen Zellkulturmodellen maligner Zellen eine gleichzeitige Expression des Rezeptors und seines Liganden und damit die Ausbildung einer autokrinen Rückkopplungsschleife festgestellt werden (Rahimi et al., 1996; Tsao et al., 1993; Tuck et al., 1996). Verschiedene Gründe machen die Analyse der Hgf-Expression im Zellkultursystem der G-2C9 Zellen unabdingbar. Zum einen konnte eine Hgf-unabhängige, nicht auf Mutationen basierende aber andauernde Aktivität des Rezeptors festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.2), zum anderen handelt es sich hier um ein im Gleichgewicht zwischen quasi-mesenchymalen und quasi-epithelialen Differenzierungszuständen stehendes System von Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften. Darüber hinaus konnte in den Tumoren der WAP-T Mäuse eine Hgf-Expression ungeklärter Herkunft detektiert werden (siehe Abbildung 15 B). All diese Faktoren geben Grund zu der Annahme, dass (i) Hgf ebenfalls im Tumorzellsystem der G-2C9 Zellen exprimiert werden könnte und (ii) dass dessen Expression zwischen quasi-mesenchymal und quasi-epithelial differenzierter Subpopulation spezifisch reguliert sein könnte.

4.5.1 Hgf-Proteinexpression und Verteilung in der G-2C9 Gesamtkultur

Die indirekte Immunfluoreszenz-Markierung des Hgf-Proteins liefert sowohl Informationen über die Expression des Proteins, als auch über dessen zelluläre Lokalisation bzw. dessen Verteilung auf verschiedene Subpopulationen innerhalb der G-2C9 Zellkultur. Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene gängige Prozedur der Immunfluoreszenz-Markierung von Proteinen erfolgte mit auf Deckgläschen kultivierten G-2C9 Zellen.

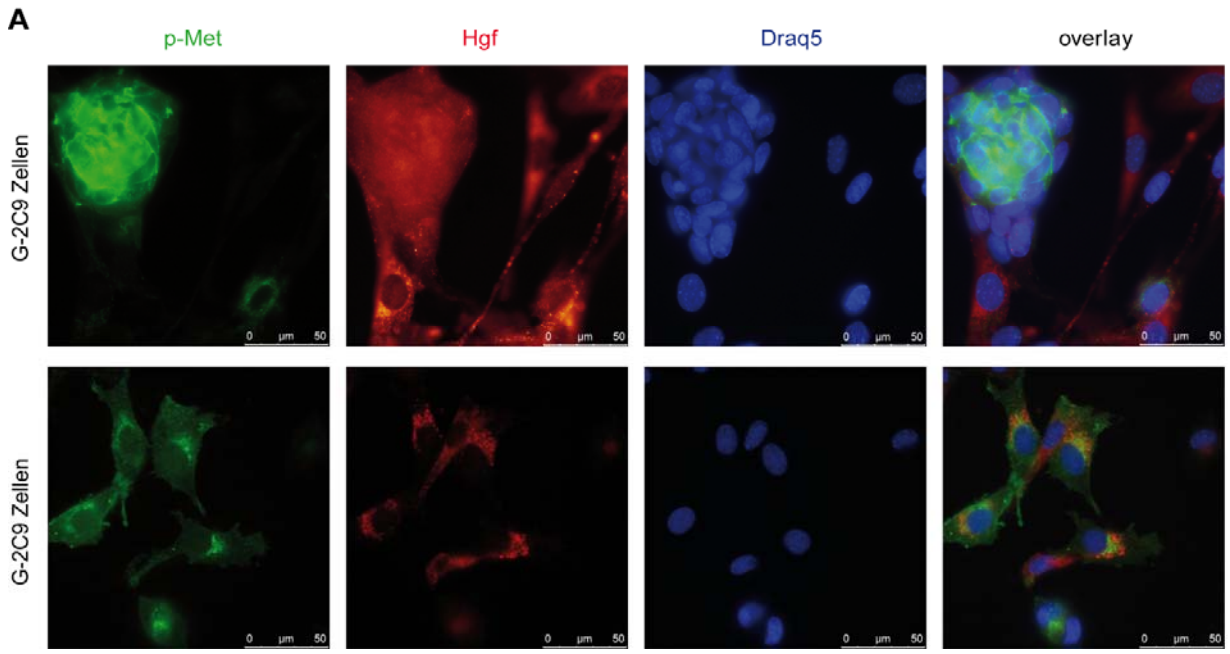


Abbildung 23: Analyse der Hgf-Expression und der Met-Phosphorylierung in G-2C9 Zellen.

Die Expression und Lokalisation von Hgf und p-Met wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Markierung untersucht. Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert, mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Hgf-Proteins über Alexa-555 und im Falle von p-Met über Alexa-488 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Immersions-Objektiv aufgenommen. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. Die obere Reihe zeigt eine dichte Zellkolonie mit wenigen Einzelzellen, die untere Reihe zeigt nur vereinzelte Zellen. Verwendeter Met-Antikörper: p-Met # sc-34086-R.

Abbildung 23 zeigt die Expression von Hgf und die Phosphorylierung des Met-Rezeptors. In der ersten Reihe der Abbildung erkennt man eine epitheliale Kolonie und einige daraus hervorgehende Einzelzellen. Die Kolonie weist eine intensive membranständige Färbung des aktivierten Met-Rezeptors auf, während sich in den Einzelzellen kaum ein aktiver Met-Rezeptor detektieren lässt bzw. dessen Lokalisation eher zytoplasmatisch zu sein scheint. Allerdings zeigt sich demgegenüber die Färbung des Hgf-Proteins in diesen Einzelzellen deutlich stärker als in der p-Met-positiven Kolonie. Da es sich bei Hgf um ein sekretiertes Protein handelt, welches in der Lage ist, an Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden, spricht ein positives Signal an der Oberfläche einer Zelle bzw. Kolonie nicht unbedingt für eine eigenständige Expression von Hgf. Vielmehr hat es den Anschein, als wäre das Hgf innerhalb der epithelialen Kolonie nur an dessen Oberfläche gebunden, während Hgf innerhalb der solitär vorliegenden Zellen eindeutig innerhalb des Zytoplasmas vorliegt. Vergleicht man diesbezüglich die zweite Reihe der

Abbildung 23, so lässt sich innerhalb dieser einzeln vorliegenden Zellen eine vesikuläre Färbung des Hgf-Proteins, als auch eine vesikuläre Färbung des phosphorylierten Met-Proteins nachweisen. Allerdings scheint keine direkte Ko-Lokalisation der Färbungen vorzuliegen, sondern eher eine Färbung in direkter Nachbarschaft. Eine intrazelluläre Färbung des Hgf-Proteins könnte zwar ein Indiz für die Expression des Hgf-Proteins in diesen Zellen sein, allerdings ist die Möglichkeit der mit Met gemeinsam stattfindenden Internalisierung von Rezeptor und daran gebundenem Liganden nicht außer Acht zu lassen. Aus diesem Grund sollte im Folgenden festgestellt werden, ob sich die in diesem Versuchsteil erlangten Hinweise auf eine differenzielle Expression des Hgf-Proteins in G-2C9 Subpopulationen transkriptionell unterstützen lassen.

4.5.2 Analyse der Expression von Hgf und Hgf-assoziierten Genen

Zur Analyse der *Hgf*-Expression in den G-2C9 Zellen und dessen Zuordnung zu einer bestimmten Subpopulation wurden die Zellen nach dem in Abschnitt 3.2.12.1 beschriebenen Protokoll gefärbt und wie in Abschnitt 4.3.1 über FACS in Met^+ und Met^- sowie $Thy1^+$ und $Thy1^-$ Subpopulationen aufgetrennt. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die Expression von *Hgf* in den Subpopulationen paarweise über qRT-PCR verglichen (siehe Abbildung 24 A).

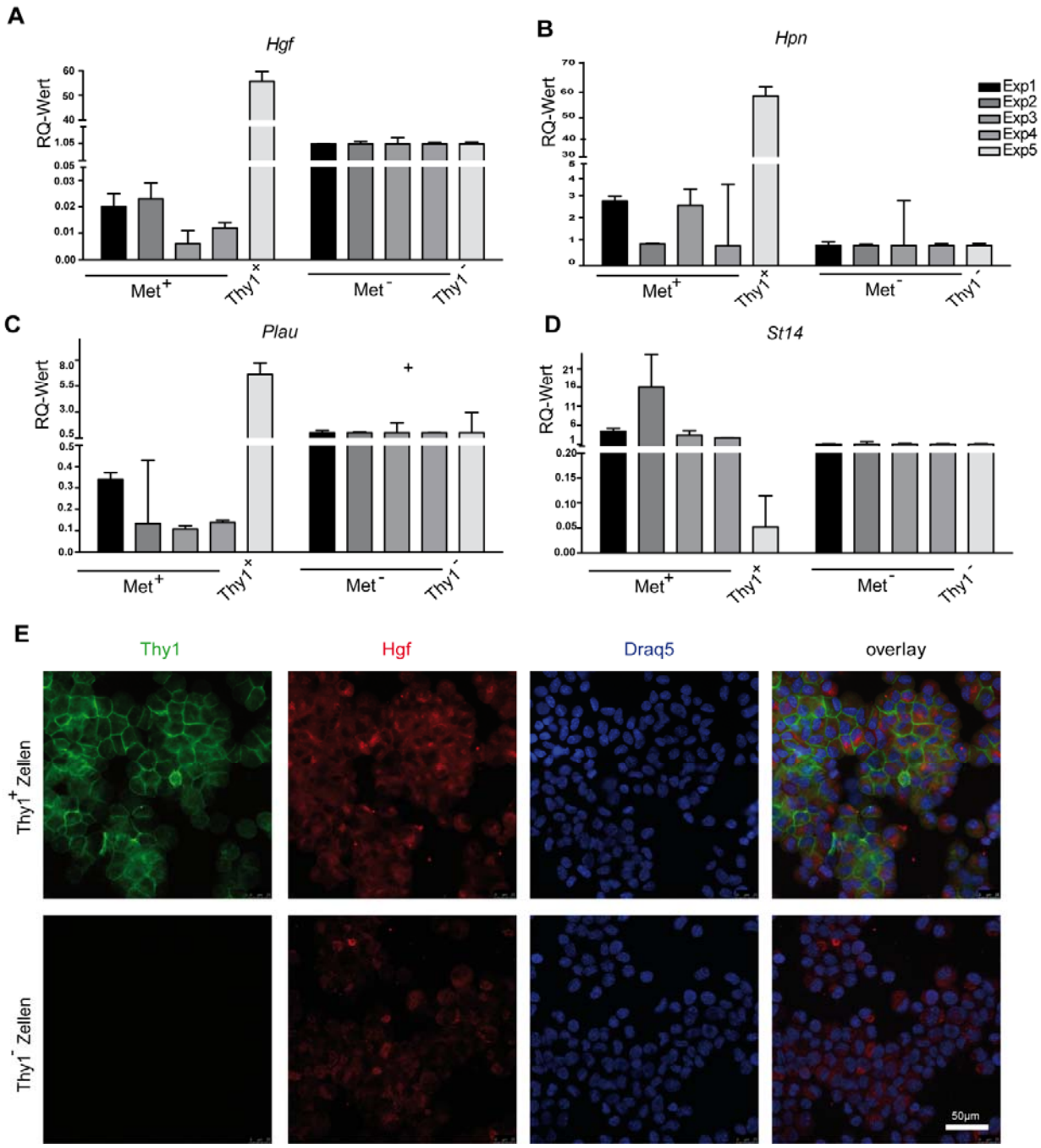


Abbildung 24: Analyse der differentiellen Hgf-Expression in Met$^+$/Met$^-$ bzw. Thy1$^+$/Thy1$^-$ Subpopulationen.

(A-D) Vergleichende Expressionsanalyse von Met$^+$/Met$^-$ bzw. Thy1$^+$/Thy1$^-$ sortierten Subpopulationen mittels qRT-PCR. Die Balkendiagramme zeigen die RQ-Werte der jeweiligen Proben. Die Normierung erfolgte auf die zugehörige Met- bzw. Thy1-negative Population. Als *housekeeping*-Gen wurde *Gapdh* eingesetzt. Die Experimente 1-4 (Exp) stellen vier unabhängige FACS-Sortierungen der Met$^+$ und Met$^-$ Populationen dar, Experiment 5 zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer FACS-Sortierung in Thy1$^+$ und Thy1$^-$ Populationen. (A) Expression von *Hgf*, (B) Expression von *Hpn*, (C) Expression von *Plau*, (D) Expression von *St14*. (E) Die mittels FACS-sortierten Thy1$^+$ und Thy1$^-$ Zellen wurden durch Zentrifugation auf Objekträger aufgebracht, mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert.

Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Hgf-Proteins über Alexa-555 und im Falle von Thy1 über Alexa-488 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Immersions-Objektiv aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen zum einen, dass sich das *Hgf*-Transkript prinzipiell in jeder der untersuchten Subpopulationen detektieren lässt, zum anderen ließ sich eine spezifische Regulation von *Hgf* nachweisen. So konnte sowohl in der Met^- als auch in der $Thy1^+$ Subpopulation eine deutlich stärkere Expression des *Hgf*-Transkriptes festgestellt werden. Der Unterschied in der *Hgf*-Expression zwischen $Thy1^+$ und $Thy1^-$ Zellen entsprach dem Faktor 50, während der Expressionsunterschied zwischen der Met^+ und Met^- Subpopulation das 50 bis über 160-fache betrug.

Der Nachweis des Hgf-Proteins als sezernierter Faktor, der an die extrazelluläre Matrix jeder Zelle gebunden werden kann, erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung nach FACS-basierter Zell-Sortierung und der direkt darauf folgenden Zentrifugation der Zellen auf Objektträger. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Enzym Trypsin wird die extrazelluläre Matrix zerstört und das Heparansulfat zusammen mit dem daran gebundenen Hgf entfernt (Kraemer and Tobey, 1972). Demzufolge ist nach Vereinzelung der Zellen nur noch zytoplasmatisch vorliegendes Hgf detektierbar. In Abbildung 24 E sind Immunfärbungen von Hgf und Thy1 in durch Zentrifugation auf Objektträgern fixierte Zellen der $Thy1^+$ und $Thy1^-$ Population zu sehen. Obwohl die Färbung generell weniger intensiv ausfällt, ist doch ein klarer Unterschied in der Hgf-Expression zwischen den beiden Subpopulationen zu erkennen. So ist übereinstimmend mit den Expressionsdaten ein stärkeres Hgf-Signal in den quasi-mesenchymalen Thy1-positiven Zellen zu verzeichnen. Da in diesen Zellen die Expression des Met-Rezeptors nahezu ausgeschlossen werden kann, muss man davon ausgehen, dass es sich bei dieser zytoplasmatischen Färbung tatsächlich um sezerniertes und nicht um internalisiertes Hgf handelt.

Die Synthese des Hgf-Proteins erfolgt in Form einer inaktiven Vorstufe, zu deren Aktivierung die Prozessierung mittels Hgf-spezifischer Enzyme wie St14 (Matriptase), Hpn (Hepsin) und Plau (Plasminogen Aktivator/Urokinase) notwendig ist. Zur Analyse dieser drei potentiellen Hgf-Aktivatoren wurden die Met^+/Met^- sowie die $Thy1^+$/$Thy1^-$ Subpopulationen mittels qRT-PCR auf deren Expression untersucht. Wie den Balkendiagrammen aus Abbildung 24 B-D zu entnehmen ist, konnte in jeder der untersuchten Subpopulationen die Transkription aller Gene festgestellt werden. Allerdings wird das für Matriptase kodierende Gen stärker in den Met^+ sowie $Thy1^-$

Zellen exprimiert (Faktor 3 bis 19), während eine umgekehrte Expression der Urokinase (Faktor 3 bis 10) zu verzeichnen ist. Die Expression des Hepsin-Gens zeigt keine eindeutigen Unterschiede. So ist die Menge des Transkripts in 3 der analysierten Proben in den eher epithelial-differenzierten Subpopulationen erhöht (>Faktor 3), während es in den verbleibenden 2 Proben nicht reguliert scheint.

Somit lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen: (i) Die Expression von Hgf lässt sich sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene dem mesenchymalen Kompartiment der G-2C9 Zellen zuordnen und (ii) die Expression des pro-Hgf prozessierenden Enzyms Matriptase lässt sich der epithelialen Subpopulation zuordnen, während (iii) die Expression von Urokinase, welche nicht für die direkte Spaltung von Hgf, sondern eher für dessen Freisetzung aus der extrazellulären Matrix verantwortlich scheint, mit der Expression von Hgf selbst auf das mesenchymale Kompartiment beschränkt ist.

4.5.3 Analyse der Met-Aktivität in getrennt kultivierten Met^+ und Met^- Zellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Met^+ als auch die Met^- Population in der Lage ist, unabhängig voneinander zu proliferieren und die fehlende Population wieder zu generieren (siehe Abschnitt 4.4.1). Allerdings stellt sich aufgrund der auf die mesenchymale Subpopulation beschränkten Hgf-Expression die Frage, ob in der Met^+ Population auch ohne die Hgf-produzierende Met^- Population eine Aktivierung des Met-Signalweges nachweisbar ist. Zur Analyse der Met-Aktivität und dessen Lokalisation in der Zelle wurden die Zellen zunächst gefärbt und mittels FACS-Sortierung in Met^+ und Met^- Zellen getrennt. Diese Zellen wurden für 3 und 5 Tage auf sterilen Deckgläschen kultiviert und mittels IF-Analyse untersucht. Da durch das FACS-Gerät nur der extrazelluläre, sich tatsächlich an der Zelloberfläche befindliche Teil des Rezeptors erkannt wird und somit eventuell internalisierte Rezeptor-Moleküle sowie *de novo* synthetisierte Rezeptoren außer Acht gelassen werden, wurden die Zellen bei der IF-Analyse zusätzlich durch den Einsatz intrazellulärer Epitope erkennender Met-Antikörper auf die Lokalisation des Rezeptors und dessen Phosphorylierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Antikörper eingesetzt, einer zur Detektion der extrazellulären Domäne des Met-Rezeptors, ein anderer zur Detektion der intrazellulären Domäne und ein weiterer, der die Phosphorylierung der MSD am Tyrosin 1347 erkennt.

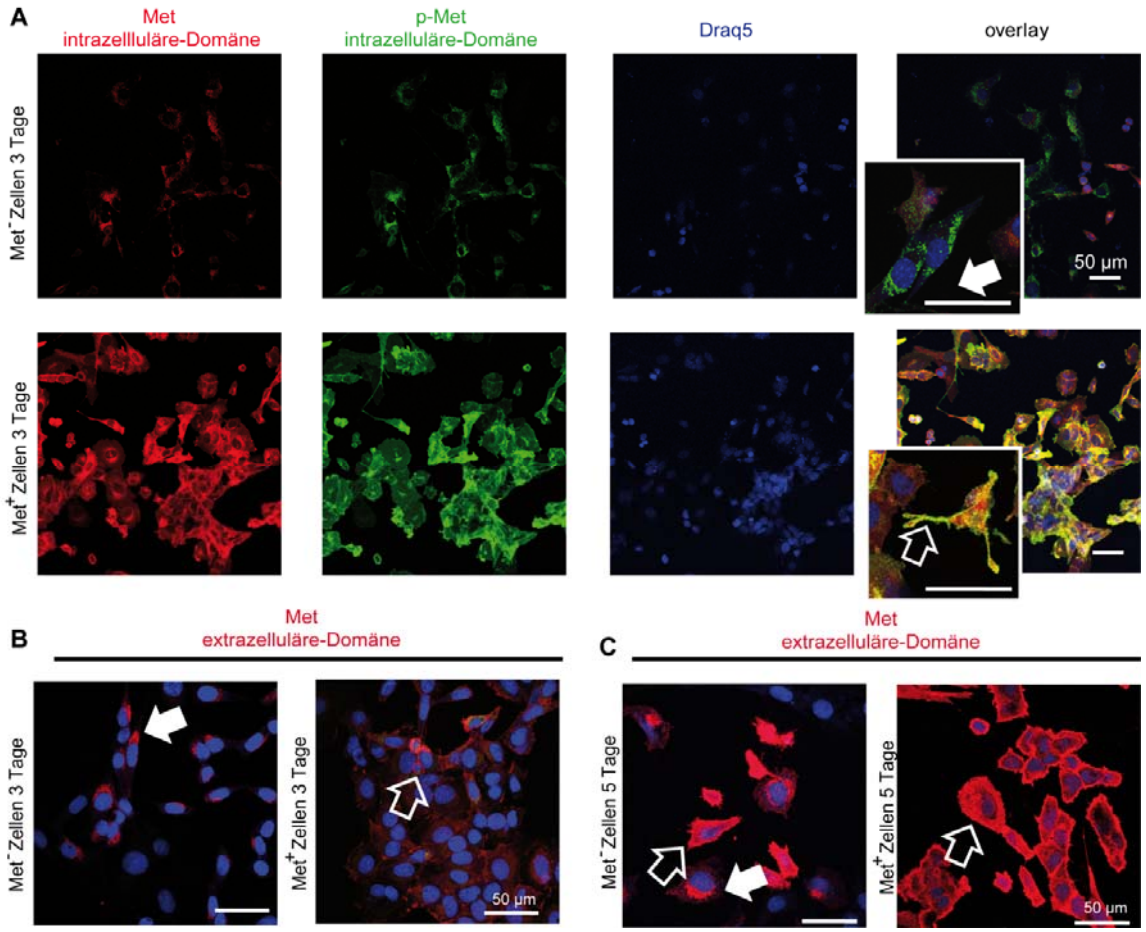


Abbildung 25: Analyse der Met-Expression, Lokalisation und Aktivität in den Met$^+$ und Met$^-$ Subpopulationen nach 3 und 5 Tagen separater Kultivierung.

Die Expression und Aktivität von Met wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Markierung von drei und fünf Tage kultivierten Met$^+$ und Met$^-$ sortierten Zellen untersucht. Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert und nach PFA-Fixierung mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-erkennenden Antikörpers über Alexa-555 und im Falle des p-Met-erkennenden Antikörpers über Alexa-488 gekoppelte Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen der jeweiligen Paare wurden unter denselben Einstellungen am Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss AG) mittels 20x-Objektiv (A) bzw. 40x-Immersions-Objektiv (B, C) aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. (A) IF-Färbung mit ausschließlich intrazelluläre Epitope erkennende Antikörpern. Vergleichende Übersicht über die Met-Expression und Phosphorylierung zwischen Met$^+$ und Met$^-$ sortierten Zellen nach 3 Tagen separater Kultur. In den eingefügten Vergrößerungen zeigt sich eine vesikuläre Verteilung von p-Met mit einem gefüllten, die membranöse Verteilung mit einem leeren Pfeil. (B-C) IF-Färbung mit ausschließlich extrazelluläre Epitope erkennenden Antikörpern. Vergleichende Übersicht über die Met-Expression zwischen Met$^+$ und Met$^-$ sortierten Zellen nach 3 bzw. 5 Tagen separater Kultur. Die vesikuläre Verteilung von Met ist mit einem gefüllten, die membranöse Verteilung mit einem leeren Pfeil gekennzeichnet. Verwendete Met-Antikörper intrazelluläre Domäne: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R; extrazelluläre Domäne: Met # GTX10681.

In Abbildung 25 A ist eine Übersicht über die Met^+ und Met^- sortierten Zellen nach drei Tagen in Kultur zu sehen. Vergleicht man diese Übersichten, dann fällt zum einen eine geringere Zelldichte der Met^- Zellen trotz des Einsatzes gleicher Zellzahlen auf, zum anderen ist ein deutlicher Unterschied bei der Expression von Met und dessen Aktivierung zu verzeichnen. Die ehemals Met^+ Zellen zeigen in Übereinstimmung mit der FACS-Analyse nach 4 Tagen (siehe Abbildung 22) eine starke Expression von Met auf nahezu jeder Zelle. Zusätzlich war ebenso eine eindeutige Phosphorylierung des Rezeptors und eine damit einhergehende Aktivität des Met-Signalweges zu erkennen. Die ursprünglich Met^- sortierten Zellen zeigten nur zu einem geringen Anteil eine Expression des Met-Proteins, hier hingegen lässt sich in den Met-positiven Zellen keine Phosphorylierung der MSD und damit einhergehend keine Aktivität des Met-Signalweges erkennen. Das Fluoreszenzsignal des p-Met Antikörpers im Zytoplasma einiger Zellen korrespondiert mit einer nur sehr schwachen Expression des Rezeptors. In der in Abbildung 25 A dargestellten stärkeren Vergrößerung der Zellen lässt sich in der Met^- Population eine ausschließlich vesikuläre Färbung von p-Met in einigen der Zellen detektieren, während in der Met^+ Population neben dieser vesikulären Färbung für Met und p-Met eine hauptsächlich membranöse Lokalisation des Rezeptors zu erkennen ist. Da die verwendeten Antikörper ausschließlich intrazelluläre Epitope des Met-Rezeptors erkennen, könnte es sich bei der Färbung um aus Abbauprozessen stammende Teilstücke des degradierten Rezeptors oder um einen potentiell funktionalen, neu synthetisierten oder im Recyclingprozess befindlichen Rezeptor handeln. Vergleicht man nun die Expression des Met-Proteins mit einem extrazellulär bindenden Antikörper zwischen den ursprünglich Met^+ und Met^- sortierten Zellen, zeigt die Färbung des Met-Proteins in den ursprünglich Met^- sortierten Zellen nach drei Tagen Kultivierung neben einigen Zellen mit membranständiger Rezeptor-Expression weiterhin auch eine vesikuläre und damit intrazelluläre Verteilung des Rezeptors (siehe Abbildung 25 B). Da es sich bei dem hier verwendeten Antikörper um einen Antikörper handelt, der ein Epitop der extrazellulären Domäne des Met-Rezeptors erkennt, ist davon auszugehen, dass es sich um den gesamten Rezeptor und nicht um ein bereits prozessiertes Teilstück handelt. 5 Tage nach der Sortierung ist neben der vesikulären Verteilung des Rezeptors bereits eine starke Expression von Met an der Membranoberfläche einiger Zellen zu erkennen, während andere weiterhin komplett negativ für das Met-Protein sind (siehe Abbildung 25 C). Die Zellen der Met^+ Subpopulation zeigten auch nach fünf Tagen weiterhin eine intensive membranöse Färbung des Rezeptors.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Met^+ Zellen eine Aktivierung des Met-Rezeptors zeigen, die unabhängig von den Met^- Zellen und deren Hgf-Produktion ist. Weiterhin scheint eine

Internalisierung des Met-Rezeptors in den G-2C9 Zellen zu erfolgen. Ob dies auf dem Weg zur Degradierung des Rezeptors und damit einhergehender Unterbrechung des Signalwegs oder als Fortführung des Met-Signals verstanden werden kann, bleibt dahingehend offen.

4.6 Unterbrechung des Met-Signalweges und dessen biologische Effekte

Die Aktivierung des Met-Signalweges führt über ein weit verzweigtes Netzwerk an Signalen und *Downstream*-Modulatoren zu zahlreichen Effekten. Durch die Aktivierung der Zell-Proliferation und Migration sowie einer erhöhten Überlebensfähigkeit von Zellen außerhalb ihres Gewebeverbandes und unabhängig von Kontakten zur extrazellulären Matrix kann der Met-Signalweg Einfluss auf fundamentale, zelluläre Eigenschaften nehmen. Diese und weitere Fähigkeiten führen zu einer verstärkten Invasivität der Zellen, die im Kontext der Tumorprogression eine entscheidende Rolle im Metastasierungsprozess spielen (Hugo et al., 2007; May et al., 2011).

Um die Rolle des Met-Signalweges in den G-2C9 Zellen untersuchen zu können, wurden verschiedene experimentelle Strategien eingesetzt, um den Met-Signalweg zu manipulieren. Zum einen bietet sich, wie bereits in Abschnitt 4.3 beschrieben, durch die heterogene Expression des Met-Rezeptors die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer natürlich vorliegenden Expressions-Muster zu sortieren und deren Eigenschaften separat zu beobachten. Zum anderen wurde die Expression und Aktivität von Met über das stabile Einbringen von gegen *Met* mRNA gerichteter shRNA oder Behandlung mit einem spezifischen Met-TKD-Inhibitor gezielt verändert.

4.6.1 Etablierung einer stabilen G-2C9 Zellkultur mit shRNA vermitteltem Met-*knockdown*

Zum shRNA-vermittelten *knockdown* des Met-Rezeptors wurden Zellen der G-2C9 Kultur mit einem lentiviralen Vektor transduziert und anschließend auf die Expression der shRNA selektioniert. Bei dem Vektorkonstrukt handelt es sich um ein pGIPZ-Rückgrat welches in einem RNAmir-Konstrukt die shRNA gegen *Met* mRNA bzw. eine *non-silencing* shRNA (shscr) trägt. Zusätzlich enthält der Vektor das TurboGFP-Gen (*green fluorescence protein*) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (*Cytomegalievirus*) sowie ein Puromycin-Restistenzgen, dessen Expression durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosome entry site*) vermittelt wird. Anschließend folgt direkt die shRNA-Sequenz. Die Transduktionseffizienz ließ

sich so über die Expression des TurboGFP-Proteins feststellen bzw. die erfolgreich transduzierten Zellen über die Selektion mit Puromycin anreichern. Die Met-Expression der transduzierten Zellen wurde zunächst über indirekte Immunfluoreszenzmarkierung visualisiert und analysiert. Die Ergebnisse der IF-Markierung sind Abbildung 26 A zu entnehmen. Die linke Spalte zeigt die mit shRNA gegen *Met* transduzierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen in der rechten Spalte. Es ist eindeutig zu erkennen, dass sowohl in den Met-*knockdown* als auch in den Kontrollzellen nahezu jede Zelle TurboGFP in einem gewissen Umfang exprimiert. Vergleicht man dazu die Färbung des Met-Proteins, so lässt sich feststellen, dass, wie zu erwarten, die Met-Expression in den Kontrollzellen von der TurboGFP-Expression unabhängig ist und durch die Existenz von stark $TurboGFP^{+}/Met^{+}$ Zellen erkennbar ist. In den *knockdown*-Zellen allerdings zeigte die Färbung des Met-Proteins im Vergleich zur TurboGFP-Expression, dass es nur bei starker Expression von TurboGFP, also starker Expression des shRNA tragenden Vektorkonstruktes auch gleichzeitig zu einer eindeutigen Reduktion des Met-Proteins kommt. Aufgrund dessen wurden die *knockdown*- und Kontrollzellen über die Kultivierung in Puromycin-haltigem Medium über mindestens 6 Passagen (ca. 14 Tage) selektioniert, bis über 90% der Zellen eine starke TurboGFP-Expression aufwiesen (siehe Abbildung 26 B). Diese Zellen wurden dann, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, geerntet und über qWB auf die Reduktion des Met-Proteins bzw. die Menge an phosphoryliertem Met-Protein überprüft. Eine Reduktion des Met-Proteins und demzufolge des phosphorylierten Met-Proteins ist deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 26 C und D). Die quantitative Auswertung zeigte eine Reduktion des Met-Proteins zwischen 80% und 90%. Die Reduktion des p-Met-Signals beläuft sich ebenfalls auf ca. 70% bis 87%. Zur weiteren Expressionsanalyse wurden die Zellen gemäß Abschnitt 3.6.1 geerntet und nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese über qRT-PCR verglichen. Zur Expressionsanalyse wurden jeweils 3 Proben aus je 3 unabhängigen lentiviralen Transduktionen eingesetzt. Es konnte ebenfalls eine Reduktion der Met-Expression auf RNA-Ebene festgestellt werden. Allerdings führte die Expression der shRNA zu einer maximal 5-fachen Reduktion des *Met*-Transkripts (siehe Abbildung 34 B), während das Met-Protein auf bis zu 10% der herkömmlichen Proteinmenge reduziert war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Verlauf der weiteren Versuche die Met-*knockdown*- und shscr Kontrollzellen unter dem Selektionsdruck von 5 µg/ml Puromycin gehalten bzw. alle Experimente in Gegenwart des Selektionsantibiotikums durchgeführt.

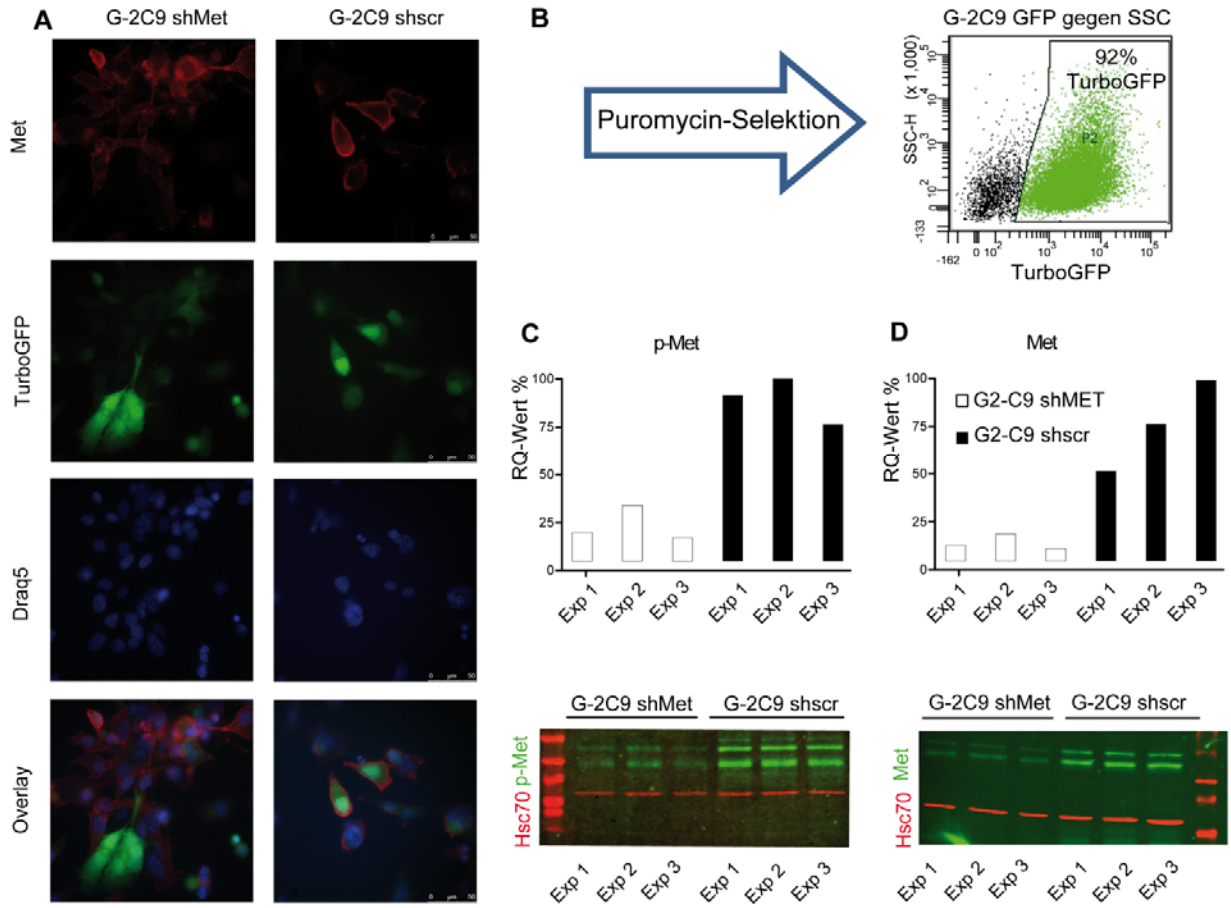


Abbildung 26: Met Reduktion nach lentiviraler Transduktion von shRNA gegen *Met* mRNA.

(A) IF-Analyse der G-2C9 Zellen nach lentiviraler Transduktion von shRNA gegen *Met* mRNA (shMet, linke Spalte) bzw. einer *non-silencing* shRNA (shscr, rechte Spalte). Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert, mit 4% PFA fixiert und nicht permeabilisiert. Ein grünes Fluoreszenzsignal spricht für die Expression des Vektorkonstruktes mit dem TurboGFP-Marker. Die Detektion des spezifischen Met-Antikörpers erfolgte über einen Alexa-555 gekoppelten Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Objektiv aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert.
(B) Durchflusszytometrische TurboGFP-Expression nach Puromycin-Selektion. Je 3 Proteinproben der selektionierten Zellen wurden auf die Phosphorylierung von Met (C) und die Met-Expression (D) im qWB analysiert. Die Detektion und Auswertung der Blots erfolgte mit dem *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma LI-COR Bioscience über Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper. Als *housekeeping*-Protein wurde Hsc70 eingesetzt. Die Detektion von Hsc70 erfolgte über IRDye 700 (rot), die von Met und p-Met erfolgten über IRDye 800 (grün). Die Normierung der Proben erfolgte auf den Wert mit dem stärksten p-Met-Signal, welches gleich 100% gesetzt wurde. Die Reduktion des Met-Rezeptors betrug 80%-90%. Verwendete Met-Antikörper: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R.

4.6.2 Analyse der Met-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Met-TKD-Inhibitor PHA-665752

Neben der stabilen Reduktion der Met-Expression führte die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Met-TKD-Inhibitor PHA-665752 ebenfalls zu einer reduzierten Aktivität des Met-Signalweges. Bei diesem Inhibitor handelt es sich um einen sogenannten *small-molecule*-Met-TKD-Inhibitor der Firma Pfizer. Dieser ist in der Lage, die ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne direkt zu blockieren und damit um die ATP-Bindung zu kompetitieren und so die Autophosphorylierung der Kinase-Domäne zu unterbinden (Christensen et al., 2003; Puri et al., 2007). Des Weiteren ist dieser Inhibitor in der Lage, sowohl die Hgf-induzierte als auch die Hgf-unabhängige, konstitutive Met-Aktivierung zu verhindern (Smolen et al., 2006). Die minimal notwendige Konzentration von PHA-665752 wurde in Verdünnungsstufen von 10 nM, 100 nM und 1 µM und anschließender Western-Blot-Analyse bestimmt.

Eine nahezu vollständige Reduktion des p-Met-Signals im Western-Blot war erst bei einer Konzentration von 1 µM PHA-665752 zu detektieren. Die Applikation von 10 nM des Inhibitors hatte keinerlei Effekt, wobei die Zugabe von 100 nM bereits eine leichte Reduktion der Met-Phosphorylierung nach 24-stündiger Inkubation zeigte (siehe Abbildung 27 A). Unterstützende Daten lieferte die IF-Färbung der in Gegenwart von 1 µM PHA-665752 kultivierten Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen. Die in Abbildung 27 B dargestellten IF-Färbungen zeigen eine eindeutige Reduktion der Met-Phosphorylierung nach Behandlung mit PHA-665752. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Versuche eine Inhibitor-Konzentration von 1 µM bzw. der entsprechenden Menge an DMSO verwendet.

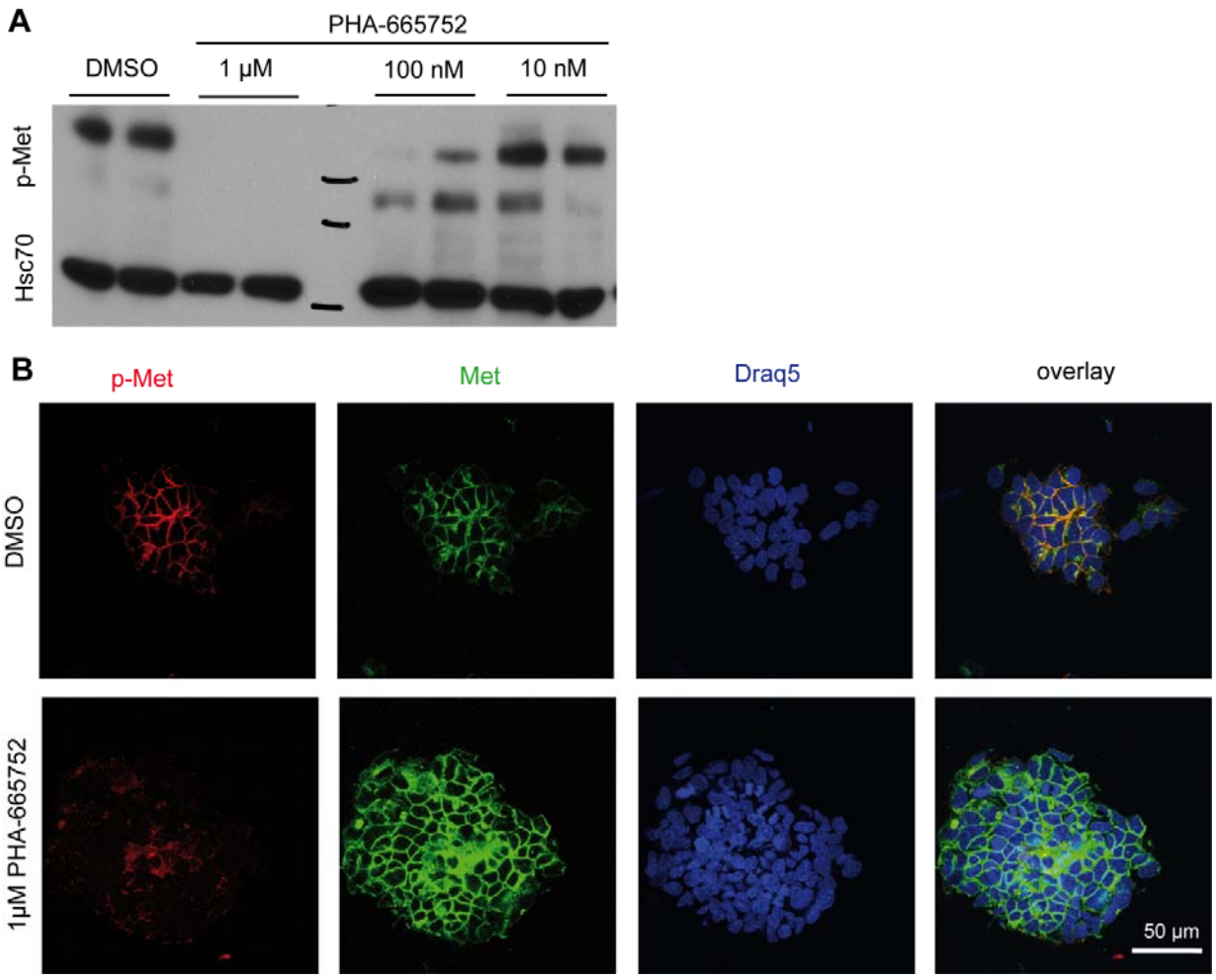


Abbildung 27: Inhibition der Met Aktivität nach der Zugabe von PHA-665752.

(A) Western-Blot-Analyse der PHA-665752-behandelten G-2C9 Zellen. Die Zellen wurden mit 10 nM, 100 nM oder 1 µM PHA-665752 für 24 Stunden kultiviert und im Anschluss daran mittels Western-Blot auf die Menge an phosphoryliertem Met-Rezeptor untersucht. Als Ladungskontrolle wurde Hsc70 eingesetzt. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper. Im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) ist nach der Behandlung mit 1 µM PHA-665752 kein p-Met mehr zu detektieren. (B) Die G-2C9 Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert und dann für 24 Stunden unter der Zugabe von 1 µM PHA-665752 inkubiert. Diese wurden mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen Antikörper erfolgte im Falle des Met-Antikörpers über einen Alexa-488, im Falle des p-Met Antikörpers über einen Alexa-555 gekoppelten Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss AG) mittels 40x-Immersions-Objektiv erstellt. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. Verwendete Met-Antikörper intrazelluläre Domäne: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R.

Sowohl für die Met-*knockdown*- als auch für die Inhibitor-behandelten Zellen konnte eine eindeutige Reduktion der Met-Aktivität festgestellt werden. Somit lässt sich PHA-665752 zur

Analyse verschiedener Met-spezifischer Eigenschaften verwenden. Die PHA-665752-behandelten Zellen wurden mit ihren jeweiligen Kontrollzellen hinsichtlich ihrer Proliferationsgeschwindigkeit, Motilität und ihrer Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum verglichen.

4.6.3 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Proliferation der G-2C9 Zellen

Zur vergleichenden Analyse der Proliferationsgeschwindigkeiten von G-2C9 Zellen mit reduzierter Met-Aktivität wurden jeweils $1x10^5$ Zellen/*well* einer 6 Loch-Platte ausgesät und nach 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden mittels Trypsin vereinzelt und die Zellzahlen bestimmt.
Den in Abbildung 28 A-C dargestellten Proliferationskurven kann man entnehmen, dass die Zellen mit reduzierter Met-Aktivität auch eine Reduktion in ihrem Proliferationsverhalten zeigen. Vergleicht man die Proliferationsgeschwindigkeiten der FACS-separierten Met^+ und Met^- Zellen so fällt auf, dass die Met^- Zellen sogar Schwierigkeiten haben sich nach der Zell-Sortierung zu regenerieren und mit der Zellteilung zu beginnen. So war nur ungefähr die Hälfte der ausgesäten Met^- Zellen vital bzw. in der Lage, erfolgreich anzuwachsen, was an der Halbierung der Zellzahl nach 24 Stunden Kultivierung erkennbar ist. Die Met^+ Zellen hingegen waren in der Lage, direkt anzuwachsen. Doch auch hier begann die Proliferation erst 48 Stunden nach Inkulturnahme der Zellen. Im Vergleich dazu wuchsen die Met-k*nockdown*-Zellen und deren Kontrollzellen beide aufgrund des toxischen Effekts des Selektionsantibiotikums Puromycin relativ langsam. Auch hier war eine stärkere Proliferation der Kontrollzellen zu beobachten. Die mit PHA-665752- bzw. DMSO-behandelten Zellen wiesen ebenfalls einen deutlichen Unterschied in ihrem Proliferationsverhalten auf. So wuchsen die Inhibitor-behandelten Zellen generell langsamer als die Kontrollzellen. Dieses verminderte Wachstum zeigte sich nach einigen Tagen der Kultivierung noch eindeutiger. So wiesen die Kontrollzellen mit einem intakten Met-Signalweg auch nach 96 Stunden, d.h. zu dem Zeitpunkt, an dem die Zellen bereits eine fast vollständige Konfluenz erreicht haben, noch ein konstantes Wachstum auf, während die Inhibitor-behandelten Zellen nur sehr langsam proliferierten.

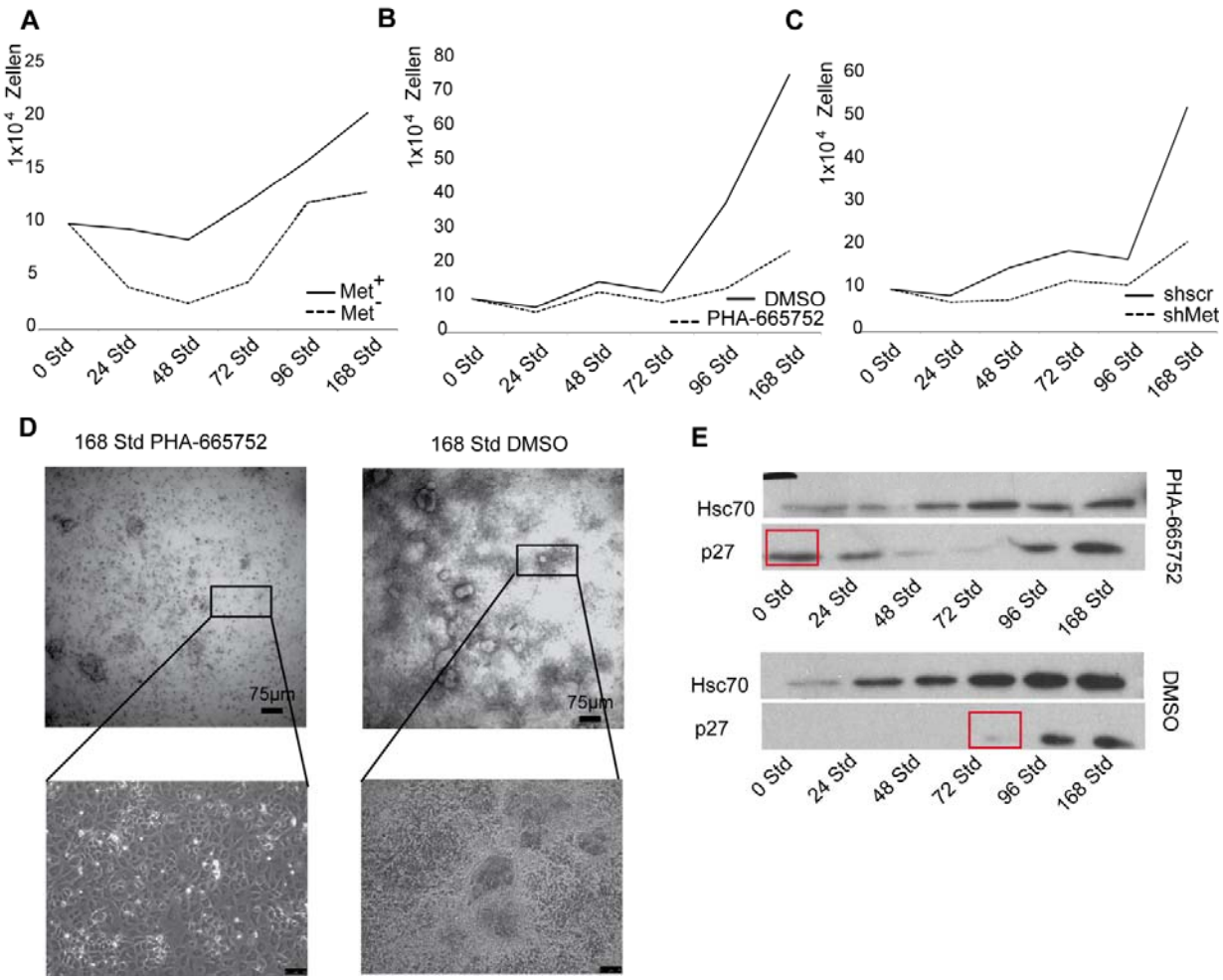


Abbildung 28: Einfluss der Met-Expression, Met-Inhibition und Reduktion auf das Proliferationsverhalten von G-2C9 Zellen.

(A-C) Vergleichende Analyse des Proliferationsverhaltens. (A) FACS sortierte Met^+ und Met^- Zellen, (B) PHA-665752- und DMSO-behandelte Kontrollzellen und (C) shMet und shscr Zellen. Es wurden je $1x10^5$ Zellen/*well* zu Beginn der Analyse ausgesät (0 Std). Über 4 Tage wurden alle 24 Stunden die Zellen gezählt, der letzte Wert wurde 168 Stunden nach Versuchsbeginn ermittelt. Die Diagramme stellen die Zunahme der Zellzahlen über die Zeit dar. (D) Vergleichende morphologische Betrachtung von PHA-665752-behandelten Zellen auf der linken Seite und DMSO-behandelten Kontrollzellen auf der rechten Seite, je 168 Stunden nach Versuchsbeginn. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop erstellt, der Größenstandard beträgt 75 µM. (E) Vergleichende Western-Blot-Analyse der p27-Expression von PHA-665752-behandelten Zellen (oben) und DMSO-behandelten Kontrollzellen (unten). Die Detektion der spezifischen Primärantikörper erfolgte mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Als Ladungskontrolle wurde Hsc70 eingesetzt.

Die morphologische Analyse der Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit PHA-665752 oder DMSO-haltigem Medium lieferte genauere Hinweise auf das Wachstumsverhalten der beiden Zelltypen (siehe Abbildung 28 D). So waren die Kontrollzellen in der Lage, auch nach Erreichen

einer vollständigen Konfluenz weiter zu proliferieren und ohne hemmende Kontaktinhibitionen sich gegenseitig zu überwachsen und dreidimensionale Kolonien zu bilden. Dagegen waren Zellen mit reduzierter Met-Aktivität zwar noch in der Lage einen geschlossenen Zellrasen zu bilden, doch scheinen sie nicht mehr die Fähigkeit zu besitzen, sich nach Kontakt mit den umliegenden Nachbarzellen weiter zu teilen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde in einer weiteren Zeitreihe in PHA-665752- bzw. DMSO-behandelten Kontrollzellen die p27-Expression überprüft. P27 ist ein für die Regulation des Zellzyklus entscheidendes Tumorsuppressor-Protein (Chu et al., 2008). Wird es vermehrt gebildet, verhindert es den Übergang von der G_0 zur G_1-Phase. Ein Anstieg der p27-Expression kann z.B. durch Tgf-β oder aber durch Kontaktinhibition aufgrund von Interaktionen mit umgebenden Zellen verursacht werden. Zusätzlich ist p27 ein prognostischer Marker für bestimmte humane Tumore, da eine geringe Menge des p27-Proteins in verschiedenen Tumoren, unter anderem der Brust, mit einer gesteigerten Aggressivität sowie einer schlechten Prognose einhergeht (Chu et al., 2008). Die Zeitreihe wurde wie oben beschrieben durchgeführt und zu jedem Zeitpunkt eine Proteinprobe gesammelt (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Proteinproben wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression des p27-Proteins überprüft. Wie in Abbildung 28 E dargestellt, ist bereits nach 24 Stunden Inkubation mit PHA-665752 eine deutliche Expression von p27 zu erkennen. Die Expression von p27 nimmt bis 72 Stunden nach Zugabe des Inhibitors vermutlich gemeinsam mit dessen Wirksamkeit ab. Danach ist nach 168 Stunden mit zunehmender Zelldichte wieder eine verstärkte p27-Expression zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu lässt sich p27 in den Kontrollzellen mit intaktem Met-Signalweg generell erst ab 168 Stunden in Kultur nachweisen, wenn die Zellen schon sehr dicht gewachsen sind. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass (i) Met-negative Zellen ein reduziertes Proliferationspotential haben und (ii) G-2C9 Zellen mit einem intakten Met-Signalweg eine Reduktion der physiologischen Kontaktinhibition und der Menge an p27-Protein zeigen, welche durch die gezielte Inhibition der Met-Aktivierung wiedererlangt werden kann.

4.6.4 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die *in vitro* Tumorigenität der G-2C9 Zellen

Verankerungsunabhängiges Wachstum in hoch viskösem Medium, wie etwa Methylzellulose, ist ein Indiz für die Fähigkeit von Tumorzellen unabhängig von einem umgebenden Zellverband bzw. der Anheftung an einen gegebenen Untergrund weiter zu wachsen und Kolonien zu bilden

(Taddei et al., 2011). Diese *in vitro* beobachtbare Eigenschaft spiegelt die *in vivo* Situation disseminierter Tumorzellen und deren Fähigkeit zur Ausbildung von Metastasen und Sekundärtumoren wider. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich Zellen eingebunden in ihren jeweiligen Gewebeverband mit intakten Zell-Zell-Interaktionen und Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix. Ein Verlust des Gewebeverbandes und damit dieser signalgebenden Interaktionspartner führt demzufolge zu einer besonderen Form der Apoptose, der Anoikis (Taddei et al., 2011). Tumorzellen können aufgrund verschiedenster Signalwege, unter anderem der Aktivierung des Met-Signalweges, dieser Art des Zelltods entgehen.

Zur Untersuchung des verankerungsabhängigen Wachstums der PHA-665752-behandelten, Met-depletierten und Met-sortierten Zellen wurden $1x10^4$ vereinzelte Zellen bis zur Bildung von Kolonien in Methylzellulose kultiviert.

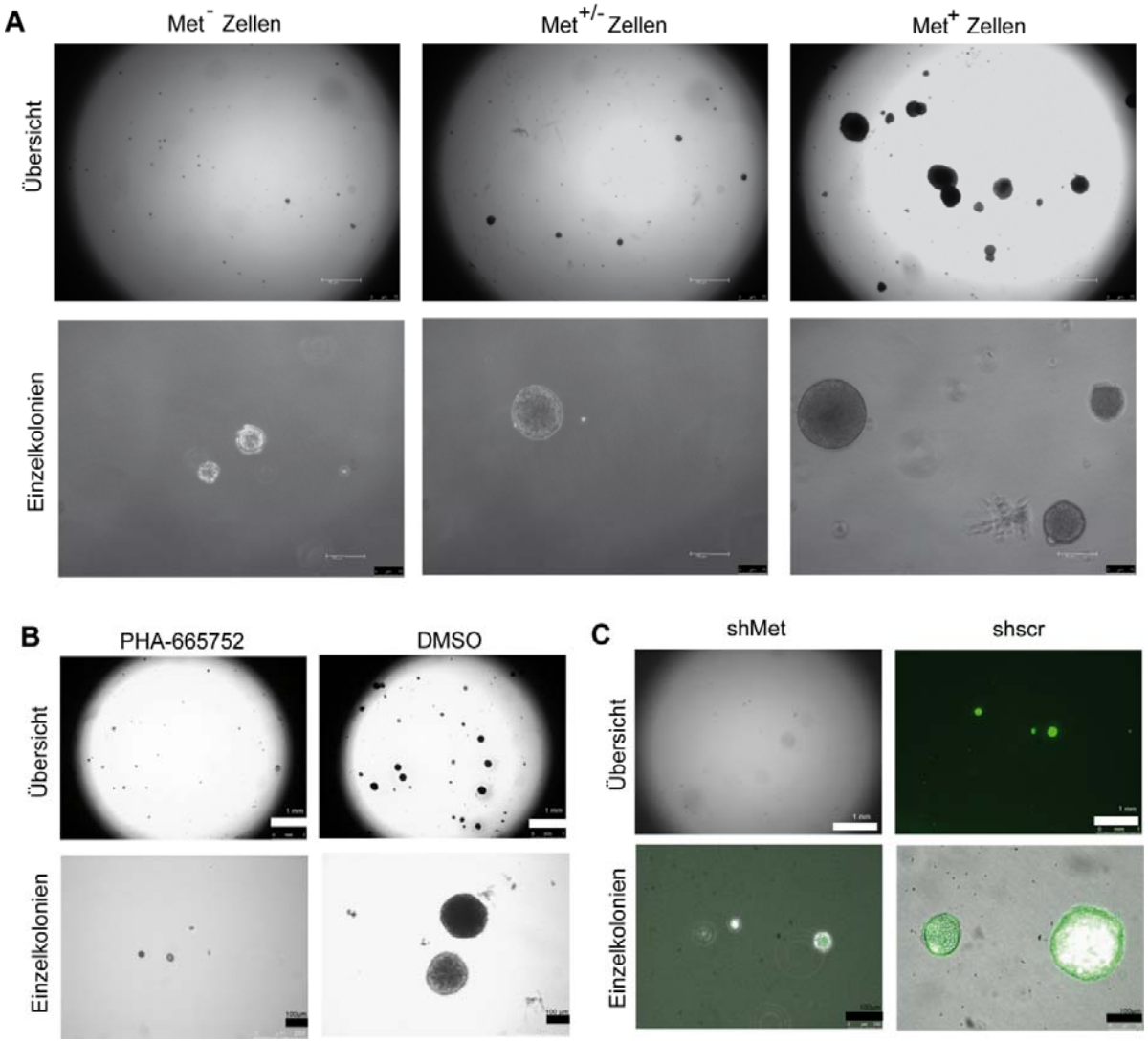


Abbildung 29: Einfluss der Met-Expression, Met-Inhibition und Met-Reduktion auf das verankerungsunabhängige Wachstum von G-2C9 Zellen.

(A-C) Vergleichende Analyse der Fähigkeit zur Koloniebildung in Methylzellulose von sortierten Met^+, Met^- und $Met^{+/-}$ Zellen, PHA-665752- und DMSO-behandelten Kontrollzellen sowie shMet und shscr Zellen. Es wurden je $1x10^4$ Zellen/*well* in Methylzellulose ausgesät und bis zur Bildung von Kolonien kultiviert. (A) Linke Seite: Met^- sortierte Zellen, Mitte: sortierte $Met^{+/-}$ Kontrollzellen, rechte Seite: Met^+ sortierte Zellen. Die $Met^{+/-}$ Kontrollzellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Met^+ und Met^- Zellen gefärbt und im FACS-sortiert. Die sortierte Population repräsentiert die Gesamtpopulation aller lebenden G-2C9 Zellen, welche sowohl Met^+ als auch Met^- Zellen beinhaltet. Die obere Reihe zeigt eine Übersichtsaufnahme des *wells*, die untere Reihe zeigt einzelne Kolonien (Größenstandard: 100 µm). (B) Linke Seite: PHA-665752-behandelte Zellen, rechte Seite: DMSO-behandelte Kontrollzellen. Die obere Reihe zeigt eine Übersichtsaufnahme des *wells* (Größenstandard: 1 mm), die untere Reihe zeigt einzelne Kolonien (Größenstandard: 100 µm). (C) Linke Seite: shMet Zellen, rechte Seite: shscr Zellen. Die obere Reihe zeigt eine Übersichtsaufnahme des *wells* (Größenstandard: 1 mm), die untere Reihe zeigt einzelne Kolonien (Größenstandard: 100 µm)

Im Vergleich der Koloniebildungsfähigkeiten der Met^- Zellen, der PHA-665752-behandelten Zellen und der Met-*knockdown*-Zellen zeigten alle ein ähnliches Bild: eine reduzierte Koloniebildungsfähigkeit von Zellen ohne einen aktiven Met-Signalweg. So zeigten Met^+ im Vergleich zu Met^- Zellen, aber auch im Vergleich zu einer unter den gleichen Bedingungen gefärbten und FACS-sortierten, die Gesamtpopulation der lebenden Zellen enthaltenden Kontrollkultur, eine deutlich stärkere Tendenz zur Koloniebildung (siehe Abbildung 29 A). Die Kontrollzellen repräsentieren die Gesamtpopulation aller lebenden G-2C9 Zellen und umfassen sowohl Met^+ als auch Met^- Zellen. Die Kolonien der Met^+ Zellen waren sowohl zahlreicher als auch größer im Durchmesser. Noch deutlicher wurde dieser Effekt durch die Behandlung der Zellen mit PHA-665752. Wie in Abbildung 29 B zu sehen, ist die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum nach Inhibitor-Behandlung nahezu vollständig verloren gegangen. Obwohl die lentiviral-transduzierten Zellen eine gegenüber unbehandelten Zellen generell reduzierte Fähigkeit zur Koloniebildung zeigten, war auch hier die Koloniebildungs-Fähigkeit in den *knockdown*-Zellen gegenüber den Kontrollzellen eindeutig minimiert (siehe Abbildung 29 C).

4.6.5 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Migrationsfähigkeit von G-2C9 Zellen

Die Migrationsfähigkeit von Zellen ist das Resultat eines komplexen Netzes an interner Signalverarbeitung und signalgebenden Einflüssen durch Kontakte mit Nachbarzellen bzw. Interaktionen mit der extrazellulären Matrix. Je nach Beschaffenheit der migrierenden Zelle und den von außen an die Zelle herangetragenen Signalen können diese deren Art der Bewegung

beeinflussen. Man unterscheidet im Allgemeinen zwei Arten der Zellwanderung. Zum einen die Bewegung als Kollektiv in einem gemeinsamen Zellverband (*collective cell movement*) mit z.T. spezialisierten Zellen an der Spitze der Gruppe, zum anderen die Wanderung von Einzelzellen, die in der Lage sind, sich aus dem Zellverband zu lösen und ohne Kontakte zu den umgebenden Nachbarzellen eigenständig zu wandern (*single cell movement*) (Ilina and Friedl, 2009; Poujade et al., 2007; Rorth, 2009). Zur Aufrechterhaltung jeder Art der Motilität sowohl während der Entwicklung als auch der Tumorprogression ist ein andauerndes, von Chemokinen und Wachstumsfaktoren ausgehendes Signal von Nöten. So ist zum Beispiel eine andauernde Aktivierung des Met-Rezeptors durch seinen Liganden Hgf bei der Migration von Muskelvorläuferzellen während der Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung. Ebenso wird die Migration von Keratinocyten bei der Wundheilung in der Epidermis durch ein anhaltendes Hgf-Signal vermittelt (siehe Abschnitt 1.4.7). Die Fähigkeit von Tumorzellen, invasiv in das umgebende Gewebe einzuwandern bis hin zu der Fähigkeit sich vollständig vom Primärtumor zu lösen und so über den Blutstrom in andere Organe des Organismus zu gelangen, spiegelt in gewissem Maße die Wanderung von Zellen bei der Embryonalentwicklung und Wundheilung wider. Die Aktivierung des Met-Signalweges durch die Bindung von Hgf führt gerade in Epithelzellen zu einem sogenannten *scattered phenotype*, also zur Auflockerung epithelialer Kolonien durch sich mesenchymal verändernde, einzeln auswandernde Zellen und damit zum Zerfall der Kolonien durch eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Epithelzellen.

Mit Hilfe der µ-*dish* Zellkulturschalen der Fima Ibidi konnte sowohl die Art als auch die relative Geschwindigkeit der G-2C9 Zellen in Abhängigkeit des Met-Signalweges untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode liegt im Gegensatz zu klassischen *scratch*- bzw. *wound healing*-Assays, bei denen einem bestehenden Zellrasen mechanisch eine „Wunde“ zugefügt wird darin, keine Stresssignale durch plötzlich freiwerdende zytoplasmatische Inhaltsstoffe bzw. abrupten Abriss von Zell-Zell-Kontakten in den verbleibenden Zellen zu verursachen. Der Motilitäts-Impuls wird allein durch den freiwerdenden Raum nach Entfernung des Zellkultur-Einsatzes und darauf folgenden, den G-2C9 Zellen innewohnenden Signalverarbeitungsprozessen verursacht (siehe Abbildung 30 A).

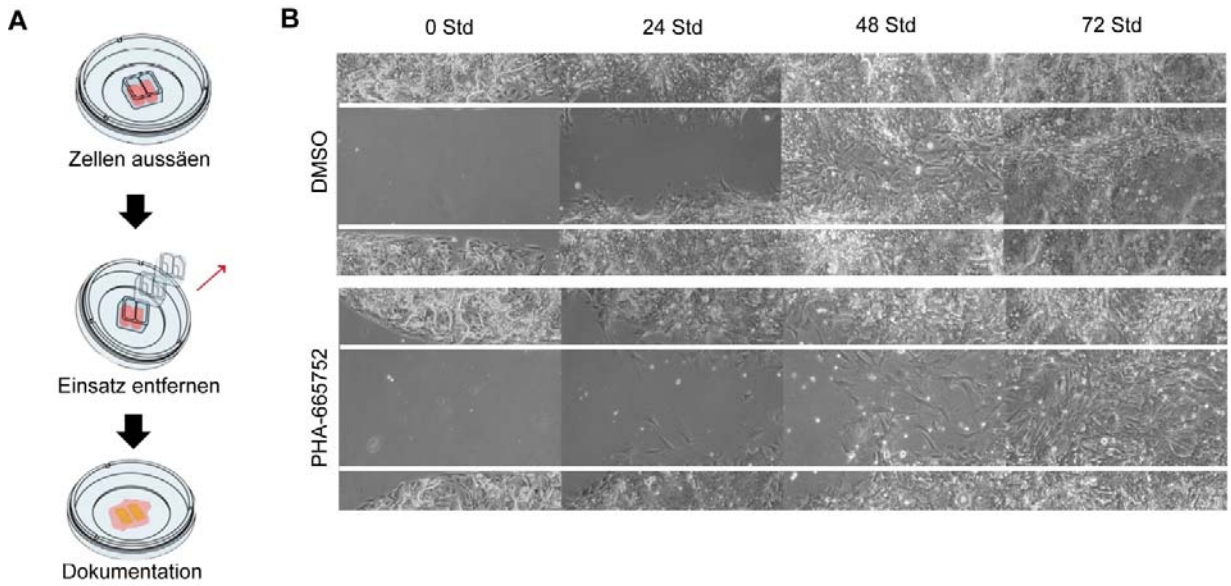


Abbildung 30: Einfluss der Met-Inhibition auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen.

(A) Übersicht über die experimentelle Strategie. Die jeweiligen Zellen wurden in den Einsatz einer Ibidi µ-*Dish* Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Einsatz entfernt und die Wanderung der Zellen maximal 4 Tage alle 24 Stunden dokumentiert. (B) Vergleichende Analyse des Migrationsverhaltens von PHA-665752 und DMSO-behandelten Kontrollzellen. Unten: PHA-665752-behandelte Zellen, oben: DMSO-behandelte Kontrollzellen, 0 bis 72 Stunden nach der Entfernung des Einsatzes

Betrachtet man zunächst das Migrationsverhalten der DMSO-behandelten Kontrollzellen, so wird deutlich, dass bereits nach 24 Stunden die Ränder des Zellrasens ihren linearen Abschluss verlieren und dieser sich durch gruppenweise zur Mitte schiebende Zellen wellenförmig verformt (siehe Abbildung 30 B). Weiterhin war zu beobachten, dass Einzelzellen ebenso in der Lage sind, sich vom Zellrasen bzw. den migrierenden Gruppen zu lösen und völlig unabhängig in den zell-freien Spalt einwandern. Morphologisch erscheinen diese Zellen eher mesenchymal differenziert, wobei auch die Bildung von Lammelipodien zu beobachten war. Bei dem Migrationsverhalten der G-2C9 Zellen handelt es sich also um eine Mischung verschiedener zellulärer Fortbewegungsarten von der kollektiven Zell-Motilität bis hin zu hoch beweglich Einzelzellen. Vergleicht man demgegenüber die Motilität der in Gegenwart von 1 µM PHA-665752 kultivierten G-2C9 Zellen, so fällt auf, dass die Ränder des bereits bestehenden Zellrasens weiterhin einen linearen Abschluss zeigen, sich also keine beweglichen Gruppen in den bestehenden zellfreien Raum vorschieben (siehe Abbildung 30 B). Allerdings ließen sich Zellen nachweisen, die in der Lage sind, sich als Einzelzellen aus dem Zellverband zu lösen und in den Spalt einzuwandern. Diese Zellen sind durch die Bildung langer zytoplasmatischer Fortsätze und

zum Teil auch von Lammelipodien gekennzeichnet. Vergleicht man die Zellen nach 48 stündiger Kultivierung so fällt auf, dass in den Kontrollzellen der zellfreie Raum sowohl durch das Einwandern von Einzelzellen als auch durch das Zusammenschieben ganzer Zellgruppen bereits nahezu geschlossen ist, während die mit Inhibitor-behandelten Zellen weiterhin nur vereinzelt und vor allem als Einzelzellen in den Spalt einwandern und somit nicht in der Lage sind, den zellfreien Raum mit gleicher Geschwindigkeit zu schließen.

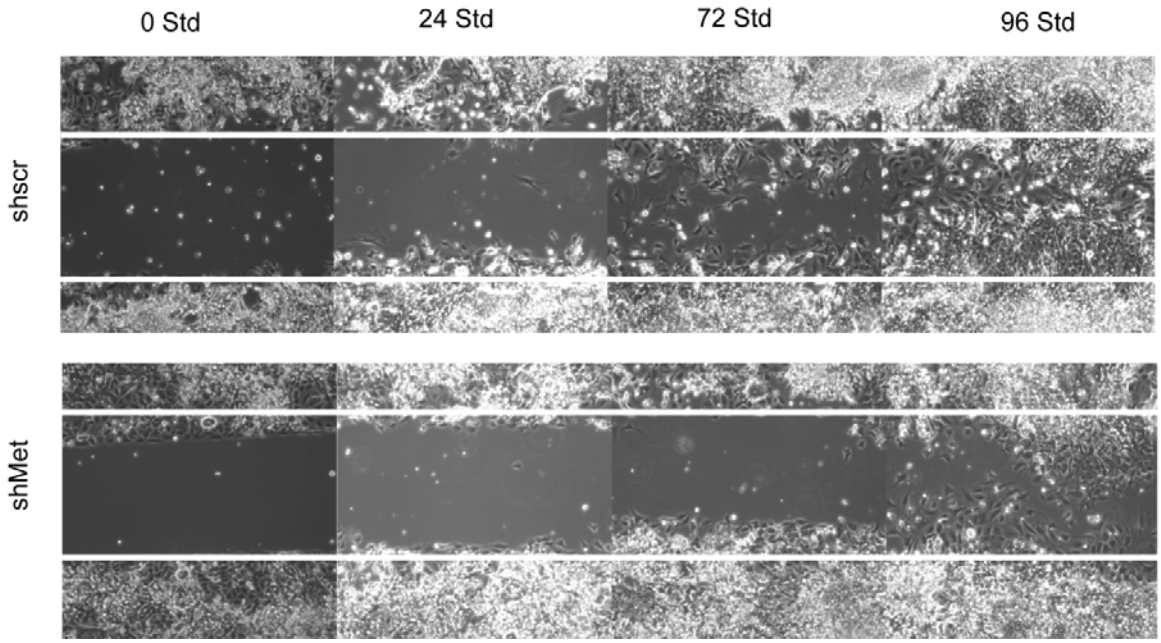


Abbildung 31: Einfluss der shRNA vermittelten Met-Reduktion auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen.

Vergleichende Analyse des Migrationsverhaltens von shMet und shscr Zellen. Unten: shMet Zellen, oben: shscr Zellen, 0 bis 96 Stunden nach der Entfernung des Einsatzes. Die Abbildung zum Zeitpunkt 48 Std wurde nicht dargestellt.

Ein ähnliches Bild zeigte auch der Vergleich zwischen den *knockdown*-Zellen mit den Kontrollzellen (siehe Abbildung 31). Allgemein ist in diesen shRNA tragenden und TurboGFP exprimierenden Zellen eine schwächere Motilität als in den nicht-transduzierten Zellen zu beobachten. So sind die Kontrollzellen erst nach über 92 Stunden in der Lage, den zellfreien Raum zu schließen. Im Gegensatz dazu können die shRNA gegen Met exprimierenden Zellen auch nach 92 Stunden den Spalt nicht merklich schließen. Auch hier lassen sich vereinzelt einwandernde Zellen beobachten, doch scheinen diese deutlich unbeweglicher zu sein als die mobilen Einzelzellen, die nach der Met-Inhibition detektiert werden konnten.

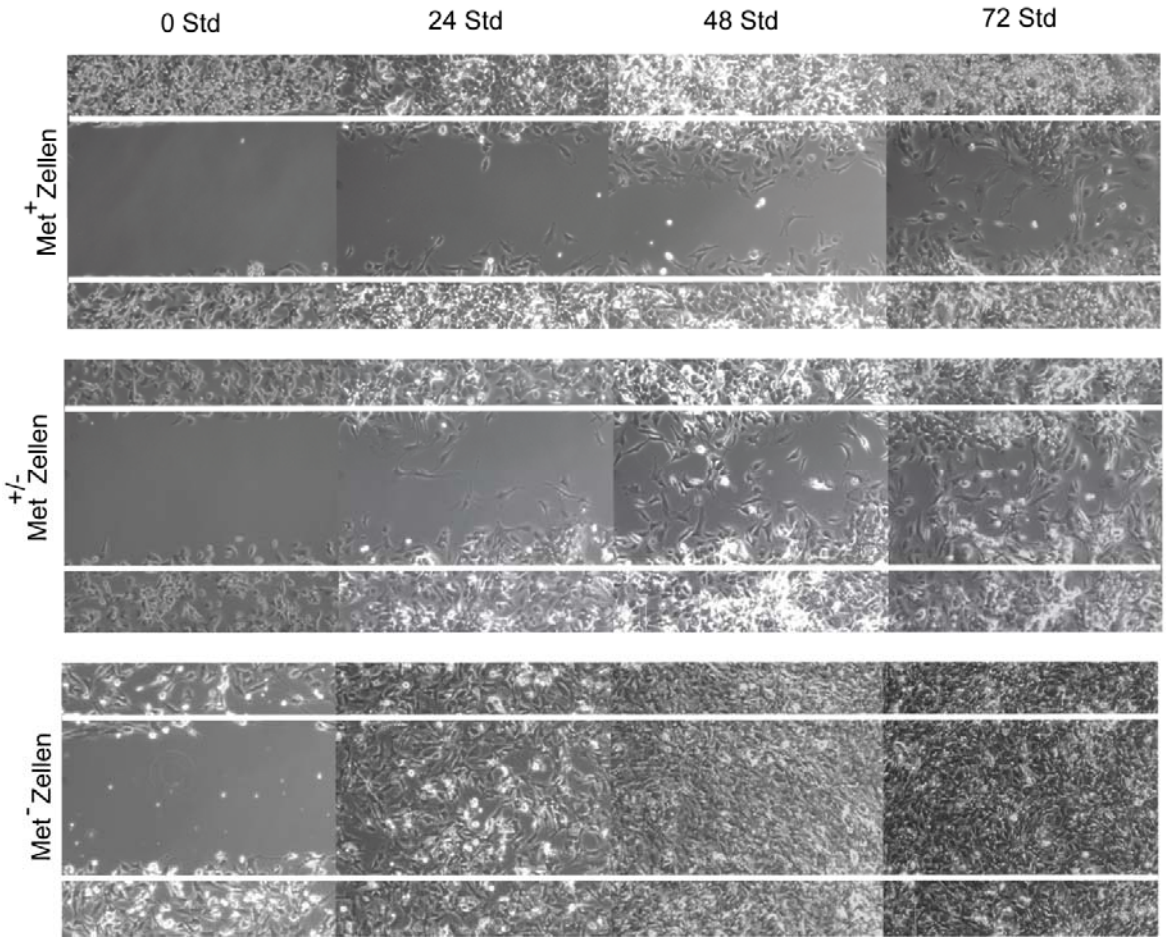


Abbildung 32: Einfluss der endogenen Met-Expression auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen.

Vergleichende Analyse des Migrationsverhaltens von sortierten Met^{+}, Met^{-} und $Met^{+/-}$ Zellen. Unten: Met^{-} sortierte Zellen, Mitte: $Met^{+/-}$ sortierte Zellen, oben: Met^{+} sortierte Zellen, 0 bis 72 Stunden nach der Entfernung des Einsatzes. Die sortierte $Met^{+/-}$ Population repräsentiert die Gesamtpopulation aller lebenden G-2C9 Zellen, welche sowohl Met^{+} als auch Met^{-} Zellen beinhaltet.

Vergleicht man demgegenüber die in Met^{+}, Met^{-} und eine $Met^{+/-}$gemischte Kontrollpopulation FACS-sortierten Zellen hinsichtlich ihrer Motilität, so kommt man zu einem überraschenden Ergebnis (siehe Abbildung 32). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Analysen zeigten die Met^{-} Zellen die weitaus stärkste Beweglichkeit. Diese Zellen waren in der Lage, binnen 24 Stunden den Spalt mit einem lockeren Netzwerk an Zellen auszufüllen und ihn nach 48 Stunden bereits komplett zu schließen. Die Met^{+} und $Met^{+/-}$ Kontrollzellen hingegen zeigten erst nach 24 bis 48 Stunden eine beginnende Bewegung in den zellfreien Raum, die auch nach 72 Stunden noch nicht komplett abgeschlossen war, wobei die Mobilität der Met^{+} Zellen noch langsamer erschien als die der FACS-sortierten Kontrollzellen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der zur Markierung des Met-Rezeptors verwendete Antikörper durch Bindung an den Rezeptor dessen

Funktionalität beeinflusst und daher, wie nach Behandlung mit PHA-665752, eine reduzierte Motilität beobachtbar ist. Allerdings waren die Met$^-$ Zellen deutlich mobiler als die Gesamtzellkultur. Im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten, ungefärbten und nicht sortierten Kontrollzellen (siehe Abbildung 30) füllten die Met$^-$ Zellen den Spalt innerhalb von 24 Stunden komplett aus, während bei den DMSO-behandelten Kontrollzellen erst einige wenige Zellen in den Spalt eingewandert waren.

Ob es sich bei den Zellen, die unabhängig von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten wandern können, um Met$^+$ oder Met$^-$ Zellen bzw. um Zellen mit einem aktiven Met-Signalweg handelt, wurde über die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von Met und p-Met sowohl an sortierten als auch Inhibitor-behandelten Zellen untersucht.

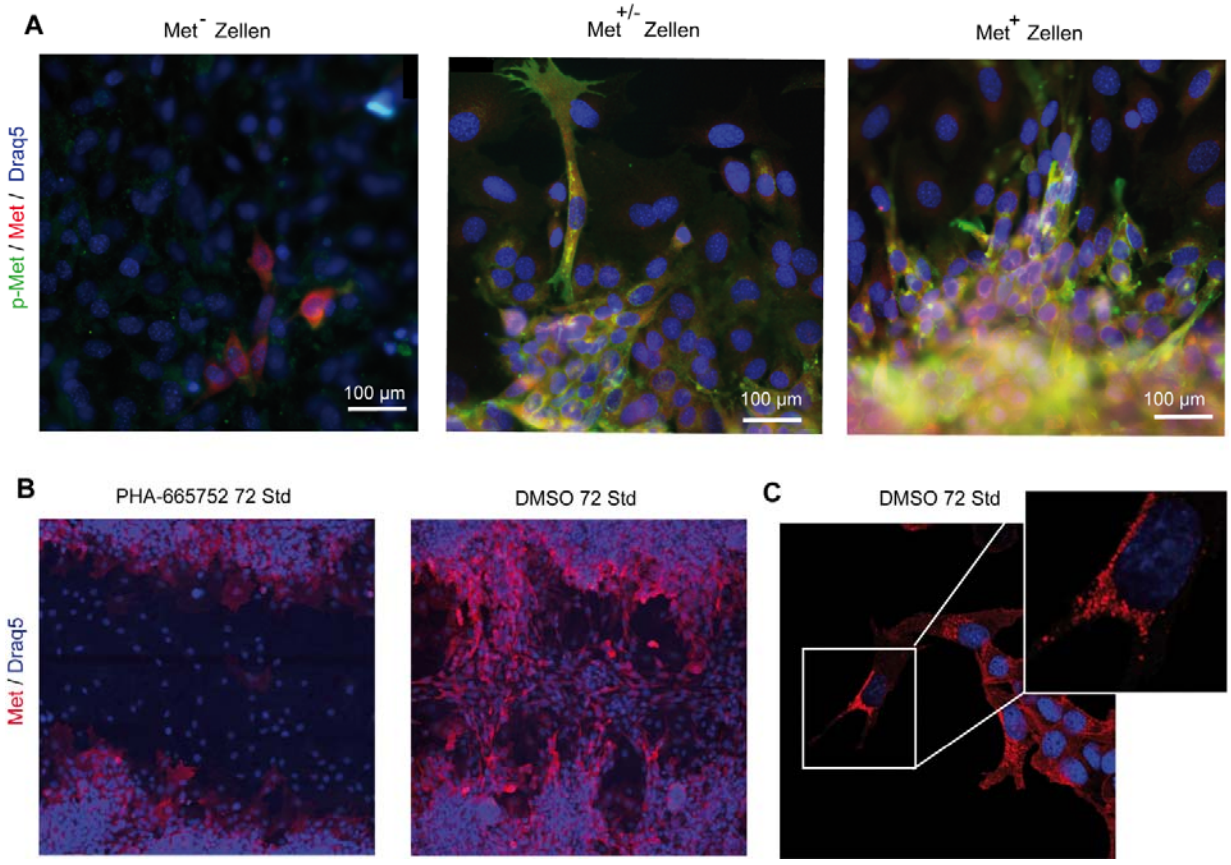


Abbildung 33: Vergleich der Migrationsformen und Verteilung des Met-Rezeptors in G-2C9 Zellen.

IF-Analyse der migrierenden Zellen. (A) linke Seite: Met$^-$ sortierte Zellen im Spalt, Mitte: Met$^{+/-}$ sortierte Zellen an der Migrationsfront, rechte Seite: Met$^+$ sortierte Zellen an der Migrationsfront. Die Met$^{+/-}$ sortierte Population repräsentiert die Gesamtpopulation aller lebenden G-2C9 Zellen, welche sowohl Met$^+$ als auch Met$^-$ Zellen beinhaltet. (B) linke Seite: mit PHA-665752-behandelte Zellen, rechte Seite: DMSO-behandelte Kontrollzellen; beide 72 Stunden nach Dokumentationsbeginn. (C) Nahaufnahme einer wandernden Gruppe von DMSO-behandelten Kontrollzellen an der Migrationsfront. Die spezifischen

Antikörper wurden im Falle von Met mit einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper, im Falle von p-Met mit einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert, der Größenstandard beträgt 100 µm. Verwendete Met-Antikörper intrazelluläre Domäne: p-Met # sc-34086-R; extrazelluläre Domäne: Met # GTX10681.

Betrachtet man nun zunächst die IF-Färbung der sortierten Zellen so ist in den Met^{+} und $Met^{+/-}$ Kontrollzellen nach 72-stündiger Kultivierung sowohl eine starke Met-Expression (siehe Abbildung 33 A rechts und Mitte), als auch eine eindeutige Phosphorylierung des Rezeptors in den als Gruppen wandernden Zellen der Met^{+} und $Met^{+/-}$ Kontrollpopulation zu verzeichnen (siehe Abbildung 33 A rechts und Mitte). Allerdings scheinen die Zellen diese intensive Met-Expression und Phosphorylierung zu verlieren, sobald sie sich von der Gruppe losreißen können und einzeln einwandern. Die ehemals als Met-negative Subpopulation sortierten Zellen wurden ebenfalls auf ihre Met-Expression hin untersucht. Die Zellen die sich nach 72 Stunden innerhalb des Spaltes befanden, zeigten, wie zu erwarten, nur sehr vereinzelt ein positives Signal für den Met-Rezeptor (Abbildung 33 A, links). Eine eindeutige Phosphorylierung konnte hier aber nicht nachgewiesen werden. Eine vergleichende Betrachtung der mit PHA-665752- bzw. DMSO-behandelten Zellen verdeutlicht zunächst den Unterschied im Migrationsmuster der beiden Gruppen. In Abbildung 33 B sind die Kerne der einwandernden Zellen jeder Gruppe mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert dargestellt. Vergleicht man die Kerne der Kontrollzellen mit den Kernen der PHA-665752-behandelten Zellen, so stellt man fest, dass die Kontrollzellen nach einem festen Muster wandern. So schieben sich Gruppen von Zellen gemeinsam vor, aber auch einzeln wandernde Zellen bewegen sich scheinbar zielgerichtet in lockeren Gruppierungen hintereinander her, bis die Zellen in der Mitte des Spaltes aufeinander treffen und neue Kolonien bilden. Diese gruppenweise migrierenden Zellen zeigen gegenüber den schwach positiven Einzelzellen eine intensive Met-Expression (Abbildung 33 B, Mitte). Dieselben Zellen zeigen allerdings ein völlig anderes Verhalten, wenn sie in Gegenwart von PHA-665752 migrieren. Die Verteilung der Kerne zeigt hier wie bereits erwähnt das alleinige Einwandern von Einzelzellen ohne Gruppenverband. Weiterhin wird nun deutlich, dass diese unabhängig wandernden Zellen keinerlei Zielausrichtung mehr zeigen und auch keine lockeren Aggregate von aufeinanderfolgenden Einzelzellen bilden. Interessanterweise zeigen diese „zufällig“ wandernden Zellen nahezu keine Expression des Met-Rezeptors. Die Zellen des Zellrasens, besonders an den Grenzen zum freien Raum, zeigen demgegenüber und sogar gegenüber den Kontrollzellen eine verstärkte Expression des Met-Proteins bzw. eine Stabilisierung des Met-Proteins in den Membranen der inhibierten Zellen (siehe Abbildung 33 B, links). Diese Zellen weisen ein stark

ausgebreitetes, in Richtung des freien Raumes strebendes, Lammelipodien-formendes und amöboid erscheinendes Zytoplasma auf, sind aber nicht in der Lage, sich gruppenweise vorzuschieben oder einzeln loszureißen.

Die nähere Betrachtung einer gemeinsam wandernden Gruppe der DMSO-behandelten Kontrollzellen lässt erkennen, dass diejenigen Zellen, die sich vom Gruppenverband lösen bzw. die Führung der Gruppe übernehmen, eine vesikuläre Verteilung des Met-Rezeptors bei gleichzeitiger Reduktion der membranösen Verteilung zeigen (siehe Abbildung 33 C).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass (i) die Inhibition des Met-Signalweges bzw. die Reduktion des Met-Rezeptors durch shRNA zu einer verringerten Motilität der G-2C9 Zellen führt. Insbesondere sind die zielgerichtete Migration von kollektiv wandernden Gruppen sowie die gemeinsame Wanderung aufeinander folgender Einzelzellen durch den Verlust eines funktionellen Met-Signalweges deutlich reduziert. (ii) Die in Gruppen wandernden Zellen exprimieren den Met-Rezeptor in seiner aktiven Form, während Einzelzellen nach Ablösung vom Zellverband die Expression von Met augenscheinlich verlieren bzw. den Rezeptor internalisieren. Und (iii) die als Met-negativ sortierten Zellen wandern deutlich schneller als Met-positive bzw. unsortierte Zellen. Es wäre möglich, dass es sich bei den zuerst einwandernden Einzelzellen um die im Rahmen der FACS-Analyse sortierte, schnelle Met^- Subpopulation handelt.

4.7 Einfluss der Met-Proteinexpression und -Aktivität auf die Subpopulationen der G-2C9 Zellkultur

Wie bereits in Abschnitt 4.3 erwähnt, stellt die G-2C9 Zellkultur ein Zellsystem bestehend aus Zellen verschiedener Differenzierungsstufen dar. Die Expression des Met-Rezeptors wird innerhalb dieses Zellsystems differenziell reguliert und konnte der quasi-epithelialen Subpopulation der G-2C9 Zellen zugeordnet werden. Neben der eindeutigen Zuordnung des Met-Rezeptors zu den Zellen des epithelialen Kompartiments konnte die Expression seines Liganden Hgf der eher mesenchymal differenzierten Subpopulation zugeordnet werden (siehe Abschnitt 4.5). Des Weiteren zeigte die vergleichende Expressions-Analyse von G-2C9 Zellen nach pharmakologischer Met-Inhibition bzw. dem stabilen *knockdown* von Met mittels shRNA eine Zunahme der Hgf-Expression. Aufgrund der Zugehörigkeit der Hgf-Expression zur mesenchymalen Subpopulation und der Rolle des Met Proteins als EMT/MET-Regulator stellte sich die Frage, ob der Verlust der Met-Aktivität unter Umständen einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Subpopulationen hat bzw. die direkte Transition von einem in den anderen

Differenzierungszustand durch die fehlende Met-Aktivität erschwert oder begünstigt wird. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen der G-2C9 Kultur mit PHA-665752 bzw. DMSO behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern untersucht (siehe Abschnitt 4.3.2 und 4.3.1). Zur vertiefenden Analyse der Subpopulationen wurden die Anteile der Subpopulationen an der Gesamtpopulation nach Inhibitor-Behandlung durchflusszytometrisch vermessen und die Verteilung bzw. Menge des Met-Proteins über Western-Blot-Analyse und IF überprüft.

4.7.1 Expression von epithelialen und mesenchymalen Markergenen nach Met-Inhibition und shRNA-vermitteltem Met-*knockdown*

Um den Einfluss eines intakten Met-Signalweges auf das Expressionsprofil der Gesamtpopulation von G-2C9 Zellen zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile von PHA-665752- und DMSO-behandelten Kontrollzellen nach 72 stündiger Kultivierung verglichen. Zur Gruppe der epithelialen Markergene zählen *Cd24a, Cd49f, Epcam, Krt14, Met*, *Muc1* und *Sox10*. Die Gruppe der mesenchymalen Markergene beinhaltet *Sca1, Thy1, Twist*2 und *Vim*. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle mesenchymalen Markergene nach Behandlung mit PHA-665752, also nach Reduktion der Met-Aktivität, stärker exprimiert wurden. Die Expression von *Vim* stieg maximal um den Faktor 3, die von *Thy1* um mehr als 5, die Expressionswerte von *Sca1* und *Twist2* stiegen um das 3- bis 4-fache. Bei den epithelialen Markergenen zeigten sich die Expressionswerte von *Cd24a, Epcam, Met*, *Muc1* und *Sox10* unverändert. *Cd49f* und *Krt14 z*eigten leicht schwankende Werte, bei *Krt14* mit einer Tendenz nach oben (siehe Abbildung 34 A). Zur Bestätigung dieser Expressionsprofile wurden G-2C9-*knockdown*-Zellen und die entsprechenden *non-silencing*-Kontrollzellen ebenfalls auf die Expression ausgewählter Markergene verglichen. Wie im Vergleich der Inhibitor-behandelten Zellen bereits festgestellt, kann eine deutliche Zunahme der Expression des in diesem System ausschlaggebenden Markers *Thy1* verzeichnet werden (siehe Abbildung 34 B). Die Expressionswerte der drei technischen Replikate pro Transduktion liegen relativ dicht beisammen, schwanken aber deutlich zwischen den einzelnen Transduktionen. So ist in einigen Versuchen kaum eine Regulation der *Thy1*-Genexpression zu erkennen, während in anderen Versuchen eine bis zu 90-fache Anreicherung des *Thy1*-Transkriptes in den shMet Zellen zu verzeichnen ist. Die Gründe für die starken Schwankungen sind vermutlich in der Größe der sehr variablen Thy1-positiven Population während der lentiviralen Transduktion der G-2C9 Zellen zu

finden. Da die Transduktionseffizienz relativ gering ausfiel und dadurch nur ein Teil der Gesamtpopulation erfolgreich transduziert werden konnte, spielt der Differenzierungsstatus der ursprünglich bei der Transduktion getroffenen und daraufhin selektionierten Zellen eine entscheidende Rolle bei der Gesamtexpression von *Thy1*. Die Analyse der epithelialen Marker *Epcam* und *Muc1* zeigte in Übereinstimmung mit den Inhibitor-Studien keinen expressionellen Unterschied zwischen shMet- und shscr-Kontrollzellen. Die Expression des messbaren *Met*-Transkriptes nimmt durch die Expression der Met-shRNA naturgemäß ab.

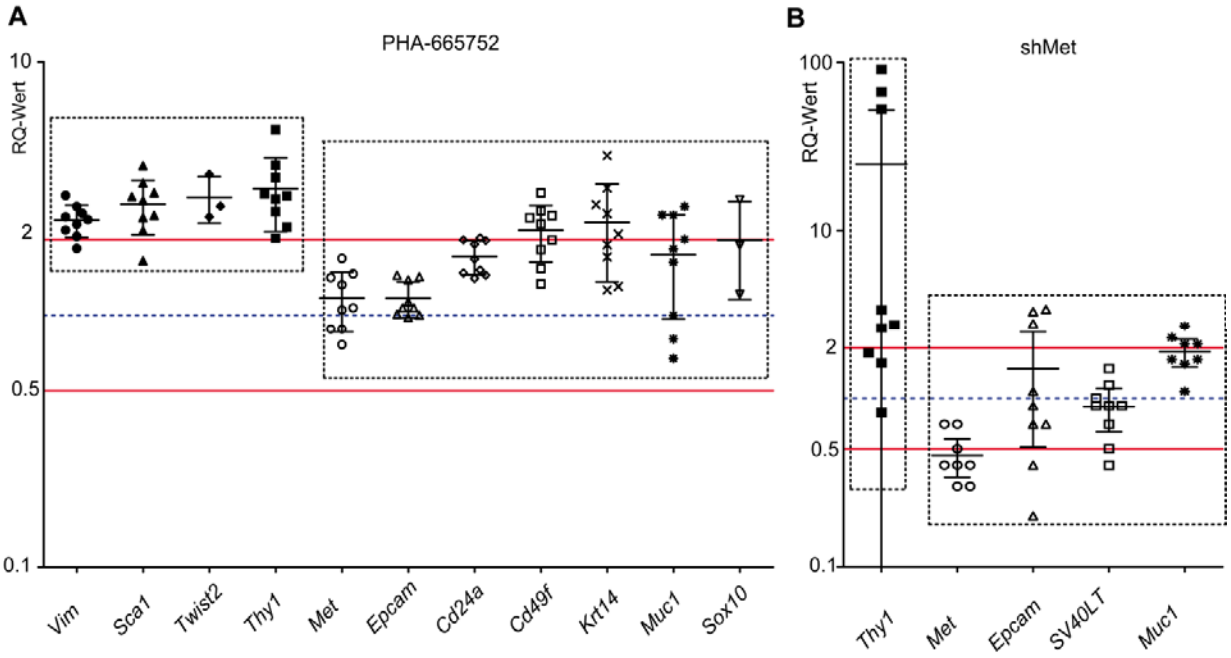


Abbildung 34: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker nach Met-Inhibition bzw. shRNA-vermitteltem Met-*knockdown*.

Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der Proben mit einer reduzierten Met-Aktivität gegen die jeweiligen Kontrollen. Aufgetragen sind je 3 biologische Replikate in je 3 technischen Replikaten. Jeder Punkt stellt den RQ-Wert einer Probe dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige Kontrollproben, deren RQ-Werte somit 1 betragen. Darstellung der Daten gemäß Abbildung 19. (A) Bei den Proben handelt es sich um 72 Std. mit PHA-665752-behandelte G-2C9 Zellen. Die Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO kultiviert. (B) Bei den Proben handelt es sich um shMet-exprimierende G-2C9 Zellen. Die Kontrollzellen exprimieren eine *non-silencing* shRNA (shscr).

Die Genexpressions-Analyse in zwei verschiedenen Systemen hat eine Zunahme der Expression mesenchymaler Marker ergeben. Diese konnte sowohl nach Met-Inhibition, als auch nach stabilem Met-*knockdown* aber bei gleichbleibender Expression epithelialer Marker beobachtet werden.

Zumindest in den mit PHA-665752 behandelten Zellen ist eine Störung des Gleichgewichtes zwischen der Expression mesenchymaler und epithelialer Markergene eindeutig zu erkennen. Hier kann jedoch nicht geklärt werden, ob es sich um eine Veränderung der Differenzierungszustände einzelner Zellen bzw. ganzer Zellpopulationen handelt oder, den eher mesenchymal differenzierten Zellen ein Wachstumsvorteil gegenüber den Met-exprimierenden Zellen eingeräumt wird. Die Inhibition des Met-Signalweges wirkt sich natürlich nur auf Zellen mit einem funktionellen Met-Rezeptor aus und nicht auf die quasi-mesenchymal differenzierten Met^- Zellen, was zu einem Wachstumsvorteil für diese Zellen führen könnte. Allerdings wäre bei einer Anreicherung quasi-mesenchymaler Zellen eine gleichzeitige Reduktion der epithelialen Markergenexpression in der Gesamtkultur zu erwarten. Da es in diesem Versuch aber nicht zu einer reduzierten Expression epithelialer Markergene kam, liegt die Vermutung nahe, dass die Inhibition des Met-Signalweges in Met-positiven Zellen zu einer gesteigerten Expression mesenchymaler Marker in diesen Zellen führt.

4.7.2 Einfluss der pharmakologischen Met-Inhibition und der shRNA vermittelten Met-Reduktion auf die Expression von Hgf

Wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, ist die Expression des Met-Rezeptors und seines Liganden Hgf auf unterschiedliche Subpopulationen der G-2C9 Zellen beschränkt. Da Hgf vom mesenchymalen Kompartiment der G-2C9 Zellen produziert wird und die Inhibition von Met bzw. der shRNA vermittelte Met-*knockdown* zu einer gesteigerten Expression mesenchymaler Marker führt, ergibt sich die Frage nach dem Einfluss einer reduzierten Met-Aktivität auf die Hgf-Expression. Deshalb wurde untersucht, ob die Expression von Hgf im Sinne eines negativen *feed-back*-Mechanismus durch einen intakten Met-Signalweg unterdrückt wird und demzufolge eine Reduktion der Met-Expression bzw. Inhibition des Met-Signalweges zu einer verstärkten Expression der Hgf-Transkription führt. Dazu wurden die PHA-665752 und DMSO-behandelten Zellen nach 24 bzw. 72 Stunden gemäß Abschnitt 3.2.4 der qRT-PCR-Analyse des *Hgf*-Transkripts bzw. der IF- Analyse des Hgf-Proteins zugeführt.

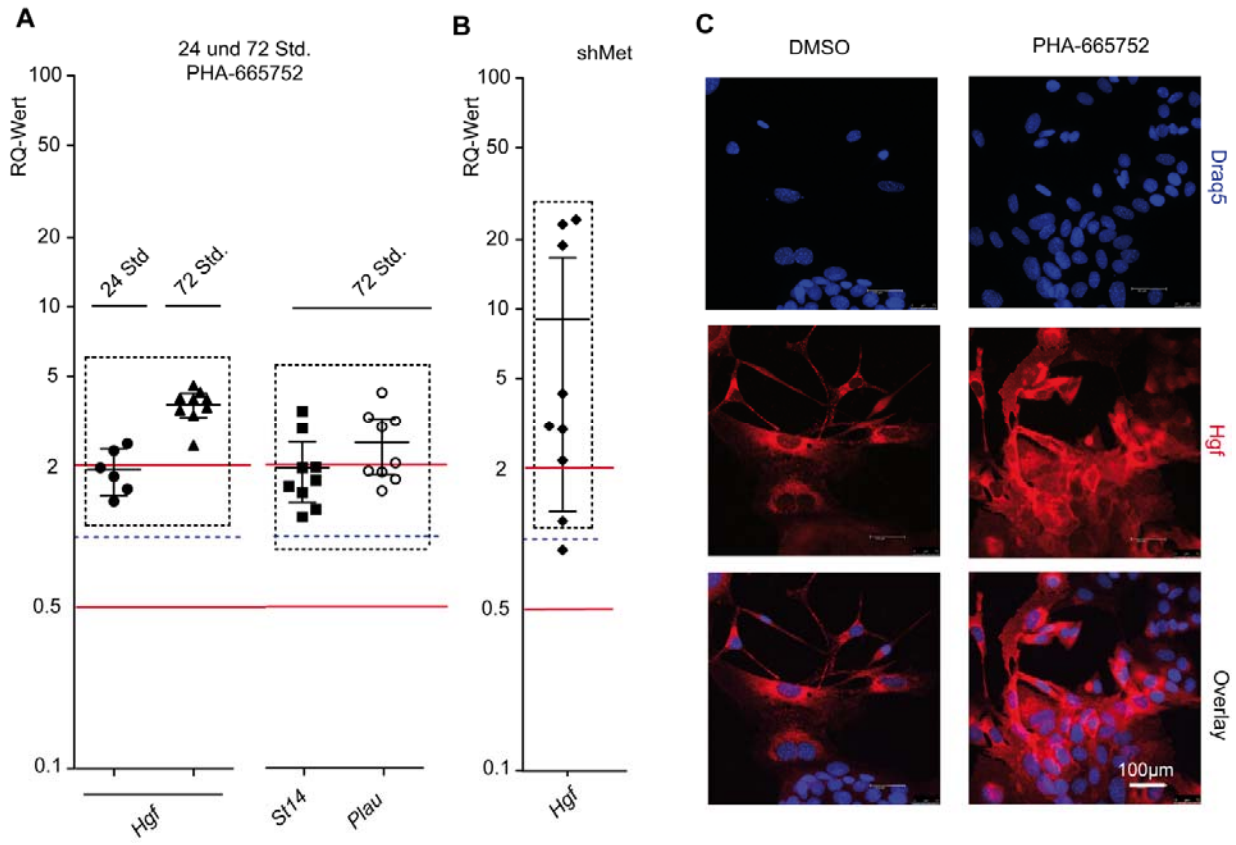


Abbildung 35: Einfluss der Met-Inhibition und -Reduktion auf die Expression von Hgf und assoziierter Gene.

(A) Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der 24 bzw. 72 Stunden nach Met-Inhibition analysierten G-2C9 Zellen für das *Hgf*-Gen sowie die RQ-Werte für die Gene *St14* und *Plau* nach 72-stündiger Inkubation. Dargestellt sind je 2 biologische Replikate in je 3 technischen Replikaten, für die 24 Std. bzw. je 3 biologische Replikate in 3 technischen Replikaten für die 72 Std. Proben; jeder Punkt stellt den RQ-Wert einer Probe dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörigen DMSO-Kontrollen, deren RQ-Werte somit 1 betrugen. (B) Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der shMet-exprimierenden G-2C9 Zellen für das *Hgf*-Gen. Dargestellt sind je 3 biologische Replikate in je 3 technischen Replikaten. Jeder Punkt stellt den RQ-Wert einer Probe dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörigen shscr-Kontrollen. Darstellung der Daten gemäß Abbildung 19. (C) IF-Analyse des Hgf-Proteins nach 72-stündiger Met-Inhibition. Die behandelten Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion des spezifischen Hgf-Antikörpers erfolgte über einen Alexa-555 gekoppelten Sekundär-Antikörper. Der Größenstandard beträgt 100 µm. Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop mittels 40x-Objektiv aufgenommen. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. Die linke Seite zeigt die DMSO-behandelten Kontrollzellen, die rechte Seite die PHA-665752-behandelten Zellen.

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse der *Hgf*-Expression zeigten in Übereinstimmung mit der in Abschnitt 4.7.1 beschriebenen erhöhten Expression mesenchymaler Marker bereits nach 24 Stunden eine Tendenz zur verstärkten Expression von *Hgf*. Nach 72 Stunden Inkubation in

Anwesenheit von PHA-665752 konnte eine eindeutige Regulation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 A). Die Expression der *Hgf*-mRNA nahm um den Faktor 5 nach Inhibitor-Behandlung gegenüber den mit DMSO-behandelten Kontrollzellen zu. Eine zum Teil noch stärkere Zunahme der *Hgf*-Expression war in den stabil mit shRNA gegen Met transfizierten G-2C9 Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen zu beobachten, die ein *non-silencing* shRNAmir Konstrukt (vergl. Abschnitt 4.6) trugen (siehe Abbildung 35 B). Die Expressionswerte der einzelnen Proben streuen je nach Versuch relativ stark. In nahezu jeder Probe ist jedoch ein Anstieg der *Hgf*-Expression in shMet Zellen zu verzeichnen, der zum Teil bis zu 24-fach erhöhten RQ-Werten führt.

Die Expressionsdaten korrespondieren mit den in Abbildung 35 C dargestellten Immunfluoreszenz-Färbungen des Hgf-Proteins nach 72-stündiger Behandlung mit PHA-665752 oder DMSO. Die linke Spalte zeigt die Färbung der Kontrollzellen. Hier ist im Vergleich zur rechten Spalte eine reduzierte Färbung des Hgf-Proteins zu verzeichnen. Wie in unbehandelten Kontrollzellen bereits gezeigt wurde (Vergleich Abschnitt 4.5.1), weisen hier die eher einzelständigen Zellen eine Färbung des Hgf-Proteins auf, während die meist epithelialen Kolonien am unteren Rand der Abbildung, zum Teil keinerlei Hgf-Protein erkennen lassen. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Hgf-Proteins in den Inhibitor-behandelten Zellen, wie auf Expressionsebene gezeigt, verstärkt (Abbildung 35 C, rechte Spalte). Neben der Expression von Hgf nach Behandlung mit PHA-665752 wurden die Expressionswerte der eventuell Hgf prozessierenden Enzyme Matriptase (St14) und Plasminogen Aktivator/Urokinase (Plau) nach 72-stündiger Kultur verglichen (siehe Abbildung 35 B). Eine Veränderung der *St14*-Expression konnte nicht festgestellt werden. Die Expression von *Plau* zeigte jedoch die Tendenz zu leichter Erhöhung. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass (i) sowohl die Inhibition des Met-Signalweges als auch die Runterregulation des Met-Proteinlevels zu einer verstärkten Expression des Met-Liganden Hgf führt und (ii) dieser expressionelle Anstieg gleichermaßen in einer Zunahme des Hgf-Proteins nach Behandlung der Zellen mit PHA-665752 resultiert.

4.7.3 Beeinflussung des Met-Umsatzes durch die pharmakologische Inhibition der Met-Aktivität

In den Abschnitten 4.7.1 und 4.7.2 konnte ein Anstieg der Expression mesenchymaler Markergene inklusive *Hgf* nach Inhibition des Met-Signalwegs festgestellt werden. Um den Effekt der Inhibition auf der Ebene einzelner Zellen bzw. der gesamten Zellkultur besser

verstehen zu können, wurde nach 72-stündiger Met-Inhibition zum einen die Menge und Verteilung von Met in einzelnen Zellen über indirekte Immunfluoreszenzmarkierung analysiert, zum anderen dessen Menge und Verteilung in der Gesamtkultur über Western-Blot und Durchflusszytometrie überprüft.

Die Western-Blot-Analyse zeigt auch nach 72 Stunden und einmaliger Zugabe von PHA-665752 eine deutliche Reduktion der Met-Phosphorylierung (siehe Abbildung 36 A). Interessanterweise nimmt die Menge an generell detektierbarem Met-Protein im Western-Blot gegenüber den Kontrollzellen mit intaktem Met-Signalweg bei gleichbleibender Met-Expression (siehe Abschnitt 4.7.1) zu. Diese Zunahme konnte durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit zwei Met-spezifischen Antikörpern, einer gegen ein extrazelluläres und einer gegen ein intrazelluläres Epitop gerichtet, bestätigt werden (siehe Abbildung 36 B). Im direkten Vergleich der Proteinexpression zwischen inhibierten und Kontrollzellen fällt eine erhöhte Met-Proteinkonzentration auf der Oberfläche der Inhibitor-behandelten Zellen auf. Neben der Zelloberflächen-Lokalisation des Met-Rezeptors ist eine intrazelluläre, vesikuläre Lokalisation von Met zu erkennen. Obwohl im Western-Blot kaum phosphoryliertes Met nachgewiesen werden konnte, ist in den Inhibitor-behandelten Zellen eine ausschließlich vesikuläre p-Met-Färbung zu erkennen, während die Kontrollzellen eine sehr starke, membranöse p-Met-Färbung aufweisen. In den Aufnahmen in Abbildung 36 C lässt sich gut erkennen, dass in den Inhibitor-behandelten Kulturen neben den Zellen, die eine erhöhte Met-Proteinmenge aufweisen, Met-negative Zellen gehäuft vorkommen. Im Gegensatz dazu zeigen fast alle Zellen der Kontroll-Kultur eine schwache bis starke Met-Expression.

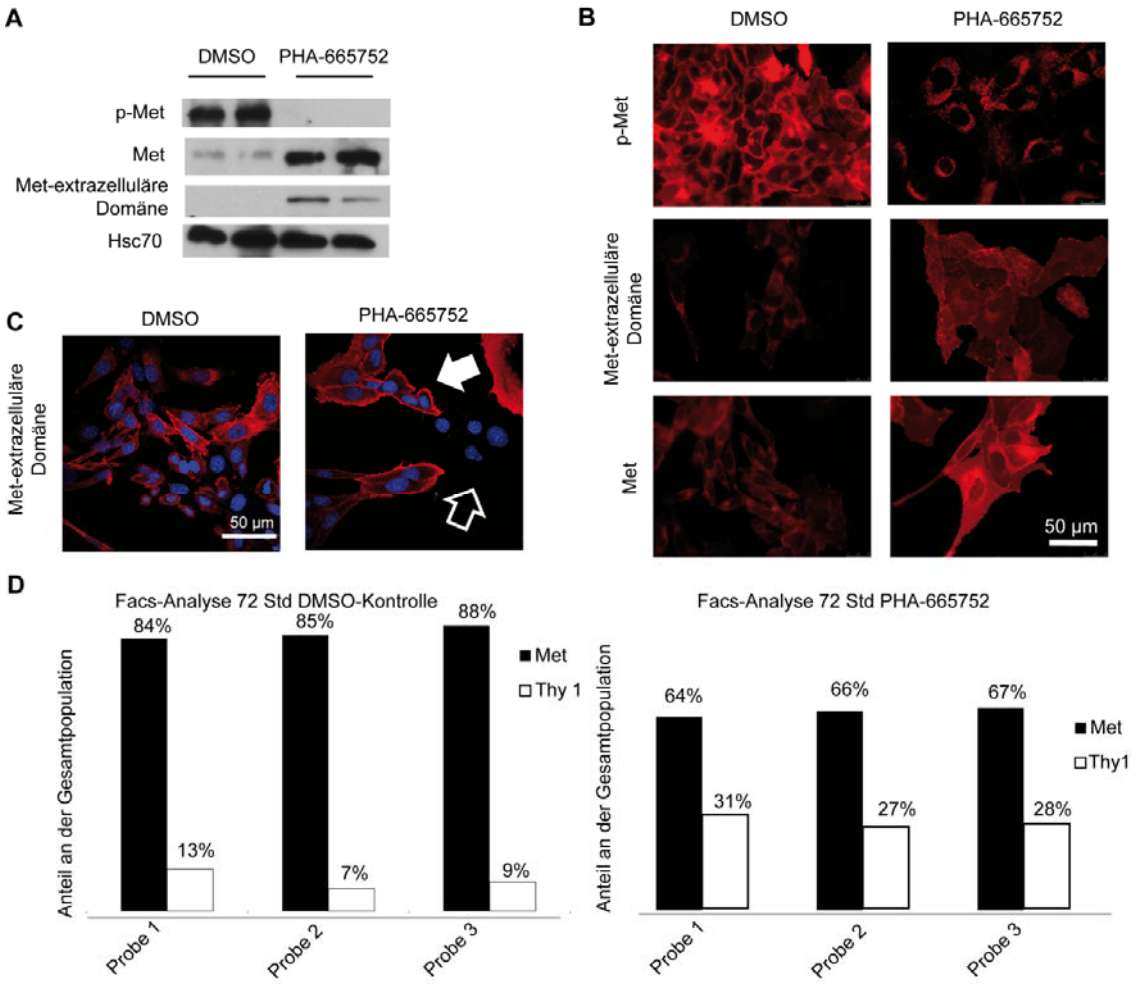


Abbildung 36: Effekt der Met-Inhibition auf Menge und Verteilung des Met-Rezeptors.

G-2C9 Zellen wurden für 72 Stunden in Gegenwart von PHA-665752 bzw. DMSO kultiviert. (A) Vergleichende Western-Blot-Analyse (n=2) der Met-Expression bzw. Met-Phosphorylierung von PHA-665752-behandelten Zellen (rechts) und DMSO-Kontrollzellen (links). Die Detektion der spezifischen Primärantikörper erfolgte mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Als Ladungskontrolle wurde Hsc70 eingesetzt. Met = Antikörper der intrazelluläres Met-Epitop erkennt, Met-extrazelluläre Domäne = Antikörper der extrazelluläre Met-Epitope erkennt. (B,C) Vergleichende IF-Analyse der Met-Expression bzw. Phosphorylierung von PHA-665752-behandelten Zellen (rechts) und DMSO-Kontrollzellen (links). Die spezifischen Primärantikörper wurden mit Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. (B) Die Aufnahmen wurden alle unter denselben Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop erstellt. (C) Die Aufnahmen wurden unter denselben Einstellungen am Laser-Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss AG) mittels 40x-Immersions-Objektiv erstellt. Der Größenstandard beträgt 50 µm. Gefüllte Pfeile weisen auf Met-exprimierende Zellen, leere Pfeile auf Met-negative Zellen hin. Die Kerne wurden mit Draq5 visualisiert. (D) Vergleichende FACS-Analyse der Met- und Thy1-Expression in PHA-665752-behandelten Zellen und DMSO-behandelten Kontrollzellen (n=3). Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Met- bzw. Thy1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation. Rechts: PHA-665752-behandelte Proben, links: DMSO-behandelten Kontrollproben. Verwendete Met-Antikörper intrazelluläre Domäne: Met # sc-8057; p-Met # sc-34086-R; extrazelluläre Domäne: Met # GTX10681.

Vergleichende durchflusszytometrische Analysen der Met- und Thy1-Proteinexpression in der Gesamtkultur zeigen, dass nach drei Tagen in Anwesenheit von PHA-665752 die Subpopulation der Met^+ Zellen von ca. 80% auf ca. 60% schrumpft, während sich die Population der eher mesenchymal differenzierten $Thy1^+$ Zellen von ca. 13% auf bis zu 30% vergrößert (siehe Abbildung 36 D).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass (i) eine größere Menge des Met-Proteins auf einer kleineren Anzahl von Zellen exprimiert wird und (ii) der prozentuale Anteil epithelialer, Met-positiver Zellen an der Gesamtkultur zurückgeht, während die Menge an eher mesenchymal differenzierten Zellen bezogen auf die Gesamtkultur ansteigt. Dies bedeutet weiterhin (iii), dass sich das Gleichgewicht der Populationen in der Tat in Richtung der mesenchymalen Differenzierung verschiebt und sich die eher mesenchymale Stammzellcharakteristiken tragende Subpopulation anreichert.

4.8 Analyse der Met-Signaturgene in G-2C9 Zellen

Wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben, konnte eine Gruppe von Genen identifiziert werden, die gemeinsam mit der Expression des *Met*-Gens selbst in *high-grade* Tumoren überexprimiert wird. Diese Signatur setzt sich aus den Genen *Upp1, Tes, Igfbp2* und *Rbp7* zusammen. Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, konnten die Expressionsdaten des Arrays über qRT-PCR validiert werden. Zusätzlich ist für die Expression des Met-Rezeptors auch *in vitro* eine Zuordnung zu einem distinkten Differenzierungsstatus und damit zu einer eindeutig abgrenzbaren Gruppe gelungen (siehe Abschnitt 4.3). Daher ergibt sich die Frage, ob die Gene der Met-Signatur ebenfalls zwischen den Subpopulationen differenziell reguliert werden und, wenn ja, ob deren Expression durch die Inhibition eines intakten Met-Signalweges bzw. des Met-*knockdowns* beeinflusst wird. Dieser Abschnitt dient dazu, potenzielle Met-*Downstream-Targets* innerhalb der Gruppe der Met-Signaturgene zu identifizieren und Aufschluss über die in den G-2C9 Zellen ablaufenden Met-Signalwege zu liefern.

4.8.1 Vergleichende Expressionsanalyse der Met-Signaturgene in Met^+ und Met^- Subpopulationen

Die Expressionswerte der Met-Signaturgene wurden in den Met^+ und Met^- Subpopulationen über qRT-PCR relativ quantifiziert (siehe Abbildung 37 A).

Als einziges der Met-Signaturgene zeigte *Rbp7* eine konstant stärkere Expression in Met^+ Zellen. Die RQ-Werte zeigten eine 2- bis 7-fache Erhöhung der *Rbp7* Transkriptmenge. Die Expressionswerte der Gene *Igfbp2* und *Upp1* schwankten, wobei in 3 von 4 Sortproben in der Met-positiven Subpopulation die Expression von *Igfbp2* um das 2- bis über 4-fache erhöht war. Die RQ-Werte von *Upp1* schwankten alle um den Faktor 2, was eine tendenziell leicht verstärkte Expression in den Met^+ Zellen andeutet. Die Transkriptmengen des *Tes*-Gens unterschieden sich zwischen der Met^+ und Met^- Subpopulation nicht. Somit konnte für *Rbp7* weiterhin eine Ko-Regulation mit Met gezeigt werden, während dass *Tes*-Gen nicht in Abhängigkeit der Met-Expression reguliert zu sein scheint. Die Gene *Igfbp2* und *Upp1* zeigten lediglich Tendenzen zu einer stärkeren Expression in den Met-positiven Zellen.

4.8.2 Einfluss der pharmakologischen Met-Inhibition und der shRNA vermittelten Met-Reduktion auf die Expression der Met-Signaturgene

Zur Analyse eines möglichen Einflusses des Met-Signalweges auf die Gene der Met-Signatur wurden PHA-665752-behandelte Zellen und Zellen, die eine shRNA gegen Met exprimieren, mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen.

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsanalyse von shMet und shscr Zellen (siehe Abbildung 37 B), so lässt sich eine Veränderung der Expressionsdaten nach Met-*knockdown* nur für das *Rbp7* Gen feststellen. Die Expression von *Rbp7* zeigte in 8 von 9 Proben eine Reduktion. 3 Proben wiesen eine ca. 2-fach reduzierte Transkriptmenge, 3 weitere Proben eine 5-fach reduzierte Transkriptmenge und noch einmal 3 Proben eine weniger als 2-fach reduzierte Menge an *Rbp7* mRNA auf. Die Daten der anderen Met-Signaturgene zeigten keinerlei Reaktion auf die Met-Reduktion.

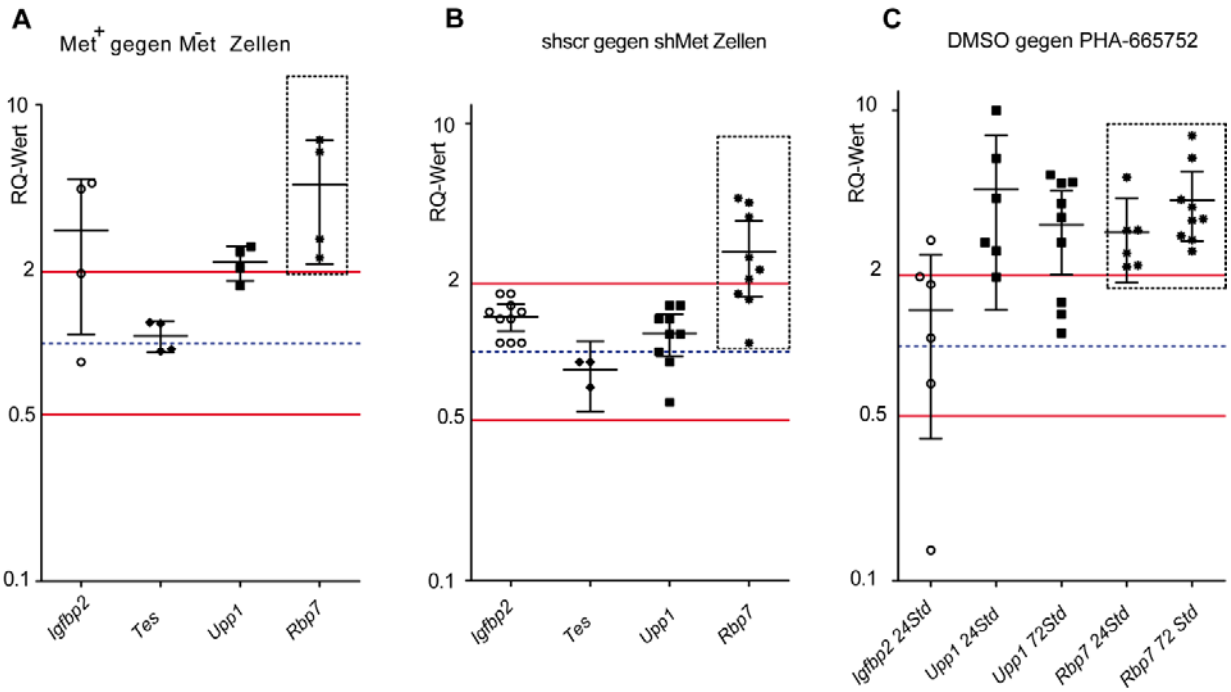


Abbildung 37: Vergleichende Expressionanalyse der Met-Signaturgene in Met$^+$/Met$^-$, PHA-665752/DMSO-Kontroll- und shMet/shscr Proben.

Darstellung der RQ-Werte der Kontrollzellen mit einem intakten Met-Signalweg, aufgetragen gegen die Proben mit reduzierter Met-Aktivität. Jeder Punkt stellt den RQ-Wert einer unabhängigen Probe dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige Probe mit reduziertem Met-Signalweg (Met$^-$, shMet oder PHA-665752-behandelt), deren RQ-Werte somit 1 betragen. Die RQ-Werte der Proben mit reduzierter Met-Aktivität sind als blaue gestrichelte Linie dargestellt. Die roten Linien bei RQ 2 und 0,5 dienen als Hilfslinien und markieren die Grenzen einer 2-fachen Reduktion bzw. Anreicherung der Transkripte gegenüber 1. Liegen die RQ-Werte über bzw. unter der roten Linie bedeutet diese eine zumindest zweifache Anreicherung bzw. Reduktion der Transkriptmenge eines Gens in der Kontrollpopulation mit aktivem Met-Signalweg gegenüber der jeweiligen Population mit reduzierter Met-Aktivität. RQ-Werte, die zwischen den beiden roten Linien liegen, unterscheiden sich in ihrer Expression nicht von 1, zeigen also keine differentielle Regulation zwischen den manipulierten und den Kontrollzellen. Die Mittelwerte der einzelnen Proben sind als Querbalken mit Standard-Fehler (SD) verzeichnet. Als *housekeeping*-Gen wurde *Gapdh* verwendet. (A) Bei den Proben handelt es sich um Met$^+$ und Met$^-$ sortierte G-2C9 Zellen (B) Bei den Proben handelt es sich um shMet exprimierende G-2C9 Zellen. Die Kontrollzellen exprimieren eine *non-silencing* shRNA (shscr). (C) Bei den Proben handelt es sich um 24 bzw. 72 Std. mit PHA-665752 behandelte G-2C9 Zellen. Die Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO kultiviert.

Unterstützend für die Abhängigkeit der *Rbp7*-Expression von einem intakten Met-Signalweg wirken die aus den Inhibitorstudien ermittelten Expressionswerte (siehe Abbildung 37 C). Hier war die Expression von *Rbp7* sowohl nach 24, als auch nach 72 Stunden zwischen 2- und 7-fach reduziert. *Igfbp2* hingegen zeigte nach 24 Stunden keine Reaktion und wurde aus diesem Grund nicht weiter analysiert. Auf die Analyse der *Tes*-Expression wurde verzichtet, da weder nach

Sortierung noch nach shRNA-Behandlung eine Regulation des *Tes*-Gens zu verzeichnen war. Die Expressionswerte des *Upp1*-Gens zeigten in den 24-Stunden-Werten eine 2- bis 10-fache Reduktion des *Upp*1-Transkripts. Die 72-Stunden-Werte wiesen in 6 von 9 Werten eine bis zu 4-fache Reduktion auf, jedoch zeigten 3 der analysierten Proben keine Veränderung ihrer *Upp1* Expression. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass aus den Genen der Met-Signatur nur das *Rbp7* Gen in direkter Abhängigkeit der Met-Expression und in Abhängigkeit eines funktionellen Met-Signalweges steht.

4.8.3 Regulation des Rbp7 Proteins in Abhängigkeit der Met-Aktivität

Für den vollständigen Nachweis der Abhängigkeit der Rbp7 Expression von einem intakten Met-Signalweg wurden Proteinlysate von Met-inhibierten und Met-*knockdown*-Zellen mit Lysaten ihrer jeweiligen Kontrollzellen über Western-Blot-Analyse auf ihre Rbp7-Proteinexpression verglichen.

Die Analyse der Proteinexpression zeigte eine deutliche Reduktion des Rbp7-Proteins bei einer reduzierten Met-Aktivität. Gleichzeitig stieg die Gesamtproteinmenge des Met-Rezeptors in Triplikaten von 72 Stunden mit PHA-665752-behandelten G-2C9 Zellen im Vergleich zu drei Kontrollzell-Lysaten jedoch an (siehe Abbildung 38 A). Die quantitative Auswertung anhand der Hsc70 Proteinexpression ließ eine Reduktion der Rbp7 Proteinmenge um 70% bis 90% nach Inhibitor-Behandlung erkennen. Der quantitative Vergleich der Rbp7 Proteinexpression nach stabilem Met-*knockdown* zeigte ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 38 B). Zwar war die Reduktion des Rbp7-Proteins nicht so eindeutig wie in den Inhibitorstudien, dennoch war eine schwache Reduktion des Proteins zu erkennen. Somit konnte nun gezeigt werden, dass die Reduktion des Met-Rezeptors, aber auch die Unterbrechung des Met-Signalweges, zu einer Reduktion der *Rbp7* mRNA und des Rbp7 Proteins führt. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass Rbp7 ein neues *Downstream-Target* des Met-Signalnetzwerkes darstellt.

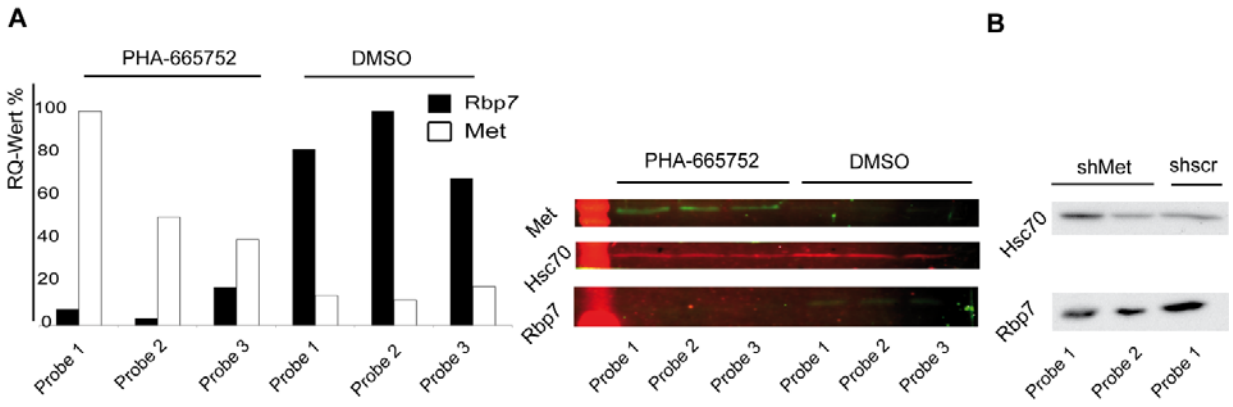


Abbildung 38: Vergleichende Analyse der Rbp7-Proteinexpression nach Met-Inhibition bzw. shRNA-vermitteltem Met-*knockdown*.

Zur Analyse der Met abhängigen Rbp7-Expression wurden die Mengen an Rbp7 und Met nach Met-Inhibition bzw. shRNA-vermitteltem Met-*knockdown* über Western-Blot mit den jeweiligen Kontrollzellen verglichen. (A) Quantitative Western-Blot-Analyse der Rbp7 bzw. Met-Expression von PHA-665752-behandelten Zellen links und DMSO-behandelten Kontrollzellen rechts (n=3). Die Detektion und Auswertung der Blots erfolgte mit dem *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma LI-COR Bioscience über Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper. Als *housekeeping*-Protein wurde Hsc70 eingesetzt. Die Normierung der Proben erfolgte auf den Wert mit dem stärksten Met-Signal, welches gleich 100% gesetzt wurde. (B) Vergleichende Western-Blot-Analyse der Rbp7-Expression von shMet Zellen links (n=2) und shscr-Kontrollzellen rechts (n=1). Die Detektion der spezifischen Primärantikörper erfolgte mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Als Ladungskontrolle wurde Hsc70 eingesetzt. Verwendeter Met-Antikörper: Met # GTX10681.

4.9 Met- und Retinsäure-Signalwege: additive, kooperative oder autarke Signalwege in G-2C9 Zellen?

Die Expression des Retinolbindeproteins Rbp7 in Abhängigkeit der Met-Expression und insbesondere in Abhängigkeit von einem funktionellen Met-Signalweg lassen vermuten, dass eine Wechselwirkung zwischen Retinsäure-abhängigen Signalen und Met stattfinden könnte. Retinsäure wird in die Zellen in Form von Retinol, gebunden an das Retinolbindeprotein RBP4, über dessen Rezeptor STRA6 aufgenommen (Wolf, 2007). In der Zelle selbst entscheidet die Bindung verschiedener Retinol- und Retinsäure-Bindeproteine über die Substratzugänglichkeit der Retinsäurederivate zu verschiedenen, Retinoide-prozessierenden Enzymen und damit über das Gleichgewicht zwischen Retinsäure in ihrer aktiven Form und ihren inaktiven Derivaten (Napoli et al., 1991; Noy, 2000).

Retinol ist die direkte Vorstufe im Prozess der Retinsäure-Synthese. Retinsäure selbst ist der aktive Metabolit im Retinsäure-Signalweg und kann durch Transport in den Kern und dortiger

Bindung an RAR- und RXR-Rezeptoren die Transkription bestimmter Zielgene veranlassen. Retinsäure selbst kann jedoch auch ohne nukleären Transport im Zytoplasma zu Retinylester, der Speicherform der zellulären Retinoide, weiter prozessiert werden. Retinol liegt aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften in der Regel gebunden an eines der zellulären Retinolbindeproteine vor (Noy, 2000; Sporn et al., 1994). Unter physiologischen Bedingungen dienen die zellulären Retinol-Bindeproteine (CRBPs) dem Schutz der Membran vor der Einlagerung freien Retinols. Des Weiteren wird vermutet, dass den CRBPs eine Rolle bei der Zulieferung von Retinol zu bestimmten Retinol zu Retinsäure oxidierenden oder die Umwandlung zu Retinylester katalysierenden Enzymen spielt (Napoli, 1997; Nau et al., 1999; Newcomer et al., 1998; Sporn et al., 1994). Zurzeit sind bei der Maus drei CRBPs bekannt, zu denen Crbp-I (Rbp1), Crbp-II (Rbp2) und Crbp-III (Rbp7) gehören (Vogel et al., 2001). Rbp7 unterscheidet sich in zumindest zwei Eigenschaften von Crbp-I und Crbp-II: so ist seine Expression im Gegensatz zu der von Crbp-I und -II auf Fettgewebe, Herz- und Muskelzellen sowie Mammagewebe beschränkt. Darüber hinaus ist Rbp7 nur in der Lage, Retinol und nicht wie die anderen Crbps zusätzlich Retinaldehyd zu binden. Aus den Versuchen an $Rbp7^{-/-}$ Mäusen geht hervor, dass an Rbp7 gebundenes Retinol ein exzellentes Substrat für das Enzym Lecithin-Retinol-Acetyltransferase ist, welches die Bildung von Retinylester katalysiert (Piantedosi et al., 2005). Ähnlich wie Retinol wird auch Retinsäure selbst in der Zelle an eines von zwei zellulären Retinsäure-Bindeproteinen CRABPs gebunden (Napoli, 1997; Noy, 2000). Crabp-I und II binden Retinsäure mit hoher Affinität. Es konnte gezeigt werden das Crabp-II, aber nicht Crabp-I die transkriptionelle Aktivität von RAR verstärkt (Noy, 2000). In Abwesenheit von Retinsäure befindet sich Crabp-II im Zytoplasma, nach Bindung von Retinsäure wandert es in den Kern und vermittelt dort die Bindung von RA und seinen Rezeptoren RAR, was zu einer Intensivierung des Retinsäure-Signals führt. Das Gen *Cyp26a1* hingegen kodiert für das Cytochrom P450 26A1, ein Enzym, das zur metabolischen Inaktivierung von Retinsäure führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieses Enzyms das verankerungsunabhängige Wachstum unterstützt und positiv auf das Überleben von Tumorzellen wirkt (Osanai et al., 2009).

Um Informationen über die Expression von *Cyp26a1* sowie der Retinol- und Retinsäurebindeproteine in G-2C9 Zellen und deren mögliche Beeinflussung über den Met-Signalweg zu erlangen, wurde die Expression einiger relevanter Gene zwischen Met^{+} und Met^{-}-Zellen verglichen sowie die Effekte der Met-Inhibition über qRT-PCR analysiert. Des Weiteren wurde der transkriptionelle und biologische Effekt einer Behandlung der Zellen mit 9-cis-Retinsäure (RA) oder einer Kombination von RA und PHA-665752 untersucht.

4.9.1 Vergleichende Expressionsanalyse von RA-Signalweg assoziierten Genen

Wie in Abschnitt 4.8.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass das Retinolbindeprotein *Rbp7* in der Met$^+$ Subpopulation eindeutig stärker exprimiert wird als in der Met$^-$ Subpopulation. Weiterführende vergleichende Expressionsanalysen der Gene *Rbp1* (*Crbp-I*), *Crabp1*, *Crabp2* und *Cyp26a1* zeigten, dass *Crabp2* und *Rbp1* ebenfalls stärker in Met$^+$ Zellen exprimiert werden als im Met$^-$ Kompartiment (siehe Abbildung 39 A). *Cyp26a1* konnte in nur 3 der 4 unabhängigen Versuche nachgewiesen werden, war jedoch in jeder dieser Proben gegenläufig reguliert, während *Crabp1* in keiner der beiden Populationen nachweisbar war.

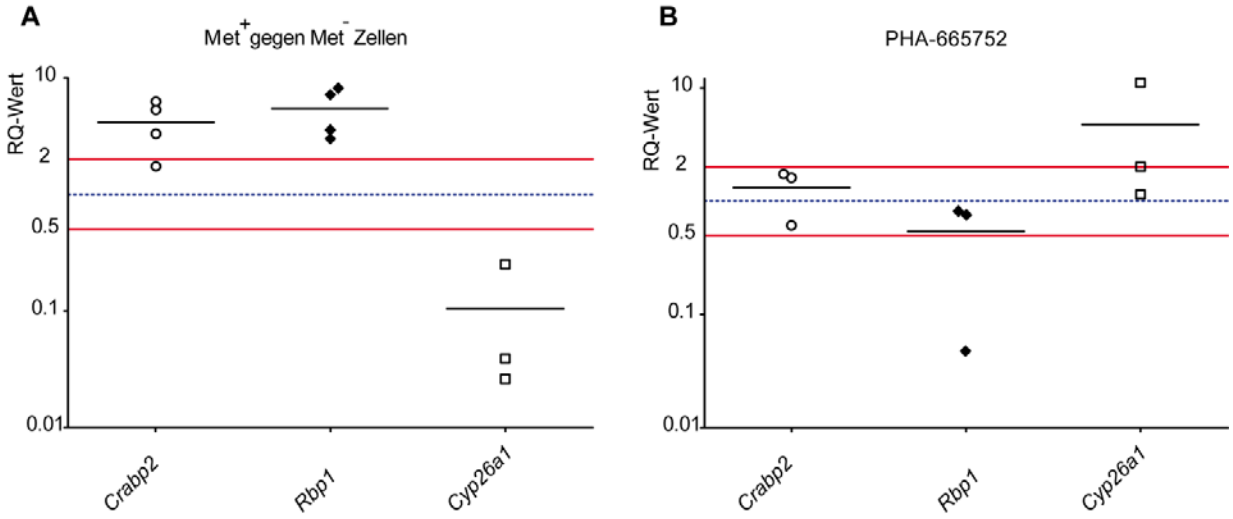


Abbildung 39: Vergleichende Expressionsanalyse der Retinoid-Bindeproteine und Cyp26a1 nach Met-Inhibition bzw. zwischen sortierten Met$^+$ und Met$^-$ Zellen.

(A) Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der sortierten Met$^+$-Proben für das jeweilige Gen. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige Met$^-$ Probe, deren RQ-Werte somit 1 betragen. Darstellung der Daten gemäß Abbildung 19. (B) Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der 72 Stunden mit PHA-665752 behandelten Proben für das jeweilige Gen. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige DMSO-Kontrollproben, deren RQ-Werte somit 1 betragen. Darstellung der Daten gemäß Abbildung 19.

Durch die in Abschnitt 4.8.2 und 4.8.3 dargestellten, durch shRNA und Inhibitor-Studien ermittelten Daten, konnte die Abhängigkeit der *Rbp7*-Expression von einem intakten Met-Signalweg bestätigt werden. Daraus ergab sich die Frage, ob die Inhibition des Met-Signalweges ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der anderen, entscheidenden Gene hat, deren Proteine für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Retinsäure in seiner aktiven Form und inaktiven Retinoiden verantwortlich sind.

Dazu wurden G-2C9 Zellen nach dem üblichen Protokoll für 72 Stunden in Gegenwart von PHA-665752 oder einer äquivalenten Menge an DMSO kultiviert und über RNA-Isolation und cDNA-Synthese der qRT-PCR Analyse zugeführt.
Vergleichende Expressionsanalysen von drei unabhängigen, biologischen Replikaten zeigen keine Veränderung der Transkriptmenge von *Rbp1* und *Crabp2* nach Met-Inhibition. Die Expressionswerte von *Cyp26a1* schwanken zwischen den einzelnen Replikaten sehr stark zwischen 1,5- und 11-fach; somit kann nicht von einer eindeutigen Tendenz einer Met-abhängigen Regulation ausgegangen werden (siehe Abbildung 39 B).
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass von den exprimierten Retinoid-Bindeproteinen nur Rbp7 in Abhängigkeit des Met-Signalweges reguliert wird. Die Reduktion von Rbp7 nach Met-Inhibition bei gleichbleibender Expression von *Rbp1* und *Crabp2* führt demnach zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den beiden Retinol-Bindeproteinen *Rbp7* und *Rbp1* und einer allgemeinen Reduktion der Retinol-Bindeproteine gegenüber dem Retinsäure-Bindeprotein *Crabp2*. Bedenkt man nun einen möglichen Unterschied in der Enzymspezifität der beiden Retinolbindeproteine, so könnte ein Ungleichgewicht dieser Proteine zu einem veränderten Retinsäuremetabolismus in den Zellen und somit zu einer reduzierten bzw. gesteigerten Umsetzung von Retinol in dessen aktive Form Retinsäure führen.

4.9.2 Vergleichende Analyse der biologischen Effekte von PHA-665752, RA oder kombinierter Applikation in G-2C9 Zellen

Die bisherigen Analysen konnten einen eindeutigen Einfluss des Met-Signalweges auf das Gleichgewicht der G-2C9 Subpopulationen sowie auf die Expression der für ein intaktes Retinsäure-Signal wichtigen Retinoid-Bindeproteine aufzeigen. Im Umkehrschluss ergibt sich daraus die Frage, ob die Behandlung der Zellen mit RA ebenso einen Einfluss auf den Met-Signalweg bzw. das Gleichgewicht der G-2C9 Subpopulationen haben könnte. Die kombinierte Behandlung mit PHA-665752 und RA sollte Aufschluss darüber liefern, ob diese Kombination zu einer Verstärkung oder Aufhebung der nach RA bzw. PHA-665752 Behandlung auftretenden Effekte führt. G-2C9 Zellen wurden für 72 Stunden mit 100 nM RA, 1µM PHA-665752, einer Kombination aus beiden oder einer entsprechenden Menge DMSO in DMEM/10% FCS kultiviert und im Anschluss daran durchflusszytometrisch auf den Anteil ihrer Met- und Thy1-positiven Populationen analysiert. Zusätzlich wurden vergleichende Expressionsanalysen nach RA oder kombinierter Behandlung über qRT-PCR durchgeführt und die Expression mesenchymaler und

epithelialer Marker bzw. Retinsäure-Bindeproteine gemessen. Wie bereits in Abschnitt 4.7.3 beschrieben, führt die Inhibition des Met-Signalweges binnen drei Tagen zur Anreicherung der Thy1-positiven Population bei gleichzeitiger Reduktion des Met^+ Anteils an der Gesamtkultur. Vergleicht man die Populationsverteilung in den RA oder mit einer Mischung aus RA und PHA-665752-behandelten Zellen, so zeigt die alleinige Behandlung mit RA den gleichen Anstieg der Thy1-positiven Population auf ca. 30%, bzw. die Reduktion der Met-positiven Zellen auf ca. 60% der Gesamtkultur (siehe Abbildung 40 A). Die kombinierte Behandlung führt bemerkenswerterweise zu einer Verstärkung dieses Effektes. Die Population der eher mesenchymalen Thy1-positiven Zellen steigt auf ca. 50% der Gesamtkultur an. Betrachtet man die in Abbildung 40 B dargestellten Zellen nach den verschiedenen Behandlungen, so kann man deutlich morphologische Veränderungen der einzelnen Gruppen beobachten. So sind die Zellen der DMSO-behandelten Kultur nach 3 Tagen am dichtesten, was für eine reduzierte Proliferation aller behandelten Zellen spricht. Die mit RA-behandelten Zellen zeigen eine einheitlich spindelförmig veränderte Morphologie, während die PHA-665752-behandelten Zellen zum größten Teil ein rundliches, flaches Erscheinungsbild haben. Diese rundliche Morphologie wird durch einige eher spindelförmige Zellen unterbrochen. Ein ähnliches Erscheinungsbild zeigen die mit einer Kombination der beiden Wirkstoffe behandelten Zellen.

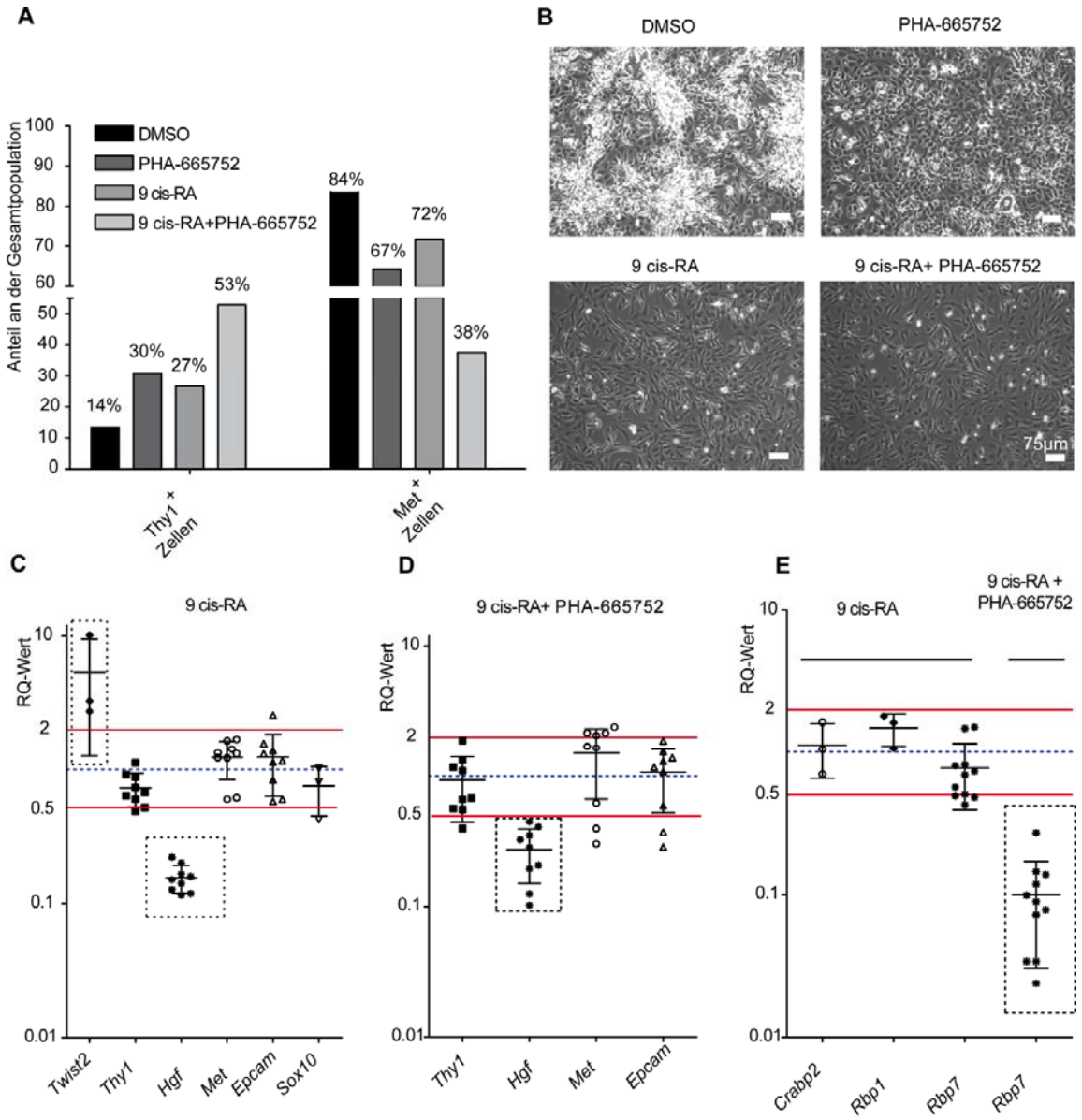


Abbildung 40: Einfluss von RA bzw. RA und PHA-665752 auf den Differenzierungszustand der G-2C9 Zellen.

(A) Vergleichende FACS-Analyse der Met und Thy1-Expression in entweder RA- oder PHA-665752- bzw. RA + PHA-665752-behandelten Zellen sowie DMSO-behandelten Kontrollzellen. Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Met- bzw. Thy1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation. (B) Vergleichende morphologische Analyse der G-2C9 Zellen 72 Stunden nach Zugabe von PHA-665752, RA, RA und PHA-665752 bzw. DMSO. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop erstellt, der Größenstandard beträgt 75 µm. (C-E) Dargestellt sind die RQ-Werte der biologischen Replikate der 72 Stunden mit 9-cis-Retinsäure (RA) oder RA- und PHA-665752-behandelten Proben für das jeweilige Gen. Jeder Punkt stellt den RQ-Wert einer unabhängigen Probe dar. Die Normierung der Proben erfolgte auf die jeweils zugehörige DMSO-Kontrollproben, deren RQ-Werte somit 1 betragen. Darstellung der Daten gemäß Abbildung 19. (C) Analyse der Differenzierungsmarker nach RA Zugabe, (D) Analyse der Differenzierungsmarker nach kombinierter RA und PHA-665752 Zugabe, (E) Analyse der Retinoidbindeproteine nach RA- und kombinierter RA- und PHA-665752-Zugabe.

Trotz des starken Anstieges der Thy1$^+$ Subpopulation in den RA und kombiniert behandelten Zellen wurde, im Gegensatz zu den PHA-665752-behandelten Zellen, keine transkriptionelle Veränderung von *Thy1* festgestellt (siehe Abbildung 40 C-D). Als weitere Marker des mesenchymalen Kompartiments wurden der Met-Ligand *Hgf* und der Transkriptionsfaktor *Twist2* untersucht. Die Analyse der *Hgf*-Expression lieferte weitere Unterschiede im Expressionsmuster zwischen nur PHA-665752-, nur RA- oder kombiniert-behandelten Zellen. Wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben, wirkt sich die Inhibition des Met-Signalweges auf die Expression des Met-Liganden *Hgf* positiv aus. Trotz des Anstieges an Thy1$^+$ Zellen, die das mesenchymale, Hgf-exprimierende Kompartiment der G-2C9 Zellkultur verkörpern, war eine Reduktion der *Hgf*-Transkriptmenge nach RA und Doppel-Behandlung um das ca. 10-fache der ursprünglichen Transkriptmenge zu verzeichnen (siehe Abbildung 40 C-D). Im Gegensatz dazu, aber in Übereinstimmung mit einer Zunahme der Thy1$^+$, mesenchymalen Subpopulation und der spindelförmigen Morphologie der Zellen war die Expression von *Twist2*, genau wie nach Inhibitor-Behandlung, um das 3- bis 10-fache erhöht. Die Expression der *Met* sowie *Epcam* und *Sox10* mRNA als Gruppe der epithelialen Marker blieb, wie nach PHA-665752-Behandlung, ebenfalls konstant. In Übereinstimmung mit der Expression nach Met-Inhibition kam es nach RA-Behandlung zu keiner Veränderung in der Expression von *Rbp1*, *Crabp2* und *Cyp26a1* (siehe Abbildung 40 E). Allerdings zeigte sich im Gegensatz zur Met-Inhibition die Expression von *Rbp7* durch alleinige RA-Behandlung nicht beeinflussbar. Die Doppel-Behandlung mit RA und PHA-665752 führte dagegen ebenfalls zu einer Reduktion der *Rbp7*-Expression, aber diesmal um den Faktor 10 bis 50, während die alleinige Behandlung mit PHA-665752 lediglich zu einer Reduktion von *Rbp7* um den Faktor < 7 führte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass (i) die Behandlung der G-2C9 Zellen mit RA zu einer zumindest morphologischen Differenzierung der Zellen zu einem eher mesenchymalen Phänotyp und zu einem gleichzeitigen Anstieg des Thy1$^+$ Kompartiments führt. Diese Veränderung der Zellen hat (ii) keinen Effekt auf die Expression der Retinoid-Bindeproteine, inklusive *Rbp7* sowie zusätzlich *Cyp26a1*. Allerdings führt sowohl die alleinige Zufuhr als auch die Kombination von RA und PHA-665752 zu einer Reduktion der *Hgf*-Expression und damit zu einer direkten Beeinflussung des Met-Signalweges durch den RA-Signalweg.

4.9.3 Vergleichende Analyse der biologischen Effekte von PHA-665752, RA oder kombinierter Applikation nach Langzeit Exposition

Die in Abschnitt 4.9.2 beschriebene Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen den Subpopulationen der G-2C9 Kultur durch die Behandlung mit entweder RA oder PHA-665752 oder einer Kombination beider Wirkstoffe wirft die Frage nach der Langzeitwirkung einer kontinuierlichen Behandlung der Zellen auf. In Abschnitt 4.9.2 konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der G-2C9 Zellen mit den oben genannten Wirkstoff-Kombinationen bereits nach 72 Stunden zu einem Anstieg der mesenchymalen Thy1$^+$ Subpopulation bei gleichzeitiger Reduktion der epithelialen Met$^+$ Subpopulation führte. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche sollten klären, ob eine dauerhafte Kultivierung der G-2C9 Zellen in Anwesenheit der genannten Wirkstoffkombinationen generell möglich ist oder dies zu einer irreversiblen Differenzierung der Zellen, zu nicht mehr proliferierenden Mesenchymzellen führt.

Die G-2C9 Zellen waren in der Lage, unter jeder der eingesetzten Wirkstoffe bzw. deren Kombination zu proliferieren, und erlaubten eine dauerhafte, mehrwöchige Kultivierung inklusive regelmäßiger Passage der Zellen. Alle behandelten Zellen zeigten eine leichte Reduktion der Proliferationsrate gegenüber der DMSO-Kontrolle. Interessanterweise scheint die Reduktion der Proliferationsrate durch Inkubation mit PHA-665752 durch eine zusätzliche Zugabe von RA reduziert zu werden (vergl. Dichte des Zellrasens nach 7 Tagen in Abbildung 41 A). Die in den vorangegangenen Experimenten nach 72 Stunden erkennbare Abrundung der Zellen nach Met-Inhibition wich mit zunehmender Passagenzahl einem eher mesenchymalen Phänotyp. Ein ähnliches Erscheinungsbild lieferten Zellen, die sowohl unter PHA-665752 als auch RA kultiviert wurden. Zellen, die nur unter Zugabe von RA kultiviert wurden, zeigten ebenfalls einen eher mesenchymalen Phänotyp, doch wiesen die Zellen eine noch schmalere Form und ein anscheinend zielgerichtetes Wachstum oder zumindest eine gezielte Ausrichtung der Zellen auf, die zur Bildung zusammenhängender Zellstränge zwischen einzelnen Zellkolonien führte (vergl. Abbildung 41 A).

Die vergleichende FACS-Analyse der Zellen nach 14-tägiger Kultivierung bestätigte und verstärkte die nach 72 Stunden ermittelten Ergebnisse aus Abschnitt 4.9.2. So stieg die Thy1$^+$ Population nach 14-tägiger Met-Inhibition von 15% auf 91% der Gesamtkultur an, während sich die Expression von Epcam von 14% auf 8% reduzierte. Einen noch stärkeren Effekt kann man nach kombinierter RA- und PHA-665752-Zugabe beobachten. Hier stieg die Thy1$^+$ Population auf 96% der Gesamtkultur an, während die Expression von Epcam auf unter 1% fiel. RA allein

wies ebenso einen Effekt auf Thy1 und Epcam auf, wobei die Anzahl der Thy1^{+} Zellen von 15% auf 21% stieg und die Epcam-Expression auf 8% der Gesamtpopulation reduziert wurde (siehe Abbildung 41 B).

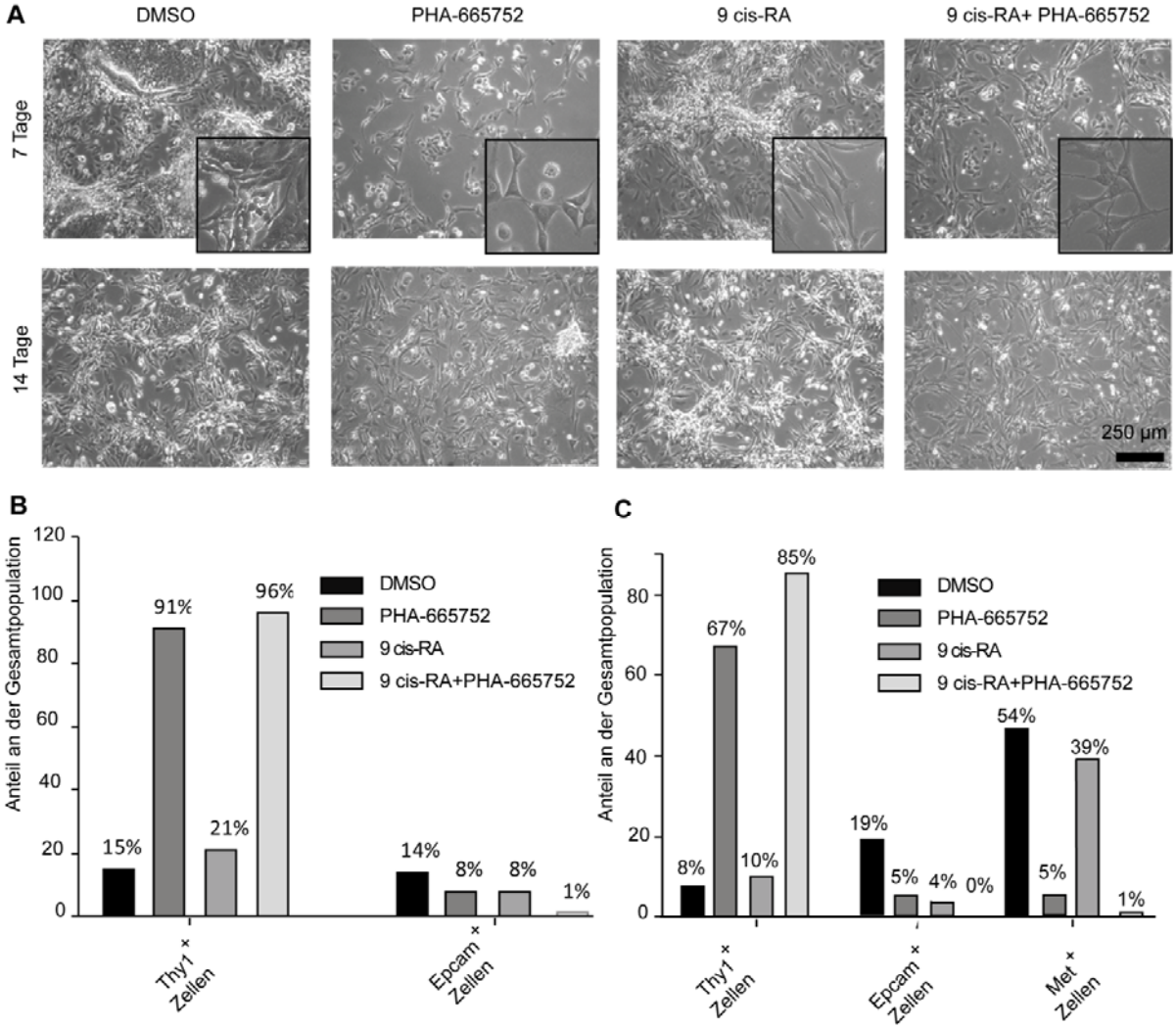


Abbildung 41: Einfluss von RA bzw. RA und PHA-665752 auf den Differenzierungszustand der G-2C9 Zellen nach Langzeitexposition.

(A) Vergleichende morphologische Analyse der G-2C9 Zellen 7 bzw. 14 Tagen nach kontinuierlicher Zugabe von PHA-665752, RA, RA und PHA-665752 bzw. DMSO. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop erstellt, der Größenstandard beträgt 250 µm. (B-C) Vergleichende FACS-Analyse der Thy1-, Epcam- und Met-Expression in entweder RA- oder PHA-665752- bzw. RA + PHA-665752-behandelten Zellen sowie DMSO-behandelten Kontrollzellen. Die Zellen wurden entweder nach 14 Tagen kontinuierlicher Wirkstoffzugabe oder nach anschließender Kultivierung für 7 Tage ohne Zusätze analysiert. Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Epcam-, Met- bzw. Thy1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation.

Ob es sich bei dieser veränderten Zusammensetzung der Zellkultur um eine reversible oder terminale mesenchymale Differenzierung handelt, sollte durch eine weiterführende Kultivierung der behandelten Zellen in DMEM/10% FCS, ohne Zugabe von Wirkstoffen ermittelt werden. Die FACS-Analyse der weiter kultivierten Zellen zeigte wie zuvor, eine eindeutige Vergrößerung der $Thy1^+$ Population in PHA-665752 und in Kombination behandelten Zellen, wenn auch der Anteil der $Thy1^+$ Populationen von 91% auf 67% bzw. 96% auf 85% schrumpfte. Die $Thy1^+$ Population der RA-behandelten Zellen war ähnlich zu der von Kontrollzellen. Die Expression von Epcam jedoch verringerte sich leicht in allen analysierten Proben weiter von 8% auf 5% bzw. 4% in PHA-665752 und RA Zellen, während eine Expression von Epcam in kombiniert behandelten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die ergänzende Analyse der Met-Expression dieser Zellen zeigte, dass nach der Behandlung mit PHA-665752 in Übereinstimmung mit der Epcam-Expression ebenfalls nur 5% der Zellen positiv für Met waren. Bei den RA-behandelten Zellen jedoch zeigten sich 39% aller Zellen positiv für Met, obwohl die Expression von Epcam bei nur 4% lag. Die kombiniert behandelten Zellen wiesen auch nach einer Woche Regeneration in DMEM/10% FCS nur 1% Met-positive Zellen auf, einhergehend mit einer fehlenden Epcam Expression. Die DMSO-behandelten Kontrollzellen zeigten ca. 54% Met-positive Zellen (siehe Abbildung 41 C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass (i) die Met-Inhibition, die Behandlung mit RA oder einer kombinierte Wirkstoffgabe zu einer eindeutigen Verschiebung des Gleichgewichts Richtung mesenchymaler Differenzierung führt, (ii) eine weitere Kultivierung und Passage der Zellen unter jedem der Wirkstoffe möglich ist und (iii) auch eine Woche nach Absetzen der Wirkstoffe eine weitere Reduktion des epithelialen Kompartiments zu verzeichnen ist bzw. das Gleichgewicht zwischen den Populationen weiterhin verschoben bleibt.

5. Diskussion

5.1 Met ist in *high-grade* WAP-T Mammakarzinomen überexprimiert und aktiv

Das Verständnis onkogener Signalwege, die zur Entstehung humaner Mammakarzinome führen, ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Einer der in den letzten 20 Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückten Signalwege ist das komplexe Netzwerk der Rezeptortyrosinkinase c-Met. So konnte eine hohe Met-Expression in zahlreichen humanen Tumoren, unter anderem in Mammakarzinomen, mit einer verstärkten Aggressivität und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (Ghoussoub et al., 1998; Graveel et al., 2009; Lengyel et al., 2005; Ponzo et al., 2009). Trotz der derzeit intensiven Forschungen ist die Rolle des Met-Signalweges in der Induktion und Progression dieser Tumoren bislang nur unzureichend verstanden.

Interessante Einblicke in die Rolle von Met bei der Entstehung von Mammakarzinomen konnten die MMTV/Met^{mt} bzw. Met^{mut} *knockin*-Mausmodelle liefern (Graveel et al., 2009; Ponzo et al., 2009). Die durch den MMTV-Promotor zielgerichtete Expression onkogener Met-Varianten im Gewebe des Mammaepithels führte zur Induktion von Tumoren verschiedener Phänotypen, inklusive basalen Mammakarzinomen. Weiterführende bioinformatische Analysen konnten darüber hinaus den Zusammenhang zwischen Met, humanen basalen Mammakarzinomen und einer negativen Prognose aufzeigen und eröffnen so die Hoffnung auf eine gezielte Therapie dieser Tumoren durch Eingriff in den Met-Signalweg.

Wie in Abschnitt 1.1 der Einleitung beschrieben, ähneln die Tumoren des WAP-T Mausmodells einer Gruppe basaler, menschlicher Mammakarzinome. Diese konnten anhand ihrer Morphologie und Differenzierungsstufe in die Klasse der *low*- und *high-grade* Tumoren unterteilt werden. Bioinformatische Analysen Array-basierter Expressions- und Amplifikationsprofile konnten die Amplifikation des Met-Lokus und dessen deutliche Überexpression in den wenig differenzierten Karzinomen der *high-grade* Tumoren feststellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Überexpression des *Met*-Gens in allen untersuchten WAP-T Tumoren im Vergleich zum unveränderten Mammagewebe bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.1.1). Ebenso ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von *Met* zwischen der Gruppe der *high-grade* und *low-grade* Tumoren feststellen. Die deutlich stärkere Expression des Met-Gens in *high-grade* Tumoren führte nicht nur zu einer deutlich stärkeren Met-

Proteinexpression in diesen Tumoren, sondern ebenfalls zu einer eindeutig erhöhten Rezeptoraktivität (siehe Abschnitt 4.1.3).

Diese Ergebnisse verbinden direkt die Amplifikation des *Met*-Lokus mit einer entsprechenden Amplifikation der Met-Aktivität und einem damit zusammenhängenden Differenzierungsstatus der Tumoren. Demzufolge eignen sich die *high-grade* Tumoren des WAP-T Mausmodells als ideales Werkzeug zur Untersuchung der Funktion von Met an der Entstehung basaler Mammakarzinome. Ein entscheidender Vorteil des WAP-T Modells z.B. gegenüber den MMTV/Met^{mt} bzw. Met^{mut} *knockin*-Mausmodellen liegt in der Expression von Wildtyp Met unter der Kontrolle des endogenen *Met*-Promotors (siehe Abschnitt 1.1). In der überwiegenden Mehrheit humaner Mammakarzinome liegt das Met-Protein nicht mutiert vor, weshalb die Tumoren des WAP-T Modells die Situation humaner, basaler Mammakarzinome mit Met-Überexpression noch genauer wiederspiegeln können als andere bereits etablierte Modelle.

5.2 G-2C9 Zellen liefern ein Modell zur Analyse des Met-Signalwegs in basalen Mammakarzinomzellen

Um die Rolle des Met-Rezeptors in der Aufrechterhaltung von basalen Mammakarzinomen analysieren zu können, bedarf es eines Zellkulturmodells das in hohem Maße die *in vivo* Situation widerspiegelt, aber zusätzlich jegliche Möglichkeit der molekularbiologischen und biochemischen Manipulation bietet.

Das Zellkultursystem der G-2 Zellen und dessen klonaler Tochterzelllinie G-2C9 (siehe Abschnitt 4.3.1) bietet durch seine Zusammensetzung aus Subpopulationen verschiedener Differenzierungsstadien die einzigartige Möglichkeit durch gezielte Manipulation den direkten Einfluss auf den Differenzierungszustand und das Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen zu untersuchen.

Die detaillierte Analyse der Met-Expression und der Aktivität des Met-Rezeptors in G-2C9 Zellen bestätigte die Annahme, dass es sich bei diesem Modell um ein geeignetes Werkzeug zur Analyse des Met-Signalweges bezogen auf Phänotyp und Tumorigenität von Mammakarzinomzellen handelt. Es war möglich zu zeigen, dass der Met-Rezeptor in den Zellen des G-2C9 Zellkultursystems heterogen exprimiert wird (siehe Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2). Ebenso konnte die *in vitro* Aktivität des Rezeptors durch eine konstante Phosphorylierung der MSD festgestellt werden, (siehe Abschnitt 4.2) welche auch durch die zusätzliche Zugabe von rekombinantem Hgf nicht weiter gesteigert werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1). Die

Nukleotid-Sequenz-Analyse verschiedener, für die Aktivität des Rezeptors entscheidender Domänen, führte zu dem Ergebnis, dass der beobachteten Rezeptor-Aktivität keine aktivierenden Mutationen zugrunde liegen (siehe Abschnitt 4.2.2).

5.3 Met spielt eine Rolle in der Differenzierung von G-2C9 Mammakarzinomzellen

Das metastabile Gleichgewicht zwischen den Subpopulationen des G-2C9 Tumorzellsystems wird durch die epigenetische Plastizität der Zellen und der damit verbundenen Fähigkeit von epithelialer zu mesenchymaler und mesenchymaler zu epithelialer Transition aufrecht gehalten. Met als einer der entscheidenden Induktoren von EMT- und MET-Prozessen in der Embryonalentwicklung sowie in Wundheilung und Metastasierung von Tumoren und nicht zuletzt in der Verzweigung des Mammaepithels, könnte einer der für das Gleichgewicht der G-2C9 Kultur notwendigen und ausschlaggebenden Faktoren sein. Weiterführende Analysen der Met-Expression in den G-2C9 Zellen konnten eine Met-negative und eine Met-positive Subpopulationen identifizieren (siehe Abschnitt 4.3.1). Vergleichende Expressionsanalysen mesenchymaler und epithelialer Marker sowie IF- und FACS-Analysen konnten die Met-Expression eindeutig der quasi-epithelial differenzierten Subpopulation zuordnen und die Expression des Markers Thy1 auf die quasi-mesenchymal differenzierte Subpopulation beschränken (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese besondere Zusammensetzung der G-2 Zellkultur bietet die einmalige Möglichkeit, die Effekte des Met-Signalweges innerhalb einer Zelllinie vor einem einheitlichen genetischen Hintergrund zu untersuchen, bzw. das Gleichgewicht zwischen den Differenzierungszuständen in Abhängigkeit eines intakten Met-Signalweges zu studieren. Wie bereits schon für die Kultur der parentalen G-2 Zellen gezeigt wurde, sind die Subpopulationen in der Lage, nach getrennter Kultivierung die Zusammensetzung der Ausgangszellkultur zu regenerieren und so das Gleichgewicht wieder herzustellen (Wegwitz et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, das sich dieses Gleichgewicht auch im Subklon C9 der parentalen G-2 Zellen einstellt und zum anderen, dass die Zellen der Met^+ und Met^- Subpopulation ebenfalls die Fähigkeit zur Repopulation und damit zur Aufrechterhaltung des metastabilen Gleichgewichts besitzen (siehe Abschnitt 4.4.1). Dabei sind die Met^- Zellen jedoch schneller in der Lage, Met^+ Zellen zu generieren als umgekehrt, obwohl Met^- Zellen nach der Zell-Sortierung deutlich schlechter proliferieren als Met^+ Zellen (siehe Abschnitt 4.6.3). Diese Beobachtung stimmt mit den bereits publizierten Daten (Wegwitz et al.,

2010) insofern überein, als die Thy1$^+$ Population ebenfalls ein schnelleres Repopulationspotenzial besitzt und diese Zellen, wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt, eine Subpopulation der Met-negativen Teilpopulation ausmachen.

Vergleicht man die in Abschnitt 4.7.1 und 4.7.2 beschriebenen Ergebnisse nach Met-Inhibitor bzw. shRNA Behandlung so fällt auf, dass es zu einer verstärkten Expression mesenchymaler Marker-Gene kommt und damit zu einer tendenziellen Verschiebung der gesamten Population in Richtung mesenchymaler Differenzierung. Die FACS- und IF-Analysen des Abschnitts 4.7.3 bestätigen, dass es sich hier tatsächlich um eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen den Subpopulationen handelt und nicht bloß um eine Reaktion auf die Met-Inhibition auf Transkriptionsebene. So war bereits nach 3 Tagen eine Reduktion der Met$^+$ und eine Vergrößerung der Thy1$^+$ Population zu erkennen (siehe Abbildung 36). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten die Existenz eindeutig Met-negativer und stark Met-positiver Zellen nach 3 Tagen Met-Inhibition. Fasst man die Ergebnisse der FACS und IF-Analyse so wie die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen zusammen, so korreliert die Met-Inhibition mit einer Anreicherung des Met-Proteins in der Gesamtkultur. Insgesamt gibt es jedoch weniger Zellen in der Kultur die das Met-Protein exprimieren. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Inhibition der Kinasedomäne zunächst zu einer Stabilisierung des Rezeptors auf der Zelloberfläche bestimmter Zellen und gleichzeitig zur Anreicherung Met-negativer Zellen führt.

Die Verschiebung der Subpopulationen in Richtung mesenchymaler Differenzierung konnte durch die in Abschnitt 4.9.3 beschriebene Langzeit-Exposition der G-2C9 Zellen mit PHA-665752 eindeutig bestätigt werden. So war es möglich, durch eine zweiwöchige Zugabe des Inhibitors das Gleichgewicht der G-2C9 Subpopulationen fast vollständig zum mesenchymalen Differenzierungszustand zu verschieben. Die Re-Analyse dieser Zellen, 7 Tage nach der Behandlung und ohne weitere Zugabe des Inhibitors lassen Zweifel über deren Fähigkeit zur Repopulation aufkommen, da auch nach 7-tägiger Kultivierung weiterhin nur 5% der Zellen Met bzw. Epcam exprimieren und noch 67% aller Zellen Thy1 exprimierten. Vergleicht man diese Werte mit der in Abschnitt 4.4.1 ermittelten Repopulationsgeschwindigkeit, so waren die als Met-negativ sortierten Zellen bereits nach acht Tagen bis zu 80% Met-positiv. Dieser Vergleich lässt vermuten, dass das Gleichgewicht zwischen den Differenzierungszuständen unter Umständen nach Langzeit-Inhibitor-Behandlung dauerhaft gestört ist, bzw. eine deutlich längere Regenerationsphase benötigt. Ein weiterer wichtiger Punkt im Rahmen einer geplanten therapeutischen Anwendung eines geeigneten Met-Inhibitors ist, dass zumindest die G-2C9 Zellen trotz der entscheidenden Rolle von Met in der Proliferation, Motilität und ihrer Fähigkeit

zum verankerungsunabhängigen Wachstum (vergl. Abschnitt 4.6) nach Met-Inhibition überleben können. Allerdings liefert die deutlich reduzierte Koloniebildungsfähigkeit der Met-inhibierten Zellen *in vitro* ein Indiz dafür, dass auch deren Proliferation unabhängig vom Gewebeverband und somit deren *in vivo* Tumorigenität eingeschränkt sein könnte. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche kann nicht eindeutig geklärt werden, ob Met$^-$ Zellen durch den vorherrschenden Selektionsdruck des Met-Inhibitors einen Wachstumsvorteil bekommen, durch den sie sich anreichern können. Es ist jedoch mit Sicherheit zu sagen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Mammakarzinomzellen auf die Behandlung mit PHA-665752 mit dem Verlust einer epithelialen Differenzierung reagieren und somit durch die in den quasi-mesenchymalen Zellen fehlende Met-Expression der Angriffspunkt des Inhibitors verloren geht, wodurch die Zellen also resistent gegenüber der Inhibition von Met werden. Ob einhergehend mit dem Verlust der Met-Expression die *in vivo* Tumorigenität und Aggressivität der Tumoren ebenfalls verloren geht, bleibt zu klären. Eine *in vivo* Analyse der Met-Inhibition war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, da der verwendete Met-Inhibitor PHA-665752 eine sehr schlechte Biokompatibilität hat und eine Dauerbehandlung nicht möglich ist, da der Wirkstoff sich im Lungengewebe der Tiere anreichert (Accornero et al., 2008). Zumindest scheint die Fähigkeit zur Produktion epithelialer, Met-exprimierender Nachkommen deutlich reduziert zu sein, was zwar nicht zwingend die Proliferation und Migration beeinflusst, aber unter Umständen die Bildung von Metastasen durch die reduzierte mesenchymal-epitheliale Transition erschweren werden. Diese Transition stellt den abschließenden Schritt der Metastasierungskaskade dar und sorgt zum einen für das Festsetzen der Metastase und zum anderen für die Wiederherstellung des ursprünglichen Tumorphänotyps (Chaffer et al., 2007; Tsuji et al., 2009; van der Pluijm, 2010). Andererseits ist jedoch zu bedenken, dass die Inhibition des Met-Signals und damit die Inhibition eines der entscheidenden Signalgeber einer EMT, indess zu einer EMT führt. Ziel einer Therapie mit spezifischen Kinase-Inhibitoren ist neben der Reduktion des Tumorwachstums vor allem die Unterbindung der Metastasierung des primären Tumors. Betrachtet man nun aber die Veränderung der G-2C9 Zellen nach Inhibition, so wurden genau diejenigen Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp und einer hohen Motilität selektioniert, denen *in vivo* die Fähigkeit zur Disseminierung in umliegendes Gewebe zugesprochen wird. Geht man nun davon aus, dass primäre Tumoren aufgrund der epigenetischen Plastizität der Tumorzellen aus einem Gleichgewicht an Tumorzell-Subpopulationen unterschiedlicher Differenzierungszustände bestehen, so könnte auch hier die Behandlung der Tumoren mit dem Met-Inhibitor das Gleichgewicht zugunsten derjenigen Zellen verschieben, die bereits eine fortgeschrittene EMT

vollzogen haben. Somit würde die Behandlung der Tumoren unter Umständen erst die Invasivität der Tumoren und damit die Induktion von Metastasen ermöglichen, da die mesenchymale Transition den ersten Schritt in der Metastasierungskaskade von Karzinomen darstellt (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; van der Pluijm, 2010). Andererseits könnte die phänotypische Homogenisierung des Tumors die Möglichkeit eröffnen, genau diesen resultierenden Zelltyp durch gezielten Angriff auf nur eine Art von Zellen zu beschränken. Dies hätte den Vorteil, dass alle verbliebenen Tumorzellen mit einem einzigen Wirkstoff behandelbar wären. Die Tatsache, dass mit Met-Kinase-Inhibitoren bereits beträchtliche Erfolge in klinischen Studien verschiedenster Tumor-Wirkstoffkombinationen erzielt werden konnten, verdeutlicht das ungemeine Potenzial dieser Klasse von Wirkstoffen in der Bekämpfung zahlreicher Krebsarten. Aufgrund der erst in den letzten Jahren stattgefundenen Entwicklung potenzieller Wirkstoffe steht die Analyse von Langzeit-Effekten und Wirkstoffsicherheit jedoch weiterhin aus und erfordert größere, gut geplante klinische Studien (Liu et al., 2008).

5.4 Met und Hgf werden in verschiedenen Zellen der G-2C9 Kultur exprimiert

Im Zuge der embryonalen Organentwicklung wird die Ko-Expression von Met und Hgf mit wenigen Ausnahmen eingestellt und die Expression von Met auf Zellen epithelialer bzw. die Expression von Hgf auf Zellen mesenchymaler Herkunft begrenzt. Im adulten Organismus sind nur wenige Zellen bekannt, die eine Ko-Expression von Met und Hgf zeigen. Zu diesen Zellen gehören z.B. humane mesenchymale Stammzellen, in denen ein autokriner Met/Hgf-Signalweg nachgewiesen werden konnte (Neuss et al., 2004). Weit häufiger tritt die Ko-Expression des Met-Rezeptors und seines Liganden im Zuge einer malignen Transformation von Tumorzellen auf. Dabei kann es zur *de novo* Produktion von Hgf in epithelialen, bzw. von Met in mesenchymalen Tumoren und damit zur Bildung eines autokrinen Signalwegs innerhalb dieser Tumoren kommen. Beispiele dafür sind Osteosarkome (Ferracini et al., 1995), Rhabdomyosarkome (Ferracini et al., 1996), Glioblastome (Koochekpour et al., 1997) und Mammakarzinome (Tuck et al., 1996). Ebenso konnte in aus primären Tumoren gewonnenen Zelllinien, wie z.B. in NSCLC (*non-small cell lung carcinoma cell lines*) und kultivierten normalen humanen Bronchial-Zellen (Tsao et al., 1993), Glioblastom-Zelllinien (Koochekpour et al., 1997) sowie in murinen Mammakarzinomzellen der Linie SP1 (Rahimi et al., 1996) eine Ko-Expression von Met und Hgf festgestellt werden.

In der vorgelegten Arbeit war es möglich, die Expression von Hgf und Met ebenfalls innerhalb einer Zelllinie nachzuweisen. Darüber hinaus gelang es erstmals, deren Expression auf definierten, voneinander abgegrenzten Subpopulationen zu zeigen. Die Expression von Rezeptor und Ligand lässt zunächst die Annahme einer autokrinen Stimulation des Met-Signalweges vermuten. Es handelt sich hier jedoch vielmehr um die Ausbildung einer parakrinen Wechselwirkung von Met und Hgf in Zellen verschiedener Differenzierungsstadien (siehe Abschnitt 4.5). Die Expression von *Hgf* ist in der mesenchymalen Met^- als auch $Thy1^+$ Subpopulation gegenüber der epithelialen Subpopulation deutlich stärker. Der Nachweis des Hgf-Proteins war mit einigen experimentellen Schwierigkeiten verbunden, da es sich bei Hgf um ein sezerniertes Protein handelt, welches in der Lage ist, an die extrazelluläre Matrix jeder Zelle zu binden. Daher war die Zuordnung zu einer bestimmten, Hgf-produzierenden Zelle nicht eindeutig möglich. Diese Schwierigkeit konnte durch die Behandlung mit Trypsin behoben werden. Die Behandlung der Zellen führt durch unspezifischen Verdau der Extrazellulären Matrix ebenfalls zum enzymatischen Abbau von Heparansulfat (Kraemer, 1971; Kraemer and Tobey, 1972) und des daran gebundenen Hgf, wodurch nur noch intrazellulär vorliegendes Hgf detektiert werden konnte. Mit dieser Methodik lässt sich allerdings nicht zwischen neu synthetisiertem und internalisiertem Hgf unterscheiden (siehe Abbildung 23). Durch Analyse der FACS-sortierten $Thy1^+$ und $Thy1^-$ Population kann man jedoch davon ausgehen, dass es sich bei dem in den $Thy1^+$ Zellen vorliegendem Hgf um neu synthetisiertes Protein handelt, da die Expression von Thy1 die gleichzeitige Expression des Met-Rezeptors nahezu ausschließt und somit eine Internalisierung von Rezeptor und daran gebundenem Ligand nicht möglich ist. Eine zusammengefasste Betrachtung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.5.1 und 4.5.2 bestätigt die Annahme, dass Hgf primär in Zellen des quasi-mesenchymalen Differenzierungszustandes exprimiert wird. Die alleinige Expression des Hgf Proteins lässt aber noch nicht auf eine entsprechende Funktionalität schließen, da Hgf als inaktive Vorstufe sezerniert wird, welche erst durch die Spaltung spezifischer Enzyme in seine aktive Form gebracht wird. Für die proteolytische Spaltung von pro-Hgf zu Hgf sind drei Serinproteasen verantwortlich, von denen eine als lösliches Enzym vorliegt, während die anderen beiden Proteasen Hepsin (Hpn) und Matriptase (St14) von den Met-exprimierenden Zielzellen produziert werden (Owen et al., 2009). Ein weiterer für die Prozessierung von Pro-Hgf diskutierter Faktor ist das Enzym Plasminogen Aktivator/Urokinase (Plau) (Mars et al., 2005; Mars et al., 1993; Naldini et al., 1992; Naldini et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass jedes dieser drei Gene in den G-2C9 Zellen exprimiert wird und das die Gene *St14* und *Plau* ebenso wie Met und Hgf nur in

bestimmten Subpopulationen exprimiert werden (siehe Abschnitt 4.5.2.). So wird Matriptase entsprechend der Literatur hauptsächlich in Met-exprimierenden, quasi-epithelialen Zellen produziert. Unter physiologischen Bedingungen wird St14 in Übereinstimmung mit der Met-Expression innerhalb des Mammagewebes verstärkt in Stadien der Weiterentwicklung und Verzweigung des Drüsenepithels exprimiert. Im juvenilen Tier wird St14 hauptsächlich an den Spitzen der sich entwickelnden Dukte, den *terminal end buds* (TEB) exprimiert. Eine verstärkte Expression ist in den Stadien der aktiven Umgestaltung des Mammagewebes, vornehmlich in den luminalen Epithelzellen von Dukten und Lobuli, zu finden (Lee et al., 2009). Für das Enzym Plasminogen Aktivator/Urokinase konnte eine genau entgegengesetzte Verteilung zur Met- und St14-Expression beobachtet werden, da dieses zusammen mit Hgf von Zellen des eher mesenchymal differenzierten Kompartiments exprimiert wird. Neuere Veröffentlichungen zeigten, das Plasminogen Aktivator/Urokinase im Gegensatz zu Matriptase und Hepsin anscheinend nicht in der Lage ist, pro-Hgf direkt zu prozessieren (Owen et al., 2009). Dennoch konnte eine Korrelation zwischen der Überexpression von Plasminogen Aktivator/Urokinase und einer negativen Prognose in invasiven humanen Mammakarzinomen hergestellt werden (Jelisavac-Cosic et al., 2011).

Die Expression von Hepsin in G-2C9 Zellen wurde ebenfalls gezeigt, obwohl hier nur eine Tendenz zur stärkeren Expression in den quasi-epithelial differenzierten Zellen zu verzeichnen war. Hepsin konnte bereits mit der Progression von Tumoren in Verbindung gebracht werden (Klezovitch et al., 2004). So ist Hepsin eines der am stärksten hochregulierten Gene in Prostata- und Ovarialkarzinomen (Tanimoto et al., 1997) und wurde zum einen mit einer verstärkten neoplastischen Transformation (Dhanasekaran et al., 2001; Luo et al., 2001; Magee et al., 2001; Stamey et al., 2001; Stephan et al., 2004; Welsh et al., 2001) und zum anderen mit der Progression und Metastasierung von Prostatakarzinomen assoziiert (Klezovitch et al., 2004). Über etwaige Funktionen und Expressionsprofile von Hepsin in Geweben des Mammaepitheliums liegen bis dato keine ausreichenden Kenntnisse vor, obwohl in einigen Analysen eine Hochregulation von Hpn in humanen Mammakarzinomen gezeigt werden konnte (Xing et al., 2011).

Die Expression der Hgf-prozessierenden Enzyme unter anderem auf den Met-exprimierenden Zielzellen liefert ein weiteres Indiz für die Funktionalität des Hgf-Proteins in diesem System. Wie bereits erläutert, zeigt der Met-Rezeptor in den G-2C9 Zellen eine konstitutive Aktivierung, der keine aktivierenden Mutationen zugrunde liegen und die nicht durch eine zusätzliche Zugabe von rekombinantem Hgf gesteigert werden kann. Die Expression von Hgf und der zu dessen

Aktivierung notwendigen Enzymen liefert zunächst Grund zu der Annahme, dass die andauernde Met-Aktivität auf der Anwesenheit von Hgf beruht. Trennt man aber die Met^+ von der Hgf-produzierenden Met^- Population, so lässt sich auch in Abwesenheit von Hgf eine starke Aktivität des Rezeptors nachweisen. Hier können drei mögliche Erklärungen diskutiert werden: (i) Da die Halbwertszeit des Rezeptors und dessen Phosphorylierung in diesem System nicht bekannt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung des Rezeptors vor der Trennung der beiden Subpopulationen bereits stattgefunden hat, durch Hgf verursacht wurde und auch nach Sortierung der Populationen noch nachgewiesen werden kann. Eine abschließende Aussage über die Rolle von Hgf in den Zellen des G-2C9 Systems und dessen Notwendigkeit zur Aktivierung der Rezeptor-Aktivität könnten nur durch die Inhibition der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand bzw. der Bindung von Hgf durch neutralisierende Hgf-Antikörper ermittelt werden. Zum Zeitpunkt der experimentellen Bearbeitung der vorliegenden Arbeit war jedoch kein kommerziell erhältlicher Inhibitor bzw. Antikörper gegen murines Hgf verfügbar. (ii) Ebenfalls ist möglich, dass die Aktivierung von Met auf der Überexpression des Rezeptors selbst beruht und dieser durch die hohe Moleküldichte auf der Oberfläche der Zellen *Cluster* bildet, in denen es zur Di- und Multimerisierung der Rezeptoren und zu deren folgender Aktivierung kommt. (iii) Ein weiteres mögliches Szenario der Rezeptor-Aktivierung ist ein Zusammenspiel aus Liganden-vermittelter und Liganden-unabhängiger Phosphorylierung innerhalb der G-2C9 Zellen. Vergleicht man die verschiedenen Zelltypen in Abbildung 23 in Abschnitt 4.5.1 so lässt sich dort eine stark membranöse Met-Phosphorylierung innerhalb einer dichten Kolonie erkennen, während die vorliegenden Einzelzellen eine intrazelluläre, vesikuläre Verteilung von p-Met und Hgf zeigen. Es wäre möglich, dass die Liganden-vermittelte und die Liganden-unabhängige Aktivierung zu unterschiedlicher Signalverarbeitung innerhalb der Zielzellen führt. So könnte die zusätzliche Bindung von Hgf im Gegensatz zur Autophosphorylierung z.B. die Internalisierung des aktvierten Rezeptors veranlassen und somit entweder zum Abbruch des Signals (siehe Abschnitt 1.4.4.2) oder zu einer Intensivierung bestimmter Signale wie z.B. Stat3 und Erk1/2 führen (siehe Abschnitt 1.4.4.1). Betrachtet man weiterhin die in Abbildung 23 gezeigten Zelltypen, also scheinbar „unbewegliche“ innerhalb einer Kolonie oder bewegliche, aus dieser Kolonie ausgewanderte Zellen, so weisen, wie bereits erwähnt, nur letztere eine intrazelluläre Verteilung von Hgf und p-Met auf. Es wäre denkbar, dass die Wechselwirkung von Hgf und Met in diesen Zellen notwendig ist, um ihnen eine erhöhte Beweglichkeit und damit die Fähigkeit zur Auswanderung aus dem Verbund der epithelialen Kolonie zu verleihen und als Einzelzellen zu überleben. Andererseits wäre es genauso möglich, dass die vollständige Aktivierung des Met-

Rezeptors unabhängig von Hgf erfolgt und aufgrund der durch Met vermittelten Signalverarbeitung eine EMT der Zellen verursacht. Diese Veränderung der Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp ermöglicht den Zellen zum einen eine gesteigerte Beweglichkeit und Invasivität sowie die Fähigkeit ohne Zell-Zell-Kontakte zu überleben. Zum anderen ist ein quasi-mesenchymaler Differenzierungszustand der G-2C9 Zellen notwendige Voraussetzung für die Expression von Hgf, da gezeigt werden konnte, dass dieses nur in quasi-mesenchymalen Met$^-$ Zellen exprimiert wird. Damit könnte es sich also ebenso um Zellen eines fortgeschrittenen EMT–Stadiums handeln, die den Rezeptor nach erfolgtem Signal durch Internalisierung abschalten und bereits zur *de novo* Produktion von Hgf übergegangen sind.

5.5 Met beeinflusst die Kontaktinhibition in G-2C9 Zellen und unterstützt dadurch deren Proliferation und verankerungsunabhängiges Wachstum

Die Expression des Met-Rezeptors geht in verschiedenen Tumoren, unter anderem in Mammakarzinomen, mit einer schlechten Prognose einher. Das stromabwärts von Met gelegene Signalnetzwerk veranlasst eine tiefgreifende Veränderung zellulärer Prozesse, welche die Proliferation, die Migration sowie die Lebensdauer und Invasivität der Tumorzellen beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss des Met-Signalweges auf die Proliferation, die Migration und die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum von G-2C9 Zellen über verschiedene technische Ansätze analysiert werden. Der direkte Vergleich zwischen PHA-665752-behandelten, shRNA gegen Met-exprimierenden und Met$^-$-sortierten Zellen und ihren Kontrollzellen mit aktivem Met-Signal führte zu dem Ergebnis, dass ein reduziertes Met-Signal Einfluss auf Proliferation und verankerungsunabhängiges Wachstum hat. Die Ergebnisse der Proliferationsstudien zeigten interessanterweise, dass die von Met vermittelten Signale hauptsächlich bei der Überwindung der Kontaktinhibition eine Rolle spielen. So proliferierten die Zellen zunächst in einer ähnlichen Geschwindigkeit bis zum Erreichen eines konfluenten Zustands. Ab diesem Zeitpunkt stellten Zellen ohne Met-Signal die Proliferation ein, während die Kontrollzellen in der Lage waren, weiterhin zu proliferieren und dreidimensionale Kolonien zu bilden (siehe Abbildung 29). In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der stabile *knockdown* von Met in humanen Myelom Zellen zu einer Verlangsamung des Zellzyklus durch einen Anstieg der p27-Expression führt (Que et al., 2012), konnte in den G-2C9 Zellen der Zusammenhang zwischen Met und dem Verlust der Kontaktinhibition durch den Anstieg der

p27-Expression in Inhibitor-behandelten Zellen ebenfalls bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.6.3).

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass sowohl die shRNA als auch die Inhibitor-behandelten Zellen dauerhaft kultivierbar sind, führten zunächst zu der Folgerung, dass das Met-Signal in den G-2C9 Zellen nicht allein für die Proliferation und Überlebensdauer dieser Zellen verantwortlich ist. Betrachtet man jedoch die Western-Blot-Analyse der Met-depletierten Zellen, so fällt auf, dass es sich nicht um einen vollständigen *knockdown*, sondern nur um eine deutliche Reduktion der Met-Expression handelt (siehe Abbildung 26). Unter Umständen führt die dauerhafte Kultivierung hier zu einer Selektion von Zellen mit einer verbleibenden, basalen Met-Expression, die auch nach mehreren Passagen in Kultur stabil bleibt. Die Kultivierung der Inhibitor-behandelten Zellen über mehr als 14 Tage war problemlos möglich. Zu beachten ist allerdings, dass es sich hier nur um die Proliferation und Überlebensdauer derjenigen Zellen handelt, die unter herkömmlichen 2D-Zellkulturbedingungen propagiert wurden.

Die Met-Aktivität übt aber unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. bei reduzierten Platzverhältnissen, etwa innerhalb einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale oder eines Tumors, entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und Überlebensdauer der Zellen aus. Einhergehend mit einer eingeschränkten Proliferation ohne Met-Signal konnte ebenfalls eine verminderte Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum festgestellt werden. Dies kann als Hinweis für eine eventuell reduzierte Tumorigenität der Zellen ohne Met-Signalweg verstanden werden. So führt eine konstitutiv vorliegende Met-Aktivität in den Zellen der G-2C9 Kultur anscheinend zu gestörten Zell-Zell-Kontakten. Zum einen werden diese Zellen nicht durch den Kontakt zu ihren Nachbarzellen in ihrer Proliferation gehindert, zum anderen scheinen sie diesen Zellverbund jedoch auch nicht zum Überleben und zur Proliferation zu benötigen.

5.6 Die Aktivität und Lokalisation von Met beeinflusst das Migrationsverhalten der G-2C9 Zellen

Die Analyse der Migrationsfähigkeit der G-2C9 Zellen führte zu dem scheinbaren Paradoxon, dass die G-2C9 Zellen sowohl nach Met-Inhibition als auch nach der Transduktion mit Met-spezifischer shRNA eine deutliche Reduktion in ihrer Migrationsfähigkeit zeigten. Demgegenüber wanderten sortierte Met^- Zellen jedoch schneller als gemischte Met^+/Met^--sortierte Zellen oder unsortierte Kontrollzellen (siehe Abschnitt 4.6.5). Die experimentelle Reduktion des Met-Signals führt somit zu einer verminderten Motilität, wobei eine physiologisch

niedrige Met-Expression eine Steigerung der Motilität veranlasst. Eine nähere Betrachtung der wandernden Zellen zeigte verschiedene Arten der Motilität. So war nach Met-Inhibition keine geordnete, kollektive Wanderung von Gruppen mehr zu erkennen, sondern nur noch einzelne, Met-negative Zellen waren in der Lage, in den Spalt einzuwandern (siehe Abbildung 30). Zellen der Kontroll-Gruppe zeigten jedoch neben einigen einzeln wandernden Zellen eine kontrollierte Wanderung in Form von Gruppen oder Strängen aufeinander folgender Met-positiver Zellen. Den Färbungen der sortierten Met^+ und Kontrollzellen kann entnommen werden, dass die in Gruppen einwandernden Zellen hier ebenfalls Met-positiv und Met-phosphoryliert sind, aber augenscheinlich die Expression des Met-Rezeptors verlieren, sobald sie sich von der Gruppe lösen. Vergleicht man demgegenüber die Verteilung des Met-Rezeptors in den Zellen an der Spitze einer wandernden Gruppe unbehandelter G-2C9 Kontrollzellen, so ist eine vesikuläre Verteilung des Rezeptors und damit einhergehend eine Reduktion von Met auf der Oberfläche der Zellen deutlich zu sehen (siehe Abbildung 33). Wie lässt sich nun anhand dieser Beobachtungen die Motilität der sortierten Met^- Zellen erklären?

Die Sortierung der Zellen erfolgt allein aufgrund von extrazellulär gebundenen Antikörpern, die an den in der Zellmembran befindlichen Met-Rezeptor gebunden sind. Ein negatives Signal bedeutet deshalb genau genommen nur, dass sich zum Zeitpunkt der Analyse keine Met-Rezeptoren auf der Zelloberfläche befanden. Bezieht man nun die Ergebnisse aus Abschnitt 4.5.3 mit ein, so konnte nach dreitägiger Kultivierung in den Met^- Zellen eine intrazelluläre, vesikuläre Met-Färbung und sogar Met-Phosphorylierung detektiert werden. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass die Met-negativen Zellen den Rezeptor in ihrer Membran exprimiert hatten, dieser aber nach Aktivierung bzw. Phosphorylierung internalisiert wurde und die Zelle bei der Met-Immunfärbung mit einem, nur externe Epitope erkennenden Antikörpern, Met-negativ erscheint. Geht man nun davon aus, dass quasi-mesenchymal differenzierte Met^- Zellen aus aktivierten quasi-epithelialen Met^+ Zellen entstehen, hätten die Met^- Zellen eine abgeschlossene EMT vollzogen. Ob die vesikuläre Verteilung des Met-Rezeptors nun im Sinne der „*signalling endosomes theorie*“ (Scita and Di Fiore, 2010) die Ursache für die fortgeschrittene EMT und damit für die Motilität der Met^- Zellen ist oder ob sie Folge einer fortgeschrittenen EMT und dem damit verbundenem Umbau der Membranstruktur ist, bleibt im Rahmen dieser Arbeit jedoch offen. Zusätzliche Komplexität erhält dieses System durch die endogene Expression von Hgf in Met^- Zellen und dessen Rolle in der Aktivierung von Met in G-2C9 Mammakarzinomzellen. Die Bindung von Hgf an das bereits durch Rezeptor-Amplifikation aktivierte Met könnte der ausschlaggebende Schritt zur fortgeschrittenen EMT und damit zur Internalisierung des

Rezeptors sowie zur Loslösung der Zellen aus dem Zellverband sein oder aber auch völlig unabhängig davon erfolgen. Ersteres würde die in Abschnitt 4.5.1 dargestellte Beobachtung von vesikulärem Hgf und p-Met in Einzelzellen gegenüber Zellkolonien mit membranständiger Met-Phosphorylierung erklären. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass die Stimulation von MDCK Epithelzellen mit Hgf in einer geringen Konzentration zur reduzierten Konnektivität von Zell-Zell-Kontakten bis zur vollständigen Ablösung einzelner Zellen aus dem Epithelverband führt (Poujade et al., 2007). Weiterhin ist bekannt, dass Hgf in niedrigen Konzentrationen zu einer Beschleunigung der kollektiven Wanderung von Epithelzellen führt und damit die Wundheilung fördert, während die Applikation von Hgf in höheren Konzentrationen die Dissoziation des Epithelverbandes veranlasst (*cell scattering*) und so die Wundheilung behindert (Poujade et al., 2007; Sponsel et al., 1994). Da die Konzentration von Hgf in diesen Versuchen allein über die Aktivität des Met-Rezeptors entscheidet, scheint zumindest der Grad der Rezeptoraktivität für die Unterscheidung zwischen einer kollektiven Zellmotilität (*collective cell motility*) und der Fähigkeit einzelner Zellen unabhängig wandern zu können (*single cell movement)* verantwortlich zu sein. Neben der Met-Aktivität wird für die Bewegung einzelner Zellen eine vollständig abgeschlossen EMT vorausgesetzt, während die kollektive Wanderung von Zellen je nach Zelltyp nur eine partielle oder keine EMT voraussetzt (Rorth, 2009). Dies würde erklären, warum die Behandlung der G-2C9 Zellen mit dem Met-Inhibitor zu einer Reduktion der Migration in geordneten Gruppen führt, einzelne Met-negative Zellen aber noch immer in der Lage sind, in den zellfreien Raum einzuwandern. Diese Zellen müssten bereits vor Zugabe des Met-Inhibitors nach abgeschlossener Met-Aktivierung eine fortgeschrittene EMT vollzogen haben und deshalb auch nicht mehr empfänglich für die Inhibition von Met sein.

Über die spezifische biologische Funktion der Met-Internalisierung liegen zurzeit noch keine umfassenden Informationen vor. Zum einen konnte die vesikuläre Lokalisation des Rezeptors direkt mit dem tumorigenen Potential von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden, zum andern kann es zu einer Intensivierung des Erk1/2-Signals und damit zu einer erleichterten Migration der Zellen führen (Joffre et al., 2011; Kermorgant and Parker, 2008; Kermorgant et al., 2003; Kermorgant et al., 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von MDCK Zellen mit Hgf zu einer Ko-Internalisierung von Met-Rezeptor und E-Cadherin, einem transmembranen Glykoprotein aus der Gruppe der Adhäsionsproteine, führt (Kamei et al., 1999). Weiterhin stimuliert Met durch direkte Phosphorylierung von Bcl9-2 die nukleäre Akkumulation von β-Catenin und mindert somit zum einen die von E-Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion und induziert zum anderen - durch die Wirkung von β-Catenin als transkriptioneller Ko-Faktor die

Induktion der EMT. Hierdurch konnte der direkte molekulare Beweis für Met als wichtigem Induktor der EMT geliefert werden (Lee et al., 2006). Demzufolge könnte die Internalisierung von Met sowohl Folge als auch Ursache einer fortschreitenden EMT und der damit zunehmenden zellulären Beweglichkeit sein und somit eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen den unterschiedlich differenzierten Subpopulationen des G-2C9 Zellsystems spielen.

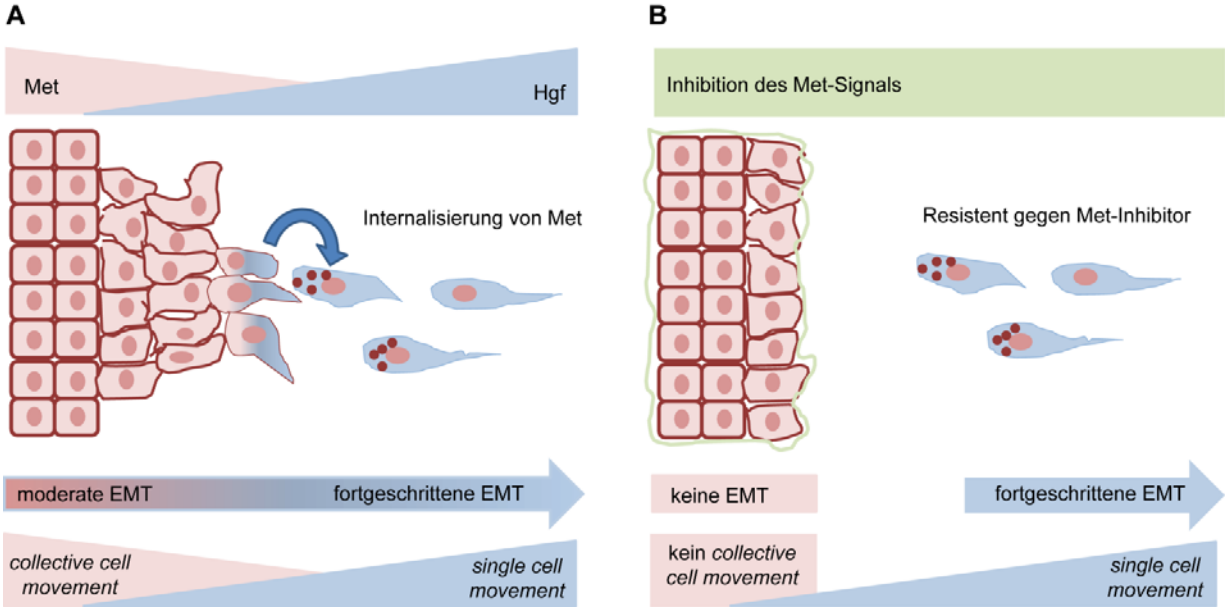


Abbildung 42: Modell über die Met-abhängigen Mechanismen der Migration in G-2C9 Zellen.

(A) Zur gruppenweisen Migration von Epithelzellen eines Zellverbandes (*collective cell movement*) ist eine moderate EMT notwendig. Diese Zellen zeigen eine starke Expression von Met auf der Zelloberfläche. Im Zuge einer fortschreitenden mesenchymalen Transition kommt es zu einer tiefgreifenden Umgestaltung der Zellmembran. Der Verlust der epithelialen Differenzierung führt zur gesteigerten Expression von Hgf. Die gleichzeitige Expression von Met und Hgf könnte zur maximalen Rezeptoraktivität, einer darauf folgenden Internalisierung von Met und schließlich zum Fortschreiten der EMT führen. Diese Veränderungen befähigen die Zellen sich vom Zellverband zu lösen und unabhängig zu migrieren (*single cell movement*). (B) Die Inhibition des Met-Signals durch PHA-665752 führt zur Unterbindung der EMT der Met-exprimierenden Zellen durch Verlust des Met-Signals. Diejenigen Zellen, die nach Met-Aktivierung und Internalisierung bereits zuvor eine fortgeschrittene EMT durchgeführt haben, sind resistent gegen PHA-665752, augenscheinlich Met$^-$ und in der Lage ungehindert zu migrieren.

5.7 Rbp7 als Bindeglied zwischen dem Met- und dem Retinsäuresignalweg

Die Aktivierung des Met-Rezeptors führt in Abhängigkeit vom zellulären Kontext zur Aktivierung zahlreicher stromabwärts gelegener Signalwege, wie z.B. dem Mapk, Akt, Nfκb, Stat3 und vielen anderen Signalwegen. Das grobe Netzwerk der Met nachgeschalteten

Signalwege ist zwar bekannt, doch dessen Regulation, Verzweigungen und Modulatoren sind bis dato weitestgehend unerforscht.

Die Analyse der Met-Signaturgene sollte Aufschluss über den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsstatus einer Gruppe muriner WAP-T-Tumoren, der Amplifikation des Met-Signals und der Überexpression einer Gruppe von Genen liefern, um die Rolle von Met in basalen Mammakarzinomen besser zu verstehen. Die umfassenden Analysen zur Expression dieser Met-Signaturgene im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Rbp7 sowohl in Tumoren, als auch in G-2C9 Zellen als neues von Met beeinflusstes *Downstream-Target* identifizieren (siehe Abschnitt 4.1.1 und 4.8). Rbp7 ist ein Retinolbindeprotein über welches bislang wenig bekannt ist, dem aber aufgrund seiner Fähigkeit zur Bindung von Retinol eine Rolle im Retinsäure-Signalweg zugesprochen wird. Wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, wird Rbp7 in Abhängigkeit eines intakten Met-Signals exprimiert. So zeigten sortierte Met^+ Zellen eine stärkere *Rbp7* Expression, umgekehrt führte die Behandlung mit shRNA oder Met-Inhibitor zu einer Reduktion von Rbp7. Zusätzlich zu Rbp7 konnte die Expression der Gene eines weiteren Retinolbindeproteins, dem *Rbp1* und des Retinsäurebindeproteins *Crabp2* festgestellt werden. Diese beiden Gene wiesen ebenfalls eine verstärkte Expression in Met^+ Zellen auf, ließen sich durch die Inhibition des Met-Signalweges jedoch nicht beeinflussen (siehe Abschnitt 4.9.1 und 4.9.2). Daher ist anzunehmen, dass diese beiden Gene nicht direkt unter der expressionellen Kontrolle des Met-Signalweges stehen und Met somit Einfluss auf das Gleichgewicht der zwei Retinolbindeproteine Rbp7 und Rbp1, sowie auf das Verhältnis der Gesamtmenge an Retinolbindeproteinen zu Retinsäurebindeproteinen hat. Neben dem Schutz der Zellmembran vor der Einlagerung freien Retinols spielen diese Proteine eine Rolle in der Zulieferung von Retinol zu bestimmten, Retinol-prozessierenden Enzymen. So konnte gezeigt werden, das Rbp1 als Zulieferer für das Enzym Lecithin-Retinol-Acetyltransferase (LRAT) fungiert und die Esterifizierung von Retinol zu Retinsäureester katalysiert, der inaktiven Speicherform der Retinoide (Ghyselinck et al., 1999). Liegt ein Überschuss von Rbp1 gegenüber Retinol vor, so häuft sich freies, sog. apo-Rbp1 an, welches die Aktivität der LRAT direkt inhibiert und im Gegenzug die Aktivität der Retinylester-Hydrolase (REH) und somit die Freisetzung von Retinol fördert (Sporn et al., 1994). Demzufolge hat Rbp1 zwei Hauptfunktionen: zum einen die Regulation der Speicherung von Retinsäurederivaten und zum anderen die Regulation der Retinsäuresynthese aus diesen Speicherformen. Rbp1 ist zusätzlich in der Lage, Retinal zu binden und es bestimmten, Retinal zu Retinsäure prozessierenden Enzymen zuzuliefern (Noy, 2000).

Crabp2 hingegen bindet mit hoher Affinität an Retinsäure und vermittelt deren Transport in den Nukleus sowie deren dortige Zulieferung zu Retinsäure-Rezeptoren (RAR), die nach Bindung von Retinsäure als Transkriptionsfaktoren die Transkription spezifischer Zielgene veranlassen (Noy, 2000).

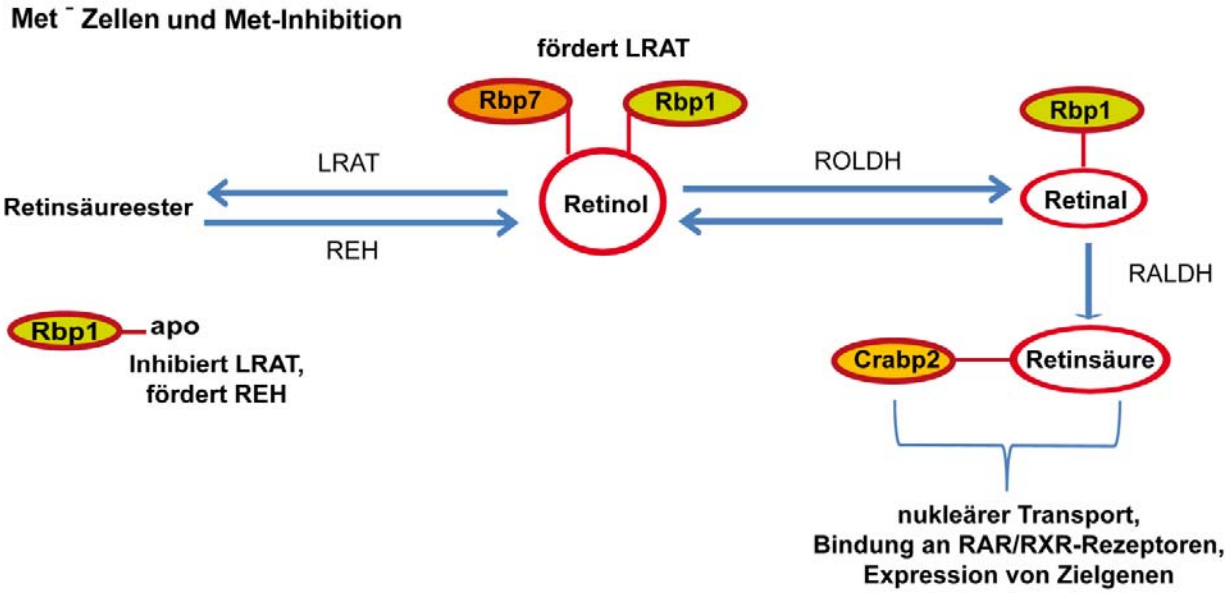


Abbildung 43: Modell des Retinsäuremetabolismus in Met⁻ Zellen und nach Met-Inhibition.

Schematische Darstellung des Retinsäuremetabolismus unter reduziertem Met-Signal. Eine niedrige Expression von Met bzw. die Inhibition des Met-Signals führt zur Reduktion von Rbp7. Die Menge an Rbp1 und Crabp2 bleibt unverändert. Dies führt zu einer reduzierten Konzentration an Retinolbindeproteinen in der Zelle. Stehen Rbp7 und Rbp1 im Gleichgewicht, so binden diese gleichermaßen freies Retinol. Rbp7 und Rbp1 fördern die Veresterung von Retinol zu Retinsäureester über das Enzym Lecithin-Retinol-Acetyltransferase (LRAT) während apo-Rbp1 die LRAT hemmt und gleichzeitig die Rückreaktion, also die Freisetzung von Retinol aus Retinsäureester über das Enzym Retinylester-Hydrolase (REH) fördert. Ebenso ist Rbp1 in der Lage, die Metabolisierung von Retinol zu Retinal über die Retinol-Dehydrogenase (ROLDH) und darauf folgend zu Retinsäure über das Enzym Retinal-Dehydrogenase (RALDH) zu katalysieren. Die Retinsäure wird dann gebunden an das zelluläre Retinsäurebindeprotein 2 (Crabp2) in den Kern transportiert, wo es an nukleäre RAR/RXR-Rezeptoren bindet und die Expression spezifischer Zielgene veranlasst. Somit entsteht bei reduziertem Met-Signal ein aktives Retinsäuresignal in der Zelle.

Eine gesteigerte Expression von Met bzw. eine Amplifikation des Met-Signals führt in den G-2C9 Zellen zu einem Anstieg von Rbp7 und damit vermutlich zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Retinolbindeproteinen Rbp7 und Rbp1. Geht man davon aus, dass die beiden Proteine das gebundene Retinol spezifisch Retinol-prozessierenden Enzymen zuliefern können, also entweder denjenigen, die die Umsetzung von Retinol zu Retinsäureester oder denen, die Retinol zu Retinal katalysieren, würde ein Ungleichgewicht beider Bindeproteine die

Metabolisierung aktiver RA in der Zelle und damit ein aktives RA-Signal entscheidend beeinflussen. In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass murines Rbp7 genau wie Rbp1 ein ideales Substrat für die LRAT darstellt und somit die Veresterung von Retinol zu Retinsäureester fördert und dem Retinsäure-Signal entgegenwirkt (Piantedosi et al., 2005). Im Gegensatz zum inhibitorischen Effekt von freiem Rbp1 auf die Aktivität von LRAT konnte bei freiem Rbp7 kein Einfluss auf die Aktivität der LRAT beobachtet werden. Da Rbp1 und Rbp7 Retinol mit einer ähnlichen Affinität binden, führt ein Überschuss von Rbp7 durch die Amplifikation des Met-Signals unweigerlich zum Auftreten von ungebundenem Rbp1. Dieses fördert die Freisetzung von Retinol aus Retinsäureester und hemmt gleichzeitig dessen Synthese. Dadurch und durch die Tatsache, dass vermutlich kein freies Retinol in der Zelle vorhanden ist, kann angenommen werden, dass es nicht zur Bildung von Retinal und Retinsäure kommt, sondern zu einem durch Rbp7 und apo-Rbp1 vermittelten metabolischen Zyklus zwischen Retinol und Retinsäurester.

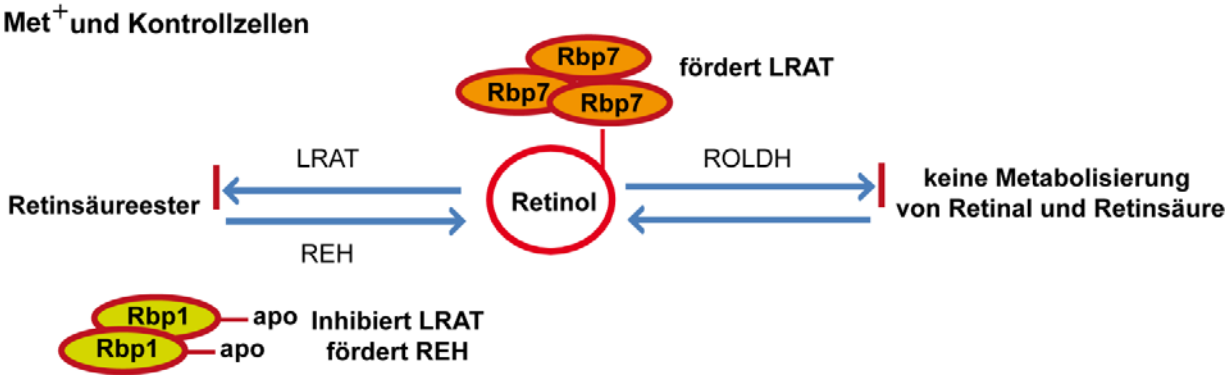


Abbildung 44: Modell des Retinsäuremetabolismus in Met$^+$ Zellen.

Schematische Darstellung des Retinsäuremetabolismus unter konstitutiv aktivem Met-Signal. Das Met-Signal führt zur verstärkten Expression von Rbp7, aber nicht von Rbp1. Somit entsteht ein Überschuss an Rbp7 gegenüber Rbp1, welches nun ungebunden als apo-Rbp1 vorliegt. Rbp7 fördert die Veresterung von Retinol zu Retinsäureester über die Lecithin-Retinol-Acetyltransferase (LRAT) während apo-Rbp1 die LRAT hemmt und gleichzeitig die Rückreaktion, also die Freisetzung von Retinol aus Retinsäureester über das Enzym Retinylester-Hydrolase (REH) fördert. Freiwerdendes Retinol wird durch den Überschuss an Rbp7 sofort wieder gebunden und der LRAT zugeführt. Somit kommt es nicht zur Bildung von Retinal und Retinsäure, wodurch kein aktives Retinsäuresignal in den Zellen entsteht.

Retinsäure spielt wie Met eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung sowie in der Proliferation, Lebensdauer und Differenzierung von Zellen. Die Analogie von Tumor-initiierenden Zellen und embryonalen Stammzellen über den gemeinsamen Besitz bestimmter Stammzelleigenschaften veranlasst die Forschung zur Analyse der Rolle von Retinsäure auf sog. Tumorstamm- oder Tumor-initiierende Zellen. Unabhängig davon, ob ein Tumor nun von einigen

wenigen Tumorstammzellen oder von Zellen eines plastischen, von EMT-Mechanismen getragenen Tumorzellsystems aufrecht erhalten wird, liegen der Progression und Metastasierung dieser Tumoren die Stammzelleigenschaften bestimmter Zellen zugrunde, wie z.B. die Selbsterneuerung und die Produktion differenzierter Nachkommen. Gemäß dieser Annahme muss eine erfolgreiche Tumortherapie an der bzw. den Tumor-initiierenden Zellen angreifen und diese eliminieren. Ein Ansatz diese Tumor-erzeugenden Zellen zu bekämpfen besteht darin, den Verlust der Stammzelleigenschaften dieser Zellen durch Induktion der Differenzierung zu veranlassen und somit deren Proliferation zu unterbinden. Im Rahmen der Differenzierungs-Therapie von Tumoren ist Retinsäure in den Fokus der Untersuchungen gerückt, da Retinsäure als eine der wenigen bekannten Wirkstoffe die Differenzierung von normalen embryonalen Stammzellen regulieren kann (Kashyap et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass manche Tumorzellen außerordentlich stark mit Differenzierung und Wachstumsstopp auf die Anwesenheit von RA reagieren, während andere Tumorarten nicht empfänglich gegenüber Retinsäure zu sein scheinen. Zahlreiche unterschiedliche Variablen wie etwa die Aufnahme von RA in die Zelle (Moise et al., 2007), der RA Metabolismus (Duester, 1996; Wang et al., 2008), die Expression verschiedener RAR-Gene sowie die Aktivität anderer Signalwege können die Reaktion der Tumorzellen auf pharmakologische Dosen von RA erheblich beeinflussen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Behandlung der G-2C9 Zellen mit Retinsäure führte zu einer eindeutig morphologischen Veränderung der Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp. Erstaunlicherweise zeigte die FACS-Analyse der behandelten Zellen eine nur geringe Verschiebung der Populationen in Richtung mesenchymal (siehe Abschnitt 4.9.2-4.9.3). Die Expressionsanalysen zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit Retinsäure für 72 Stunden keinen Effekt in Bezug auf die Expression der Retinoidbindeproteine und epithelialen Marker - inklusive Met - hatte, aber die Expression des mesenchymalen Transkriptionsfaktors Twist2 ansteigen ließ. Obwohl die Behandlung der Zellen nicht in einer veränderten Expression des *Met*-Gens resultierte, könnte der Retinsäure-Signalweg dennoch einen Einfluss auf den Met-Signalweg nehmen, da es trotz Anstiegs der mesenchymalen Population zu einer gleichzeitigen Reduktion der Hgf-Expression in der Gesamtkultur kam. Es konnte gezeigt werden, dass schon bei der Wanderung myogener Vorläuferzellen während der Entwicklung des Embryos die Sekretion von Retinsäure entscheidend für die kontrollierte Expression von Hgf in den Mesenchymzellen der Extremitäten-Knospen verantwortlich ist (Duester, 1996). Die Hgf-Expression ist im Embryo strikt auf bestimmte Kompartimente, z.B. die Arm- und Beinknospen beschränkt. Die Abwesenheit von Retinsäure stört diese strikte Regulation und führt zu einer

durchgehenden Hgf-Expression der anterior-proximalen Domäne auch zwischen den beiden Extremitätenknospen. Die Anwesenheit von Retinsäure führt also zu einer Unterdrückung der Hgf-Expression in bestimmten Zellen des Embryos und - wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte - ebenso in den murinen Mammakarzinomzellen der Linie G-2C9.

Interessanterweise führte die dauerhafte Behandlung der Zellen mit RA genau wie in Met-Inhibitor-behandelten Zellen nicht zu einem Stopp der Proliferation und einer terminalen Differenzierung aller Zellen. Allerdings führte die Langzeit-Exposition von Retinsäure im Gegensatz zu der Langzeit-Behandlung des Met-Inhibitors nicht zum Kippen des Gleichgewichtes zwischen den differenzierungsbedingten Subpopulationen, sondern nur zu einem leichten Schifft in Richtung mesenchymaler Differenzierung. Diese schwache Beeinflussung des Gleichgewichtes bei gleichzeitig dramatisch veränderter Morphologie lässt auf eine nur partielle Retinsäure-Sensitivität der G-2C9 Zellen schließen. Wie bereits dargelegt, hängt die Retinsäure-Sensitivität von Tumorzellen von einer Reihe verschiedener Faktoren wie etwa dem RA Metabolismus, der Expression verschiedener Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und die Retinoid X Rezeptoren (RXR) sowie der Aktivität anderer Signalwege ab. Der RA Metabolismus wird über das Gleichgewicht der Retinsäure-Derivate innerhalb der Zelle bestimmt, welches wiederum von der Enzymaktivität und deren Substratzugänglichkeit zu den bestimmten Derivaten abhängig ist. Die Substratzugänglichkeit wird über die verschiedenen Retinoid-Bindeproteine vermittelt, die in den G-2C9 Zellen zumindest zum Teil unter der Kontrolle eines intakten Met-Signalweges stehen. Schaltet man den Met-Signalweg durch Met-Inhibition aus und behandelt gleichzeitig mit RA, so stellt sich eine deutlich stärkere Verschiebung zum quasi-mesenchymalen Differenzierungszustand ein, als sie durch beide Zusätze allein verursacht werden konnte. Auch die Wiederherstellung des Gleichgewichtes nach siebentägiger Regenerationsphase war in den kombiniert behandelten Zellen nahezu nicht gegeben, da es zu einem vollständigen Verlust der epithelialen bzw. Met-exprimierenden Population kam (siehe Abbildung 41). Der Verlust des epithelialen Kompartiments könnte zum einen tatsächlich durch eine terminale Differenzierung der epithelialen Zellen, deren Proliferationsstopp und damit deren Verschwinden über die verschiedenen Passagen der Kultur verursacht sein. Ebenso könnte der Verlust aber auch in der Induktion einer mesenchymalen Transition aller Zellen begründet sein. Grundlegende Schwierigkeiten zur eindeutigen Korrelation des Met- und Retinsäuresignalweges liegen in der ungeklärten physiologischen Rolle des Rbp7-Proteins und in der ohnehin bereits deutlich veränderten Proteinzusammensetzung des Retinsäure-Signalwegs in den G-2C9 Zellen. So beschränkt sich die Expression der nukleären

Retinoid-Rezeptoren RAR (α, β, γ) und RXR (α, β, γ) innerhalb dieser Zellen z.B. auf RARγ und RXRβ. Für $RAR\beta_2$, der biologisch aktiven Isoform des RARβ-Rezeptors ist bekannt, dass dieser (Chambon, 1996; Toulouse et al., 1996) den durch RA veranlassten Proliferationsstopp (Altucci et al., 2007; Faria et al., 1999; Seewaldt et al., 1995) in einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem in Mammakarzinomen vermittelt (Liu et al., 1996). Eine zunehmende Anzahl an Studien konnte zeigen, dass der anti-karzinogene Effekt der RA auf der Expression von $RAR\beta_2$ beruht und dieser somit einen potenten Tumorsuppressor darstellt (Sirchia et al., 2002). Seine Expression geht während der Tumorentstehung, besonders in Karzinomen, häufig verloren und führt zu einer Desensibilisierung der Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit RA, welche durch die exogene Expression von $RAR\beta_2$ aufgehoben werden kann (Si et al., 1996). Die Abwesenheit dieses Rezeptors ist nur ein Beispiel der aberranten Veränderungen des Retinsäure-Signalwegs innerhalb der G-2C9 Zellen und könnte zum Teil die eingeschränkte Reaktion der Zellen auf die Behandlung mit RA erklären.

Schlussendlich bleibt jedoch die Tatsache, dass die Anwesenheit von RA zu einer Reduktion der Hgf-Expression und die Amplifikation des Met-Signals zu einer Überexpression des Retinolbindeproteins Rbp7 führen. Interessanterweise veranlasst die Kombination von Met-Inhibition und RA-Behandlung einen scheinbar irreversiblen Verlust des epithelialen Differenzierungszustandes der G-2C9 Zellen. Allein diese Indizien rechtfertigen die Annahme einer wie auch immer gearteten Verbindung des Met- und Retinsäure-Signalwegs in den murinen Mammakarzinomzellen der Linie G-2C9 und erfordern dessen weitere eingehende Analyse.

5.8 Ausblick

Invasivität und Metastasierung von Tumoren stellen die gängigsten zum Tode führenden Prozesse aller Krebspatienten dar. Die Veränderung der epihtelialen Zellen des Primärtumors hin zu einem motilen, mesenchymalen Phänotyp ist der entscheidende Schritt in der Invasion der Tumorzellen in umliegendes Gewebe und somit der darauf folgenden Bildung von Metastasen. Die Unterbindung von EMT ist das Ziel wissenschaftlicher und medizinischer Ambitionen zur Bekämpfung von Metastasen und invasiven Tumoren. Der Met-Rezeptor als einer der Auslöser von EMT induzierenden Signalwegen liefert einen idealen Angriffspunkt zur Inhibition einer mesenchymalen Transition und damit einhergehend eine Reduktion von Proliferation und Invasivität verschiedenster, bislang schwer zu behandelnder Tumoren. Obwohl bereits einige gegen Met gerichtete Wirkstoffe die dritte Phase klinischer Studien erreicht haben, konnten

bislang nur wenige Informationen über die genaue Wirkungsweise dieser, zumeist niedrigmolekularen Kinase-Inhibitoren, erlangt werden. Neben dem Verständnis der durch die Met-Inhibition angehaltenen bzw. angestoßenen Prozesse auf der Ebene der einzelnen Zelle, aber auch des gesamten Tumors, ist die Auswahl der Patienten mit Sicherheit entscheidend für die erfolgreiche Entwicklung und Anwendung therapeutischer, gegen Met gerichteter Medikamente. Welche Hindernisse und Chancen auf dem Weg zu einer gezielten Met-Therapie überwunden bzw. erkannt werden müssen, ist zu diesem Zeitpunkt schwer absehbar. Der Erwerb von Resistenzen wird mit Sicherheit eine der in der Zukunft der Met-Therapie auftretenden vorrangigen Fragestellungen sein. So könnte die Inhibition von Met zum einen der rettende Ausweg aus einer bereits bestehenden Resistenz gegenüber anderen Rezeptortyrosinkinase-gerichteten Therapien sein, zum anderen könnten die behandelten Tumoren selbst ebenso schnell eine Resistenz gegenüber Met-spezifischen Angriffen entwickeln. Hier eröffnet die gezielte Kombination von Wirkstoffen mit Angriffspunkten an unterschiedlichen Knotenpunkten des zellulären Signalnetzwerkes, abgestimmt auf die patientenspezifischen Besonderheiten der Tumoren, die Möglichkeit zur Überwindung von Resistenzen durch eine maßgeschneiderte Therapie, welche in Zukunft sicherlich an Bedeutung gewinnen wird.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1968). Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. J Cell Physiol *72*, 141-148.

Abd El-Rehim, D. M., Pinder, S. E., Paish, C. E., Bell, J., Blamey, R. W., Robertson, J. F., Nicholson, R. I., and Ellis, I. O. (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. J Pathol *203*, 661-671.

Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E. M., and Laterra, J. (2002). In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. FASEB J *16*, 108-110.

Accornero, P., Lattanzio, G., Mangano, T., Chiarle, R., Taulli, R., Bersani, F., Forni, P. E., Miretti, S., Scuoppo, C., Dastru, W.*, et al.* (2008). An in vivo model of Met-driven lymphoma as a tool to explore the therapeutic potential of Met inhibitors. Clin Cancer Res *14*, 2220-2226.

Ahuja, D., Saenz-Robles, M. T., and Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. Oncogene *24*, 7729-7745.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 3983-3988.

Altucci, L., Leibowitz, M. D., Ogilvie, K. M., de Lera, A. R., and Gronemeyer, H. (2007). RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. Nat Rev Drug Discov *6*, 793-810.

Amemiya, H., Kono, K., Itakura, J., Tang, R. F., Takahashi, A., An, F. Q., Kamei, S., Iizuka, H., Fujii, H., and Matsumoto, Y. (2002). c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. Oncology *63*, 286-296.

Andermarcher, E., Surani, M. A., and Gherardi, E. (1996). Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. Dev Genet *18*, 254-266.

Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S.*, et al.* (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. Cancer Cell *14*, 79-89.

Apolant, H. (1906). Die epithelialen Geschwülste der Maus. Arbeiten am. „Königlichen Inst. F.Expt. Ther. zu Frankfurt a.M“. 1, 7–68.).

Bedard, P. L., and Piccart-Gebhart, M. J. (2008). Current paradigms for the use of HER2-targeted therapy in early-stage breast cancer. Clin Breast Cancer *8 Suppl 4*, S157-165.

Bertotti, A., Comoglio, P. M., and Trusolino, L. (2005). Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. Cancer Res *65*, 10674-10679.

Bertotti, A., Comoglio, P. M., and Trusolino, L. (2006). Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. J Cell Biol *175*, 993-1003.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 915-925.

Birchmeier, C., and Brohmann, H. (2000). Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. Curr Opin Cell Biol *12*, 725-730.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature *376*, 768-771.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 207-217.

Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. Nature *391*, 285-288.

Boccaccio, C., and Comoglio, P. M. (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. Nat Rev Cancer *6*, 637-645.

Borowiak, M., Garratt, A. N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 10608-10613.

Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., and Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? J Clin Oncol *23*, 7350-7360.

Buchschacher, G. L. (2003). Lentiviral vector systems for gene transfer, (Georgetown, Tex. ; [Great Britain]: Landes Bioscience/Eurekah.com).

Burgess, T., Coxon, A., Meyer, S., Sun, J., Rex, K., Tsuruda, T., Chen, Q., Ho, S. Y., Li, L., Kaufman, S., *et al.* (2006). Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors. Cancer Res *66*, 1721-1729.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem *112*, 195-203.

Camp, R. L., Rimm, E. B., and Rimm, D. L. (1999). Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. Cancer *86*, 2259-2265.

Capparuccia, L., and Tamagnone, L. (2009). Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. J Cell Sci *122*, 1723-1736.

Cardiff, R. D., and Kenney, N. (2007). Mouse mammary tumor biology: a short history. Adv Cancer Res *98*, 53-116.

Carter, S., Urbe, S., and Clague, M. J. (2004). The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. J Biol Chem *279*, 52835-52839.

Chaffer, C. L., Thompson, E. W., and Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. Cells Tissues Organs *185*, 7-19.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J *10*, 940-954.

Chan, A. M., Rubin, J. S., Bottaro, D. P., Hirschfield, D. W., Chedid, M., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. Science *254*, 1382-1385.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adelaide, J., Cervera, N., Fekairi, S., Xerri, L., Jacquemier, J., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2006). Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. Oncogene *25*, 2273-2284.

Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. J Cell Biol *177*, 151-162.

Cho, R. W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G. Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J., and Clarke, M. F. (2008). Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. Stem Cells *26*, 364-371.

Christensen, J. G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., *et al.* (2003). A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. Cancer Res *63*, 7345-7355.

Chu, I. M., Hengst, L., and Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat Rev Cancer *8*, 253-267.

Coltella, N., Rasola, A., Nano, E., Bardella, C., Fassetta, M., Filigheddu, N., Graziani, A., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (2006). p38 MAPK turns hepatocyte growth factor to a death signal that commits ovarian cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. Int J Cancer *118*, 2981-2990.

Comoglio, P. M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. Curr Opin Cell Biol *15*, 565-571.

Comoglio, P. M., Giordano, S., and Trusolino, L. (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. Nat Rev Drug Discov *7*, 504-516.

Da Silva, L., Clarke, C., and Lakhani, S. R. (2007). Demystifying basal-like breast carcinomas. J Clin Pathol *60*, 1328-1332.

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., and Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet *366*, 1784-1793.

Danilkovitch-Miagkova, A., and Zbar, B. (2002). Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. J Clin Invest *109*, 863-867.

Davis, B. J. (1964). Disc Electrophoresis. Ii. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann N Y Acad Sci *121*, 404-427.

Debnath, J., and Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. Nat Rev Cancer *5*, 675-688.

Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature *412*, 822-826.

Di Renzo, M. F., Olivero, M., Martone, T., Maffe, A., Maggiora, P., Stefani, A. D., Valente, G., Giordano, S., Cortesina, G., and Comoglio, P. M. (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. Oncogene *19*, 1547-1555.

Di Renzo, M. F., Olivero, M., Serini, G., Orlandi, F., Pilotti, S., Belfiore, A., Costantino, A., Vigneri, R., Angeli, A., Pierotti, M. A., and et al. (1995). Overexpression of the c-MET/HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium. J Endocrinol Invest *18*, 134-139.

Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. Blood *112*, 4793-4807.

Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., and Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. Development *126*, 1621-1629.

Dorak, M. T. (2006). Real-time PCR, (London: Taylor Francis).

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. Mol Cell Biol *7*, 379-387.

Duester, G. (1996). Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. Biochemistry *35*, 12221-12227.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J.*, et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science *316*, 1039-1043.

Fan, S., Gao, M., Meng, Q., Laterra, J. J., Symons, M. H., Coniglio, S., Pestell, R. G., Goldberg, I. D., and Rosen, E. M. (2005). Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. Oncogene *24*, 1749-1766.

Faria, T. N., Mendelsohn, C., Chambon, P., and Gudas, L. J. (1999). The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. J Biol Chem *274*, 26783-26788.

Ferracini, R., Di Renzo, M. F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M., and Comoglio, P. M. (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. Oncogene *10*, 739-749.

Ferracini, R., Olivero, M., Di Renzo, M. F., Martano, M., De Giovanni, C., Nanni, P., Basso, G., Scotlandi, K., Lollini, P. L., and Comoglio, P. M. (1996). Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. Oncogene *12*, 1697-1705.

Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdeux, V., Giordano, S., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. Mol Biol Cell *20*, 2495-2507.

Gallego, M. I., Bierie, B., and Hennighausen, L. (2003). Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenosquamous carcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways. Oncogene *22*, 8498-8508.

Galvani, A. P., Cristiani, C., Carpinelli, P., Landonio, A., and Bertolero, F. (1995). Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. Biochem Pharmacol *50*, 959-966.

Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M., and Comoglio, P. M. (1994). Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. J Biol Chem *269*, 1815-1820.

Garcia, S., Dales, J. P., Charafe-Jauffret, E., Carpentier-Meunier, S., Andrac-Meyer, L., Jacquemier, J., Andonian, C., Lavaut, M. N., Allasia, C., Bonnier, P., and Charpin, C. (2007). Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. Hum Pathol *38*, 830-841.

Garner, O. B., Bush, K. T., Nigam, K. B., Yamaguchi, Y., Xu, D., Esko, J. D., and Nigam, S. K. (2011). Stage-dependent regulation of mammary ductal branching by heparan sulfate and HGF-cMet signaling. Dev Biol *355*, 394-403.

Gentile, A., Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2008). The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. Cancer Metastasis Rev *27*, 85-94.

Ghoussoub, R. A., Dillon, D. A., D'Aquila, T., Rimm, E. B., Fearon, E. R., and Rimm, D. L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. Cancer *82*, 1513-1520.

Ghyselinck, N. B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C. B., Hakansson, H., Sauvant, P.*, et al.* (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. EMBO J *18*, 4903-4914.

Goncalves, A., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Audebert, S., Toiron, Y., Esterni, B., Monville, F., Tarpin, C., Jacquemier, J., Houvenaeghel, G.*, et al.* (2008). Protein profiling of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes. Mol Cell Proteomics *7*, 1420-1433.

Graveel, C. R., DeGroot, J. D., Su, Y., Koeman, J., Dykema, K., Leung, S., Snider, J., Davies, S. R., Swiatek, P. J., Cottingham, S.*, et al.* (2009). Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 12909-12914.

Gupta, P. B., Chaffer, C. L., and Weinberg, R. A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? Nat Med *15*, 1010-1012.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol *166*, 557-580.

Hanai, J., and Lin, M. (1990). Primary adenocarcinoma of the female urethra with three histologic patterns and partial AFP positivity. Acta Pathol Jpn *40*, 838-844.

Hennighausen, L., and Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 715-725.

Hu, X., Stern, H. M., Ge, L., O'Brien, C., Haydu, L., Honchell, C. D., Haverty, P. M., Peters, B. A., Wu, T. D., Amler, L. C.*, et al.* (2009). Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. Mol Cancer Res *7*, 511-522.

Huang, S. (2009). Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. Bioessays *31*, 546-560.

Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D., and Thompson, E. W. (2007). Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol *213*, 374-383.

Huh, C. G., Factor, V. M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E. A., and Thorgeirsson, S. S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 4477-4482.

Humphrey, P. A., Zhu, X., Zarnegar, R., Swanson, P. E., Ratliff, T. L., Vollmer, R. T., and Day, M. L. (1995). Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. Am J Pathol *147*, 386-396.

Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. J Cell Sci *122*, 3203-3208.

Jelisavac-Cosic, S., Sirotkovic-Skerlev, M., Kulic, A., Jakic-Razumovic, J., Kovac, Z., and Vrbanec, D. (2011). Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in patients with primary invasive ductal breast carcinoma - a 7.5-year follow-up study. Tumori *97*, 532-539.

Joffre, C., Barrow, R., Menard, L., Calleja, V., Hart, I. R., and Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. Nat Cell Biol *13*, 827-837.

Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science *298*, 1911-1912.

Jun, H. T., Sun, J., Rex, K., Radinsky, R., Kendall, R., Coxon, A., and Burgess, T. L. (2007). AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. Clin Cancer Res *13*, 6735-6742.

Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest *119*, 1420-1428.

Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, A., Yokoyama, S., Peng, Y. F., Nakano, K., Takaishi, K., and Takai, Y. (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. Oncogene *18*, 6776-6784.

Kao, J., and Pollack, J. R. (2006). RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. Genes Chromosomes Cancer *45*, 761-769.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer *2*, 301-310.

Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., and Mongan, N. P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. Stem Cells Dev *18*, 1093-1108.

Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2005). c-Met signalling: spatio-temporal decisions. Cell Cycle *4*, 352-355.

Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2008). Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. J Cell Biol *182*, 855-863.

Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P. J. (2003). Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. J Biol Chem *278*, 28921-28929.

Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P. J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. EMBO J *23*, 3721-3734.

Kijima, Y., Hokita, S., Yoshinaka, H., Itoh, T., Koriyama, C., Eizuru, Y., Akiba, S., and Aikou, T. (2002). Amplification and overexpression of c-met gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. Oncology *62*, 60-65.

Kim, K. J., Wang, L., Su, Y. C., Gillespie, G. Y., Salhotra, A., Lal, B., and Laterra, J. (2006). Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. Clin Cancer Res *12*, 1292-1298.

Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J., and Vasioukhin, V. (2004). Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. Cancer Cell *6*, 185-195.

Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E. A., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. Cancer Res *57*, 5391-5398.

Kordon, E. C., McKnight, R. A., Jhappan, C., Hennighausen, L., Merlino, G., and Smith, G. H. (1995). Ectopic TGF beta 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. Dev Biol *168*, 47-61.

Kraemer, P. M. (1971). Heparan sulfates of cultured cells. I. Membrane-associated and cell-sap species in Chinese hamster cells. Biochemistry *10*, 1437-1445.

Kraemer, P. M., and Tobey, R. A. (1972). Cell-cycle dependent desquamation of heparan sulfate from the cell surface. J Cell Biol *55*, 713-717.

Krepulat, F., Lohler, J., Heinlein, C., Hermannstadter, A., Tolstonog, G. V., and Deppert, W. (2005). Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. Oncogene *24*, 4645-4659.

Kricka, L. J. (1991). Chemiluminescent and bioluminescent techniques. Clin Chem *37*, 1472-1481.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lamorte, L., Kamikura, D. M., and Park, M. (2000). A switch from p130Cas/Crk to Gab1/Crk signaling correlates with anchorage independent growth and JNK activation in cells transformed by the Met receptor oncoprotein. Oncogene *19*, 5973-5981.

Lander, A. D. (2009). The 'stem cell' concept: is it holding us back? J Biol *8*, 70.

Lee, J. H., Han, S. U., Cho, H., Jennings, B., Gerrard, B., Dean, M., Schmidt, L., Zbar, B., and Vande Woude, G. F. (2000). A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. Oncogene *19*, 4947-4953.

Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol *172*, 973-981.

Lee, S. L., Huang, P. Y., Roller, P., Cho, E. G., Park, D., and Dickson, R. B. (2009). Matriptase/epithin participates in mammary epithelial cell growth and morphogenesis through HGF activation. Mech Dev *127*, 82-95.

Lengyel, E., Prechtel, D., Resau, J. H., Gauger, K., Welk, A., Lindemann, K., Salanti, G., Richter, T., Knudsen, B., Vande Woude, G. F., and Harbeck, N. (2005). C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. Int J Cancer *113*, 678-682.

Li, L., McCormack, A. A., Nicholson, J. M., Fabarius, A., Hehlmann, R., Sachs, R. K., and Duesberg, P. H. (2009). Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. Cancer Genet Cytogenet *188*, 1-25.

Liu, X., Yao, W., Newton, R. C., and Scherle, P. A. (2008). Targeting the c-MET signaling pathway for cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs *17*, 997-1011.

Liu, Y., Lee, M. O., Wang, H. G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J. C., and Zhang, X. (1996). Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. Mol Cell Biol *16*, 1138-1149.

Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L. G. (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. J Biol Chem *277*, 10452-10458.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods *25*, 402-408.

Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol *23*, 675-699.

Luo, J., Duggan, D. J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C. M., Bittner, M. L., Trent, J. M., and Isaacs, W. B. (2001). Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. Cancer Res *61*, 4683-4688.

Lutterbach, B., Zeng, Q., Davis, L. J., Hatch, H., Hang, G., Kohl, N. E., Gibbs, J. B., and Pan, B. S. (2007). Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. Cancer Res *67*, 2081-2088.

Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Catalona, W. J., Watson, M. A., and Milbrandt, J. (2001). Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. Cancer Res *61*, 5692-5696.

Maina, F., Pante, G., Helmbacher, F., Andres, R., Porthin, A., Davies, A. M., Ponzetto, C., and Klein, R. (2001). Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. Mol Cell *7*, 1293-1306.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell *133*, 704-715.

Maroun, C. R., Naujokas, M. A., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. Mol Cell Biol *20*, 8513-8525.

Mars, W. M., Jo, M., and Gonias, S. L. (2005). Activation of hepatocyte growth factor by urokinase-type plasminogen activator is ionic strength-dependent. Biochem J *390*, 311-315.

Mars, W. M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. (1993). Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. Am J Pathol *143*, 949-958.

Martens, T., Schmidt, N. O., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Merchant, M., Schwall, R., Westphal, M., and Lamszus, K. (2006). A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. Clin Cancer Res *12*, 6144-6152.

Matsumoto, B. (2002). Cell biological applications of confocal microscopy, 2nd ed. edn (Amsterdam ; London: Academic Press).

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2003). NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. Cancer Sci *94*, 321-327.

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2008). NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. Front Biosci *13*, 1943-1951.

May, C. D., Sphyris, N., Evans, K. W., Werden, S. J., Guo, W., and Mani, S. A. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. Breast Cancer Res *13*, 202.

Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Pennacchietti, S., Risio, M., Naldini, L., Comoglio, P. M., and Michieli, P. (2004). An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. J Clin Invest *114*, 1418-1432.

Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. Cancer Cell *6*, 61-73.

Miyazawa, K., Kitamura, A., Naka, D., and Kitamura, N. (1991). An alternatively processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene. Eur J Biochem *197*, 15-22.

Moise, A. R., Noy, N., Palczewski, K., and Blaner, W. S. (2007). Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. Biochemistry *46*, 4449-4458.

Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J. P., and Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. J Biol Chem *280*, 5350-5360.

Montesano, R., Soriano, J. V., Malinda, K. M., Ponce, M. L., Bafico, A., Kleinman, H. K., Bottaro, D. P., and Aaronson, S. A. (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. Cell Growth Differ *9*, 355-365.

Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. PLoS One *3*, e2888.

Muller, M., Morotti, A., and Ponzetto, C. (2002). Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. Mol Cell Biol *22*, 1060-1072.

Munshi, N., Jeay, S., Li, Y., Chen, C. R., France, D. S., Ashwell, M. A., Hill, J., Moussa, M. M., Leggett, D. S., and Li, C. J. (2010). ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. Mol Cancer Ther *9*, 1544-1553.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature *342*, 440-443.

Nakazawa, K., Dobashi, Y., Suzuki, S., Fujii, H., Takeda, Y., and Ooi, A. (2005). Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. J Pathol *206*, 356-365.

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

Naldini, L., Vigna, E., Bardelli, A., Follenzi, A., Galimi, F., and Comoglio, P. M. (1995). Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. J Biol Chem *270*, 603-611.

Napoli, J. L. (1997). Retinoid binding-proteins redirect retinoid metabolism: biosynthesis and metabolism of retinoic acid. Semin Cell Dev Biol *8*, 403-415.

Napoli, J. L., Posch, K. P., Fiorella, P. D., and Boerman, M. H. (1991). Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of cellular retinol-binding protein

(CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. Biomed Pharmacother *45*, 131-143.

Nath, D., Williamson, N. J., Jarvis, R., and Murphy, G. (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. J Cell Sci *114*, 1213-1220.

Nau, H., Blaner, W. S., and Agadir, A. (1999). Retinoids : the biochemical and molecular basis of Vitamin A and retinoid action, (Berlin ; London: Springer).

Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L., and Jahnen-Dechent, W. (2004). Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. Stem Cells *22*, 405-414.

Newcomer, M. E., Jamison, R. S., and Ong, D. E. (1998). Structure and function of retinoid-binding proteins. Subcell Biochem *30*, 53-80.

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L.*, et al.* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res *10*, 5367-5374.

Niranjan, B., Buluwela, L., Yant, J., Perusinghe, N., Atherton, A., Phippard, D., Dale, T., Gusterson, B., and Kamalati, T. (1995). HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. Development *121*, 2897-2908.

Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. Biochem J *348 Pt 3*, 481-495.

Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. Genes Dev *16*, 3074-3086.

Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. Ann N Y Acad Sci *121*, 321-349.

Osanai, M., Sawada, N., and Lee, G. H. (2009). Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. Oncogene *29*, 1135-1144.

Otto B., Heinlein C., Wegwitz F., Gruner K., Gevensleben H., Nollau P., Ylstra B., Pantel K., Schumacher U., Baumbusch L.O., Martin-Subero J.I., Siebert R.,Wagener C., Streichert T.,Deppert W., and Tolstonog G.V.(2012). „Conserved transcriptional regulators link mouse WAP-T mammary carcinomas with human breast cancer“.submitted.

Owen, K. A., Qiu, D., Alves, J., Schumacher, A. M., Kilpatrick, L. M., Li, J., Harris, J. L., and Ellis, V. (2009). Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. Biochem J *426*, 219-228.

Pacchiana, G., Chiriaco, C., Stella, M. C., Petronzelli, F., De Santis, R., Galluzzo, M., Carminati, P., Comoglio, P. M., Michieli, P., and Vigna, E. (2010). Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. J Biol Chem *285*, 36149-36157.

Park, W. S., Dong, S. M., Kim, S. Y., Na, E. Y., Shin, M. S., Pi, J. H., Kim, B. J., Bae, J. H., Hong, Y. K., Lee, K. S.*, et al.* (1999). Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. Cancer Res *59*, 307-310.

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z.*, et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol *27*, 1160-1167.

Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G., and et al. (1995). The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. Oncogene *10*, 1631-1638.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A.*, et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747-752.

Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. Mol Cell *8*, 995-1004.

Petrelli, A., Circosta, P., Granziero, L., Mazzone, M., Pisacane, A., Fenoglio, S., Comoglio, P. M., and Giordano, S. (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor

receptor down-regulation and hampers biological activity. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 5090-5095.

Piantedosi, R., Ghyselinck, N., Blaner, W. S., and Vogel, S. (2005). Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk. J Biol Chem *280*, 24286-24292.

Pipas, J. M. (2009). SV40: Cell transformation and tumorigenesis. Virology *384*, 294-303.

Pollack, A. L., Runyan, R. B., and Mostov, K. E. (1998). Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. Dev Biol *204*, 64-79.

Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer *9*, 265-273.

Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 33-45.

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

Ponzo, M. G., Lesurf, R., Petkiewicz, S., O'Malley, F. P., Pinnaduwage, D., Andrulis, I. L., Bull, S. B., Chughtai, N., Zuo, D., Souleimanova, M.*, et al.* (2009). Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A.

Ponzo, M. G., and Park, M. (2010). The met receptor tyrosine kinase and basal breast cancer. Cell Cycle *9*.

Potemski, P., Kusinska, R., Watala, C., Pluciennik, E., Bednarek, A. K., and Kordek, R. (2005). Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. Oncology *69*, 478-485.

Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A., and Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 15988-15993.

Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P., and Comoglio, P. (1991). C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. Mol Cell Biol *11*, 5954-5962.

Puri, N., Khramtsov, A., Ahmed, S., Nallasura, V., Hetzel, J. T., Jagadeeswaran, R., Karczmar, G., and Salgia, R. (2007). A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts. Cancer Res *67*, 3529-3534.

Que, W., Chen, J., Chuang, M., and Jiang, D. (2012). Knockdown of c-Met enhances sensitivity to bortezomib in human multiple myeloma U266 cells via inhibiting Akt/mTOR activity. APMIS *120*, 195-203.

Rahimi, N., Tremblay, E., McAdam, L., Park, M., Schwall, R., and Elliott, B. (1996). Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. Cell Growth Differ *7*, 263-270.

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., and Ellis, I. O. (2008). Basal-like breast cancer: a critical review. J Clin Oncol *26*, 2568-2581.

Rasola, A., Anguissola, S., Ferrero, N., Gramaglia, D., Maffe, A., Maggiora, P., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (2004). Hepatocyte growth factor sensitizes human ovarian carcinoma cell lines to paclitaxel and cisplatin. Cancer Res *64*, 1744-1750.

Recio, J. A., and Merlino, G. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. Oncogene *21*, 1000-1008.

Robinson, G. W., McKnight, R. A., Smith, G. H., and Hennighausen, L. (1995). Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. Development *121*, 2079-2090.

Robinson, G. W., Smith, G. H., Gallahan, D., Zimmer, A., Furth, P. A., and Hennighausen, L. (1996). Understanding mammary gland development through the imbalanced expression of growth regulators. Dev Dyn *206*, 159-168.

Rodrigues, G. A., Park, M., and Schlessinger, J. (1997). Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. EMBO J *16*, 2634-2645.

Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 4731-4735.

Rorth, P. (2009). Collective cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol *25*, 407-429.

Rosen, L. S., Senzer, N., Mekhail, T., Ganapathi, R., Chai, F., Savage, R. E., Waghorne, C., Abbadessa, G., Schwartz, B., and Dreicer, R. (2011). A phase I dose-escalation study of Tivantinib (ARQ 197) in adult patients with metastatic solid tumors. Clin Cancer Res *17*, 7754-7764.

Sablina, A. A., and Hahn, W. C. (2008). SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. Cancer Metastasis Rev *27*, 137-146.

Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Muller, T., Hulsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. J Cell Biol *150*, 1375-1384.

Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M. L., Becherer, J. D., Comoglio, P. M., Boccaccio, C., and Kruger, A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. J Biol Chem *285*, 26335-26340.

Schiavon, G., and Tonini, G. (2010). Hormone-biological therapy in breast cancer: preclinical evidences, clinical studies and future directions. Curr Cancer Drug Targets *10*, 3-18.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. Nature *373*, 699-702.

Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M.*, et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. Nat Genet *16*, 68-73.

Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, I., Neumann, H. P., Brauch, H., Decker, J.*, et al.* (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. Oncogene *18*, 2343-2350.

Schubert, K., Polte, T., Bonisch, U., Schader, S., Holtappels, R., Hildebrandt, G., Lehmann, J., Simon, J. C., Anderegg, U., and Saalbach, A. (2011). Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. Eur J Immunol *41*, 645-656.

Schulze-Garg, C., Lohler, J., Gocht, A., and Deppert, W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. Oncogene *19*, 1028-1037.

Scita, G., and Di Fiore, P. P. (2010). The endocytic matrix. Nature *463*, 464-473.

Seewaldt, V. L., Johnson, B. S., Parker, M. B., Collins, S. J., and Swisshelm, K. (1995). Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. Cell Growth Differ *6*, 1077-1088.

Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., and Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell *138*, 822-829.

Shapiro, H. M. (2003). Practical flow cytometry, 4th ed. edn (New York ; [Great Britain]: Wiley-Liss).

Si, S. P., Lee, X., Tsou, H. C., Buchsbaum, R., Tibaduiza, E., and Peacocke, M. (1996). RAR beta 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. Exp Cell Res *223*, 102-111.

Sirchia, S. M., Ren, M., Pili, R., Sironi, E., Somenzi, G., Ghidoni, R., Toma, S., Nicolo, G., and Sacchi, N. (2002). Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. Cancer Res *62*, 2455-2461.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M.*, et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med *344*, 783-792.

Smolen, G. A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W. J., Okimoto, R. A., Bell, D. W., Sgroi, D. C.*, et al.* (2006). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 2316-2321.

Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M., and Birchmeier, C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. J Cell Biol *123*, 223-235.

Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 609-622.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S.*, et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 10869-10874.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S.*, et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 8418-8423.

Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., and Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 10393-10398.

Sponsel, H. T., Breckon, R., Hammond, W., and Anderson, R. J. (1994). Mechanisms of recovery from mechanical injury of renal tubular epithelial cells. Am J Physiol *267*, F257-264.

Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (1994). The retinoids : biology, chemistry, and medicine, 2nd ed. edn (New York, N.Y.: Raven Press).

Stamey, T. A., Warrington, J. A., Caldwell, M. C., Chen, Z., Fan, Z., Mahadevappa, M., McNeal, J. E., Nolley, R., and Zhang, Z. (2001). Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia. J Urol *166*, 2171-2177.

Stepanova, V. V., and Tkachuk, V. A. (2002). Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. Biochemistry (Mosc) *67*, 109-118.

Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A., and Diamandis, E. P. (2004). Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. J Urol *171*, 187-191.

Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J. T., and Eaves, C. J. (2005). Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. J Mammary Gland Biol Neoplasia *10*, 49-59.

Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. Nature *327*, 239-242.

Taddei, M. L., Giannoni, E., Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2011). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. J Pathol *226*, 380-393.

Takayama, H., LaRochelle, W. J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S. A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 701-706.

Taniguchi, T., Toi, M., Inada, K., Imazawa, T., Yamamoto, Y., and Tominaga, T. (1995). Serum concentrations of hepatocyte growth factor in breast cancer patients. Clin Cancer Res *1*, 1031-1034.

Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G. P., and O'Brien, T. J. (1997). Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer. Cancer Res *57*, 2884-2887.

Taulli, R., Scuoppo, C., Bersani, F., Accornero, P., Forni, P. E., Miretti, S., Grinza, A., Allegra, P., Schmitt-Ney, M., Crepaldi, T., and Ponzetto, C. (2006). Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Res *66*, 4742-4749.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871-890.

Thompson, E. W., Newgreen, D. F., and Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? Cancer Res *65*, 5991-5995; discussion 5995.

Toulouse, A., Morin, J., Pelletier, M., and Bradley, W. E. (1996). Structure of the human retinoic acid receptor beta 1 gene. Biochim Biophys Acta *1309*, 1-4.

Triplett, A. A., Sakamoto, K., Matulka, L. A., Shen, L., Smith, G. H., and Wagner, K. U. (2005). Expression of the whey acidic protein (Wap) is necessary for adequate nourishment of the offspring but not functional differentiation of mammary epithelial cells. Genesis *43*, 1-11.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. Cell *107*, 643-654.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol *11*, 834-848.

Tsao, M. S., Zhu, H., Giaid, A., Viallet, J., Nakamura, T., and Park, M. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. Cell Growth Differ *4*, 571-579.

Tsuji, T., Ibaragi, S., and Hu, G. F. (2009). Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. Cancer Res *69*, 7135-7139.

Tuck, A. B., Park, M., Sterns, E. E., Boag, A., and Elliott, B. E. (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. Am J Pathol *148*, 225-232.

Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. Nature *373*, 702-705.

Vaillant, F., Asselin-Labat, M. L., Shackleton, M., Forrest, N. C., Lindeman, G. J., and Visvader, J. E. (2008). The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. Cancer Res *68*, 7711-7717.

van der Pluijm, G. (2010). Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. Bone *48*, 37-43.

Vigna, E., Pacchiana, G., Mazzone, M., Chiriaco, C., Fontani, L., Basilico, C., Pennacchietti, S., and Comoglio, P. M. (2008). "Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. Cancer Res *68*, 9176-9183.

Vogel, S., Mendelsohn, C. L., Mertz, J. R., Piantedosi, R., Waldburger, C., Gottesman, M. E., and Blaner, W. S. (2001). Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. J Biol Chem *276*, 1353-1360.

Wajih, N., Walter, J., and Sane, D. C. (2002). Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). Circ Res *90*, 46-52.

Wang, R., Ferrell, L. D., Faouzi, S., Maher, J. J., and Bishop, J. M. (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. J Cell Biol *153*, 1023-1034.

Wang, T., Ma, X., Krausz, K. W., Idle, J. R., and Gonzalez, F. J. (2008). Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. J Pharmacol Exp Ther *324*, 674-684.

Ward, R. J., and Dirks, P. B. (2007). Cancer Stem Cells: At the Headwaters of Tumor Development. Annu Rev Pathol *2*, 175-189.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics *25*, 1189-1191.

Watson, C. J., and Khaled, W. T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. Development *135*, 995-1003.

Wegwitz, F., Kluth, M. A., Manz, C., Otto, B., Gruner, K., Heinlein, C., Kuhl, M., Warnecke, G., Schumacher, U., Deppert, W., and Tolstonog, G. V. (2010). Tumorigenic WAP-T mouse mammary carcinoma cells: a model for a self-reproducing homeostatic cancer cell system. PLoS One *5*, e12103.

Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr., and Hampton, G. M. (2001). Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. Cancer Res *61*, 5974-5978.

WHO, 2008, GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cancer Information

Wolf, G. (2007). Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. Nutr Rev *65*, 385-388.

Wu, J. M., Fackler, M. J., Halushka, M. K., Molavi, D. W., Taylor, M. E., Teo, W. W., Griffin, C., Fetting, J., Davidson, N. E., De Marzo, A. M., *et al.* (2008). Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. Clin Cancer Res *14*, 1938-1946.

Xing, P., Li, J. G., Jin, F., Zhao, T. T., Liu, Q., Dong, H. T., and Wei, X. L. (2011). Clinical and biological significance of hepsin overexpression in breast cancer. J Investig Med *59*, 803-810.

Yamashita, J., Ogawa, M., Yamashita, S., Nomura, K., Kuramoto, M., Saishoji, T., and Shin, S. (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. Cancer Res *54*, 1630-1633.

Yang, X. M., Vogan, K., Gros, P., and Park, M. (1996). Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. Development *122*, 2163-2171.

Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K. M., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1995). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. J Cell Biol *131*, 215-226.

Yant, J., Buluwela, L., Niranjan, B., Gusterson, B., and Kamalati, T. (1998). In vivo effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on mouse mammary gland development. Exp Cell Res *241*, 476-481.

Yao, Y., Jin, L., Fuchs, A., Joseph, A., Hastings, H. M., Goldberg, I. D., and Rosen, E. M. (1996). Scatter factor protein levels in human breast cancers: clinicopathological and biological correlations. Am J Pathol *149*, 1707-1717.

Yehiely, F., Moyano, J. V., Evans, J. R., Nielsen, T. O., and Cryns, V. L. (2006). Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. Trends Mol Med *12*, 537-544.

Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. (1989). Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. Cancer Res *49*, 3314-3320.

Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI, Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: „Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010“.

Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest *119*, 1429-1437.

Zhang, Y. W., Graveel, C., Shinomiya, N., and Vande Woude, G. F. (2004). Met decoys: will cancer take the bait? Cancer Cell *6*, 5-6.

Zhang, Y. W., Wang, L. M., Jove, R., and Vande Woude, G. F. (2002). Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. Oncogene *21*, 217-226.

7. ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über das G-2 Zellkultur-System 4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Met-Rezeptors und seines Liganden Hgf und deren Interaktion 9
Abbildung 3: Wechselwirkungen von Met mit verschiedenen Adapterproteinen 11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Met-abhängigen MAPK-Signalwege 14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Met-abhängigen Pi3k-Signalwege 15
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Met-abhängigen Stat3-Signalwegs 15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Met-abhängigen Nfκb –Signalwegs 16
Abbildung 8: Endosomale Signalweiterleitung nach Clathrin-vermittelter Met-Internalisierung 18
Abbildung 9: Signalabbruch durch Rezeptor-Internalisierung oder gesteuerter Proteolyse 19
Abbildung 10: Die Rolle des Met-Signalweges in der Embryonalentwicklung 21
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Rolle von Met im adulten Organismus 23
Abbildung 12: Die Expression von Met während der verschiedenen Entwicklungsstadien der Mamma 24
Abbildung 13: Klassifizierung von Mammakarzinomen 28
Abbildung 14: Therapeutische Ansätze zur Inhibition des Met-Signalweges 30
Abbildung 15: Validierung der Microarray Expressionsanalyse der Gene Met, Hgf und der Met-Signaturgene im Vergleich zwischen *low-grade* und *high-grade* WAP-T Tumoren 79
Abbildung 16: Expression und Aktivität des Met-Rezeptors in *low*- und *high-grade* Tumoren sowie in der normalen Brustdrüse 82
Abbildung 17: Expression und Aktivität des Met-Rezeptors in parentalen und klonierten G-2 Zellen 85
Abbildung 18: Effekt von rekombinantem Hgf auf die Phosphorylierung des Met-Rezeptors in HeLa und G-2C9 Zellen 86
Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker in Met^+ und Met^-- Subpopulationen 89
Abbildung 20: Analyse der Expression der Met- und Thy1-Proteine in G-2C9 Zellen 91
Abbildung 21: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker in $Thy1^+$ und $Thy1^-$ Subpopulationen 93
Abbildung 22: Repopulationsstudie der Met^+ und Met^- Zellen nach 4 und 8 Tagen separater Kultivierung 95
Abbildung 23: Analyse der Hgf-Expression und der Met-Phosphorylierung in G-2C9 Zellen 98

Abbildung 24: Analyse der differentiellen Hgf-Expression in Met^+/Met^- bzw. $Thy1^+$/$Thy1^-$ Subpopulationen 100
Abbildung 25: Analyse der Met-Expression, Lokalisation und Aktivität in den Met^+ und Met^- Subpopulationen nach 3 und 5 Tagen separater Kultivierung 103
Abbildung 26: Met Reduktion nach lentiviraler Transduktion von shRNA gegen Met mRNA 107
Abbildung 27: Inhibition der Met Aktivität nach der Zugabe von PHA-665752 109
Abbildung 28: Einfluss der Met-Expression, Met-Inhibition und Reduktion auf das Proliferationsverhalten von G-2C9 Zellen 111
Abbildung 29: Einfluss der Met-Expression, Met-Inhibition und Met-Reduktion auf das verankerungsunabhängige Wachstum von G-2C9 Zellen 113
Abbildung 30: Einfluss der Met-Inhibition auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen 116
Abbildung 31: Einfluss der shRNA vermittelten Met Reduktion auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen 117
Abbildung 32: Einfluss der endogenen Met-Expression auf das Migrationsverhalten von G-2C9 Zellen 118
Abbildung 33: Vergleich der Migrationsformen und Verteilung des Met-Rezeptors in G-2C9 Zellen 119
Abbildung 34: Vergleichende Expressionsanalyse epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmarker nach Met-Inhibition bzw. shRNA vermitteltem Met-*knockdown* 123
Abbildung 35: Einfluss der Met-Inhibition und -Reduktion auf die Expression von Hgf und assoziierter Gene 125
Abbildung 36: Effekt der Met-Inhibition auf Menge und Verteilung des Met-Rezeptors 128
Abbildung 37: Vergleichende Expressionanalyse der Met-Signaturgene in Met^+/Met^-, PHA-665752/DMSO-Kontroll- und shMet/shscr Proben 131
Abbildung 38: Vergleichende Analyse der Rbp7-Proteinexpression nach Met-Inhibition bzw. shRNA vermitteltem Met-*knockdown* 133
Abbildung 39: Vergleichende Expressionsanalyse der Retinoid-Bindeproteine nach Met-Inhibition bzw. zwischen sortierten Met+ und Met- Zellen 135
Abbildung 40: Einfluss von RA bzw. RA und PHA-665752 auf den Differenzierungszustand der G-2C9 Zellen 138
Abbildung 41: Einfluss von RA bzw. RA und PHA-665752 auf den Differenzierungszustand der G-2C9 Zellen nach Langzeitexposition 141
Abbildung 42: Modell der Met-abhängigen Migration in G-2C9 Zellen 156
Abbildung 43: Modell des Retinsäuremetabolismus in Met- Zellen und nach Met-Inhibition 158
Abbildung 44: Modell des Retinsäuremetabolismus in Met^+Zellen 159

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die transfizierten Plasmide 58

Tabelle 2: Überblick über die Komponenten des cDNA-Synthese Ansatzes 68

Tabelle 3: Überblick über das zur cDNA-Synthese eingesetzte Temperaturprogramm 68

Tabelle 4: Überblick über die Komponenten einer Standard-PCR und deren Konzentration 69

Tabelle 5: Überblick über das Standard-PCR-Programm 69

Tabelle 6: Überblick über die Komponenten eines qRT-PCR Reaktions Ansatzes 71

Tabelle 7: Überblick über das qRT-PCR Programm 71

7.3 Abkürzungen

Abkürzung	**Bedeutung**
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
APC	Allophycocyanin
ATP	Andenosintriphosphat
BAD	*BCL-2 antagonist of cell death*
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	*Grad Celsius*
ca.	Zirka *(circa)*
Cbl	*casitas B-lineage lymphoma*
CCS	Tumorzellsystem (*cancer cell system*)
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*Copy* DNA
CLSM	Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie (c*onfocal laser scanning microscopy*)
cpk	*Creatin-Phosphokinase*
C-Terminus	*Carboxyl-Terminus*
d.h.	Das heißt
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylidol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotide
DRAQ5	1,5-bis([2-(di-methylamino) ethyl]amin)-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	*enhanced green fluorescent protein*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	*Epithelial cell adhesion molecule*
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
ESR1	Östrogenrezeptor-Alpha
et al	*et alii*
EtOH	Ethanol
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting*
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	*Forward scatter*

G	Guanosin
Gab1	*Grb2-associated binding protein1*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase 3β
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEPES	(N-2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
Her2/neu	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren 2
Hgf	*Hepatocyte growth factor*
Hpn	Hepsin
HRP	Peroxidase (*horse radish peroxidase*)
IgG	Immunglobulin G
IKK	IκB-Kinase
IPT	*immunglobuline-like fold shared by plexins and transcription factors)*
JMD	Juxtamembran-Domäne
JNK	c-JUN-N-terminalen Kinasen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSM	Laser-Scan-Mikroskopie (*laser scanning microscopy*)
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MBS	Met-Bindungsstelle
Mdm2	mouse double minute chromosome 2
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
Met	Rezeptortyrosinkinase Met
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTV	*Mouse mammary tumor virus*
mRNA	*Messenger RNA*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
NFκB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSCLC	*non-small cell lung cancer*
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*Phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PH	*Pleckstrin Homology*
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen-Proteinkinase B
PIP3	Phosphatydilinositol-3,4,5-Triphosphat
PSI	Plexin, Semaphorin, Integrin
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RA	Retinsäure
RAF	*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*
Ras	*Rat sarcoma*
rek.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sca1	*Stem cell antigen 1*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEMD	Sema-Domäne
Ser	Serin
SH2	*Src-homology-2*
Shc	*SH2 domain-containing transforming protein*
shRNA	short-hairpin RNA (RNA Interferenz)
SOS	*son of sevenless*
SSC	*Sideward scatter*
STAT	*signal transducers and activators of transcription*
SV40-LT	*Simian-Virus 40 large T antigen*
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA Elektrophoresepuffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEB	*terminal end bud*
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
Thy1	*Thymocyte differentiation antigen 1*
TIC	*tumor initiating cell*
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TNM	Tumor/Lymphknoten/Metastasen-Klassifizierung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSZ	Tumorstammzelle
TSZS	Tumorstammzell-System
Tyr	Tyrosin

U	Unit; Aktivitätseinheit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vim	Vimentin
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WAP	*whey acidic protein*
WHO	*world health organisation*
z.B.	*Zum Beispiel*

7.4 Sicherheitstechnische Daten

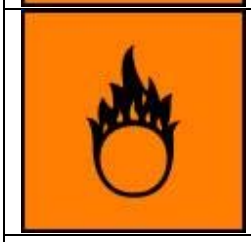
7.4.1 Gefahrenstoffe

Im Folgenden sind die Gefahrstoffe aufgelistet, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden. Für jeden Stoff sind die Sicherheitskodierung sowie die H-Sätze (*hazard statements*) und P-Sätze (*precautionary statements*) nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS, *Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*) aufgeführt.

Substanz	GHSKodierung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 261, 305+351+338
Acrylamid	GHS06/08	H301, 312, 315, 317, 319, 332, 340, 350, 361f, 372	P201, 281, 301+310, 302+352, 304+340, 305+351+338
Actinomycin D	GHS06	H300	P264, 270, 301+310, 321, 330
APS	GHS03/07/08	H272, 302, 319, 335, 334, 317	P280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Bisacrylamid	GHS07	H302	P264, 270, 301+312, 330
Chloroform	GHS07/08	H351, 302, 373, 315	P302+352, 314
DEPC	GHS07	H302, 315, 319, 332, 335	P280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351+338
DTT	GHS07	H302, 315, 319, 332, 335	P280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351+338, 332+313
EDTA	GHS07	H319	P264, 280, 305+351+338, 337+313
Essigsäure	GHS02/05/07	H226, 332, 302, 314, 335	P280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol	GHS02	H225	P210, 240, 243, 280, 303+361+353
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 304+P340
Formaldehydlsg. 37%	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 317, 331, 335, 351, 370	P280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338
Isoamylalkohol	GHS02/07	H226, 332, 335	P210, 304+340
Isopropanol	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 233, 305+351+338

Substanz	GHSKodierung	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercaptoethanol	GHS05/06/09	H: 301-310-330-315-318-410	P: 280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310
Methanol	GHS02/06/08	H225, 301, 311, 331, 370	P243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Natriumdodecylsulfat	GHS02/06	H: 228-311-302-335-315-319	P: 210-280-304+340-305+351+338-309+310
Natriumazid	GHS06/09	H300, 410	P273
Natrium-Desoxycholat	GHS07	H302	
Natriumhydroxid	GHS05	H314, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
N-Lauroylsarcosin	GHS06/07	H330, 315, 319, 317	P280, 304+340, 302+350, 305+351+338
Paraformaldehyd	GHS02/07/08	H228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	P202, 280, 302+352, 305+351+338, 308+313, 362
Phenol	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 331, 341, 373	P261, 280, 301+310, 305+351+338, 310
Puromycin	GHS07	H302	
Salzsäure 37 %	GHS05/07	H314, 335, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
SDS	GHS02/06	H228, 302, 311, 315, 319, 335	P210, 261, 280, 305+351+338
TEMED	GHS02/05/07	H225, 302, 314, 332	P243, 260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340
Triton X-100	GHS05/07	H302, 318	P280, 305+351+338
Trizma Base	GHS07	H315, 319, 335	P261, 305+351+338
Trypanblau	GHS08	H350	P201, 308+313
β-Mercaptoethanol	GHS05/06/09	H301, 310, 315, 317, 318, 330, 400, 410	P262, 280, 301+310, 302+350, 305+351+338, 363
Xylol	GHS02/07	H 226-332-312-315	P 210-302+352+302+352 210-302+352

7.4.2 Liste der alten Gefahrensymbole und GHS-Piktogramme

Gefahrensymbol	Zeichen	Bedeutung	GHS-Piktogramm	Bedeutung GHS-Kodierung
	E	Explosionsgefährlich		Explosionsgefährlich GHS01
	F+	Hochentzündlich		Entzündlich GHS02
	F	Leichtentzündlich		Entzündlich GHS02
	O	Brandfördernd		Brandfördernd GHS03
kein Symbol				Unter Druck stehende Gase GHS04
	C	Ätzend		Ätzend GHS05
	T+	Sehr giftig		Giftig GHS06
	T	Giftig		Giftig GHS06

Gefahrensymbol	Zeichen	Bedeutung	GHS-Piktogramm	Bedeutung GHS-Kodierung
	Xi	**Reizend**		**Reizend GHS07**
	Xn	**Gesundheitsschädlich**		**Gesundheitsschädlich GHS08**
	N	**Umweltgefährlich**		**Umweltschädlich GHS09**

7.4.3 Verzeichnis der H- und P-Sätze

7.4.3.1 H-Sätze (hazard statements)

H200-Reihe: Physikalische Gefahren

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228 Entzündbarer Feststoff.
H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301 Giftig bei Verschlucken.
H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311 Giftig bei Hautkontakt.
H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315 Verursacht Hautreizungen.
H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318 Verursacht schwere Augenschäden.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H331 Giftig bei Einatmen.
H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335 Kann die Atemwege reizen.
H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340 Kann genetische Defekte verursachen.
H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350 Kann Krebs erzeugen.
H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370 Schädigt die Organe.
H371 Kann die Organe schädigen.
H372 Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373 Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.

H400-Reihe: Umweltgefahren

H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

7.4.3.2 P-Sätze (precautionary statements)

P200-Reihe: Prävention

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210 Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten.Nicht rauchen.
P233 Behälter dicht verschlossen halten.
P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264 Nach Gebrauch … gründlich waschen.
P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P300-Reihe: Reaktion

P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P321 Besondere Behandlung.
P330 Mund ausspülen.
P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

7.5 Protein-*Alignment* der Sequenzierungen der TKD, JMD SEMD

```
                10        20        30        40        50        60
G-2C9   m-------------------------------------------------IQNVVLHGHHIYLGATNYIY
Met     m-------------------------------------------------IQNVVLHGHHIYLGATNYIY

                80        90       100       110       120       130       140
G-2C9   VLNDKDLQKVSEFKTGPVLEHPDCLPCRDCSSKANSSGGVWKDNINMALLVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQ
Met     VLNDKDLQKVSEFKTGPVLEHPDCLPCRDCSSKANSSGGVWKDNINMALLVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQ

               150       160       170       180       190       200       210
G-2C9   RHVLPPDNSADIQSEVHCMFSPEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPPGYSLHSI
Met     RHVLPPDNSADIQSEVHCMFSPEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPPGYSLHSI

               220       230       240       250       260       270       280
G-2C9   SVRRLKETQDGFKFLTDQSYIDVLPEFQDSYPIKYIHAFESNHFIYFLTVQKETLDAQTFHTRIIRFCSVD
Met     SVRRLKETQDGFKFLTDQSYIDVLPEFQDSYPIKYIHAFESNHFIYFLTVQKETLDAQTFHTRIIRFCSVD

               290       300       310       320       330       340       350
G-2C9   SGLHSYMEMPLECILTEKRRKRSTREEVFNILQAAYVSKPGANLAKQIGASPSDDILFGVFAQSKPDSAEP
Met     SGLHSYMEMPLECILTEKRRKRSTREEVFNILQAAYVSKPGANLAKQIGASPSDDILFGVFAQSKPDSAEP

               360       370       380       390       400       410       420
G-2C9   VNRSAVCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARSDEYRTEFTTALQRV
Met     VNRSAVCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARSDEYRTEFTTALQRV

               430       440       450       460       470       480       490
G-2C9   DLFMGRLNQVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVLSRTAHLTPHVNFLLD----------------
Met     DLFMGRLNQVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVLSRTAHLTPHVNFLLD----------------

               500       510       520       530       540       550       560
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               570       580       590       600       610       620       630
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               640       650       660       670       680       690       700
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               720       730       740       750       760       770
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               790       800       810       820       830       840       850
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               860       870       880       890       900       910       920
G-2C9   ------------------------------------------------------------------------
Met     ------------------------------------------------------------------------

               930       940       950       960       970       980       990
G-2C9   ----------------------------------------------RYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMV
Met     ----------------------------------------------RYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMV

              1000      1010      1020      1030      1040      1050      1060
G-2C9   SNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQVQYPLTDLSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQ
Met     SNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQVQYPLTDLSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQ

              1070      1080      1090      1100      1110      1120      1130
G-2C9   HVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIEEVSQFLTEGIIMKDFSHPN
Met     HVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIEEVSQFLTEGIIMKDFSHPN

              1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
G-2C9   VLSLLGICLRSEGSPLVVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARN
Met     VLSLLGICLRSEGSPLVVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARN

              1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270
G-2C9   CMLDEKFTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRG
Met     CMLDEKFTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRG

              1280      1290      1300      1310      1320      1330      1340
G-2C9   APPYPDVNTFDITIYLLQGRRLLQPEYCPDALYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISSIFSTFIGEHYVH
Met     APPYPDVNTFDITIYLLQGRRLLQPEYCPDALYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISSIFSTFIGEHYVH

              1350      1360      1370
G-2C9   VN-------------------------------t
Met     VN-------------------------------t
```

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit dieses spannende Thema zu bearbeiten. Die zahlreichen Diskussionen im Rahmen regelmäßiger Seminare und Gespräche haben grundlegend zur erfolgreichen Entwicklung und Vollendung meiner Arbeit beigetragen. Ihr Durchblick hat mir immer geholfen, die Dinge im richtigen Moment auf das Wesentliche zu beschränken.

Herrn Prof. Dr. Hahn danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation

Ebenso möchte ich den Fragestellern meiner Disputation, Frau Prof. Dr. med. Elke Oetjen (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) sowie Herrn Dr. Thomas Hackl (Abteilung Organische Chemie, Universität Hamburg) herzlich danken.

Ein riesiger Dank geht an Dr. Genrich Tolstonog für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit! Vielen Dank für den unermüdlichen Einsatz, die Unterstützung, die unglaubliche wissenschaftliche Begeisterung und die Bereitschaft viele freie Stunden für meine Arbeit zu Opfern. Es war mir eine Ehre mit Dir das Büro (auch der Wandschrank genannt) teilen zu dürfen.

Und nun zu Euch, meinen lieben Kollegen und auch Freunden. Ihr habt die beste, lustigste und spannendste Arbeitsatmosphäre geschaffen die man sich nur vorstellen kann. Ich danke den „Damen“, Marion, Gabi, Martina und Gundula für wissenschaftlichen und seelischen Beistand sowie den wunderbaren Kaffeerunden. Den „jungen Wilden“, Andy, Eva, Annette, Jara, Florian, Timo und Claudia für nette Gespräche, gemeinsame Weihnachtsfeiern und lustige, außerberufliche Aktivitäten. Nicht zuletzt danke ich der guten Doris für ihre unergründlichen Geschichten, ihren Humor und ihr offenes Ohr und Herrn Bohn der mich mit seinem ganz eigenen Humor immer zum Schmunzeln bringen konnte.

An dieser Stelle seien meine lieben Freunde erwähnt die mich immer in die „Welt da draußen“ zurückgeholt haben und mit denen ich die Welt erkunden konnte. An erster Stelle, meine beste Freundin Swantje als eine der Vietnam-Mädels sowie Jule und Jenny mit denen mich weit mehr als diese wunderbare Reise verbindet. Ganz lieben Dank auch an Jule und Christian für die vielen

schönen Abende und nicht zuletzt auch an Annette und Sebastian die mich beide von Beginn meines Studiums bis zur Promotion als sehr gute Freunde begleitet haben.

Der größte Dank gilt aber sicherlich meiner Familie, meinen lieben Eltern und meiner großen Schwester Christiane. Alle drei zusammen haben mich immer und in jeglicher, erdenklicher Weise unterstützt. Ich hätte keine wunderbarere und liebevollere Familie haben können. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Andreas, dem Andy, für, für, für…….für einfach Alles! Am Rande erwähnt sei zunächst einmal Deine großartige Hilfe im Labor, bei wissenschaftlichen Diskussionen und bei der Erstellung meiner Arbeit. An zentraler Stelle möchte ich Dir jedoch für Deine wunderbare Art, Deinen unschlagbaren Humor und Deine liebevolle Unterstützung danken. Ich freue mich darauf mit Dir auch den Rest der Welt zu erkunden.
Am Ende ist alles gut und wenn es nicht gut ist, dann ist es nicht das Ende.