

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Hans Marquardt

***Rolle der ERK/MAP-Kinasen und des Egr-1-  
Transkriptionsfaktors in der TPA-induzierten  
monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Julia Schwabe

aus Hamburg

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 13. Dezember 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Marquardt

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. A. Schaefer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD. Dr. M. de Wit

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Vorwort</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
3.1	Die MAP-Kinasen.....	9
3.1.1	Die ERK-Kaskade.....	10
3.1.2	Ras als Verbindungsmolekül .....	10
3.1.3	Aktivierung der ERK-Kaskade über die Proteinkinase C .....	11
3.1.4	JNK und p38/MAP-Kinasen.....	13
3.1.5	Transkriptionsfaktoren setzen das Signal im Zellkern um .....	16
3.1.6	Inaktivierung der MAP-Kinasen.....	17
3.2	MAP-Kinasen und Differenzierung.....	18
3.2.1	ERK/MAP-Kinasen und die megakaryozytäre Differenzierung .....	19
3.2.2	Aktivierung von Raf und MAPK während der monozytären Differenzierung .....	21
3.2.3	ERK/MAP-Kinasen und die erythroide Differenzierung .....	24
3.2.4	Zusammenfassung .....	25
3.3	Das Early growth response-1 Gen .....	26
3.3.1	Der Egr-1-Transkriptionsfaktor .....	26
3.3.2	Egr-1 und seine Wirkung in myeloiden Zellen.....	27
3.3.3	Egr-1 und seine Wirkung in erythromegakaryozytären Zellen .....	29
3.3.4	Zusammenfassung .....	31
3.4	ERK/MAP-Kinasen und Egr-1 .....	31
3.5	Die Testsubstanzen .....	32
3.5.1	TPA (PMA).....	32
3.5.2	Erythropoetin .....	33
3.5.3	UO126.....	33
3.5.4	PD 98059 .....	34
3.5.5	SB 203580.....	36
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
4.1	Methoden zur Handhabung der HL-60 Zellen.....	38
4.1.1	Zellkultur .....	38
4.1.2	Einfrieren von HL-60 Zellen in Flüssigstickstoff.....	38
4.2	Methoden zur Analyse von Proteinen.....	39
4.2.1	Der Western Blot .....	39
4.2.2	Proteinisolierung.....	39
4.2.3	Bestimmung des Proteingehaltes .....	40
4.2.4	Gelelektrophorese und Wet-Blot .....	40
4.3	Methoden zur Analyse der RNA .....	42
4.3.1	Northern Blot .....	42
4.3.2	Isolierung der RNA.....	42
4.3.3	Photometrische Bestimmung des RNA Gehaltes .....	43
4.3.4	Glyoxalisierung und Elektrophorese .....	43
4.3.5	Blot.....	43
4.3.6	Hybridisierung .....	44

4.4	Methoden zur Beurteilung von Differenzierung.....	45
4.4.1	Pappenheimfärbung .....	45
4.4.2	$\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung.....	45
4.4.3	2,7-Diaminoflouren-Färbung.....	46
4.5	Konzentrationen.....	47
4.5.1	Western Blot .....	47
4.5.2	Northern Blot .....	48
4.5.3	Morphologie.....	49
4.6	Geräte.....	49
4.7	Materialien.....	49
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
5.1	Molekularbiologischen Untersuchungen zur Wirkung von TPA auf die ERK-Kaskade und die egr-1-Expression in HL-60 Zellen .....	53
5.1.1	Auswirkungen verschiedener TPA-Konzentrationen auf die ERK/MAP-Kinase, die egr-1-Expression und die Synthese des Transkriptionsfaktors .....	53
5.1.2	Zeitlicher Aspekt der TPA-Effekte auf die ERK-Kaskade, egr-1-Expression und Egr-1-Synthese.....	56
5.1.3	Suppression der ERK-Phosphorylierung durch PD 98059.....	59
5.1.4	Suppression der ERK-Kaskade durch UO126.....	62
5.1.5	Untersuchungen zu den Wirkungen von SB 203580 auf die ERK-Kaskade, egr-1-Expression und Synthese des Transkriptionsfaktors.....	65
5.1.6	Wirkung von DMSO und der Kombination von TPA und DMSO auf die Egr-1-Synthese .....	70
5.2	Zytologische Untersuchung zur Differenzierung von HL-60 Zellen.....	72
5.2.1	Beurteilung der Differenzierung nach Induktion mit TPA, DMSO und den MEK-Inhibitoren.....	72
5.3	ERK, Egr-1 und Differenzierung in ELM-I-1 Zellen .....	79
5.3.1	Untersuchung zur Differenzierung von ELM-I-1 Zellen bei Behandlung mit Epo, UO126 und SB 203580 .....	80
5.3.2	Egr-1-Expression bei Einsatz von UO126 und SB 203580.....	81
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
6.1	Bedeutung der durch TPA über die ERK-Kaskade aktivierten egr-1-Genexpression für die Differenzierung von HL-60 Zellen.....	85
6.2	Rolle von p38 in der Aktivierung von ERK .....	89
6.3	Vergleich der myeloiden und der erythroiden Differenzierung.....	90
6.4	Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zu diesem Thema.....	93
6.5	Bedeutung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen für die Medizin .....	94
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>114</b>
9.1	Abkürzungen.....	114
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	116
9.3	Lebenslauf.....	117
9.4	Danksagung .....	118
9.5	Eidesstattliche Versicherung.....	118

# 1 Vorwort

Neben den Herz- und Kreislauferkrankungen gehören Neoplasien zu den häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt. Sie stellen eine große Herausforderung für die Medizin, die Forschung und den Sozialstaat dar. Obwohl diese Erkrankung schon seit Menschengedenken existiert, wächst das Wissen über dieses vielfältige Krankheitsbild nur langsam. Die bisherigen Therapien zur Behandlung des Krebsleidens, wie Chemotherapie und Bestrahlung, sind dabei keineswegs kausal, vielmehr beruhen sie auf langjährigen Erfahrungen der Mediziner. In den letzten Jahren hat die moderne Molekularbiologie viele Erkenntnisse über die Genese von Tumoren und somit Angriffspunkte für gezieltere Therapieansätze geliefert.

Tumoren entstehen durch exogene Einflüsse physikalischer, chemischer und biologischer Art, die zu einer Schädigung der DNA führen. Man geht davon aus, dass mehrere Schäden zusammen kommen müssen, um eine Zelle zur Tumorzelle zu transformieren. Diese Zelle unterliegt nicht mehr der Kontrolle durch den Organismus, d.h. sie wächst und teilt sich unkontrolliert. Das Wachstum ist dann invasiv, denn es kommt durch den Tumorklon zur Auflösung von benachbarten Gewebestrukturen und bei Einbruch in Blut- und Lymphgefäße auch zur Metastasierung und Destruktion weiter entfernt gelegener Organe. Die Tumorzellen, die sich im Körper verbreiten, sind je nach Art des Tumors mehr oder weniger stark entdifferenziert, d.h. die Zellen können nicht mehr ihrer ursprünglichen Aufgabe im Gewebeverband nachkommen und hindern stattdessen die gesunden Körperzellen in ihrer Funktion (*Löffler und Petrides, 1998*). Neben diesem Modell der Entdifferenzierung von Zellen zur Entstehung von Krebs geht ein anderes von einer Blockade in der Differenzierung von Stammzellen aus. Dieses gilt z.B. für die Genese von Leukämien. Dort sind die entarteten Blutzellen je nach Art der Leukämie in einem unterschiedlich weiten Stadium der Differenzierung arretiert (*Olsson et al., 1996*). Unter physiologischen Umständen bildet eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle den Ursprung aller hämatopoetischen Zellen. Während sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt, gehen aus ihr zusätzlich Tochterzellen hervor, die unter Einfluss verschiedener Zytokine, wie der Colony Stimulating Factors (CSF) und Interleukine (IL), über Vorstufen zu Erythrozyten, Leukozyten und Lymphozyten reifen. Diese erfüllen für eine begrenzte Zeit ihre Aufgaben im Organismus, um dann dem programmierten Zelltod zu unterliegen. Beide hier

dargestellten Modelle für die Genese von Neoplasien, das der Entdifferenzierung von reifen Zellen und das des Arrests in der Differenzierung von Stammzellen, schließen sich nicht aus, sondern können jeweils der Entstehung von unterschiedlichen Tumoren zugrunde liegen (*Olsson et al., 1996; Sell, 1993*).

Genotypische Veränderungen von Zellen, wie strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen, können mit der Aktivierung von Protooncogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verbunden sein. Protooncogene sind normale zelluläre Gene, die für Proteine kodieren, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation spielen. Klassische Protooncogen-Produkte sind Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, intrazelluläre Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren. Die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen hingegen üben eine inhibitorische Funktion auf das Zellwachstum aus. Sowohl die Aktivierung von Protooncogenen als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen münden für die Zellen in einen Verlust des kontrollierten Wachstums. Dieses wird normalerweise durch Bindung von Wachstumsfaktoren an entsprechende Rezeptoren gesteuert, wodurch eine intrazelluläre Signaltransduktionskette aktiviert wird, welche wiederum das Signal über Transkriptionsfaktoren an den Zellkern weiterleitet. Am Ende dieses Prozesses führt eine veränderte Genexpression zum Wachstum der Zelle. Eine Fehlregulation der Genexpression von an diesem Vorgang beteiligten Komponenten oder ein verändertes Genprodukt führen dazu, dass auch ohne den entsprechenden Reiz eines Wachstumsfaktors eine dauerhafte Stimulation dieser Einheit gegeben ist. Daraus resultiert eine vom Organismus nicht mehr kontrollierbare Proliferation und die Entstehung von Tumoren wird nun möglich. Ursache für die Dauerstimulation ist die fehlgeleitete Regulation von Protooncogenen, die damit zu Oncogenen geworden sind (*Löffler und Petrides, 1998*).

Grundsätzliche Mechanismen für die Entstehung von Oncogenen aus Protooncogenen sind Amplifikation, Punktmutation und Translokation. Aufgrund dieser Veränderungen wird das Genprodukt entweder quantitativ oder qualitativ verändert exprimiert (*Löffler und Petrides, 1998*).

Es gibt einige Beispiele von Tumoren, bei denen man Mutationen von Protooncogen festgestellt hat. So zeigen Untersuchungen, dass ca. 85% der Pankreaskarzinome eine

Mutation der *ras*-Oncogenfamilie, welche zur Gruppe der intrazellulären Signalüberträger gehört, aufweisen (Friess *et al.*, 1996; Sirivatanauksorn *et al.*, 1998). Die Amplifikation des *erbB2/neu/HER-2*-Oncogens, welches für einen Rezeptor kodiert und in 25-30% der Mamma-Neoplasien nachweisbar ist, korreliert wiederum mit einer schlechten 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen mit Brustkrebs (Hynes *et al.*, 1989; Slamon *et al.*, 1989). 80-90% der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) besitzen das Philadelphia Chromosom, welches ebenfalls bei Disomie mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht wird. Es entsteht durch reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Das auf Chromosom 22 innerhalb einer beschränkten Region entstehende rekombinante Gen wird *bcr* (break point cluster region) -*abl* (Homolog des Abelson-Leukämie-Virus) genannt. Sein Fusionsprotein besitzt eine verstärkte Tyrosinkinaseaktivität (Shtivelman *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1988).

Die durch die Molekularbiologie gewonnene Erkenntnis, dass Neoplasien entstehen, wenn es zur Fehlregulation von Komponenten kommt, die an der Signaltransduktion von Wachstumssignalen beteiligt sind, ist wichtig für die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen. Ein interessantes Ziel für chemotherapeutische Interventionen stellt z.B. die Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionskaskade dar (Weinstein-Oppenheimer *et al.*, 2000; Sebolt-Leopold, 2000). Innerhalb der verschiedenen Transduktionsketten bieten sich unterschiedliche Angriffspunkte für Pharmaka an. So wird zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie seit 2002 ein Tyrosinkinaseinhibitor der BCR-ABL-Kinase, Imatinib (=STI571), eingesetzt, welcher diese Krankheit für einige Zeit erfolgreich aufzuhalten vermag (Buchdunger *et al.*, 1996; Druker *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002). Für Brustkrebspatientinnen mit einer Mutation des HER2-Neu/c-erbB-2-Rezeptors bietet ein seit 1998 zugelassener Antikörper, Trastuzumab, welcher an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet, eine viel versprechende therapeutische Option. In Phase III klinischer Studien war festzustellen, dass dieser Antikörper in Kombination mit einem Chemotherapeutikum die Überlebenszeit zu verlängern vermochte (Goldenberg, 1999; Goldhirsch *et al.*, 1998; Albanell und Baselga, 1999). Ebenfalls zukunftssträftig erscheint die Inhibition der dualspezifischen Serin/Threonin-Kinasen MEK1/2 (Milella *et al.*, 2001), da ein hoch potenter und selektiver MEK-Inhibitor das Wachstum von Kolonkarzinomen menschlicher und tierischer Herkunft um 80% zu senken vermochte (Sebolt-Leopold *et al.*, 1999). Aus diesem Grund

befinden sich die spezifischen MEK-Inhibitoren UO126 und PD 185243 in der klinischen Prüfung (*Dancey und Sausville, 2003*). Nicht nur in der Onkologie erweisen sich MEK-Inhibitoren als hilfreich, sondern auch in der Therapie von neuropathischen Schmerzen deuten sich Vorteile einer Suppression der ERK-Kaskade durch PD 198306 an (*Ciruela et al., 2003*). Neben der ERK/MAPK-Kaskade erweist sich die p38/MAPK als interessantes Ziel medikamentöser Intervention in der Behandlung von rheumatischen Erkrankungen. Eine Hemmung der p38-Kinase senkt in Makrophagen die Produktion von TNF und anderen inflammatorischen Zytokinen, welche eine Schlüsselrolle in der Genese entzündlicher Erkrankungen einnehmen (*Regan et al., 2002; Branger et al., 2002*). Bei all diesen viel versprechenden Entwicklungen sollte jedoch nicht vergessen werden, dass die verschiedenen Signaltransduktionskaskaden auf hoch komplexe Weise miteinander vernetzt sind. Da sich das Ausmaß dessen bisher nur ansatzweise abzeichnet, kann die Inhibition einer Kinase zu nicht vorhersehbaren Effekten auf andere Signaltransduktionswege führen. Aber auch die Vielfalt an Prozessen, die von den jeweiligen Kaskaden gesteuert werden, birgt die Gefahr zahlreicher Nebenwirkungen bei der Einnahme solcher Inhibitoren. So könnte z.B. eine Hemmung von MEK durch Inhibitoren im Rahmen der Chemotherapie von Tumoren oder der Behandlung von neuropathischen Schmerzen unter Umständen Auswirkungen auf die Hämatopoese haben.

Vor diesem Hintergrund soll die nun folgende Arbeit, welche die Rolle und das Zusammenspiel zwischen ERK/MAPK und dem Egr-1-Transkriptionsfaktor in der monozytären Differenzierung von humanen HL-60 Leukämiezellen untersucht, ein kleines Mosaiksteinchen in den großen und bei weitem noch nicht geklärten Komplex von der Genese und Therapie von Tumorerkrankungen hinzufügen.

## 2 Fragestellung

Der Krebs der weißen Blutzellen, die Leukämie, entsteht durch einen Arrest der Reifung von aus pluripotenten Stammzellen hervorgehenden Tochterzellen (*Olsson et al., 1996*). Durch die Vielzahl der einzelnen Entwicklungsstufen, die eine Vorläuferzelle auf ihrem Weg zur terminalen Differenzierung durchläuft, sind ebenso viele Ebenen denkbar, auf denen die Blockade erfolgen kann. Eine dieser Leukämiezelllinien stellen HL-60 Zellen dar, die von einem Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie isoliert wurden, und hier als Zellmodell für Versuche dienen (*Gallagher et al., 1979*). Sie sind in einem frühen Stadium der Differenzierung arretiert, besitzen jedoch die Fähigkeit unter entsprechender Stimulation zu Monozyten oder Granulozyten auszureifen. Durch welche intrazellulären Prozesse die monozytäre Reifung der HL-60 Zellen unter TPA, einem bekannten Induktor der monozytären Differenzierung, induziert wird, soll Gegenstand dieser Dissertation sein.

Bereits veröffentlichte Forschungsergebnisse zeigen auf, dass ERK/MAP-Kinasen an Differenzierungsvorgänge von hämatopoetischen Zellen beteiligt sind. In HL-60 und U937 Zellen leitet die Aktivierung der ERK-Kaskade die monozytäre Differenzierung (*Kharbanda et al., 1994; Okuma et al., 2002*) und in K562 und CMK Zellen die megakaryozytäre Differenzierung ein (*Whalen et al., 1997; Melemed et al., 1997*).

Weitere Darstellungen bringen den Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1 in Zusammenhang mit der Induktion der monozytären Differenzierung von HL-60, U937 und M1 Zellen sowie der megakaryozytären Ausdifferenzierung von K562 Zellen (*Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1998; Cheng et al., 1994*). Die Mechanismen, welche diesen Transkriptionsfaktor bei der Induktion der Differenzierung aktivieren, sind in bisherigen Arbeiten jedoch nicht untersucht worden.

Die vorangegangenen Aussagen über die monozytäre Reifung verschiedener myeloischer Zellen sollen miteinander in Einklang gebracht werden und zwar in der Hinsicht, dass eine Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade die Aktivierung des *egr-1*-Gens zur Folge hat und beide Komponenten über dieses Zusammenspiel für die monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen verantwortlich sind. Die folgenden Ausführungen gehen einerseits genauer auf die bestehenden Forschungsergebnisse ein

und andererseits sollen die Ergebnisse eigener Untersuchungen die obige Hypothese bestätigen.

## 3 Einleitung

### 3.1 Die MAP-Kinasen

MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Kaskaden finden sich in allen eukaryotischen Zellen. Sie bestehen aus einem Modul von Enzymen, die nacheinander geschaltet sind und das entscheidende Bindeglied des Informationsflusses zwischen der Zellmembran und dem Zellkern darstellen (*Lewis et al., 1998*). Die Bedeutung der Kinasen liegt in der intrazellulären Signaltransduktion von an der Membran ankommenden extrazellulären Signalen zum Zellkern. Hier werden die Signale in Form einer veränderten Genexpression umgesetzt, welche Einfluss auf den Stoffwechsel und das Schicksal der Zelle nimmt. Die MAP-Kinasen kontrollieren fundamentale Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose der Zelle.

MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die selbst durch Threonin- und Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden. Es sind bisher drei Untergruppen bekannt. Zu diesen gehören die ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen), die p38-Kinasen und die JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen)/ SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinasen).

Die allgemein gültige Organisation der MAPK-Signaltransduktionskette besteht aus drei Kinasen: die an der Spitze der Kaskade stehende MAPKKK (MAP-Kinase Kinase Kinase) phosphoryliert die ihr nachgeschaltete MAPKK und diese aktiviert wiederum die am Ende der Kette stehende MAPK (Abbildung 1). Wie und welche Signale jedoch dieses Modul aktivieren, ist heute bisher nur zum Teil bekannt (*Kolch, 2000*).

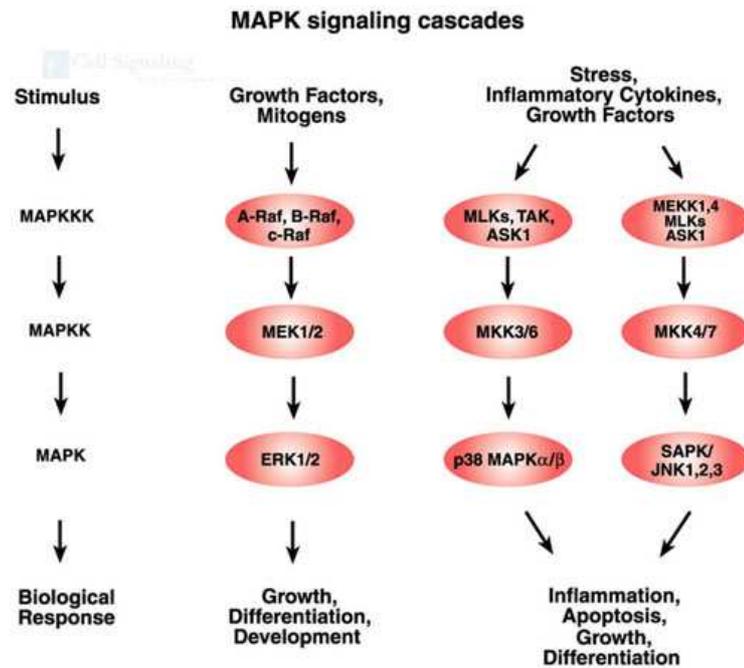


Abbildung 1: Die MAP-Kinase Kaskaden (Quelle: cell signal.com)

### 3.1.1 Die ERK-Kaskade

Die nacheinander geschalteten Kinasen des ERK-Moduls sind Raf (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK) und ERK1/2 (MAPK).

Das an oberster Stelle des Gliedes stehende Protooncogen Raf ist eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, die MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase) an einem dieser beiden Reste phosphoryliert (Kyriakis *et al.*, 1992). Die dualspezifischen Kinasen MEK1/2 übertragen wiederum im nächsten Schritt jeweils einen Phosphatrest auf Threonin- und Tyrosinreste von ERK1/2 (Dhanasekaran und Premkumar, 1998). MEK1/2 arbeiten hoch selektiv und aktivieren nur ERK1/2 (English *et al.*, 1999). ERK hat Substrate im Zytosol und transloziert auch in den Zellkern, um dort Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (Schenk und Snaar-Jagalskar, 1999). Die aktivierte Kaskade reguliert Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle (Abbildung 1 und 2).

### 3.1.2 Ras als Verbindungsmolekül

Die Verbindung des ERK-Moduls zur Zellmembran wird häufig durch das kleine G-Protein Ras hergestellt (Avruch *et al* 1994; Hall, 1994). Der Weg eines extrazellulären Signals zu Ras soll hier genauer betrachtet werden. Das Signal in Form von Hormonen

oder Zytokinen bindet als Ligand an einen Rezeptor, der entweder eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt oder wie hämatopoetische Zytokinrezeptoren mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen assoziiert ist. Typische Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität sind z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren. Dieser dimerisiert nach Ligandenbindung und autophosphoryliert seine Tyrosinreste. Die Phosphorylierung des Zytokinrezeptors erfolgt nach Dimerisation durch die Aktivierung zytoplasmatischer Kinasen z.B. der Jak- oder Src-Familie, die mit dem Rezeptor verbunden sind (*Kishimoto et al., 1994*). Diese Tyrosinphosphatgruppen am Rezeptor stellen Bindungsorte für SH2-Domänen von Adaptermolekülen dar. Beispiele für solche Adaptermoleküle sind Grb2 und Shc, die nun an den Rezeptor binden können. Aufgabe dieser Moleküle ist es, das Andocken von Guaninnukleotid-exchange-Faktoren (GEFs), wie SOS (son of sevenless), zu ermöglichen. SOS katalysiert in dem Protooncogen Ras den Austausch von GDP durch GTP. Ras-GTP stellt die aktive Form des G-Proteins dar. Der aktivierte Zustand von Ras kann durch die Hydrolyse des gebundenen GTP mit Hilfe einer intrinsischen GTPase-Aktivität beendet werden. Analog zu den GEF gibt es auch Proteine, die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs), welche diese Reaktion beschleunigen (*Smithgall, 1998; English et al., 1999*).

Die Aktivierung von Ras erfordert aber nicht nur die Bindung von GTP, sondern auch eine Modifikation des c-terminalen Endes von Ras. Über einen Farnesyl- und Geranylrest wird Ras an der zytoplasmatische Seite der Zellmembran verankert und kann nur hier seine volle Wirkung entfalten (*Lowy und Willumsen, 1993*). Das aktivierte Ras-Protein kann Raf binden und vom Zytoplasma zur Zellmembran translozieren. Neben einer Bindung an Ras erfordert die Aktivierung von Raf auch eine Phosphorylierung (*Smithgall, 1998*). An der Aktivierung von Raf-1 sind neben Ras noch viele andere Proteine beteiligt, die auch eine regulatorische Funktion auf der Ebene von Raf-1 übernehmen (*Kolch, 2000*).

### **3.1.3 Aktivierung der ERK-Kaskade über die Proteinkinase C**

Die ERK-Kaskade kann wie oben beschrieben in einem Rezeptor vermittelten Vorgang oder durch Tumorpromotoren vom Phorbolestertyp (*Carroll et al., 1994; Cai et al., 1997*) über die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden. Verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige und unabhängige PKC-Isoformen aktivieren das Raf-1 Enzym, aber auch

Angriffspunkte oberhalb und unterhalb von Raf-1 sind beobachtet worden (Schönwasser *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999a).

Am Anfang steht die  $G_q$  vermittelte Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) durch die Phospholipase  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ). Sowohl das DAG als auch der durch das  $IP_3$  vermittelte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Anstieg aktivieren die PKC, welche Raf-1 phosphoryliert. Über Raf-1 kann der Signalfluss zu ERK1/2 strömen (English *et al.*, 1999).

Aber auch das intrazelluläre  $Ca^{2+}$  vermag als second messenger eine Aktivierung von ERK in verschiedenen Zelltypen zu induzieren, z.B. in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Frödin *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 1994). Dies geschieht vermutlich ohne Beteiligung der PKC. Die  $Ca^{2+}$ -induzierte Signalweiterleitung zu ERK könnte über  $Ca^{2+}$ -sensitive Ras-GEFs (Farnsworth *et al.*, 1995) erfolgen oder über die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK) durch welche MEK1/2 phosphoryliert und aktiviert werden (Dellarocca *et al.*, 1997).

Die Vorstellung dieser alternativen ERK-Aktivierung ist für das Verständnis der Wirkung von TPA (o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) wichtig, da man annimmt, dass dieser Tumorpromotor die Wirkung von DAG nachahmt (Lee und Thee, 1995).

Das Protooncogen Raf-1 erhält durch seine Position am Anfang der Kaskade eine Vielzahl von Signalen aus anderen Signaltransduktionswegen und leitet sie an ERK weiter. Bisher waren die weitläufig einzig akzeptierten Effektoren ERK1/2, aber es häufen sich Hinweise, dass Raf Signale auch an andere Informationsketten weiterleitet. Es stellt durch seine Schlüsselposition eine Ebene für regulatorische Eingriffe von Seiten der Zelle dar. Experimentell konnte eine Hemmung von Raf *in vitro* durch die Inhibitoren SB 203580 und ZM 336372 nachgewiesen werden. *In vivo* führt der Einsatz dieser Inhibitoren jedoch zu einer Hyperaktivierung von Raf-1, die sich aber nicht in einer gesteigerten MEK- und ERK-Aktivierung niederschlägt (Hall-Jackson *et al.*, 1999a+b). Für die Interaktion von Raf-1 mit MEK, bedarf es also weitaus mehr als nur der Aktivierung von Raf. Eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B. 14-3-3, KSR, SUR8 und MP1 sind an der Regulierung der Raf-Aktivität und seiner Interaktion mit MEK1/2 beteiligt (Kolch, 2000).

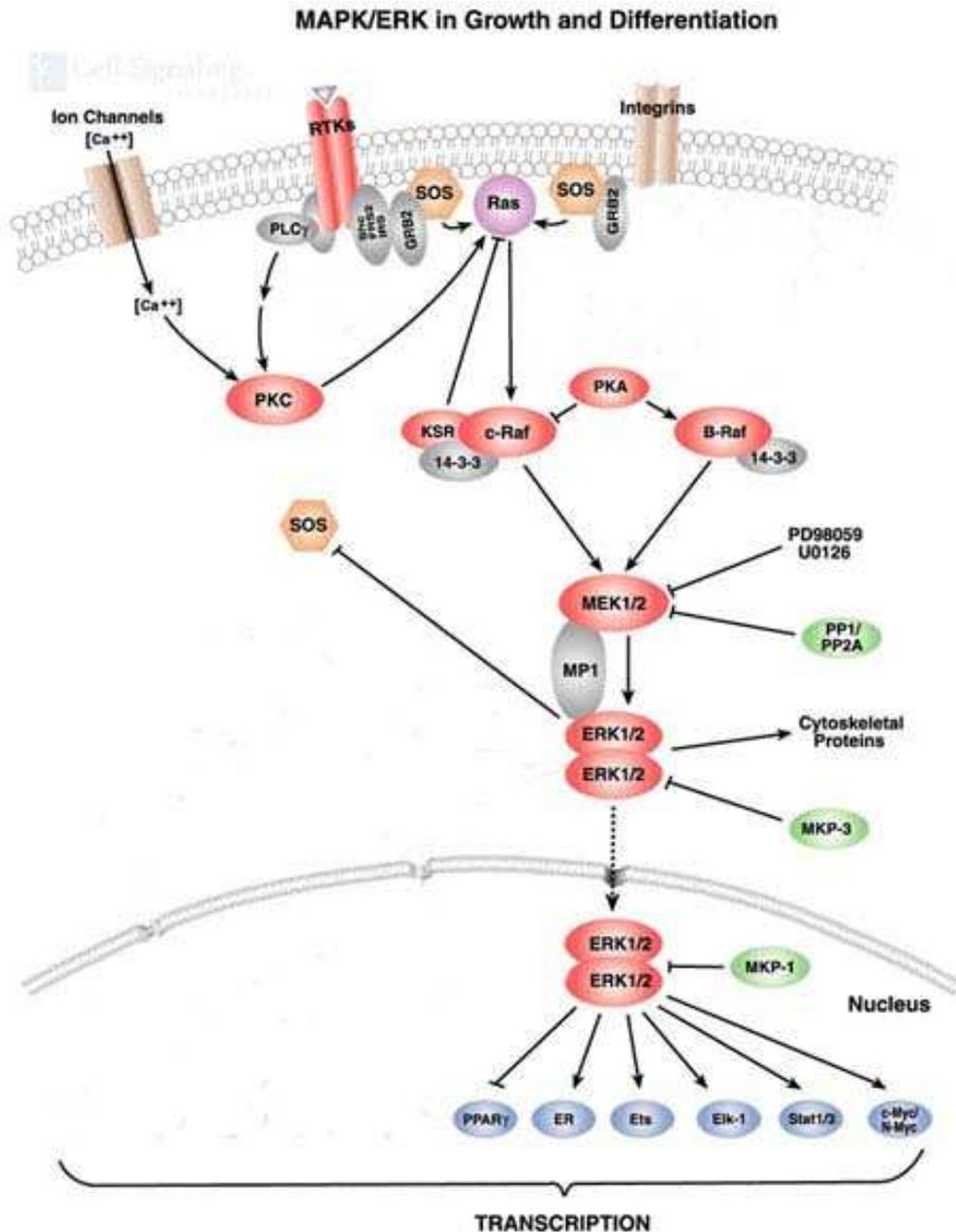


Abbildung 2: ERK/MAP-Kinase Kaskade (Quelle: cell signal.com)

### 3.1.4 JNK und p38/MAP-Kinasen

Neben der klassischen ERK/MAP-Kinase gibt es noch die c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNK oder auch SAPK genannt) und die p38-Kinasen. Auch diese sind in einem kaskadenartigen Modell mit dem gleichen Grundmodul organisiert, wie die schon

vorgestellte ERK-Signalübertragungskette. Diese beiden Kinasen werden in erster Linie durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$  oder durch chemischen und physikalisch Stress wie bakterielle Endotoxine, Arsenit, Anisomycin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, osmotischer Stress, Hitze-Schock, UV-Strahlen und einige genotoxische Substanzen aktiviert. Diese Kinasen sind an der Entstehung von apoptotischen und inflammatorischen Zellprozessen beteiligt (Abbildung 3 und 4).

Die JNK wird durch dualspezifische MKK4 und MKK7 phosphoryliert und die p38-Isoformen durch MKK3 und MKK6. Aktivatoren von MKK4 und MKK7 sind MEKK1, -2, -3, -4 beziehungsweise PAK (p21-aktivierte Kinasen), die wiederum durch Interaktion mit Rho-Proteinen-Familie aktiviert werden. Die Phosphorylierung und Aktivierung von MKK4 und MKK7 kann aber auch durch zahlreiche andere Kinasen erfolgen, die auch MKK3 und MKK6 phosphorylieren, wie z.B. MLK-1,-2,-3 (Mixed lineage kinase), ASK1 (Apoptose Signal-regulierte Kinase), TAK1 (TGF $\beta$ -aktivierte Kinase). Ras kann ebenfalls die Aktivierung der JNK und p38-Kinase Kaskaden vermitteln. Die MAPKK Kinasen können wiederum durch eine noch größere Zahl von Proteinen, die zu der „sterile 20 kinase family“ gehören, aktiviert werden (*Tibbles und Woodgett, 1999*).

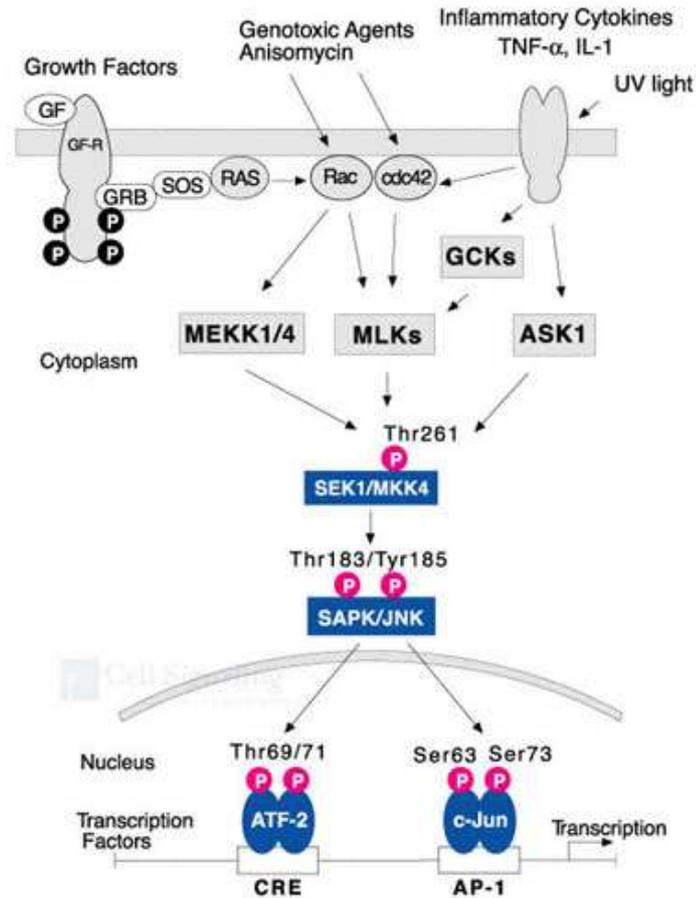


Abbildung 3: JNK/SAPK-Kaskade (Quelle: cell signal.com)

Substrate der p38 und JNK sind zum einen zytosolische Proteine und zum anderen Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Bekannte Transkriptionsfaktoren der JNK sind ATF-2, Elk-1 und c-Jun (Van Dam *et al.*, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1995), das mit dem Aktivator Protein 1 (AP1) einen Komplex bildet und zu einer vermehrten Expression von Genen mit einer AP1-Bindungsstelle in ihrem Promotor führt (Abbildung 3). p38 phosphoryliert bevorzugt die Transkriptionsfaktoren Sap-1, AFT-2 (Raigneaud *et al.*, 1995; Janknecht und Hunter, 1997), aber auch CHOP (Wang und Ron, 1996) und MEF2C (Han *et al.*, 1997). Ein wichtiges zytosolisches Substrat der p38 ist die MAPKAP-Kinase 2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase), die das Hsp 27, CREB (Clifton *et al.*, 1996) und auch den SRF phosphoryliert (Heidenreich *et al.*, 1999).

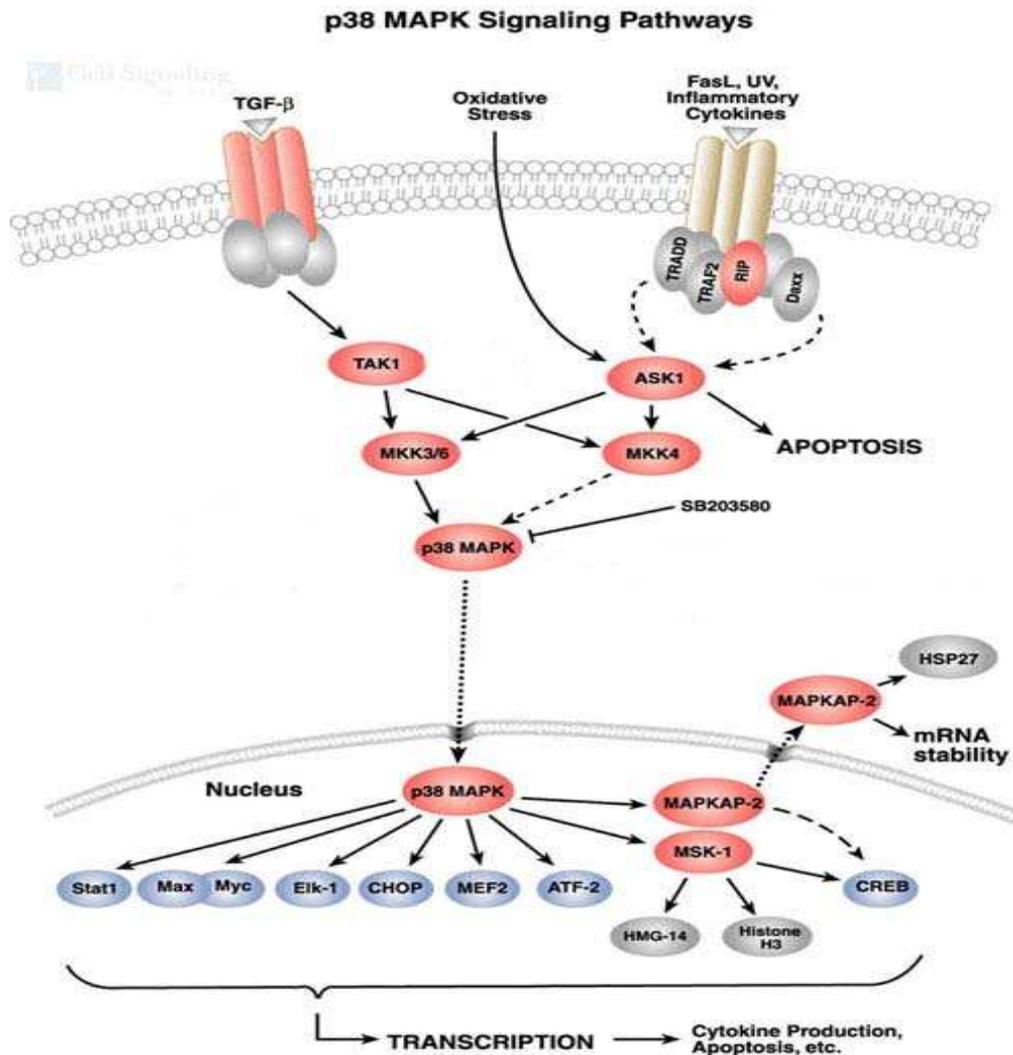


Abbildung 4: p38/MAP-Kinase Kaskade (Quelle: cell signal.com)

### 3.1.5 Transkriptionsfaktoren setzen das Signal im Zellkern um

Durch Signaltransduktionskaskaden werden externe Stimuli, die die Zelle an der Membran empfängt, nicht nur an Protein-Substrate im Zytoplasma, sondern auch in den Zellkern weitergeleitet. Endglieder dieser Kaskaden translozieren in den Zellkern und phosphorylieren dort Transkriptionsfaktoren. Im Nukleus selbst sind diese Faktoren für die Umsetzung von Signalen verantwortlich, indem sie Einfluss auf die Transkription von Zielgenen nehmen. Eine wichtige Gruppe solcher Transkriptionsfaktoren ist die Ets-Oncogenfamilie, die sich in die Ternärkomplexfaktoren (TCF) und in die Ets-Gruppe unterteilt. Auf diese Familie konvergieren die drei großen MAPK-Kaskaden, Ca<sup>2+</sup>-spezifische Signale und die IP<sub>3</sub>-Signaltransduktionskaskade.

Aktiviert TCF binden an bestimmte Sequenzen wie dem Serum Response Element (SRE) und dem Ras Response Element (RRE), welche in Promotoren von vielen „immediate early response“ Genen enthalten sind (*Yordy und Muise-Helmericks, 2000*). TCF der Ets-Familie binden zusammen mit dem SRF an das SRE und induzieren die Transkription von Zielgenen wie *c-fos* (*Janknecht et al., 1995*) und *erg-1* (early growth response 1) (*Hodge et al., 1998; Clarkson et al., 1999*). Sie gehören zu den „immediate early response“-Genen, die durch Serum, Wachstumsfaktoren oder andere mitogene Einflüsse rasch aktiviert werden (*Herschman, 1991*). Vor allem der Ternärkomplexfaktor Elk-1 ist nicht nur ein wichtiges Substrat der ERK/MAPK-Signaltransduktionskette, sondern auch von p38 und JNK. Er wird an vielen Serin- und Threoninresten phosphoryliert und bindet an die DNA (*Yordy und Muise-Helmericks, 2000*).

### **3.1.6 Inaktivierung der MAP-Kinasen**

Über die negative Regulierung von MAP-Kinase Kaskaden ist bisher wenig bekannt. Während die Aktivierung der Kaskaden über Phosphorylierungen verläuft, so vermitteln Phosphatasen durch Dephosphorylierungen die Inaktivierung. Dualspezifische MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP) sorgen auf Ebene der MAPK für eine Dephosphorylierung von regulatorischen Tyrosin- und Threoninresten an ERK, JNK und p38, womit der Einfluss dieser auf die Genexpression aufgehoben wird (*Sun und Tonks, 1994; Franklin und Kraft, 1997; Bokemeyer et al., 1996*).

Es sind mehrere MKP bekannt: MKP-1 inaktiviert alle drei MAPK, MKP-2 bevorzugt JNK und ERK, MKP-3 ist spezifisch für ERK und MKP4 ist relativ unspezifisch.

Interessant ist, dass die MKP-1 durch ERK induziert werden kann und dann p38 und JNK negativ reguliert, aber umgekehrt auch ERK dephosphoryliert, wenn sie über p38 und JNK aktiviert worden ist. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen den verschiedenen MAP-Kinase Kaskaden (*Tibbles und Woodgett, 1999*).

Neben den zweifach-spezifischen Phosphatasen gibt es auch solche, die für Serin/Threonin sowie Tyrosin spezifisch sind. Der Serin/Threonin-spezifischen Phosphatase PP2A wird eine besondere Rolle bei der Regulierung der MEK/ERK-

Aktivität zugesprochen (*Hunter, 1995*). Denkbar ist eine Regulation auf allen Ebenen der MAPK, denn es ist bekannt geworden, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-spezifische Phosphatase PP2B oder Calcineurin Elk-1 dephosphorylieren und so den Einfluss von Elk-1 auf die MAP-Kinase vermittelte Genexpression am SRE modulieren können (*Sugimoto et al., 1997; Tian und Karin, 1999*).

### **3.2 MAP-Kinasen und Differenzierung**

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK) sind für das Leben von essenzieller Bedeutung, denn sie regulieren viele wichtige Phasen in der embryonalen Entwicklung und in der Differenzierung von Geweben und Organen: So sind z.B. aktivierte MEK und ERK notwendig für die Entwicklung von Photorezeptoren und des Körpermusters in *Drosophila melanogaster* (*Perrimon, 1994*), die Induktion des Mesoderm von *Xenopus laevis* (*Umbhauer et al., 1995*), die positive T-Zell Selektion (*Aberola et al., 1995*) oder die Myogenese in C2-Zellen (*Gredinger et al., 1998*).

Darüber hinaus wird die Aktivierung von ERK mit den sehr gegensätzlichen zellulären Prozessen Proliferation und Differenzierung in Verbindung gebracht.

Ein bekanntes Beispiel für die Beteiligung von ERK sowohl an der Übermittlung von proliferativen als auch differenzierenden Signalen stellen die aus einem Phäochromozytom der Ratte stammenden PC12 Zellen dar. EGF (Epidermal growth factor) stimuliert in dieser Zelllinie eine transiente ERK-Phosphorylierung, welche von einer Zellproliferation begleitet wird. Andererseits steht im Gegensatz dazu die Beobachtung, dass die Behandlung dieser Zellen mit NGF (Neuronal growth factor) eine anhaltende ERK-Aktivierung induziert, die mit einer Aussprossung von Neuriten und einer Minderung der Zellteilung einhergeht (*Marshall, 1995*). Im Gegensatz dazu sorgt in der NIH 3T3 Linie eine anhaltende ERK-Aktivität für die Proliferation dieser Zellen. Das Einbringen einer konstitutionell aktiven MAPKK führte sogar zu einer Bildung von Tumoren in vivo (*Mansour et al., 1994*).

In diesem Kontext wird deutlich, dass die Effekte von ERK auf Differenzierung und Proliferation nicht nur von der Dauer der Aktivierung, sondern auch vom Zelltyp abhängig sind (*Cowley et al., 1994*).

In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass die ERK/MAP-Kinasen auch in hämatopoetischen Zellen für Differenzierungsvorgänge verantwortlich sind. Im Folgenden soll die Rolle der ERK-Kaskade in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien aufgezeigt werden.

### **3.2.1 ERK/MAP-Kinasen und die megakaryozytäre Differenzierung**

Stimulation der menschlichen CMK Zelllinie, die aus einem Patienten mit akuter megakaryoblastischer Leukämie gewonnen wurde, mit TPA bzw. dem physiologischen Zytokin SCF führt zur megakaryozytären Differenzierung dieser Zellen. Dies zeigt sich anhand der Ausbildung von megakaryozytären Oberflächenmarkern CD 41 und CD 61 sowie an einer Veränderung des morphologischen Zellbildes. Beide Induktoren sind bekannte Aktivatoren der ERK. Auch aktive ERK- und MEK-Vektoren, die in die Zellen eingebracht wurden, leiteten die Differenzierung mit Wachstum und Expression von CD 41 und CD 61 ein. Diese Verhältnisse deuteten auf eine Beteiligung von ERK1/2 an der Reifung der Blasten hin. Durch Versuche mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 konnte dies untermauert werden, da es durch seinen Einsatz gelang, die SCF-getriggerte Differenzierung zu verhindern.

Aus diesen Ergebnissen zogen die Autoren den Schluss, dass die Aktivierung der ERK-Kaskade notwendig und ausreichend sei, um die megakaryozytäre Differenzierung von CMK Zellen zu induzieren (*Melemed et al., 1997*).

In K562 stellt sich die Situation ähnlich dar. K562 Zellen sind menschliche erythromegakaryozytäre leukämische Zellen, die aus einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie stammen. Hierbei handelt es sich um Vorläuferzellen, die die Potenz besitzen, auf entsprechende Stimuli entlang der erythroiden, megakaryozytären und zu einem kleineren Prozentsatz auch der monozytären Linie zu differenzieren. Aktivierung der PKC durch den Tumorpromotor TPA leitet in K562 die Entwicklung von Megakaryozyten ein (*Tabilio et al., 1983*).

Analog zu den Versuchen mit CMK Zellen, kam es unter TPA und der Transfektion von aktiven MEK-Vektoren zu morphologischen Veränderungen, wie man sie auch im Verlauf der megakaryozytären Differenzierung beobachten kann (*Whalen et al., 1997*).

Die Zellen wurden größer, bildeten Pseudopodien aus, wurden adhärent und exprimierten Integrin, einen spezifischen Marker von Plättchenvorläuferzellen. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des erythroiden  $\alpha$ -Globins supprimiert. Sowohl bei den mit TPA stimulierten als auch in den mit aktiven MEK-Vektoren transfizierten Zellen war eine gesteigerte ERK-Aktivität nachzuweisen. Die durch TPA-induzierte ERK-Phosphorylierung war transient, sie erreichte nach 24 Stunden wieder basale Werte.

Der spezifische MEK1-Inhibitor PD 98059 supprimierte in dieser Zelllinie sowohl die ERK-Aktivität als auch die Effekte von TPA auf die Differenzierung. Dies gelang jedoch nur bis zu einem bestimmten Zeitpunkt, da eine Applikation des Inhibitors später als 12 Stunden nach der TPA-Behandlung die Differenzierungsvorgänge nicht mehr aufzuhalten vermochte. Umgekehrt wurde die Differenzierung von K562 Zellen nicht nur durch Entzug eines Phorbolesters innerhalb der ersten 12 Stunden nach Gabe verhindert, sondern auch rückgängig gemacht, sofern die Substanz in den ersten 7 Stunden entfernt wurde (*Whalen et al., 1997*).

Zusammenfassend gelang es der Gruppe um *Whalen* anhand dieser Ergebnisse darzulegen, dass die megakaryozytäre Differenzierung von K562 Zellen durch die ERK/MAPK-Kaskade reguliert wird, und diese gleichzeitig für die Suppression von erythroiden Markern verantwortlich ist. Darüber hinaus demonstrierten sie den Bedarf einer länger anhaltenden ERK-Aktivierung. Diese Resultate legen eine Beteiligung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade einerseits an der linienspezifischen Differenzierung von hämatopoetischen Zellen und andererseits an der Suppression der erythroiden Differenzierung nahe.

Wie auch in PC12 Zellen kristallisiert sich für K562 die Bedeutung einer andauernden ERK-Aktivierung für die megakaryozytäre Differenzierung heraus.

Durch den Vergleich von TPA mit Bryostatin, ebenfalls ein bekannter Aktivator der PKC, demonstrierte man, dass nicht die Aktivierung allein ausschlaggebend für diesen Prozess ist, sondern die Dauer der ERK-Aktivierung (*Racke et al., 1997*).

Da sowohl TPA als auch Bryostatin über die PKC die ERK/MAPK-Kaskade aktivieren, sie aber nicht die gleiche Wirkung auf die Differenzierung von K562 Zellen haben (*Hocevar et al., 1992*), war es interessant zu vergleichen, worin sie sich unterschieden.

Unter TPA-Behandlung dauerte die ERK-Aktivierung bis zu 24 Stunden an, unter Bryostatin erreichte sie schon nach ca. 6 Stunden wieder Ausgangswerte. Dabei wurde die TPA-, nicht jedoch die Bryostatin-Stimulierung, von einer Expression des Plättchenmarkers CD 41 begleitet. Wie wichtig die ERK-Aktivierung für die Differenzierung ist, demonstrierten Versuche mit dem MEK1-Inhibitor PD 98059. Er vermocht durch seine Applikation innerhalb der ersten 18 Stunden nach TPA Behandlung, die megakaryozytäre Reifung zu unterbrechen, jedoch nicht mehr nach 24 Stunden Einwirkzeit.

Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren *Racke et al.* die Notwendigkeit einer anhaltenden ERK-Aktivierung für die megakaryozytäre Differenzierung von K562 Zellen (*Racke et al., 1997*).

Die obigen Darstellungen heben die Rolle der ERK für die megakaryozytäre Entwicklung aus CMK und multipotenten K562 Zellen hervor. Auf der anderen Seite hemmen sie die Synthese von erythroiden Proteinen (*Melemed et al., 1997; Whalen et al., 1997*). Tatsächlich wird z.B. die unter Cyclosporin A auftretende erythroide Differenzierung von K562 Zellen nicht durch die ERK/MAPK, sondern durch die p38/MAPK vermittelt (*Sawafuji et al., 2003*).

### **3.2.2 Aktivierung von Raf und MAPK während der monozytären Differenzierung**

HL-60 Zellen sind ein weiteres Zellmodell, an dem die Beteiligung der Raf/MEK/ERK-Kaskade auf die Differenzierung bekannt wurde. Ein Induktor der monozytären Entwicklung in HL-60 Zellen ist der Tumorpromotor TPA (*Rovera et al., 1979*), der die PKC aktiviert (*Nishizuka, 1992*). Eine Forschergruppe um *Kharbanda* untersuchte, inwieweit die durch TPA aktivierte Proteinkinase C die Raf/MAPK-Signaltransduktionskette während der monozytären Differenzierung stimuliert (*Kharbanda et al., 1994*).

Es zeigte sich, dass die unter TPA und Okadasäure, einem Inhibitor der Phosphoserin- und Phosphothreonin-Proteinphosphatase 1 und 2A, beobachtete monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen von einer gesteigerten Raf- und ERK-Phosphorylierung begleitet wird.

In HL-525 Zellen, die aufgrund einer verminderten PKC $\beta$ -Expression für den durch TPA-getriggerten Differenzierungsreiz resistent sind, findet keine Aktivierung von Raf und MEK statt, jedoch aber bei Stimulation mit Okadasäure. Diese vermag offensichtlich den von TPA erforderlichen Weg über die Proteinkinase C zu umgehen. Steigert man die PKC $\beta$ -Expression der HL-525 Zellen durch die Gabe von All-trans Retinsäure, und stimuliert daraufhin die Zellen mit TPA, so werden auch in diesen Zellen die Kinasen Raf-1 und ERK phosphoryliert.

Daraus folgern die Autoren, dass die durch Okadasäure oder TPA aktivierte Raf-1/MAPK-Kaskade für die die monozytäre Differenzierung notwendig ist (*Kharbanda et al., 1994*).

Weitere Puzzleteile ergänzen das Wissen um die Beteiligung der ERK/MAP-Kinasen an der Differenzierung von HL-60 Zellen. *Miranda und Kollegen* erforschten die Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen während der Induktion der granulozytären Differenzierung durch Retinsäure und der monozytären durch TPA (*Miranda et al., 2002*).

Beide Substanzen führten zu einer rapiden und andauernden Aktivierung von MEK1/2 in HL-60 Zellen, unterschieden sich aber hinsichtlich der ERK-Phosphorylierung: ERK1/2 werden durch TPA, jedoch nur ERK2 durch Retinsäure phosphoryliert. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem spezifischen MEK1/2-Inhibitor U0126 vermochte einerseits die ERK1/2-Phosphorylierung andererseits aber auch die Differenzierung der Zellen zu verhindern. Die Involvierung der beiden anderen Mitogen-aktivierten Kinasen JNK und p38 in diesem Prozess schließen *Yen* und seine Kollegen aus (*Yen et al., 1999*). Die Bedeutung von ERK für die myeloide Differenzierung zeigt sich auch in U937 und 32D Zellen, da auch in diesen Linien die Applikation von UO126 für eine Inhibition der monozytären Entwicklung in U937 und der granulozytären in 32D Zellen sorgte (*Miranda et al., 2002*).

Neben der Retinsäure ist auch dem Vitamin D3 als einem potenziellen Therapeutikum in der Behandlung von Leukämien Beachtung geschenkt worden (*Wang und Stidzinski, 2001; Ji et al., 2002*). Vitamin D3 ist ein bekannter Induktor der monozytären Differenzierung in HL-60 Zellen. Es werden jedoch sehr hohe Konzentrationen benötigt, um therapeutische Effekte zu erzielen. Diese Konzentrationen sind mit

erheblichen Nebenwirkungen im Calciumstoffwechsel verbunden, so dass der Einsatz noch problematisch ist.

In der Grundlagenforschung mit Vitamin D3 kristallisieren sich die ERK ebenfalls als bedeutend für die Differenzierung heraus. *Marcinkowska* arbeitete in diesem Zusammenhang die Bedeutung einer ERK1/2-Aktivierung in der 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3) induzierten monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen heraus. Durch den Einsatz von PD 98059 konnte einerseits die Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen und andererseits der Effekt des Vitamins auf die monozytäre Reifung der Zellen verhindert werden (*Marcinkowska, 2001*).

*Wang* und seine Kollegen erweiterten das Wissen um die durch Vitamin D3 hervorgerufene Differenzierung von HL-60 Zellen und schlugen aufgrund ihrer Ergebnisse ein 2-Phasen-Modell der Reifung bei einer Behandlung mit moderaten Konzentrationen von Vitamin D3 vor. Die erste Phase, welche ca. 24-48 h andauert und von einer stark gesteigerten ERK-Phosphorylierung begleitet wird, zeichnet sich durch einen normalen Zellzyklus und die Expression von monozytären Oberflächenmarkern aus. In der zweiten Stufe kommt es zum Arrest des Zyklus in G1 und zur Ausbildung von reiferen Markern. In dieser Phase sinkt der Phospho-ERK Spiegel und die Autoren vermuten, dass von dort an der Zellzyklus-Arrest in G1 für die terminale Differenzierung verantwortlich ist (*Wang und Studzinski, 2001*).

Ein ebenfalls erwähnenswerter Bereich in der Induktion der Differenzierung von HL-60 Zellen ist der Einsatz des p38-Inhibitors SB 203580. Zeit- und dosisabhängig bewirkt SB 203580 eine Reifung der Zelllinie in Richtung der granulozytären Reihe. Diese Wirkung wird von einer gesteigerten Aktivität der Raf/MEK/ERK-Kaskade begleitet, die ca. 24 Stunden andauert, und von *Zhang et al.* für die Differenzierung verantwortlich gemacht wird. Sie gehen davon aus, dass SB 203580 neben seiner hemmenden Wirkung auf p38 auch noch eine biologische Aktivität besitzt, die als therapeutisches Agens von Bedeutung sein könnte. Eine andere mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre auch, dass die Inhibition der p38-Signaltransduktionskette zu einer Akkumulation von aktivierten Proteinen oberhalb von p38 führt, die dann den Signalfluss über die ERK-Kaskade weiterleiten (*Zhang et al., 2003; Ishii et al., 2001*).

Weitere menschliche Leukämiezelllinien, in denen sich das Motiv einer ERK-Aktivierung während der Differenzierung von Monoblasten zu Monozyten wieder findet, sind U937 und ML-1. Entsprechende Differenzierungsreize sind für die erste Linie TPA oder die Kombination von TNF mit GM-CSF (*Okuma et al., 2002*). Stimulation der U937 Zellen mit beiden Zytokine gleichzeitig, führte zu einer lang andauernden ERK-Phosphorylierung. Wurde diese durch PD 98059 verhindert, differenzierten die Zellen nicht mehr, und auch UO126, ein MEK1/2-Inhibitor, blockierte die durch TPA-induzierte monozytäre Differenzierung (*Miranda et al., 2002*). Darüber hinaus war es den Autoren möglich eine Beteiligung der p38/MAP-Kinase Kaskade auszuschließen, da der p38-Inhibitor SB 203580 weder die ERK-Aktivierung noch die Differenzierung supprimierte (*Okuma et al., 2002*).

Für die myeloblastischen ML-1 Zellen hat man nachweisen können, dass auch hier die TPA-getriggerte monozytäre Differenzierung durch PD 98059 gehemmt werden kann. Dies spricht für eine zentrale Rolle der ERK/MAP-Kinasen in der Induktion der Zellreifung in dieser Zelllinie (*He et al., 1999*).

### **3.2.3 ERK/MAP-Kinasen und die erythroide Differenzierung**

Bisher wurde die Bedeutung der ERK/MAPK für die mono- und megakaryozytäre Differenzierung verschiedener hämatopoetischen Zelllinien dargestellt. Dabei deutete sich bereits an, dass die ERK-Kaskade einen negativen Einfluss auf die Reifung erythroider Zellen zu haben scheint (*Whalen et al., 1997*).

Tatsächlich konnten *Matsuzaki et al.* aufzeigen, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven ras-Mutante in erythroblastischen SKT6 Friend murine Leukämiezellen die Erythropoetin (Epo) induzierte erythroide Differenzierung zu verhindern vermochte. Umgekehrt führte die Inhibition der MEK/ERK-Signaltransduktionskaskade durch den MEK1-Inhibitor PD 98059 oder das Einbringen einer dominant negativen ras-Mutante ohne Stimulation mit Epo zur Induktion der erythroiden Reifung der SKT6 Zellen (*Matsuzaki et al., 2000*).

Die negative Korrelation zwischen ERK-Aktivierung und erythroider Differenzierung zeigte auch eine andere Gruppe um *Uchida* auf. Sie fand heraus, dass in der erythromegakaryozytären UT-7/GM Zelllinie, welche unter Stimulation mit Epo

erythroid und unter Thrombopoetin (TPO) megakaryozytär differenziert, die Aktivierung von ERK für das weitere Schicksal der Zellen verantwortlich zu sein scheint. Werden diese Zellen mit Epo und PD 98059 behandelt, so fördert dies die erythroide Reifung der Zellen wie anhand der Hämoglobinbildung zu erkennen ist. Umgekehrt kommt es unter der Kombination der megakaryozytären Induktors TPO mit dem MEK1-Inhibitor zu einer Abnahme von Glykoprotein IIb/IIIa, welches ein Marker für die megakaryozytäre Differenzierung darstellt (*Uchida et al., 2001*).

In Anlehnung an diese Erkenntnisse konnten auch andere Forschergruppen aufzeigen, dass die Inhibition der ERK/MAP-Kinasen sogar die erythroide Entwicklung induziert und fördert (*Whalen et al., 1997; Witt et al., 2000; Schaefer et al., 2004; Miyazaki et al., 2001*). Gleichzeitig kristallisiert sich eine positive Regulation der erythroiden Differenzierung durch p38 heraus (*Miyazaki et al., 2001; Sawafuji et al., 2003; Witt et al., 2000; Nagata et al., 1998*)

#### **3.2.4 Zusammenfassung**

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK) sind in viele elementare Prozesse im Organismus involviert. Nach bisherigen Forschungserkenntnissen sind sie an der Proliferation, Apoptose und der Differenzierung von Zellen maßgeblich beteiligt. Dabei hat sich herausgestellt, dass einerseits die Dauer der Aktivierung, andererseits aber auch der Zelltyp bestimmen, ob eine proliferative oder differenzierende Antwort der Zelle im Vordergrund steht, wie Untersuchungen an PC12 Zellen eindrücklich belegen. Eine zentrale Bedeutung übernehmen die ERK/MAPK im Bereich der Hämatopoese. Hier sind sie an der Übermittlung von Differenzierungssignalen in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Anhand der obigen Darstellungen ist anzunehmen, dass sie einerseits für die megakaryozytäre Differenzierung von z.B. CMK, K562 und UT-7/GM Zellen sowie andererseits für die monozytäre Differenzierung der HL-60, ML-1 und U937 Zellen verantwortlich sind.

Für K562, U937 und HL-60 Zellen hat man nachweisen können, dass, wie in PC12 Zellen, eine anhaltende ERK-Phosphorylierung für die Differenzierung der Zellen notwendig ist. Darüber hinaus deutet sich an, dass ERK/MAPK die Entwicklung anderer Zellreihen unterdrücken, wie man aufgrund der supprimierten Hämoglobinproduktion in erythroiden Zelllinien vermuten mag.

### **3.3 Das Early growth response-1 Gen**

#### **3.3.1 Der Egr-1-Transkriptionsfaktor**

Nicht nur den ERK/MAP-Kinasen wird ein bedeutender Einfluss auf die Differenzierung von Zellen zugesprochen, sondern auch dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 (*early growth response-1*). Egr-1 gehört zu den „immediate early response“ Genen und liegt auf dem Chromosom 5 (Sukhatme et al., 1988; Nagarajan et al., 1990). Der Verlust dieser Chromosomenregion liegt häufig bei Patienten, die unter einer akuten myeloischen Leukämie oder dem myelodysplastischen Syndrom leiden, vor (Le Beau et al., 1993). Insgesamt umfasst die *egr-1*-Familie 4 Gene: *egr-1* (Sukhatme et al., 1987), *egr-2* (Lemaire et al., 1988), *egr-3* (Patwardhan et al., 1991), *egr-4* (Crosby et al., 1991). Sie alle kodieren für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die an sehr ähnliche, aber nicht identische, Guanin-Cytosin reiche Sequenzen der DNA binden (Gashler und Sukhatme, 1991). Das Egr-1-Protein befindet sich im Zellkern, erkennt spezifisch eine 5'-GCGGGGGCG-3' Sequenz an der DNA und vermag Promotoren, die diese enthalten, zu transaktivieren. Aufgrund der funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit der Egr-Transkriptionsfaktoren bestehen Vermutungen, dass der Ausfall z.B. des Egr-1-Proteins durch seine Verwandten ausgeglichen werden kann. Dies könnte durch die Tatsache untermauert werden, dass auch anderen Mitglieder der Egr-Familie während der myeloiden Differenzierung exprimiert werden (Kharbanda et al., 1991).

Ursprünglich wurde *egr-1* als ein „early growth response“ Gen in kultivierten Fibroblasten entdeckt (Sukhatme et al., 1987). Analog zu den ERK/MAP-Kinasen wird *egr-1* mit der Differenzierung von B-Zellen (McMahon und Montoe, 1996) sowie anderen hämatopoetischen Zellen (Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1995; Krishnaraju et al., 1998; Krishnaraju et al., 2001) aber auch von Nerven- (Beckmann und Wilce, 1997) und Knochenzellen (Suva et al., 1991) in Verbindung gebracht. Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Beteiligung des *egr-1*-Gens an der Regulation von Prozessen wie Proliferation (Perez-Castillo et al., 1993; Hu und Levin, 1994; Hofer et al., 1996), Apoptose (Muthukkumar et al., 1995) und Tumorwachstumshemmung (Huang et al., 1995; Liu et al., 1996; Liu et al., 1998).

### 3.3.2 *Egr-1 und seine Wirkung in myeloiden Zellen*

Die Gruppe um *Nguyen* stellte erstmals die Bedeutung von *egr-1* für die myeloide Differenzierung dar, indem sie die *egr-1*-Expression und die Wirkung auf die myeloischen Linien HL-60, U937 und M1 untersuchte.

Stimulation von HL-60 Zellen mit TPA, einem bekannten Induktor der monozytären Differenzierung, oder der Kombination von TPA mit DMSO, welche ebenfalls die Ausbildung von Makrophagen zur Folge hat, ging mit einer *egr-1*-Expression einher, die innerhalb einer Stunde ihr Maximum erreichte und nach einem Tag nicht mehr nachweisbar war. Weder unbehandelte noch mit DMSO, einem granulozytären Induktor, stimulierte Zellen wiesen diese charakteristische *egr-1*-Aktivierung auf.

Da sich diese Beobachtungen auch in U937 Zellen bestätigen ließen, gelangte die Gruppe nach Analysen der Expression des *egr-1*-Gens zu dem Schluss, dass der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor während der frühen Phase der Differenzierung von Makrophagen aus HL-60, U937, M1 Zellen und normalen myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird er nicht bei der granulozytären Entwicklung von HL-60 Zellen aktiviert, wohl aber zu einem späteren Zeitpunkt der granulozytären Differenzierung von normalen myeloiden Vorläufern (*Nguyen et al., 1993*).

Während in U937 und M1 Zellen, welche auf eine Entwicklung zu Makrophagen determiniert sind, das *egr-1*-Gen auch in der Kontrollgruppe transkribiert wird, ist es in HL-60 Zellen, die nicht nur auf diese Linieentwicklung festgelegt sind, still und wird erst nach Stimulation mit TPA abgelesen. Die gesteigerte *egr-1*-Expression in den determinierten monopotenten Zelllinien U937 und M1 unter Induktion wird durch posttranskriptionelle Modifikationen erreicht. Abhängig vom Kommitment der Zelllinie scheint somit auch die *egr-1*- Expression.

Der Nachweis der Bedeutung von *egr-1* für die Differenzierung von myeloiden Zellen gelang der Gruppe durch Experimente mit *egr-1*-Antisenseoligonukleotiden und der Transfektion von HL-60 Zellen mit *egr-1*-cDNA. Während die *egr-1*-Expression unter TPA mit der Ausbildung des morphologischen Bildes von Makrophagen verbunden war, konnte dieser Effekt durch *egr-1*-Antisenseoligonukleotide antagonisiert werden.

Gleichzeitig verloren mit *egr-1*-cDNA transfizierte HL-60 Zellen die Fähigkeit sich auf Gabe von DMSO zu Granulozyten zu entwickeln, behielten jedoch die Eigenschaft, unter Stimulation mit TPA entlang der monozytären Linie zu reifen.

Zusammenfassend zeigte die Gruppe auf, dass das *egr-1*-Gen, welches während der Differenzierung von myeloiden Zellen zu Makrophagen als eines der immediate early response Genen exprimiert wird, essenziell für diese Entwicklung ist und gleichzeitig die Differenzierung auf diese Linie beschränkt (*Nguyen et al., 1993*).

Wenige Jahre später arbeitete man weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von *egr-1* heraus, denn anhand von Experimenten mit der 32Dcl3 Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor das Differenzierungsprogramm dieser Zellen zu Gunsten der Reifung von Makrophagen zu verändern vermag.

32Dcl3 Zellen sind IL-3-abhängige hämatopoetische Vorläuferzellen die auf Stimulus mit G-CSF einem Proliferationsstopp und der terminalen granulozytären Differenzierung unterliegen. Dagegen führt die Gabe des Zytokins GM-CSF lediglich zu einer verminderten Proliferation ohne eine nachfolgende Differenzierung. Weder in unbehandelten noch mit GM-CSF-stimulierten Zellen ließ sich eine endogene *egr-1*-Expression nachweisen. In Bestätigung zu Versuchen mit normalen myeloiden Vorläuferzellen war jedoch wiederum eine *egr-1*-Expression in späten Stadien der G-CSF-induzierten granulozytären Entwicklung zu beobachten.

Die Transfektion dieser Zellen mit einem *egr-1*-Vektor und die damit resultierende ektope Expression des Transkriptionsfaktors verhinderte die terminale G-CSF-abhängige granulozytäre Reifung. Wie es auch schon Versuche mit HL-60 Zellen gezeigt hatten, bewirkt *egr-1* auch hier eine Restriktion der hämatopoetischen Differenzierung entlang der monozytären Linie. Darüber hinaus ermöglichte die exogene *egr-1*-Expression eine Differenzierung der 32Dcl3 Zellen zu reifen Makrophagen auf GM-CSF-Stimulus, eine Fähigkeit, die diese Zellen vorher nicht besessen hatten (*Krishnaraju et al., 1995*).

Bisherige Untersuchungen zeichneten das *egr-1*-Gen als einen wichtigen Modulator der monozytären Differenzierung aus. In Versuchen mit HL-60 und 32Dcl3 Zellen war

jedoch ein Induktor notwendig, um das Differenzierungsprogramm unter ektopter *egr-1*-Expression einzuleiten. In myeloblastischen M1 Leukämiezellen, die unter dem physiologischen Zytokin IL-6 zu Makrophagen ausreifen, sorgte allein die ektope *egr-1*-Expression für die Induktion des monozytären Differenzierungsprogrammes. Zusätzlich ermöglichte sie es einer noch größeren Anzahl von Zellen unter niedrigen Konzentrationen von IL-6, die in normalen M1 Zellen zu keinen Effekten im Sinne der Differenzierung führen, in die terminale Reifung einzutreten. Als Folge der induzierten Differenzierung sank das leukämische Potenzial der transfizierten M1 Zellen, wie Versuche mit Mäusen, denen diese Zellen injiziert wurden bewiesen. Diese Gruppe von Mäusen lebte länger als eine mit M1 Zellen injizierte Kontrollgruppe.

Somit ist nicht nur die Expression, sondern auch die Funktion von *egr-1* als ein positiver Modulator der myeloischen Differenzierung abhängig vom Kommitment der jeweiligen Zelllinie (Krishnaraju *et al.*, 1998).

### **3.3.3 *Egr-1 und seine Wirkung in erythromegakaryozytären Zellen***

Die Effekte des Egr-1-Transkriptionsfaktors wurden nicht nur in myeloiden Zellen, sondern auch in der erythromegakaryozytären Zelllinie K562 untersucht. Wie schon erwähnt, besitzt diese Linie das Potenzial zu verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen zu differenzieren, vorwiegend zu Erythrozyten, aber auch zu Megakaryozyten oder zu einem noch kleineren Anteil zu Monozyten. Die Induktion der megakaryozytären Differenzierung von K562 Zellen wird durch die Stimulation mit dem Phorbolster TPA erreicht.

Ebenso wie in HL-60 und U937 Zellen zeigten auch hier Northern Analysen einen schnellen Anstieg der *egr-1*-Expression, die nach 30 min nachweisbar, nach 60min höchste Werte annahm und nach einem Tag nicht mehr zu sehen war.

Das Einbringen eines aktiven *egr-1*-Plasmids in diese Zellen untermauert die angenommene Rolle des Transkriptionsfaktors für die megakaryozytäre Differenzierung. Dieser *egr-1*-Vektor führte in K562 Zellen zu einer verminderten Synthese von erythroidem Glykoprotein A, monozytären CD 33 Oberflächenmarker und zu einer Herabregulation erythroider Gene (z.B. GATA-1). Tatsächlich veränderte die alleinige Expression des ektopten *egr-1* ohne zusätzliche TPA-Beigabe den Staus der Zellen dahingehend, dass sie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine wesentlich höheren

Anteil des megakaryozytären Oberflächenrezeptor CD 41a exprimierten. Veränderungen im Bereich der erythroiden und monozytären Marker waren in *egr-1*-transfizierten Zellen nicht wahrzunehmen (*Cheng et al., 1994*).

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das *egr-1*-Gen wesentlich an der megakaryozytären Differenzierung beteiligt zu sein. Interessanterweise wird diese von einer Suppression erythroider und monozytärer Marker begleitet, so dass sich Parallelen zu den Ergebnissen der *egr-1*-Forschung in HL-60 Zellen aufdrängen. Dort beschränkte der Transkriptionsfaktor die Differenzierung der multipotenten Linie ausschließlich auf Makrophagen und unterdrückte die der Granulozyten.

Neue Ergebnisse ergänzen dies in der Hinsicht, als dass *egr-1* die Ausbildung von Makrophagen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarkes auf Kosten der granulozytären oder erythroiden Zellreihen bevorzugt, unabhängig davon, welchem Zytokin die Zellen ausgesetzt sind (*Krishnaraju et al., 2001*).

Diese Effekte erzielte man durch Versuche in mit Stammzellen und myeloischen Zellen angereicherten Knochenmarkszellkulturen, die anschließend mit einem *egr-1*-exprimierenden Virus infiziert wurden. Es zeigte sich, dass diese Zellen gegenüber der Kontrollgruppe ein geringeres Wachstum an den Tag legten und analog dazu eine niedrigere Zahl von Kolonien bildeten. Gleichzeitig wiesen sie den Phänotyp von Makrophagen und andere Merkmale dieser auf, wie etwa einen erhöhten Prozentsatz von NSE- (nicht-spezifische Esterase) positiven Zellen und die Ausbildung des Oberflächenmarkers F4/80. Dieser Effekt konnte unter Stimulation mit verschiedenen Zytokinen (IL-3, SCM, GM-CSF, M-CSF), nicht jedoch mit G-CSF erzielt werden, andererseits jedoch schwächte die ektope Expression von *egr-1* die von G-CSF geförderte granulozytäre Entwicklung, was bisherigen Ergebnisse nur stützt. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass die Wirkung des *egr-1*-Vektors in mit Stammzellen angereicherten Knochenmarkskulturen noch viel deutlicher hervortrat.

Bei Behandlung dieser Kulturen mit Induktoren der erythroiden Differenzierung setzte sich auch hier die Ausbildung von Makrophagen durch, so dass man ergänzend festzustellen kann, dass dies nicht nur auf Kosten der granulozytären Linien, sondern auch der erythroiden Linie stattfindet (*Krishnaraju et al., 2001*)

### **3.3.4 Zusammenfassung**

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 stellt sich damit wie folgt dar:

Seine Expression fördert die Ausbildung der Monozyten und Makrophagen, nicht nur aus myeloischen Zellen, sondern auch aus Stammzellen. Dabei ist seine Wirkung abhängig vom Kommitment der jeweiligen Zelllinie. In Zellen die für die monozytäre Entwicklung determiniert sind, bewirkt die alleinige Expression eine Ausdifferenzierung, wohingegen in pluripotenten Zellen die Anwesenheit eines Induktors notwendig ist.

Die Favorisierung der monozytären oder der megakaryozytären Differenzierung z.B. in K562 Zellen findet dabei auf Kosten erythrozytärer und granulozytärer Linien statt. Der Transkriptionsfaktor induziert nicht nur die Differenzierung, sondern senkt dabei auch das Wachstum und das leukämische Potenzial der Zellen.

### **3.4 ERK/MAP-Kinasen und Egr-1**

Die bisher aufgezeigten Effekte der *egr-1*-Aktivierung, wie z.B. die Differenzierung von myeloiden Zellen (HL-60, U937, M1, 32Dcl3) zu Makrophagen oder von erythromegakaryozytären K562 zu Megakaryozyten, decken sich mit den Effekten von aktivierten ERK/MAP-Kinasen auf die Reifung dieser Zellen. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung von *egr-1* über die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen gesteuert wird.

Und tatsächlich wies man nach, dass die ERK/MAP-Kinasen die *egr-1*-Expression stimulieren und wahrscheinlich auch die biologische Aktivität Transkriptionsfaktors regulieren (*Kaufman et al., 2001*).

Diese ERK/MAPK-vermittelte Aktivierung der *egr-1*-Expression taucht in verschiedenen Bereichen der Forschung immer wieder auf. So wird z.B. die Insulin abhängige *egr-1*-Aktivierung ebenfalls über die extrazellulär Signal-regulierten Proteinkinasen vermittelt (*Harada et al., 2001*), so wie auch die Wirkung von Trifluoperazin. Dieser Calmodulinantagonist führt in HT1080 Fibrosarkomzellen zu einer gesteigerten *egr-1*-Expression, die auf der Aktivierung der Ras/MEK/ERK/Elk-1-Signaltransduktions Kaskade beruht (*Shin et al., 2001*).

Analog dazu liefert die kardiovaskulären Forschung Erkenntnisse, die eine *egr-1*-Expression über die Proteinkinase C vermittelte Aktivierung der Ras/Raf-1/ERK1/2-

Signaltransduktionsweges postulieren. Man wies nach, dass in Endothelzellen, die einer Hypoxie ausgesetzt wurden, ein rascher und transients Egr-1-Anstieg über die PKC-abhängige Stimulierung der Ras/Raf-1/MEK/ERK/Elk-1-Kaskade verläuft (Lo et al., 2001).

Aufgrund der oben dargestellten Sachverhalte, dass sowohl *egr-1* als auch die anhaltende ERK-Aktivierung für die monozytären Differenzierung notwendig sind, soll im Folgenden der Zusammenhang zwischen diesen beiden Komponenten dargestellt werden, und zwar in der Hinsicht, als dass die TPA vermittelte Induktion der monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen über den Signalfluss von MEK/ERK/Elk-1 an *egr-1* weitergeleitet wird, und diese Komponenten eine funktionelle Einheit im Rahmen der monozytären Differenzierung bilden.

### 3.5 Die Testsubstanzen

#### 3.5.1 TPA (PMA)

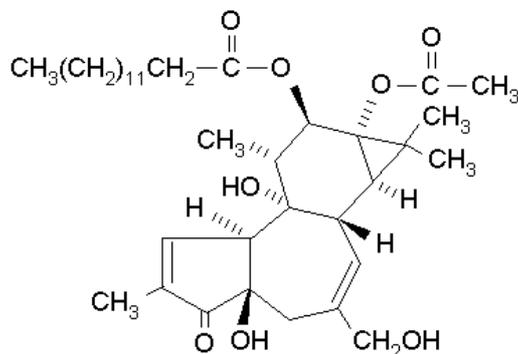


Abbildung 5: Struktur von TPA

Der Phorbol-ester TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) ist ein sehr potenter Tumorpromotor, der die Differenzierung von verschiedenen myeloischen Zelllinien induziert. HL-60 Zellen differenzieren genauso wie THP-1 und U937 Zellen unter TPA zu Makrophagen (Rovera et al., 1979; Ways et al., 1987). In der erythromegakaryozytären K562 Zelllinie bewirkt die TPA-Stimulation eine Differenzierung zu Megakaryozyten (Koeffler et al., 1981). Man nimmt an, dass TPA in der Zelle die Wirkung von Diacylglycerol nachahmt und in Folge dessen die PKC aktiviert (Nishizuka., 1992). Über diese kann wiederum die ERK/MAPK-Kaskade

stimuliert werden. Interessanterweise scheint TPA die Differenzierung dosisabhängig zu beeinflussen, wie man sowohl in HL-60 als auch in MEP Zellen festgestellt hat. Unter einem ersten, sehr niedrigen Schwellenwert (1 nM) findet in MEP Zellen keine, darüber die myelomonozytäre und über einem zweiten (20 nM) die eosinophile Differenzierung statt (*Rossi et al., 1996*). In HL-60 Zellen fördern sehr niedrige Dosen (0,3 nM) die Proliferationsfähigkeit, bei etwas höheren (0,4 nM) bilden sich Granulozyten und bei noch höheren Dosen (>0,5 nM) Makrophagen (*Collins, 1987*).

### 3.5.2 Erythropoetin

Das Glykoproteinormon Erythropoetin wird zu 90% von Kapillarendothelzellen und Fibroblasten der Niere gebildet. Die restlichen 10% produziert die Leber. Bei Anämie, arterieller Hypoxie oder erhöhter Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird vermehrt Erythropoetin sezerniert (*Klinken und Silbernagel, 1996*), um über eine gesteigerte Produktion von roten Blutkörperchen diesen Sauerstoffmangel auszugleichen. Das Hormon übernimmt eine wichtige regulatorische Funktion in der Hämatopoese, da es über Bindung an entsprechende Rezeptoren die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von späten erythroiden Vorläuferzellen kontrolliert (*Wu et al., 1995*). J2E, SKT6 und ELM-I-1 Zellen der Maus stellen solche späten erythroleukämischen Vorläuferzellen dar, die unter Stimulation mit Epo zu differenzieren beginnen (*Todokoro et al., 1987; Klinken et al., 1988; Itoh et al., 1988*). Damit eignen sich diese Zelllinien, die Epo-induzierte Erythropoese und deren intrazellulären Prozesse zu untersuchen.

### 3.5.3 UO126

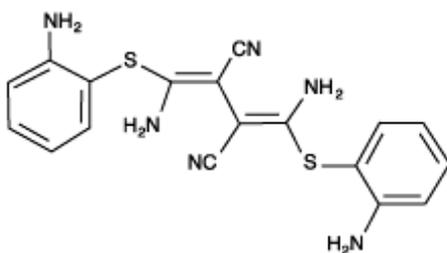


Abbildung 6: Struktur von UO126

UO126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien) wurde ursprünglich als eine Substanz identifiziert, die die Wirkung des Transkriptionsfaktors AP-1 antagonisierte. Genauere Studien führten jedoch zu der Erkenntnis, dass die niedermolekulare Verbindung nicht die AP-1-Bindung an die DNA blockierte, sondern durch Inhibition von MEK1/2 die über die ERK-Kaskade vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors verhinderte.

Das aromatische Aminothiolderivat gilt als ein nichtkompetitiver spezifischer MEK1/2-Inhibitor, der keine oder nur eine sehr geringe Wirkung auf andere Kinasen ausübt. So werden MEK1/2 fünfmal stärker inhibiert als beispielsweise JNK/p38 oder PKB $\alpha$ , während andere Kinasen unbeeinflusst bleiben. UO126 erzielt seine Effekte auf die Zellen dadurch, dass es die Aktivierung der dualspezifischen Kinasen durch Raf-1 verhindert, nicht jedoch ihre Aktivität selbst verändert (Davies *et al.*, 2000). Im Vergleich zu dem anderen bekannten MEK1-Inhibitor PD 98059 weist UO126 gegenüber dem MEK-Wildtyp und der MEK-Mutation (N3-S218E/S222D) eine viel höhere Affinität auf. Beide Substanzen binden an MEK an anderer Stelle als deren Substrate ATP und ERK. Weiterhin legen Vermutungen nahe, dass sich die Bindungsstellen von PD 98059 und UO126 überlappen (Favata *et al.*, 1998).

#### 3.5.4 PD 98059

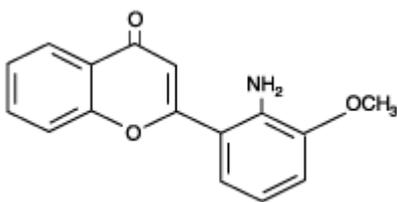


Abbildung 7: Struktur von PD 98059

PD 98059 (2-(2-Amino-3-methoxy)-flavon) wurde als eine Substanz identifiziert, die die dephosphorylierte MAPKK1 (MEK1) und die MAPKK1-Mutante (S217E, S221E), welche nur zu einem geringen Grad konstitutionell aktiv ist, inhibiert (Dudley *et al.*, 1995). Eine Hemmung von MAPKK2 (MEK2) durch PD 98059 findet bei einer wesentlich höheren IC<sub>50</sub> (50  $\mu$ M statt 2-7  $\mu$ M) statt, so dass PD 98059 als ein spezifischer MEK1-Inhibitor zu betrachten ist (Alessi *et al.*, 1995). Es sind keine weiteren Kinasen bekannt, die durch eine Konzentration von 50  $\mu$ M PD 98059 inhibiert

werden (*Davis et al., 2000*). Neuere Ergebnisse deckten eine Besonderheit in der Wirkung von PD 98059 auf, da das Flavon die durch Raf aktivierte MEK1 nicht zu inhibieren vermochte. Umgekehrt wurde durch Einsatz von PD 98059 die Aktivierung von MEK1 durch Raf verhindert. Auch für diese Substanz gilt also, dass nicht die Aktivität von MEK1 gesenkt wird, sondern vermutlich über eine allosterische Hemmung die Aktivierung durch übergeordnete Kinasen erschwert wird. Aus dieser Tatsache leitet sich die Notwendigkeit einer Vorinkubation in Versuchen mit MAPKK-aktivierenden Substanzen ab. Da PD 98059 im Vergleich zu UO126 ein weniger potenter Inhibitor der MEK1/2 ist, scheint es nicht verwunderlich, dass das Ausmaß der nichtkompetitiven Hemmung von MEK durch PD 98059 abhängig von der Stärke der Raf/MEK-Aktivierung ist (*Alessi et al., 1995*).

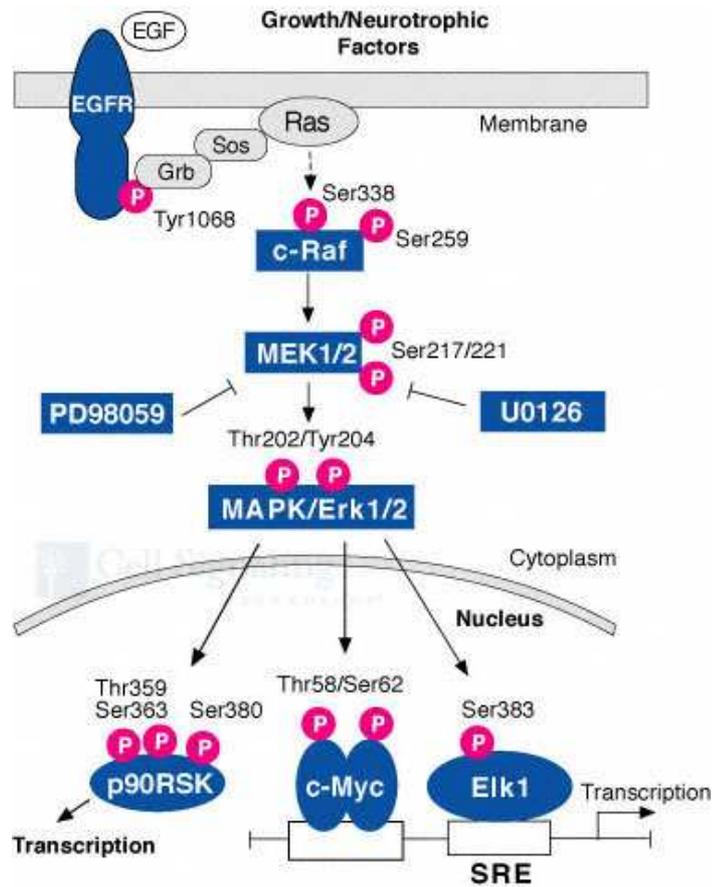


Abbildung 8: Angriffspunkte von UO126 und PD 98059 (Quelle: cell signal.com)

### 3.5.5 SB 203580

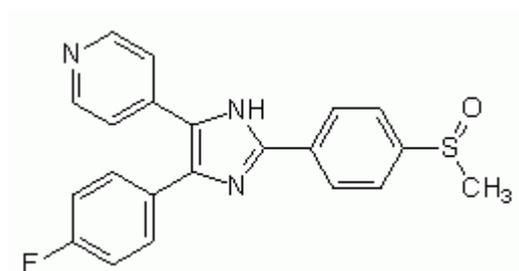


Abbildung 9: Struktur von SB 203580

Die Kenntnis über die Struktur von p38 machte es möglich spezifische p38-Inhibitoren, wie die Pyridinylimidazole, zu entwickeln (Wang *et al.*, 1998). Diese binden in die für

ATP vorgesehene Tasche von p38 (*Tong et al., 1997*), und dort scheint der Threonin-Rest an Position 106 ganz entscheidend für die Spezifität dieser Substanzklasse für p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  zu sein (*Gum et al., 1998; Eysers et al., 1998*). Die IC50-Werte liegen für diese beiden Isoformen bei 1  $\mu$ M. p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ , die an der Position 106 anstelle von Threonin einen Methionin-Rest besitzen, weisen eine IC50-Konzentration von 100  $\mu$ M auf. Im Gegensatz zu den MEK-Inhibitoren wirkt SB 203580 als kompetitiver Inhibitor (*Frantz et al., 1998*). Nur wenige andere Kinasen werden durch diese Substanz in sehr viel höheren Konzentrationen beeinflusst (*Davies et al., 2000*)

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Methoden zur Handhabung der HL-60 Zellen**

#### **4.1.1 Zellkultur**

Sowohl die HL-60 als auch die ELM-I-1 Zellen wurden freundlicherweise von Professor W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg, zur Verfügung gestellt. HL-60 Zellen sind menschliche Leukämiezellen, die aus einem Patienten mit akuter myeloblastischer Leukämie isoliert wurden (*Collins, 1987*), während die erythroblastoiden ELM-I-1 Zellen der Maus entstammen.

Die menschliche Linie wurde bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in RPMI 1460-Medium kultiviert. Das RPMI-Medium wurde vor seinem Einsatz für die Zellkultur mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. ELM-I-1 Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in  $\alpha$ -MEM, welches wie das RPMI-Medium aufbereitet wurde, jedoch statt fetalem Kälberserum Pferdeserum enthielt, gehalten. Alle zwei Tage erfolgte die Passage und Verdünnung der Zellen in einem Verhältnis 1:4

#### **4.1.2 Einfrieren von HL-60 Zellen in Flüssigstickstoff**

Zum Einfrieren wurden  $(1-2) \times 10^6$  Zellen pro einem ml FCS mit 10% DMSO aliquotiert und von 4 °C mit einer Temperatursenkung von 1 °C/min auf -80 °C herab gekühlt. Darauf folgte das Einfrieren der Zellen in Flüssigstickstoff. Für das Auftauen wurden sie in 20-30 ml 37 °C warmen Zellkulturmedium gewaschen, um dann in Kultur gebracht zu werden.

## **4.2 Methoden zur Analyse von Proteinen**

### **4.2.1 Der Western Blot**

Mit Hilfe der hier verwendeten Methode des Western Blots ist es möglich, das Vorhandensein und die Aktivierung intrazellulärer Proteine nachzuweisen.

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der Isolierung von zellulären Proteinen, die zunächst mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert werden. Diese erlaubt eine Fixierung von Proteinen im genauen Abbild des Gels, hat jedoch den Vorteil handlicher und stabiler als jenes zu sein. Um eine Aussage über die Quantität oder den Phosphorylierungszustand von Proteinen treffen zu können, müssen diese zuvor für das menschliche Auge sichtbar gemacht werden. Hierzu verwendet man spezifische Antikörper, die an die gesuchten Proteine binden. Ein Zweitantikörper wiederum ist gegen diesen Primärantikörper gerichtet und dockt an ihn an. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym, die Meerrettichperoxidase, gekoppelt, welches bei Reaktion mit einem Substrat durch entstehende Chemilumineszens einen Röntgenfilm genau dort belichtet, an dem das nachzuweisende Protein an die Membran gebunden ist. Im Folgenden wird auf die einzelnen Abschnitte des Western Blots genauer eingegangen. Die genauen Angaben zu den Zusammensetzungen der Lösungen, sowie den Konzentrationen und Geräten sind den nachfolgenden Tabellen in den Kapiteln 4.6-4.8 zu entnehmen.

### **4.2.2 Proteinisolierung**

An erster Stelle der Proteinanalyse steht die Isolierung dieser aus der Zelle selbst. Zunächst wurden am Vortag eines Versuchs ca.  $1,25 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI-Medium ausplattiert und ungefähr 18 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert.

Nach der Behandlung entsprechend des Versuchsplanes am nächsten Vormittag wurden die Zellen geerntet und in 10 ml kaltem PBS für 5 min bei 65% gewaschen. Waren die Zellen im Versuch mit den niedermolekularen MEK-Inhibitoren PD 98059, UO126 oder dem p38-Inhibitor SB 203580 behandelt worden, so wurden diese in gleicher Konzentration dem PBS-Waschvolumen hinzugefügt.

Für die Lyse der Zellen versetzte man die Ansätze mit 90 µl P-RIPA-Lysispuffer, welcher Proteaseinhibitoren enthielt, und mischte gründlich, um die DNA auszufällen. Im Anschluss daran ruhten die Proben für eine halbe Stunde auf Eis. Das nicht gelöste Zellmaterial wurde dann bei  $12\,000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  für 12 min abzentrifugiert. 73 µl des Überstandes, welcher das Protein enthielt, wurden mit 23,3 µl Laemmli III versetzt, für 5 min bei  $100\text{ °C}$  erhitzt und auf Eis für weitere 5 min abgekühlt. Eine Aufbewahrung der Proben bei  $-20\text{ °C}$  war nach dieser Prozedur möglich.

#### **4.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes**

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurden im doppelten Ansatz 1,5 µl der Protein enthaltenden Probe mit 500 µl destilliertem Wasser und 500 µl Bradfordreagenz bei einer Wellenlänge von 595 nm photometriert. Durch die Zugabe des Reagenz entsteht eine intensiv blaue Färbung, die durch Komplexierung des Farbstoffes Brilliantblau G mit den Proteinen hervorgerufen wird und ein Absorptionsmaximum in der genannten Wellenlänge besitzt (*Bradford, 1976*).

#### **4.2.4 Gelelektrophorese und Wet-Blot**

Die Elektrophorese dient der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld. Bei der hier angewendeten diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichts bei der Wanderung zur Anode getrennt. Durch die Zugabe von SDS erhalten die Proteine eine negative Gesamtladung, so dass die Auftrennung nur noch von der Porengröße des Gels und dem Molekulargewichte der Proteine abhängt. Das Polyacrylamid-Minigel setzt sich aus dem 5%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel, die jeweils 0,1 % SDS enthalten, zusammen.

Mit 40 µg Protein je Tasche lief die Elektrophorese für ca. 90 min mit einer Stromstärke von 27 mA in der Elektrophoresekammer, welche mit  $4\text{ °C}$  kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt war.

Direkt im Anschluss daran wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran mit Hilfe des Wet-Blotverfahrens transferiert. Zuvor musste die Membran für eine Minute in reinem Methanol hydrophilisiert und dann wie auch die Filterpapiere und

Schwammtücher für ca. 20 min in Blotpuffer getränkt werden. Das Gel wurde  $3 \times 5$  min im Transferpuffer gewaschen, um äquiliert zu werden. Danach erfolgte die Zusammenlegung von Schwammtüchern, Filtern, Gel und Membran zum Blotsandwich, Fixierung mittels einer Halterung und anschließend das Einsetzen in die mit Blotpuffer gefüllte Kammer. Um eine ausreichende Kühlung während des Blots zu gewährleisten, wurde ein Eisträger mit in die Apparatur eingebracht.

Dieser Blotvorgang nahm für 110 min bei 270 mA seinen Lauf, wobei in dieser Zeit die Eisträger dreimal gewechselt wurden. Nach Beendigung, wurden die Membranen je  $3 \times 5$  min in TBS gewaschen und über Nacht getrocknet, um den Verlust an geblotteten Protein zu senken.

Zunächst wurden die für den Nachweis nicht interessanten Bereiche der Membran abgeschnitten, so dass schmale Streifen mit der jeweils nachzuweisenden Bande resultierten. Für eine Minute wurden diese in reinem Methanol rehydratisiert und dann  $3 \times 5$  min mit TBS gewaschen. Eine weitere Waschung in 0,1%igen TBS-Tween 20 für 10 min schloss sich dem an. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erforderte 1 h und fand in einer zu 5% mit Milchpulver und zu 0,02% mit Natriumazid gesättigten 0,1%igen TBS-Tween 20 Lösung (Blockierlösung) bei Raumtemperatur statt. Danach wurden die Membranstreifen in einer den Primärantikörper, 1:200 verdünnt, enthaltenden frischen Blockierlösung geschwenkt. Nach Ablauf einer weiteren Stunde wurde das Erstantikörpergemisch mit destilliertem Wasser kurz abgespült und wieder dreimal à 15 min in 0,1%igen TBS-Tween 20 geschüttelt. Die Markierung des Erstantikörpers geschah mit Hilfe eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten Zweitantikörper (Kaninchen 1:10000 oder Maus 1:6666,7) innerhalb einer weiteren Stunde in einer Blockierlösung ohne Natriumazid. Bevor die Chemolumineszenzreaktion stattfinden konnte, musste man die Membranen wiederum für eine Stunde mit TBS-Tween 20 waschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper konnte dann mit dem ECL-Western Blot Detektionssystem durch die entstehende Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

Bestand der Bedarf die Membranstreifen für weitere Untersuchungen erneut zu verwenden, so wurden diese für 30 min in einer Wasserstoffperoxid enthaltenden TBS-Lösung, welche die an den Sekundärantikörper gebunden Peroxidase zerstört, geschüttelt und für weitere 15 min in TBS gewaschen. Die Banden wurden für die Dokumentation dem *Gel print 2000i System* digitalisiert. Für die Auswertung setzte man die Banden mit Referenzproteinen in Bezug gesetzt und wertete sie mit Hilfe des *One-Dscan* aus.

### **4.3 Methoden zur Analyse der RNA**

#### **4.3.1 Northern Blot**

Mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens kann die RNA der Zelle analysiert werden. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die Analyse der messenger-RNA, denn sie gibt Auskunft darüber, welche Gene und die durch sie codierten Proteine in der Zelle abgelesen werden. Zunächst muss die RNA aus dem Zellmaterial isoliert werden, um später aufgereinigt mittels einer 1%igen Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt zu werden. Anschließend erfolgt unter Kapillarkräften die Fixierung der Ribonukleinsäuren auf eine Membran. Diese wird mit einer zur gesuchten RNA komplementären, radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Radioaktivität schwärzt bei der Entwicklung eines Röntgenfilmes genau diejenigen Stellen, an der die gesuchte mRNA auf der Membran fixiert ist.

#### **4.3.2 Isolierung der RNA**

Für einen Versuch wurden  $12 \times 10^6$  Zellen pro Versuchsansatz ausplattiert und am nächsten Tag entsprechend des Versuchsplanes behandelt. Nach der vorgesehenen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und bei 50% für 5 min abzentrifugiert. Das von Mediumresten befreite Pellet wurde mit Solution D aufgeschlossen und nacheinander mit 100 µl Natriumacetat 2 M pH 4, 1 ml Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol 49:1 versetzt (*Chomczynski und Sacchi, 1987*). Nach einer 15 min dauernden Ruhepause zentrifugierte man die Proben bei 4 °C für eine Stunde bei  $3000 \times g$ , um eine Phasentrennung zu erzielen. Die RNA befand sich danach in der wässrigen oberen Phase, von der 900 µl in kleine Eppendorfreaktionsgefäße überführt wurden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Ausfällung der RNA für 5 h mit 1 ml eiskaltem Isopropylalkohol bei -20 °C. Nach dieser Zeit wurde die RNA für 15 min bei 4 °C und  $10000 \times g$  abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 300  $\mu$ l Solution D und 300  $\mu$ l eiskaltem Isopropanol resuspendiert und über Nacht bei -20 °C erneut ausgefällt. Am nächsten Tag zentrifugierte man unter gleichen Bedingungen die RNA wieder ab und wusch sie mit 75%igem Ethanol. Die so gereinigte RNA wurde getrocknet und mit 110 ml 0,5%igem SDS versetzt. Danach mussten die Proben gründlich gemischt und kurz auf 56 °C erwärmt werden, damit sich die RNA wieder vollständig lösen konnte.

#### **4.3.3 Photometrische Bestimmung des RNA Gehaltes**

Für die Bestimmung des RNA-Gehaltes wurden pro Versuchsansatz je zweimal 5  $\mu$ l der Probe in 1 ml destilliertem Wasser überführt und bei 260 und 280 nm photometriert. Aliquots von 40-60  $\mu$ g RNA wurden mit dem 0,1fachen Volumen Natriumacetat 3 M pH 5,5 und dem doppeltem Volumen Ethanol bei -80 °C erneut über Nacht ausgefällt. Die Aufbewahrung der restlichen Proben erfolgte ebenfalls bei -80 °C.

#### **4.3.4 Glyoxalisierung und Elektrophorese**

Bevor die Glyoxalisierung beginnen konnte, zentrifugierte man die RNA für 15 min ab und ließ sie für 30 min unterm Abzug trocknen.

Zu den Proben gab man daraufhin den Glyoxalisierungsmix hinzu, der dafür sorgte, dass die RNA denaturierte und dies auch während der nativen Agarosegelelektrophorese blieb. Dieser Vorgang lief für ca. 50 min bei 56 °C ab. Zuvor wurde jedoch pro Ansatz je zweimal 1,5  $\mu$ l RNA-Probe entnommen und bei 260 nm in 1 ml destilliertem Wasser photometrisch bestimmt. Es wurde dann ein Aliquot von 40  $\mu$ g mit 3,4  $\mu$ l Probenpuffer versetzt. Die Proben liefen in 1%igem Agarosegel zuerst für 30 min bei 30 V und dann für weitere 4 Stunden bei 40 V. Während dieser Zeit sorgte man mittels einer Pumpe für die Zirkulation des Elektrophoresepuffers.

#### **4.3.5 Blot**

In diesem Schritt wurden die in dem Agarosegel aufgetrennten Nukleinsäuren auf eine Membran transferiert. Dazu wurde das Gel auf eine mit Filterpapier, dessen Enden in ein Bad von  $20 \times$  SSC tauchten, bedeckte Brücke gelegt. Auf das Gel wiederum

schichtete man die Biodyne-Membran und über diese zwei weitere Filterpapiere. Diese Konstruktion wurde mit reichlich Papiertüchern beschichtet und mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Der Transfervorgang verlief über die Nacht (*Thomas, 1980*).

#### 4.3.6 Hybridisierung

Die in die Membran eingewanderten Nukleinsäuren wurden am nächsten Tag im Backofen für zwei Stunden bei 80 °C und Unterdruck auf der Membran fixiert und die Glyoxalreste dadurch abgespalten.

Bevor die eigentliche Hybridisierung stattfinden konnte, wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer Prähybridisierungslösung für die Dauer von 6 h bei 42 °C geblockt. Im nächsten Schritt wurde die Membran erneut in einer Prähybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte und bei 100 °C denaturierte DNA-Sonde enthielt, für 18 h bei 42 °C inkubiert. Nach Reinigung mittels einer Sephadex Säule erfolgte die Markierung der DNA-Sonden mit dem Multiprime DNA-labelling System von Amersham.

Sonden-DNA, die nicht oder unspezifisch gebunden war, entfernte man durch eine Serie von Waschungen. Sie fanden mit folgenden Konzentrationen an SSC und SDS und Temperaturen statt:

<b>Lösung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
2 × SSC/0,1% SDS	20 °C	30 min
2 × SSC/0.1% SDS	50 °C	60 min
0,5 × SSC/0.1% SDS	50 °C	30 min
0.2 × SSC/0.1% SDS	55 °C	30 min

Die DNA-Sonde hybridisierte auf der Membran mit komplementärer RNA, in diesem Fall *egr-1* und *β-Aktin* mRNA, und entsendete radioaktive Strahlen von diesem Ort, mit deren Hilfe ein Röntgenfilm an den entsprechenden Stellen belichtet werden konnte. Dafür legte man einen Film in eine Röntgenkassette bei -80 °C und entwickelte ihn. Je nach Menge der in der Membran fixierten RNA fielen die Banden mehr oder weniger stark aus.

Für die Dokumentation fotografierte man die Filme mit dem *Gelprint 2000i* und wertet sie mit dem *One Dscan* aus.

## **4.4 Methoden zur Beurteilung von Differenzierung**

### **4.4.1 Pappenheimfärbung**

Die Pappenheimfärbung ist eine Standardfärbung der Hämatologie und wird zum Beispiel für die differenzierte Untersuchung von Blutausstrichen angewandt. Ihre Komponenten sind die May-Grünwald-Lösung und verdünnte Giemsa-Lösung. Die erste dient der Fixierung und Vorfärbung, letztere ist für die eigentliche Färbung verantwortlich. Mit dieser Methode stellen sich die Zellkerne rötlich-lila und das Plasma blau dar.

Für einen Versuch wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 7,5 ml RPMI-Medium ausplattiert, tags darauf behandelt und für 6 Tage im Zellkulturschrank inkubiert. Am sechsten Tag wurden die Ansätze geerntet, in kaltem PBS gewaschen, erneut in PBS aufgenommen und Anteile davon auf Objektträger zentrifugiert. Die Präparate wurden für 15 min in Methanol fixiert und daraufhin getrocknet. Daran schloss sich die Vorfärbung mit May-Grünwald-Lösung für 3 min an, welche dann mit destilliertem Wasser für 1 min unterspült wurde. Das Farbgemisch wurde abgossen und daraufhin mit verdünnter Giemsa-Lösung (auf 10 ml Aqua dest. 23 Tropfen Giemsa) für 15 min gefärbt. Eine gründliche Spülung unter laufendem destilliertem Wasser und eine anschließende Lufttrocknung stellten den Abschluss des Färbevorganges dar. Um die Präparate lange konservieren zu können, wurden sie mit einem Deckgläschen, welches mit Entellan beschichtet wurde, abgedeckt.

### **4.4.2 $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung**

Esterasen sind ubiquitäre zelluläre Enzyme, die auch in hämatopoetischen Zellen vorkommen und anhand spezifischer Substrate nachgewiesen werden können. Speziell diese Färbung erlaubt es dem Hämatologen Monozyten von Granulozyten und anderen weißen Blutzellen zu unterscheiden. Werden HL-60 Zellen mit Substanzen behandelt, die die monozytäre Differenzierung induzieren, so katalysiert ihre Esterase die hydrolytische Spaltung der Esterverbindung in  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat und setzt

Naphtholgruppen frei. Diese verbinden sich mit einem Diazoniumsalz zu einem farbigen Salz, welches an Orten mit hohen Esterasekonzentrationen als grün-schwarze Granula sichtbar wird.

Es wurden wie für die Pappenheimfärbung  $1 \times 10^5$  Zellen in 7,5 ml RPMI-Medium ausplattiert und behandelt. Das Ernten und die Präparation auf die Objektträger erfolgte wie zuvor beschrieben.

Kurz vor Fixierung der präparierten Objektträger in einer Citrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung (CAF-Lösung) wurde 1 ml Fast-Blue-BB-Base-Solution mit 1 ml Natriumnitrat vermischt und einige Minuten gewartet bis ein Farbumschlag von braun nach gelb stattfand. Sobald sich die Farbreaktion sichtbar wurde, gab man diese Lösung zu 40 ml 37 °C warmen destillierten Wassers, wobei nun die Farbe nach grün umschlagen sollte. Jetzt wurden die Präparate für 30 s in der CAF-Lösung fixiert. Bevor es jedoch zum eigentlichen Färbeprozess kommen konnte, musste die Fixierlösung sehr gründlich unter laufendem deionisiertem Wasser entfernt werden, denn Rückstände des Aldehyds inhibieren die enzymatische Aktivität der Esterase. Die oben beschriebene Färbung erfolgte für 30 min im abgedunkelten Wasserbad bei 37 °C. Danach spülte man die Objektträger erneut gründlich und ließ sie an der Luft trocknen. Um die Präparate mit dem Ölimmersionsobjektiv betrachten zu können, wurden sie mit Aquatex-beschichteten Deckgläschen abgedeckt. Für die Auswertung wurden in 3 unabhängigen Versuchen je 300 Zellen ausgezählt und der Anteil von Zellen die Granula besaßen denen ohne Granula gegenübergestellt. Diese Färbung wurde mit einem Kit von Sigma durchgeführt.

#### **4.4.3 2,7-Diaminoflouren-Färbung**

Diese Methode dient dem histochemischen Nachweis von Hämoglobin in erythroiden Zellen. Im Gegensatz zu dem sonst üblich angewendeten Nachweis des Blutfarbstoffes mit Benzidin birgt sie den Vorteil, dass 2,7-Diaminoflouren (DAF) im Gegensatz zu Benzidin keine kanzerogenen Eigenschaften aufweist. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Vorhandensein einer Pseudoperoxidase in Hämoglobin, welche mit 2,7-Diaminoflouren als Wasserstoffdonator in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Bildung von Flourenblau aus Diaminoflouren katalysiert (*Kaiho et al., 1985*).

Für einen Versuch wurden  $1,7 \times 10^5$  Zellen in 5 ml Medium ausplattiert und mit den Versuchssubstanzen behandelt. Bei Kombination von Epo mit SB 203580, UO126 wurden diese Inhibitoren eine Stunde vor der Applikation von Epo zu den Ansätzen gegeben. Drei Tage lang ruhten die Ansätze im Zellkulturschrank. Insgesamt wurde der Versuch dreimal durchgeführt.

Für den Nachweis von Hämoglobin wurden 50 mg Diaminofluoren in 5 ml 90%iger Essigsäure gelöst. Diese Lösung ist bei 4 °C im Dunkel für einen Monat haltbar. Für den Versuch fügte man zu 4 ml destilliertem Wasser 1 ml 1M Tris-HCl pH 7, 500 µl der DAF-Lösung, 50 µl 30%iges Wasserstoffperoxid und vermengte dann 100 µl dieses Gemisches mit 100 µl Zellsuspension. Damit die Reaktion stattfinden konnte, wartete man 5 min bevor die Auszählung der Zellen in der Neubauerzählkammer erfolgte. Im Rahmen der Auswertung wurden die positiven und die negativen Zellen gezählt und einander gegenüber gestellt.

## 4.5 Konzentrationen

### 4.5.1 Western Blot

Proteinisolierung		
RIPA-Puffer	Tris-HCl pH 7,4	5mM
	NaCl	15mM
	EGTA	100mM
	Nonidet P-40	1%
	Natriumdeoxycholsäure	10%
P-RIPA-Lysis-Puffer (mit Protease-inhibitoren)	RIPA+	
	Aprotinin	10µg/ml
	Leupeptin	10µg/ml
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)	1mM
	Benzamidin	10mM
	PNPP (p-Nitrophenylpyrophosphat)	1mM
	Natriumpyrophosphat	10mM
	Beta-Glycerophosphat	40mM
	NaF	1mM
PMSF (Phenylmethylsulfonylfourid)	1mM	
Laemmli III	Tris-HCl pH 6,8	180mM
	SDS (Sodiumdodecylsulfat)	6%
	Dithiothreitol	300mM
	Glycerol	45%
	EDTA	22,5mM
	Bromphenolblau	0,0015%

Elektrophorese		
PAGE-Puffer	Tris pH 6,8	62,5mM
	SDS	1%
	Glycerol	10%
	Beta-Mercaptoethanol	5%
	EDTA pH 7,2	0,5mM
	Bromphenolblau q.s	
5% SDS-Polyacryl-Amidgel	Acrylamid	5%
	Bis-Acrylamid	0,13%
	Tris-HCl pH 6,8	125mM
	SDS	0,1%
	Ammoniumpersulfat	0,1%
	TEMED	0,07%
10% SDS-Polyacryl-Amidgel	Acrylamid	10%
	Bis-Acrylamid	0,3%
	Tris-HCl pH 8,8	375mM
	SDS	0,1%
	Ammoniumpersulfat	0,1%
	TEMED	0,07%
Elektrophorese-puffer	Tris-OH	25mM
	Glycin	0,2M
	SDS	0,1%

Blot		
Blot-Puffer	Tris-OH	25mM
	Glycin	0,2M
	Methanol	15%
TBS pH 7,4 (Tris-buffered saline)	Tris-OH	50mM
	NaCl	0,2M

Nachweisreaktion		
Blockierlösung	Milchpulver	5%
	Tween 20	0,1%
	Natriumazid	0,02%
	In 1× TBS	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5%
	Tween 20	0,1%
	In 1× TBS	

#### 4.5.2 Northern Blot

RNA-Isolierung		
Solution D	Guanidin-Thiocyanat	4M
	Natriumcitrat	25mM
	Sarcosyl	0,5%
	2-Mercaptoethanol	0,1M
Natriumacetat-Puffer I	2M pH4	
Natriumacetat-Puffer II	3M pH 5,15	

Elektrophorese und Blot		
Glyoxalisierungs-Mix	Glyoxal	7,5%
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	50%
	Natriumphosphat	0,5µM

	In A.ad iniection.	
Elektrophoresepuffer	Natriumphosphatpuffer 0,01M pH7	
Probenpuffer	Ficoll	10%
	Bromphenolblau	0,4%
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01M
20×SSC	NaCl	3M
	Trinatriumcitrat	0,3M

Hybridisierung		
Prähybridisierungslösung	Formamid	50%
	Heringssperma-DNA	300µg/ml
	BSA (Bovines Serumalbumin)	0,01%
	Ficoll	0,01%
	PVP (Polyvinylpyrrolidon)	0,01%
	SDS	0,2%
	Natriumphosphat	0,05M in
	SSC	5×

### 4.5.3 Morphologie

Mikroskopie		
PBS (Phosphat-buffered saline)	NaCl	135mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9mM
	KCl	2,7mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM

## 4.6 Geräte

Gerät	Firma
Gel print 2000i-Dokumentationssystem (Version 2.3)	Biophotonics Corp., Ann Arbor, MI
Hybridisierungs-ofen	AGS, Heidelberg
Kühlzentrifuge	Beckmann
Licht/Floureszenzmikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss, Jena
One-Dscan software	Scanalytics (Billerica; MA, USA)
Persisaltische Pumpe	Eigenbau
RNA-Elektrophoresekammer (Horizon 11-14)	AGS, Heidelberg
Stromquelle	Consort
Tischzentrifuge	Eppendorf
Western Blot-Apparatur (Mini ProteanII)	Biorad, München
Zellkulturschrank	Heraeus

## 4.7 Materialien

Material	Firma
(Alpha- <sup>32</sup> P)-dCTP 3000 Ci/mmol	ICN, USA
2,7-Diaminoflourene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Biomol, Hamburg
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Biorad, München
Anti-Egr-1-IgG (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz, USA
Anti-ERK1-IgG (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz, USA
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege Peroxidase-konjugiert)	Sigma, USA
Anti-Maus-IgG (Ziege Peroxidase-konjugiert)	Sigma, USA

Anti-pElk-IgG (Maus monoklonal)	Santa Cruz, USA
Anti-pERK-IgG (Maus monoclonal)	Santa Cruz, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua iniectionis	Braun, Melsungen
Aquatex	Merck, Darmstadt
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Biodyne A transfer membrane 0,2 µm	PALL, Portsmouth, USA
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
ECL detection reagent (Enhanced Chemiluminescence)	Amersham Life Science, Braunschweig
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Egr-1 2,6 kb PstI Fragment mouse erg-1 cDNA	PD Dr. A. Sellmayer Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten Universität München
EGTA (Ethylenglycol-bis-N,N'-Tetra-Acet-Acid)	Fluka, Neu-Ulm
ELM-I-1 Zellen	Prof. W. Ostertag, Heinrich-Pette Institut für experimentelle Virologie und Immunologie, in Hamburg
Entellan	Merck, Darmstadt
Epo (Erythropoetin)	Boehringer, Mannheim
Essigsäure, konz.	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Eggenstein
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Giensa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyoxal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Guanidin-Thiocyanat	Fluka, Neu-Ulm
Heringsperma-DANN	Boehringer, Mannheim
HL-60 Zellen	Prof. W. Ostertag, Heinrich-Pette Institut für experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg
Human beta-Aktin cDNA 1,2-kb PstI Fragment	Dr. T. Braun Institut für Biochemie und Biotechnologie Universität Braunschweig
Isoamylalkohol	Fluka, Neu-Ulm
Isopropylalkohol	Fluka, Neu-Ulm
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	UKE-Apotheke
Mikroskopieröl	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Multiprime Labelling system	Amersham, UK
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)	BDH, England
NaCl	J.T. Baker, Griesheim
NaF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)	Calbiochem, USA
Penicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pferdeserum	Life Technologies, USA
Phenol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PNPP (p-Nitrophenylpyrophosphat)	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	Millipore, USA
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rainbow marker RPN 756	Amersham Life Science, Braunschweig
Röntgenfilm medical x-ray	Fuji, Deutschland
RPMI 1460 (Pulver)	GIBCO Life Technologies, USA
RPMI 1460 1× Fertigmiedium	PAA Laboratories, Wien
Sarcosyl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SB 203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H Imidazol	Calbiochem, USA
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED®	Biorad, München
TPA (o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)	ICN, USA
Tris	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20®	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
UO126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene)	New England Biolabs, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α-MEM (α-minimal essential medium)	Life Technologies, USA
Beta-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

## 5 Ergebnisse

In der Einleitung wurde beschrieben, dass die ERK/MAP-Kinasen eine zentrale Rolle in der monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen einnehmen. Zum anderen gibt es Studien, die ganz eindeutig den Transkriptionsfaktor *egr-1* mit der monozytären und megakaryozytären Differenzierung von myeloischen und erythromegakaryozytären Zellen in Verbindung bringen (Nguyen *et al.*, 1993; Krishnaraju *et al.*, 1995; Krishnaraju *et al.*, 1998; Krishnaraju *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 1994). Da bereits Erkenntnisse über das Ineinandergreifen dieser beiden Komponenten in anderem Zusammenhang bestehen (Kaufmann *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2004), liegt die Vermutung nahe, dass auch in HL-60 Zellen die ERK/MAP-Kinasen den Transkriptionsfaktor aktivieren. Im Folgenden soll bewiesen werden, dass dieses Zusammenspiel von ERK und *egr-1* für die TPA-getriggerte monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen verantwortlich ist.

Dies soll einerseits auf molekularbiologischer Ebene geschehen, indem mit Hilfe von Western und Northern Blots die Effekte von TPA auf die ERK/MAPK-Signaltransduktionskaskade und die *egr-1*-Expression untersucht werden. Die unter dieser Substanz zu beobachtende Phosphorylierung von Elk-1 sowie die Expression von *egr-1*-mRNA und das Vorhandensein von Egr-1-Protein gilt es im nächsten Schritt eindeutig auf durch TPA hervorgerufene ERK-Phosphorylierung zurückzuführen. Dies geschieht mit Hilfe der zwei nicht miteinander verwandten MEK-Inhibitoren PD 98059 und UO126, die im vorherigen Kapitel vorgestellt worden waren. Beide verhindern die Aktivierung von MEK1 und MEK2 durch Raf-1, wobei PD 98059 vorwiegend MEK1 und UO126 beide Kinasen gleich stark inhibiert. Da nachgewiesen werden soll, dass TPA über die *egr-1*-Expression die monozytäre Differenzierung induziert, gilt es darüber hinaus nachzuweisen, dass diese bei Suppression der ERK-Phosphorylierung und fehlender Translation des Egr-1-Proteins unterbleibt. Dies kann anhand der Kernmorphologie beurteilt und mit Hilfe der Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung, welchen die nicht-spezifische Esterase (NSE) nachweist, quantifiziert werden. Den Abschluss dieses Kapitels bildet die Gegenüberstellung der erythroiden Differenzierung in ELM-I-1 Zellen, die von Seiten der *egr-1*-Expression und zytologisch mittels der DAF-Färbung betrachtet wurde.

## **5.1 Molekularbiologischen Untersuchungen zur Wirkung von TPA auf die ERK-Kaskade und die *egr-1*-Expression in HL-60 Zellen**

Für die Induktion der Differenzierung wurden der Phorbolester TPA ausgewählt, da diese Substanz weitläufig dafür bekannt ist, die monozytäre Differenzierung verschiedener Zelllinien, unter anderem auch der HL-60 Zellen, zu fördern (Huberman und Callahan, 1979; Rovera et al., 1979; Koeffler et al., 1981). Der Tumorpromotor ahmt in der Zelle die Wirkung des Diacylglycerols nach und aktiviert in Folge dessen die Proteinkinase C (Nishizuka, 1992). Diese wiederum phosphoryliert Raf-1 (Sozeri et al., 1992; Kolch et al., 1993), welche ein Aktivator der ERK/MAP-Kinase Kaskade ist (Dent et al., 1992; Howe et al., 1992). In den nun folgenden Ausführungen werden repräsentative Versuche gezeigt, deren wichtigste Effekte sich in unabhängigen Versuchen bestätigt hatten.

### **5.1.1 Auswirkungen verschiedener TPA-Konzentrationen auf die ERK/MAP-Kinase, die *egr-1*-Expression und die Synthese des Transkriptionsfaktors**

HL-60 Zellen wurden für diesen Zweck mit ansteigenden Konzentrationen (0; 0,06; 2,5; 10; 40; 100 nM) an TPA für 15 min behandelt. Diese kurze Zeitspanne sollte gewährleisten, dass die Phase der ERK-Phosphorylierung erfasst wird, da nach einer längeren Zeit der Effekt aufgrund von Dephosphorylierung und Inaktivierung der Kinasen weniger deutlich ausfallen könnte.

Die Auswertung des Versuchs zeigt eine konzentrationsabhängige Aktivierung der ERK, die mit Hilfe eines Antikörpers gegen Phospho-ERK (pERK) aufgespürt wurde (Abbildung 10A). Schon bei sehr niedrigen Konzentrationen von 0,6 und 2,5 nM konnte eine Phosphorylierung der ERK detektiert werden, welche umso stärker war, je mehr TPA eingesetzt wurde. Mehr als 100 nM TPA wurden in diesem Versuch nicht verwendet, da bereits schon niedrigere Konzentrationen toxisch auf die Zellen wirkten.

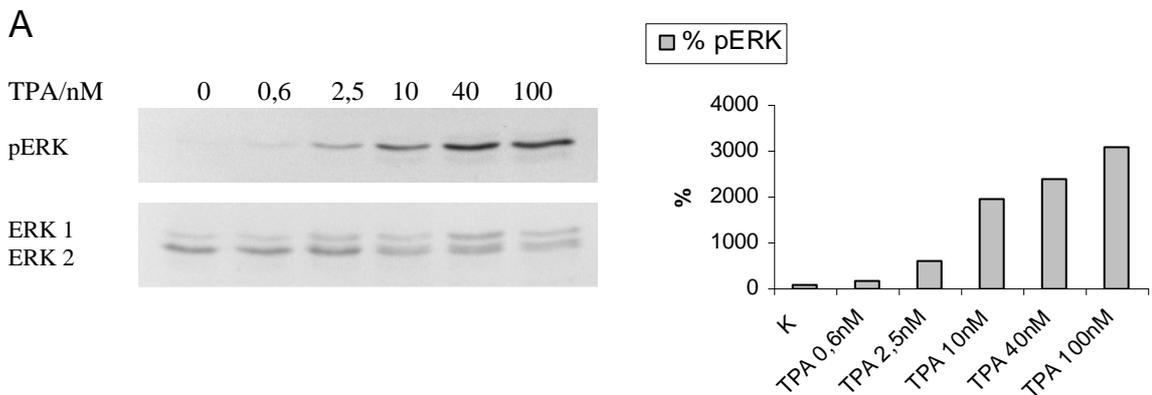
Der nächste Schritt ging der Frage nach, ob TPA tatsächlich, wie vermutet und in anderem Zusammenhang schon nachgewiesen (Nguyen et al., 1993), die Expression von *egr-1*-mRNA induziert. Dazu isolierte man aus HL-60 Zellen, nachdem man sie für 90 min mit einer Konzentrationsreihe von 0,6 bis 100 nM TPA stimuliert hatte, die RNA und führte einen Northern Blot durch. Da die Bildung von mRNA erst am Ende der Signaltransduktion von der Zellmembran über MAP-Kinasen an Transkriptionsfaktoren

steht und sich daraufhin noch die Transkription, d.h. die Ablesung des Genes und Bildung von mRNA, anschließt, erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Tumorpromotor diesmal für 90 min. Wie Abbildung 10B zeigt, war die Inkubationszeit ausreichend, um mRNA nachweisen zu können. Erwartungsgemäß bewirkte die Behandlung mit dem Phorbolster eine Transkription von *egr-1*-mRNA, die mit steigender Konzentration von TPA zunahm und hier ein Maximum bei 40 nM aufwies.

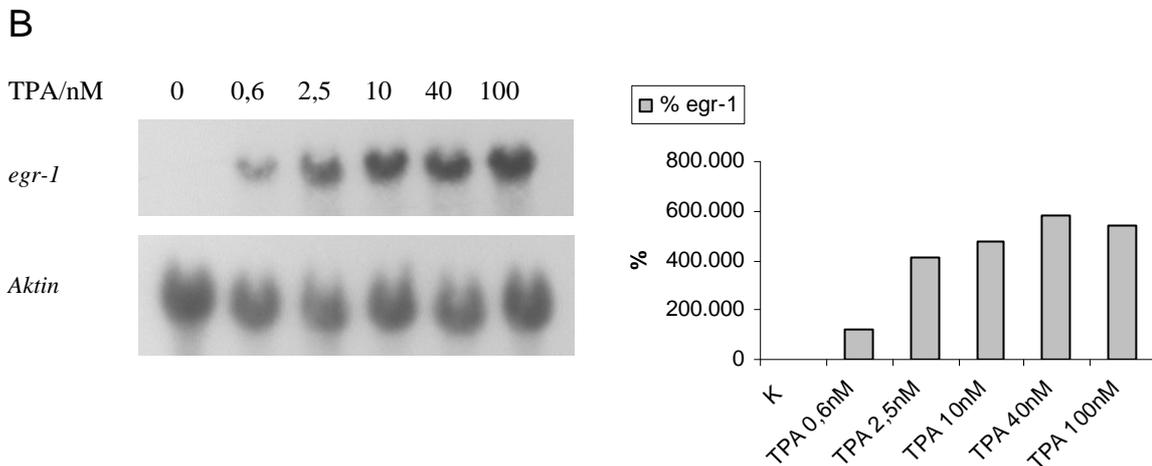
Die gebildete messenger-RNA dient der Zelle als Matrize für die Translation. Die Translation beschreibt einen Prozess, bei dem die in der mRNA in Form von Basenpaarungen gespeicherte Information in die Aminosäuresequenzen von Proteinen umgesetzt wird. Da man im Northern Blot *egr-1*-mRNA nachweisen konnte, erwartete man auch das Produkt der Translation, das Protein des Transkriptionsfaktors, in den HL-60 Zellen nachweisen zu können. Diesmal erfolgte die Inkubation der Zellen mit den verschiedenen TPA-Konzentrationen für 120 min, um zu gewährleisten, dass die Translation bereits begonnen hatte. Die Analyse mittels des Western Blot deckte wie in den beiden vorherigen Versuchen eine Konzentrationsabhängigkeit in der Bildung von Egr-1-Protein auf (Abbildung 10C).

Die Resultate dieser Experimente dienten als Grundlage für die Auswahl von Konzentration ab 2,5 nM, da bei dieser sowohl die Aktivierung von ERK, *egr-1*-Expression und Bildung von Egr-1-Protein nachweisbar war. Auch andere Gruppen setzten ähnliche Konzentrationen erfolgreich ein (*Nguyen et al., 1993; Rovera et al., 1979*).

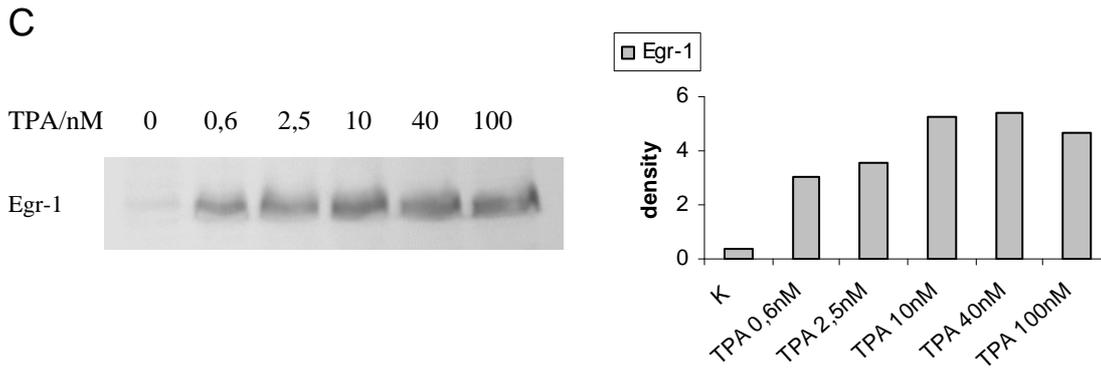
### Abbildung 10: TPA stimuliert die ERK/MAP-Kinasen, die *egr-1*-Expression und die Egr-1-Synthese konzentrationsabhängig



**Abb. 10A. Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TPA.** Für jeden Ansatz wurden  $1,25 \times 10^6$  Zellen ausplattiert und nach einer Zeitspanne von mindestens 12 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an TPA behandelt. Dem Ernten der Zellen nach einer Inkubationszeit von 15 min folgte die Isolierung der zellulären Proteine. Aliquots entsprechend einer Menge von 40 µg Protein wurden dann in einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss daran auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde im nächsten Schritt mit Antikörpern gegen Phospho-ERK und dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die durch das ECL-Detektionssystem in Gang gesetzte Chemolumineszenzreaktion vermag Röntgenfilme zu schwärzen, die fotografiert und mittels *Gel print 2000i*- und *OneDscan Software* ausgewertet werden können. Das Ergebnis dieser Analyse ist oben dargestellt: links oben ein Abbild der Autoradiographie der ERK-Phosphorylierung und darunter als interne Kontrolle der Nachweis von nicht phosphoryliertem ERK1/2 mit einem Anti-ERK1 Antikörper. Das Säulendiagramm rechts daneben zeigt die Menge an pERK, nachdem ein Bezug zur internen Kontrolle hergestellt worden war, um Unterschiede im Proteingehalt der einzelnen Banden auszugleichen. Deutlich ist ein Anstieg an phosphoryliertem ERK mit steigenden Konzentrationen an TPA zu erkennen.



**Abb. 10B. *egr-1*-Expression nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an TPA.** Für die Northern Blot Analyse der *egr-1*-Expression wurden  $1,2 \times 10^7$  HL-60 Zellen ausplattiert und nach frühestens 12 Stunden mit den oben aufgeführten Konzentrationen an TPA für 90 min behandelt. Nach dem Ernten der Zellen wird die RNA nach der Methode von Chomczynski isoliert, Aliquots von ca. 40 µg RNA in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Diese wurde unter vermindertem Druck bei 80 °C für fixiert und mit den entsprechenden radioaktiv markierten *egr-1*- und *Aktin*-DNA hybridisiert. Die Aktinbanden dienen als interne Kontrolle, um zu verifizieren, dass in jeder Spur gleich viel RNA vorhanden war. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist dem Säulendiagramm zu entnehmen. Es ist ersichtlich, dass die *egr-1*-Expression mit steigenden TPA-Konzentrationen zunimmt.



**Abb. 10C. Auswirkung verschiedener TPA-Konzentrationen auf die Egr-1-Synthese.** HL-60 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TPA für 120 min inkubiert. Nach dieser Zeitspanne erfolgte die Proteinisolierung und eine Elektrophorese mit 40 µg Protein je Spur. Das Egr-1-Protein wurde mit einem Anti-Egr-1 Antikörper markiert. Deutlich erkennt man, dass TPA nicht nur die Egr-1-Bildung fördert, sondern dass diese bis zu einer Konzentration von 40 nM auch konzentrationsabhängig zunimmt.

### 5.1.2 Zeitlicher Aspekt der TPA-Effekte auf die ERK-Kaskade, *egr-1*-Expression und Egr-1-Synthese

Nachdem nachgewiesen worden war, dass TPA die ERK-Kaskade, sowie die Transkription des *egr-1*-Gens als auch dessen Translation stimuliert, sollte zusätzlich der zeitliche Aspekt dieses Prozesses untersucht werden. Mehrere Autoren hatten eine länger andauernde ERK-Aktivität im Rahmen der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen nachgewiesen und für notwendig befunden (Kharbanda *et al.*, 1994; Racke *et al.*, 1997; Whalen *et al.*, 1997).

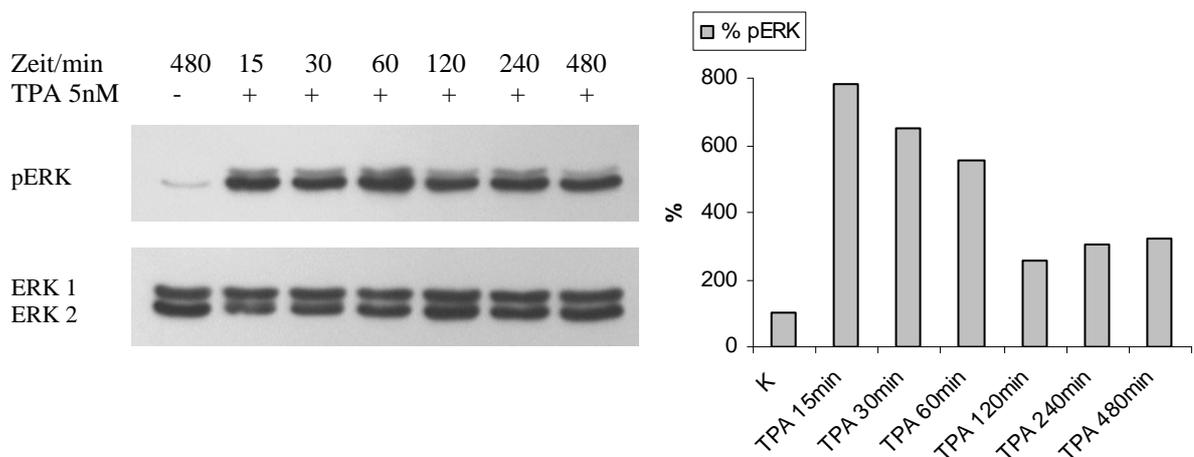
Wieder erfolgte die Analyse auf Protein- und RNA-Ebene. Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 15 min und 8 Stunden, wurden die ERK-Phosphorylierung unter 5 nM TPA untersucht. Dabei konnten eine anhaltende ERK-Aktivität von mindestens 8 Stunden beobachtet werden (Abbildung 11).

Dies wurde in unabhängigen Versuchen sogar mit einer noch geringeren Konzentration von 2,5 nM TPA bestätigt. Hier betrachtete man zusätzlich, in wieweit das Vorhandensein von Phospho-ERK mit der Bildung von pElk-1, der aktivierten Form des Transkriptionsfaktors Elk-1, welcher ein bekanntes Ziel der MAP-Kinasen ist, korreliert. Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich ist, findet sich in dem gesamten Beobachtungszeitraum über 8 Stunden eine gesteigerte Menge an phosphoryliertem Elk-1 gegenüber der Kontrolle (Abbildung 12A).

Analysen dieses Versuchsansatzes auf die Bildung von Egr-1 unterstützten die Zeitkalkulationen in den vorhergehenden Experimenten, denn nach einer Stunde Inkubation erschien eine schwache Egr-1-Bande, die im weiteren Zeitverlauf an Stärke zunahm, nach 6 Stunden ein Plateau erreichte und sich zum Messpunkt von 8 Stunden auch nicht mehr veränderte (Abbildung 12B). Auf Ebene der RNA konnte in einem Kurzzeitversuch eine Kinetik in der Induktion der *egr-1*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Zusammenfassung: Es gelang darzustellen, dass der Tumorpromotor TPA sowohl die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen aktiviert, als auch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 und die Synthese von Egr-1 nach sich zieht. Dies erfolgt einerseits konzentrationsabhängig und andererseits für einen Zeitraum von mindestens 8 Stunden. Die folgenden Untersuchungen sollen darlegen, dass diese Komponenten nacheinander geschaltet sind und eine funktionelle Einheit bilden. Für die Beweisführung werden die MEK-Inhibitoren PD 98059 und UO126 eingesetzt. Diese vermögen die Aktivierung von MEK1 bzw. MEK1/2 durch Raf zu verhindern und damit auch jene von ERK1/2. Sind Elk-1-Phosphorylierung, *egr-1*-Expression und Translation nachgeordnete Schritte in der Signaltransduktion durch TPA, so sollte die Anwendung von MEK-Inhibitoren auch gleichsinnige Auswirkungen auf Elk-1 und den Egr-1-Transkriptionsfaktor haben.

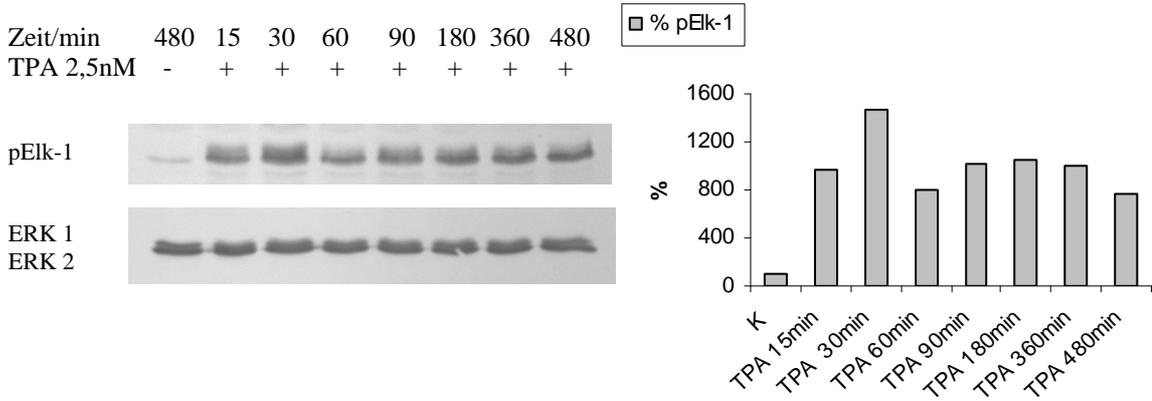
**Abbildung 11: Kinetik der ERK-Phosphorylierung nach TPA-Stimulation**



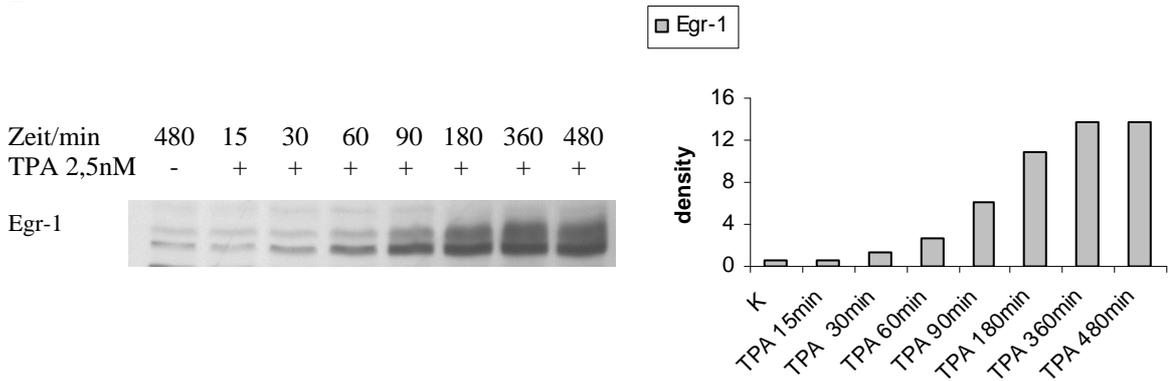
**Abb. 11. Kinetik der ERK-Phosphorylierung nach Induktion durch TPA.** HL-60 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 5 nM TPA behandelt und gemeinsam nach Ablauf der Zeit geerntet. Die Durchführung des Western Blot erfolgte auf die bereits beschriebene Weise. Ersichtlich ist, dass TPA eine mindestens 8 Stunden andauernde ERK-Phosphorylierung induziert.

**Abbildung 12: Kinetik der Elk-1-Phosphorylierung und Egr-1-Synthese nach TPA-Stimulation**

**A**



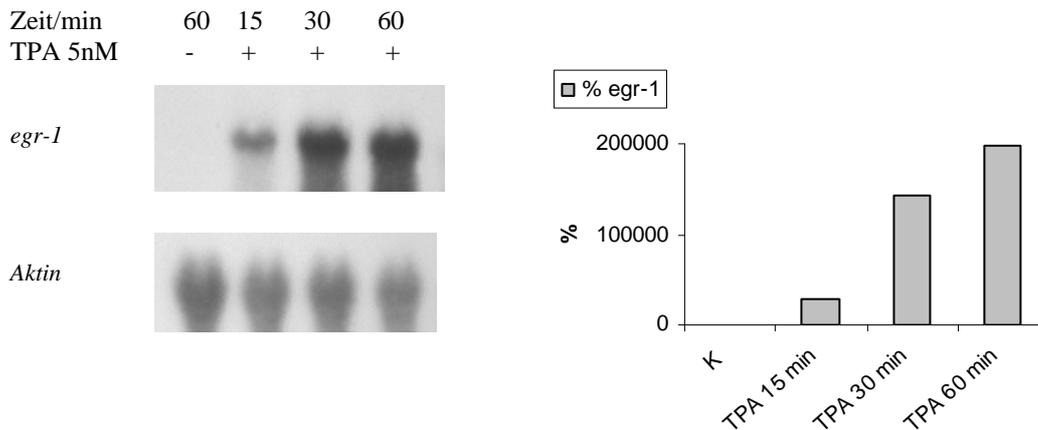
**B**



**Abb. 12. Kinetik der Elk-1-Phosphorylierung (A) und Egr-1-Bildung (B) nach Applikation von TPA.** Nach Behandlung von HL-60 Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 2,5 nM des Phorbolesters wurde das zelluläre Protein isoliert und auf gewohnte Weise ein Western Bot durchgeführt.

**A.** Die Elk-1-Phosphorylierung bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum erhöht.

**B.** Der Egr-1-Transkriptionsfaktor ist nach 30 min bereits nachweisbar und bleibt dies über eine Dauer von mindestens 8 Stunden.

**Abbildung 13: Induktion der *egr-1*-Expression unter 5 nM TPA**

**Abb. 13. Induktion der *egr-1*-Expression nach Behandlung mit 5 nM TPA.** Der Northern Blot wurde in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Innerhalb von 60 min nimmt die *egr-1*-Expression im Vergleich zu früheren Messpunkten stark zu.

**5.1.3 Suppression der ERK-Phosphorylierung durch PD 98059**

PD 98059 ist ein MEK1-Inhibitor der die Aktivierung von MEK1 durch Raf verhindert. Wie zuvor erwähnt, hat er jedoch keine Effekte auf von Raf aktivierte ERK, weshalb er in den folgenden Untersuchungen eine Stunde vor Stimulation der HL-60 Zellen mit TPA appliziert wurde. Für den Nachweis der Wirkung von PD 98059 auf die ERK-Kaskade wurden drei Konzentration, 5, 15 und 40  $\mu$ M, ausgewählt, deren Auswirkung einerseits auf die Zellen allein und andererseits mit anschließender mit TPA-Stimulation verglichen wurde.

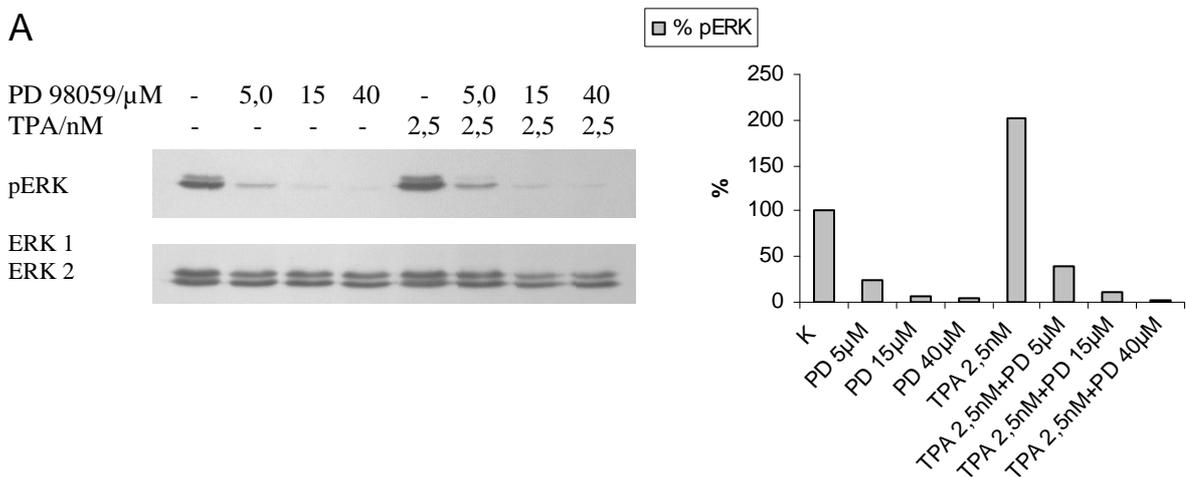
Bereits die Kontrolle wies eine basale ERK-Phosphorylierung auf, die durch Inkubation mit PD 98059 gesenkt wurde, wobei höheren Konzentrationen zu einer stärkeren Inhibition führten. Der TPA-Ansatz zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine um 100% gesteigerte ERK-Aktivität und auch diese konnte durch Präinkubation mit dem MEK1-Inhibitor gesenkt werden. Dies geschah umso erfolgreicher, je höher die eingesetzten Konzentrationen waren. 40  $\mu$ M PD 98059 bewirkten eine maximale Hemmung, die sogar die Basalwerte von phosphoryliertem ERK in der Kontrolle unterbot (Abbildung 14A).

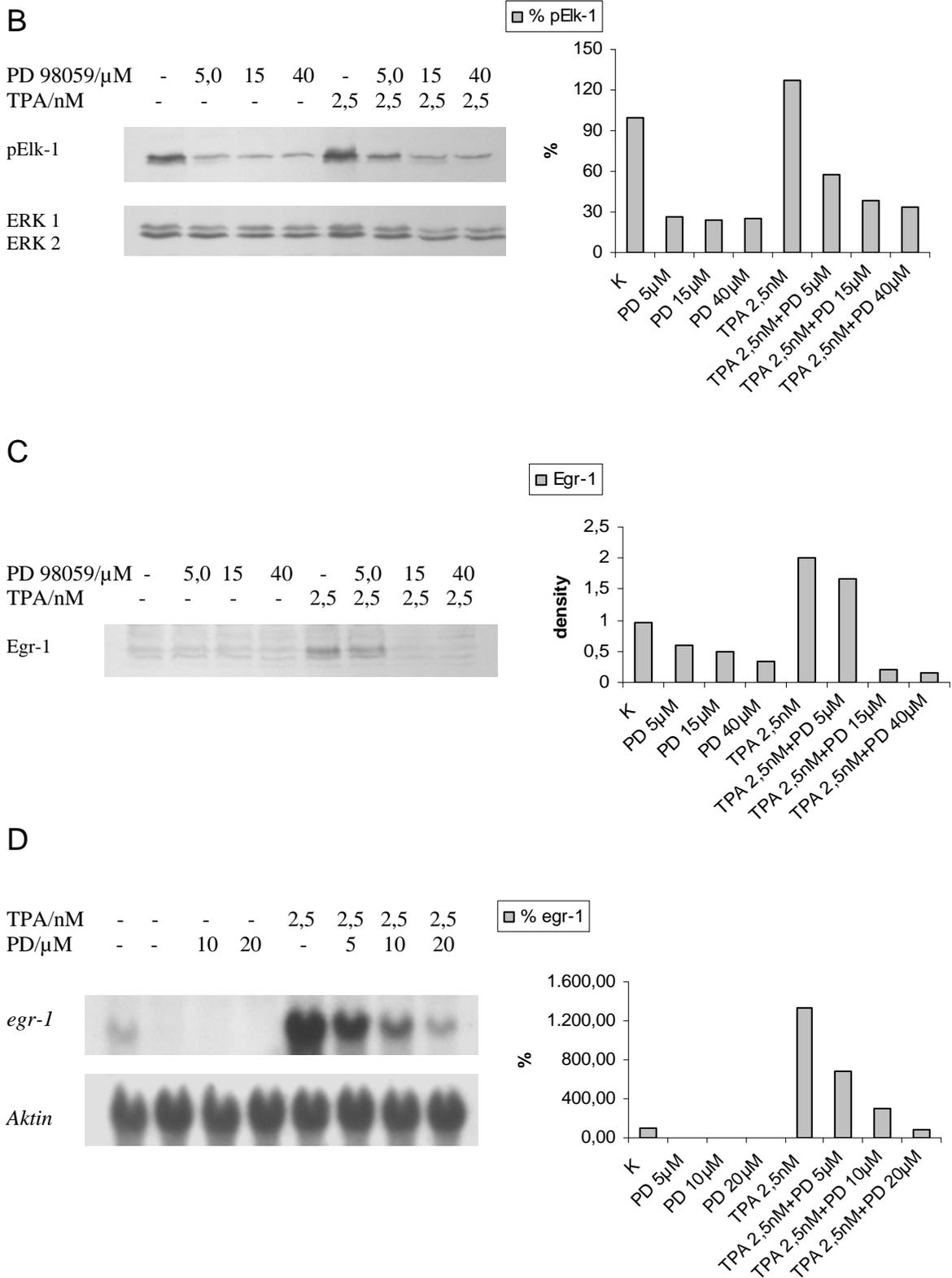
Da dargelegt werden soll, dass Elk-1 ein nachgeordnetes Substrat von ERK während der Induktion durch TPA ist, wurde in diesem Experiment auch die Elk-1-Phosphorylierung

untersucht. Tatsächlich zeigt sich ein zur ERK-Phosphorylierung analoges Ergebnis, denn auch die pElk-1-Banden wurden unter Applikation steigender Konzentrationen von PD 98059 schwächer (Abbildung 14B). In Ansätzen, die zuvor mit dem Inhibitor versetzt worden waren, konnte eine nachfolgende TPA-Stimulation ebenfalls keine vermehrte Bildung von pERK nach sich ziehen. PD 98059 bewirkt also durch eine Senkung der MEK1-Aktivität eine verringerte Produktion von Phospho-ERK.

Als letztes Glied der durch den Phorbolester eingeleiteten Prozesse galt es, einerseits die *egr-1*-Expression und andererseits das Produkt der Translation dieser Matrize, den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 nachzuweisen. Die Northern Blot Analyse untermauert die bisherigen Erkenntnisse. Aufsteigende PD 98059 Konzentrationen vermochten die *egr-1*-Expression zu senken (Abbildung 14D), und dementsprechend war auch weniger Protein mittels des Anti-Egr-1 Antikörpers in Western Blots zu detektieren. Maximale Suppression der ERK-Phosphorylierung und Egr-1-Synthese wurden in Versuchen mit Konzentrationen über 15  $\mu$ M PD 98059 erreicht (Abbildung 14A und C).

**Abbildung 14: Suppression der ERK-Kaskade durch PD 98059**





**Abb. 14. Auswirkungen von PD 98059 auf die Phosphorylierung von ERK (A) und Elk-1 (B), sowie auf die Expression (D) und Synthese Transkriptionsfaktors (C).** Für diese Analyse wurden sowohl für den Western als auch für den Northern Blot HL-60 Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen von PD 98059 für 2 Stunden behandelt und bei denjenigen Ansätzen, die zusätzlich für 60 min mit 2,5 nM TPA versetzt wurden, erfolgte die Zugabe des Tumorpromotors nachdem die Zellen schon für eine Stunde mit PD 98059 behandelt worden waren. Der Einsatz von PD 98059 vermag die Phosphorylierung von ERK, Elk-1 sowie die Transkription des *egr-1*-Gens und Translation des Proteins zu verhindern.

#### **5.1.4 Suppression der ERK-Kaskade durch UO126**

Die Ergebnisse, die durch Einsatz von PD 98059 erzielt wurden, sollten in weiteren Versuchen mit dem ebenfalls niedermolekularen, jedoch nicht verwandten MEK1/2-Inhibitor UO126, untermauert werden. Dieses Vorgehen, Ergebnisse von Inhibitionsversuchen mit Hilfe einer zweiten Substanzklasse zu bestätigen, postulieren *Davies et al.*, damit man sicher gehen kann, dass die beobachteten Effekte auch tatsächlich auf die angenommene Hemmung zurückzuführen sind. Dies schlagen sie vor dem Hintergrund vor, dass sich viele vermeintlich spezifische Inhibitoren bei weitergehenden Untersuchungen als nicht spezifisch entpuppt hatten (*Davies et al., 2000*).

Unter gleichen Konditionen, das heißt wiederum Vorinkubation für 60 min mit UO126 und daraufhin Stimulation für weitere 60 min mit TPA, wurden die Versuche mit dem MEK1/2-Inhibitor durchgeführt. Die Konzentrationen wurden mit 0,05, 1,5 und 4,5  $\mu\text{M}$  niedriger ausgewählt, da bekannt ist, dass UO126 die ERK-Phosphorylierung stärker inhibiert als PD 98059 (*Favata et al., 1998*), was vermutlich darauf beruht, dass UO126 auf beide MEK Einfluss nimmt.

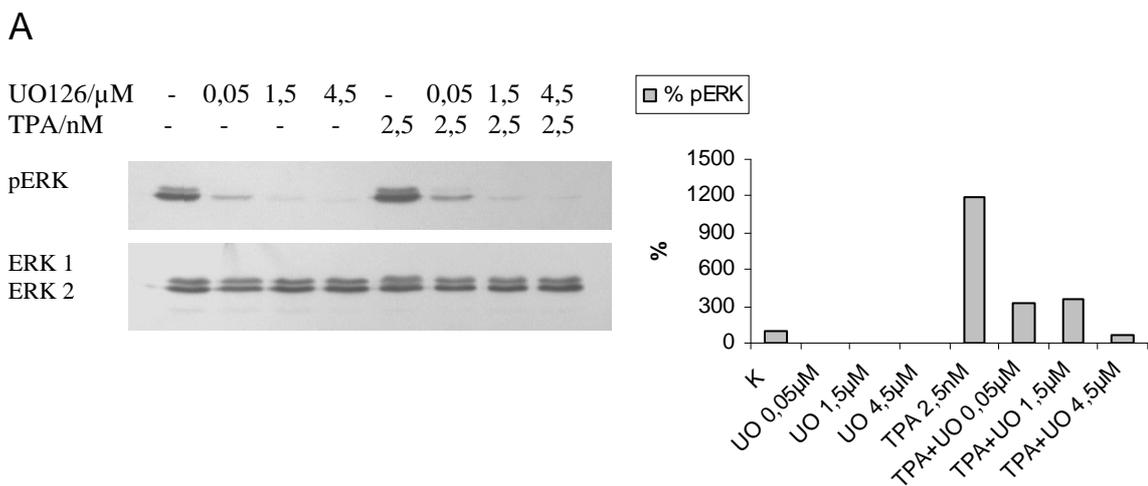
Versuchsansätze, die ausschließlich mit den drei Konzentrationen des Inhibitors behandelt worden waren, wiesen eine sichtlich verminderte ERK-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle auf. In denjenigen Ansätzen, die zusätzlich zu UO126 eine Stunde später mit TPA stimuliert worden waren, konnte die üblicherweise durch den Phorbolster getriggerte Bildung von Phospho-ERK weitestgehend antagonisiert werden. Bereits die niedrigste Konzentration vermochte die Phosphorylierung von ERK deutlich unter Kontrollwerte zu senken und bei der höchsten, 4,5  $\mu\text{M}$ , schien die Hemmung maximal zu sein (Abbildung 15A).

Auf Ebene des Transkriptionsfaktors Elk-1 setzte sich der Effekt weniger stark durch, denn obwohl die Aktivität von ERK gehemmt wurde, sanken die pElk-1 Werte zwar deutlich im Vergleich zur TPA Ansatz, jedoch sowohl bei alleiniger Applikation von UO126 als auch in Kombination mit TPA nicht unter die der Kontrolle. Dies könnte daran liegen, dass Elk-1 auch von anderen Kinasen, wie p38 und JNK, aktiviert wird (Abbildung 15B).

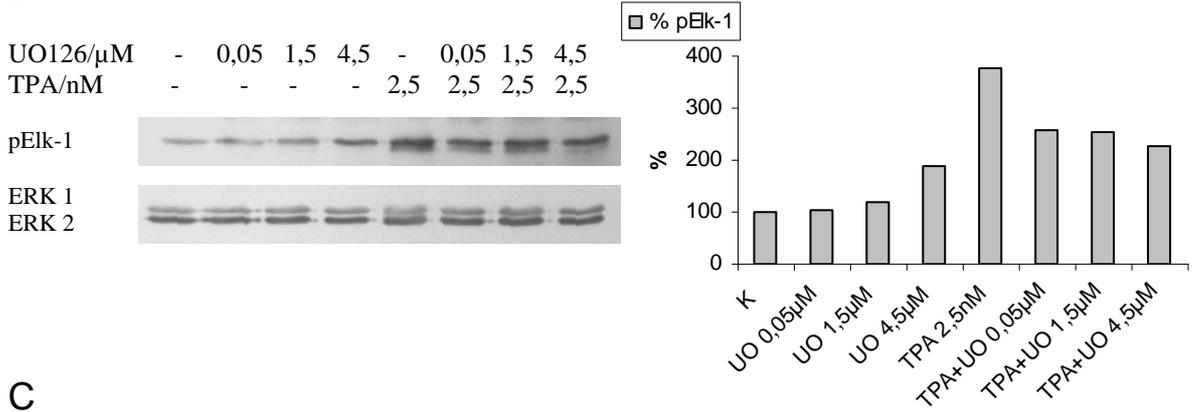
Betrachtet man die Auswirkungen der reduzierten ERK-Phosphorylierung auf die Transkription des *egr-1*-Gens und die anschließende Synthese von Egr-1, so scheint trotz allem die Suppression der ERK-Aktivierung mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 4,5  $\mu\text{M}$  UO126 ausreichend, um einerseits die Expression des Gens und andererseits die Bildung von Egr-1 zu verhindern. Bei den im Northern Blot eingesetzten 10  $\mu\text{M}$  UO126 wird die Expression total supprimiert, während bei 5  $\mu\text{M}$  noch eine geringe Transkription stattfinden kann, weshalb in den Induktionsversuchen 10  $\mu\text{M}$  UO126 verwendet wurden (Abbildung 15C und D).

Mit Hilfe einer zweiten nicht verwandten Substanzklasse, konnten die Auswirkungen der unterdrückten ERK-Aktivität auf die Bildung der „early growth response 1“-Gens bestätigt werden. Da sowohl der Einsatz von PD 98059 als auch von UO126, die beide in der Literatur als nicht verwandte MEK-Inhibitoren gelten, zusätzlich zur Suppression von ERK die Expression und Translation des Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 zu verhindern vermochte, muss davon ausgegangen werden, dass die ERK-Kaskade für die Aktivierung dieses Gens sorgt.

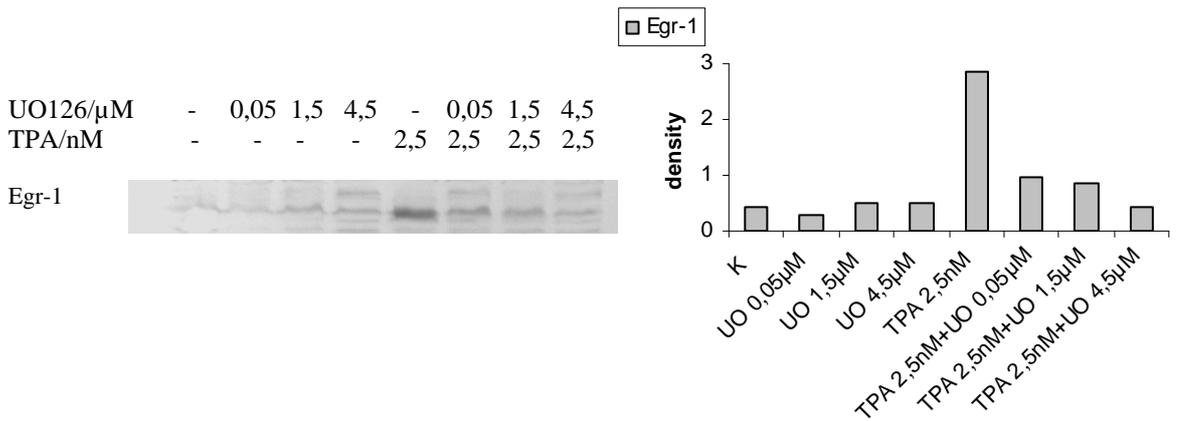
**Abbildung 15: Suppression der ERK-Kaskade, der *egr-1*-Expression und der Synthese des Transkriptionsfaktors durch UO126**



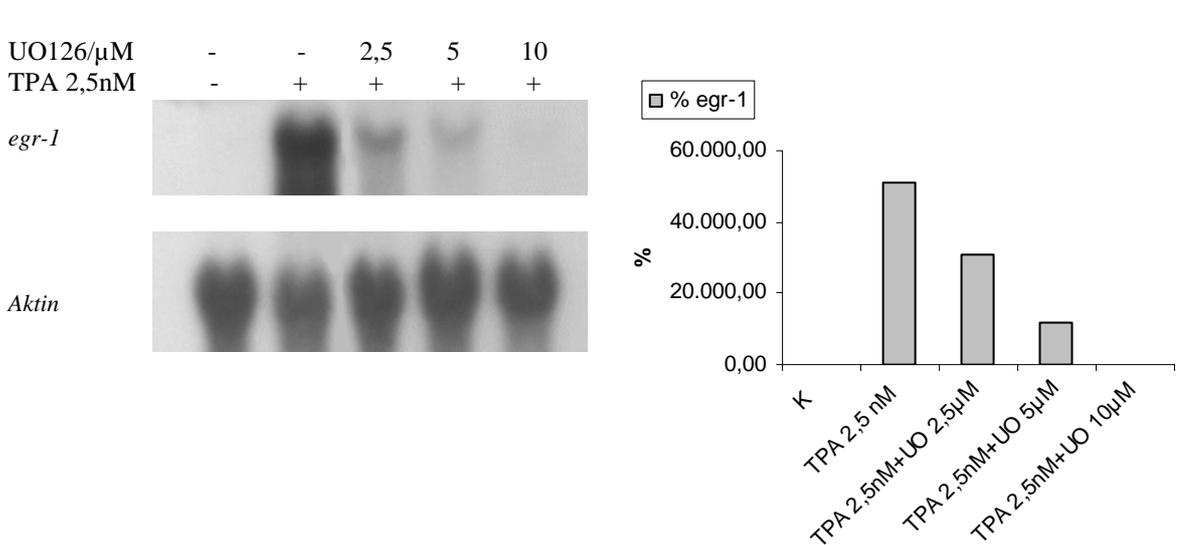
**B**



**C**



**D**



**Abb. 15. Auswirkungen von UO126 auf die Aktivierung von ERK (A) und Elk-1 (B), sowie auf die Expression (D) und Produktion von Egr-1 (C).** Für die Protein und RNA Analysen wurden HL-60 Zellen eine Stunde mit UO126 inkubiert, bevor TPA für eine weitere Stunde appliziert wurde. Die weitere Aufarbeitung der Versuche erfolgte auf gewohnte Weise.

- A.** UO126 hemmt die Bildung von Phospho-ERK.
- B.** Aktivierung des Transkriptionsfaktor Elk-1.
- C.** UO126 hemmt die Bildung von Egr-1.
- D.** UO126 hemmt die *egr-1*-Expression.

### **5.1.5 Untersuchungen zu den Wirkungen von SB 203580 auf die ERK-Kaskade, egr-1-Expression und Synthese des Transkriptionsfaktors**

Da alle drei MAP-Kinasen den Transkriptionsfaktor Egr-1 zu aktivieren vermögen, sollte untersucht werden, ob TPA auch über eine andere MAP-Kinase, die p38, die Egr-1-Synthese induziert. Dafür wurden Versuche mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB 203580 durchgeführt. Die p38/MAP-Kinase Kaskade wird durch zellulären Stress aktiviert und führt z.B. zur Bildung von TNF $\alpha$  und anderen inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen. Andererseits scheint die p38-Kaskade auch an der erythroiden Differenzierung von beispielsweise K562 Zellen beteiligt zu sein (*Sawafuji et al., 2003*).

Es wurden die Effekte des Inhibitors auf die ERK-Kaskade und den Transkriptionsfaktor Egr-1 in Western und Northern Blot Analysen untersucht, in dem man die Effekte von TPA, SB 203580 und der Kombination beider Substanzen nach 90 und 210 min miteinander verglich.

Die Betrachtung der ERK-Phosphorylierung zeigt auf, dass in diesem Versuch zu beiden Zeitpunkten die Kombination des Tumorpromotors mit dem Inhibitor eine Phospho-ERK Bildung zu Folge hatte, die stärker war, als die allein durch TPA oder SB 203580 hervorgerufene. Beide Substanzen zusammen stimulierten die ERK-Phosphorylierung deutlich gegenüber der Kontrolle, unterschieden sich in Bezug auf ihre Effekte im Vergleich untereinander aber wenig. Auch derjenige Teil des Experiments der für eine längere Zeit inkubiert worden war, ergab eine vergleichbare Situation mit einer insgesamt ein wenig gesteigerten ERK-Phosphorylierung (Abbildung 16A).

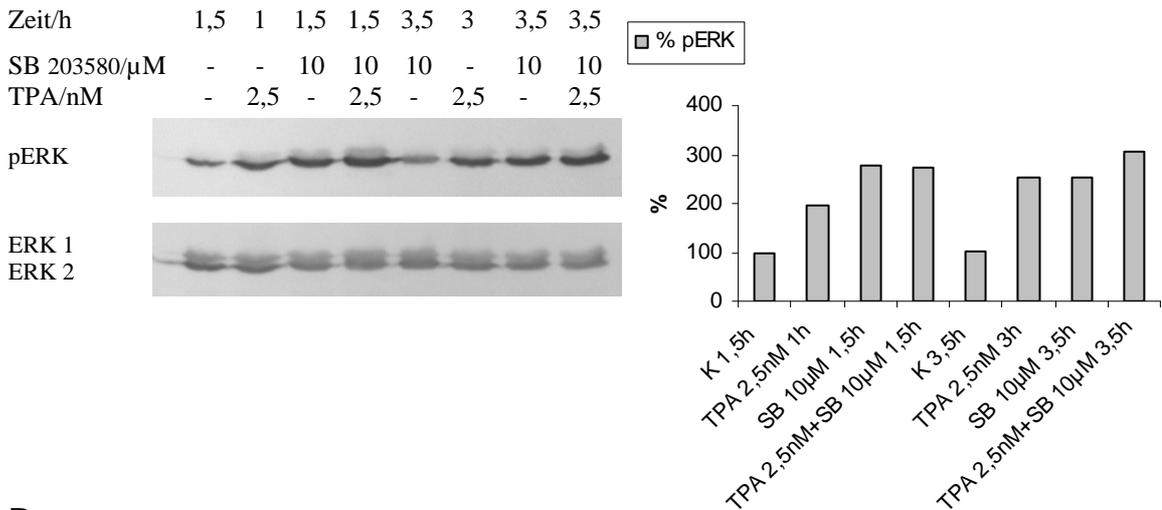
Der den ERK/MAP-Kinasen nachgeschaltete Transkriptionsfaktor Elk-1 zeigte ein vergleichbares Aktivierungsmuster. In denjenigen Ansätzen die für 90 bzw. 210 min mit der Kombination beider Substanzen behandelt worden waren, wies man eine sichtlich gesteigerte Menge Phospho-Elk-1 nach, die zu dem späteren Zeitpunkt sogar noch höher war als zu dem früheren. Wiederum unterschieden sich sowohl TPA als auch SB 203580 nur wenig in ihren Effekten auf die Aktivierung von Elk-1 (Abbildung 16B). Die Detektion mit dem Anti-Egr-1 Antikörper ermöglichte es die Effekte auf die Egr-1-Produktion zu untersuchen. Diese waren am stärksten, nachdem die HL-60 Zellen für

3,5 Stunden mit 2,5 nM TPA und 10 µM SB 203580 inkubiert worden waren. In diesem Experiment scheint der Inhibitor allein oder zusammen mit TPA einen stärkeren Reiz auf die Aktivierung von ERK, Transkription und Translation von Egr-1 als TPA für sich allein auszuüben (Abbildung 16C und D).

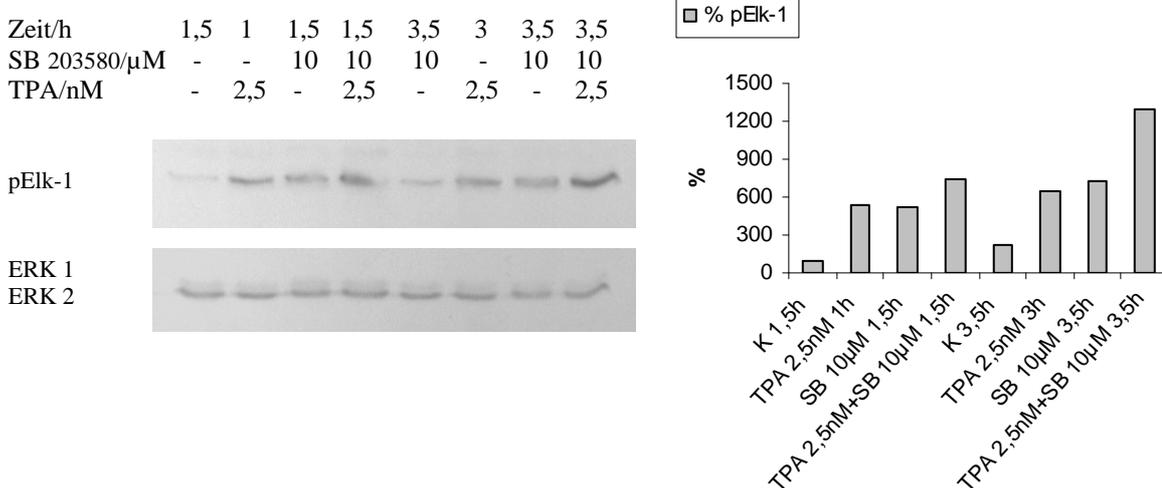
Insgesamt ist festzustellen, dass die durch SB 203580 hervorgerufene Hemmung der p38/MAP-Kinase eine positive Regulation der ERK-Kaskade zu Folge hat, weil auf allen untersuchten Ebenen (pERK, pElk-1, *egr-1*-mRNA, Egr-1) unter SB 203580 die Induktion dieser Signaltransduktionskette mindestens ähnlich oder stärker als unter TPA war.

**Abbildung 16: Auswirkung von SB 203580 auf MAP-Kinasen, *egr-1*-Expression und Synthese des Transkriptionsfaktors**

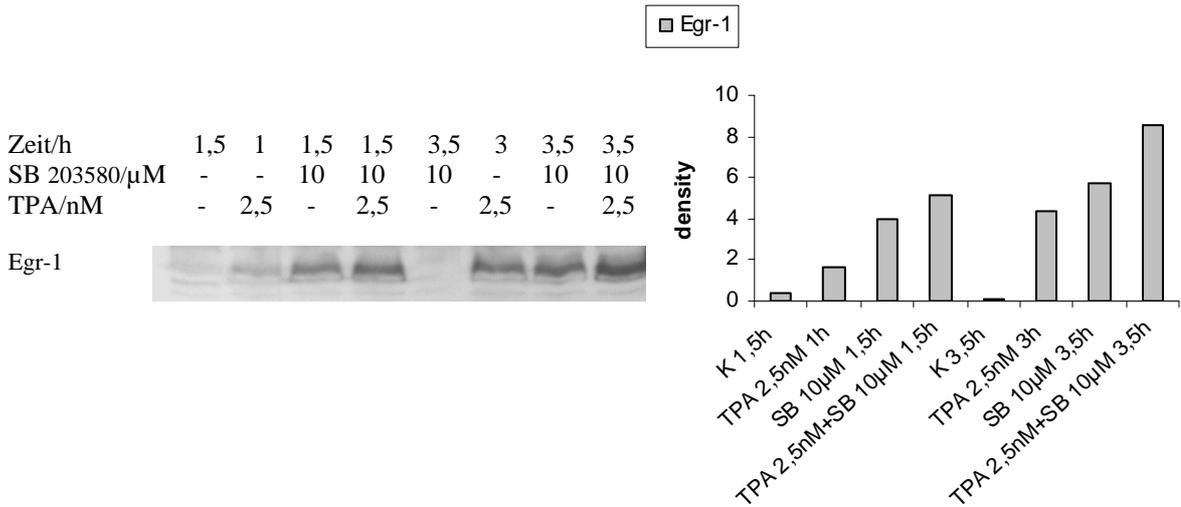
**A**



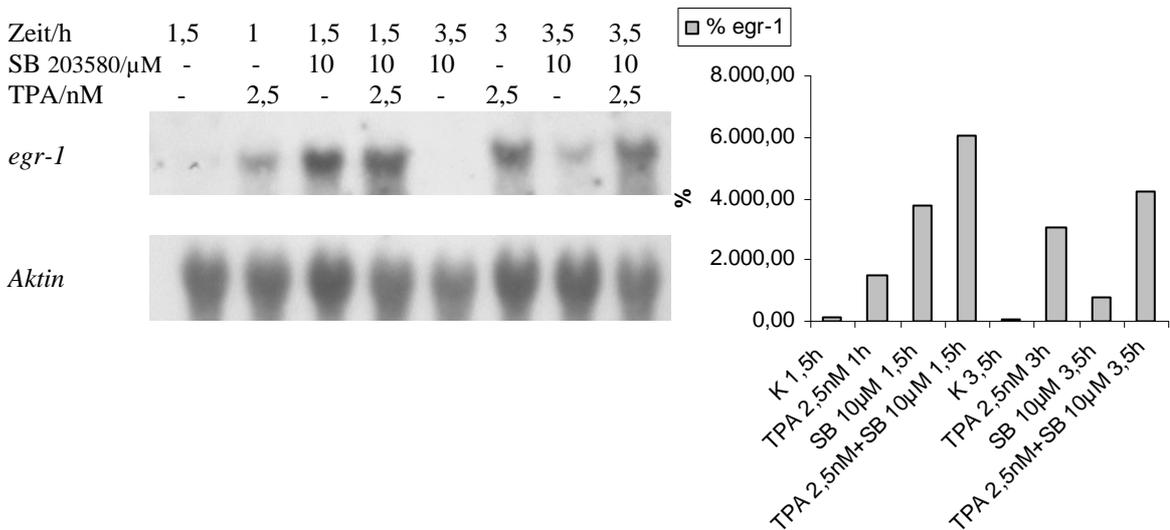
**B**



C



D



**Abb. 16. Durch SB 203580 induzierte Effekte auf die MAPK, *egr-1*-Expression und Translation des Proteins.**

Für Ansätze, bei denen die Auswirkung der Kombination beider Substanzen betrachtet werden sollte, wurde zunächst für eine halbe Stunde mit dem Inhibitor vorinkubiert und im Anschluss daran für eine bzw. drei weitere Stunden mit TPA stimuliert.

SB 203580 verstärkt die Aktivierung der ERK-Kaskade und der *egr-1*-Expression durch TPA auf allen untersuchten Ebenen. Auch allein kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung der Kinasen im Vergleich zur Kontrolle.

In einem weiteren Experiment verglich man die drei MAP-Kinase-Inhibitoren bezüglich ihrer Effekte auf die ERK-Phosphorylierung und *egr-1*-Expression. Dafür wurden Zellen einerseits nur mit PD 98059, UO126, SB 203580 oder TPA versetzt, und andererseits nach einer Vorbehandlung für 60 min mit dem jeweiligen Inhibitor zusätzlich eine weitere Stunde mit TPA stimuliert. In der nach Ablauf dieser Zeitspanne sich anschließenden Western Blot Analyse wurden ERK, Elk-1 und Egr-1 betrachtet.

In Anlehnung an bisherige Ergebnisse fand sich eine basale ERK-Phosphorylierung in der Kontrolle, eine Inhibition dieser durch die beiden MEK-Inhibitoren und eine Hemmung der TPA induzierten Phospho-ERK Produktion durch die MEK-Inhibitoren wieder. Im Gegensatz dazu ging der Einsatz von SB 203580 mit einer gegenüber der Kontrolle gesteigerten Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen einher. Diese erreichte sogar das Niveau der durch TPA angestoßenen ERK-Phosphorylierung, und die Kombination TPA und SB 203580 überstieg sogar die Effekte von TPA auf die ERK-Kaskade (Abbildung 17A).

Betrachtete man im nächsten Schritt die Elk-1-Aktivierung, so stimulierte die Kombination des Tumorpromotors mit dem p38-Inhibitor die Bildung von Phospho-Elk-1 ebenfalls stärker als es beide Substanzen (TPA oder SB 203580) für sich allein taten (Abbildung 17B). Das Bild, das sich bei der ERK- und Elk-1-Phosphorylierung bot, setzte sich auf Ebene von Egr-1 fort. Nur drei Banden wiesen deutlich Egr-1 auf. Am meisten Transkriptionsfaktor fand sich in demjenigen Ansatz, der mit TPA und SB 203580 behandelt worden war, darauf folgte derjenige, der mit 2,5 nM TPA versetzt worden war und SB 203580 allein hatte die schwächste Egr-1-Produktion zu Folge. In den übrigen Ansätzen, wie auch in der Kontrolle, war kein Egr-1 zu detektieren (Abbildung 17C). Entsprechend der zu beobachtenden Translation konnte auch die Transkription im Northern Blot nachgewiesen werden (Abbildung 13D).

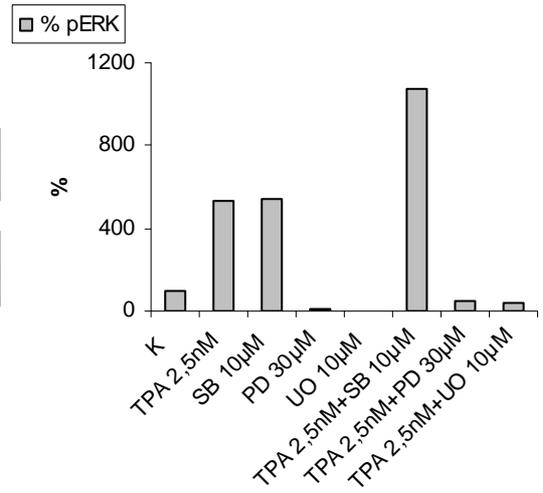
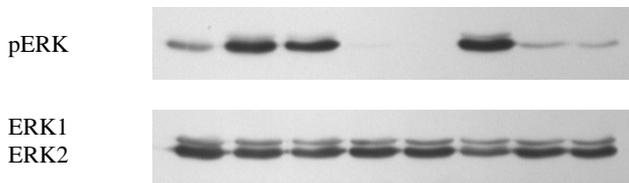
Diese Untersuchungen legen dar, dass die p38/MAP-Kinase nicht für die durch TPA-getriggerte Induktion der durch ERK vermittelten *egr-1*-Expression notwendig ist. Stattdessen bewirkt die Blockade dieses Signaltransduktionsweges eine verstärkte Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen und damit auch des Transkriptionsfaktor Elk-1, sowie eine gesteigerte Egr-1-Synthese. Die von SB 203580

hervorgerufenen Effekte ergänzen Beobachtungen von anderen Gruppen (Zhang *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 2001).

**Abbildung 17: Auswirkung von SB 203580, UO126 und PD 98059 auf die ERK/MAP-Kinasen und Egr-1-Synthese**

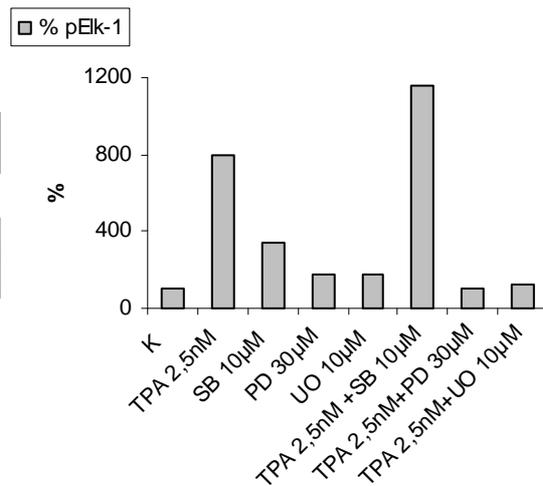
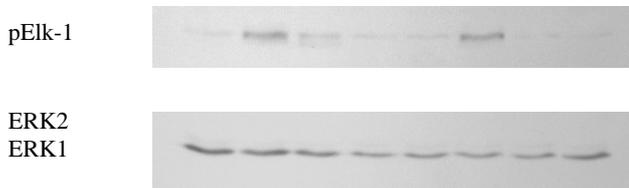
**A**

SB 203580/ $\mu$ M	-	-	10	-	-	10	-	-
PD 98059/ $\mu$ M	-	-	-	30	-	-	30	-
UO126/ $\mu$ M	-	-	-	-	10	-	-	10
TPA/nM	-	2,5	-	-	-	2,5	2,5	2,5

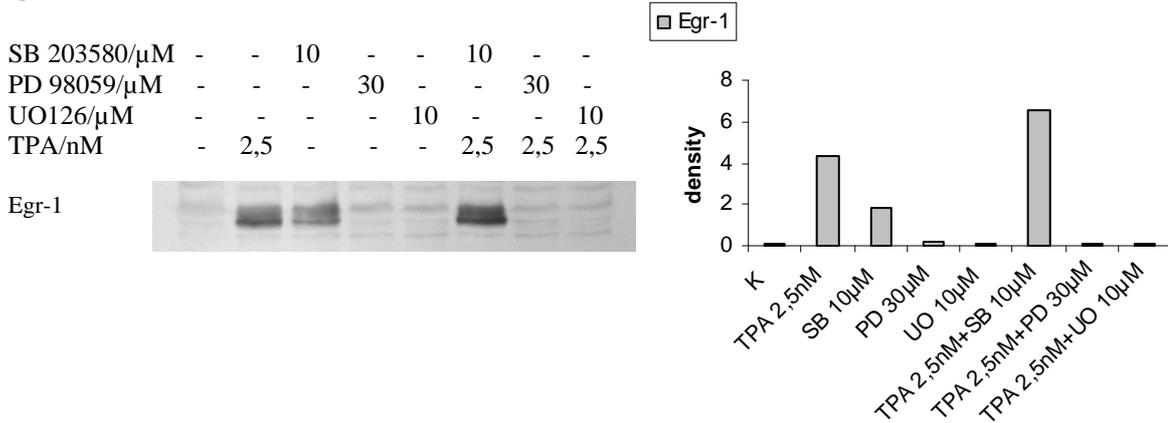


**B**

SB 203580/ $\mu$ M	-	-	10	-	-	10	-	-
PD 98059/ $\mu$ M	-	-	-	30	-	-	30	-
UO126/ $\mu$ M	-	-	-	-	10	-	-	10
TPA/nM	-	2,5	-	-	-	2,5	2,5	2,5



C



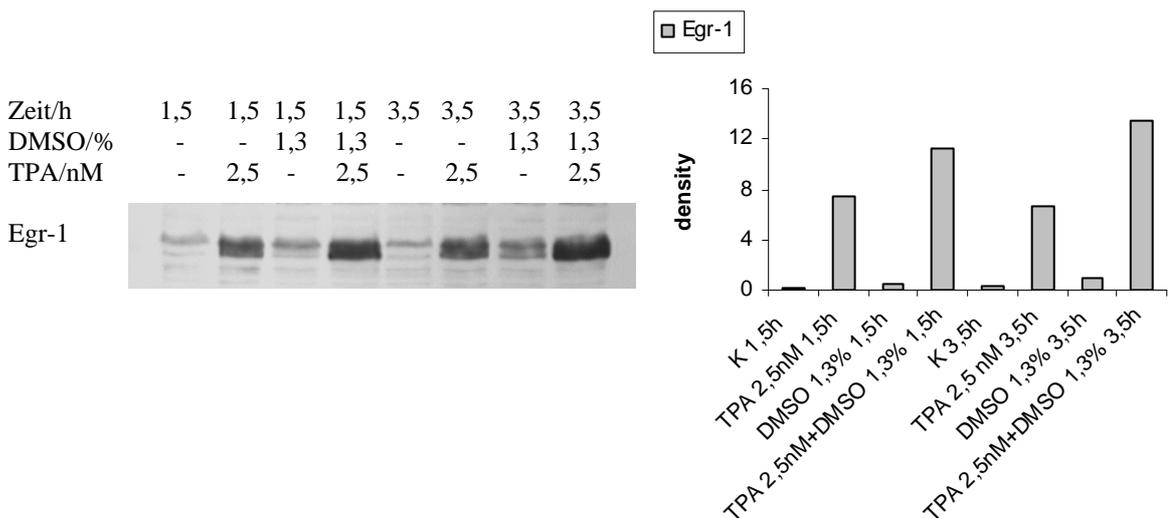
**Abb. 17. Auswirkung der MAP-Kinase-Inhibitoren PD 98059, UO126 und SB 203580 auf ERK (A), Elk-1 (B) und Egr-1 (C).** Sowohl für den Western Blot als auch für den Northern Blot wurden die Zellen vor Stimulation mit TPA mit den Inhibitoren für eine Stunde vorbehandelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie zuvor. Die Inhibition der p38-Kaskade steigert die ERK- und Elk-1-Phosphorylierung sowie die Egr-1-Synthese zu steigern.

### 5.1.6 Wirkung von DMSO und der Kombination von TPA und DMSO auf die Egr-1-Synthese

Im Gegensatz zu den Effekten, die der monozytäre Induktor TPA auf die ERK/MAPK und die *egr-1*-Expression in HL-60 Zellen hat, sollte die Wirkung von DMSO, welches die Ausreifung von Granulozyten fördert (Collins *et al.*, 1978), auf diese Signalübermittlungseinheit überprüft werden. Da die durch das *egr-1*-Gen geförderte Reifung von Monozyten gleichzeitig die granulozytäre Differenzierung unterdrückt (Krisnaraju *et al.*, 2001) und die bisherigen Ergebnisse dargelegt hatten, dass TPA die Expression dieses Gens hervorruft, sollte unter DMSO keine Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors zu finden sein. Stattdessen müsste unter der Kombination von TPA mit DMSO eine Synthese von Egr-1 nachweisbar sein, da bekannt ist, dass beide Substanzen zusammen die monozytäre Differenzierung induzieren (Liebermann *et al.*, 1981). Mit 1,3% DMSO und 2,5 nM TPA wählte man Konzentrationen, die denen entsprachen, die auch in den Induktionsversuchen eingesetzt wurden. Die Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen allein und zusammen fand für 90 und 210 min statt. Danach wurde ein Western Blot durchgeführt und die Egr-1-Proteinbiosynthese mit einem Anti-Egr-1 Antikörper detektiert. Es ist festzustellen, dass jeweils in den Ansätzen, die mit 2,5 nM TPA und der Kombination beider Substanzen versetzt worden

waren, eine deutliche Egr-1-Produktion stattgefunden hatte. Interessanterweise schien DMSO die Effekte von TPA auf die Egr-1-Bildung sogar noch zu verstärken, da in diesen Ansätzen die Egr-1-Werte noch höher als unter TPA waren. Die Kontrolle und die mit 1,3% DMSO versetzten Ansätze zeigten keine oder nur eine sehr geringe Produktion des Transkriptionsfaktors (Abbildung 18). Dies fügt sich nahtlos an die Beobachtung von *Nguyen et al.* die berichteten, dass die simultane Applikation von TPA und DMSO die *egr-1*-mRNA-Expression stimuliert, während DMSO allein keine Expression induziert (*Nguyen et al., 1993*). In diesen Arbeiten wurde die Transkription des *egr-1*-Gens nachgewiesen, nicht jedoch wie hier die Proteinbiosynthese des Transkriptionsfaktors Egr-1 selbst.

**Abbildung 18: TPA und DMSO induzieren die Bildung von Egr-1**



**Abb. 18. Effekte von DMSO 1,3% und der Kombination mit TPA 2,5 nM auf die Egr-1-Proteinbiosynthese.** HL-60 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 1,5 und 3,5 Stunden behandelt, wonach sich die Western Blot Analyse auf Egr-1-Protein anschloss. Besonders stark ist die Egr-1-Produktion unter der Kombination von TPA mit DMSO.

## **5.2 Zytologische Untersuchung zur Differenzierung von HL-60 Zellen**

Nachdem die Effekte von TPA auf die HL-60 Zellen von molekularbiologischer Seite betrachtet worden waren, war es wichtig diese durch zytologische Untersuchungen zu ergänzen, um sie mit der Differenzierung in Zusammenhang bringen zu können. Möglichkeiten zur Beurteilung der Differenzierung bieten die Pappenheim- und die Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung. Die erste ermöglicht die Betrachtung der Kernmorphologie und der Kern-Plasma-Relation, welche sich während der Ausreifung der Zellen verändern. Die zweite erlaubt die selektive Anfärbung von Monozyten und ihrer Vorstufen, in dem sie Orte mit hohem Esterasevorkommen mit einem Farbstoff sichtbar macht.

### **5.2.1 Beurteilung der Differenzierung nach Induktion mit TPA, DMSO und den MEK-Inhibitoren**

Nachdem die Effekte von TPA und der Inhibition durch UO126 und PD 98059 auf die ERK-Kaskade und die *egr-1*-Expression betrachtet worden waren, galt es die Auswirkungen dieser Substanzen auf die Morphologie und Differenzierung untersuchen. Dafür wurden Ansätze mit  $1 \times 10^5$  HL-60 Zellen ausplattiert und tags darauf mit TPA, DMSO, PD 98059, UO126 allein und in Kombination mit TPA für 6 Tage behandelt. Die Erstellung der Präparate erfolgte wie es in dem Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben wurde. Für die Auswertung wurden je Präparat 300 Zellen gezählt. Insgesamt wurden diese Induktionsversuche 3-mal durchgeführt.

Das Stadium der Differenzierung der promyelozytären HL-60 Zelllinie kann man anhand der Morphologie beurteilen. Während die **Promyelozyten** einen großen zentral liegenden Kern mit einem schmalen Zytoplasmasaum aufweisen, so verliert bei der nachfolgenden Reifestufe, den **Myelozyten**, der nun schon eher randständig liegende Kern weiter an Größe und das Zytoplasma nimmt mehr Raum ein. **Metamyelozyten** sind wiederum kleiner als ihre Vorläufer, ihr Nukleus liegt randständig und beginnt den Ansatz einer Dellung oder Einkerbung aufzuweisen. Die Endprodukte der myeloiden Vorläuferzellen sind Granulozyten und Monozyten. Granulozyten haben entweder einen stabförmigen oder segmentierten Kern der in ein basophiles, eosinophiles oder neutrophiles Plasma eingebettet ist. Monozyten sind die größten Zellen des Blutes und besitzen einen großen unregelmäßig oder bohnenförmig geformten Kern der von viel blau-grauen Plasma umgeben ist (Abbildung 20).

Zusätzlich zur Kernmorphologie wurde die Nicht-spezifische Esterase mittels eines Färbekits von Sigma detektiert. Dieses Enzym wird von Monozyten und ihren Vorläufern gebildet und ermöglicht durch Nachweis seiner Anwesenheit diese von Granulozyten oder anderen myeloiden Zellen zu unterscheiden. Das sich an Orten mit hohem Enzymvorkommen niederschlagende Diazoniumsalz führt zu einer schmutzigrünlichen Färbung des Zytoplasmas. In diesen Versuchsreihen versetzte man Zellen mit 2,5 nM TPA, 1,3% DMSO, 10  $\mu$ M UO126, 20  $\mu$ M PD 98059 und den Kombinationen dieser Substanzen mit TPA. Dabei geschah die Auswahl der Konzentrationen einerseits in Anlehnung an die von anderen Gruppen verwendeten (*Nguyen et al., 1993*) und andererseits auf Ergebnissen der eigenen molekularbiologischen Versuche. Die verwendeten MEK1/2-Inhibitoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, in welchen sie die Induktion der *egr-1*-Expression vollständig unterdrückt hatten.

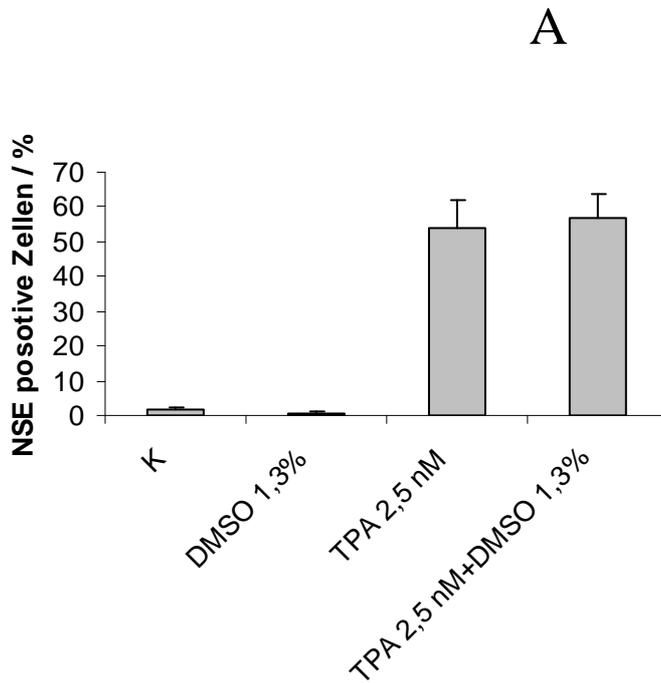
Die Zellen des Kontrollansatzes, d.h. nicht behandelte HL-60 Zellen zeigen nur extrem selten eine positive Reaktion auf die Esterasefärbung. Sie besitzen einen zentral liegenden runden Kern, der nur von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist. Dieser Phänotyp verändert sich jedoch, wenn die Zellen mit TPA, einem Induktor der monozytären Differenzierung inkubiert werden. Das einheitliche Zellbild, wie es die Kontrolle zeigt, wird durch ein Gemisch verschiedener Differenzierungsstufen ersetzt. Neben den promyelozytären Zellen, wie sie in der Kontrolle zu finden sind, gibt es auch solche Zellen die keinen runden, sondern eher einen eckig bis nierenförmigen randständigen Kern aufweisen, der von viel Plasma umgeben ist, welches Ausläufer besitzt. Zwischen diesen beiden Zelltypen existieren noch Übergangsformen, bei denen der Kern bereits randständig sitzt und schon eine ovale Form angenommen hat und deren Zytoplasma an Volumen zugenommen hat, aber insgesamt herrscht statt des unregelmäßig eckig geformten ein eher rundliches Kernbild vor. Unter dem Mikroskop und auf den Abbildungen kann man bei diesem Ansatz an vielen Zellen die schwarzgrünliche Verfärbung des Plasmas erkennen, die darauf deutet, dass es sich bei diesen Zellen um Monozyten oder ihre Vorläufer handelt.

Bei Kombination von TPA mit DMSO, welche auch die monozytäre Reifung von HL-60 Zellen einleitet (*Collins 1987*) obwohl DMSO selbst die granulozytäre Differenzierung induziert, sticht die morphologische Veränderung fast noch deutlicher

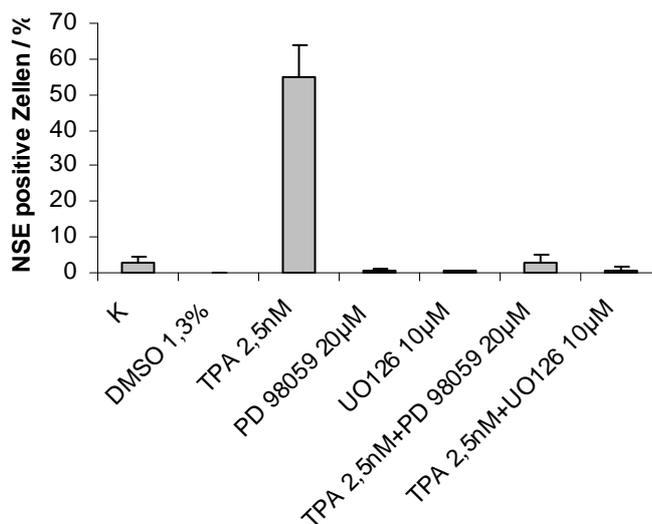
hervor, da die Zellen noch größer sind und das Plasma noch mehr an Volumen gewonnen hat. Auch hier reagieren viele Zellen positiv auf den Esterase-Nachweis.

Unter DMSO allein überwiegt die granulozytäre Reifung der HL-60 Zellen, obwohl diese nach 6 Tagen noch nicht allzu deutlich hervortritt. *Collins* beschrieb 1987 in seinem Artikel, dass die granulozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen nicht vollständig stattfindet, sondern überwiegend auf Stufe der Metamyelozyten stehen bleibt. Gegenüber der Kontrolle findet man Zellen, die zwar noch einen runden Kern haben, deren Plasmasaum aber zugenommen hat und noch weiter entwickelte Zellen mit randständig gelegenen Nukleus, der nun mehr eine ovale Form aufweist und damit wie Myelozyten aussehen. Einige sehr wenige sind noch weiter differenziert und besitzen schon eine kleine oder größere Einkerbung im Zellkern die auf das metamyelozytäre Stadium deutet und die Vorstufen zum stabförmigen Granulozyten darstellt. Passend dazu fällt die Esterase-Reaktion negativ aus, so dass man davon ausgehen kann, dass sich hier um ein granulozytäre Vorläufer handelt.

Werden HL-60 Zellen für 6 Tage mit der Kombination aus TPA und einem der Inhibitoren PD 98059 oder UO126 behandelt, wird die Wirkung von TPA auf die Differenzierung abgeschwächt. Nur einige Zellen besitzen ein grünlich angefärbtes Plasma, wengleich auch hier der Phänotyp sich von demjenigen der unbehandelten HL-60 Zellen unterscheidet. Neben solchen, die wie Promyelozyten aussehen, existieren auch solche, deren Kern eher oval und eingedellt ist und deren Plasma mehr als einen Saum um den Kern bildet (Abbildung 19).

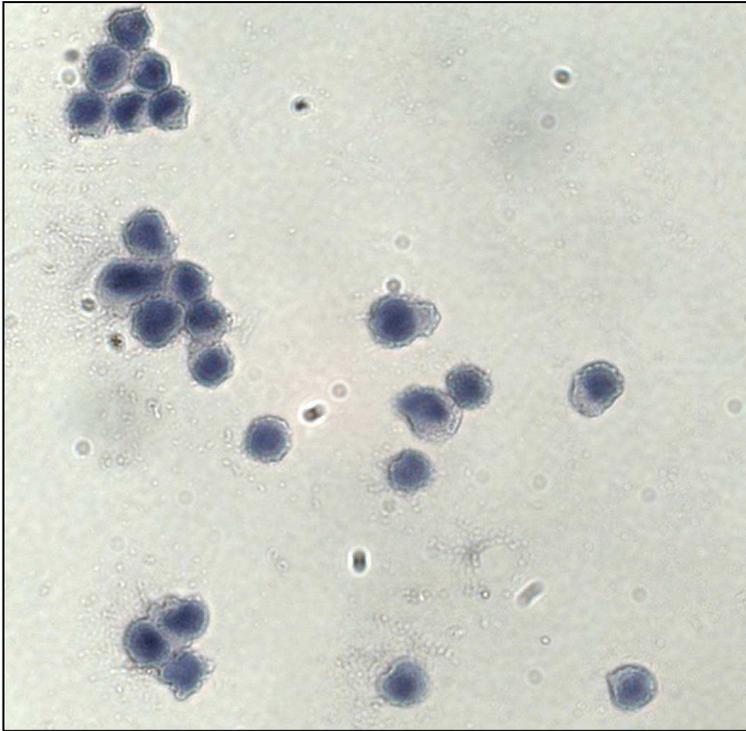
**Abbildung 19: Nicht-spezifische-Esterase Produktion in HL-60 Zellen**

**Abb. 19A. Analyse der Nicht-spezifischen Esterase-Bildung in HL-60 Zellen nach Induktion der Differenzierung.**  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in 7,5 ml RPMI-Medium für diese Versuche ausplattiert und am darauf folgenden Tag mit 2,5 nM TPA, 1,3% DMSO und der Kombination beider Substanzen für 6 Tage behandelt. Insgesamt erfolgte eine dreimalige Wiederholung des Experiments und je Präparat wurden 300 Zellen ausgezählt. Aus dem Säulendiagramm wird ersichtlich, dass besonders viele Zellen unter TPA bzw. unter TPA und DMSO auf den für Nachweis positiv reagierten.

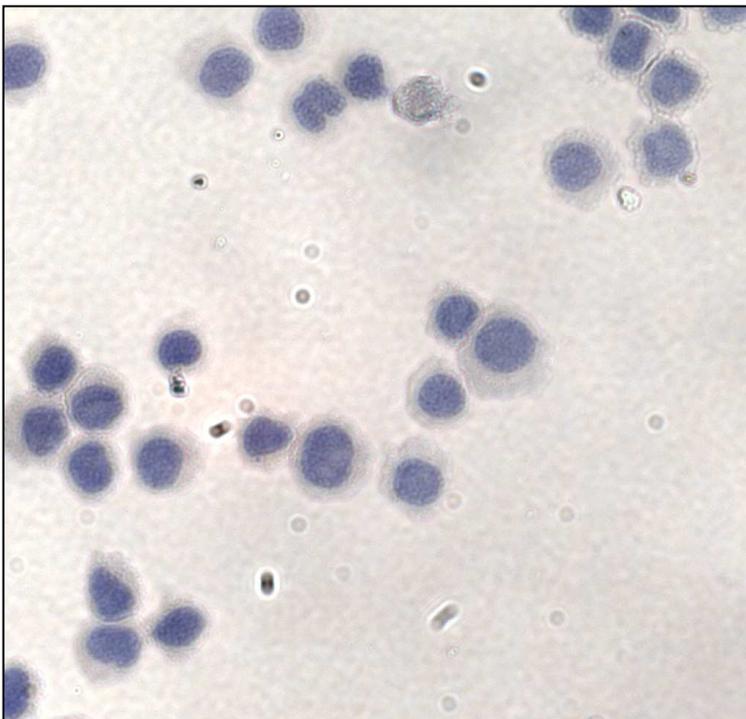
**B**

**Abb. 19. B Nachweis von Nicht-spezifischer Esterase-Produktion nach Induktion der Differenzierung.** Wie unter Abb. 16. A beschrieben erfolgte die Durchführung dieser Versuchsreihe, die ebenfalls dreimal wiederholt wurde. Zusätzlich untersuchte man die Wirkung der Kombination von 2,5 nM TPA mit entweder 10 µM UO126 oder 20 µM PD 98059. Nur mit TPA inkubierte Zellen weisen eine deutlich erhöhte Esterase-Produktion auf.

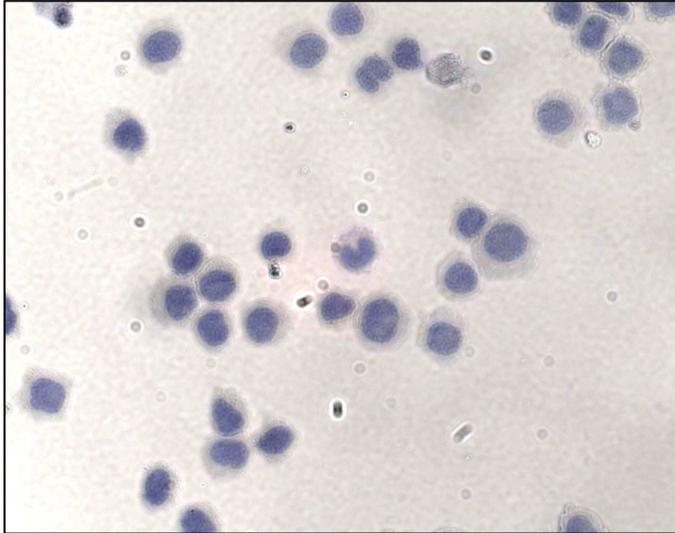
**Abbildung 20: Morphologie von HL-60 Zellen nach Induktion**



**Kontrolle.** Unbehandelte HL-60 Zellen nach 6 Tagen. Das Bild ist einheitlich, es herrschen Zellen mit rundem Kern und schmalem Plasmasaum vor.

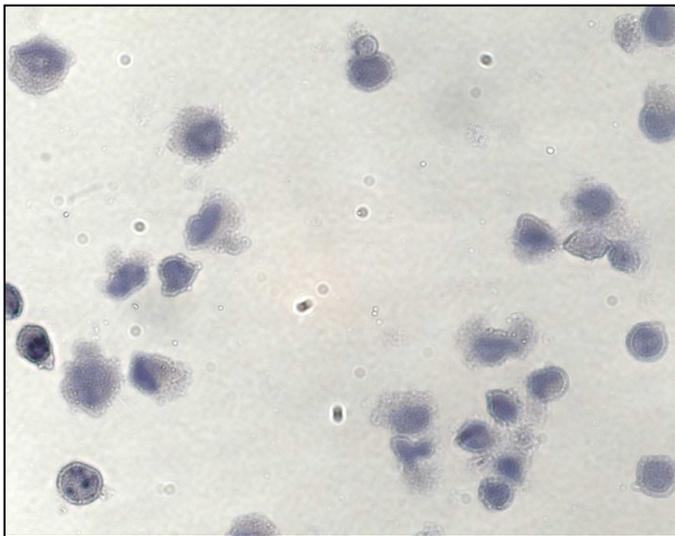


**DMSO 1,3% nach 6 Tagen.** Das Bild mutet gemischt an, es gibt Zellen mit rundem mittig liegendem Kern und verbreiterten Zytoplasma-saum. Bei anderen hat der Kern eine randständige Position und eine eher ovale Form angenommen. Bei sehr wenigen existiert schon eine Einkerbung, wie sie Metamyelozyten besitzen.



**DMSO 1,3% nach 6 Tagen.**

Das Bild ist gemischt, es gibt Zellen mit rundem mittig liegendem Kern und verbreiterten Zytoplasma. Bei anderen hat der Kern eine randständige Position eingenommen und eine eher ovale Form angenommen. Bei sehr wenigen existiert schon eine Einkerbung, wie sie Metamyelozyten besitzen.



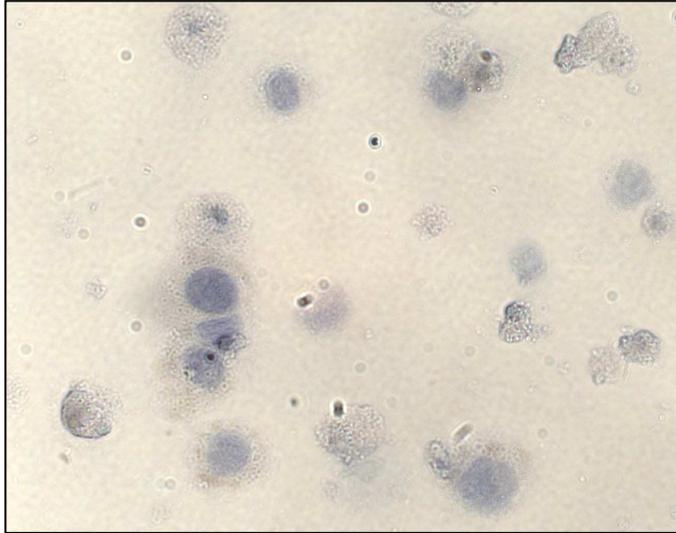
**TPA 2,5 nM nach 6 Tagen.**

Einige Zellen haben statt eines runden Nukleus einen ovalen, nierenförmigen Kern, der randständig liegt und von viel Plasma, welches auch Ausläufer bildet, umgeben ist. Die können HL-60 Zellen auf dem Weg der monozytären Reifung sein. Darüber hinaus existieren aber auch noch Promyelozyten, deren Kern fast die ganze Zelle ausfüllt.

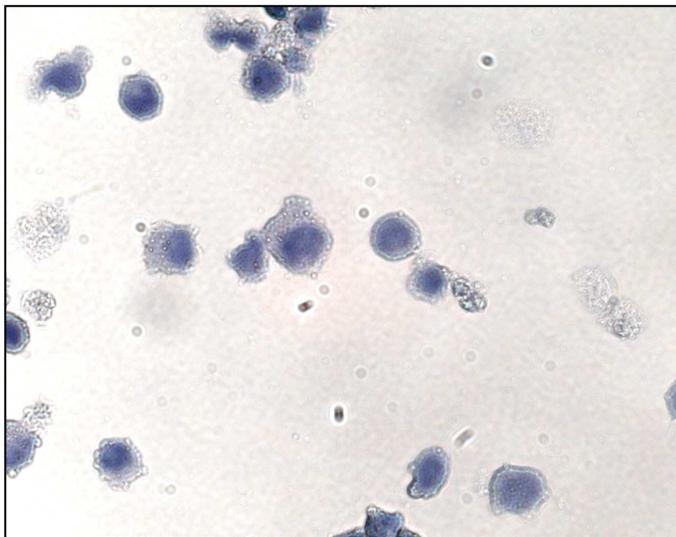


**TPA 2,5 nM nach 6 Tagen.**

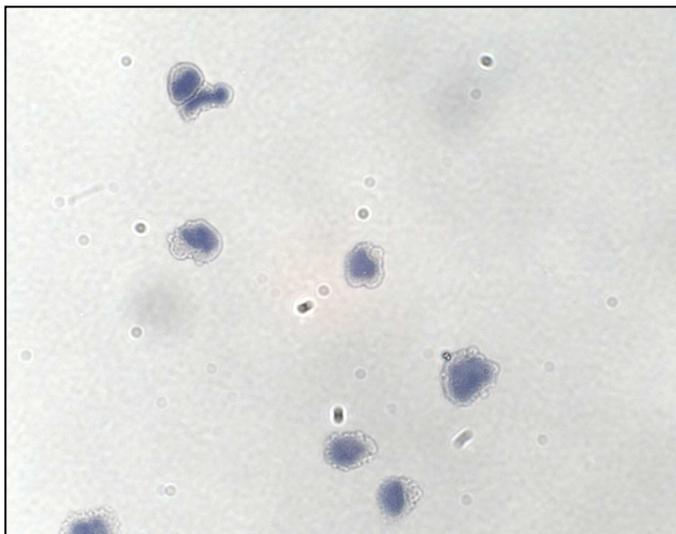
Die Beschreibung des vorangegangenen Bildes gilt auch für dieses. Hier kann man jedoch besser die schmutzige Färbung des Plasma erkennen, die durch den positiven Nachweis von Esterase, einem monozytären Marker, hervorgerufen wird. Diese wurde mit Hilfe eines Kit von Sigma detektiert.



**TPA 2,5 nM und DMSO 1,3% nach 6 Tagen.** Die Zellen weisen einen großen Kern auf, der von viel grünlich angefärbtes Plasma eingebettet ist. Der Nachweis auf Esteraseproduktion ist hier positiv ausgefallen, so dass auch hier von monozytärer Differenzierung gesprochen werden kann.



**TPA 2,5 nM und UO126 10 µM nach 6 Tagen.** Gegenüber der Kontrolle findet man in diesem Ansatz, trotz der Inhibition der TPA Wirkung, Zellen, die nicht wie diejenigen in der Kontrolle aussehen. Zusätzlich existieren auch solche, deren Kern seine kreisrunde Form verloren hat, am Rand liegt und deren Plasma an Volumen gewonnen hat. Nur in wenigen Fällen findet sich eine Esteraseproduktion



**TPA 2,5 nM und PD 98059 20 µM nach 6 Tagen.** Wie unter der Kombination von TPA mit UO 126 haben sich die Zellen im Vergleich zur Kontrolle verändert, obwohl der Nachweis auf die Nicht-spezifische Esterase vorwiegend negativ ausfällt. Man findet neben promyelozytären Zellen auch solche deren Kern die runde Form zu Gunsten einer ovalen eingedellten verloren hat. Der Nukleus liegt dann am Rand und das Volumen an Plasma hat leicht zugenommen.

### **5.3 ERK, Egr-1 und Differenzierung in ELM-I-1 Zellen**

Wie bereits dargestellt scheint die ERK-Signaltransduktionskaskade eine bedeutende Rolle für Differenzierungsvorgänge in hämatopoetischen Zellen zu spielen. Zum einen beeinflusst sie die mono- und megakaryozytäre Entwicklung von hämatopoetischen Zellen (Kharbanda *et al.*, 1994; Whalen *et al.*, 1997; Melemed *et al.*, 1997; Racke *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999; Marcinkowska, 2001; Lin *et al.*, 2002) und zum anderen deutet sich eine negative Regulation von erythroiden Differenzierungsvorgängen an (Whalen *et al.*, 1997; Witt *et al.*, 2000; Uchida *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2000; Nagata *et al.*, 1998; Schaefer *et al.*, 2004). Auch einer anderen MAP-Kinase, der p38, wird eine Bedeutung für die Reifung von erythroiden Zellen zugesprochen (Nagata *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.* 2001; Sawafuji *et al.*, 2003). Sie scheint die Entwicklung von Erythrozyten aus Vorläuferzellen zu fördern und umgekehrt kann die Hemmung der p38-Kinase mit SB 203580 jene Reifung supprimieren. Interessanterweise wird bei Hemmung der p38 mit dem Inhibitor eine Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen beobachtet (Singh *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Westermarck *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001), so dass man eine Kopplung dieser beiden Wege vermutet.

Aufgrund dessen war es interessant, sich im Vergleich zu HL-60 Zellen die Differenzierung in erythroiden Zellen anzuschauen und gegenüberzustellen, welche Rolle die Wirkkette ERK/*egr-1* hier in der Differenzierung einnimmt. Dafür wurden ELM-I-1 Zellen ausgewählt, die ein geeignetes Modell für die erythroide Entwicklung darstellen (Shiozaki *et al.*, 1990). ELM-I-1 Zellen sind erythroleukämische Zellen, die aus der Maus isoliert wurden und sich in einem Stadium der Entwicklung befinden, das ausschließlich eine erythroide Reifung zulässt. Wird diese Zelllinie mit Erythropoetin stimuliert, beginnen die Zellen zu differenzieren, was sich anhand einer gesteigerten Hämoglobinproduktion nachweisen lässt (Shiozaki *et al.*, 1990). Die ELM-I-1 Zellen und andere Erythropoetin-sensitive erythroblastoide Leukämiezellen der Maus wie z.B. SKT6 und J2E Zellen (Todokoro *et al.*, 1987; Klinken *et al.* 1988) ermöglichen eine isolierte Untersuchung der erythroiden Differenzierung unabhängig von anderen Differenzierungsvorgängen/richtungen.

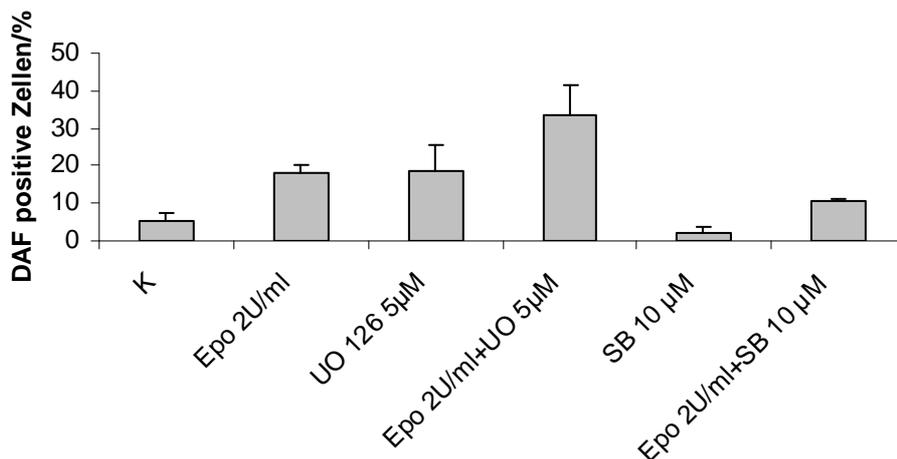
### **5.3.1 Untersuchung zur Differenzierung von ELM-I-1 Zellen bei Behandlung mit Epo, UO126 und SB 203580**

Um zu demonstrieren, dass im Gegensatz zur monozytären Differenzierung die erythroide durch die ERK/MAP-Kinasen negativ reguliert wird, wurde vergleichend untersucht, welche Auswirkungen eine Inhibition der ERK-Kaskade auf die erythroide Differenzierung der monopotenten erythroblastoiden Zelllinie, ELM-I-1, hat. Als Marker für die beginnende Ausreifung der erythroleukämischen ELM-I-1 Zellen diente die Hämoglobinproduktion der Zellen, welche anhand der 2,7-Diaminofluoren-Färbung darstellbar wurde. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Vorhandensein einer Pseudoperoxidase in Hämoglobin, welche mit 2,7-Diaminofluoren als Wasserstoffdonator unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Bildung von Fluorenblau aus Diaminofluoren katalysiert. Der blaue Farbstoff entsteht also in denjenigen Zellen, die Hämoglobin bilden und macht diese somit kenntlich. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Auswertung der positiven Zellen. In drei Versuchen wurden ELM-I-1 Zellen drei Tage lang mit Epo, UO126, SB 203580 oder einer Kombination von Epo mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert.

In der Kontrolle bildeten nur sehr wenige Zellen den roten Blutfarbstoff. Wurden sie hingegen mit Erythropoetin, dem physiologischen Induktor der erythroiden Differenzierung behandelt, so fanden sich deutlich mehr Zellen, die Hämoglobin-positiv waren. Vergleichbar hoch war die Produktion dieses Proteins unter 5  $\mu$ M UO126, welches die MEK1/2 hemmt und, wie in den obigen Experimenten gezeigt wurde, auch die *egr-1*-Transkription in HL-60 Zellen unterdrückt. SB 203580, eine Substanz die die p38-Kinase hemmt aber auch ERK aktiviert (Ishii *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003), führte zu einer Senkung des prozentualen Anteils von Hämoglobin-bildenden Zellen. Wurden sowohl Epo als auch SB 203580 zusammen gegeben, so steigerte sich der Anteil von Zellen, die in die Differenzierung eintraten, geringfügig über denjenigen des Kontrollansatzes. Die größte Anzahl von Hämoglobin produzierenden Zellen konnte jedoch dort gefunden werden, wo ELM-I-1 Zellen mit einer Kombination von Epo mit UO126 versetzt worden waren (Abbildung 21). Nach diesen Ergebnissen wird in den untersuchten Leukämiezellen der Maus die erythroide Differenzierung einerseits durch die Aktivierung der ERK-Kaskade z.B. durch SB 203580 unterdrückt und andererseits

führt eine Hemmung dieser durch einen MEK-Inhibitor wie UO126 zu einer Steigerung desjenigen Teils von Zellen die in die Differenzierung eintreten.

**Abbildung 21: Untersuchung zur Differenzierung von ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580**



**Abb. 21. Differenzierung von ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580.** ELM-I-1 Zellen wurden für diesen Versuch drei Tage lang mit den Substanzen behandelt und im Anschluss daran die Hämoglobinproduktion mit Hilfe der DAF-Färbung detektiert. Eine Hemmung der MEK1/2 scheint die Differenzierung von ELM-I-1 Zellen zu fördern, wie man anhand der Synthese von rotem Blutfarbstoff schließen kann.

### 5.3.2 *Egr-1-Expression bei Einsatz von UO126 und SB 203580*

Die oben dargestellten Differenzierungsergebnisse legen nahe, dass die ERK-Kaskade, die erythroide Differenzierung in monpotenten erythroblastoiden Leukämiezellen unterdrückt. Um zu analysieren, ob diese negative Regulation ebenfalls über die ERK/MAP-Kinasen vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Egr-1 geschieht, wurde ergänzend die *egr-1*-Expression in dieser Zelllinie untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden ELM-I-1 Zellen einerseits mit dem MEK-Inhibitor UO126 für 30 min allein oder anschließend für eine weitere halbe Stunde mit Epo inkubiert und danach eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zu HL-60 Zellen bereits eine Expression des Transkriptionsfaktors *egr-1* in der Kontrolle. Diese wurde durch 2U/ml Epo noch deutlich gesteigert. Im Gegensatz dazu vermochte UO126 die Bildung von *egr-1*-mRNA auch bei nachfolgender

Stimulation mit Epo zu verhindern. Durch den Einsatz des MEK-Inhibitors gelang es also die Transkription von *egr-1* zu senken, was darauf hin deutet, dass die Expression diese Gens in ELM-I-1 Zellen über die Aktivierung von ERK/MAP-Kinasen vermittelt wird (Abbildung 22A).

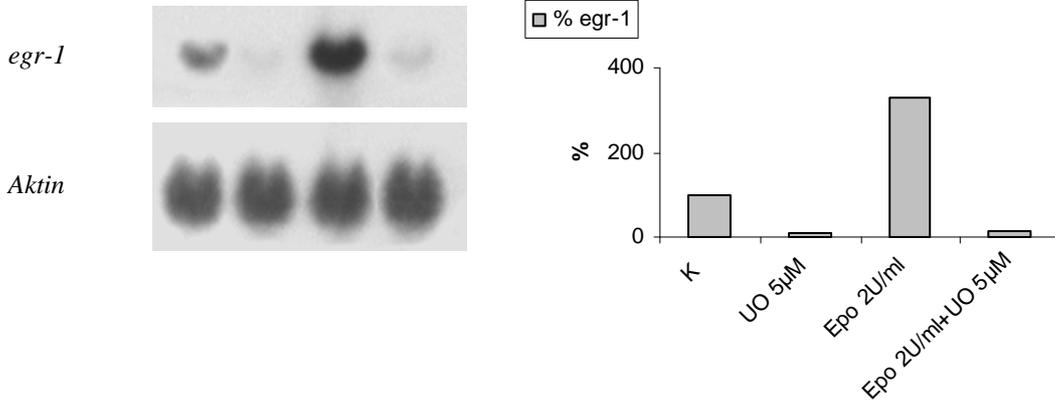
In einem anderen Experiment wurden Zellen mit Epo (2U/ml) und oder SB 203580 behandelt. Wiederum wurde zunächst mit dem p38-Inhibitor für 30 min vorinkubiert und erst danach Erythropoetin appliziert. Analog zu den Erkenntnissen verschiedener Gruppen, dass SB 203580 die ERK/MAP-Kinasen aktiviert, konnte unter dieser Substanz eine Bildung von *egr-1*-mRNA festgestellt werden, die quantitativ ein wenig geringer ausfiel als die Epo induzierte Transkription dieses Gens. Beide, das Hormon und der Inhibitor zusammen wirkten bezüglich der Expression des Transkriptionsfaktors additiv. Diese Ergebnisse scheinen damit die Vermutung, dass die ERK für die Regulation von *egr-1* verantwortlich ist, erneut zu bestätigen (Abbildung 22B).

Die in ELM-I-1 Zellen durchgeführten Versuche legen nahe, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 für die negative Regulation der erythroiden Differenzierung durch die ERK/MAP-Kinasen verantwortlich ist. In diesen Experimenten wurde auch erstmals gezeigt, dass die Kombination des physiologischen Induktors Epo mit einem MEK-Inhibitor wie UO126 sogar zu einer gesteigerten Differenzierung der Zellen bei gleichzeitig supprimierter *egr-1*-Expression führt. Forschungsergebnisse anderer Gruppen, welche *egr-1* für eine linienspezifische Differenzierung von Monozyten und Suppression von anderen Linien verantwortlich machen (*Krishnaraju et al., 2001*), können nun dadurch ergänzt werden, dass dies auf Signaltransduktionsebene über die Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen geschieht. Die ERK/*egr-1*-Wirkkette ist also für die linienspezifische Differenzierung von Monozyten notwendig, während die Differenzierung von erythroiden Zellen durch diesen Signalweg negativ beeinflusst wird.

**Abbildung 22: *egr-1*-Expression in ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580**

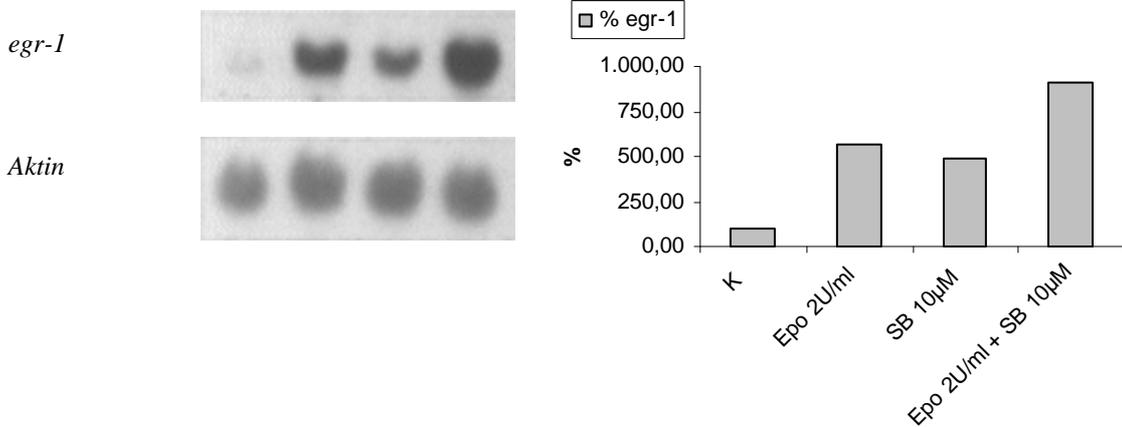
**A**

UO 126 5µM	-	+	-	+
Epo 2U/ml	-	-	+	+



**B**

SB 203580 10µM	-	-	+	+
Epo 2U/ml	-	+	-	+



**Abb. 22. *egr-1*-Expression in ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580.** Ca.  $(4-8) \times 10^4$  Zellen pro ml wurden je Ansatz ausplattiert und nach einer Zeit von ungefähr 16 Stunden mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Zunächst erfolgte die Vorinkubation für 20 min mit UO126 oder SB 203580 und anschließend wurde Epo zusätzlich für weitere 30 min dazugegeben. Danach schloss sich nach bereits beschriebenen Verfahren der Northern Blot an.

## 6 Diskussion

Viele Forschungsgruppen beschäftigen intensiv mit den zellulären Mechanismen der Hämatopoese, aber dennoch bleiben viele Fragen zu diesem wichtigen Kapitel der Physiologie des Menschen offen. Erkenntnisse zu diesem Thema sind nicht nur für Forschung und Lehre von Belang, sondern auch für die Medizin, da sich mit dem Zuwachs an Wissen auch neue kausale Angriffspunkte für die pharmakologische Intervention bieten. Patienten mit Blutkrebs, bei dem es zu einem Arrest der Differenzierung in einem frühen Stadium der Entwicklung einer weißen Blutzellrasse kommt (*Olsson et al., 1996*), könnten davon profitieren, wenn man noch genauere Kenntnisse über die intrazellulären Prozesse der Hämatopoese gewänne. Mit dem Wissen einerseits um die zugrunde liegende zelluläre Fehlregulation der jeweiligen Leukämie und andererseits um die physiologische Regulation der Blutbildung bietet sich die Chance, pharmakologisch gezielt eingreifen zu können. Auf der anderen Seite kann das Verständnis um die Hämatopoese es ermöglichen, Nebenwirkungen von Medikamenten vorauszuahnen oder zu verstehen.

Bisherige Untersuchungen deuten an, dass die MAP-Kinasen eine zentrale Rolle bei der Übermittlung von extrazellulären Signalen an den Zellkern spielen. In dieser Gruppe von Kinasen nehmen vor allem die ERK1/2 bei der Induktion der myeloiden und megakaryozytären Differenzierung von pluripotenten hämatopoetischen Zellen eine Schlüsselposition ein (*Kharbanda et al., 1994; Whalen et al., 1997; Melemed et al., 1997; Racke et al., 1997; Okuma et al., 2002*). Im Gegensatz dazu verdichten sich Hinweise, dass die erythroide Entwicklung durch die ERK negativ und durch die p38/MAP-Kinase wiederum positiv reguliert wird (*Nagata et al., 1998; Matsuzaki et al., 2000; Witt et al., 2000; Uchida et al., 2001; Miyazaki et al., 2001*). Von Seiten der Genexpression scheint das Gen *egr-1* die monozytäre Differenzierung auf Kosten der Reifung anderer Blutzellrassen einzuleiten (*Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1995; Krishnaraju et al., 1998; Krishnaraju et al., 2001*). Vor diesem Hintergrund sollen die vorliegenden Ergebnisse auch im Hinblick auf die Relevanz für die Medizin diskutiert werden.

## **6.1 Bedeutung der durch TPA über die ERK-Kaskade aktivierten *egr-1*-Genexpression für die Differenzierung von HL-60 Zellen**

Obwohl bereits bekannt ist, dass die TPA-induzierte monozytäre Differenzierung der promyelozytären Leukämiezelllinie HL-60 sowohl über die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade (*Kharbanda et al., 1994*) als auch über die Expression des early growth response Gen *egr-1* vermittelt wird (*Nguyen et al., 1993*), gibt es bisher noch keine Arbeit über die Verknüpfung dieser beiden Komponenten in der Signaltransduktion der monozytären Reifung von HL-60 Zellen.

Die aus einem Patienten mit akuter Promyelozyten-Leukämie isolierte Zelllinie HL-60 eignet sich besonders gut, weil sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war und ist und die Fähigkeit besitzt, nach Stimulation mit entsprechenden Substanzen entweder zu Granulozyten oder Monozyten auszureifen. Eine Substanz, die die monozytäre Reifung induziert, ist der Phorbolster und Tumorpromotor TPA (*Huberman und Callahan, 1979; Rovera et al., 1979*). Auch in anderen Zelllinien wird durch TPA die myeloide Differenzierung eingeleitet (*Koeffler et al., 1981; Ways et al., 1987;*). Neben der Tatsache, dass sich TPA als ein potenter Induktor der Differenzierung von HL-60 Zellen präsentiert, ist ebenfalls bekannt, über welchen Mechanismus der Tumorpromotor diese Wirkung vermittelt. Man hat nachgewiesen, dass er die Wirkung von Diacylglycerol nachahmt, welches wiederum die Proteinkinase C aktiviert (*Nishizuka, 1984*). Diese leitet den Signalfluss über Raf-1 an die ERK1/2 Kaskade weiter (*Sozeri et al., 1992; Howe et al., 1992*). Somit stellt der Phorbolster als Aktivator der ERK/MAPK eine geeignete Substanz dar, um das Zusammenspiel von ERK und *egr-1* während der monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen zu untersuchen.

In eigenen Versuchen gelang es aufzuzeigen, dass aktivierte ERK die Expression des *egr-1*-Gens und die Proteinbiosynthese des dazugehörigen Transkriptionsfaktors in HL-60 Zellen induzieren. Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der ERK-Aktivierung unter TPA in Western Blots nachgewiesen. Darüber hinaus sollte im selben Zug die Expression des *egr-1*-Gens sowie die Bildung des entsprechenden Proteins in Northern bzw. Western Blots untersucht werden. In einem Konzentrationsbereich von 0,6 nM bis 100 nM TPA konnte bereits nach 15 min Inkubation eine mit steigenden Konzentrationen zunehmende Menge an phosphorylierten ERK detektiert werden,

wobei schon bei 2,5 nM eine deutliche Erhöhung an Phospho-ERK zu beobachten war (Abbildung 10A). Dies lehnt an Ergebnisse anderer Gruppen an, die ebenfalls mit solch niedrigen Mengen TPA einerseits die Differenzierung und andererseits die *egr-1*-Expression von HL-60 Zellen induzieren können (Rovera *et al.*, 1979; Nguyen *et al.*, 1993). Die Northern Analyse auf Bildung von *egr-1*-mRNA ergab ein ähnliches Bild (Abbildung 10B), da, wie schon in der Proteinanalyse von ERK, steigende Konzentrationen von TPA zu einer zunehmenden Transkription führten. Dieser folgte den Erwartungen entsprechend auch die Translation und Proteinbiosynthese von Egr-1-Protein (Abbildung 10C). Die bis jetzt diskutierten Ergebnisse legen dar, dass der Phorbolster mit zunehmenden Konzentrationen eine steigende Aktivierung von ERK nach sich zieht und in Folge dessen auch die *egr-1*-Expression und die Synthese von Egr-1-Protein zunehmen.

Neben Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit wurde ergänzend die Dauer der Aktivierung von ERK und *egr-1* betrachtet. In einer Zeitspanne von 15 min bis 8 Stunden konnte eine starke Phosphorylierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen gesehen werden. Das Maximum an phosphorylierten ERK lag zwischen 15 und 30 min, aber auch danach blieb der Anteil an phosphorylierten Kinasen erhöht (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu nahm die Bildung von Egr-1-Protein mit zunehmender Zeitdauer der Inkubation zu. Noch nach 8 Stunden war der Gehalt an Egr-1 stark erhöht (Abbildung 12B). In diesen Experimenten stellte sich wiederum eine Korrelation zwischen der Aktivierung von ERK und *egr-1* dar.

Die Dauer der *egr-1*-Expression ist insofern von Bedeutung, da dieser Transkriptionsfaktor eine wesentliche Rolle für die monozytäre und megakaryozytäre Differenzierung spielt. Bisher hatten Untersuchungen gezeigt, dass *egr-1* die granulozytäre Differenzierung zugunsten der monozytären supprimiert, bzw. hämatopoetische Vorläuferzellen durch das Einbringen eines aktiven *egr-1*-Vektors die Fähigkeit erhalten, entlang der monozytären Reihe auch auf Kosten anderer Linien zu reifen (Nguyen *et al.*, 1993; Krishnaraju *et al.*, 1995; Krishnaraju *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 1994).

Die bis zu 8 Stunden nachgewiesene ERK-Phosphorylierung fügt sich gut in den bisherigen Kenntnisstand der Forschung, da auch andere Autoren einen verlängerten Aktivierungszustand der ERK/MAPK während der Differenzierung hämatopoetischer

Zelllinien nachgewiesen hatten (Okuma et al., 2000; Racke et al., 1997; Miranda et al., 2002; Whelan et al., 1999; Wang und Studzinski, 2001). Ob eine andauernde ERK-Phosphorylierung auch in den anderen Zelllinien zu einer gesteigerten und anhaltenden *egr-1*-Expression führt, bleibt künftigen Untersuchungen überlassen.

Vor dem Hintergrund dieser neuen Ergebnisse in HL-60 Zellen kann man die von verschiedenen Autoren für notwendig befundene andauernde ERK-Aktivierung vielleicht in der Hinsicht interpretieren, dass nicht diese allein, sondern die von ihnen vermittelte Expression und Synthese des Egr-1-Transkriptionsfaktors von eigentlicher Bedeutung für die Differenzierung hämatopoetischer Zellen sind.

Um den Nachweis erbringen zu können, dass wie bisher beschrieben die ERK/MAPK die Transkription von *egr-1* induzieren, musste noch die Beweisführung angetreten werden. Durch zwei spezifische nicht miteinander verwandte MEK-Inhibitoren, PD 98059 und UO126, sollte der Einfluss der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen auf die Ablesung des *egr-1*-Gens nachgewiesen werden. Durch die Hemmung der übergeordneten Kinasen MEK1/2 sollte eine ERK1/2-Phosphorylierung und damit auch eine Transkription Gens unterbleiben.

Die eigenen Ergebnisse zeigten auf Ebene der Proteine in einem Experiment die Auswirkungen von PD 98059 auf die ERK- und Elk-1-Phosphorylierung sowie auf die Bildung von Egr-1-Protein. Dafür wurden drei verschiedenen Konzentrationen, 5, 15 und 40  $\mu\text{M}$  ausgewählt, mit denen die Zellen einerseits allein und andererseits 30 min später für weitere 60 min mit TPA behandelt wurden. Mit Hilfe dieses Versuchs konnte eine Konzentrationsabhängigkeit in der zu beobachtenden Hemmung der ERK-Aktivierung nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Als Folge der ausbleibenden Phospho-ERK Bildung sank die Phosphorylierung des nachgeordneten Transkriptionsfaktor Elk-1 und auch die Synthese von Egr-1-Protein blieb abhängig von der eingebrachten Konzentration an PD 98059 aus (Abbildung 14B und C). Bereits 15  $\mu\text{M}$  des MEK-Inhibitors sorgten auf allen drei Ebenen für eine deutliche Hemmung der Signaltransduktion zu *egr-1*. Mit 5  $\mu\text{M}$  PD 98059 konnten die Effekte von TPA auf die ERK-Kaskade und den Transkriptionsfaktor *egr-1* noch nicht vollständig unterdrückt werden. Protein Analysen bezüglich der Produktion von Egr-1-

Transkriptionsfaktor korrelierten mit in Northern Blots nachgewiesener *egr-1*-mRNA (Abbildung 14D).

Eine weitere Reihe von Experimenten beschäftigte sich auf gleiche Weise mit dem Einfluss eines zweiten Inhibitors auf die ERK-Signaltransduktionskette und die *egr-1*-Expression. Durch die Verwendung von UO126 erfolgte eine Absicherung, dass die vorherigen Erkenntnisse nicht auf unspezifischen Effekten von PD 98059 beruhten. Auch mit UO126 konnte nicht nur eine Hemmung der ERK/MAP-Kinasen, sondern auch der Transkription und der Synthese des Transkriptionsfaktors aufgezeigt werden. Dies erfolgte wiederum mit drei verschiedenen Konzentrationen, um auch hier eine Abhängigkeit der Effekte von den eingesetzten Mengen des Inhibitors aufzuzeigen zu können (Abbildung 15). Dabei beruhen die Unterschiede in den benötigten Konzentrationen der beiden Inhibitoren wahrscheinlich darauf, dass es sich einerseits um nicht miteinander verwandte Substanzen handelt und andererseits UO126 im Gegensatz zu PD 98059 auf beide MEK-Isoformen wirkt.

Die oben dargestellten Verhältnisse erlauben die Schlussfolgerung einer Verknüpfung von ERK/MAP-Kinase Kaskade und *egr-1* in der intrazellulären Verarbeitung des TPA Stimulus in HL-60 Zellen. Auch in anderen Zelllinien hat man eine ERK1/2 vermittelte *egr-1*-Expression belegen können (Richards *et al.*, 2001; McMahon und Montoe, 1996; Kaufmann *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 1994). Neu in diesem Zusammenhang ist der Nachweis des Egr-1-Transkriptionsfaktors, denn andere Gruppen hatten bisher lediglich die Expression des Gens auf mRNA Ebene untersucht, dessen Translation jedoch nicht (Nguyen *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1994; Krishnaraju *et al.*, 1995; Krishnaraju *et al.*, 1998; Krishnaraju *et al.*, 2001).

Nachdem herausgearbeitet worden war, über welchen Mechanismus TPA die *egr-1*-Expression stimuliert, bildeten Experimente, die es ermöglichen sollten, die Reifung der Zellen zu beurteilen, den Abschluss. Mit Hilfe der gewählten Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung kann zwischen Granulozyten und Monozyten unterschieden werden, da sich bei letzteren das Zytoplasma mit dieser Methode schwarz-grünlich verfärbt. HL-60 Zellen, die mit TPA inkubiert worden waren, wiesen den Erwartungen entsprechend einen großen Anteil von Zellen auf, die begonnen hatten zu differenzieren. Da Liebermann *et al.* beschrieben hatten, dass die Kombination von TPA und DMSO, welches eigentlich die Reifung von Granulozyten fördert, die monozytäre

Differenzierung ebenso stark oder sogar noch stärker als TPA allein induziert, wurden auch Ansätze mit beiden Substanzen zusammen einer Untersuchung unterzogen (*Liebermann et al. 1981*). Die dazu durchgeführten Experimente stellten heraus, dass hier fast die Hälfte der Zellen in den Reifeprozess eingetreten war. Im Gegensatz dazu blockierten PD 98059 und UO126 die Differenzierung der HL-60 Zellen (Abbildung 19).

In Western Blots zeigte sich, dass die Kombination des Phorbolesters mit DMSO zur Synthese von Egr-1 führte, die quantitativ sogar höher ausfiel als diejenige unter TPA allein. Dies knüpft an die Beobachtungen von *Liebermann et al.* an. DMSO selbst führte innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 3 Stunden nicht zur Bildung von Egr-1-Transkriptionsfaktor (Abbildung 18). Hingegen fanden *Nguyen et al.*, heraus, dass es in Knochenmarkszellen ab dem zweiten Tag unter G-CSF zu einer späten *egr-1*-Expression während der granulozytären Differenzierung kommt, welche bis zu fünf Tage andauert (*Nguyen et al., 1993*). Unter diesem Aspekt sollte bei zukünftigen Untersuchungen zur Dauer der TPA induzierten *egr-1*-Expression sichergestellt werden, dass diese auch von einer monozytären und nicht von einer granulozytären Differenzierung begleitet wird.

## **6.2 Rolle von p38 in der Aktivierung von ERK**

Die bisher diskutierten Ergebnisse hatten gezeigt, dass die ERK-Kaskade den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 in HL-60 Zellen zu aktivieren vermochte. Um den Einfluss einer anderen MAP-Kinase, der p38, zu untersuchen, schlossen sich Experimente mit dem spezifischen Inhibitor SB 203580 an (*Cuenda et al., 1995*). Dafür wurden Western Blot Analysen von ERK, Elk-1 und Egr-1 durchgeführt. Die entsprechenden Ansätze wurden einerseits nur mit dieser Substanz oder in Kombination mit TPA behandelt. Erwartungsgemäß konnten die Effekte von TPA auf die ERK/*egr-1*-Kaskade nicht durch SB 203580 antagonisiert werden. Stattdessen führten TPA und SB 203580 zusammen sogar zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK und Elk-1 im Vergleich zur Kontrolle und zum TPA-Ansatz (Abbildung 16A und B). Auch SB 203580 allein vermochte die Aktivierung der ERK zu steigern, wenn auch nicht so stark wie der Phorbolster. Entsprechend vermehrt war die Egr-1-Synthese (Abbildung 16C). Das Bindeglied zwischen Signaltransduktion und Translation, die Transkription

ergab ähnliche Ergebnisse (Abbildung 16D). Eine weitere Versuchsreihe, die selbigen Aspekt im Vergleich zu den anderen beiden MEK-Inhibitoren erforschte, stellte wiederum heraus, dass die Inhibition der p38-Kaskade oder die Substanz SB 203580 selber, eine gesteigerte Aktivierung der ERK/*egr-1*-Kette zu Folge hatten (Abbildung 17). Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, dass es durch den Einsatz von SB 203580 über eine Phosphorylierung der ERK auch zu einer gesteigerten Transkription und Translation von *egr-1* kommt.

Nicht ganz einheitlich sind die Meinungen darüber, über welchen Mechanismus dieser Effekt vermittelt wird. Einige Autoren gehen davon aus, dass SB 203580 unabhängig von seiner hemmenden Wirkung auf p38 die Aktivierung der ERK vermittelt. *Zhang et al.* postulierten, dass die unter SB 203580 in HL-60 Zellen stattfindende granulozytäre Differenzierung, welche von einer 24 Stunden andauernden ERK-Phosphorylierung begleitet wird, durch den Inhibitor selbst vermittelt wird (*Zhang et al., 2003*). *Hall-Jackson* und seine Kollegen machten die Entdeckung, dass SB 203580 zwar die Raf-Aktivität *in vitro* zu hemmen vermochte, paradoxerweise jedoch *in vivo* zu einer Aktivierung von Raf führt (*Hall-Jackson et al., 1999 a+b*). Wieder andere gehen von einer Interaktion der beiden MAP-Kinase Kaskaden aus, wobei eine negative Regulation der ERK durch p38 angenommen wird. Beispielsweise vermutet man, dass die aktivierte p38 $\alpha$  ERK1/2 sequestriert und damit sterisch ihre Phosphorylierung durch die MEK1/2 verhindert (*Zhang et al., 2001*). Andererseits aktiviert p38 die Proteinphosphatasen 1A und 2A, welche wiederum über Dephosphorylierungen den Signalfluss über die ERK-Kaskade hemmen können (*Westermarck et al., 2001*). Wird die p38-Kinase durch SB 203580 gehemmt, so fiel nach dieser Theorie die negative Regulation auf die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen weg, was dann in einer quantitativ gesteigerten Phosphorylierung und Aktivierung resultierte. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Effekte dieser Substanz auf ERK/MAPK und *egr-1*.

### **6.3 Vergleich der myeloiden und der erythroiden Differenzierung**

Bei der Hämatopoese entstehen die verschiedenen Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle, die sich selbst wieder in Tochterzellen teilt, um einen Pool an Stammzellen aufrechtzuerhalten. Dieser komplexe Prozess wird durch verschiedene Zytokine gesteuert. Von Seiten der intrazellulären Verarbeitung extrazellulärer Signale wird den

MAP-Kinasen eine tragende Rolle zugesprochen, wobei sich abzeichnet, dass ERK1/2 für die Signaltransduktion in der monozytären und megakaryozytären (*Kharbanda et al., 1994; Whalen et al., 1997; Melemed et al., 1997; Racke et al., 1997; He et al., 1999; Marcincowska, 2001; Lin et al., 2001*) und p38 für diejenige in der erythroiden Differenzierung (*Nagata et al., 1998; Witt et al., 2000; Miyazaki et al., 2001; Sawafuji et al., 2003*) verantwortlich ist. Darüber hinaus deutet sich eine Interaktion zwischen beiden MAP-Kinasen an, da es durch die Inhibition der p38-Kaskade zu einer Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen kommt (*Singh et al., 1999; Westermarck et al., 2001; Zhang et al., 2003; Wang et al., 2000; Ishii et al., 2001*). Auf der anderen Seite scheint eine Hemmung der ERK die erythroide Differenzierung zu fördern (*Whalen et al., 1997; Witt et al., 2000; Uchida et al., 2001; Matsuzaki et al., 2000; Nagata et al., 1998; Schaefer et al., 2004*).

Die Bedeutung von p38 für die Hämatopoese liegt also nach bisherigen Erkenntnissen nicht in der Induktion der myeloiden, sondern der erythroiden Differenzierung. So konnte zum einen eine Beteiligung dieser MAP-Kinase an der monozytäre Reifung von U937 und HL-60 Zellen ausgeschlossen werden (*Okuma et al., 2002; Yen et al., 1999*) und zum anderen resultiert aus dem Einsatz von SB 203580 eine Aktivierung von ERK1/2.

Um den Stellenwert der ERK/*egr-1*-Kaskade für die linienspezifische Differenzierung von Monozyten und Megakaryozyten und die negative Beeinflussung von erythroiden Reifungsprozessen demonstrieren zu können, wurden Versuche mit ELM-I-1 Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie eignet sich besonders gut, da sie ausschließlich das Potenzial besitzt, entlang der erythroiden Zellreihe zu differenzieren (*Shiozaki et al., 1990*). Dafür ist eine Stimulation mit Erythropoetin notwendig. Weitere Zelllinien dieser Art sind SKT6 und J2E Zellen, die ebenfalls aus der Maus stammen und erythroblastoide Eigenschaften aufweisen (*Todokoro et al., 1987; Klinken et al., 1988*).

Zunächst wurde lichtmikroskopisch die Differenzierung mit Hilfe der DAF-Färbung, welche hämoglobinproduzierende Zellen anzeigt, betrachtet. Behandlung von Zellen mit dem physiologischen Induktor Epo, sowie mit dem MEK-Inhibitor UO126, allein oder zusammen, resultierte in einer deutlich gesteigerten Hämoglobinsynthese, während SB 203580 einen negativen Einfluss auf die erythroide Differenzierung ausübte, da noch weniger Zellen im Vergleich zur Kontrolle den roten Blutfarbstoff produzierten.

Neu ist dabei die Tatsache, dass unter einer Kombination von Epo mit UO126 mehr Zellen als unter Epo allein differenzierten (Abbildung 21).

Diese Ergebnisse ergänzen Beobachtungen von anderen Autoren, wie *Schaefer et al.*, die nicht histochemisch, sondern auf molekularbiologischer Ebene eine gesteigerte Synthese von Globin-mRNA unter MEK-Inhibition mit PD 98059 und UO126 in ELM-I-1 und J2E Zellen nachgewiesen hatten (*Schaefer et al.*, 2004). In SKT6 Zellen fielen Untersuchungen über die Bedeutung der ERK/MAP-Kinasen für die erythroiden Differenzierung widersprüchlich aus. Einerseits konnte eine Gruppe unter MEK-Inhibition mit PD 98059 nach 3 Tagen einen Anstieg von hämoglobinpositiven Zellen beobachten (*Matsuzaki et al.*, 2000), andererseits wies ein anderes Forscherteam ebenfalls in SKT6 Zellen keine Zunahme der Blutfarbstoffproduktion nach 4,5 Tagen Behandlung mit PD 98059 nach (*Nagata et al.*, 1998). Beide Autoren demonstrierten jedoch analog zu den eigenen Ergebnissen eine Hemmung der Epo induzierten erythroiden Differenzierung durch SB 203580. Damit überwiegen Hinweise, die für eine negative Regulation der erythroiden Reifung durch die ERK/MAP-Kinasen sprechen.

Im nächsten Schritt galt es erneut die Verbindung zwischen ERK und *egr-1*-Aktivierung darzulegen. Dazu wurde in Northern Blot Analysen die *egr-1*-Expression verfolgt. Wiederum korrelierte eine Hemmung der MEK1/2 durch UO126 mit einer supprimierten *egr-1*-Expression. Passend dazu zog die Aktivierung von ERK durch SB 203580 eine gesteigerte Synthese von *egr-1*-mRNA nach sich (Abbildung 22). Die starke *egr-1*-Expression unter Epo deuten *Schaefer et al.* als eine Verzögerung der Reifung durch eine proliferative Phase, welche für eine genügend hohe Zahl von Zellen für die nachfolgende Differenzierungsphase sorgt (*Schaefer et al.*, 2004). Die Ergebnisse der Promotionsarbeit deuten darauf hin, dass der Egr-1-Transkriptionsfaktor bei der Regulation der linienspezifischen Entwicklung von hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielt und regulatorische Effekte der Raf/MEK/ERK-Kaskade auf Differenzierungsvorgänge im hämatopoetischen System vermittelt.

In Zusammenhang mit den Differenzierungsergebnissen erlaubt sich nun die Schlussfolgerung, dass die ERK-vermittelte Aktivierung des Egr-1-Transkriptionsfaktors die erythroide Differenzierung hemmt. Umgekehrt resultiert eine Einleitung der erythroiden Reifung bei Suppression der ERK/MAP-Kinasen. Dies ergänzt Untersuchungen von *Krishnaraju et al.* die dargelegt hatten, dass der

Transkriptionsfaktor die monozytäre Differenzierung auf Kosten anderer Zellreihen, unter anderem der erythroiden, bevorzugt (*Krishnaraju et al., 2001*). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschieht dies über die Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen.

#### **6.4 Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zu diesem Thema**

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen die Verbindung zwischen ERK-Kaskade und *egr-1* in der TPA induzierten monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen auf. Obwohl damit die Zielsetzung dieser Arbeit erreicht worden ist, gibt es Bereiche, die sich als Ausgangspunkte für weitergehende Forschung eignen, um das Verständnis um diese Thematik zu vertiefen.

Zunächst bietet es sich an, ergänzende Experimente zur Dauer der ERK- und *egr-1*-Aktivierung durchzuführen. Zielsetzung könnte dabei sein, herauszuarbeiten, wie lange eine Aktivierung der ERK/MAP-Kinasen von Nöten ist, um die monozytäre Differenzierung zu induzieren. Für diese Fragestellung eignen sich Experimente, wie sie *Racke et al.* in K562 Zellen durchgeführt hatten. Dafür antagonisierten sie zu verschiedenen Zeitpunkten nach TPA-Stimulation mit dem MEK-Inhibitor PD 98059 die Wirkung des Tumorpromotors auf ERK1/2 und betrachteten die Folgen auf die Differenzierung. Dies kann in HL-60 Zellen mit Hilfe der Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung geschehen, wobei man jedoch auch weitere Methoden einschließen könnte, wie den Nachweis von spezifischen Oberflächenmarkern, die Nitroblautetrazolium-Färbung und die Superoxidanionenproduktion, um die resultierenden Ergebnisse auf ein sicheres Fundament zu stellen. Der Vorteil läge darin, dass die biochemischen und histochemischen Methoden einen objektiven Gegenpol zur subjektiven Auszählung von Zellanteilen mit dem Lichtmikroskop bilden.

In diesem Zusammenhang bietet es sich an, die *egr-1*-Expression für einen längeren Zeitraum zu betrachten, um Aussagen treffen zu können, ob es wie in ELM-I-1 oder M1 Zellen auch in HL-60 Zellen eine späte Expression von *egr-1* zwischen dem 2. bis 4. Tag gibt (*Schaefer et al., 2004; Nguyen et al., 1993*). Wenn eine solche zu detektieren wäre, gälte es die ERK-Phosphorylierung zu den entsprechenden Zeitpunkten in Western Blots zu untersuchen.

Der Reifungsprozess unter Vitamin D3 kann nach *Wang und Studzinski* in 2 Phasen gegliedert werden, wobei sich erstere eventuell ERK-abhängig und zweite unabhängig davon darstellen könnte (*Wang und Studzinski, 2001*). Ob sich dieses Modell auf die TPA-induzierte Differenzierung von HL-60 Zellen übertragen lässt, ist noch nicht bekannt. Generell jedoch gilt es zu klären, über welche zellbiologischen Prozesse *egr-1* die monozytäre Differenzierung induziert und welche Mechanismen der Suppression der erythroiden Reifung durch die die ERK/MAPK/*egr-1*-Kaskade zugrunde liegen.

Weiterhin ist unklar, ob durch eine Blockade der ERK-Signaltransduktion und anschließender Stimulation mit DMSO oder SB 203580 die Zellen entlang der granulozytären Linie differenzieren oder unverändert proliferieren. Neben den in den Differenzierungsversuchen dieser Dissertation verwendeten Kombinationen von TPA und PD 98059 bzw. TPA und UO126, sind somit weitere Ansätze, wie die Tripel-Kombinationen aus TPA, PD 98059 bzw. UO126 mit DMSO oder SB 203580 (z.B. TPA + PD 98059 + SB 203580) denkbar. Kommt es beispielsweise unter TPA + UO126 + DMSO durch die Hemmung der ERK/*egr-1*-Wirkkette durch UO126 aufgrund der Anwesenheit von DMSO zu einer granulozytären Reifung der HL-60 Zellen?

Ein weiterer Aspekt ist die Bedeutung von p38 bzw. SB 203580 für die Differenzierung der HL-60 Zellen. Kann man Untersuchungen von *Zhang et al.* und *Ishii et al.* bezüglich einer granulozytären Reifung von HL-60 Zellen unter SB 203580 bestätigen, und wenn ja, welcher Bedeutung kommt der unter dieser Substanz zu beobachtenden *egr-1*-Expression in diesem Zusammenhang zu (*Zhang et al. 2003; Ishii et al. 2001*)?

Neben den genannten Punkten werden sich immer wieder neue Bereiche ergeben, die auf Erforschung warten und das Wissen um die intrazellulären Prozesse erweitern.

## **6.5 Bedeutung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen für die Medizin**

Die MAP-Kinasen sind, wie eingangs erwähnt, an der Vermittlung von verschiedenen zum Teil auch gegensätzlichen elementaren biologischen Prozessen wie Proliferation und Differenzierung, Apoptose und Überleben der Zelle beteiligt. Am Beispiel von ERK zeigt sich wie komplex die Regulation dieser Vorgänge ist, denn abhängig von

Wachstumsfaktor und Zelllinie fällt die Antwort der Zelle auf die Stimulation unterschiedlich aus (Marshall, 1995). Zum einen wird eine Aktivierung von ERK in Leukämiezelllinien wie z.B. K562, U937, CMK, UT-7/GM und HL-60 für die Induktion von Differenzierungsvorgängen benötigt (Racke et al., 1997; Melemed et al., 1997; Whalen et al., 1997; Kharbanda et al., 1993; Okuma et al., 2002; Uchida et al., 2001), zum anderen wird aber auch eine erhöhte basale ERK-Aktivität für die Entartung von Leukämiezellen und anderen Tumorzelllinien verantwortlich gemacht (Lunghi et al., 2001; Milella et al., 2001; Kim et al., 1999b; Hoshino et al., 1999; Towatari et al., 1997; Mansour et al., 1994).

Seitdem bekannt ist, dass Proteinkinasen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von physiologischen und pathologischen Prozessen einnehmen, sind sie Gegenstand intensiver Forschung. Unter zahlreichen Proteinkaskaden stellt die Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionskette ein viel versprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente in der Tumorthherapie dar (Sebolt-Leopold, 2000; Lee und McCubrey, 2002; Sebolt-Leopold et al., 1999; Weinstein-Oppenheimer et al., 2000). Vor allem in der Therapie von Tumoren, in welchen sich vielfach eine Fehlregulation von Proteinkinasen durch die Aktivierung von Protooncogenen zu Oncogenen nachweisen lässt, erhofft man sich durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren eine Erweiterung und Verbesserung der Tumorbehandlung.

Tatsächlich befinden sich zwei MEK-Inhibitoren, UO126 und PD 184352, ein Nachfolger von PD 98059 mit günstigerer Kinetik, in Phase I und II klinischer Prüfungen (Dancey und Sausville, 2003). Vorteile von MEK-Inhibitoren gegenüber anderen Substanzen, die sehr früh in Signaltransduktionskaskaden eingreifen, ist die Tatsache, dass MEK1/2 nur ERK1/2 aktivieren und damit Einflüsse auf andere Kinasen begrenzt sind. Vielleicht ist dies auch der Grund für die sich bereits andeutende gute Verträglichkeit von PD 184352. Als mögliche Einsatzbereiche für diese Substanzen zeichnen sich unter anderem epitheliale Tumore und Leukämien ab. So hat man z.B. mit PD 184352 eine Reduktion des Tumorwachstums von Kolonkarzinomen in Mäusen um 80% erreichen können (Sebolt-Leopold et al., 1999) und untersucht nun die Wirkung von PD 184352 (CI-1040) auf Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung in einer klinischen Studie (LoRusso et al., 2002).

Die zurückliegenden Ausführungen haben die Rolle der ERK/*egr-1*-Kaskade für die monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen aufgezeigt. Interessanterweise scheint aber eine erhöhte ERK-Aktivierung in vielen akuten myeloischen Leukämien (AML) zur leukämischen Transformation beizutragen (*Kim et al., 1999b; Towatari et al., 1997; Lunghi et al., 2001; Blalock et al., 2000a; Blalock et al., 2000b*). Aus diesem Sachverhalt leitet sich der Gedanke ab, durch MEK-Inhibitoren Einfluss auf den Verlauf von akuten myeloischen Leukämien nehmen zu können. Tatsächlich scheint eine Hemmung von MEK nicht nur einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen zu haben, sondern diese auch für die Zytostatika induzierte Apoptose zu sensibilisieren (*Millela et al., 2001; Lunghi et al., 2003; Lee und McCubrey 2002; Morgan et al., 2001*). Nicht nur in akuten myeloischen Leukämien beeinflussen MEK-Inhibitoren den Erkrankungsverlauf günstig, sondern auch in chronisch myeloischen Leukämien zeichnet sich ein wirkungsvoller Einsatz dieser Substanzen ab. In Bcr-Abl positiven Leukämiezellen kann die Kombination des bereits zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (STI571) mit PD 184352 einerseits die Resistenz gegen erstere Substanz aufheben und andererseits die Induktion der Apoptose deutlich verstärken (*Yu et al., 2002a; Yu et al., 2002b*). Aufgrund dieser Ergebnisse wird von verschiedenen Autoren die Berechtigung für klinische Studien mit MEK-Inhibitoren allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika in der Behandlung von Leukämien abgeleitet.

Trotz der viel versprechenden Einsatzmöglichkeiten von Proteinkinase-Inhibitoren, sollte bedacht werden, dass die Kinasekaskaden in zahlreiche zum Teil auch noch nicht bekannte Prozesse involviert sind und sich somit die unerwünschten Wirkungen vielfältig gestalten können. Darüber hinaus kann die Blockade eines Signaltransduktionsweges aufgrund von komplexen Vernetzungen und Interaktionen der Proteinkinasen untereinander auch auf andere Kaskaden Auswirkungen haben. Denkbar ist z.B., dass es bei dem Einsatz von MEK-Inhibitoren in der Tumorthherapie zu Auswirkungen auf die monozytäre und erythroide Differenzierung kommt. Falls sich die Rolle von p38 für die erythroide Reifung bestätigen sollte, wäre eine mögliche unerwünschte Wirkung von p38-Inhibitoren in der antiinflammatorischen Therapie (*Branger et al., 2002; Regan et al., 2002*) unter Umständen eine Anämie.

Die Abschätzung solcher Risiken ist aber nur möglich, wenn bekannt ist, welche Signaltransduktionskaskaden in den unterschiedlichen physiologischen Prozessen eine

Schlüsselposition einnehmen. In diesem Sinn soll meine Dissertation nicht nur die wissenschaftliche Neugier erfüllen, sondern auch von praktischer Bedeutung für die Medizin sein.

## 7 Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese formuliert, dass die TPA-induzierte monozytäre Differenzierung von HL-60 Zellen über die ERK/MAP-Kinasen vermittelte Aktivierung des *egr-1*-Gens eingeleitet wird.

Bisher war aus der Literatur einerseits eine Abhängigkeit der TPA-getriggerten Reifung von HL-60 Zellen von einer Aktivierung der ERK1/2 bekannt (*Kharbanda et al., 1994*) und andererseits wurde die Bedeutung der *egr-1*-Expression für die monozytäre Differenzierung nicht nur in HL-60 Zellen herausgestellt (*Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 2001*). Eine Verbindung dieser beiden Erkenntnisse unter der Vorstellung, dass in dieser Zelllinie die Aktivierung der ERK-Kaskade durch TPA über den Transkriptionsfaktor Elk-1 zur Expression des *egr-1*-Gens führt, gab es in diesem Kontext noch nicht.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen gelang es, diese Arbeitshypothese zu bestätigen. Es konnte aufgezeigt werden, dass die TPA-induzierte Differenzierung von promyelozytären HL-60 Zellen zu Monozyten über die ERK/MAP-Kinasen vermittelte Expression des *egr-1*-Gens gesteuert wird. Erstmals wurde in diesem Zusammenhang nicht nur die Expression des Gens, sondern auch dessen Genprodukt, der Egr-1-Transkriptionsfaktor, nachgewiesen. Wurde die Signaltransduktion über die ERK/MAPK-Kaskade mit den beiden MEK-Inhibitoren UO126 und PD 98059 unterbrochen, unterblieb nicht nur die Expression des *egr-1*-Gens sondern auch die Ausreifung der HL-60 Zellen unter TPA.

Durch Versuche mit erythroblastoiden ELM-I-1 Zellen konnte darüber hinaus untermauert werden, dass die ERK/*egr-1*-Wirkkette einerseits für eine linienspezifische Differenzierung von Monozyten und Megakaryozyten verantwortlich ist, andererseits jedoch die erythroide Entwicklung supprimiert. Eine gesteigerte Aktivierung von ERK hatte in dieser Zelllinie zur Folge, dass ein noch geringerer Anteil von Zellen in die Differenzierung eintrat. Umgekehrt konnte durch eine Inhibition der ERK/MAPK die Anzahl von ausreifenden ELM-I-1 Zellen gesteigert werden.

Mit diesen Ergebnissen wird die Bedeutung des ERK/*egr-1*-Signaltransduktionsweges für die myeloide Differenzierung deutlich, wohingegen die erythroide Reifung

hämatopoetischer Zellen nicht durch die ERK induzierte *egr-1*-Aktivierung eingeleitet wird.

## 8 Literaturverzeichnis

**Aberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM** (1995) *Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation.* Nature 373:620-623

**Albanell J, Baselga J** (1999) *Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer.* Drugs Today 35:931-946

**Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR** (1995) *PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo.* J Biol Chem 270:27489-27494

**Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM** (1994) *Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway.* Trends Biol Sci 19:279-283

**Beckmann AM, Wilce PA** (1997) *Egr transcription factors in the nervous system.* Neurochem Int 4:477-510

**Blalock WL, Moye PW, Chang F, Pearce M, Steelman LS, McMahon M, McCubrey JA** (2000a) *Combined effects of aberrant MEK1 activity and BCL2 overexpression in relieving the cytokine dependency of human and murine hematopoietic cells.* Leukemia 14:1080-1096

**Blalock WL, Pearce M, Steelman LS, Franklin RA, McCarthy SA, Cherwinski H, McMahon M, McCubrey JA** (2000b) *A conditionally-active form of MEK1 results in autocrine transformation of human and mouse hematopoietic cells.* Oncogene 19:526-536

**Bokemeyer D, Sorokin A, Yan M, Ahn NG, Templeton DJ, Dunn MJ** (1996) *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts.* J Biol Chem 271:639-642

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

**Branger J, van den Mlink B, Weijer S, Madwes J, Bos CL, Gupta A, Yong CL, Polmar SH, Olszyna DP, Hack CE, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, van der Poll T** (2002) *Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia.* J Immunol 168:4070-4077

**Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lyndon NB** (1996) *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative.* Cancer Res 56:100-104

**Cai H, Smola U, Wixler V, Eisenmann-Trappe I, Diaz-Meco MT, Moscat J, Rapp U, Cooper GM** (1997) *Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase.* Mol Cell Biol 17:732-741

**Carroll MP, May WS** (1994) *Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells.* J Biol Chem 269:1249-1256

**Cheng T, Wang A, Dai W** (1994) *Transcription factor egr-1 is involved in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells.* J Biol Chem 269:30848-30853

**Chomczynski P, Sacchi N** (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem 162:156-159

**Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K** (2003) *Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain.* Br J Pharmacol 138:751-756

**Clark SS, McLaughlin J, Timmons M, Pendergast AM, Ben-Neriah Y, Dow LW, Crist W, Rovera G, Smith SD, Witte ON** (1988) *Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL).* Science 239:775-777

**Clarkson RW, Shang CA, Levitt LK, Howard T, Waters MJ** (1999) *Ternary complex factors Elk-1 and Sap-1a mediate growth hormone-induced transcription of egr-1 (early growth response factor-1) in 3T3-F442A preadipocytes.* Mol Endocrinol 13:619-631

**Clifton AD, Young PR, Cohen P** (1996) *A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress.* FEBS Lett 392:209-214

**Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, U KM, Staten AM, Pazdur R** (2002) *Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia.* Clin Cancer Res 8:935-942

**Collins SJ** (1987) *The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression.* Blood 70:1233-1244

**Collins SJ, Ruscetti FW, Ruscetti RE, Gallagher R, Gallo RC** (1978) *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.* Proc Natl Acad Sci USA 75:2458-2462

**Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall C** (1994) *Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells.* Cell 77:842-852

**Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J** (1991) *The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element binding protein family.* Mol Cell Biol 8:3835-3841

**Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC** (1995) *SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.* FEBS Lett 364:229-233

**Dancey J, Sausville EA** (2003) *Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment.* Nat Rev Drug Discov 2:296-313

**Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P** (2000) *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.* Biochem J 351:95-105

**Dellarocca GJ, Vanbiesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ** (1997) *Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors-Convergence of G(i)- and G(q)-mediated pathways on calcium/calmodulin, PYK2, and Src kinase.* J Biol Chem 272:19125-19132

**Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW** (1992) *Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells.* Science 257:1404-1407

**Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E** (1998) *Signaling by dual specificity kinases.* Oncogene 17:1447-1455

**Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M** (2001) *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome.* N Engl J Med 344:1038-1042

**Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR** (1995) *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.* Proc Natl Acad Sci USA 92:7686-7689

**English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb H** (1999) *New insights into the control of MAP kinase pathways.* Expt Cell Tes 253:255-270

**Eyers PA, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M** (1998) *Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution.* Chem Biol 5:321-328

**Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA** (1995) *Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF.* Nature 376:542-527

**Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Dyk DEV, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM** (1998) *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.* J Biol Chem 273:18623-18632

**Franklin CC, Kraft AS** (1997) *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase MAPK phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells.* J Biol Chem. 272:16917-16923

**Frantz B, Klatt T, Pang M, Parsons J, Rolando A, Williams H, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA** (1998) *The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determinates the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding.* Biochemistry 37:13846-13853

**Friess H, Berberat P, Schilling M, Kunz J, Korc M, Buchler MW** (1996) *Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors.* J Mol Med 74:35-42

**Frödin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB Obberghen E** (1995) *Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin secreting  $\beta$ -cell line INS-1.* J Biol Chem 270:7882-7889

**Gallagher R, Collins S, Trujillo J, MCCredie M, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R** (1979) *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.* Blood 54: 713-733

**Gashler A, Sukhatme VP** (1995) *Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 50:191-224

**Goldenberg MM** (1999) *Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer.* Clin Ther 21:309-318

**Goldhirsch A, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD** (1998) *New treatments for breast cancer: breakthroughs for patient care or just steps in the right direction?* Ann Oncol 9:973-976

**Gredinger E, Gerber AN, Tamir Y, Tapscott SJ, Bengal E** (1998) *Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells.* J Biol Chem 273:10436-10444

**Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC, Adams JL, Livi GP, Goldsmith EJ, Young PR** (1998) *Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket.* J Biol Chem 273:15605-15610

**Hall A** (1994) *A biochemical function for ras—at last.* Science 264:1413-1414

**Hall JP, Davies RJ** (2002) *Inhibition of the p38 pathway upregulates macrophage JNK and ERK activities, and the ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways are reprogrammed during differentiation of the murine myeloid M1 cell line.* J Cell Biochem 86:1-11

**Hall-Jackson CA, Evers PA, Cohen P, Goedert M, Boyle FT, Hewitt N, Plant H, Hedge P** (1999a) *Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor.* Chem Biol 6:559-568

**Hall-Jackson CA, Goedert M, Hedge P, Cohen P** (1999b) *Effect of SB 203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo.* Oncogene 18:2407-2054

**Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ** (1997) *Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation.* Nature 386:296-299

**Harada S, Esch GL, Holgado-Madruga M, Wong AJ** (2001) *Grb-2-associated binder-1 is involved in insulin-induced egr-1 gene expression through its phosphatidylinositol 3'-kinase binding site.* DNA Cell Biol 20:223-229

**He H, Wang X, Gorospe M, Holbrook NJ, Trush MA** (1999) *Phorbol ester-induced mononuclear cell differentiation is blocked by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD98059.* Cell Growth Differ 10:307-315

**Heidenreich O, Neininger A, Schrott G, Zinek R, Cahill MA, Engel K, Kotlyarov A, Kraft R, Kostka S, Gaestel M, Nordheim A,** (1999) *MAPKAP Kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo.* J. Biol. Chem. 274:14434-1443

**Herschman HR** (1991) *Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters.* Annu Rev Biochem 60:281-319

**Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J** (1998) *Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2.* J Biol Chem 273:31327-31336

**Hofer G, Grimmer C, Sukhatme VP, Sterzel RB, Rupperecht HD** (1996) *Transcription factor Egr-1 regulates glomerular mesangial cell proliferation.* J Biol Chem 271:28306

**Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Arii S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M** (1999) *Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.* Oncogene 18:813-822

**Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ** (1992) *Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf.* Cell 71:335-342

**Hu RM, Levin ER,** (1994) *Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis 8 and basic fibroblast growth factor.* J Clin Invest 93:1820

**Huang RP, Liu C, Fan Y, Mercola D, Adamson E** (1995) *Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via DNA-binding domain.* Cancer Res 55:5054

**Hubermann E, Callahan MF** (1979) *Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents.* Proc Natl Acad Sci USA 76:1293-1297

**Hunter T** (1995) *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.* Cell 80:225-236

**Hynes NE, Gerber HA, Saurer S, Groner B** (1989) *Overexpression of the c-erbB-2 Protein in human breast tumor cell lines.* J Cell Biochem 39:167-173

**Ishii Y, Sakai S, Honma Y** (2001) *Pyridinyl imidazole inhibitor SB 20358 activates p44/42 mitogen-activated protein kinase and induces the differentiation of human myeloid leukemia cells.* Leuk Res 25:813-820

**Itoh K, Sasaki R, Ono K, Tezuka H, Sakoda H, Sawada H, Tezukai H, Dakoda H, Nakane H, Uchiyama T, Uchino H, Mori KJ (1988)** *Establishment and characterization of a transplantable erythroblastic leukemia in C3H mice.* *Cancer Res* 79:931-937

**Janknecht R, Cahill MA, Nordheim A (1995)** *Signal integration at the c-fos promoter.* *Carcinogenesis* 16:443-350

**Janknecht R, Hunter T (1997)** *Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a.* *EMBO J* 16:1620-1627

**Ji Y, Kutner A, Verstuyf A, Verlinden L, Studzinski GP (2002)** *Derivatives of vitamins D (2) and D (3) activate three MAPK pathways and upregulate pRb expression in differentiation HL-60 cells.* *Cell Cycle* 1:410-415

**Kaiho SI, Mizuno K (1985)** *Sensitive Assay systems for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation.* *Anal Biochem* 149:117-120

**Kaufmann K, Bach K, Thiel G (2001)** *The extracellular signal-regulated protein kinases ERK1/ERK2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1.* *Biol Chem* 382:1077-1081

**Kharbanda S, Nakamura T, Stone R, Hass R, Bernstein S, Datta R, Sukhatme VP, Kufe D (1991)** *Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation.* *J Clin Invest* 88:251-257

**Kharbanda S, Saleem A, Emoto Y, Stone R, Rapp U, Kufe DJ (1994)** *Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells.* *J Biol Chem* 269:872-878

**Kim JY, Yang MS, Oh CD, Kim KT, Ha MJ, Kang SS, Chun JS (1999a)** *Signalling pathway leading to an activation of mitogen-activated protein kinase by stimulating M3 muscarinic receptor.* *Biochem J* 337:275-280

**Kim SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ (1999b)** *Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of phosphatase, PAC1.* *Blood* 93:3893-3899

**Kishimoto T, Taga T, Akira S (1994)** *Cytokine signal transduction.* *Cell* 76:253-262

**Klinke R, Silbernagel S (Hrsg.) (1996)** *Lehrbuch der Physiologie, 2. Auflage.* Thieme, Stuttgart New York

**Klinken SP, Nikola NA, Johnson GR (1988)** *In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin.* *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8900-8904

**Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo MC (1981)** *Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation.* *Cancer Res* 41:919-926

- Kolch W** (2000) *Meaningful relationship: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions* Biochem J 351:289-305
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR** (1993) *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.* Nature 364:249-252
- Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA** (1998) *The zinc finger transcription factor egr-1 activates macrophage differentiation in M1 myeloblastic leukemia cells.* Blood 92:1957-1966
- Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA** (2001) *Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages* Blood 97:1298-1305
- Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B** (1995) *The zinc finger transcription factor egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells.* Mol Cell Biol Oct.:5499-5507
- Kyriakis JM, App H, Zhang X-F, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J** (1992) *Raf-1 activates MAP kinase-kinase.* Nature 358:417-421
- Le Beau MM, Espinosa R III, Newman WL, Stock W, Roulston D, Larson TA, Keinanen M, Westbrook CA** (1993) *Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases.* Proc Natl Acad Sci USA 90:5484
- Lee JT, McCubrey** (2002) *The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia.* Leukemia 16:486-507
- Lee SB, Thee SG** (1995) *Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes.* Curr Opin Cell Biol 7:183-189
- Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P** (1988) *Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells.* Proc Natl Acad Sci USA 85:4691-4695
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG** (1998) *Signal transduction through MAP kinase cascades* Adv. Cancer Res. 74:49-139
- Liebermann D, Hoffman-Liebermann B, Sachs L** (1981) *Regulation of gene expression by tumor promoters. II. Control of cell shape and developmental programs for macrophages and granulocytes in human myeloid leukemic cells.* Int J Cancer 28:285-291
- Lin H, Chen C, Li X, Chen BD** (2002) *Activation of the MEK/MAPK pathway is involved in bryostatins-induced monocytic differentiation and up-regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein.* Exp Cell Res 272:192-198
- Liu C, Adamson E, Mercola D** (1996) *Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HAT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor.* Proc Natl Acad Sci USA 93:11831

- Liu C, Rangnekar VM, Adamson E, Mercola D** (1998) *Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by Egr-1*. *Cancer Gene Ther.* 1:3-28
- Löffler G, Petrides P** (1998) *Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Lo LW, Cheng JJ, Chiu JJ, Wung BS, Liu YC, Wang DL** (2001) *Endothelial exposure to hypoxia induces egr-1 expression involving PKC $\alpha$ -mediated ras/raf-1/erk1/2 pathway*. *J Cell Physiol* 188:304-312
- LoRusso PM** (2002) *A phase I clinical and pharmacokinetic evaluation of the oral MEK inhibitor, CI-1040, administered for 21 consecutive days, repeated every 4 weeks in patients with advanced cancer*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:321-?
- Lowy DR, Willumsen BM** (1993) *Function and regulation of ras*. *Annu Rev Biochem* 62:851-891
- Lunghi P, Tabilio A, Dall'Aglio PP, Ridolo E, Carlo-Stella C, Pelicci PG, Bonati A** (2003) *Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts*. *Leukemia* 17:1783-1793
- Lunghi P, Tabilio A, Pinelli S, Valmadre G, Ridolo E, Albertini R, Carlo-Stella C, Dall'Aglio PP, Pelicci PG, Bonati A** (2001) *Expression and activation of SHC/MAP kinase pathway in primary acute myeloid leukemia blasts*. *Hematol J* 2:70-80
- Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Woude GFV, Ahn NG** (1994) *Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase*. *Science* 265:966
- Marcinkowska E** (2001) *Evidence that activation of MEK1,2/erk1,2 signal transduction pathway is necessary for calcitriol-induced differentiation of HL-60 cells*. *Anticancer Res* 21:499-504
- Marshall CJ** (1995) *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cell* 80:179
- Matsuzaki T, Aisaki K, Yamamura Y, Noda M, Ikawa Y** (2000) *Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a friend murine leukemia cell line*. *Oncogene* 19:1500-1508
- McMahon SB, Montoe JG** (1996) *The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response*. *J Leukoc Biol* 60:159-166
- Melemed AS, Ryder JW, Vik TA** (1997) *Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells* *Blood* 90:3462-3470
- Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreff M** (2001) *Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia*. *J Clin Invest* 108:851-859

- Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE** (2002) *Importance of MEK-1/2 signaling in monocytic differentiation of myeloid cell lines.* Leukemia 16:683-92
- Miyazaki R, Ogata H, Kobayashi Y** (2001) *Requirement of thrombopoietin-induced activation of ERK for megakaryocyte differentiation and of p38 for erythroid differentiation.* Ann Hematol 80:284-291
- Morgan MA, Dolp O, Reuter CW** (2001) *Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling.* Blood 97:1823-1834
- Muthukkumar S, Nair P, Sells SF, Maddiwar NG, Jacob RJ, Rangnekar VM** (1995) *Role of Egr-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in melanoma cell line A375-C6.* Mol Cell Biol 15:6262
- Nagarajan L, Lange B, Cannizzaro L, Finan J, Nowell PC, Huebner K** (1990) *Molecular anatomy of a 5q interstitial deletion.* Blood 75:82-87
- Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K** (1998) *Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation.* Blood 92:1859-1869
- Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA** (1993) *The zinc finger transcription factor egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage.* Cell 72:197-209
- Nishizuka Y** (1984) *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.* Science 255:1365
- Okuma E, Inazawa Y, Saeki K, Yuo A** (2002) *Potential roles of extracellular signal-regulated kinase but not p38 during myeloid differentiation of U937 cells stimulated by cytokines: augmentation of differentiation via prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase.* Exp Hematol 30:571-81
- Olsson I, Bergh G, Ehinger M, Gullberg U** (1996) *Cell differentiation in acute myeloid leukemia.* Eur J Haematol 57:1-16
- Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, Shows TB, Le Beau MM, Sukhatme VP** (1991) *EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors.* Oncogene 6:917-928
- Perez-Castillo A, Pipaon C, Garcia I, Alemany S** (1993) *NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation.* J Biol Chem 168:19445
- Perrimon N** (1994) *Signalling pathways initiated by receptor protein tyrosine kinases in Drosophila.* Curr Opin Cell Biol.6:260-266
- Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, Goldfarb AN** (1997) *Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells.* J Biol Chem 272:23366-23370

- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ Davis RJ** (1995) *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.* J. Biol. Chem. 270:7420-7426
- Regan J, Breitfelder S, Cirillo P, Gilmore T, Graham AG, Hickey E, Klaus B, Madwed J, Moriak M, Moss N, Pargellis C, pav S, Proto A, Swinamer A Tong L, Torcellini C** (2002) *Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate.* J Med Chem 45:2994-3008
- Richards JD, Dave SH, Chou CH, Mamchak AA, DeFranco AL** (2001) *Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen.* J Immunol 166:3855-3864
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME** (1994) *Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras.* Neuron 12:1207-1221
- Rossi F, McNagny KM, Smith G, Frampton J, Graf T** (1996) *Lineage commitment of transformed haematopoietic progenitors is determined by the level of PKC activity.* EMBO J 15:1894-1901
- Rovera G, Santoli D, Damsky C** (1979) *Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol ester.* Proc Natl Acad Sci USA 76:2779-2783
- Sawafuji K, Miyakawa Y, Kizaki M, Ikeda Y** (2003) *Cyclosporin A induces erythroid differentiation of K562 cells through p38 MAPK and ERK pathways.* Am J Hematol 72:67-69
- Schaefer A, Kósa K, Bittorf T, Magócsi M, Rosche A, Ramirez-Chávez Y, Marotzki S, Marquardt H** (2004) *Opposite effects of mitogen-activated protein kinase pathways on the egr-1 and  $\beta$ -globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells.* Cell Signal 16:223-234
- Schenk PW, Snaar-Jagalska BE** (1999) *Signal perception and transduction: the role of protein kinases.* Biochem Biophys Acta 1449:1-24
- Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ** (1998) *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes.* Mol Cell Biol 18:790-798
- Sebolt-Leopold JS** (2000) *Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway.* Oncogene 19:6594-6599
- Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR** (1999) *Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo.* Nat Med 5:810-816
- Sell S** (1993) *Cellular origin of cancer: dedifferentiation of Stem cell maturation arrest?* Environ Health Perspect 101:15-26

- Shin SY, Kim SY, Kim JH, Min DS, Ko J, Kang UG, Kim YS, Kwon TK, Han MY, Kim YH, Lee YH** (2001) *Induction of early growth response-1 gene expression by calmodulin antagonist trifluoperazine through the activation of Elk-1 in human fibrosarcoma HT1080 cells.* J Biol Chem 276:7797-7805
- Shiozaki M, Itoh K, Mori KJ** (1990) *Proliferation and differentiation of erythroleukemia cell line (ELM-I-1) in response to erythropoietin and interleukin 3.* Leuk Res 14:287-291
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E** (1985) *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia.* Nature 315:550-554
- Singh RP, Dhawan P, Golden C, Kapoor GS, Mehta KD** (1999) *One-way cross-talk between p38 (MAPK) and p42/44 (MAPK). Inhibition of p38 (MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44 (MAPK) cascade.* J Biol Chem. 274:19593-19600
- Sirivatanauksorn V, Sirivatanauksorn Y, Lemoine NR** (1998) *Molecular pattern of ductal pancreatic cancer.* Langenbecks Arch Surg 383:105-115
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al.** (1989) *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.* Science 244:707-712
- Smithgall TE** (1998) *Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation.* Pharmacol Rev 50:1-19
- Sozeri O, Vollmer K, Liyanage M, Frith D, Kour G, Mark GE 3rd, Stabel S** (1992) *Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation.* Oncogene 7:2259-2262
- Sugimoto T, Stewart S, Guan KL** (1997) *The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase.* J Biol Chem 272:29415-29418
- Sukhatme VP, Cao X, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Terreira PCP, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, Le Beau MM, Adamson ED** (1988) *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarisation.* Cell 53:37-43
- Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH** (1987) *A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens.* Oncogene Res 1:343-355
- Sun H, Tonks NK** (1994) *The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling.* Trends Biochem Sci 19:480-485
- Suva LJ, Ernst M, Rodan GA** (1991) *Retinoic acid increases zif268 early gene expression in rat preosteoblastic cells.* Mol Cell Biol 11:2503-2510
- Tabilio A, Pelicci PG, Vinci G, Mannoni P, Civin CI, Vainchenker W, Testa U, Lipinski M, Rochant H, Breton-Gorius J** (1983) *Myeloid and megakaryocytic properties of K562 cell lines.* Cancer Res 43:4569-4574

- Thomas PS** (1980) *Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose*. Proc Natl Acad Sci USA 77:5201-5207
- Tian J, Karin M** (1999) *Stimulation of Elk-1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinase is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin)*. J Biol Chem 274:15173-15180
- Tibbles LA, Woodgett JR** (1999) *The stress-activated protein kinase pathways*. Cell Mol Life Sci 55:1230-1254
- Todokoro K, Watson RJ, Higo H, Anamuma H, Kuramochi S, Yanagisawa A, Ikawa Y** (1988) *Downregulation of c-myc gene is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation*. Proc Natl Acad Sci USA 85:8506-8510
- Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA** (1997) *A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket*. Nat Struct Biol 4:311-316
- Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H** (1997) *Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells*. Leukemia 11:479-484
- Uchida M, Kirito K, Shimizu R, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N** (2001) *A functional role of mitogen-activated protein kinase, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages*. Int J Hematol 73:78-83
- Umbhauer M, Marshall CJ, Mason CS, Old RW, Smith JC** (1995) *Mesoderm induction in Xenopus caused by activation of MAP kinase*. Nature 376:58-62
- Van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P** (1995) *AFT-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents*. EMBO J 14:1798-1811
- Wang X, Rao J, Studzinski GP** (2000) *Inhibition of p38 MAP kinase activity up-regulates multiple MAP kinase pathways and potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells*. Exp Cell Res 258:425-437
- Wang X, Studzinski GP** (2001) *Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL-60 cells*. J Cell Biochem 80:471-82
- Wang XZ, Ron D** (1996) *Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element*. Science 272:1347-1349
- Wang Z, Canagarajah BJ, Boehm JC, Kassiso S, Cobb MH, Youn PR, Abdel-Meguid S, Adams JL, Goldsmith EJ** (1998) *Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinase*. Structure 6:1117-1128
- Ways DK, Dodd RC, Earp HS** (1987) *Dissimilar effects of phorbol ester and diacylglycerol derivative on protein kinase activity in the monoblastoid U937 cell*. Cancer Res 47:3344-3350

**Weinstein-Oppenheimer CR, Blalock WL, Steelman LS, Chang F, MCCubrey JA** (2000) *The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors.* Pharmacol Ther 88:229-279

**Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kahari VM** (2001) *p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression.* Mol Cell Biol. 21:2373-2383

**Whalen AM, Galasinski SC, Shapiro PS, Nahreini TS, Ahn NG** (1997) *Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated kinase kinase.* Mol Cell Biol 17:1947-1958

**Whelan RD, Kiley SC, Parker PJ** (1999) *Tetradecanoyl phorbol acetate-induced microtubule reorganization is required for sustained mitogen-activated protein kinase activation and morphological differentiation of U937 cells.* Cell Growth Differ 10:271-277

**Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ** (1995) *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element.* Science 269:403-407

**Witt O, Sand K, Pekrun A** (2000) *Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways.* Blood 95:2391-2396

**Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF** (1995) *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor.* Cell 83:59-67

**Yen A, Roberson MS, Varvayanis S** (1999) *Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK of p38 kinases when inducing myeloid differentiation.* In Vitro Cell Dev Biol Anim 35:527-532

**Yordy JS, Muise-Helmericks RC** (2000a) *Signal transduction and the Ets family of transcription factors.* Oncogene 19:6503-6513

**Yu C, Dai Y, Dent P, Grant S** (2002b) *Coadministration of UCN-01 with MEK1/2 inhibitors potently induces apoptosis in BCR/ABL+ leukemia cells sensitive and resistant to STI571.* Cancer Biol Ther 1:674-682

**Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, Grant S** (2002) *Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells.* Cancer Res 62:188-199

**Zhang H, Shi X, Hampong M, Blanis L, Pelech S** (2001) *Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase.* J Biol Chem 276:6905-08

**Zhang JX, Zhuang WJ, Poon KH, Yang M, Fong WF** (2003) *Induction of HL-60 cell differentiation by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 is*

*mediated through the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway.*  
Anticancer Drugs 14:31-38

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungen

AFT-2	Activating transcription factor 2
AML	Akute myeloische Leukämie
AP1	Aktivator Protein 1
ASK1	Apoptose Signal-regulierte Kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr-abl	Break point cluster region-Abelson-Leukämie-Virus-Homolog
CAF-Lösung	Citrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CD	Cluster of differentiation
CHOP	CCAAT/enhancer binding homologous protein
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CREB	cAMP response-element binding protein
CSF	Colony stimulating factor
DAF	Diaminoflouren
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response-1-Transkriptionsfaktor
<i>egr-1</i>	Early growth response-1-Gen
Epo	Erythropoetin
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Proteins
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninenucleotid-exchange-Factoren
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
Grb2	Growth-factor receptor-bound-protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
Hsp27	Heat shock protein 27
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KSR	Kinase suppressor of Ras
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase

MEF2C	Myocyte enhancing factor-2C
MEK	MAPK/ERK Kinase
MKK	MAPK Kinase
MKP	MAP-Kinase Phosphatasen
MLK	Mixed lineage kinase
MP1	MEK Partner 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGF	Neuronal growth factor
NSE	Nicht-spezifische Esterase
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-buffered saline
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
PP2A/2B	Proteinphosphatase 2A/2B
RRE	Ras Response Element
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SB 203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol
SCF	Stem cell factor
SCM	Cell-conditioned medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOS	Son of sevenless
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Faktor
SUR8	Suppressor of Ras-8
TAK	TGF $\beta$ -aktivierte Kinase
TBS	Tris-buffered saline
TCF	Ternärkomplexfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	o-Tetradecanoylphosphat
TPO	Thrombopoetin
UO126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die MAP-Kinase Kaskaden (Quelle: cell signal.com) .....	10
Abbildung 2: ERK/MAP-Kinase Kaskade (Quelle: cell signal.com) .....	13
Abbildung 3: JNK/SAPK-Kaskade (Quelle: cell signal.com) .....	15
Abbildung 4: p38/MAP-Kinase Kaskade (Quelle: cell signal.com) .....	16
Abbildung 5: Struktur von TPA.....	32
Abbildung 6: Struktur von UO126 .....	33
Abbildung 7: Struktur von PD 98059 .....	34
Abbildung 8: Angriffspunkte von UO126 und PD 98059 (Quelle: cell signal.com).....	36
Abbildung 9: Struktur von SB 203580 .....	36
Abbildung 10: TPA stimuliert die ERK/MAP-Kinasen, die <i>egr-1</i> -Expression und die Egr-1-Synthese konzentrationsabhängig .....	55
Abbildung 11: Kinetik der ERK-Phosphorylierung nach TPA-Stimulation.....	57
Abbildung 12: Kinetik der Elk-1-Phosphorylierung und Egr-1-Synthese nach TPA-Stimulation .....	58
Abbildung 13: Induktion der <i>egr-1</i> -Expression unter 5 nM TPA .....	59
Abbildung 14: Suppression der ERK-Kaskade durch PD 98059.....	60
Abbildung 15: Suppression der ERK-Kaskade, der <i>egr-1</i> -Expression und der Synthese des Transkriptionsfaktors durch UO126 .....	63
Abbildung 16: Auswirkung von SB 203580 auf MAP-Kinasen, <i>egr-1</i> -Expression und Synthese des Transkriptionsfaktors.....	66
Abbildung 17: Auswirkung von SB 203580, UO126 und PD 98059 auf die ERK/MAP-Kinasen und Egr- 1-Synthese.....	69
Abbildung 18: TPA und DMSO induzieren die Bildung von Egr-1 .....	71
Abbildung 19: Nicht-spezifische-Esterase Produktion in HL-60 Zellen .....	75
Abbildung 20: Morphologie von HL-60 Zellen nach Induktion.....	76
Abbildung 21: Untersuchung zur Differenzierung von ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580 .....	81
Abbildung 22: <i>egr-1</i> -Expression in ELM-I-1 Zellen unter Epo, UO126 und SB 203580 .....	83

## **9.3 Lebenslauf**

*Julia Schwabe*

### **Persönliche Daten**

Geboren am 02.12.1977 in Hamburg

### **Schule**

1984-1988 Grundschule in Egenbüttel und Stade

1988-1990 Orientierungsstufe Stade

1990-1997 Gymnasium Athenaeum Stade mit Abitur Sommer 1997

### **Hochschulausbildung**

1998-2004 Humanmedizin an der Universität Hamburg

03/2000: Physikum

03/2001: Erstes Staatsexamen

09/2003: Zweites Staatsexamen

11/2004: Drittes Staatsexamen

### **Praktische Ausbildung**

8/2000 Famulatur *Innere Medizin* AK St. Georg Hamburg

2/2002 Famulatur *Neurologie* Elbeklinikum Stade

8/2002 Famulatur *Chirurgie* St. Adolf-Stift Reinbek

9/2002 Famulatur *Orthopädische Praxis*

10/2003-10/2004 Praktisches Jahr : *Neurologie* im UK Eppendorf

*Chirurgie* im Concord Hospital Sydney, Australien

und St. Adolf-Stift Reinbek

*Innere Medizin* in Luzern, Schweiz

### **Promotion**

Juli 2001 bis Februar 2004 unter Leitung von Prof. Dr. H. Marquardt und der Betreuung von Prof. Dr. A. Schaefer im Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg zu dem Thema „Die Rolle der ERK/MAPK und des Egr-1-Transkriptionsfaktors in der TPA-induzierten monozytären Differenzierung von HL-60 Zellen“.

## **9.4 Danksagung**

Ich danke sehr dem Direktor des Instituts für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Prof. Dr. H. Marquardt, für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Leitung anfertigen zu können.

An nächster Stelle möchte ich Prof. Dr. András Schaefer von ganzen Herzen für seine Betreuung danken. Dies schließt die Auswahl des Themas, Vermittlung von Methoden, Rat und Anregung, seine große Hilfsbereitschaft in jeder Situation und ein Ohr für meine Sorgen und Nöte ein. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Von Yoandra Ramirez-Chavez habe ich nicht nur die Western Blot Technik gelernt, sondern in ihr auch eine neue Freundin gewonnen.

Dr. Dorothee Dartsch danke ich für ihren Rat, sowie für die Weitergabe ihres Wissens bezüglich des Handlings der HL-60 Zellen und ihrer Anfärbung.

Weiterhin möchte ich meinen Dank an Peggy Heide für ihre praktische Hilfe im Labor richten.

Außerhalb meiner Arbeitsgruppe gilt mein Dank Natalie und Okko für Hilfe in Fragen mit dem Computer und für ihre Freundschaft.

Natürlich danke ich auch all den lieben Menschen aus meiner Familie und meinem Freundes- und Bekanntenkreis, die auf die eine oder andere Art und Weise dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation entstanden ist.

## **9.5 Eidesstattliche Versicherung**

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

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