

Aus der Urologischen Klinik  
Direktor: Prof. Dr. Ackermann

**Signaltransduktionswege in Harnblasenkarzinomzelllinien und  
normalen uroepithelialen Zellen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Sandra Swiatkowski

**2006**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Bernd Nürnberg

Dekan

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. W.A. Schulz

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. rer. nat. F. Schliess

*Für meine Eltern*

# **1. EINLEITUNG**

## **1.1 Das Harnblasenkarzinom**

## **1.2 Signaltransduktionswege bei der Zellproliferation**

1.2.1 MAP-Kinase-Signalwege

1.2.2 Der JAK/STAT-Signalweg

1.2.3 Der Wnt-Signalweg

## **1.3 Ziel der Arbeit**

# **2. MATERIAL**

## **2.1 Etablierte Zelllinien**

## **2.2 Primärkulturen**

## **2.3 E.coli-Stämme**

## **2.4 Plasmide**

## **2.5 Kulturmedien und Zusätze**

## **2.6 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits, Proteine, Transfektionsreagenzien, Verbrauchsmaterial**

## **2.7 Lösungen und Puffer**

## **2.8 Spezielle Geräte**

## **2.9 Software**

# **3. METHODEN**

## **3.1 Kultivierung von humanen Zellen**

3.1.1 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien

3.1.2 Anlegen von humanen Urothel-Primärkulturen aus Ureter

3.1.3 Giemsa-Färbung

## **3.2 Analytische Methoden an Zellen in Zellkultur**

3.2.1 Proteinbestimmung

3.2.2 BrdU-Inkorporationstest

3.2.3 Luziferase Messung

## **3.3 Transfektionsversuche**

3.3.1 Transiente Transfektion

## **3.4 Kultur von Bakterienzellen**

3.4.1 Kultur von E.coli-Zellen

3.4.2 Transformation

### **3.5 Untersuchungen von Nukleinsäuren und Proteinen**

3.5.1 Plasmidpräparationen

3.5.2 Proteinextraktion aus Zelllinien und normalen Uroepithelialzellen

### **3.6 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA**

3.7 Agarosegelelektrophorese

3.8 Western Blot-Analyse

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Aktivität von MAPK-Signalwegen in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen**

4.1.1 Experimentelles Vorgehen

4.1.2 Bestimmung der MAPK-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen mittels Reportergenanalyse

4.1.3 Induktion der MAPK-Basalaktivität durch EGF

4.1.4 Induktion der MAPK-Basalaktivität durch MEKK4

4.1.5 Induktion der Basalaktivität durch TPA

4.1.6 Effekt von Serum auf Promotoraktivitäten in Harnblasenkarzinomzelllinien

4.1.7 Effekt von Serum auf Promotoraktivitäten in uroepithelialen Zellen

4.1.8 Effekt von cAMP auf Promotoraktivitäten in Harnblasenkarzinomzelllinien

4.1.9 Expression von MAPKs in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

4.1.10 Expression aktiver MAPKs in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

4.1.11 Induktion der Expression aktiver MAPKs durch TPA

4.1.12 Effekt des MEK1/2-Inhibitor PD98059 in Harnblasenkarzinomzelllinien

### **4.2 Aktivität der IL-6/STAT in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen**

4.2.1 Experimentelles Vorgehen

4.2.2 Bestimmung der STAT-Signalweg-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

4.2.3 Induktion IL-6/STAT- vermittelter Signalwege durch IL-6 + IL-6-Rezeptor

### **4.3 Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin vermittelten-Signalweges in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen**

4.3.1 Experimentelles Vorgehen

4.3.2 Bestimmung der Wnt-Signalweg-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien

4.3.3 Induktion der Wnt-Signalweg-Basalaktivität durch Lithiumacetat

## **5. DISKUSSION**

**5.1 Der MAPK-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen**

**5.2 Der STAT-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen**

**5.3 Der Wnt-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen**

## **6. ZUSAMMENFASSUNG**

## **7. LITERATURVERZEICHNIS**

## **8. ABKÜRZUNGEN**

## **9. DANKSAGUNG**

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung im Urogenitaltrakt.

Es macht 2-3% aller malignen Tumoren des Menschen aus. Jährlich erkranken ungefähr 15.000 Menschen in Deutschland an Harnblasenkrebs. Das Altersmaximum der Erkrankung liegt zwischen der 5. und 7. Lebensdekade, Männer sind im Vergleich zu Frauen dreimal häufiger betroffen. Eine familiäre Häufung ist nicht bekannt.

Ätiologisch spielt die Exposition gegenüber verschiedenen Substanzen, die als karzinogen oder co-karzinogen wirken, eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Erstmals wurde eine Beziehung zwischen beruflicher Exposition gegenüber chemischen Karzinogenen und Harnblasenkrebs Anfang des 18. Jahrhunderts beschrieben. (Bochner 2003) Zu den stärksten Karzinogenen zählen die aromatischen Amine und ihre Abkömmlinge und Amide. Ebenso besteht eine Assoziation von Blasenkrebs und Rauchen. Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein 2-3mal erhöhtes Risiko, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln. (Morrison 1984; Burch et al. 1989; Clavel et al. 1989; Zeegers et al. 2002; Bochner 2003) Dies wird den im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogenen wie aromatischen Aminen und anderen zugeschrieben. (Hoffman et al. 1969)

Weitere gesicherte Karzinogene für das Harnblasenkarzinom sind Medikamente wie Phenacetin und Cyclophosphamid, chronische Harnwegsinfekte bei denen Nitrosamine anfallen, Bilharziose, Balkannephropathie, chronische, interstitielle Nephritis und Strahlentherapie des kleinen Beckens.

Das Überwiegen des Urothelkarzinoms bei Männern wird der höheren Prävalenz des Rauchens und der häufigeren (beruflichen) Exposition von Karzinogenen zugeschrieben.

Die Latenzzeit zwischen Exposition und Karzinomerkrankung ist sehr lang. Ein Harnblasenkarzinom kann nach einer Latenzzeit von bis zu 30 Jahren auftreten.

Die Mehrzahl der Harnblasentumore (90%) sind Übergangszellkarzinome (TCC = transitional cell carcinoma). Die übrigen setzen sich aus Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen zusammen. In seltenen Fällen wurden kleinzellige Karzinome, Sarkome, Lymphome und Melanome beschrieben. (Raghavan 2003) Plattenepithelkarzinome findet man häufig mit chronischen Infekten wie Bilharziose assoziiert.

Prinzipiell treten Urothelkarzinome in den gesamten ableitenden Harnwegen gleichmäßig verteilt auf. Die Tatsache, dass die meisten Urothelkarzinome Harnblasenkarzinome sind, erklärt sich dadurch, dass die Harnblase mit 93% den größten Flächenanteil einnimmt.

Urothelkarzinome sind häufig multifokal, die Tumore sind in der Mehrzahl der Fälle monoklonal, so dass man davon ausgeht, dass ihr Ursprung eine einzige genetisch veränderte Zelle ist, die intraluminal streut oder sich intraepithelial ausbreitet. (Cohen and Johansson 1992)

Klassifiziert werden die Harnblasenkarzinome gemäß den Richtlinien der internationalen Union gegen Krebs (UICC, Unio internationalis contra cancrum, 1997) nach Tumorausbreitung (TNM) und Differenzierungsgrad der Zellen (G).

pTa	Papillär, nicht invasives Karzinom
pTis	Carcinoma in situ („flacher Tumor“)
pT1	Infiltration in subepitheliales Bindegewebe
pT2	Infiltration in den Muskel (oberflächlich/tief)
pT3	Infiltration des perivesikalen Bindegewebes (mikroskopisch/makroskopisch)
pT4	Infiltration der perivesikalen Organe (Prostata, Uterus, Vagina/ Becken-oder Bauchwand)
pN1	Solitär < 2 cm
pN2	Solitär 2-5 cm, multipel < 5 cm
pN3	> 5 cm

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

**Tab. 1.1a/b** **Klassifizierung des Harnblasenkarzinoms:** Die Einteilung erfolgt gemäß den Richtlinien der internationalen Union gegen Krebs (UICC, Unio internationalis contra cancrum, 1997) nach Tumorausbreitung (TNM) und Differenzierungsgrad der Zellen (G).

Es besteht eine enge Korrelation zwischen Tumorgrad, Infiltrationstiefe des Tumors, Differenzierungsgrad der Zellen, Auftreten von Rezidiven, Progression und Überlebensrate. (Rübben and Otto 2001)

Die meisten oberflächlichen Blasen Tumore (G1) sind gut differenziert, bei den meisten invasiven Tumoren handelt es sich um wenig differenzierte Tumore (G3).

Danach lassen sich die urothelialen Tumore histopathologisch und klinisch in zwei verschiedene Gruppen unterteilen, die sich in Bezug auf ihre Prognose unterscheiden. Die erste Gruppe setzt sich aus gut differenzierten papillären Tumoren zusammen, die meist nur oberflächlich wachsen und auf Mukosa und Submukosa beschränkt sind (Ta/Cis/T1). Diese machen ungefähr 80% der Blasen Tumore aus. Der Großteil der papillären Tumore zeichnet sich durch eine hohe Rezidivrate aus. Nur 10%-20% verlaufen im weiteren Verlauf progredient muskelinfiltrierend.

Das Carcinoma in situ (Cis) nimmt unter den oberflächlich wachsenden Tumoren eine Sonderstellung ein. Es wächst intraepithelial und nicht infiltrierend, zeichnet sich aber durch einen hohen Malignitätsgrad und durch eine hohe Progressionsneigung aus.

Zu der zweiten Gruppe gehören solide Tumore im Stadium T2-T4, die bereits die Muskulatur und/oder umliegendes Gewebe infiltrieren. Sie zeichnen sich durch eine schlechtere Prognose aus und verlaufen oft schnell progredient. (Knowles 2001)

Analog dazu unterscheidet sich auch die Therapie in den einzelnen Untergruppen.

Harnblasenkarzinome in den Stadien Ta, Cis, T1 werden hauptsächlich transurethral elektroreseziert, gegebenenfalls nachreseziert und mit einer adjuvanten Instillationstherapie mit einem Zytostatikum behandelt. Bei Versagen der Rezidivprophylaxe eines Cis-Tumors ist dann eine radikale Zytomie indiziert.

Bei muskelinvasiven, nicht metastasierten Harnblasenkarzinomen (T2-4, N0, M0) wird eine radikale Zytomie empfohlen. Dies bedeutet für Frauen die Durchführung einer Hysterektomie, Adnexektomie und Resektion der vorderen Scheidewand, für den Mann die Entfernung von Prostata und Samenblase. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder Metastasierung (Tx, N1-2, M1) erfolgt zur Prognoseverbesserung eine perioperative adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie. (Böhle et al. 2001) Eine radikale Zystektomie und adjuvante Chemotherapie sind somit mit erheblichen Einschränkungen, Nebenwirkungen und Risiken für den Patienten verbunden. Hieraus stellt sich die Forderung sowohl nach kausalen Therapiemöglichkeiten als auch nach spezifischen Markersystemen, um frühe Tumorstadien zu detektieren.

Solange keine kausalen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen, wäre es sinnvoll, die Patienten einer bestimmten Gruppe gemäß ihrer Prognose zuzuordnen und sie daran

orientierend einer geeigneten Therapie zuzuführen. Dies scheitert bislang daran, dass Kriterien wie Tumorstadium, Tumorgrad oder Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation die Prognose von Harnblasentumoren nicht ausreichend charakterisieren. Beispielsweise wäre es sinnvoll, aus der Gruppe der Patienten mit oberflächlichen Harnblasenkarzinomen diejenigen herauszufiltern, die zu den 10-20% mit einem progredienten Verlauf gehören, um sie einer aggressiveren Therapie zuzuführen.

Neue Erkenntnisse und Perspektiven bringt die molekularbiologische Erforschung des Harnblasenkarzinoms. Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere genetische und epigenetische Veränderungen im Harnblasenkarzinom entdeckt, die für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden können.

Neben chromosomalen Veränderungen, Veränderungen von Adhäsionsmolekülen und Angiogenesefaktoren findet man im Harnblasenkarzinom häufig Aktivierungen von Onkogenen und Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen. Viele Veränderungen betreffen die Zellzyklusregulation. Von besonderer Bedeutung sind am G1-Checkpoint die Inaktivierung des RB-Regulationssystems (RB-CyclinD1/CDK4-p16) und des p53-Kontrollsystems (p53-mdm2-p21<sup>WAF1</sup>-p14<sup>ARF</sup>). (Steinhoff 2001) Die Identifizierung von Inaktivierungen dieser Zellzyklusregulationsproteine kann somit deutliche Hinweise auf den weiteren Verlauf der Erkrankung liefern. (Knowles 2001)

Molekulargenetische Veränderungen im Harnblasenkarzinom betreffen zudem Wachstumsfaktorrezeptoren wie *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR* und ihre Regulatoren sowie Komponenten von intrazellulären Proliferationssignalwegen wie *RAS* oder Transkriptionsfaktoren wie *c-MYC*. (Raghavan 2003)

Zu den chromosomalen Veränderungen gehören Deletionen, Amplifikationen und Translokationen. Am häufigsten wurden Chromosomenaberrationen für 9p und 9q nachgewiesen. (Knowles 1999a; Knowles 1999b; Knowles 2001)

Epigenetische Veränderungen finden sich beim Harnblasenkarzinom in Form genomweiter Hypomethylierung fast durchgehend und in Form von Hypermethylierungen von verschiedenen Tumorsuppressorgenen. (Knowles 1999a; Seifert 2005)

Eine Übersicht der Veränderungen im Harnblasenkarzinom gibt die **Tabelle 1.1c** (modifiziert nach Knowles, 2001).

	Veränderung	Häufigkeit	Korrelation mit klinischem Status
Onkogene			
<i>HRAS</i> (11p)	<b>Aktivierende Mutation</b>	<b>10-15%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>FGFR3</i> (4p)	<b>Aktivierende Mutation</b>	<b>30-40%</b>	<b>Papilläre/niedrige Stadien</b>
<i>ERBB2</i> (17q)	<b>Amplifikation/Überexpression</b>	<b>10-14%</b>	<b>Höhergradig</b>
<i>CCND1</i> (11q)	<b>Amplifikation/Überexpression</b>	<b>10-20%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>MDM2</i> (12q)	<b>Amplifikation/Überexpression</b>	<b>1-4%</b>	
Suppressorgene			
<i>INK4A-ARF</i> (9p)	<b>Homozygote Deletion/ Methylierung/ Mutation</b>	<b>20-30%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>RBI</i> (13q)	<b>Deletion/ Mutation</b>	<b>10-15%</b>	<b>Höhere Stadien</b>
<i>TP53</i> (17p)	<b>Deletion/ Mutation</b>	<b>70%</b>	<b>Muskelinvasiv</b>
<i>PTEN</i> (10q)	<b>Homozygote Deletion/ Mutation</b>	<b>35%</b>	<b>Muskelinvasiv</b>
<i>PTCH</i> (9q)	<b>Deletion</b>	<b>60%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>TSCI</i> (9q)	<b>Deletion/ Mutation</b>	<b>60%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>DBCCR1</i> (9q)	<b>Deletion/ Methylierung</b>	<b>60%</b>	<b>Alle Stadien</b>
<i>DCC/SMAD</i> (18q)	<b>Deletion</b>	<b>30%</b>	<b>Höhergradig</b>
<i>MYC</i>	<b>Überexpression/ Amplifikation</b>	<b>60%</b>	<b>Alle Stadien</b>

Tab.1.1c Übersicht genetischer Veränderungen im Harnblasenkarzinom (modifiziert nach Knowles, 2001)

Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der molekularen Pathogenese von oberflächlichen und invasiven Blasentumoren. Man geht davon aus, dass sich oberflächliche Tumore von urothelialer Hyperplasie über urotheliale Atypie (G1-3) zu einem gut differenzierten papillären Tumor entwickeln. Für die invasiven Tumore ist ein Weg von urothelialer Atypie über Dysplasie und Cis bis hin zum invasiven Urothelkarzinom wahrscheinlich. Die zugrunde liegenden genetischen Veränderungen sind in den beiden Gruppen teils unterschiedlich.

Oberflächliche Tumore sind überwiegend durch den Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 9, *FGFR3*-Mutationen und Cyclin D1-Überexpression charakterisiert. (Spruck et al. 1994; Raghavan 2003).

In invasiven, undifferenzierten Tumoren findet man hingegen häufig p53-Mutationen und zusätzlich Verlust der Heterozygotie von 3p, 8p, 13q und 17p sowie Amplifikationen von 8q, 11q, 6p, 5p, 20q und 7p. (Knowles 2001) Die Funktion von p53 ist eng mit der von p21 verbunden. Die beste Prognose ergibt sich bei einer Wildtyp-Expression von p53 und p21. (Varley et al. 2005) Deletion von *RB* weist auf eine ungünstige Prognose hin, seine normale Funktion wird auch durch den p53/p21-Komplex beeinflusst. (Cote et al. 1998)

*EGFR*-Mutationen korrelieren mit p53-Expression, Aneuploidie und invasivem Zellwachstum. Zudem scheint er das Ansprechen auf Chemotherapeutika wie Cisplatin zu beeinflussen.

Überexpression von *RAS* ist mit undifferenzierten Tumoren und einer schlechteren Prognose assoziiert. (Theodorescu et al. 1990)

Um jedoch kausale, auf genterapeutischen Ansätzen basierende Therapien zu entwickeln, die die unspezifischen, mit vielen Nebenwirkungen behafteten und nur begrenzt wirksamen, zytotoxischen Chemotherapien ersetzen sollen, reicht allein die Detektion genetischer Veränderungen in einem Tumor nicht aus. Aufgrund der vielen Interaktionen der komplexen Signalkaskaden und Regulationssysteme ist es erforderlich, die Pathogenese des Harnblasenkarzinoms zu kennen und die Mechanismen, durch welche Entartung, ungehemmte Proliferation und ausbleibende Apoptose verursacht werden, genauer zu charakterisieren.

Einen Vorteil für genterapeutische Ansätze erhofft man sich von neueren Verfahren wie den Mikroarrays. Mit ihnen kann in größerem Umfang als bisher nach genetischen Veränderungen in Tumoren „gescreent“ werden. Doch stellen diese Verfahren für die Therapie eines Harnblasenkarzinoms nur dann einen Fortschritt dar, wenn eine begrenzte Anzahl von Genen identifiziert werden kann, die das biologische Verhalten des Harnblasenkarzinoms näher charakterisieren.

Beispielsweise ist, wie oben bereits erwähnt, eine Überexpression des *EGFR*-Rezeptorgens in vielen uroepithelialen Tumoren nachgewiesen worden. Eine Modulation am EGFR-Rezeptor wäre somit ein potentieller Angriffspunkt für eine spezifische Pharmako-Chemotherapie. Dies setzt jedoch die Integrität der Signalkaskaden voraus, über die der EGFR-Rezeptor proliferationsfördernde, oder -hemmende Stimuli zum Zellkern weiterleitet. Diese Signaltransduktionswege und damit mögliche unterschiedliche Funktionen des EGFR-Rezeptors sind im Harnblasenkarzinom kaum untersucht. Unklar ist deshalb, welche

Wirksamkeit und welche Nebeneffekte eine Therapie am Angriffspunkt des EGFR-Rezeptors tatsächlich hätte.

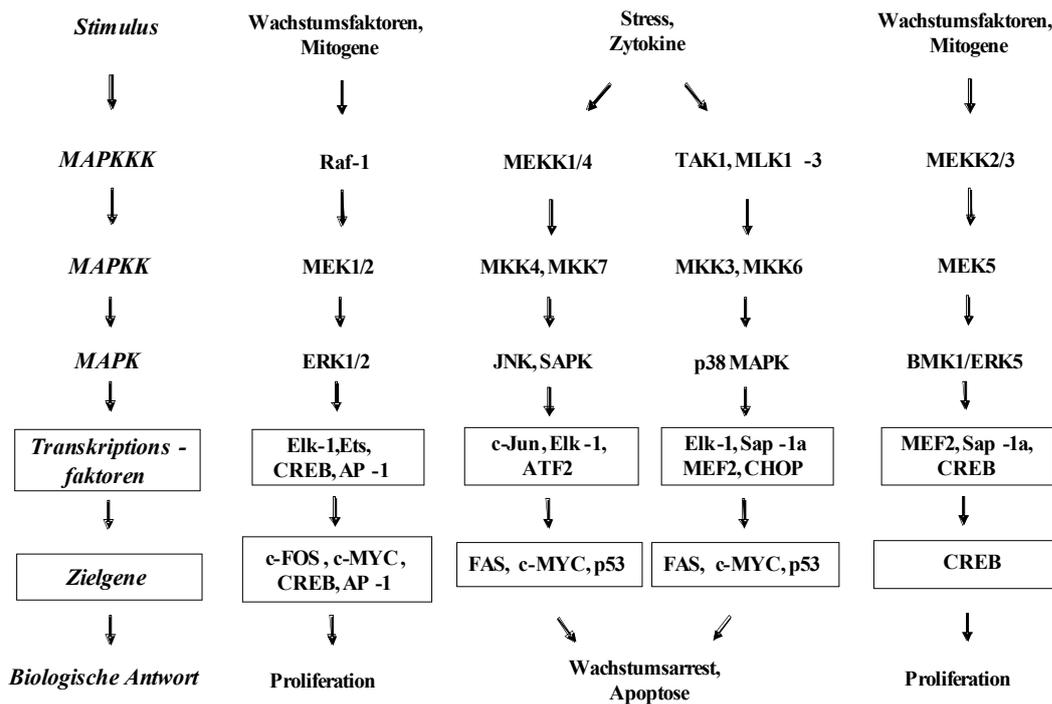
## **1.2 Signaltransduktionswege bei der Zellproliferation**

### **1.2.1 MAP-Kinase Signalwege**

Auf die Zelle wirkt eine große Anzahl unterschiedlicher externer Signale ein. Über diese werden metabolische Prozesse in der Zelle, Zellwachstum, Differenzierung und das Zellüberleben beeinflusst. Weiterleitung und Verarbeitung dieser Signale in der Zelle sind hochkomplex. Unterschiedliche Signalwege vom Rezeptor an der Zellmembran zum Zellkern koordinieren diesen Informationsfluss. Durch Interaktionen der einzelnen Signalwege („crosstalk“) existiert ein weit verzweigtes intrazelluläres Netzwerk. Dieses beinhaltet umfangreiche Kontrollmechanismen, um ein fehlerfreies Ablaufen der zellulären Prozesse zu gewährleisten. Entscheidende Mediatoren einiger Signaltransduktionswege sind Kaskaden von Proteinkinasen. Die Familie der MAPK („Mitogen-Activated Protein Kinases“ oder auch „Microtubule Associated Protein“) nimmt unter den Signaltransduktions-Systemen eine zentrale Rolle ein. **Abb. 1.2.1a**

MAP-Kinasen regulieren in Abhängigkeit von externen Stimuli nicht nur so fundamentale Prozesse wie die DNA-Synthese, Zellzyklusprogression und Zellproliferation, sondern nehmen auch Einfluss auf die Zelldifferenzierung und die Zellfunktion in der G1-Phase. (Bokemeyer et al. 1996). Sie koordinieren Signale anderer Signalwege und amplifizieren Signale.

Man findet sie sowohl in niederen Organismen wie der Hefe als auch in höheren Organismen, den Säugern, insbesondere dem Menschen. Sie sind in der Evolution hochkonserviert. (Bokemeyer et al. 1996; Puddicombe and Davies 2000) Ihre besondere Bedeutung für Proliferation und Wachstum der Zelle wird dadurch deutlich, dass Komponenten, Zielproteine und Regulatoren als Proto-Onkogene identifiziert wurden. (Franklin and McCubrey 2000)



**Abb 1.2.1a Die MAP-Kinase-Kaskaden:** Durch unterschiedliche Stimuli (Wachstumsfaktoren, Stress, Mitogene) wird die sukzessive Phosphorylierung der MAP-Kinasen (MAPKKK-MAPKK-MAPK) ausgelöst. Phosphorylierte MAPKs translozieren in den Zellkern und phosphorylieren dort abhängig vom auslösenden externen Stimulus unterschiedliche Transkriptionsfaktoren.

Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um gemischte Serin-/Threonin- und Tyrosin-Kinasen. Nach Bindung von Agonisten, wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen, Oxidantien oder Stressfaktoren, an ihre jeweiligen Rezeptoren, zumeist Zellmembranrezeptoren, werden drei MAP-Kinasen, MAPKKK-MAPKK-MAPK, in Folge aktiviert. Die Aktivierung besteht in einer doppelten Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten mit einem Thr-X-Tyr-Motiv (X steht für eine beliebige Aminosäure) in einer Aktivierungsschleife (T-loop). (Ausnahme ERK3: ser-glu-gly) (Davis 2000; Puddicombe and Davies 2000)

In der phosphorylierten Form können MAP-Kinasen entweder zytoplasmatische Signalmoleküle und Zytoskelettproteine aktivieren oder in den Zellkern translozieren, wo sie die Aktivität von nuklearen Transkriptionsfaktoren beeinflussen. (Puddicombe and Davies 2000)

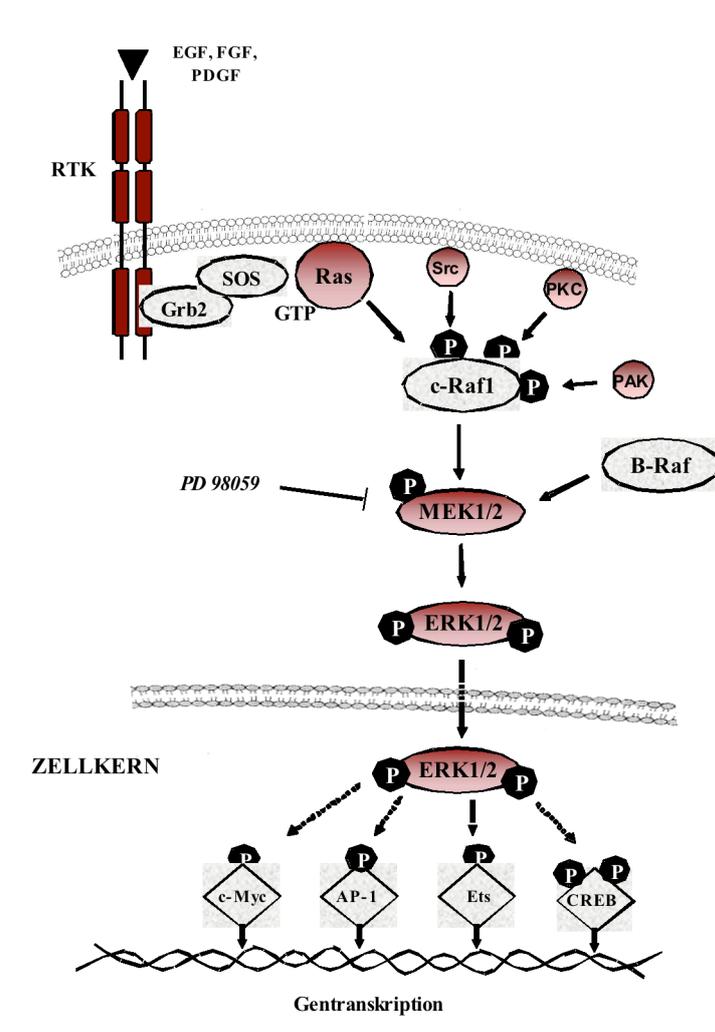
Bislang wurden sechs verschiedene MAPK-Kaskaden identifiziert, die aus jeweils unterschiedlichen MAPKKKs aufgebaut sind. (Hilger et al. 2002)

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bislang 5 verschiedene MAPK-Signalwege identifiziert. (Davis 2000). In Säugetierorganismen sind 4 Vertreter der MAPK bekannt. Dabei handelt es sich um die Wachstumsfaktor-regulierten ERKs („Extracellular signal

Regulated-Kinases“), die beiden stress-aktivierten Zytokin-regulierten JNKs („c-Jun N-terminal Kinase“), auch bekannt als SAPKs („Stress-Activated Protein Kinase“), p38-MAPK, sowie die BMK1/ERK5-vermittelte Kaskade, die große Ähnlichkeiten mit der ERK1/2-Kaskade aufweist und auch über Wachstumsfaktoren induziert wird. (Cavanaugh 2004; Hayashi and Lee 2004)

Die davon am besten charakterisierte ist die MAPK/ERK-Kaskade. **Abb. 1.2.1b**

Diese Kaskade spielt sowohl in Proliferations- wie auch Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle.



**Abb. 1.2.1b Die MAPK/ERK-Signalkaskade:** Wachstumsfaktoren binden an Rezeptortyrosinkinasen. Von dort werden die Signale über Adapterproteine (Grb2, SOS) an GTP-bindenden Proteinen (Ras) weitergeleitet, welche ihrerseits die Phosphorylierungskaskade der MAP-Kinasen MAPKKK (Raf) – MAPKK (MEK) – MAPK (ERK) auslöst. Aktiviertes ERK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert diverse Transkriptionsfaktoren.

An transmembranösen Tyrosinkinaserzeptoren binden Wachstumsfaktoren wie EGF („Epidermal Growth Factor“), PDGF („Platelet Derived Growth Factor“) oder FGF („Fibroblast Growth Factor“). Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Dimerisierung

der meist monomeren Rezeptoren, die zum einen eine Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase, zum anderen die Phosphorylierung anderer zellulärer Proteine nach sich zieht. Über Adapterproteine wie Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) und das SOS-Protein, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras-Proteine, aktiviert die Rezeptor-Tyrosinkinase das RAS-Protein und initiiert die Signalkaskade. (Wagener 1999)

Aktiviertes RAS in seiner GTP-bindenden Form bindet nun Raf-1, die erste Serin-Threonin Proteinkinase des MAPK-Signalwegs, die eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase darstellt. Raf-1 wird auf diese Weise an die Zellmembran verlagert, wo es durch Kinasen wie PAK (p21-activated kinase), Kinasen der Src-Familie oder PKC („Protein Kinase C“) aktiviert wird. (Chang et al. 2003b)

Raf-1 aktiviert seinerseits die MAP-Kinasen-Kinasen MEK1 und 2 („MAP/ERK-Kinasen“) durch Phosphorylierung zweier regulatorischer Serin-Reste. In höheren Eukaryonten sind bisher drei Raf-Gene identifiziert worden: Raf-1, A-Raf und B-Raf. Während Raf-1 ubiquitär in fast allen Gewebsarten exprimiert zu werden scheint, findet man A-Raf hauptsächlich in urogenitalem Gewebe und B-Raf in neuronalen Zellen. B-Raf unterscheidet sich zudem von den anderen beiden Raf-Genen durch eine deutliche höhere Aktivität. Während Raf-1 und A-Raf für eine volle Aktivierung sowohl Ras als auch Src benötigen, ist die B-Raf Aktivität unabhängig von Src. (Pritchard et al. 1995; Vogt 2002; Chang et al. 2003b) Obwohl B-Raf zu 78 bzw. 81% identisch mit A-Raf und Raf-1 ist, fanden sich bisher nur in B-Raf onkogene Mutationen. (Sebolt-Leopold and Herrera 2004)

Von Raf aus werden die MAP-Kinasen ERK1 und 2 durch Phosphorylierung an beiden Threonin- und Tyrosin-Resten, im Konsensuspeptid Thr-Glu-Tyr, aktiviert. ERK ist in der Lage sowohl zytoplasmatische Proteine zu phosphorylieren als auch durch Translokation in den Zellkern Transkriptionsfaktoren zu aktivieren.

Ein wichtiges Substrat von ERK ist der Transkriptionsfaktor Elk-1. Elk-1 bindet zusammen mit SRF („Serum Response Factor“) das SRE („Serum Response Element“) in der Promotorregion vieler Gene. (Bokemeyer et al. 1996). SRE vermittelt die nach wenigen Minuten nachweisbare Transkription von frühen Antwortgenen, den so genannten „immediate early response genes“. Zu diesen Genen gehören *c-FOS*, *c-MYC*, *ETS*, *CREB*, *AP-1* und *NF-κB*. Diese kodieren für Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression von Genen beeinflussen, die den Zellzyklus und das Überleben der Zelle regulieren. (Chang et al. 2003b) Direkt werden von ERK *c-JUN*, eine Komponente von *AP-1*, *ETS* und *c-MYC* phosphoryliert. Für alle Raf-aktivierten Transkriptionsfaktoren in vielen unterschiedlichen Zelltypen ist Cyclin D1 als zentrales Cyclin in der G1-Progression des Zellzyklus wichtigstes Transkriptionszielgen. (Daksis et al. 1994; Chang et al. 2003b)

*CDK1* und *CDK4* sind Zielgene von c-MYC. (Hermeking et al. 2000; Chang et al. 2003b)  
Cyclin A und E werden durch CREB, AP-1 und c-MYC aktiviert. (Chang et al. 2003b)  
*p27<sup>Kip1</sup>* wird von c-MYC herunterreguliert, *p21<sup>Cip1</sup>* durch C-MYC und Ets-1, *p16<sup>Ink4a</sup>* durch AP-1, *p15<sup>Ink4b</sup>* durch c-MYC. (Chang et al. 2003b)

Neben der Induktion von Transkriptionsfaktoren, die den Zellzyklus und damit das Zellwachstum beeinflussen, aktiviert Raf zudem Gene, die für Zytokine und Wachstumsfaktoren kodieren und ermöglicht so eine autokrine Wachstumsstimulation. (McCubrey et al. 2000; Chang et al. 2003b)

Die besondere Bedeutung dieses Signalwegs für die Zellproliferation wird von der Erkenntnis unterstrichen, dass Schlüsselregulatoren des MAP-Kinase-Signalwegs zu denjenigen Onkogenen gehören, die in menschlichen Tumoren am häufigsten mutiert sind. Ungefähr 30% aller menschlichen Tumore weisen aktivierende *RAS*-Mutationen auf. (Bokemeyer et al. 1996) (Chang et al. 2003b) Zu ihnen gehören Pankreaskarzinome, Kolorektalkarzinome, Seminome, Akute Myeloische Leukämie, Ovarialkarzinome, Gallenblasentumore, Schilddrüsenkarzinome und Bronchialkarzinome. *Raf*-Mutationen wurden unter anderem in 66% aller maligner Melanome gefunden. (Hilger et al. 2002; Kolch et al. 2002; Fang and Richardson 2005)

Die ebenfalls bei Säugern vorkommenden MAP-Kinase-Signalwege über JNK und p38 werden in nur geringem Ausmaß durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Auslöser ihrer Signalkaskaden sind intra- und extrazelluläre Stress-Stimuli wie UV-Licht, Hitzeschock, Hyperosmolarität, Entzündungs-Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  oder vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II. Diese Signale induzieren in diversen Zelltypen Apoptose. (Bokemeyer et al. 1996; Force and Bonventre 1998; Franklin and McCubrey 2000) JNK spielt außerdem eine wichtige Rolle in der embryonalen Morphogenese. Es existieren Interaktionen zwischen JNK und dem Wnt-Signalweg (s.u.) über das so genannte dishevelled-Protein.

Entsprechend dem typischen Phosphorylierungsmotiv von MAP-Kinasen weist JNK eine Thr-Pro-Tyr- und MAPK-p38 eine Thr-Gly-Tyr Phosphorylierung auf.

Es gibt drei verschiedene Isoformen der JNK-Proteine: JNK1, 2 und 3. Letzteres wird ausschließlich in Herz, Gehirn und Hoden exprimiert. (Davis 2000)

Die Aktivierung der JNKs durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 verläuft Ras-unabhängig.

Über GTPasen der Rho-Familie wie Rac1 und CDC42 wird MEKK1 aktiviert. MEKK1 war ursprünglich als Aktivator von MEK beschrieben worden, aktiviert diese aber nur in vitro oder bei Überexpression. (Bokemeyer et al. 1996) In vivo phosphoryliert es jedoch sehr selektiv die JNK-Kinasen MKK4 (SEK1) und MKK7. (Bokemeyer et al. 1996; Davis 2000)

Neben MEKK1/4 gibt es jedoch noch eine Vielzahl anderer MAPKKK-Proteine, wie TAK1,

TPL2, „mixed-lineage protein kinases MLK1-3 oder ASK1/2, die zelltypspezifisch exprimiert sind. Von Zytokinen ausgehend werden die JNKs hauptsächlich über MKK7 aktiviert. Umwelt-Stressfaktoren wie osmotischer Stress oder Strahlung aktivieren im Unterschied dazu Rho-unabhängig primär MKK4 (Bokemeyer et al. 1996; Davis 2000) Neben der klassischen Aktivierung durch Stress-Stimuli können die JNKs auch durch Wachstumsfaktoren wie EGF aktiviert werden. Diese Aktivierung ist im Gegensatz zur Ras-unabhängigen durch Stressfaktoren Ras-abhängig. Wachstumsfaktoren aktivieren JNKs aber in geringerem Ausmaß als ERKs.

JNK-Kinasen findet man im Unterschied zum Pendant der ERK-Kaskade, den MEKs, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, so dass man davon ausgehen kann, dass die JNK-Aktivierung außerhalb wie innerhalb des Zellkerns stattfinden kann.

Aktivierte JNK-Kinasen phosphorylieren den Transkriptionsfaktor *c-JUN*, das Protoonkogen des retroviralen *v-Jun*-Onkogens. (Wagener 1999) Jun ist Komponente von AP-1, dem Activator protein-1. (Vogt 2002) Andere Zielgene der JNKs sind *ELK-1*, *SAP-1a*, *ATF2* (Activating Transcription Factor-2). (Bokemeyer et al. 1996; Puddicombe and Davies 2000) und NFκB. Über sie werden entzündliche Reaktionen in der Zelle und Apoptose ausgelöst. Potentielle Zielgene von JNK in Apoptose-Signalwegen sind das *FAS*-Gen, p53 und *c-MYC*. Das *FAS*-Gen wird mit autokrinem und parakrinem Zelltod in Verbindung gebracht. (Faris et al. 1998; Kasibhatla et al. 1998) p53 wird von JNKs reguliert, aber nicht essentiell in seiner Apoptosefunktion beeinflusst. C-MYC ist zwar nicht notwendig für JNK-induzierte Apoptose, aber es zeigte sich, dass hohe *c-MYC* Expression eine erhöhte JNK-Aktivität zur Folge hat. Bei letzteren beiden scheinen also die JNK-Signale regulatorische Funktionen zu haben, nicht aber für die über sie induzierte Apoptose essentiell zu sein. (Davis 2000)

Eine wichtige Rolle scheinen JNKs in der Tumorentwicklung zu spielen: RAS-induzierte Transformation erfordert *c-Jun*, Tumorentstehung über RAS ist supprimiert durch *c-JUN* Mutationen an der Bindungsstelle für JNK, in vielen Tumorzelllinien ist *JNK* konstitutiv aktiv und Mediatoren der JNK wurden als potentielle TU-Suppressorgene (*MKK4*) identifiziert.

Von p38 sind bisher 4 Isoformen ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) bekannt. (Lewis et al. 1998) Der MAPK-p38 Signalweg wird ebenfalls über Zytokine und andere Stressfaktoren aktiviert und hat mit den JNKs viele gemeinsame Mediatoren. P38 ist eingebunden in stress-induzierten G1-Arrest (Force and Bonventre 1998) und kann wie auch die JNKs Apoptose induzieren. (Puddicombe and Davies 2000)

Das apoptotische Potential der beiden stress-induzierten MAPK-Signalwege scheint jedoch vom Aktivierungsgrad der ERKs abzuhängen. Das Verhältnis zwischen anti-apoptotischen, proliferativen Signalen der ERKs und apoptotischen Signalen von SAPK und p38 bestimmt

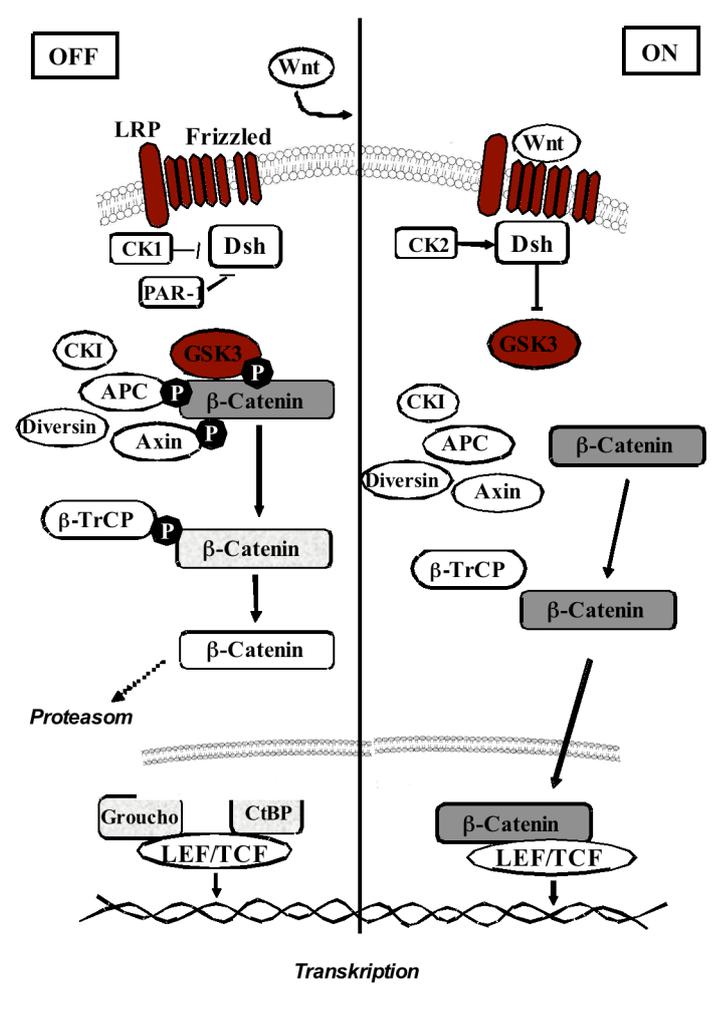
den weiteren Weg, den die Zelle nimmt. Typische Auslöser einer MAP-Kinase-Aktivierung sind in Form von Überexpression von den Wachstumsfaktoren *EGF* und *FGF* und Wachstumsfaktorrezeptoren *ERBB2* und *EGFR* oder Mutationen von *HA-RAS* und *FGFR3* im Harnblasenkarzinom alteriert. Doch erstaunlicherweise sind selbst die MAPK-Signaltransduktionswege im Harnblasenkarzinom kaum untersucht, obwohl aufgrund der genannten molekulargenetischen Veränderungen das Tumorstadium des Urothelkarzinoms über sie vermittelt werden könnte.

### 1.2.2 Der Wnt-Signalweg

Die Wnt-Proteine sind eine Gruppe von extrazellulären Wachstumsfaktoren, die über mehrere intrazelluläre Signalkaskaden in diversen Entwicklungsprozessen Zellproliferation, Zelluntergang, Adhäsion, Zellpolarität und Zellmigration regulieren. Ursprünglich wurde der Wnt-Signalweg vor allem im Zusammenhang mit der Embryogenese von Vertebraten und Nicht-Vertebraten genauer untersucht. Wnt spielt eine Rolle bei der embryonalen Segmentierung, der Darmgestaltung, der Entwicklung des Nervensystems, der Bildung und Gestaltung der Anhangsgebilde sowie der Stammzellproliferation. (Moon et al. 2002) Mit der Entdeckung aktivierender Mutationen dieses Signalweges in einigen menschlichen Tumoren, insbesondere in gastrointestinalen Tumoren, begann die Erforschung der Beziehung zwischen Wnt-Signalweg und Onkogenese.

Es gibt drei Wege der Wnt-vermittelten Signalübertragung. Neben dem klassischen, dem „kanonischen“ Wnt-Signalweg, gibt es den „Planar cell polarity pathway“, der über RhoA und Jun Kinasen die Organisation des Zytoskeletts kontrolliert und auch Aufgaben in der Embryonalentwicklung hat. Bisher wurde kein Anhalt für dessen Rolle in der Tumorentstehung gefunden. Der dritte Signalweg, der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg, wird durch die Faktoren WNT-5a und WNT-11 stimuliert und geht mit Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Signalkomponenten einher. Er scheint mit dem kanonischen Wnt-Signalweg zu interagieren und diesen unter bestimmten Bedingungen zu hemmen. Er fördert offenbar stärker die Zelldifferenzierung.

Das Hauptaugenmerk liegt im Folgenden auf dem kanonischen Wnt-Signalweg, dessen Dreh- und Angelpunkt  $\beta$ -Catenin ist. **Abb.1.2.2**



**Abb. 1.2.2** Der kanonische Wnt-Signalweg: In Abwesenheit von Wnt-Faktoren destabilisiert der Komplex aus GSK3, Axin und APC durch Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin. Dieses wird über erneute Phosphorylierung von  $\beta$ TrCP in den Proteasomen abgebaut. In Anwesenheit von Wnt-Faktoren hemmt Dishvelled (Dsh) die GSK3 und verhindert so den Abbauprozess des  $\beta$ -Catenins durch den Komplex aus GSK3, APC und Axin. Das stabilisierte  $\beta$ -Catenin kann so in den Zellkern translozieren und TCF-Transkriptionsfaktoren aktivieren. Inaktive TCF-Faktoren reprimieren mit Co-Repressoren (Groucho, CtBP) die Transkription.

Durch Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin aktiviert der Wnt-Signalweg seine Zielgene, zu denen Regulatoren der Zellproliferation, Kontrollgene in der Entwicklung und Gene mit Einfluss auf Tumorprogression gehören. Darüber hinaus hat  $\beta$ -Catenin noch eine wichtige Funktion in der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion. (Miller et al. 1999; Satoh et al. 2000)

Wnts sind sekretorische Glykoproteine, die von verschiedenen Zellen produziert werden. (Cadigan and Nusse 1997) WNT-1, WNT-3a und WNT-8 sind typische Aktivatoren des klassischen Signalwegs. Sie binden an Transmembran-Rezeptoren, die zu zwei verschiedenen Rezeptorfamilien gehören: der Frizzled-Gene-Familie und der LRP (LDL-Rezeptor-Related-Protein)-Familie. Beim Menschen wurden bisher 10 Frizzled-Rezeptoren identifiziert. Der Frizzled-Rezeptor enthält sieben transmembranöse Domänen und möglicherweise über heterotrimere G-Proteine die Wnt-Signale weiterzuleiten. (Liu et al. 2001) Zwei Mitglieder

der LRP-Familie LRP-5 und LRP-6 binden Wnt und bilden mit Frizzled und Wnt einen Komplex. Für die Signalweiterleitung sind LRPs daher essentiell. (Tamai et al. 2000; Wehrli et al. 2000) Wnt-Signale werden durch verschiedene andere sekretorische Proteine antagonisiert, wie zum Beispiel durch FrzB (frizzled related Proteins), WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor-1) und Cerberus in *Xenopus*. (Miller 2002) Einen anderen inhibitorischen Effekt übt Dkk (Dickkopf) auf den Signalweg aus. Er blockiert den LRP-Co-Rezeptor für Wnt.

Down-stream vom Frizzled-Rezeptor liegt im Wnt-Signalweg als positiver Mediator Dsh (Dishevelled). Auf welche Weise er zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beiträgt ist jedoch unklar. Er hat außerdem eine weitere Funktion in der Aktivierung von Jun-Kinasen. (Polakis 2000) Drei Kinasen sind bekannt, die mit Dishevelled assoziiert sind: CK1 (Casein Kinase 1), welche inhibitorische Effekte auf den Wnt-Signalweg ausübt (Lustig and Behrens 2003), die aktivierende CK2 (Willert et al. 1997; Lustig and Behrens 2003) und PAR-1, welche im kanonischen Signalweg stimulierend, im JNK assoziierten inhibierend wirkt (Lustig and Behrens 2003). Intrazellulär führen Wnt-Signale zur Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma.

In Abwesenheit von Wnt-Signalen wird  $\beta$ -Catenin schnell durch Proteasen abgebaut. GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) ist der wichtigste Negativ-Regulator (Miller et al. 1999; Polakis 2000) des  $\beta$ -Catenins. GSK3 $\beta$  phosphoryliert  $\beta$ -Catenin an Serin- und Threoninresten. Dadurch kann  $\beta$ -Catenin von der Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -TrCP/Slimb erkannt und dem Abbau in den Proteasomen zugeführt werden. Die Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins durch die GSK3 $\beta$  kann jedoch nur in einem Multiproteinkomplex, bestehend aus den Gerüstproteinen Axin und/oder Conduktin, dem Tumorsuppressorgen APC, dem Diversin, CK-1 $\alpha/\epsilon$  und der GSK3 $\beta$  selbst, erfolgen. In einem ersten Schritt wird  $\beta$ -Catenin durch die Casein-Kinase 1 (CK-1 $\alpha/\epsilon$ ) an einem Serinrest phosphoryliert. Diversin dient dabei als Bindeglied. Erst im nächsten Schritt erfolgt die Phosphorylierung durch die GSK3 $\beta$ , die erst durch die Brückenfunktion des Axins ermöglicht wird. APC übernimmt in diesem Multiproteinkomplex eine ähnliche Funktion wie das Axin und erleichtert die GSK3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins und stimuliert den darauffolgenden Abbau. (Miller et al. 1999);(Lustig and Behrens 2003; Gregorieff and Clevers 2005)

Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten in diesem Komplex gewährleistet einen niedrigen Steady-State des  $\beta$ -Catenin-Spiegels in der Zelle in Abwesenheit von Wnt-Faktoren.

Wird der Wnt-Signalweg jedoch aktiviert, transloziert  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und bildet mit Transkriptionsfaktoren der LEF (Lymphoid Enhancer Factor-1)/TCF (T-Cell-Factor)-

Familie Komplexe. TCF/LEF binden direkt an der DNA, können selbst jedoch keine Transkription auslösen. Dazu brauchen sie Co-Aktivatoren wie das  $\beta$ -Catenin. (Eastman and Grosschedl 1999; Polakis 2000) Als Komplex stimulieren sie die Transkription entsprechender Zielgene. In Abwesenheit von Wnt-Signalen agiert TCF im Zusammenspiel mit Co-Repressoren als Transkriptionsrepressor. Beispiele für Co-Repressoren sind Groucho und CtBP. (Roose and Clevers 1999)

Eine beträchtliche Anzahl von Zielgenen des Wnt-Signalwegs spielen eine Rolle in der Entwicklung und Tumorentstehung. Viele dieser Gene sind direkte Targets, das heißt, ihre Promotoren enthalten TCF-Bindungsstellen und werden durch TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplexe heraufreguliert. Die ersten Zielgene, welche identifiziert wurden, waren das Protoonkogen *c-MYC* und Cyclin D1, ein Aktivator Cyclin-abhängiger Kinasen. (Shtutman et al. 1999; Tetsu and McCormick 1999) Durch Stimulation der Gene kommt es zur Progression durch den Zellzyklus. *c-MYC* inhibiert  $p21^{CIP}$ , welches die Aktivität verschiedener CDKs blockieren kann. Cyclin D1 stimuliert die Aktivität der CDKs und fördert so die Zellzyklusprogression. Neben diesen beiden bedeutenden Zielgenen von Wnt gibt es noch viele weitere, die als Zielgene von Wnt ebenfalls in der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Zu ihnen gehören unter anderem die Protoonkogene *c-JUN* und *FRA-1* sowie das anti-apoptotische Survivin, die Wachstumsfaktorgene *VEGF* (Vasculat Endothelial Growth Factor) und *WISP-1* (Wnt-1-Induced-Secreted-Protein), Connexine, Gene der Zell-Zell-Kommunikation oder die Rezeptor-Tyrosin-Kinase *c-MET*. (Miller et al. 1999; Lustig and Behrens 2003)

Bisher wurden drei Komponenten des Wnt-Signalwegs identifiziert, die in menschlichen Tumoren mutiert und über die Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins zur Aktivierung der Genexpression führen. In einer Vielzahl menschlicher Tumoren wurde  $\beta$ -Catenin als Onkogen identifiziert. Mutationen finden sich in hepatozellulären Karzinomen, in kolorektalen Karzinomen, Wilms Tumor, Desmoid, Hepatoblastom, Endometrium-Karzinom und einigen anderen. (Polakis 2000)

Ebenso sind APC und Axin von Mutationen betroffen. Sie übernehmen die Funktion von Tumorsuppressorgenen. Das *APC*-Gen wurde in Form von Keimbahnmutationen, bei der genetischen Analyse von FAP-Familien identifiziert. (Grodin et al. 1991; Kinzler and Vogelstein 1996; Lustig and Behrens 2003). Mutationen und Deletionen beider Allele findet man in kolorektalen Tumoren von FAP-Patienten und in über 70% aller spontanen kolorektalen Karzinome. Weiter wurden *APC*-Mutationen in Magen-, Pankreas- und hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen. (Nakamura 1997; Wagener 1999) Neben seiner Funktion im Wnt-Signalweg ist APC mit Mikrotubuli und den Zentrosomen assoziiert. Die

Lokalisation von APC im Bereich der Mitose-Spindeln und Kinetochoren macht dort eine Kontrollfunktion wahrscheinlich. Die genaue Funktion ist jedoch noch unklar. (Bienz 2001)

Für Axin wurde eine Inaktivierung beider Allele in Hepatozellulären Karzinomen und hepatozellulären Zelllinien gefunden. (Sato et al. 2000; Taniguchi et al. 2002; Lustig and Behrens 2003) Eine  $\beta$ TrCP-Mutation wurden im Prostatakarzinom beobachtet.

Welche Rolle der Wnt-Signalweg in der Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms spielt, ist noch weitgehend unklar. Zu den wenigen Erkenntnissen gehören *WNT-7b*-Expressionsunterschiede zwischen normalem Urothelgewebe, oberflächlichen und invasiven Harnblasentumoren (Bui et al. 1998). Ein re-transformierender Effekt von *WNT-5a* bei der Überexpression wurde in einer Urothelkarzinomzelllinie gefunden.

### 1.2.3 Der JAK/STAT-Signalweg

Der JAK/STAT (Janus kinase/signal transductor and activators of transcription)-Signalweg ist eine Signalkaskade, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Homöostase von Zellen niederer und höherer Organismen, wie auch dem Menschen spielt. In Säugetieren aktivieren eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren diesen Signalweg. Nach Rezeptoraktivierung wird die Phosphorylierung von STATs induziert, welche in den Zellkern translozieren und dort Gene der Zellproliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose regulieren.

Ursprünglich wurden die STATs in Zytokin-vermittelten Signalwegen in hämatopoetischen Zellen entdeckt, welche in entzündlichen und immunologischen Prozessen wichtige regulatorische Funktionen haben. Der erste identifizierte Rezeptor, der diesen Weg aktiviert, war der Interferon-Rezeptor. (Darnell 1997; Silva 2004) Darauf folgend wurden Zytokinrezeptoren von Prolaktin, Wachstumshormonen und Erythropoetin sowie diverse Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen als Ausgangspunkt von STAT-Aktivierung ausgemacht. Diese beiden Gruppen ergeben die typische Aktivierung der STATs. Daneben gibt es noch eine weitere JAK-unabhängige Aktivierungsmöglichkeit über Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Mitgliedern der SFK („Src Family Kinases“). Aufgrund der onkogenen Aktivität von beispielsweise v-Src führt diese STAT-Aktivierung (hier von STAT3) zur Transformation von Zellen. (Silva 2004)

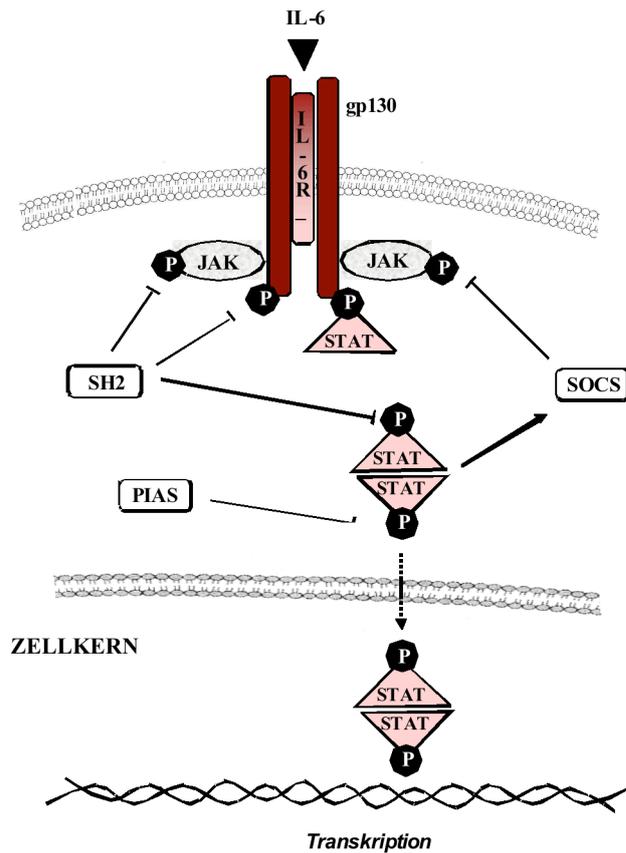
Es wurden bisher 7 verschiedene STAT-Proteine entdeckt. Die STAT-Faktoren 2, 4 und 6 werden relativ spezifisch über eine kleine Anzahl von Zytokinen (Interferon  $\alpha$ , IL-6, IL-12 und IL-13) aktiviert. Die STAT-Faktoren 1, 3, 5a und 5b hingegen werden sowohl durch

Zytokine, und Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF, Insulin, IGF-1 als auch durch einige an G-Proteine gekoppelte Rezeptoragonisten aktiviert. (Silva 2004)

Die Subtypen der STAT-Proteine übernehmen je nach aktivierenden Liganden und Zelltyp unterschiedliche Aufgaben auf zellulärer Ebene. Sie spielen eine wichtige Rolle in Prozessen wie der Hämatopoese, der Entwicklung immunologischer und entzündlicher Vorgänge, der Brustdrüsenentwicklung, der geschlechtlichen Entwicklung, Laktation oder Lipogenese. (Rawlings et al. 2004) Besonders gut untersucht ist ihre Funktion in hämatopoetischen Zellen. Dort wie aber auch in anderen Zellarten sind Veränderungen dieser Signalkaskaden assoziiert mit Entartung, erhöhter Zellproliferation und anderen die Tumorgenese begünstigenden Mechanismen. In der Entstehung sowohl akuter als auch chronischer Leukämien scheint beispielsweise die konstitutive Aktivierung von STAT-3, STAT-5a und STAT-5b eine entscheidene Rolle zu spielen. (Silva 2004) Dieselben STAT-Faktoren werden mit der Genese einer Vielzahl solider Tumoren wie dem Prostata-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Mamma-Karzinom und Kopf- und Halstumoren in Verbindung gebracht.

Die JAK/STAT vermittelte Signaltransduktion geschieht nach einem recht übersichtlichen Prinzip. **Abb. 1.2.3** Extrazelluläre Signalpeptide wie Zytokine und Wachstumsfaktoren binden an transmembranösen Signaltransduktionsrezeptoren und bewirken dort eine Dimerisierung und damit Aktivierung des Rezeptors. Zum Teil binden die Zytokine zusätzlich an  $\alpha$ -Rezeptoren (IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$  und CNTFR $\alpha$ ), die nicht direkt an der zellulären Signalweitergabe beteiligt sind, sondern als Signalverstärker fungieren. Einige Signaltransduktionsrezeptoren können sogar erst durch die Aktivierung der  $\alpha$ -Rezeptoren aktiviert werden.

Die klassischen Rezeptoren des JAK/STAT-Signalwegs sind die Zytokinrezeptoren wie gp130, LIFR und OSMR, welche je nach Ligand Homodimere und Heterodimere bilden. Sie besitzen im Gegensatz zu den Wachstumsfaktorrezeptoren keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität. Diese wird von rezeptorassoziierten, „Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase“ der Janus-Familie JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Heinrich et al. 2003) bereitgestellt. JAK1, JAK2 und TYK2 werden ubiquitär exprimiert, JAK3 findet man hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen. (Heinrich et al. 1998) Nach Bindung an den Rezeptoren induzieren die JAKs sowohl eine Autophosphorylierung als auch eine Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptordomänen. An den Rezeptoren entstehen nun Bindungsstellen für die STAT-Faktoren. (Aaronson and Horvath 2002) Neben ihrer Funktion in der Signalkaskade regulieren die JAKs zudem die Expression einiger Zytokinrezeptoren an der Zelloberfläche.



**Abb. 1.2.3** Der JAK/STAT-Signalweg: Zytokine wie IL-6 induzieren die Dimerisation des Rezeptors. Dadurch werden die JAKs aktiviert, die wiederum den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors phosphorylieren. STAT-Faktoren docken am Rezeptor an und werden ebenfalls durch JAKs aktiviert. Sie translokieren in den Zellkern und induzieren die Expression entsprechender Zielgene (Cyclin D1, c-Myc, p21<sup>WAF</sup>, Bcl-x).

Die JAKs induzieren nun eine transiente Assoziation der STAT-Faktoren mit den aktivierten Rezeptoren. Nach Bindung zwischen der SH2-Domäne der STATs und den Phosphotyrosinresten der Rezeptoren werden die STAT-Faktoren durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert und bilden aktive STAT-Dimere. (Heinrich et al. 2003)

In Säugetierorganismen sind wie schon erwähnt sieben verschiedene STAT-Faktoren bekannt: STAT-1,-2,-3,-4,-5a,-5b und -6. Sie bestehen aus einer Oligomerisationsdomäne, der DNA-Bindungsdomäne, der Linker-Domäne, der SH2 (Src Homology 2) -Domäne und der Transaktivierungsdomäne.

Nach Aktivierung translokieren die STATs über einen Importin- $\alpha$ -5 abhängigen Mechanismus in den Zellkern und akkumulieren dort. Im Zellkern aktivieren sie Zielgene, welche unter anderem direkte Verbindung zur Zellzyklusregulation besitzen und proliferative Effekte auf die Zelle ausüben.

Neben Zielgenen wie Akute-Phase-Proteinen, C-reaktivem Protein,  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, Lipopolysaccharid-bindende Proteine oder *IRF-1* (Interferon-Regulator-Faktor-1) wurden auch Zellzyklusregulationsgene identifiziert, die somit potentiell für Tumorwachstum und – progression verantwortlich sind. Hierzu gehören *Cyclin D1*, *c-MYC*, *bcl<sub>xL</sub>* und *p53*, die Protoonkogene *PIM-1* und *PIM-2* sowie Transkriptionsfaktoren wie *c-JUN* und *c-FOS*.

STAT-1 induziert über Induktion von p21<sup>CIP1</sup> und Caspasen Apoptose und Zellzyklusarrest. (Coletta et al. 2004) (Bromberg and Darnell 2000)

Konstitutive STAT-3/-5-Aktivierung fördert über Induktion von *bcl<sub>xL</sub>*-Genen und anderen antiapoptotischen Regulatoren die Tumorprogression in verschiedenen Zelllinien und Tumoren. (Bowman et al. 2000; Bromberg and Darnell 2000)

STAT-5 reguliert die Expression von *Cyclin D1* und *c-MYC* und wird mit der Tumorprogression von Mamma-Karzinomen in Verbindung gebracht. (Hirano et al. 2000)

STAT-3 ist essentiell für Induktion der Cycline D2, D3, A und *CDC25A* sowie der damit einhergehenden Verminderung von p21 und p27. (Hirano et al. 2000) EGFR/ c-Src induzieren über STAT-3 und Stat5a/b die Tumorprogression im Mammakarzinom (Clevenger 2004; Silva 2004).

Ebenso wurden Negativregulatoren des JAK/STAT-Signalwegs identifiziert. Man unterscheidet drei Hauptklassen von Negativregulatoren: SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs) und PTPs (Protein-Tyrosin-Phosphatasen).

PTPs, zu denen die bereits erwähnten SHP2-Proteine gehören, findet man sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Durch Bindung oder Interaktion mit den Rezeptoren und Adapterproteinen wird die Phosphatase enzymatisch aktiv. (Heinrich et al. 2003) Potentielle Substrate sind der Rezeptor selbst aber auch die JAKs und STATs sowohl in ihrer inaktiven wie auch in ihrer bereits phosphorylierten Form. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Phosphatase eine verstärkte Signalübertragung des JAK/STAT-Wegs zur Folge hat. (Aaronson and Horvath 2002; Heinrich et al. 2003)

PIAS binden phosphorylierte STAT-Dimere und verhindern über einen noch ungeklärten Mechanismus die DNA-Erkennung.

SOCS-Proteine sind klassische Feedback-Inhibitoren. Nach Stimulation durch aktivierte STATs binden SOCS phosphorylierte JAKs und unterbrechen so die Signalübertragung des JAK/STAT-Signalwegs.

Aufgrund vieler Interaktionen mit anderen Signalwegen ist trotz der Übersichtlichkeit der Hauptkomponenten der Wirkungsradius des JAK/STAT-Signalwegs sehr komplex. Die am

besten untersuchte Interaktion ist die mit dem MAPK-Signalweg. Hierbei existiert „cross-talk“ auf verschiedenen Ebenen. Aktivierung von RTKs (Rezeptor Tyrosin Kinasen) durch EGFR oder PDGFR induziert JAK-abhängige STAT-Phosphorylierung. MAPKs phosphorylieren spezifisch STAT-Faktoren und führen zu einer stark erhöhten Transkriptionsrate ihrer Zielgene. Umgekehrt wird die Ras-abhängige Kaskade durch Elemente des JAK/STAT-Wegs stimuliert, zum einen über Interaktion von aktivierten JAKs mit Adapterproteinen der RTKs, zum anderen durch den inhibierenden Einfluss von SOCS auf einen Negativregulator von Ras. (Heinrich et al. 2003; Rawlings et al. 2004)

Ein anderer Interaktionspartner ist der TGF- $\beta$ -Signalweg. (Rawlings et al. 2004)

Zudem liegen viele genetische Bindungsstellen für STAT-Faktoren oft in unmittelbarer Nähe von Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF $\kappa$ B, so dass auch hier von Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren ausgegangen werden muss.

Die vielfältigen Interaktionen insbesondere mit anderen Signaltransduktionswegen sowie Genen der Zellproliferation, Zellzyklusregulation und Apoptose und die Beobachtung von erhöhter Aktivität einzelner Komponenten des JAK/STAT-Signalwegs in Zelllinien und Tumoren unterstreichen die Bedeutung für die Onkogenese.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Die Genese und Proliferation eines Tumors lässt sich nicht auf isolierte genetische Veränderungen zurückführen, sondern basiert auf einem komplexen Zusammenwirken diverser genetischer Veränderungen. Es ist somit illusorisch, für eine Tumorerkrankung „das“ kausal wirkende Medikament zu finden, welches das Tumorwachstum hemmt. Jedoch steht das Vorhandensein multipler genetischer und epigenetischer Veränderungen eines Tumors der Suche nach therapeutischen „Targets“ nicht völlig entgegen. Es zeigt sich nämlich, dass letztendlich eine kleinere Anzahl molekulargenetischer Veränderungen für die Tumorgenese und speziell die Tumorzellproliferation essentiell ist und damit mögliche Angriffspunkte für eine molekular orientierte Therapie wieder übersichtlicher werden.

In Zeiten, wo mit Mikroarrays oder im Rahmen des „Human Genom Project“ breit und unselektiv nach potentiellen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen als Kandidaten für molekulartherapeutische Ansätze „gescreent“ wird, bedarf es daher genauer funktioneller Untersuchungen der betroffenen Gene und Proteine, die mit der Tumorphiliferation in Zusammenhang stehen sollen. Für kausale Therapieansätze ist es notwendig, relevante von irrelevanten genetischen Veränderungen unterscheiden zu können.

Als zwei wichtige Gruppen von genetischen Veränderungen bei der Tumorgenese kann man vereinfachend diejenigen betrachten, die auf der einen Seite eine Deregulation der Proliferation auf der anderen Seite eine Inhibition der Apoptose nach sich ziehen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit möglichen deregulatorischen Effekten auf die Zellproliferation. Dabei kann man wiederum vereinfachend zwei Klassen von Mutationen unterscheiden, die für die Tumorphiliferation essentiell sind. Die erste Klasse betrifft die autonome Produktion von mitogenen Signalen oder die übersteigerte Reaktion auf externe Signale. Zu dieser gehören beispielsweise Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein-Signaltransduktoren wie RAS. In jedem Fall resultiert hieraus eine übersteigerte Aktivität von Signaltransduktionswegen, welche diese Signale in der Zelle vermitteln, z.B. von MAPK, Wnt- oder STAT-Signalwegen.

Die zweite Klasse von Mutationen betrifft Zellzyklusgene insbesondere am späten G1-Zellzyklus-Kontrollpunkt, der durch pRB reguliert wird. Dabei ist entweder das Gen *RBI* selbst verändert oder die *CDKs*, die den Aktivierungszustand von RB kontrollieren. (Evan and Vousden 2001)

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Deregulation der Zellproliferation in Harnblasenkarzinom-Zelllinien durch Veränderungen der Signaltransduktion ausgelöst wird.

Signaltransduktionswege sind die Verbindung zwischen extrazellulären Einflüssen und der Regulation im Zellkern. In gesunden Zellen garantieren enge Kontrollmechanismen die fehlerfreie Signalweitergabe und das richtige Ansprechen der Zelle auf die externen Signale. In Tumoren sind verschiedene Komponenten von Signaltransduktionswegen mutiert und ziehen eine konstitutive Aktivierung nach sich. Bekanntes Beispiel ist RAS, welches in 30% aller menschlichen Tumore mutiert ist.

Inhibitoren von Signaltransduktionskomponenten bieten sich durch gezielte Angriffspunkte in der Tumorthherapie als effiziente Alternative zu herkömmlichen, mit vielen Nebenwirkungen behafteten Tumorthérapien an. (Heinrich et al. 2003) Inhibitoren von RTKs, RAS und MAPKs befinden sich bereits im Stadium klinischer Forschung. (Evan and Vousden 2001; Hilger et al. 2002) Voraussetzung für ihren Wirkungserfolg sind jedoch die Integrität und Aktivität der Signalwege sowie die Sensitivität der Zelle gegenüber externen Modulatoren.

Man ging bisher allgemein davon aus, dass Signaltransduktionswege wie der ubiquitäre MAPK-Signalweg in der Proliferation von Übergangszellkarzinomen der Harnblase eine entscheidende Rolle spielen. Beispielsweise nimmt man an, dass die Überexpressionen vom *EGFR* und *ERBB2*-Rezeptor und *RAS*-Mutationen in urothelialen Tumoren eine konstitutive MAPK-Aktivierung nach sich ziehen. Diese aus einer *EGFR*-Überexpression resultierende MAPK-Aktivierung wird beispielsweise gehäuft in Kopf-Hals-Tumoren beobachtet. (Lango et al. 2001) Direkte experimentelle Belege für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs in Harnblasenkarzinomen lagen jedoch bisher nicht vor.

Speziell findet man in papillären Harnblasentumoren aktivierende Mutationen von *FGFR3* (Cappellen et al. 1999; Sibley et al. 2001a; Sibley et al. 2001b). FGFR initiiert unter physiologischen Bedingungen MAPK- und STAT-abhängige Signalkaskaden. Betrachtet man die Zielgene dieser Signalwege in Übergangszellkarzinomen der Harnblase, so findet man auch hier onkogene Veränderungen. Frühe Tumorstadien gehen beispielsweise mit einer *Cyclin D1*-Überexpression, fortgeschrittene Tumoren mit einem pRB und p16<sup>INK4A</sup> Verlust einher. Es wird daher angenommen, dass die verbindenden wachstumsproliferativen Signaltransduktionswege zwischen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren im Harnblasenkarzinom ebenfalls aktiv sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher drei Signalkaskaden, die der MAP-Kinasen, der STAT-Faktoren und der WNT-Proteine in Harnblasenkarzinomzelllinien und vergleichend in gesunden uroepithelialen Zellen untersucht. Obwohl sie in der Genese anderer Tumoren eine entscheidende Rolle spielen, ist ihre Bedeutung für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms nicht hinreichend geklärt. Von ihrer Relevanz für die Genese des Harnblasenkarzinoms hängt

jedoch ab, inwieweit neuere molekulartherapeutische Ansätze für die Therapie des Harnblasenkarzinoms sinnvoll sind.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Teile:

1) Im Modell von Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen wurde zunächst die Aktivität der MAP-Kinasen sowie ihre Induzierbarkeit durch spezifische Induktoren untersucht. Dazu diente

a) das Reporterluziferasesystem, mit dem die Aktivität spezifischer MAPK-abhängiger Promotoren bestimmt wurde und

b) die Westernblotanalyse, in der durch spezifische MAPK-Antikörper ein direkter Proteinnachweis aktivierter und inaktiver MAPKs durchgeführt wurde.

Darüber hinaus wurde

c) der Einfluss externer Stimuli auf die Promotoraktivität und

d) der Effekt spezifischer Inhibitoren der MAPKs untersucht.

Nach ausführlicher Analyse des MAPK-Signaltransduktionswegs wurden exemplarisch zwei weitere Signaltransduktionswege im Modell von Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen mittels Reporterassay untersucht. Dabei wurde

2) die STAT-Aktivität sowie ihre Induzierbarkeit durch spezifische Agonisten und

3) die Aktivität von Wnt-Faktoren ebenfalls mit einem spezifischen Induktor näher betrachtet.

## 2. MATERIAL

### 2.1 Etablierte Zelllinien

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VmCub1, VmCub2, HT1376, 5637, SW1710 und SD stammten von Dr .J. Fogh, Sloan-Kettering Institute, Rye, NY, USA und wurden aus soliden fortgeschrittenen Harnblasentumoren etabliert. Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft. Die Zelllinie BFTC905 wurde von der DSMZ bezogen. Sie wurde aus einem gut differenzierten papillären Harnblasentumor etabliert. (Cheng et al. 1995)

	Ursprung	p21	Rb	p16 <sup>INK4A</sup>	c-myc	p53 Mutation	Hypo-Meth.
VmCub1	TCC	+	+	mutant	++	mutant Exon 5	mittel
VmCub2	TCC	+	+	deleted	+	mutant Exon 5	schwach
5637	TCC	+	-	+	+	mutant Exon 8	schwach
HT1376	TCC	Mutation	-	+	+	mutant Exon 7	stark
SW1710	TCC	+	+	deleted	n.d.	mutant Exon 8	schwach
SD	TCC	+	+	deleted	n.d.	mutant Exon 4	mittel
BFTC905	TCC	+	+	deleted		wild-type (MDM2 ↑ ↑)	
HepG2	HCC	+					
T47D	<b>Duktales Mamma-Ca, Expression von <i>WNT-7b</i>-Onkogen</b>						
BT20	<b>Mamma-Ca, Expression von <i>WNT-3</i>, <i>WNT-7b</i>-Onkogen</b>						
SKBr3	<b>Adeno-Ca, Mamma, Überexpression <i>HER2/ c-ERB-2</i></b>						

**Tab. 2.1** Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien. Zu den Harnblasenkarzinomzelllinien gehören VmCub1, VmCub2, 5637, HT1376, SW1710, SD und BFTC905. Bei HepG2 handelt es sich um eine Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms. T47D, BT20 und SKBr3 entstammen einem Mammakarzinom.

Die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2 wurde in Vorarbeiten charakterisiert. (Schulz et al. 1988) Sie trägt eine onkogene *CTNNB1*-Mutation ( $\beta$ -Catenin) (de La Coste et al. 1998), weshalb sie als Positivkontrolle für verschiedene Versuche zum Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg verwendet wurde.

## 2.2 Primärkulturen

Zur Kultivierung normaler uroepithelialer Zellen wurden Harnleiter aus Nephrektomieoperationen durch die Urologische Klinik zur Verfügung gestellt.

Die Einwilligung aller Patienten wurde mittels eines Formblattes routinemäßig gemäß des Beschlusses der Ethikkommission der HHU eingeholt.

## 2.3 E.coli-Stämme

Die für die Plasmidpräparation benötigten kompetenten E.coli-Zellen des Stammes "XL-2 blue" wurden von der Firma Stratagene erworben.

Dauerkulturen wurden aus 800  $\mu$ l Übernachtskulturen der Bakterienklone mit 150  $\mu$ l 99%-igem Glycerin hergestellt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

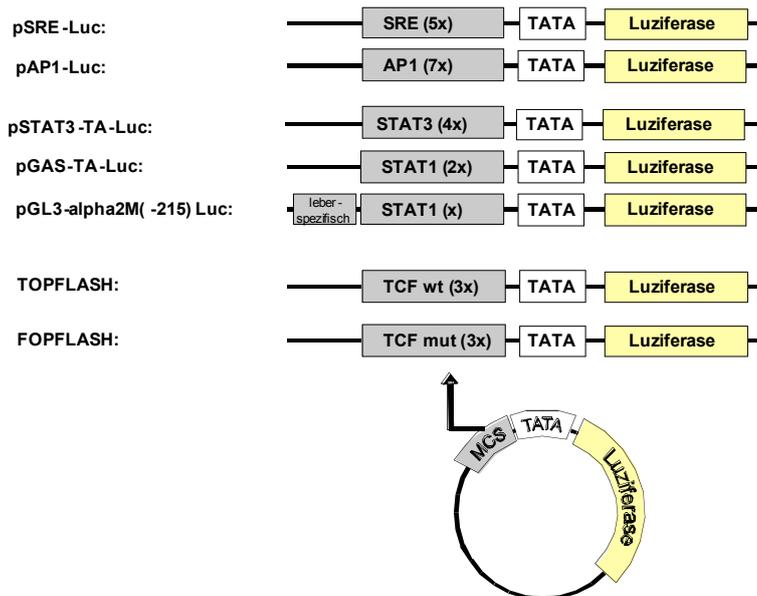
Alle Experimente mit veränderten Organismen wurden unter Beachtung der Vorschriften des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 (BGB 1.1, S.2066), sowie der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 14.03.1995 (BGB 1.1, S.297) durchgeführt.

## 2.4 Plasmide

Folgende Plasmide wurden kloniert, zur Verfügung gestellt oder käuflich erworben:

1. pAPI-Luc: Stratagene Europe, Amsterdam, Netherlands
2. pFC MEKK: Stratagene Europe, Amsterdam, Netherlands
3. FOPFLASH: enthält mutierte TCF-Bindungsstelle, Upstate Biotechnology, NY, USA
4. pGAS-TA-Luc: enthält STAT1-Promotor, CLONTECH, Palo Alto, CA, USA
5. pGL-3: Promega Europe
6. pGL3- $\alpha$ 2M(-215)Luc: enthält STAT3-Promotor/ $\alpha$ 2M-Promotor-Luziferase (Ratte), Prof. P.C. Heinrich, Institut für Physiologische Chemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen
7. -193/+661 Luc (=LINE): enthält das Fragment -193/+661 bp des humanen L1.2B Promotors (L1.2B erhalten von: Prof. H.H. Kazazian, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), dieses wurde SmaI/BglII (BamHI) in pGL3 kloniert.
8. pSRE-Luc: Stratagene Europe, Amsterdam, Netherlands

9. pSTAT3-TA-Luc: CLONTECH, Palo Alto, CA, USA
10. pT109luc: (Nordeen, 1988) Dr. S.K. Nordeen, Denver, USA
11. pTA-Luc: CLONTECH, Palo Alto, CA, USA
12. TOPFLASH: enthält normale TCF-Bindungsstelle, Upstate Biotechnology, NY, USA
13. TKRL: Promega Europe



**Abb. 2.4** Schematische Darstellung der transfizierten Vektoren: Plasmide mit spezifischer Bindungsstelle gekoppelt an eine Firefly-Luziferase.

## 2.5 Kulturmedien und Zusätze

Bovine Pituitary Extract (BPE)	Gibco BRL, Eggenstein
Choleratoxin	Sigma Aldrich, Chemie, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Epidermal Growth Factor (EGF)	Biochrom KG, Berlin
Fötale Kälber Serum (FCS)	Seromed Biochrom, Deisenhofen
Keratinocyten Serum Freies Medium (KSFM)	Life Technologies, Karlsruhe
LB-Agar	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
MEM-Vitamine	Biochrom KG, Berlin

Alle Harnblasenkarzinomzelllinien wurden in DMEM mit 15% hitzeinaktiviertem FCS und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Das Kälberserum wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Die Mammakarzinomzelllinien BT20, SKBr3 und T47D wurden in oben beschriebenem Medium unter Zugabe von MEM-Vitaminen kultiviert.

Normale humane Uroepithelialzellen wurden in KSFM unter Zusatz von 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat, 100 U/ml Penicillin, 4 ng/ml EGF, 30 ng/ml Cholera toxin und einem Aliquot BPE/500 ml Medium kultiviert.

Die Bakterien wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar kultiviert. Durch Zugabe von Ampicillin (50 mg/ml) wurde eine Selektion auf Antibiotika-Resistenz erreicht.

## **2.5 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits, Proteine, Transfektionsreagenzien, Verbrauchsmaterial**

### **Antikörper**

Anti- $\alpha$ -tubulin 3-5-1-2	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Anti-MAPK 1/2 (Erk1/2-CT)	Upstate-Biotechnology, NY, USA
MEK 1/2 Antibody	Cell Signaling Technology, MA, USA
HRP-conjugated anti-mouse antibody ECL-Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
HRP conjugated anti-rabbit antibody ECL-Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) Antibody	Cell Signaling Technology, MA, USA

### **Enzyme**

Soweit nicht in Kits enthalten, wurden Enzyme von der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen

### **Kits**

Dual Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ECL Western blotting System (RPN2108)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Proteinassay DC	Biorad, Hercules, USA
QIAfilter Plasmid Midi- und Maxi-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAspin Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

## **Transfektionsreagenzien**

FuGene

Roche, Mannheim

Superfect

Qiagen GmbH, Hilden

## **Chemikalien/ Proteine**

Acrylamid 37,5:1, 30%

AppliChem, Darmstadt

Agar

Difco Labs, Detroit, USA

Agarose

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Ampicillin

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Aprotinin

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

APS (Ammoniumpersulfat)

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

cAMP

Boehringer Mannheim, Mannheim

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

DNA-Längenstandards

PeqLab, Erlangen

ECL-Filme

Amersham Pharmacia, Freiburg

Glycerol

Merck, Darmstadt

Harnstoff

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

HEPES

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Hyperfilm (ECL)

Amersham Pharmacia, Freiburg

Kulturmedien

Gibco BRL, Eggenstein

Lithiumacetat

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Magermilchpulver

Neuform, Lüneburg

Nonidet P-40

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Biochrom KG, Berlin

PD 98059

Merck, Darmstadt

Penicillin, Streptomycin

Biochrom KG, Berlin

Saccharose

Merck, Darmstadt

SDS (Natriumdodecylsulfat)

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Temed

Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

Trypsin

Biochrom KG, Berlin

Tween 20

Serva, Heidelberg

Versene

Biochrom KG, Berlin

Whatman Chromatographiepapier

Whatman, Maidstone, UK

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt) oder von Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

### **Verbrauchsmaterial**

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Frickenhausen), Falcon/Becton Dickinson (Meylen Cedex, Frankreich) und Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen.

## **2.7 Lösungen und Puffer**

6x Ladepuffer für Agarosegele:

30%	Glyzerin
0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol FF in H <sub>2</sub> O
0,2%	EDTA
pH 8,0	

Blotpuffer (Western) ad 200 ml A.dest.:

0,606 g	Tris
2,252 g	Glyzin
20 ml	Methanol

Ethidiumbromid (Stammlösung):

50 µg/ml	Ethidiumbromid
----------	----------------

Lämmli-Puffer:

120 mM	Tris, pH 6,8
10%	SDS
10%	Glyzerol
25%	β-Mercaptoethanol
0,01%	Bromphenolblau

Laufpuffer für Westerngele (5x, ad 1l A.dest.):

150,14 g	Glyzin
30,29 g	Tris
50 ml	SDS (10%)

LB-Medium (1l):

10 g	Bacto-tryptone
5 g	Bacto-yeast extract
5 g	NaCl
pH 7,5	

PBS:

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCL
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,2	

Ripa-Puffer für die Zellyse:

50 mM	Tris pH 7,4
150 mM	NaCl
1%	Nonidet P40
0,5%	Natriumdeoxycholat
0,1%	SDS
10 mM	Natriumfluorid
10 mM	Natriumpyrophosphat
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 mM	Natriumvanadat
20 mM	β-Glycerophosphat
25 µl/ml	Protease Inhibitor Cocktail, Sigma
steril filtrieren: Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser	

SOC-Medium:

2,0 g	Bacto-trypton
0,5 g	Bacto-yeast extract
1,0 ml	1 M NaCl
autoklaviert, vor Gebrauch zugesetzt:	
0,25 ml	1 M KCl
1 ml	2 M Mg Vorratslösung (1 M MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 1 M MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)
1 ml	2 M Glukose

TAE:

40 mM Tris-Acetat  
1 mM EDTA  
pH 8,0

TBE:

90 mM Tris-Borat  
1 mM EDTA  
pH 8,0

TE-Puffer:

10mM Tris/HCL, pH 8,0  
1 mM EDTA  
pH 8,0

Acrylamidgel für Westernblotting:

(a) Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 10 cm x 10 cm)

35 ml H<sub>2</sub>O  
18,75 ml Acrylamid (30%)  
19 ml 1,5 M Tris pH 8,8  
1,5 ml SDS (10%)  
30 µl Temed  
750 µl APS (10%)

(b) Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 10 cm x 10 cm)

2,25 g Saccharose  
9,6 ml H<sub>2</sub>O  
2,5 ml Acrylamid (10%)  
1 ml 1 M Tris pH 6,8  
150 µl SDS (10%)  
9,9 µl Temed  
99 µl APS (10%)

## 2.8 Spezielle Geräte

Avanti 30 Zentrifuge	Beckman, Unterschleißheim
EASY-Reader EAR 400 AT	OWL, über PeqLab, Erlangen
J2 21 Centrifuge	Beckman, Unterschleißheim
Lichtmikroskop DIALUX 22EB	Leitz, Wetzlar
Minifuge RF	Heraeus, über Kendro, Hanau
MiniLuminat LB 9506	Berthold, Wildbad

Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer, Uvikon	Kontron, Neufehr
The Panther <sup>TM</sup> Semi-dry Electrobloetter	OWL, über PeqLab, Erlangen

## 2.9 Software

ONE-Dscan 1.2, Scananalytics, CSP iNc., 1997

## 3. METHODEN

### 3.1 Kultivierung von humanen Zellen

#### 3.1.1 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VmCub1, VmCub2, SD, SW1710, 5637, HT1376 und BFTC905 sowie die Mammakarzinomzelllinien BT20, T47D und SKBr3 wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (vgl. 2.5) bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sie wuchsen adhärent in liegenden 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit je 14 ml Medium. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:8 bis 1:16 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, in 3 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) für 5 Minuten inkubiert und in 7 ml Medium aufgenommen und in neue Flaschen überführt. Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurde zu 1x10<sup>6</sup> Zellen FCS/DMSO (4,5 ml FCS, 0,5 ml DMSO) gegeben, die suspendierten Zellen auf 5 Probengefäße aufgeteilt und zunächst bei -20°C (20 min), dann bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C angetaut, in 6 ml kaltem Medium aufgenommen und in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät.

#### 3.1.2 Anlegen von humanen Urothel-Primärkulturen aus Ureter

Gewebe zur Isolierung normaler uroepithelialer Zellen wurden in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) Puffer unter Zusatz von 10 mM HEPES und 20 KIU/ml Aprotinin transportiert. Die Präparation und Kultivierung erfolgte nach Southgate et al (1994). Der Harnleiter wurde freipräpariert, der Länge nach aufgeschnitten und mit der Mukosa-Seite nach oben in einer Schale in PBS unter Zusatz von 0,1% EDTA und Aprotinin über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde zunächst die PBS-Lösung abgesaugt und Kulturmedium (KFSM mit Zusätzen, vgl.2.5) hinzugeben. Die oberste Mukosa-Schicht wurde mit einer sterilen Pinzette abgelöst. Die Mukosastücke in Medium wurden mit einer Glas-Pipette abgesaugt, durch Pipettieren

weiter zerkleinert, gewaschen und in frischen Medium in einer mit Kollagen Typ 4 beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät und die Flasche auf 12 ml Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach ca. 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Bei einem Konfluenzgrad von etwa 80% wurden die Zellen 1:3 passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um Fibroblasten-Kontaminationen zu entfernen, wurde 2 ml Versen zugegeben und die Kulturflasche für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden zunächst Fibroblasten abgelöst und durch Absaugen entfernt. Nachdem 3 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) aufpipettiert und die Zellen für 3 Minuten wiederum bei 37°C inkubiert wurden, wurden 3 ml Trypsininhibitor (Stammlösung: 0,5 mg/ml Trypsininhibitor in PBS) sowie 6 ml Kulturmedium zugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Kulturmedium aufgenommen und entsprechend der Versuchsanordnung in Kulturflaschen oder 6-Well-Platten (Greiner) ausgesät.

### 3.1.3 Giemsa-Färbung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1:1 PBS/Methanol einmal und zweimal mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 2 ml Giemsalösung/25 cm<sup>2</sup> 2 Minuten gefärbt und das gleiche Volumen destilliertes Wasser hinzugefügt (2 Minuten). Danach wurde die Färbelösung abgegossen und die Schalen gründlich unter fließendem Wasser gewaschen.

## 3.2 Analytische Methoden an Zellen in Zellkultur

### 3.2.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die zu untersuchenden Zellen in Puffer zur Zellyse (vgl.2.7) lysiert. 20 µl des Lysats wurden auf einer ELISA-Platte mit 10 µl der im ProteinassayDC-Kit enthaltenen Lösung A (alkaline copper tartrate solution) und 80 µl Lösung B (Folin Reagenz) vermischt. Nach 20 Minuten wurde die Extinktion bei 690 nm gemessen. Als Proteinstandard diente eine Albuminverdünnungsreihe. Der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

### 3.2.2 BrdU-Inkorporationstest

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach 12 Stunden BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) hinzugefügt, das statt Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben (in situ Cell Proliferation ELISA, Roche). Dazu wurden die Zellen fixiert und im selben Schritt die DNA denaturiert, um sie für den nachfolgenden Antikörper-Schritt besser zugänglich zu machen. Dann wurde anti-BrdU-POD, ein monoklonaler BrdU-Antikörper, der Peroxidase (POD)-konjugiert ist, hinzugegeben. POD katalysiert in Anwesenheit von Hydrogenperoxid die Oxidation von Diazylhydrazid. Die Farbveränderung bzw. die Absorption des Reaktionsprodukts wurde somit messbar und korrelierte mit dem Ausmaß der DNA-Synthese. Die Absorption wurde bei 450 nm und 690 nm gemessen.

### 3.2.3 Luziferase Messung

Zur Messung wurde der „Dual Luciferase Reporter Assay System“-Kit mit den erwähnten Lösungen verwendet. Zunächst wurden die transfizierten Zellen zweimal in PBS gewaschen, danach mit 500µl/Loch „Passive Lyse-Puffer“ lysiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat gut gemischt und 10 µl davon mit 50 µl „Luziferase Reagenz 1“ versetzt. Nach 2 Minuten wurde das Gemisch im Luminometer zweimal gemessen. Dann wurden 50 µl „Renilla Luziferase-Substrat“ zupipettiert und ebenfalls zweimal gemessen.

## 3.3 Transiente Transfektion

### FuGene:

Zellen wurden auf einer 6-Well-Platte bis zu 40% Konfluenz kultiviert, dann mit PBS gewaschen und 2 ml neues Medium hinzupipettiert. Pro Well wurden 5 µl des Transfektionsreagenz mit 95 µl Medium ohne Zusätze vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µg DNA zupipettiert und nach Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur tropfenweise auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion in einer 96-Well-Platte wurden pro Well 1 µl FuGene mit 19 µl Medium ohne Zusätze mit einer DNA-Menge von 0,2 µg verwendet.

### SuperFect:

Pro Well wurde 1 µg DNA in 36 µl Medium ohne Zusätze gegeben und 4,8 µl SuperFect hinzugefügt. Nach 5-10 Minuten Inkubation wurde 600 µl Medium hinzugegeben und die Mischung für 3 h auf die gewaschenen Zellen pipettiert.

Danach wurde die Mischung abgesaugt und 2 ml Medium mit Zusätzen auf die Zellen gegeben.

### **3.4 Kultur von Bakterienzellen**

#### 3.4.1 Kultur von E.coli-Zellen

Die Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) in flüssigem LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums kultiviert. Auf Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) wurden Dauerkulturen mittels 3-Ösenausstrich ausgestrichen, im 37°C-Brutschrank über Nacht inkubiert. Zur Plasmidpräparation wurden dann Einzelklone in flüssiges LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin: 50 µg/ml) überführt.

#### 3.4.2 Transformation

Nach Inkubation von 65 µl kompetenter Zellen mit 1,5 µl Mercaptoethanol für 10 Minuten auf Eis, wurden ca. 100 ng der zu transformierenden DNA hinzugefügt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurde der Ansatz einem Hitzeschock bei 42°C von 45 Sekunden und anschließender Kühlung von 2 Minuten auf Eis unterzogen.

Nach Zugabe von 1,5 ml warmen SOC-Medium wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C und ca. 175 rpm geschüttelt.

50 µl der Kultur wurden auf einer Agar/Antibiotikumplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.5 Untersuchungen von Nukleinsäuren und Proteinen**

#### 3.5.1 Plasmidpräparationen

##### Minipräparation:

Aus 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur (12-16 Stunden) wurden die Bakterien abzentrifugiert (10.000 rpm, 5 Minuten) und dann mittels Qiaprep Minikit Plasmid-DNA isoliert. Die Intaktheit der Plasmide und der relative Anteil von Supercoiled-DNA wurde auf einem Agarosegel geprüft, die Konzentration photometrisch bestimmt sowie per Restriktionsverdau kontrolliert.

##### Midi- und Maxipräparation:

2 ml einer 5 ml Übertagkultur (8 Stunden) wurden in eine 200 ml Übernachtskultur (12-16 h) eingesetzt. Für eine Midipräparation wurden 50 ml, für eine Maxipräparation 200 ml der

Kultur abzentrifugiert und nach Herstellerangaben mit dem Qiafilter Plasmid Midi- bzw. Maxikit Plasmid-DNA präpariert.

### 3.5.2 Proteinextraktion aus Zelllinien und normalen Uroepithelialzellen

Zur Proteinextraktion wurden 2 ml Proteinlysepuffer/ $10^6$  Zellen auf die Zellen pipettiert und diese 1 Stunde auf Eis geschwenkt. Um die Viskosität zu minimieren, wurden die Lysate 3-4 mal durch eine 25G Kanüle passiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Protein DC-Assay (vgl.3.9.1).

### 3.6 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde ad 8  $\mu$ l A.dest. aufgefüllt und 2  $\mu$ l des entsprechenden 10x Puffers und 10 U Restriktionsenzym zugefügt. Der Ansatz wurde dann bei der für das entsprechende Enzym geeigneten Temperatur für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 2  $\mu$ l Blaumarker gestoppt.

### 3.7 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben und der Längenstandard wurden mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt und auf einem Agarosegel in 1xTAE-Puffer bei 120-140 V aufgetrennt. Die Dichte des Gels (0.5-3%) wurde in Abhängigkeit von der zu erwarteten Fragmentgröße gewählt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung, wobei das Gel 5-20 Minuten in einer Lösung aus 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm betrachtet wurde.

### 3.8 Westernblotanalyse

Zwischen gereinigten Gelplatten (10 cm x 10 cm) wurde zunächst das Trenngel gegossen und eine Stunde polymerisiert. Der Gelrand wurde durch Aufpipettieren von Butanol geglättet. Nach Abgießen und Reinigen der Gelkante wurde das Sammelgel gegossen, der Kamm eingeschoben und das Gel wiederum polymerisieren gelassen. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer überführt und der Kamm entfernt. Die Proteinlysate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, abzentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. 10  $\mu$ g Gesamtprotein wurde mit 10  $\mu$ l Lämmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 96°C inkubiert. Die Proben wurden dann zusammen mit 10  $\mu$ g Längenstandard (Gibco BRL BenchMark Prestained Protein Ladder No: 10748-010, 10-220 kD) in die ausgespülten Slots aufgetragen. Nach

Einlauf bei 50-100 V erfolgte die Proteinauftrennung über Nacht bei circa 50 V. Nach dem Gellauf wurde das Trenngel vom Sammelgel befreit. 3 in Blotpuffer angefeuchtete Whatmanpapiere in der Größe des Gels) wurden auf die Anode der Blotkammer gelegt. Dann wurde die Immobilon-Membran (in Methanol angefeuchtet und in Blotpuffer abgespült) aufgelegt. Darauf kam das Gel und nochmals 3 Lagen feuchtes Whatmanpapier. Die Blotkammer wurde geschlossen und für 1,5 Stunden bei 200 mA und maximal 10 V geblottet. Nach dem Blocken der Membran in PBS mit 10% Magermilch und 0,01% Tween über Nacht bei 4°C wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper waren mit obiger Blocklösung auf die folgenden Konzentrationen herunterverdünnt: anti- $\alpha$ -tubulin 3-5-1-2 (1:10000), anti-MAPK 1/2 (1:2000), MEK 1/2 Antibody (1:1000), Phospho-p44/42 MAPK (1:2000), Phospho-MEK1/2 Antibody (1:1000). Nach Waschen mit PBS/0,01% Tween erfolgte die Behandlung der Membran mit dem Sekundär-Antikörper für circa 1 Stunde bei Raumtemperatur (1:5000-1:10000 HRP-conjugated anti-mouse antibody, 1: 2000 HRP conjugated anti-rabbit antibody). Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen. Für die Proteindetektion wurden circa 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Membran ECL-Lösung 1 und 2 gemischt und für genau eine Minute auf der abgetropften Membran inkubiert. Diese wurde dann in Folie eingelegt, in eine Röntgenkassette geklebt und ein ECL-Film je nach Bedarf zwischen 5 und 30 Minuten exponiert und entwickelt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Aktivität von MAPK-Signalwegen in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

#### 4.1.1 Experimentelles Vorgehen

Die Aktivität zweier MAPK Signalwege wurde in sieben unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzelllinien (VMCub1, VMCub2, SW1710, SD, HT1376, 5637 und BFTC905) und in normalen uroepithelialen Zellen untersucht. Die Zelllinien wurden zunächst unter Standardbedingungen in komplettem Medium, d.h. mit 15% FCS, kultiviert. Die Uroepithelzellen wuchsen in Kultur in vollständigem Medium, d.h. unter Zusatz von BPE, EGF und Choleratoxin.

Ergänzend wurden die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 sowie die Mammakarzinomzelllinien T47D, BT20 und SKBr3 untersucht.

Eine Auflistung von Charakteristika der einzelnen Zelllinien findet sich in der **Tabelle 2.1**.

Die Signaltransduktionswege wurden zunächst mittels Reporteranalyse untersucht. Aktivität der Signalwege sollte letztendlich zu Aktivität spezifischer Promotoren führen. Es wurden Promotoren mit Elementen verwendet, über die der klassische MAPK bzw. der JNK/SAPK-Weg spezifisch zur Transkriptionsaktivierung führt.

Für den MAPK-Weg wurden Promotorkonstrukte mit SRE-Sequenzen, für den JNK-Weg mit AP1-Bindungsstellen verwendet. **Abb. 2.4** Beide Sequenzen waren jeweils in mehrfacher Kopie mit einem Basalpromotor kombiniert. Die Promotoren steuerten in den beiden Plasmiden pSRE-Luc bzw. pAP1-Luc jeweils die Expression des Reportergens, das für die Firefly-Luziferase aus *Photinus pyralis* kodierte. Diese Plasmide wurden per Transfektion in die Zellen eingebracht. Um Schwankungen der Transfektionseffizienz aufgrund von unterschiedlicher Zellzahl, Mediumkonzentrationen und Pipettierfehlern zu verfolgen und auszugleichen, wurde in jedem Experiment eine Co-Transfektion mit TKRL durchgeführt. Dieser Vektor exprimiert eine Renilla-Luziferase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven HSV-Thymidin-Kinase Promotors. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der beiden Luziferasen separat bestimmt. Die Firefly-Luziferase wurde gemäß den Schwankungen der Renilla-Luziferase adjustiert.

Um die Aktivitäten in verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde in jeder Serie von Experimenten die Aktivität von LINEluc mitbestimmt. Dieser Vektor exprimiert eine Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des humanen Retrotransposon-Promotors L1.2B, der in allen Zelltypen gleich aktiv ist. (Steinhoff 2001) Der zunächst

gewählte pT109luc hatte gegenüber LINEluc größere Schwankungen aufgewiesen. Diese können auf Konkurrenz zwischen dem TK-Promotor von pT109luc und dem von TKRL beruhen.

Um die Hintergrundaktivität zu bestimmen wurde in jeder Serie pGL-3, ein promotorloser Luziferasevektor, mitgeführt.

#### 4.1.2 Bestimmung der MAPK-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen mittels Reporteranalyse

In den Harnblasenkarzinomzelllinien war unter Standardbedingungen die Aktivität von sowohl SRE-Luc als auch AP1-Luc sehr niedrig.

Die Aktivität von SRE-Luc lag in Zelllinien wie 5637 und BFTC905 mit  $0,89 \pm 0,33$  % und  $0,55 \pm 0,2$  % im Bereich des pGL-3 Vektors, die im Mittel ungefähr bei 0,6 % des LINEluc lag. **Abb. 4.1.2a** Die Aktivität von LINEluc wurde dabei jeweils als 100% bewertet. Die höchsten Basalaktivitäten unter den Harnblasenkarzinomzelllinien wiesen HT1376 und VMCub2 mit  $6 \pm 0,5$  % bzw.  $4,9 \pm 3,2$  % von LINEluc auf. In der Kontrollzelllinie HepG2 lag die SRE-Luc- Aktivität bei  $1,6 \pm 1,2$  %. Ebenso bewegten sich die SRE-Luc-Aktivitäten in den Mammakarzinomzelllinien nur im Bereich der Hintergrundaktivität. T47D hatte eine Aktivität von  $0,4 \pm 0,2$  , BT20 eine von  $0,3 \pm 0,01$  und SKBr3 eine von  $0,95 \pm 0,2$ .

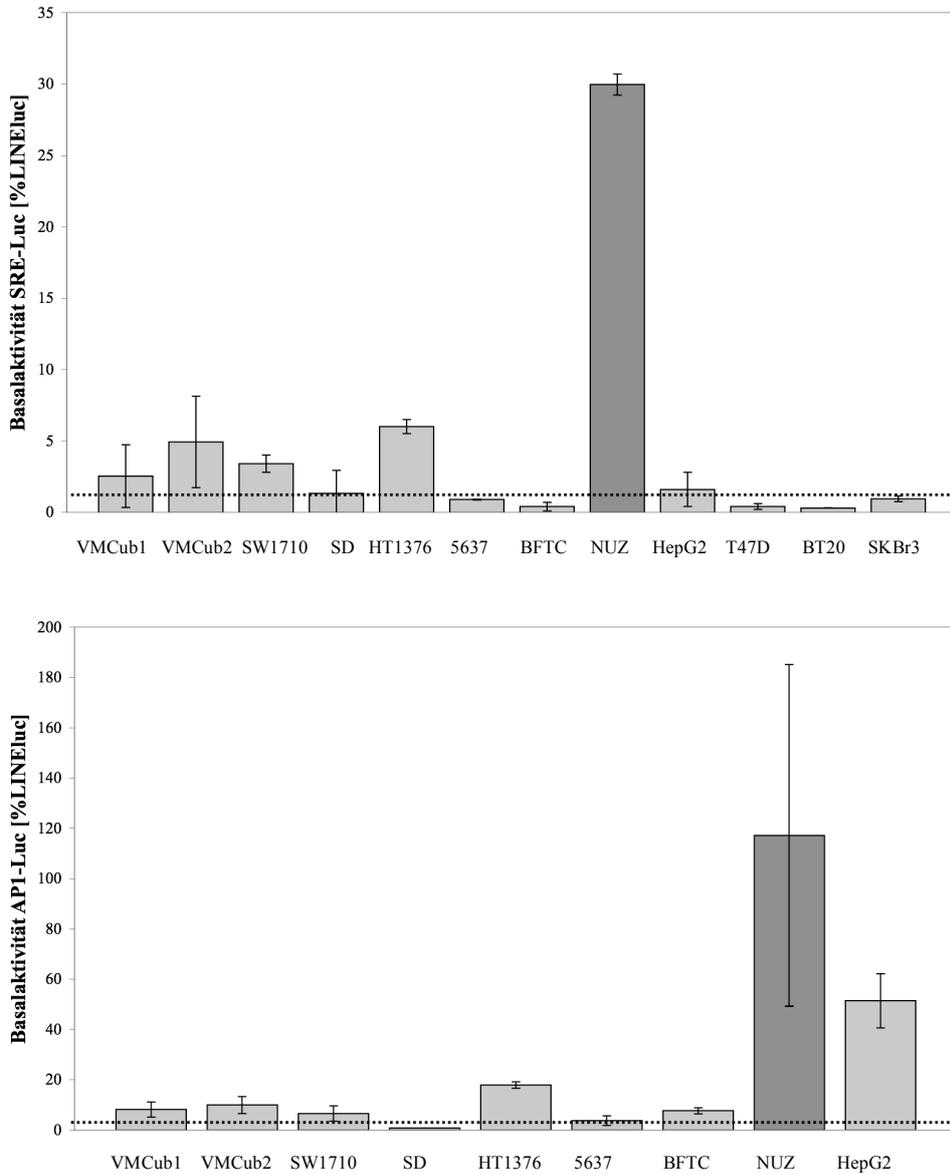
Bei der Transfektion von AP1-Luc zeigten alle Zelllinien mindestens doppelt so hohe Aktivitäten wie bei SRE-Luc. **Abb. 4.1.2b** Eine Ausnahme bildete SD mit  $0,82 \pm 0,2$  %. Die Aktivität in den anderen Zelllinien bewegten sich im Bereich zwischen 6 und 10 % von LINEluc (SW1710:  $6,5 \pm 3,1$  %; BFTC905:  $7,6 \pm 1,2$  %; VMCub1:  $8,1 \pm 3,0$  %; VMCub2:  $9,9 \pm 3,4$  %). Wie für SRE-Luc wies auch hier HT1376 unter den Harnblasenkarzinomzelllinien die höchste Basalaktivität mit  $17,9 \pm 1,3$  % von LINEluc auf. HepG2 lieferte bei AP1-Luc mit  $51,3 \pm 10,8$  % deutlich höhere Werte als bei SRE-Luc. Dies war zu erwarten, da Hepatozyten Transkriptionsfaktoren der JUN-Familie exprimieren.

Die uroepithelialen Zellen zeigten im Vergleich zu den Harnblasenkarzinomzelllinien sowohl bei SRE-Luc als auch bei AP1-Luc signifikant höhere Basalaktivitäten. **Abb. 4.1.2a/b**

Bei SRE-Luc lagen die Werte bei  $27,3 \pm 27,7$  % und bei AP1Luc bei  $117,1 \pm 68$  % des LINEluc.

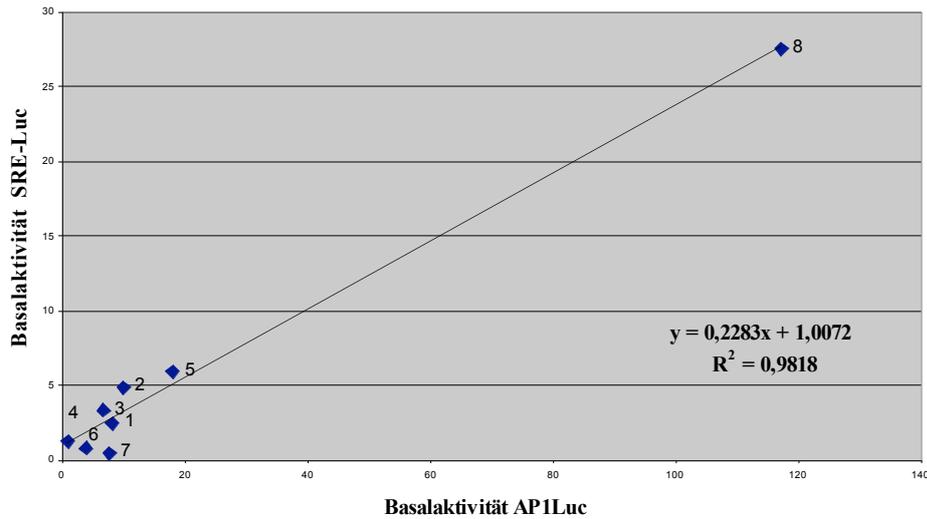
Die SRE-Luc Aktivität reichte von 5-fach höheren Werten verglichen mit HT1376 bis zu 31-fach höheren Werten verglichen mit 5637. Alle Zelllinien unterschieden sich damit signifikant von den uroepithelialen Zellen (VMCub1, SD, 5637, BFTC:  $p \leq 0,01$ ; VMCub2, SW1710, HT1376:  $p \leq 0,02$ ). Bei ebenfalls signifikant höheren AP1-Luc Basalaktivitäten in den

uroepithelialen Zellen (Signifikanzspanne:  $p = 0,0001$  für HT1376 bis  $p = 0,00002$  bei SD) reichten die Unterschiede von 6,5-fach höheren Werten im Vergleich zu HT1376 bis zu 143-fach höheren Werten im Vergleich zu SD.



**Abb 4.1.2** Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen (NUZ). Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion der MAPK-abhängigen Promotoren in den angegebenen Zelllinien, uroepithelialen Zellen (dunkle Säule) und der Kontrollzelllinie HepG2. Nach Korrektur der Transfektionseffizienz, wie im Methodenteil beschrieben, wurde die Aktivität von pLINEluc als 1 und die Firefly-Luziferase-Expression dazu in Relation gesetzt. Die gepunktete Linie gibt die mittlere Aktivität des promotorlosen Luziferase-Vektors pGL3 an. Diese lag in den einzelnen Zelllinien zwischen 0,2 -1% des pLINEluc.

**Abb. 4.1.2a** SRE-Luc  
**Abb.4.1.2b** AP1-Luc



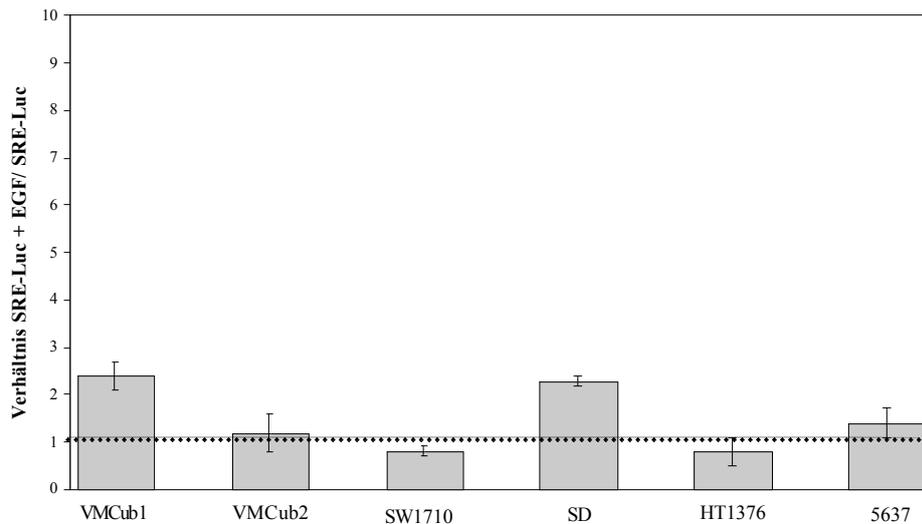
**Abb. 4.1.2c** Korrelation der MAPK-abhängigen Promotoraktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen (NUZ). Die Mittelwerte der Firefly-Luziferase-Expression der SRE- und AP1-abhängigen Promotoren wurden miteinander korreliert.  
 1 = VMCub1, 2 = VMCub2, 3 = SW1710, 4 = SD, 5 = HT1376, 6 = 5637, 7 = BFTC  
 8 = NUZ

### 4.1.3 Induktion der MAPK-Basalaktivität durch EGF

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen transfiziert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen in 0,5 % FCS-Medium mit EGF in der Konzentration 10 ng/ml überführt. Auf diese Weise sollte spezifisch der EGF- Einfluss auf die Aktivität des MAPK-Signalwegs untersucht werden. Als Reporterkonstrukt wurde SRE-Luc transfiziert.

In den Harnblasenkarzinomzelllinien war der EGF-Einfluss auf die SRE-Aktivität gering und variabel. Eine signifikante Induktion der MAPKs wurde nicht erzielt.

Die SRE-Aktivität nach Induktion reichte von  $0,8 \pm 0,1$  des LINEluc bei SW1710 bzw.  $0,8 \pm 0,3$  bei HT1376 bis zu  $2,4 \pm 0,3$  bei VMCub1. **Abb. 4.1.3**



**Abb. 4.1.3** Aktivierung von SRE-Luc durch Epidermal Growth Factor (EGF) in Harnblasenkarzinomzelllinien. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der SRE-Luc-Aktivität wurde in Anwesenheit von EGF ins Verhältnis zur Basalaktivität gesetzt. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 und somit ausbleibende Induktion an.

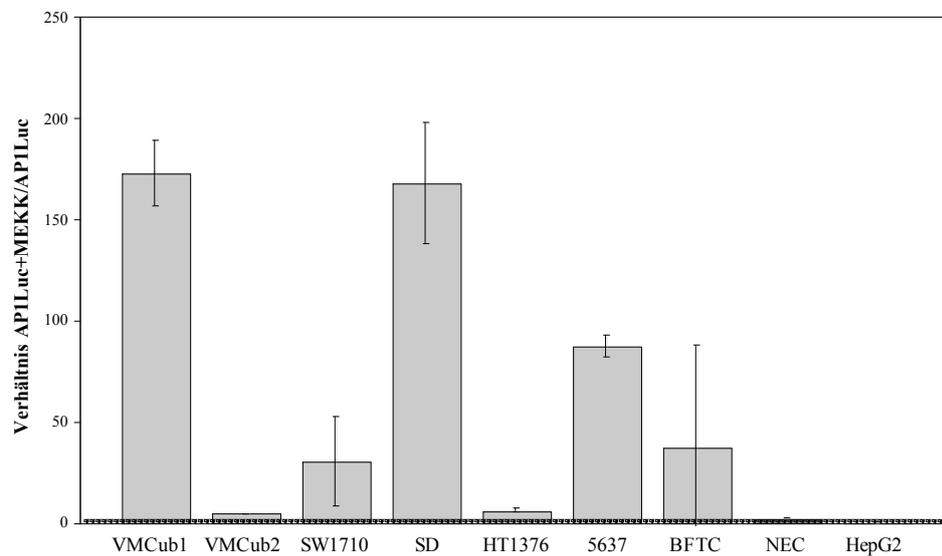
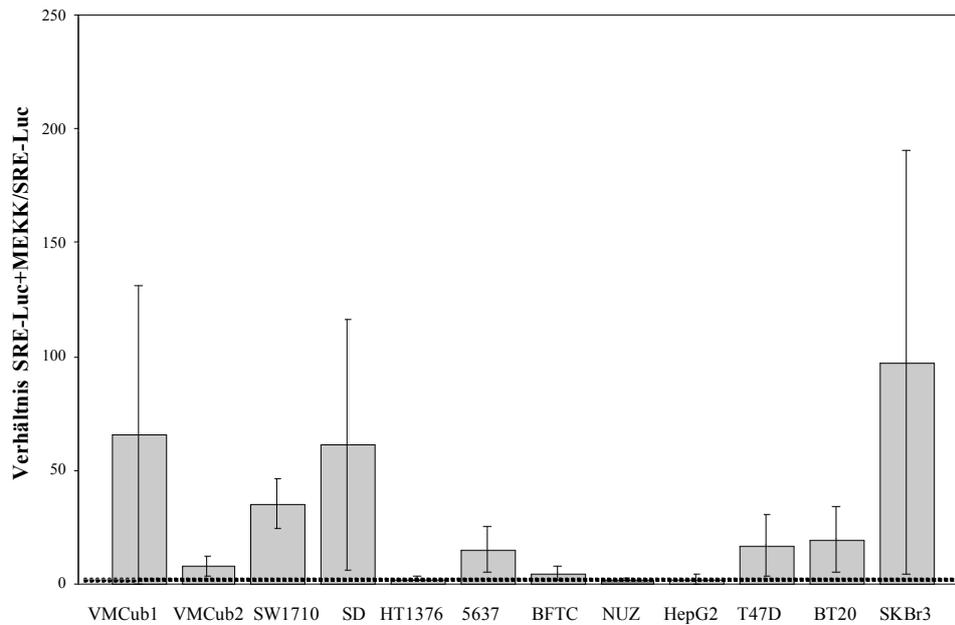
#### 4.1.4 Induktion der MAPK-Basalaktivität durch MEKK4

Die MAPK abhängigen Promotoren SRE-Luc und AP1-Luc wurden in 15% FCS Medium mit einem Expressionskonstrukt für konstitutiv aktive MEKK4 co-transfiziert. MEKK4 ist eine für die MAPK-Signalwege spezifische Kinase, welche sich upstream von SRE und AP1 befindet und diese aktiviert. **Abb. 1.2.1a**

Durch die Co-Transfektion sollte somit eine sehr starke Induktion der MAPK-Signalwege erreicht werden. In den meisten Harnblasenkarzinomzelllinien konnte die Promotoraktivität von SRE-Luc wie auch von AP1-Luc durch MEKK4 deutlich induziert werden.

Für SRE-Luc wurden in VMcub1 mit  $65,67 \pm 65,4$  und in SD mit  $61,33 \pm 55,19$  die höchsten Induktionsquotienten erzielt. Diese Zelllinien wiesen zuvor die geringste Basalaktivität auf. In HT1376, der Zelllinie mit der höchsten Basalaktivität, war der Induktionsquotient mit  $2,16 \pm 0,65$  am geringsten. **Abb. 4.1.4a**

Die Induktion nahm demnach mit steigender Basalaktivität von SRE-Luc ab. BFTC bildete die einzige Ausnahme, da hier die SRE-Aktivität sowohl basal wie auch induziert niedrig war.



**Abb. 4.1.4a/b** Aktivierung MAPK-abhängiger Promotoren durch MEKK4 in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Induktion der Aktivität der Reporterplasmide SRE-Luc und API-Luc durch Co-Transfektion von konstitutiv aktivem MEKK4. Die Säulendiagramme enthalten die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der SRE-Luc- und API-Luc-Aktivität nach Co-Transfektion mit MEKK4 ins Verhältnis zur Basalaktivität gesetzt. Kontrollzelllinien waren HepG2 und die Mammakarzinomzelllinien T47D, BT20 und SKBr3. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 und somit ausbleibende Induktion an.

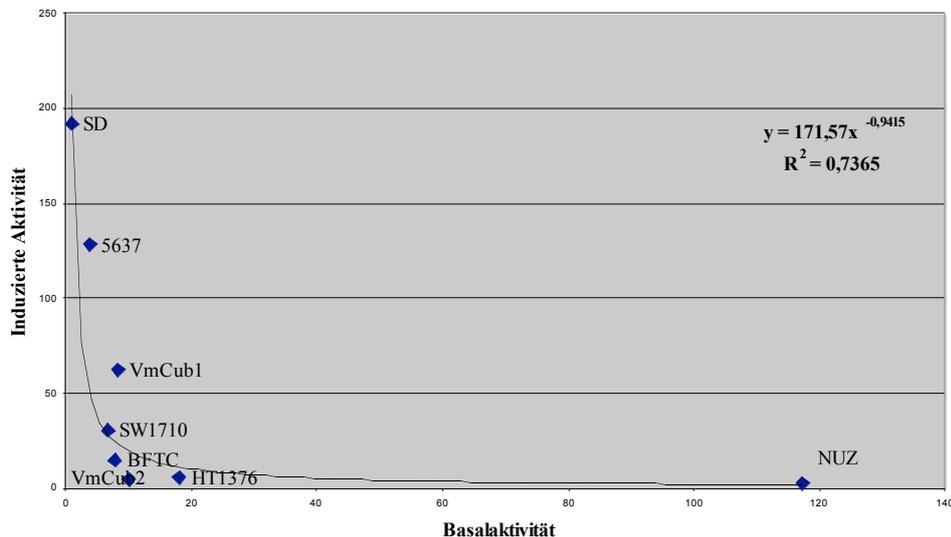
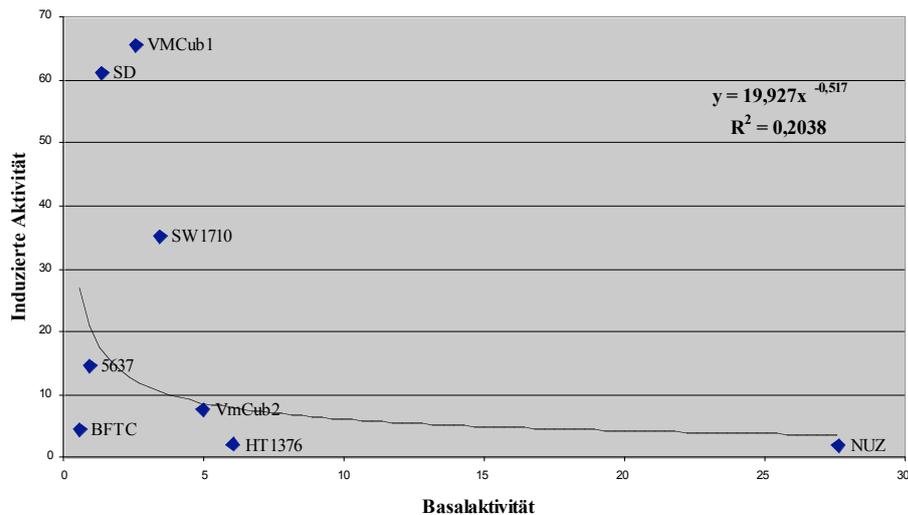
**Abb. 4.1.4** SRE-Luc

**Abb. 4.1.4b** API-Luc

Die folgende Grafik gibt diesen tendenziellen Zusammenhang wieder. **Abb. 4.1.4c** Der Bestimmungskoeffizient für einen hyperbolischen Zusammenhang ist bei SRE-Luc mit 0,2 sehr niedrig.

Die Kontrollzelllinien zeigten nach Induktion mit MEKK4 ein sehr variables Bild. Während bei HepG2 die Aktivität kaum über die Basalaktivität hinaus gesteigert wurde ( $2,12 \pm 2,1$ ), lieferten die Mammakarzinomzelllinien Induktionsquotienten von  $17,09 \pm 13,42$  (T47D) bis zu  $97,45 \pm 93,41$  (SKBr3).

Die Promotoraktivität von AP1-Luc konnte verglichen mit SRE-Luc in den Harnblasenkarzinomzelllinien deutlich stärker induziert werden. **Abb. 4.1.4b** Bei AP1-Luc zeigte SD den höchsten Induktionsquotienten mit  $192,46 \pm 111,5$ , gefolgt von 5637 mit einem Quotienten von  $128,89 \pm 106,1$ . Sowohl SD wie auch 5637 wiesen nur eine niedrige Basalaktivität auf. HT1376 mit Induktionsquotienten von  $6,39 \pm 2,9$  und VMcub2 mit  $5,39 \pm 2,9$  lieferten die niedrigsten Induktionsquotienten. Die AP1-Luc-Aktivität in der Kontrolle HepG2 nahm nach Co-Transfektion mit MEKK4 sogar ab.



**Abb. 4.1.4c/d** Aktivierung MAPK-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Induktion der Aktivität der Reporterplasmide SRE-Luc und AP1-Luc durch Co-Transfektion von konstitutiv aktivem MEKK4. Im Punktdiagramm wird die Aktivität der Reporterplasmide SRE-Luc und AP1-Luc nach Induktion mit MEKK4 mit der Basalaktivität korreliert. Die Linie gibt den Trend der Korrelation unter den Zelllinien an.  $y =$  Kurvengleichung;  $R^2 =$  Korrelationskoeffizient, absolute Korrelation, wenn  $R^2 = 1$

**Abb. 4.1.4c** SRE-Luc

**Abb. 4.1.4d** AP1-Luc

Bei AP1-Luc zeigt sich damit ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Basalaktivität und Induktion wie schon bei SRE beobachtbar. Die Grafik zeigt einen potentiellen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,74. **Abb. 4.1.4d**

In den uroepithelialen Zellen ließ sich die SRE-Luc Aktivität durch MEKK4 kaum induzieren. **Abb. 4.1.4a** Nach bereits hohen Basalwerten liegt der Induktionsquotient nur bei  $1,98 \pm 0,9$ . Der schon in den Karzinomzelllinien beobachtete Zusammenhang zwischen Basalaktivität und Induktion setzte sich damit fort. **Abb. 4.1.4c**

Die Induktion der AP1-Luc-Aktivität war in den uroepithelialen Zellen mit nur  $3,12 \pm 1,3$  ebenfalls sehr niedrig. **Abb. 4.1.4b** Der T-Test lieferte hier signifikante Unterschiede zwischen den uroepithelialen Zellen und VMcub1 ( $p = 0,02$ ), SW1710 ( $p = 0,04$ ), HT1376 ( $p = 0,001$ ) und BFTC ( $p = 0,049$ ).

#### 4.1.5 Induktion der Basalaktivität durch TPA

Etwa 7 Stunden nach Transfektion der Zelllinien unter Standardbedingungen wurde dem Medium der Proteinkinase C-Agonist TPA (0,1 nM) zugesetzt. Nach 16 und 40 Stunden Inkubation wurden jeweils die SRE-Luc- und AP1-Luc-Aktivität bestimmt.

Inkubation über 16 Stunden ergab in den ausgetesteten Zelllinien eine deutliche Induktion der SRE-Luc-Aktivität **Abb.4.1.5a** VMcub1 hatte einen SRE-Luc-Induktionsquotienten von  $6,8 \pm 1,6$ , BFTC einen von  $7,5 \pm 6,34$ , SW1710 einen von  $5,2 \pm 1,9$ , gefolgt von HT1376 mit einem Quotienten von  $3,6 \pm 0,1$ . Am wenigsten ließ sich VMcub2 mit nur  $2,4 \pm 0,7$  -fachen Werten induzieren. Im Vergleich zu MEKK4 war die durch TPA erzielte Induktion somit jedoch schwächer.

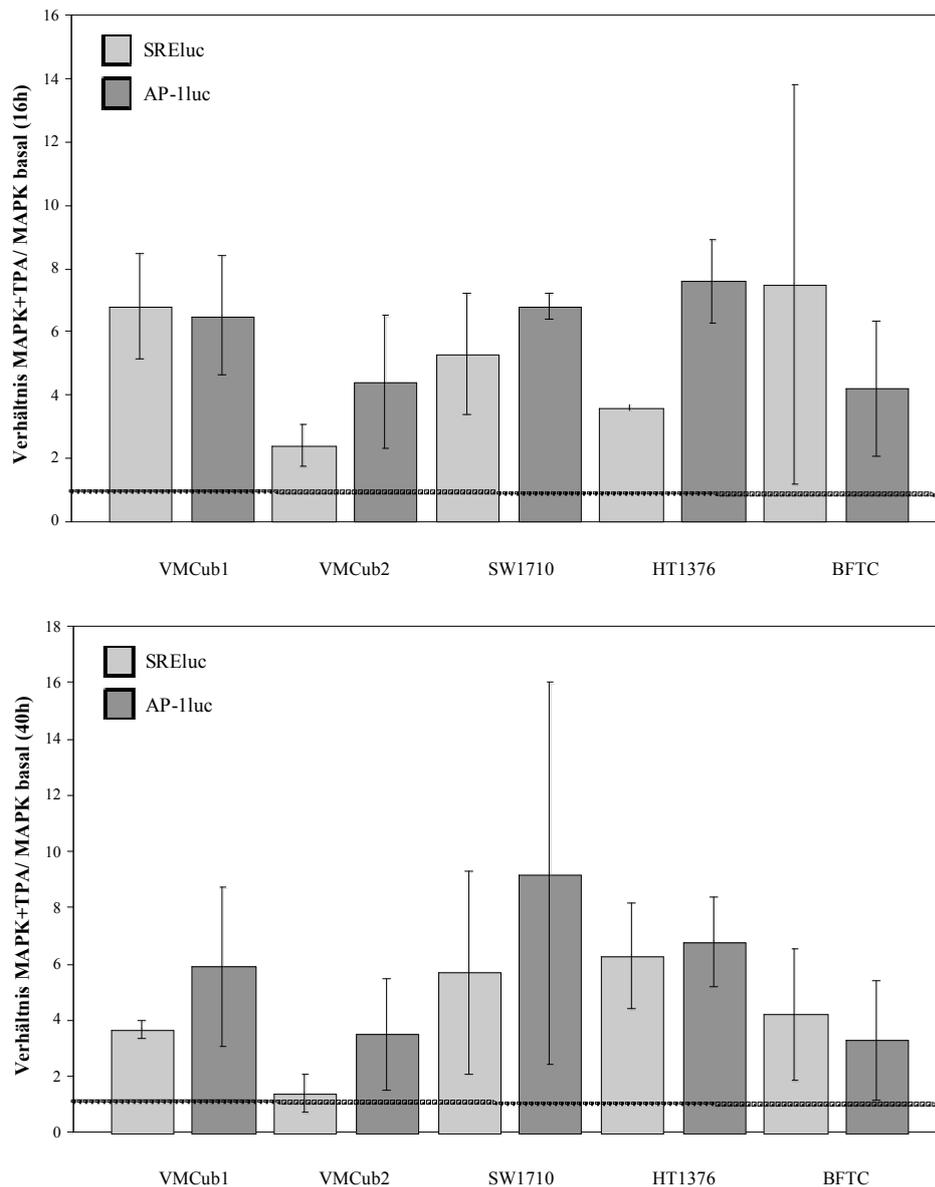
Nach Inkubation über 40 Stunden nahmen die Induktionsquotienten ab. **Abb. 4.1.5b**

Bei VMcub1 beispielsweise sank der Induktionsquotient auf  $3,67 \pm 0,3$ . Eine Ausnahme bildete HT1376. Dort stieg der Induktionsquotient auf  $6,3 \pm 1,9$  an.

AP1-Luc zeigte ein ähnliches Induktionsverhalten wie SRE-Luc. Die Induktionsquotienten nach 16 Stunden TPA-Behandlung reichten von  $4,21 \pm 2,13$  bei BFTC bis zu  $7,6 \pm 1,3$  bei HT1376. **Abb. 4.1.5a**

Eine TPA-Inkubation von 40 Stunden brachte ebenso keine deutliche Änderung der AP1-Luc-Aktivität. Hier reichten die Werte von  $3,5 \pm 2$  bei VmCub2 bis zu  $9,2 \pm 6,8$  bei SW1710.

**Abb. 4.1.5b**



**Abb. 4.1.5** Aktivierung MAPK-abhängiger Promotoren durch TPA in Harnblasenkarzinomzelllinien. Induktion der Aktivität der Reporterplasmide SRE-Luc und AP1-Luc durch TPA [0,1 nM] und Messung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der SRE-Luc- und AP1-Luc-Aktivität in Anwesenheit von TPA ins Verhältnis zur Basalaktivität gesetzt. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 und somit ausbleibende Induktion an.

**Abb.4.1.5a** Messung der Promotoraktivität nach 16h

**Abb.4.1.5b** Messung der Promotoraktivität nach 40h

#### 4.1.6 Effekt von Serum auf Promotoraktivitäten in Harnblasenkarzinomzelllinien

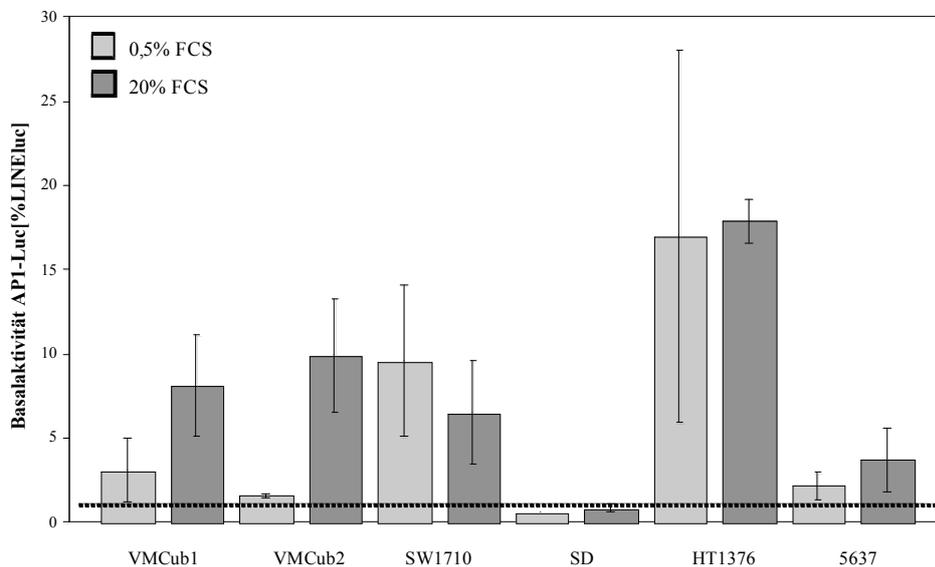
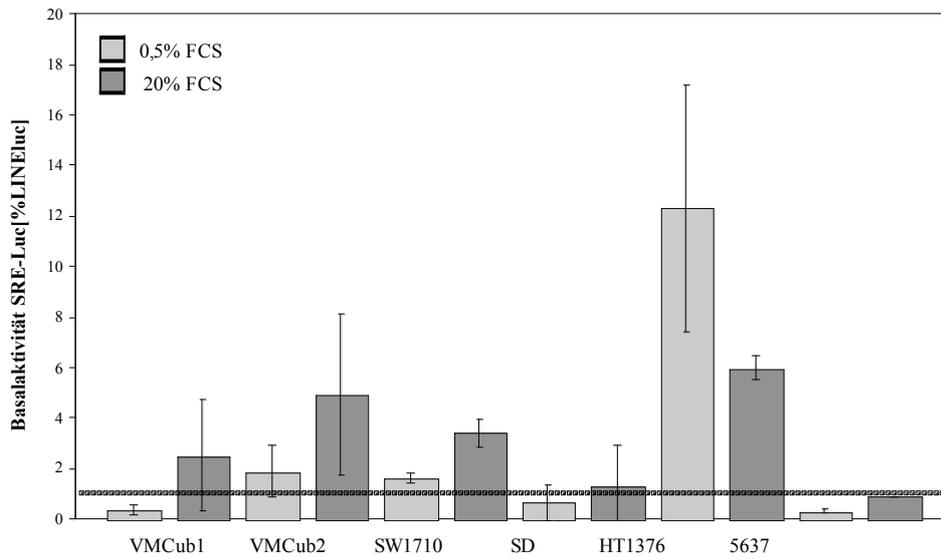
Die Zellen wurden 6 Stunden nach Transfektion mit SRE-Luc und AP1-Luc unter Standardbedingungen in Medium mit 0,5% oder 20% FCS überführt. Dieser 40-fache Konzentrationsunterschied hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivitäten.

Unter Serumentzug war die Basalaktivität von SRE-Luc verglichen mit der Aktivität unter Standardbedingungen in den Zelllinien SD und SW 1710 nur halb so groß. **Abb. 4.1.6a** In der

Zelllinie VMcub1 sank sie sogar um dass 7-fache. Die Werte reichten von  $0,33 \pm 0,06$  (5637) bis  $1,9 \pm 1,03$  (SW1710). Einzige Ausnahme bildete HT1376. Hier verdoppelte sich die Aktivität unter Serumentzug von  $6 \pm 0,5$  auf  $12,32 \pm 4,95$ .

Die gleichen Auswirkungen hatte der Serumentzug auf die AP1-Luc Promotoraktivität.

**Abb. 4.1.6b**

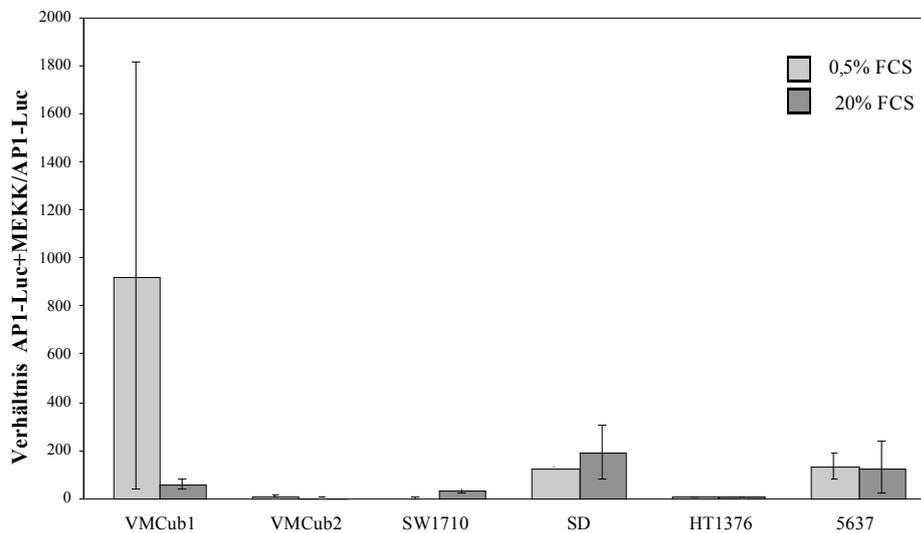
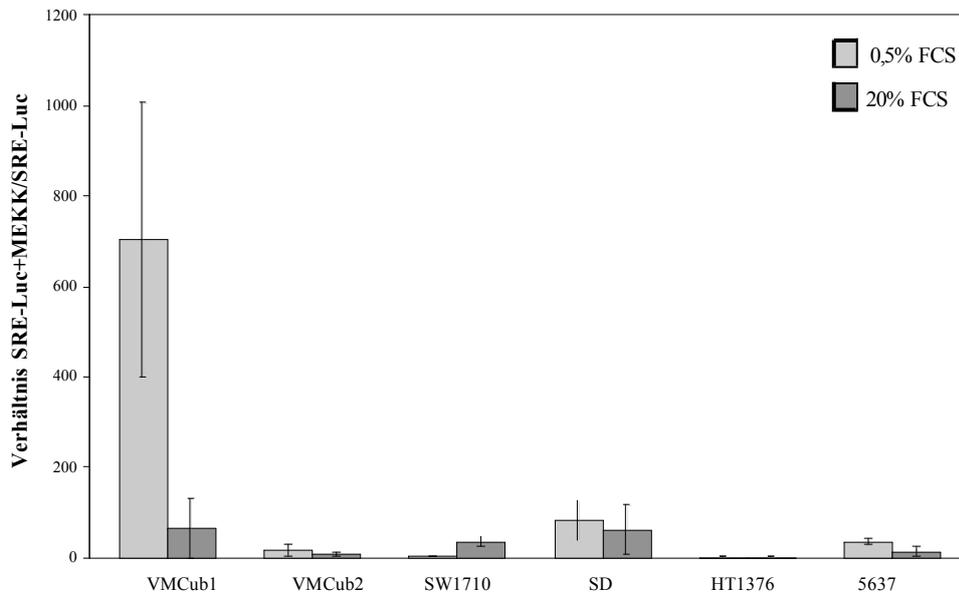


**Abb.4.1.6a/b** Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien unter Serumentzug. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion der MAPK-abhängigen Promotoren in den angegebenen Zelllinien. Die Aktivität von pLINEluc wurde als 1 und die Firefly-Luziferase-Expression dazu in Relation gesetzt. Die gepunktete Linie gibt die mittlere Aktivität des promotorlosen Luziferase-Vektors pGL3 an. Die dunklen Säulen zeigen die Promotoraktivitäten bei Medium mit 20% FCS, die hellen bei Medium unter Serumentzug mit 0,5% FCS.

**Abb.4.1.6** SRE-Luc

**Abb.4.1.6b** AP1-Luc

In den meisten Zelllinien sanken unter Serumentzug die Aktivitäten um das 2- bis 6-fache. Bei SW1710 jedoch verdoppelte sich die AP1-Luc Promotoraktivität. Bei HT1376 hatte der Serumentzug keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Die Werte reichten von  $0,6 \pm 0,02$  (SD) über  $9,56 \pm 0,9$  (SW1710) und  $16,98 \pm 11,2$  (HT1376).



**Abb.4.1.6c/d** Induktion der Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren durch MEKK4 in Harnblasenkarzinomzelllinien unter Serumentzug. Die Säulendiagramme enthalten die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der SRE-Luc- und AP1-Luc-Aktivität nach Co-Transfektion mit MEKK4 ins Verhältnis zur Basalaktivität gesetzt. Die dunklen Säulen zeigen die Promotoraktivitäten bei Medium mit 20% FCS, die hellen bei Medium unter Serumentzug mit 0,5% FCS. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 und somit ausbleibende Induktion an.

**Abb.4.1.6c** SRE-Luc  
**Abb.4.1.6d** AP1-Luc

Die Aktivität beider Promotoren konnte mit Ausnahme von VMcub1 unter Serumentzug kaum durch MEKK4 gesteigert werden. Der Induktionsquotient von SRE-Luc blieb unter Serumentzug in den Zelllinien SD, HT1376 auf gleichem Niveau. **Abb. 4.1.6c**

In VMcub2 und 5637 verdoppelte sich die Aktivität, in SW1710 sank die SRE-Luc-Aktivität jedoch sogar auf ein Zehntel des Wertes in Anwesenheit von Standardmedium ab. Allein in VMcub1 stieg unter Serumentzug der Induktionsquotient von SRE-Luc signifikant um das 10-fache auf  $703,6 \pm 303,3$  an ( $p = 0,04$ ).

AP1-Luc zeigte in VMcub1 eine noch deutlichere Zunahme. Die Aktivität stieg um das 15-fache von  $63,01 \pm 19,51$  auf  $927,2 \pm 886,2$  an. **Abb. 4.1.6d**

Die übrigen Zelllinien zeigten ein ähnliches Bild wie schon für SRE-Luc. In HT1376 und 5637 blieb die Aktivität bei den unterschiedlichen Serumkonzentrationen ungefähr gleich. In VMcub2 verdoppelte sich die Aktivität. In SW1710 sank der Induktionsquotient von AP1-Luc signifikant um das 15-fache ( $p = 0,046$ ).

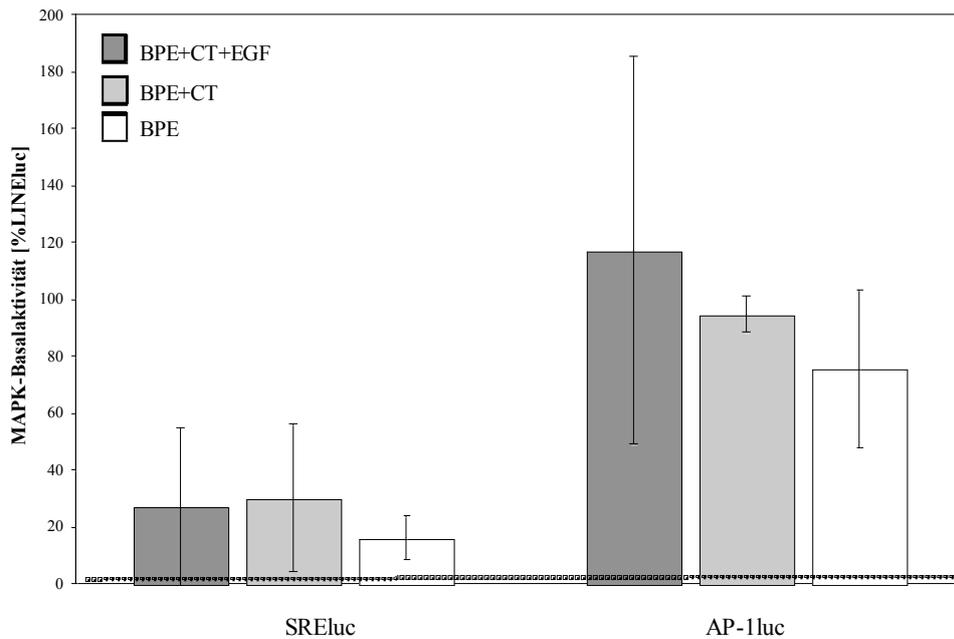
#### 4.1.7 Effekt von Serum auf Promotoraktivitäten in uroepithelialen Zellen

In den uroepithelialen Zellen wurden dem Kompletmedium nach der Transfektion einzelne Wachstumsfaktoren entzogen. Dem Kompletmedium wurde in einer Versuchsreihe nur EGF entzogen, in einer weiteren zusätzlich BPE.

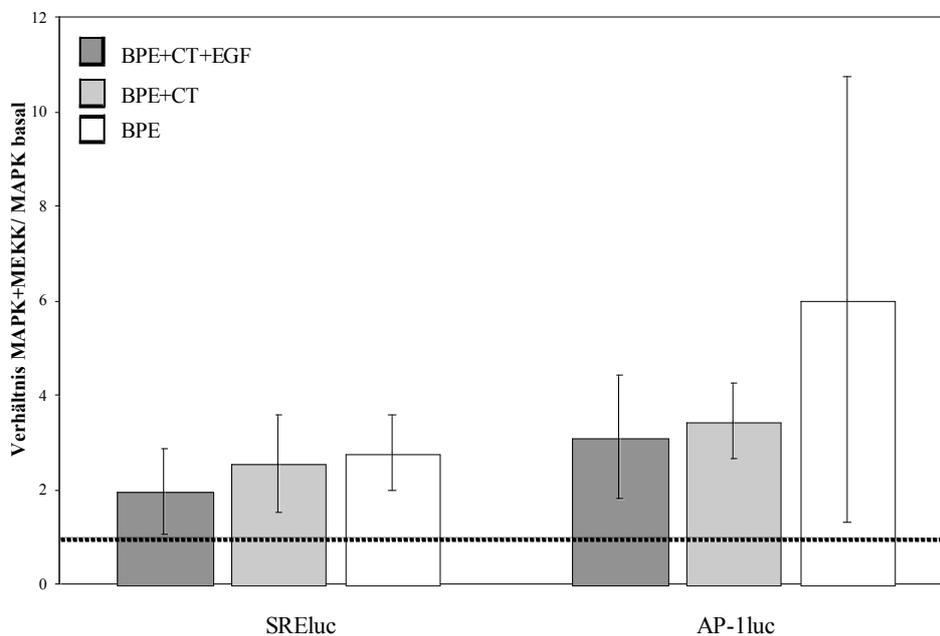
Unter beiden Bedingungen veränderte sich weder die SRE-Luc noch die AP1-Luc-Promotoraktivität deutlich. **Abb. 4.1.7a**

Unter Standardbedingungen lag die Basalaktivität von SRE-Luc bei  $27,3 \pm 27,7$  %, bei Medium ohne EGF bei  $30,3 \pm 25,7$  % und unter weiterem Entzug von BPE bei  $16,3 \pm 7,6$ %. Die AP1-Luc Promotoraktivität sank in Abwesenheit von EGF von  $117,1 \pm 68$  % unter Standardbedingungen auf  $94,9 \pm 6,6$  % und ohne EGF und BPE auf  $75,6 \pm 27,6$  %.

Die verschiedenen Serumzusätze zum Medium hatten auch auf die Aktivität beider Promotoren bei Co-Transfektion mit MEKK4 keinen großen Einfluss. **Abb. 4.1.7b** Der Induktionsquotient von SRE-Luc lag in Anwesenheit von Medium mit allen drei Serumzusätzen bei  $1,98 \pm 0,9$ , ohne EGF bei  $2,56 \pm 1,02$  und bei  $2,78 \pm 0,8$  bei weiterem Entzug von BPE. Der Induktionsquotient von AP1-Luc lag In Kompletserum bei  $3,12 \pm 1,3$ , ohne EGF bei  $3,45 \pm 0,8$  und bei zusätzlichem BPE-Entzug erhöhte sich der Induktionsquotient auf  $6,03 \pm 4,7$ .



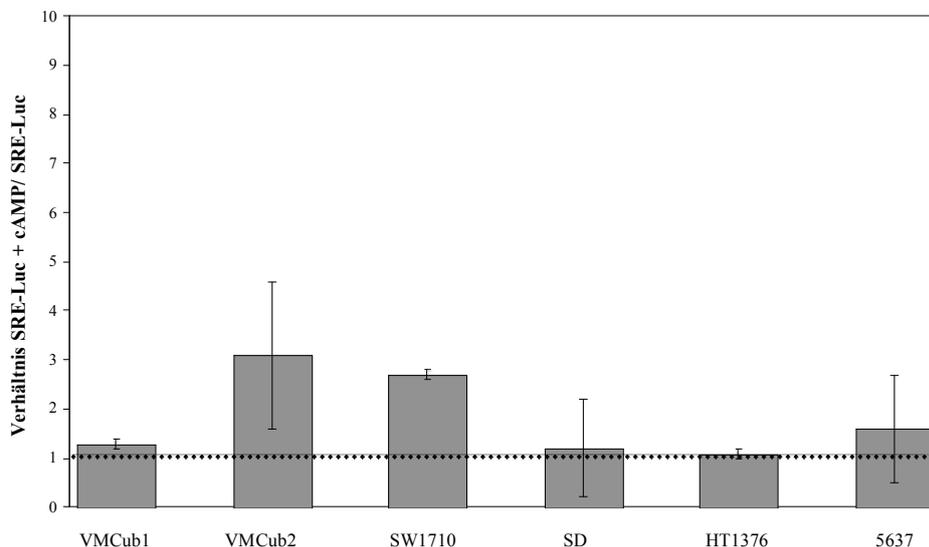
**Abb.4.1.7a** Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren in normalen uroepithelialen Zellen unter Wachstumsfaktorentzug. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion der MAPK-abhängigen Promotoren. Die gepunktete Linie gibt die mittlere Aktivität des promotorlosen Luziferase-Vektors pGL3 an. Die dunklen Säulen zeigen die Promotoraktivitäten bei Medium mit BPE, CT und EGF, die hellgrauen bei Medium mit BPE und CT und die weißen Säulen bei Medium mit BPE.



**Abb.4.1.7b** Induktion der Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren durch MEKK4 in normalen uroepithelialen Zellen unter Wachstumsfaktorentzug. Die Säulendiagramme enthalten die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der SRE-Luc- und AP1-Luc-Aktivität nach Co-Transfektion mit MEKK4 ins Verhältnis zur Basalaktivität gesetzt. Die dunklen Säulen zeigen die Promotoraktivitäten bei Medium mit BPE, CT und EGF, die hellgrauen bei Medium mit BPE und CT und die weißen Säulen bei Medium mit BPE.

#### 4.1.8 Effekt von cAMP auf Promotoraktivitäten in Harnblasenkarzinomzelllinien

cAMP soll als Aktivator der Proteinkinase A einen hemmenden Einfluss auf die MAPK-Signalwege haben. Als Reporterkonstrukt wurde SRE-Luc transfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden nach der Transfektion unter Standardbedingungen in 0,5 % FCS-Medium mit cAMP in der Konzentration von 5 mM überführt. cAMP hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die SRE-Luc-Aktivität. **Abb. 4.1.8** In den Zelllinien VMcub1, SD, HT1376 und 5637 lag die SRE-Luc-Aktivität im Bereich der Basalaktivität (+cAMP/ basal: VMcub1  $1,3 \pm 0,1$ , SD  $1,2 \pm 1,0$ , HT1376  $1,1 \pm 0,1$  und 5637  $1,6 \pm 1,1$ ). In den Zelllinien VMcub2 und SW1710 stieg die SRE-Luc-Aktivität in Anwesenheit von cAMP auf ungefähr das Dreifache des Basalwertes an (+cAMP/ basal: VMcub2  $3,1 \pm 1,5$ , SW1710  $2,7 \pm 0,1$ ).



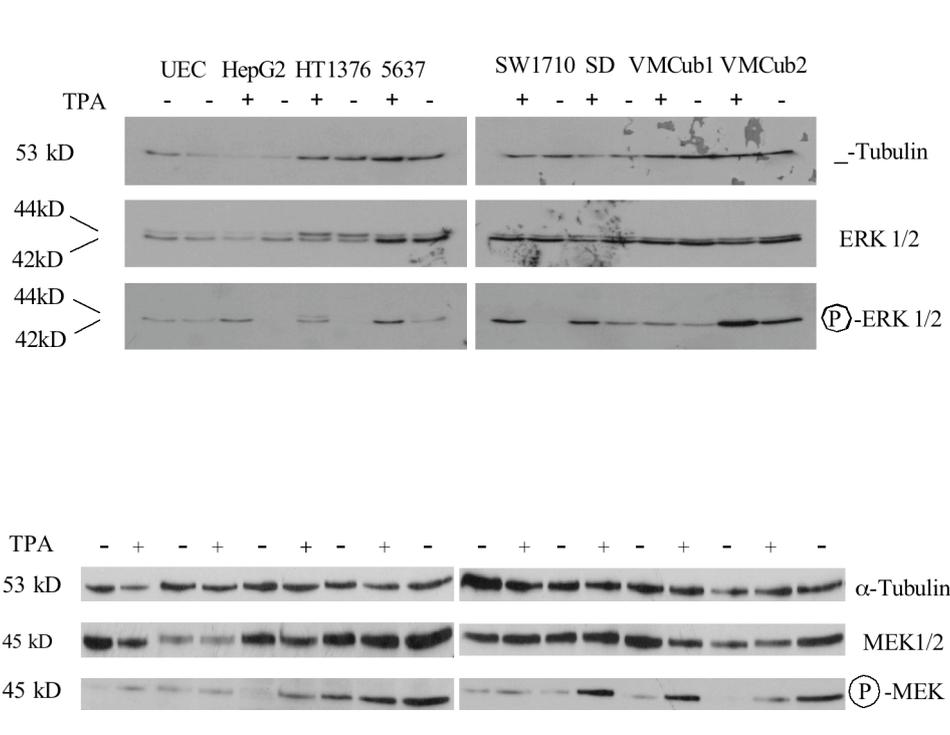
**Abb.4.1.8** Einfluss von cAMP auf die Aktivität MAPK-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion von SRE-Luc in Anwesenheit von cAMP in den angegebenen Zelllinien. Die Aktivität von pLINEluc wurde als 1 und die Firefly-Luziferase-Expression dazu in Relation gesetzt. Die gepunktete Linie gibt die mittlere Aktivität des promotorlosen Luziferase-Vektors pGL3 an.

#### 4.1.9 Expression von MAPKs in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der MAPK- Promotoraktivität wurde mittels Westernblots die Expression von Elementen der MAPKs in den Harnblasenkarzinomzelllinien VMcub1, VMcub2, SW1710, SD, HT1376, 5637 und in den Uroepithelzellen untersucht. Bei den Komponenten handelte es sich um ERK und MEK, die jeweils in Form zweier Isoenzyme 1 und 2 vorliegen. Um zunächst den Gesamtspiegel von ERK und MEK zu bestimmen, wurden

Antikörper benutzt, die sowohl phosphoryliertes wie auch unphosphoryliertes ERK/MEK banden.

In allen untersuchten Proben wurden beide Isoenzyme der ERKs, ERK1(p44) und ERK2(p42), exprimiert. **Abb. 4.1.9a, Tab. 4.1.9a** Mit Ausnahme von HT1376 exprimierten die Zellen vornehmlich ERK2. Dieses war quantitativ 2- bis 6-fach stärker nachweisbar als ERK1. In HT1376 jedoch war die ERK2-Bande fast doppelt so schwach wie die ERK1-Bande. SD lieferte erstaunlicherweise die höchsten ERK1- und ERK2-Werte, obwohl die MAPK-Promotoraktivität in SD mit am geringsten war. Im Vergleich zu HT1376, der Zelllinie mit der höchsten MAPK-Promotoraktivität unter den Harnblasenkarzinomzelllinien, war ERK2 in SD 8-fach stärker exprimiert.



**Abb.4.1.9a/b** Westernblotanalyse von MAPK in Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Der Westernblot wurde mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin (oben), gesamt MAPK1/2 (Mitte) und phosphorylierten MAPK1/2 (unten) durchgeführt. Die Lysate der angegebenen Zellen wurden einmal unbehandelt (-) und einmal für 15 min vorbehandelt mit 0,1  $\mu$ mol TPA (+) aufgetragen. Anti- $\alpha$ -Tubulin wurde als Kontrolle aufgetragen.

**Abb.4.1.9a** ERK1/2  
**Abb.4.1.9b** MEK1/2

Bei den uroepithelialen Zellen konnte sowohl in Anwesenheit von Komplettmedium wie auch unter EGF/CT-Entzug ERK1 und ERK2 detektiert werden, wobei auch hier ERK2 gegenüber ERK1 überwog. In Komplettmedium entsprach die ERK2-Menge ungefähr der Menge in SD, der Zelllinie mit dem höchsten ERK2 unter den Harnblasenkarzinomzelllinien. Unter Wachstumsfaktorentzug nahmen sowohl ERK2 als auch ERK1 um die Hälfte ab. HepG2, als Positivkontrolle aufgetragen, lieferte die stärksten ERK1- und ERK2-Banden. ERK2 war fast

doppelt so stark exprimiert wie bei SD, der stärksten Bande unter den Harnblasenkarzinomzelllinien.

MEK1/2 (p45) wurde ebenfalls in allen Harnblasenkarzinomzelllinien und in den normalen uroepithelialen Zellen exprimiert. **Abb. 4.1.9b, Tab. 4.1.9b** MEK1/2 war im Uroepithel etwas stärker exprimiert als in den Zelllinien. Die stärkste MEK1/2 Expression wies SW1710 auf. Diese lag etwa auf dem Niveau von den normalen uroepithelialen Zellen.

	ERK1	ERK1phos	ERK2	ERK2phos	ERK1 adjust.(%)	ERK1phos.adjust.(%)	ERK2 adjust.(%)	ERK2phos.adjust.(%)
NUZ+BPE	0,38		1,09	0,41	6		16	6
NUZ+Supp	0,61		2,25	0,75	9		34	11
HepG2+TPA	1,00	0,636	3,45	6,64	15	9,6	52	100
HepG2	1,37		4,79	0,11	21		72	2
HT1376+TPA	0,87	0,137	0,49	0,32	13	2,1	7	5
HT1376	0,71		0,37	0,03	11		6	0
5637+TPA	0,22	0,102	1,05	0,39	3	1,5	16	6
5637	0,31		1,64	0,18	5		25	3
SW1710 + TPA	0,64		2,23	2,05	10		34	31
SW1710	0,30		1,80	0,19	4		27	3
SD + TPA	0,91		1,76	2,96	14		27	45
SD	1,17		2,86	0,72	18		43	11
VMCub1+TPA	0,33		1,37	0,40	5		21	6
VMCub1	0,41		1,15	0,19	6		17	3
VMCub2+TPA	0,39		0,84	2,22	6		13	33
VMCub2	0,56		1,30	1,30	8		20	20

	MEK	MEKphos	MEK adjust.	MEK phos.adjust.
5637	0,51	0,01	66,2	1,3
5637+TPA	0,25	0,02	32,5	2,6
VMCub2	0,08	0,01	10,4	1,3
VMCub2+TPA	0,08	0,02	10,4	2,6
SD	0,28	0,004	36,4	0,5
SD+TPA	0,23	0,04	29,9	5,2
HepG2	0,67	0,05	87,0	6,5
HepG2+TPA	0,70	0,12	90,9	15,6
NUZ	0,77	0,22	100,0	28,6
VMCub1	0,34	0,06	13,3	2,4
VMCub1+TPA	1,45	0,23	56,9	9,0
HT1376	1,71	0,10	67,1	3,9
HT1376+TPA	2,92	1,67	114,5	65,5
SW1710	2,28	0,12	89,4	4,7
SW1710+TPA	0,63	1,30	24,7	51,0
BFTC	1,04	0,08	40,8	3,1
BFTC+TPA	0,43	0,38	16,9	14,9
NUZ	2,55	1,83	100,0	71,8

**Tab.4.1.9** OneD-Scan-Auswertung der Westernblotanalyse mit angegebenen Antikörpern. Absolute Messwerte der einzelnen MAPK-Expressionen wurden in Relation zum entsprechenden Messwert für die  $\alpha$ -Tubulinexpression gesetzt: MAPK (ERK1/2, phospho-ERK1/2, MEK1/2, phospho-MEK1/2)/  $\alpha$ -Tubulin (linke Spalte). Absolute Messwerte der MAPK-Expression in Relation zur  $\alpha$ -Tubulinexpression adjustiert auf höchsten Messwert = 100% (rechte Spalte).

**Tab.4.1.9a** ERK1/2

**Tab.4.1.9b** MEK1/2

#### 4.1.10 Expression aktiver MAPKs in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

Die aktive Form der MAPKs ließ sich durch Antikörper nachweisen, die spezifisch die phosphorylierte Form von ERK1/2 und MEK1/2 banden. Phosphoryliertes ERK2 ließ sich in allen Harnblasenkarzinomzelllinien und im Uroepithel nachweisen. **Abb. 4.1.9a, Tab. 4.1.9a** Die stärksten Banden wiesen das Uroepithel, VMCub2 und SD auf. HT1376 exprimiert die geringste Menge an phosphorylierten ERK2. Aktives ERK1 ließ sich weder in den Harnblasenkarzinomzelllinien noch im Uroepithel nachweisen. Die Kontrolle HepG2

exprimierte kein phosphoryliertes ERK1 und nur wenig phosphoryliertes ERK2. Phosphoryliertes MEK1/2 wurde in allen Proben detektiert, die Harnblasenkarzinomzelllinien exprimierten jedoch nur geringe Mengen an MEK1/2. **Abb. 4.1.9b, Tab. 4.1.9b** Wie schon beim ERK-Nachweis lieferte das Uroepithel die stärksten MEK-Banden. Die geringsten Mengen an MEK1/2 wurden in den Zelllinien SD und BTFC detektiert. Die Bande von SD war 55-mal schwächer als die des Uroepithels, in BTFC wurde 23-mal weniger phosphoryliertes MEK1/2 nachgewiesen als in der dazu aufgetragenen Uroepithelprobe. Die Schwäche der Phosphorylierung von ERK, insbesondere von ERK1, und von MEK1/2 deckt sich mit den Ergebnissen der Reporteranalyse für die Zelllinien, die auch nur eine geringe Basalaktivität aufwiesen. Die starke Aktivitätsdifferenz zwischen Uroepithel und den Harnblasenkarzinomzelllinien aus der Promotorstudie konnte jedoch durch die Westernblotanalyse nur bedingt bestätigt werden.

#### 4.1.11 Induktion der Expression aktiver MAPKs durch TPA

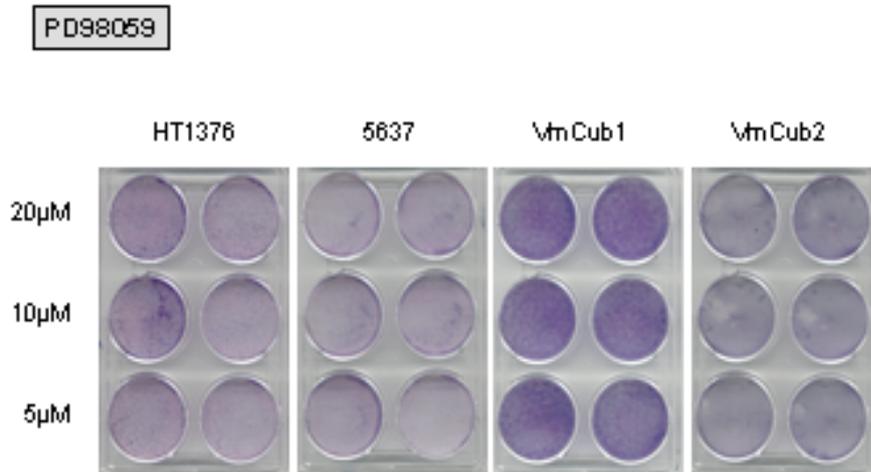
Analog zum Transfektionsversuch sollte TPA eine MAPK-Aktivierung induzieren und im Westernblot nachgewiesen werden. Nach 15 Minuten Inkubation mit 1  $\mu\text{mol}$  TPA konnte in allen Zelllinien eine Zunahme von phosphoryliertem ERK2 von bis zu 11-facher Stärke in SW1710 und HT1376 beobachtet werden. **Abb. 4.1.9a, Tab. 4.1.9a** Während aktives ERK1 in den Zellysaten ohne vorherige TPA-Zugabe nicht nachzuweisen war, exprimierten nun die Harnblasenkarzinomzelllinien HT1376 und 5637 phosphoryliertes ERK1. Aktives ERK2 war in der Positivkontrolle HepG2 nach TPA-Induktion 60-fach höher, aktives ERK1 konnte erst nach TPA-Induktion nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit TPA bewirkte in allen Zelllinien eine Zunahme von phosphoryliertem MEK1/2. **Abb. 4.1.9b, Tab. 4.1.9b** In den Zelllinien 5637 und VMCub2 verdoppelte sich die Menge an detektiertem MEK1/2, in den Zelllinien SD, HT1376 und SW1710 fand eine Verzehnfachung der gemessenen Werte statt.

#### 4.1.12 Effekt des MEK1/2-Inhibitor PD 98059 auf das Wachstum von der Harnblasenkarzinomzelllinien

Bei unterschiedlichen Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059 wurde das Proliferationsverhalten von vier repräsentativen Harnblasenkarzinomzelllinien, VMCub1, VMCub2, HT1376 und 5637 untersucht. In einem Vorversuch waren geeignete PD-Konzentrationen nach den Kriterien einer möglichst hohen Konzentration und minimalen Toxizität ermittelt. In den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  wurden die Zellen mit PD 98059

zwei Tage lang inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt. Die Färbung zeigte im Vergleich der Zelllinien untereinander eine unterschiedliche Zelldichte. Innerhalb einer Zelllinie ließen sich jedoch bei unterschiedlichen PD- Konzentrationen keine Unterschiede in der Zelldichte beobachten. **Abb. 4.1.12a**



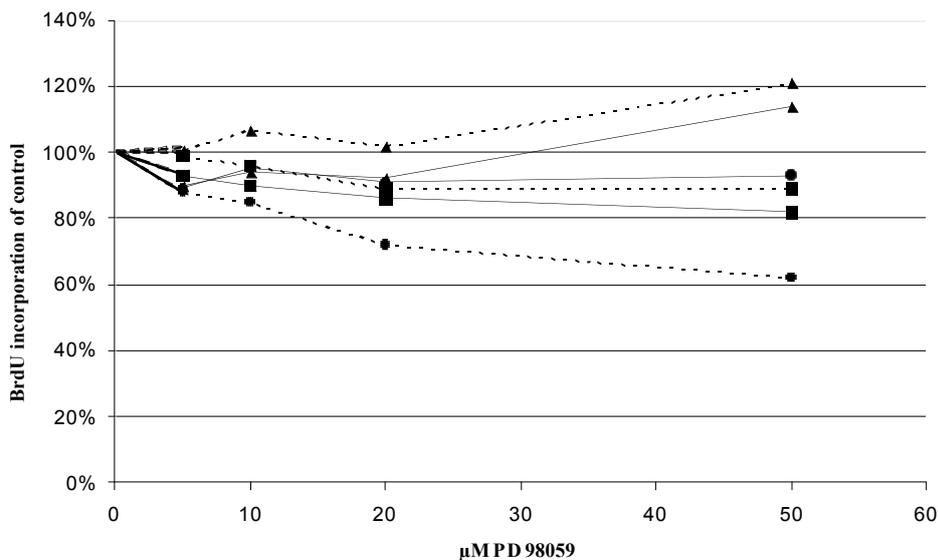
**Abb.4.1.12a** Giemsa-Färbung von Harnblasenkarzinomzelllinien nach Inkubation mit PD 98059. Inkubation der Zelllinien mit PD 98059 in den angegebenen Konzentrationen für 2 Tage.

Als nächstes wurde als Maß für die DNA-Synthese die BrdU-Inkorporation bei unterschiedlichen PD98059 Konzentrationen innerhalb von 48 Stunden gemessen. Bei PD-Konzentrationen von 0, 5, 10, 20 und 50  $\mu\text{M}$  wurde die BrdU-Inkorporation der Zelllinien SD, HT 1376 sowie der uroepithelialen Zellen untersucht. Eine Versuchsreihe fand in Anwesenheit von Kompletts serum, eine unter Serumentzug (0,5% FCS) bzw. in Fall der Uroepithelzellen unter Wachstumsfaktorentzug (ohne EGF und CT) statt. Die Inkubation der Zellen mit dem MEK-Inhibitor erfolgte für 6 Stunden. 24 Stunden nach Zellaussaat wurde die BrdU-Inkorporation bestimmt.

In Anwesenheit von Kompletts serum hatte PD98059 auf die DNA-Synthese der Uroepithelzellen wie auch der Zelllinien SD und HT1376 keinen starken Einfluss. In HT 1376 nahm mit steigender PD-Konzentration die BrdU-Inkorporation geringfügig bis auf 82% der Ausgangswerte ab. In SD stieg die BrdU-Inkorporation auf 114% an. In den uroepithelialen Zellen sank bei steigender PD-Konzentration die BrdU-Inkorporation bis auf 93%.

#### **Abb. 4.1.12b**

Unter Wachstumsfaktorentzug sank jedoch in den uroepithelialen Zellen die BrdU-Inkorporation unter Wachstumsfaktorentzug deutlich auf 62 % der Werte unter Standardbedingungen. In den Harnblasenkarzinomzelllinien war der Unterschied geringer. In HT1376 sank die BrdU-Inkorporation auf 89% ab, in SD stieg sie auf 121% an.



**Abb.4.1.12b** Einfluss von PD98059 auf die DNA-Synthese in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Die DNA-Synthese wurde mittels BrdU-Inkorporation über 24 h bestimmt. Die Zugabe von PD98059 erfolgte 6 Stunden vor der Messung in den angegebenen Konzentrationen. Durchgezogene Linie: komplettes Medium, durchbrochene Linie: 0,5% Serum (HKZ) bzw. BPE (NUZ), Kreis: NUZ, Viereck: HT1476, Dreieck: SD.

## 4.2 Aktivität der IL-6/STAT in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

### 4.2.1 Experimentelles Vorgehen

Die Aktivität STAT/IL-6-vermittelter Signalwege wurde in sechs unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzelllinien (VMCub1, VMCub2, SW1710, SD, HT1376 und 5637) und in normalen uroepithelialen Zellen untersucht. Für die Analyse der Signalwege diente ebenfalls die Reporteranalyse, nach dem unter 4.1.1 erläuterten Prinzip. Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in komplettem Medium, d.h. mit 15% FCS, kultiviert. Die uroepithelialen Zellen wuchsen in Kultur in vollständigem Medium, d.h. unter Zusatz von BPE, EGF und Cholera-toxin.

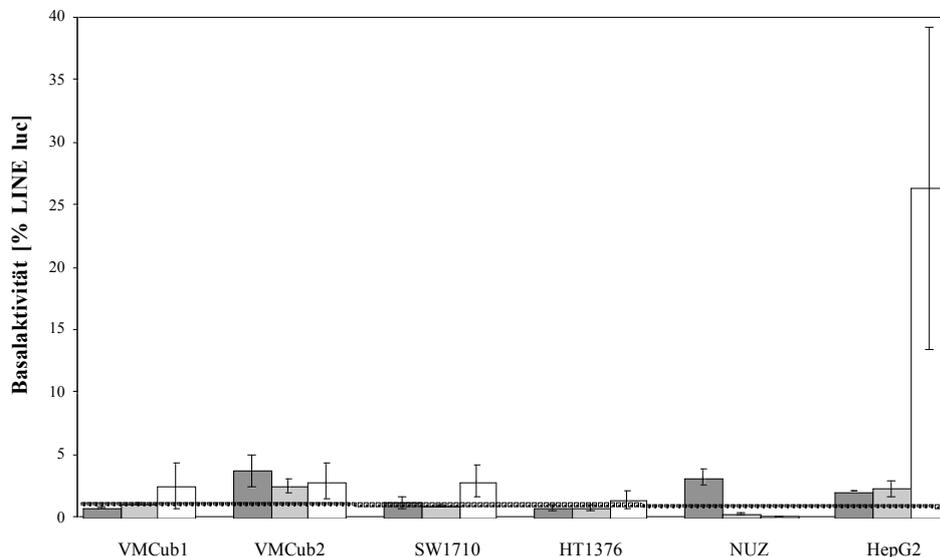
Ergänzend wurde die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 als Kontrolle herangezogen. **Tab. 4.1.1** Für den IL-6/ STAT-Signalweg wurden eine STAT1- und zwei unterschiedliche STAT3-Sequenzen eingesetzt. **Abb. 1.2.3, Abb. 4.1.1** Die Sequenzen waren jeweils in mehrfacher Kopie mit einem Basalpromotor kombiniert. Die Promotoren steuerten auch hier die Expression des Reportergens, welches für die Luziferase aus *Photinus pyralis* kodierte. Die Plasmide pSTA3-TA-Luc und pGL3- $\alpha$ 2M(-215)Luc enthalten STAT3-Sequenzen, wobei jedoch die Sequenz aus dem Promotor des  $\alpha$ 2 Makroglobulin zusätzlich leberspezifisch kontrolliert wird. Das Plasmid pGAS-TA-Luc enthält STAT1-Sequenzen. Analog zum Transfektionsmodell beschrieben in 4.1.1 wurde auch hier eine Co-Transfektion mit TKRL

zur Angleichung der Transfektionseffizienz durchgeführt. Die Aktivität von LINEluc diente als Bezugsgröße. Die promotorlosen Luziferasevektoren pGL-3 und pTA-Luc wurden zur Bestimmung der Hintergrundaktivität mitgeführt.

#### 4.2.2 Bestimmung der STAT-Signalweg-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen

In den untersuchten Zelllinien VMCub1, VMCub2, SW1710, SD, 5637, HT1376 und in den uroepithelialen Zellen konnte keine deutliche Aktivität der STAT-abhängigen Promotoren nachgewiesen werden. Die Promotoraktivität lag nur im Bereich der Hintergrundaktivität.

**Abb. 4.2.2** Bei STAT3-TA-Luc lag die Aktivität zwischen  $0,65 \pm 0,05\%$  des LINEluc in VMCub1 und  $3,7 \pm 1,33\%$  in VMCub2. Die Uroepithelzellen besaßen eine Promotoraktivität von  $3,2 \pm 0,6\%$ . Bei GAS-TA-Luc reichte das Aktivitätsniveau der Zelllinien von  $0,7 \pm 0,2\%$  des LINEluc in HT1376 bis  $2,5 \pm 0,65\%$  in VMCub2. Die Aktivität der Normalzellen war mit  $0,3 \pm 0,1\%$  am geringsten. Die Aktivität von  $\alpha 2M$ -Luc war mit  $0,04 \pm 0,01\%$  am niedrigsten in den uroepithelialen Zellen. Die höchste Aktivität wurde in VMCub2 und SW1710 mit  $2,9 \pm 0,34\%$  bzw.  $\pm 1,28\%$  gemessen.



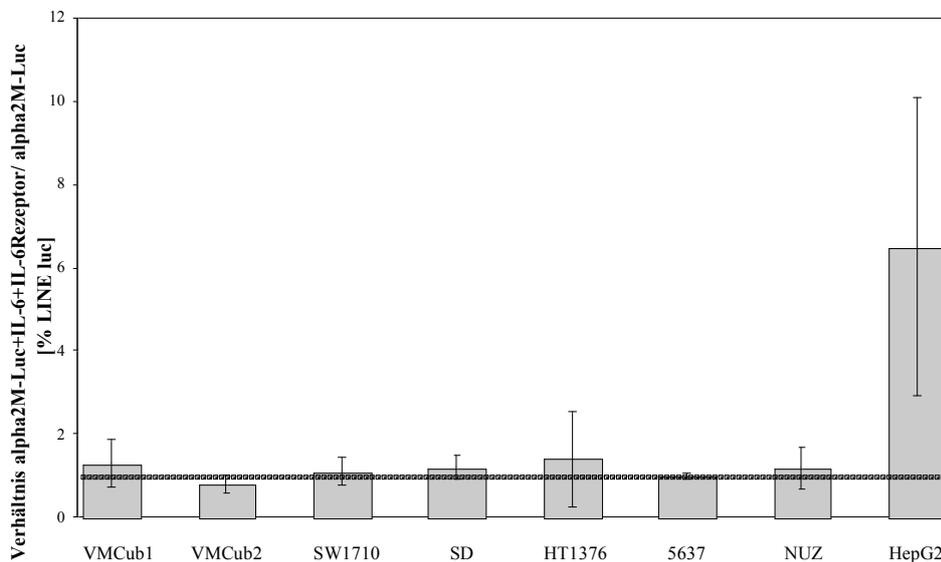
**Abb.4.2.2** Aktivität IL-6/STAT-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen (NUZ). Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion der Promotoren (dunkelgrau: pSTAT3-TA-Luc, hellgrau: pGAS-TA-Luc, weiß:  $\alpha 2M$ -Luc) in den angegebenen Zelllinien, uroepithelialen Zellen und der Kontrollzelllinie HepG2. Nach Korrektur der Transfektionseffizienz wurde die Aktivität von pLINEluc als 1 und die Firefly-Luziferase-Expression dazu in Relation gesetzt. Die gepunktete Linie gibt die mittlere Aktivität des promotorlosen Luziferase-Vektors pGL3 an. Diese lag in den einzelnen Zelllinien zwischen 0,2 -1% des pLINEluc.

In der Kontrollzelle HepG2 lag die Aktivität von STAT3-TA-Luc bei  $2,05 \pm 0,05$ , die von GAS-TA-Luc bei  $2,25 \pm 0,25$ . Das zusätzlich mit einem leberspezifischen Element ausgestattete Plasmid  $\alpha 2M$ -Luc zeigte in der Hepatoblastom-Zelle HepG2 wie erwartet eine deutliche Aktivität von  $26,3 \pm 12,9\%$ .

#### 4.2.3 Induktion IL-6/STAT- vermittelter Signalwege durch IL-6 + IL-6-Rezeptor

Der STAT3-abhängige Promotor  $\alpha 2M$ -Luc wurde unter Standardbedingungen transfiziert. 24 Stunden vor der Zellyse wurde dem Medium IL-6-Rezeptor [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] und IL-6 [ $200 \text{ U/ml}$ ] zugefügt.

In den Harnblasenkarzinomzelllinien konnte jedoch die  $\alpha 2M$ -Luc-Aktivität nicht signifikant induziert werden. **Abb. 4.2.3** Die Induktionsquotienten lagen zwischen  $0,8 \pm 0,23$  in VMcub2 und  $1,4 \pm 1,13$  in HT1376. Die Aktivität nahm somit teilweise sogar ab. In den uroepithelialen Zellen zeigte sich dasselbe Bild. Eine Induktion fand auch hier nicht statt. Der Induktionsquotient betrug  $1,2 \pm 0,5$ . Allein in HepG2 stieg die Aktivität von  $\alpha 2M$ -Luc deutlicher als in den Harnblasenkarzinomzelllinien an. Der Induktionsquotient betrug  $6,5 \pm 3,59$ .



**Abb.4.2.3** Aktivierung IL-6/STAT -abhängiger Promotoren durch IL-6 und IL-6-Rezeptor in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Induktion der Aktivität des Reporterplasmids  $\alpha 2M$ -Luc durch IL-6 -Rezeptor [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] und IL-6 [ $200 \text{ U/ml}$ ]. Das Säulendiagramm enthält die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\alpha 2M$ -Luc-Aktivität Verhältnis zur Basalaktivität. Kontrollzelle war HepG2. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 und somit ausbleibende Induktion an.

## **4.3 Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin vermittelten-Signalweges in Harnblasenkarzinomzelllinien und uroepithelialen Zellen**

### **4.3.1 Experimentelles Vorgehen**

Die Aktivität des Wnt-/ $\beta$ -Catenin vermittelten Signalweges wurde wie die beiden anderen Signalwege mittels Reporteranalyse in den Harnblasenkarzinomzelllinien VMCub1, VMCub2, SW1710, SD, HT1376 und 5637 untersucht. Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in komplettem Medium, d.h. mit 15% FCS, kultiviert.

Eine Auflistung von Charakteristika der einzelnen Zelllinien findet sich in **Tabelle 4.1.1**.

Zur Analyse des Wnt-/ $\beta$ -Catenin vermittelten Signalwegs wurden Plasmide mit TCF-Bindungsstellen verwendet. Diese lagen wie schon bei den anderen Plasmiden in mehrfacher Kopie vor und waren mit einem Basalpromotor kombiniert. Das Topflash-Plasmid enthielt Wildtyp-TCF-Sequenzen, das Plasmid Fopflash mit mutierten TCF-Sequenzen diente als Negativkontrolle. **Abb. 1.2.2, Abb. 4.1.1**

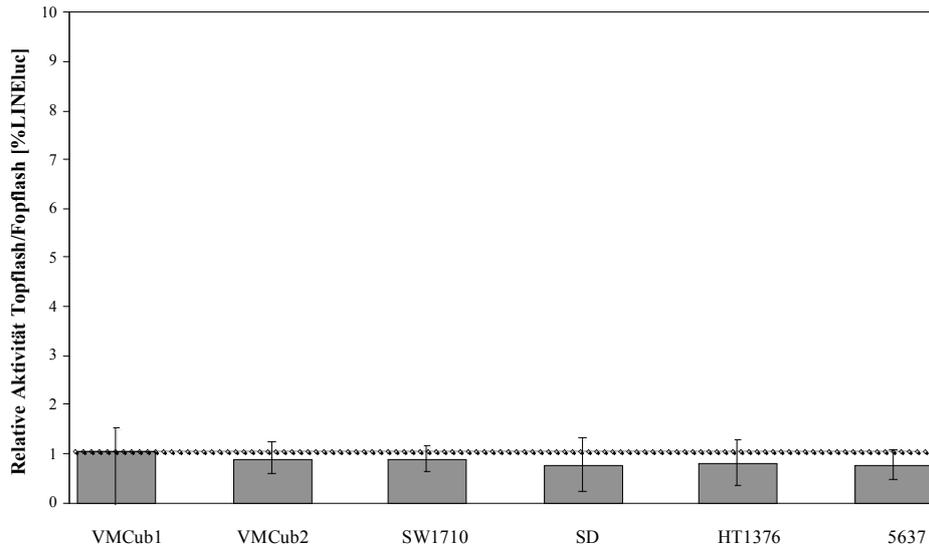
### **4.3.2 Bestimmung der Wnt-Signalweg-Basalaktivität in Harnblasenkarzinomzelllinien**

Die Harnblasenkarzinomzelllinien wurden jeweils mit Topflash und Fopflash unter Standardbedingungen transfiziert. Die Aktivität des Wildtyp-TCF-Plasmids Topflash wurde zur Aktivität der Negativkontrolle Fopflash ins Verhältnis gesetzt und als relative Aktivität angegeben. In keiner der sechs untersuchten Zelllinien konnte eine deutliche Aktivität von Topflash nachgewiesen werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Top- und Fopflash. **Abb. 4.3.2**

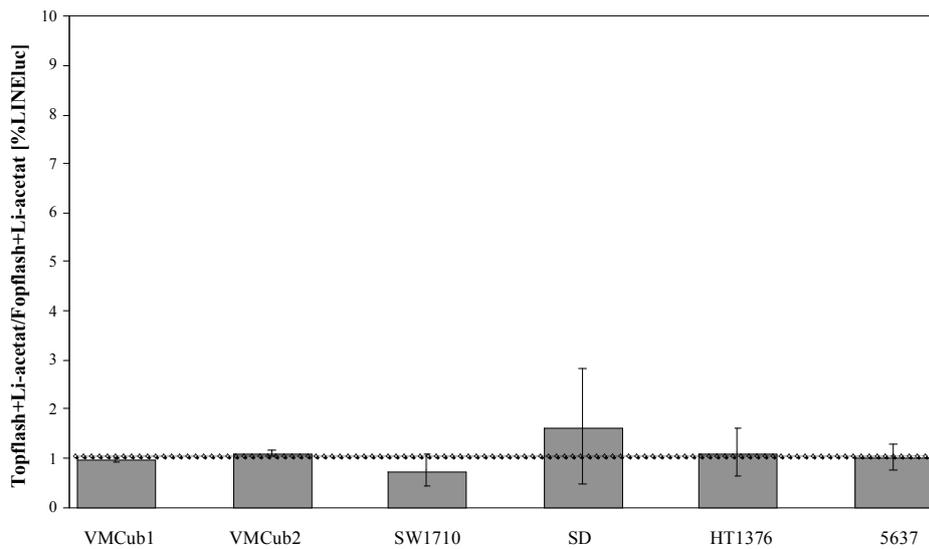
### **4.3.3 Induktion der Wnt-Signalweg-Basalaktivität durch Lithiumacetat**

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen transfiziert. Zur Induktion der Topflash-Aktivität wurden die Zellen in Medium mit Lithiumacetat in der Konzentration 2 mM inkubiert. In einem Vorversuch war eine geeignete Konzentration für Lithiumacetat ermittelt worden. Als Kontrolle diente das Fopflash-Plasmid mit mutierter TCF-Bindungsstelle.

Auch in Anwesenheit von Lithium ließ sich keine Aktivitätssteigerung induzieren. Die Promotoraktivitäten von Topflash und der Kontrolle Fopflash unterschieden sich nicht von den Basalaktivitäten. **Abb. 4.3.3**



**Abb.4.3.2** Aktivität Wnt-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion des Wildtyp-TCF-abhängigen Promotors (Topflash) und des mutierten TCF-abhängigen Promotors (Fopflash) in den angegebenen Zelllinien. Nach Korrektur der Transfektionseffizienz wurde die Aktivität von Topflash in Relation zur Negativkontrolle Fopflash gesetzt. Die gepunktete Linie gibt ein Verhältnis Topflash zu Fopflash gleich 1 an.



**Abb.4.3.3** Aktivierung Wnt-abhängiger Promotoren durch Lithiumacetat in Harnblasenkarzinomzelllinien. Induktion der Aktivität der Reporterplasmide Topflash und Fopflash durch Lithiumacetat [2 mM]. Arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der Topflash-Aktivität in Anwesenheit von Lithiumacetat ins Verhältnis gesetzt zur Fopflash-Aktivität. Die gepunktete Linie gibt das Verhältnis 1 an.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Der MAPK-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen

Als wichtigster mitogener Signalweg gilt der kanonische MAPK-Signaltransduktionsweg, der sowohl in vielen Zelltypen unter physiologischen Bedingungen wie auch in vielen Tumoren für die Zellproliferation essentiell ist. Bekannte Onkogene wie Ras oder Wachstumsfaktoren vermitteln ihre Wirkung auf die Zellproliferation über MAPKs. Zurzeit befinden sich bereits Inhibitoren der MAPK im Stadium klinischer Studien, um zum Beispiel die ungehemmte Zellproliferation von Tumoren zu verhindern. (Hilger et al. 2002)

In Harnblasentumoren sind einige Wachstumsfaktorrezeptoren, Proteine in den mitogenen Signaltransduktionswegen und Regulatoren des Zellzyklus, sowie andere Proteine, die Proliferation und Differenzierung regulieren, als mutiert oder überexprimiert beschrieben. (Billerey et al. 2001; Knowles 2001; Sibley et al. 2001a; Zhang et al. 2001; Shinohara and Koyanagi 2002; Raghavan 2003). Man ging daher bisher davon aus, dass wie in anderen Tumoren intrazelluläre Signaltransduktionswege, wie der MAPK-Signalweg, in Harnblasentumoren für das Tumorstadium eine große Rolle spielen. Darauf gründet sich die Hoffnung, dass Inhibitoren dieser Signalwege für die Therapie des Harnblasenkarzinoms einen Fortschritt in Hinblick auf Effizienz und Selektivität bringen könnten. Untersuchungen zur tatsächlichen Aktivität von Signaltransduktionswegen in Harnblasentumoren gibt es jedoch kaum. Vor allem der Hauptvertreter der mitogenen Signaltransduktionswege, der MAPK-Weg, ist im Harnblasenkarzinom bisher nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in normalen Urothelzellen der MAPK-Signalweg bei der Zellproliferation tatsächlich eine wichtige Rolle spielt. Die durch den MAPK-Signalweg spezifisch aktivierten Promotoren mit SRE- und AP-1-Elementen waren in proliferierenden normalen uroepithelialen Zellen hoch aktiv. Durch das spezifische MAPK-Aktivator-Protein MEKK4 konnte die Basalaktivität nur noch geringfügig induziert werden. Dieses spricht für eine nahezu maximale Basalaktivität in den normalen uroepithelialen Zellen. Unter Einfluss des spezifischen MAPK-Inhibitor PD98059 konnte zudem eine deutliche Abnahme der DNA-Syntheserate in den normalen Urothelzellen beobachtet werden. Auch wenn von normalen Urothelzellen *in vitro* nicht direkt auf den *in vivo* Zustand geschlossen werden kann, so zeigen diese Befunde doch, dass elementare Komponenten des MAPK-Signalwegs in normalen Urothelzellen vorhanden und aktiv sind. Es ist daher anzunehmen, dass die Proliferation der normalen uroepithelialen Zellen in Kultur bei

deutlicher Aktivität des MAPK-Signalwegs als dem Hauptvertreter der mitogenen Signaltransduktionswege über diesen vermittelt wird. Für eine Übertragung auf die Verhältnisse *in vivo* müssten weitere Versuche, wie eine Untersuchung der Expression von MAPKs in proliferierendem humanen Uroepithel während eines Regenerationsprozesses folgen.

Erstaunlicherweise wiesen dagegen etablierte Harnblasenkarzinomzelllinien gar keine bis wenig Aktivität von SRE und AP-1 auf. Zwar war die AP-1-Aktivität in den Harnblasenkarzinomzelllinien geringfügig höher als die SRE Aktivität, doch bewegte sich die MAPK-Aktivität insgesamt auf einem sehr niedrigen Niveau, geringfügig über der Hintergrundaktivität. Eine konstitutive Aktivierung von MAPKs kann daher als entscheidender Faktor für die Proliferation in den Harnblasenkarzinomzelllinien weitgehend ausgeschlossen werden. Dies könnte bedeuten, dass der MAPK-Signalweg auch in urothelialen Tumoren nicht an der Tumorgenese, speziell an der gesteigerten Zellproliferation beteiligt ist. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die geringe Basalaktivität *in vitro* auf fehlende MAPK-Aktivatoren unter Kulturbedingungen zurückzuführen ist, die möglicherweise *in vivo* vorhanden sein können.

Eine konstitutive MAPK-Aktivierung in den untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien wäre jedoch aufgrund diverser genetischer Veränderungen, die in Harnblasenkarzinomzelllinien bekannt sind, nahe liegend gewesen.

Die hier untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien entsprechen, abgesehen von der Zelllinie BFTC905, fortgeschrittenen Stadien des Harnblasenkarzinoms. Bekanntermaßen findet man bei ihnen gehäuft eine Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR und ERBB2 und eine Überexpression von Grb2 und SOS. (Watanabe et al. 2000)

Einige enthalten *RAS*-Mutationen, die alle Stadien des Harnblasenkarzinoms gleichermaßen betreffen. Die Angaben zur Häufigkeit von *RAS*-Mutationen im Harnblasenkarzinom schwanken zwischen 6% und 84%. (Shinohara and Koyanagi 2002)

Die genaue Rolle von Ras in der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms ist jedoch aufgrund der Schwankungsbreite seiner Häufigkeit noch kontrovers. Die hier untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien besitzen keine *RAS*-Mutation. Zwei Zelllinien, T24 und EJ, mit bekannter *RAS*-Mutation konnten aufgrund schlechter Transfektionseffizienz leider nicht untersucht werden. Interessanterweise zeichnen diese sich im Vergleich zu anderen Zelllinien durch eine erhöhte MAPK-Phosphorylierung aus. (Hoshino et al. 1999)

Die geringe MAPK-Basalaktivität in den hier untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien verdeutlicht somit einmal mehr die große Variabilität der genetischen Veränderungen

innerhalb des Harnblasenkarzinoms, die zu einem sehr unterschiedlichen spontanen klinischen Verlauf und unterschiedlichen Ansprechen auf Therapien führt.

Die Tatsache, dass die Basalaktivität durch den spezifischen Aktivator MEKK4 in einigen Harnblasenkarzinomzelllinien deutlich induziert werden konnte, belegt die prinzipielle Intaktheit der MAPK-Signalkaskaden in den Harnblasenkarzinomzelllinien und schließt somit einen methodischen Fehler aus.

Eine Sonderrolle unter den Zelllinien nimmt BFTC905 ein, welche von einem Tumor mit papillären Wachstumsmuster abstammt. Papilläre Urothelkarzinome weisen typischerweise gehäuft eine Überexpression von aktivierendem *FGFR* und *H-RAS*-Mutation auf. (Zhang et al. 2001) Dabei scheinen *RAS* und *FGFR3*-Mutationen alternativ im gleichen Entwicklungsweg bei der Genese von papillären Harnblasentumoren zu wirken, da sie anscheinend in papillären Tumoren nicht gleichzeitig auftreten. (Jebar et al. 2005) Die erste *H-RAS*-Mutation überhaupt wurde übrigens in der Zelllinie T24 beschrieben. (Capon et al. 1983) Die Relevanz des MAPK-Signalwegs für die Tumorphiliferation papillärer Urothelkarzinome und damit auch für die Zelllinie BFTC905 ist daher nahe liegend, auch wenn oder vielleicht gerade weil in ihr keine *RAS*-Mutation bekannt ist. Doch erstaunlicherweise wies BFTC905 wie die anderen untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien keine signifikante MAPK-Basalaktivität auf. Diese konnte auch nur minimal (AP-1) bis überhaupt nicht (SRE) induziert werden. Demnach scheinen in BFTC905 Veränderungen der Wachstumsfaktoren beziehungsweise der MAPK-Signaltransduktion für die Tumorphiliferation irrelevant zu sein. Man kann daher vermuten, dass nicht bei allen papillären Tumoren *RAS*-Mutationen und Wachstumsfaktorüberexpressionen für die Zellproliferation entscheidend sind oder sekundär durch weitere Mutationen unerheblich gemacht werden. (Braig et al. 2005)

Desweiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen die Beeinflussbarkeit der MAPK-Aktivität durch externe Stimuli untersucht. Eine Reduktion der Wachstumsfaktorkonzentration im Serum um das 30-fache führte in den Harnblasenkarzinomzelllinien weder zu einer größeren Änderung der SRE- noch der AP-1-Promotoraktivität. Ebenso war die Induktion von SRE durch isolierte Erhöhung der EGF-Konzentration im Serum mäßig stark. Die Aktivität von SRE und AP-1 und damit des MAPK-Signalwegs scheint daher in den Harnblasenkarzinomzelllinien weitgehend unabhängig von externen Stimuli zu sein. Da in den meisten Zelllinien eine MAPK-Induktion durch Transfektion von MEKK4 gelungen war, liegt möglicherweise eine Unterbrechung der Signalkaskade auf dem Weg zwischen Zelloberfläche und Zytoplasma vor. Die ausbleibende Induktion durch EGF könnte jedoch auch dadurch begründet sein, dass eine Induktion durch

EGF unter Umständen transient und kürzer ist, wie es in Fibroblasten beobachtet wurde. (Akashi and Nishida 2000) Eine erfolgte transiente Induktion nach EGF-Stimulation wäre somit in dem hier gewählten Versuchsaufbau mit einer Messung nach 42 Stunden nicht mehr nachzuweisen gewesen.

Die normalen uroepithelialen Zellen wurden ebenso wenig durch unterschiedliche Wachstumsfaktorkonzentrationen in ihrer MAPK-Aktivität beeinflusst. Dies überrascht, da in den NUZ eine hohe MAPK-Basalaktivität nachgewiesen wurde und somit ihr Proliferationsverhalten zumindest zum Teil über diese reguliert zu sein scheint. Verantwortlich hierfür könnte jedoch eine autokrine Stimulation der uroepithelialen Zellproliferation durch beispielsweise HB-EGF oder Amphiregulin als endogenen Liganden mit Aktivierung des EGFR sein. (Freeman et al. 1997; Varley et al. 2005) Dies deckt sich ebenso mit den Ergebnissen von Steinhoff et al., 2001, wonach in denselben untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien eine autonome Zellproliferation nachgewiesen wurde. Unter Serumentzug zeigte sich in den Harnblasenkarzinomzelllinien keine signifikante Änderung der Proliferationsrate gegenüber komplettem Medium. Im Vergleich dazu verringerten die normalen uroepithelialen Zellen ihre Proliferation, wenn man dem Kulturmedium Wachstumsfaktoren entzog.

Die geringe Basalaktivität der MAPK in den Harnblasenkarzinomzelllinien könnte beispielsweise dadurch bedingt sein, dass der MAPK-Signaltransduktionsweg auf zellulärer Ebene hemmenden Einflüssen durch Cross-Talk, wie zum Beispiel Phosphatasen oder inhibitorischen Phosphorylierungen durch andere Signaltransduktionswege ausgesetzt ist. Die Zelle hätte sich damit konstitutiv aktivierenden Signalen über diesen Weg entzogen, die nicht nur Zellproliferation, sondern auch beispielsweise Differenzierung und Seneszenz auslösen können. Grund für die trotzdem ungehemmte Zellproliferation müssten dann entweder andere zelluläre Veränderungen beispielsweise auf nukleärer Ebene oder eine autokrine Stimulation anderer Signaltransduktionswege wie dem Wnt-Weg oder dem STAT-Weg sein. Möglicherweise sind in den Karzinomzellen Sicherungsmechanismen zur Hemmung der unkontrollierten Proliferation ausgeschaltet, die beispielsweise in den normalen Uroepithelzellen noch vorhanden sind. Diese zeigen nämlich auch bei permanenter Aktivität der Signaltransduktionswege nur ein begrenztes Wachstum in Kultur.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit für die geringe MAPK-Aktivität besteht in den zum Teil sehr unterschiedlichen Funktionen der MAP-Kinasen. Zum einen übernehmen die einzelnen MAPK-Signalkaskaden verschiedene Funktionen. Während die ERK-vermittelte Kaskade primär proliferative Effekte ausübt, vermittelt die JNK-vermittelte Kaskade typischerweise apoptotische Effekte. Eine geringe AP1-Aktivität könnte demnach in den

Harnblasenkarzinomzelllinien ein geringes apoptotisches Potential der Zellen widerspiegeln. Doch selbst die typischerweise proliferationsinduzierende ERK-Kaskade induziert in sich ambivalente Prozesse in der Zelle.

Je nach Intensität und Dauer der Signale führt eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade entweder zu Proliferations- oder Differenzierungsprozessen. (Fang and Richardson 2005); (Chang et al. 2003a) Somit könnte eine niedrige Basalaktivität der MAPKs auch Ausdruck für herabregulierte Differenzierungssignale dieser Signalkaskade sein.

Schaut man sich die Transfektionsergebnisse im Detail an, weisen die Zelllinien für die SRE-Aktivität ein ähnliches Verteilungsmuster wie für die AP-1-Aktivität auf. (Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,98$ ). Zwar ist die hohe Korrelation durch den isoliert stehenden Wert der normalen Urothelzellen bedingt. Die isolierte Betrachtung der Harnblasenkarzinomzelllinien-Werte ergibt jedoch einen ebenso anschaulichen Zusammenhang, auch wenn die Korrelation weniger deutlich ausfällt (Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,66$ ). Diese Korrelation deutet darauf hin, dass die beiden Zweige des MAPK-Signaltransduktionswegs in allen Zellen urothelialen Ursprungs ähnlich konstituiert sind.

Grund hierfür kann die synergistische Funktion beider Promotoren sein. SRE als Element des c-FOS-Promotors wird klassischerweise über ERKs aktiviert. Da nur eine geringe SRE-Aktivität (fast ausschließlich im Bereich der Hintergrundaktivität liegend) in den Harnblasenkarzinomzelllinien nachzuweisen war, scheint eine über c-FOS-Induktion vermittelte Zellproliferation unwahrscheinlich. AP-1 als heterodimerer Transkriptionsfaktor setzt sich unter anderem aus c-FOS und c-JUN zusammen. Über c-FOS besteht die enge Anbindung an die ERK vermittelte Signalkaskade der Proliferationssteuerung. Über Elemente wie c-JUN ist AP-1 jedoch darüber hinaus in andere MAPK-Signalkaskaden wie den JNK-Signalweg integriert, die mit Stressreaktionen und Apoptose in Verbindung stehen. Die Aktivität von AP-1 war dabei bei allen Zelllinien geringfügig (ungefähr 2-3mal) höher als die SRE-Aktivität. Grund hierfür können die Aktivierungsmöglichkeiten von AP-1 (aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung des Heterodimeren Faktors) über andere MAPK-Signalkaskaden sein. Beispielsweise existiert neben der RAS-abhängigen JNK-Aktivierung durch EGF, wie bei ERK, auch eine RAS-unabhängige Aktivierung über TNF- $\alpha$ . Eine weitere Erklärung könnte eine erhöhte Aktivität von MAP-Kinase-Phosphatasen sein, die unter anderem über die Inhibition von ERK einen negativen feedback-Mechanismus ausüben. (Cobb 1999)

Als Kontrollen in diesen Experimenten wurden Mammakarzinomzelllinien herangezogen. SK-Br3 weist beispielsweise eine Überexpression von *ERBB2/HER2* auf. ERBB-Rezeptoren geben ihre Informationen hauptsächlich über zwei Signaltransduktionskaskaden, dem MAP-

Kinase Signalweg und dem PI3K-AKT-Signalweg weiter. Demnach wäre hier eine MAPK-Aktivität zu erwarten gewesen. Es fand sich jedoch nur eine geringe MAPK-Basalaktivität, die jedoch durch MEKK4 deutlich induziert werden konnte. Es scheinen daher möglicherweise inhibitorische Einflüsse/ negative Feedback-Mechanismen „oberhalb“ von MEKK zu existieren. Der intakte zelluläre MAPK-Signalweg kann daher mit Hilfe des spezifischen Aktivators MEKK4 reaktiviert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit neueren Ergebnissen, nach denen in Tumorzellen mutierte EGF-Rezeptoren ihre Signale hauptsächlich über die PI3K-Signalkaskade vermitteln. (Hynes and Lane 2005)

Neben MEKK4 wurden weitere potentielle Aktivatoren der MAPKs untersucht.

TPA führt über Aktivierung der Proteinkinase C zur Raf-1-Aktivierung. Dieser Mechanismus aktiviert ERK stärker als JNK und wirkt auf den AP-1-Promotor. Abgesehen von kleineren Schwankungen fiel die TPA-Induktion sowohl im Vergleich der Zelllinien als auch von SRE und AP-1 relativ homogen aus. Mit maximaler Induktion auf das 8-fache des Ausgangswertes nach 16 h Inkubation lag sie deutlich unter den MEKK-Induktionswerten. Grund hierfür könnte die geringere Aktivität der ERKs gegenüber der JNKs sein, die schon beim Vergleich der Basalaktivität zwischen SRE und AP-1 zu vermuten war. Dies steht im Einklang damit, dass TPA ERK stärker als JNK stimuliert.

Zur Überprüfung der Transfektionsergebnisse wurden Expression und Phosphorylierung der MAPKs untersucht. Dies geschah durch Westernblotanalyse von MEK1/2 und ERK1/2 Expression, insbesondere von ihren phosphorylierten, d.h. aktivierten Formen.

MEKs konnten sowohl in den normalen uroepithelialen Zellen wie auch in den Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Bei gleichen Molekulargewichten von 45 kDa lassen sich keine separate Banden für MEK 1 und 2 detektieren.

MEK1/2 war quantitativ am stärksten in den normalen uroepithelialen Zellen nachweisbar. Dies deckt sich mit den Transfektionsergebnissen, wo auch die normalen Uroepithelzellen die höchste Aktivität aufwiesen. Der Phosphorylierungsgrad der unstimulierten MEK in den Harnblasenkarzinomzelllinien unterschied sich geringfügig von dem nach den Transfektionsergebnissen zu vermutenden. Beim Vergleich der Zelllinien untereinander wiesen jedoch die Zelllinien HT1376 und SW1710 weiterhin die stärksten Aktivitäten auf.

Die Analyse des Phosphorylierungszustands der MEKs lieferte noch deutlichere Ergebnisse. Phosphoryliertes MEK1/2 war in bis zu 60-facher Stärke (im Vergleich zu SD) in den Proteinlysaten der normalen uroepithelialen Zellen nachzuweisen. Alle Proben der Harnblasenkarzinomzelllinien zeigten geringere Mengen an aktivierten MEKs.

In Anwesenheit von TPA zeigten erstaunlicherweise alle Harnblasenkarzinomzelllinien abgesehen von VMCub1 und HT1376 eine deutliche Reduktion der detektierten Menge an

Gesamt-MEK1/2. Dies könnte einmal auf eine möglicherweise zelltoxische Wirkung von TPA zurückzuführen sein. Diese war schon im Transfektionsversuch festgestellt worden. Nach 40 h Inkubationszeit mit TPA kam es im Vergleich zu 16 h Inkubationszeit zu einem deutlichen Rückgang der Promotoraktivitäten. Eine andere Erklärung wäre ein durch TPA ausgelöster negativer Feedback-Mechanismus, welcher zu einer Abnahme an detektierbarer MEK1/2 führt.

Die Westernblotanalyse von phosphoryliertem MEK1/2 nach Inkubation mit TPA lieferte jedoch die erwarteten Ergebnisse einer Intensitätszunahme der detektierten Banden. Die stärkste Induktion verzeichnete HT1376 mit einer 23-fachen Intensitätszunahme der Bande.

In der ERK-Analyse ließen sich in den Proteinlysaten bei 42 und 44 kDa sowohl ERK1 wie auch ERK2 detektieren. Sowohl in den normalen uroepithelialen Zellen als auch in den Harnblasenkarzinomzelllinien konnte überall ERK2, jedoch kaum ERK1 nachgewiesen werden. Allein die Zelllinie HT1376 wies eine stärkere Expression von ERK1 als ERK2 auf. Bei wahrscheinlich synergistischer Funktion von ERK1 und ERK2 könnte es sich hierbei um einen gewebsspezifisch bedingten Expressionsunterschied handeln.

Aktiviertes ERK1 konnte gar nicht detektiert werden. Aktiviertes ERK2 war ohne einen deutlichen quantitativen Unterschied sowohl in den Harnblasenkarzinomzelllinien als auch in den normalen Uroepithelzellen vorhanden. Während jedoch auf Promotorebene alle Karzinomzelllinien eine deutlich niedrigere MAPK-abhängige Aktivität als die normalen Zellen aufwiesen, war ERK2 in den Zelllinien SD und VMcub2 genauso stark phosphoryliert wie in den normalen Zellen. Die dennoch geringere Promotoraktivität deutet daraufhin, dass der Signalfluss zwischen ERK und nukleären Transkriptionsfaktoren unterbrochen ist. Offenbar kann diese Unterbrechung jedoch durch hohe MEKK4-Aktivität aufgehoben werden, da diese zu einer Induktion von Promotoraktivität führt. Demnach hinge die Aktivität des MAPK-Signalwegs nicht nur von der ERK-Phosphorylierung, sondern noch weiteren Schritten ab. Dies steht im Einklang mit neueren Erkenntnissen zur Regulation des Signalswegs über ‚Scaffold-Proteine‘, Ankerproteinen und Kerntransportfaktoren. Scaffold-Proteine sind so genannte Gerüstproteine, die durch Formation von Multienzymkomplexen einzelne Komponenten der MAPK-Signalkaskade zusammenführen und die Genauigkeit der Signalweitergabe sicherstellen. Mehrere Scaffold-Proteine wurden bereits identifiziert. Davon sind in Säugetieren MP1 (MEK Partner 1) und KSR1 (Kinase Suppressor von RAS) für die ERK-Kaskade relevant. (Pouyssegur and Lenormand 2003) Zudem ist der Übertritt von ERK in den Zellkern nicht allein vom Phosphorylierungsschritt abhängig. Kerntransportfaktoren wie das Importin oder der NPC (nuclear pore complex) begünstigen die ERK-Translokation in den Zellkern. Ankerproteine wie Sef (similar expression to fgf genes) oder PEA-15 sind im

Zytoplasma lokalisiert und können spezifisch den Übertritt von ERK in den Zellkern hemmen. Dadurch ist trotz ERK-Phosphorylierung eine Hemmung der MAPK-Aktivität im Zellkern oder eine Begrenzung der Wirkung auf das Zytoplasma möglich. (Preger et al. 2004; Kondoh et al. 2005)

Ebenso belegt die Induktion von MAPK-Aktivität durch TPA auch auf Proteinebene die Intaktheit der Signalkaskade trotz geringer/fehlender Aktivität unter Standardbedingungen. In allen Zelllinien erhöhte sich die detektierbare Menge sowohl an aktivierten wie auch nicht aktiviertem ERK.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass der MAPK-Weg in den Harnblasenkarzinomzelllinien zwar intakt, jedoch kaum aktiv ist. Einzelne Komponenten weisen zwar wie ERK2 in VMcub2 eine erhöhte Aktivität auf, jedoch führt dies nicht zu erhöhter Transkriptionsaktivität. Dies verdeutlicht einmal mehr die Komplexität der Signaltransduktionswege. Die einzelnen Signalkaskaden stehen unter dem Einfluss diverser Einflüsse sowohl aktivierender wie auch inhibitorischer Art. Dazu bestehen unter Signaltransduktionswegen negative Feedback-Mechanismen. MEK hat unter anderem die Funktion ERK im Zytoplasma zu binden und dessen Übertritt in den Zellkern und die damit verbundene MAP-abhängige Aktivierung auf nuklearer Ebene zu verhindern. Ähnliche Funktionen haben Ankerproteine wie die oben bereits erwähnten Proteine Sef und PEA-15. Auf jeder Ebene der MAPK-Signalkaskade existieren negative Regulatoren wie die Phosphatasen. Bei Säugetieren scheint die DUSP6/MKP-3 besonders relevant zu sein. Diese dephosphoryliert ERK und bildet somit einen negativen Feedback-Mechanismus auf ERK-Ebene. (Furukawa et al. 2003; Li et al. 2003)

Zum Abschluss wurden bekannte Inhibitoren des MAPK-Signalwegs ausgetestet, da ihre Anwendung das Ziel molekulargenetischer Untersuchungen an Signaltransduktionswegen wie dem MAPK-Signalweg ist.

Zum einen wurde ein Cotransfektionsversuch mit cAMP durchgeführt. cAMP hemmt über Aktivierung der PKA (Proteinkinase A) die Interaktion zwischen Raf und Ras. (Wilson et al. 1998; Akashi and Nishida 2000; Franklin and McCubrey 2000) Die Anwesenheit von cAMP hatte jedoch auf die MAPK-Promotoraktivität in den Harnblasenkarzinomzelllinien keinen Einfluss.

Des weiteren wurde der spezifische MEK-Inhibitor PD 98059 in den Harnblasenkarzinomzelllinien ausgetestet, dessen Derivate bereits in klinischen Studien bezüglich ihrer antiproliferativen Wirkung auf Tumore untersucht werden. (Alessi et al. 1995; Dudley et al. 1995) In den ausgetesteten Harnblasenkarzinomzelllinien konnte jedoch in Anwesenheit des Inhibitors keine Änderung des Proliferationsverhaltens der Zellen

festgestellt werden, während er auf das Wachstum der normalen Urothelzellen einen starken inhibitorischen Effekt ausübte. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse scheinen Inhibitoren des MAPK-Signalweges somit nicht generell ein geeignetes Target für gezielte molekulare Therapieansätze beim Harnblasenkarzinom zu sein. Vielmehr ist eine „target orientated drug therapy“ sinnvoll, in der anhand detaillierter Informationen zu jedem einzelnen Tumor ein geeigneter (molekulargenetischer) Angriffspunkt für eine kausale Therapie ausgewählt wird.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der MAPK-Signaltransduktionsweg für die Proliferation der untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien nicht essentiell ist. Es konnte weder eine deutliche Basalaktivität nachgewiesen werden, noch war die MAPK-Aktivität durch exogene Stimuli stark beeinflussbar. Spezifische Inhibitoren wie PD98059 hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Zellproliferation der Harnblasenkarzinomzelllinien. Es ist daher zu vermuten, dass der MAPK-Signaltransduktionsweg auch in den uroepithelialen Tumoren, die durch die verwendeten Zelllinien repräsentiert werden, keine Relevanz für die Tumorzellproliferation hat. Trotz beschriebener genetischer Veränderungen von Komponenten des MAPK-Signaltransduktionswegs führen diese offensichtlich in vielen Harnblasenkarzinomen nicht zu einer gesteigerten MAPK-vermittelten Zellproliferation.

Im Gegensatz zu den Harnblasenkarzinomzelllinien wiesen die normalen Uroepithelzellen in Kultur eine deutliche MAPK-Basalaktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass der MAPK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich auch *in vivo* die Zellproliferation von normalen Uroepithelzellen beeinflusst.

Über welche Inhibitoren/ inhibitorische Mechanismen der MAPK-Signaltransduktionsweg in den Harnblasenkarzinomzelllinien so stark reprimiert ist, bleibt noch zu untersuchen. Ebenso bleibt offen, welche genetischen Veränderungen letztendlich für die Zellproliferation in den Harnblasenkarzinomzelllinien und im weiteren im Harnblasenkarzinom verantwortlich sein können. In Frage kommen andere Signaltransduktionswege, die zu einer De-Regulation der Zellproliferation führen oder Veränderungen auf der Zellzyklusebene, wie zum Beispiel RB-Defekte. Letztere sind in den untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien bekannt. RB hat unter anderem eine regulatorische Funktion in der RAS-vermittelten Signalweitergabe. Unter Einfluss von RB induziert RAS den Übertritt der Zelle von der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>/S-Phase. Ebenso ist eine Inhibition von RAS mit konsekutivem G<sub>1</sub>-Arrest abhängig von aktiviertem hypophosphoryliertem RB bekannt. Demnach sind die Funktionen von Signaltransduktoren und Zellzyklusregulatoren eng miteinander verknüpft. (Mittnacht et al. 1997; Peeper et al. 1997)

Daher wurden im Folgenden andere Signaltransduktionswege untersucht, die alternativ zum MAPK-Signalweg als mögliche Wachstumsmediatoren in Frage kommen.

## **5.2 Der STAT-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen**

Der STAT-Signalweg vermittelt klassischerweise Signale für Apoptose, Differenzierung und Zellproliferation. Diese werden von Zytokinen wie Interferonen oder Interleukinen, aber auch von Wachstumsfaktoren zum Zellkern weitergeleitet, wo entsprechende Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Der STAT-Signaltransduktionsweg und andere wie der MAPK- Signaltransduktionsweg bilden über „Cross-talk“ ein komplexes intrazelluläres Informationsnetzwerk. Da der STAT-Signaltransduktionsweg neben seiner Vernetzung mit anderen Proliferationssignalwegen auch direkten Einfluss auf Zielgene der Zellzyklusregulation wie *c-MYC* hat, wurde der STAT-Signaltransduktionsweg in den Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen hinsichtlich einer möglichen Relevanz für die Zellproliferation beim Harnblasenkarzinom untersucht. Dabei zeigten sich in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen identische Ergebnisse.

In den Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen konnte weder die Basalaktivität eines STAT1-abhängigen Promotors noch die von zwei STAT3-abhängigen Promotoren detektiert werden. Die als Positivkontrolle transfizierte Hepatoblastomzelllinie HepG2 zeigte nur in einem der beiden STAT3-abhängigen Promotoren, dem  $\alpha$ -2M-Promotor eine deutliche Basalaktivität. Weder der zweite STAT3-abhängige „minimal-TA-Promotor“ noch der STAT1-abhängige Promotor wiesen in HepG2 eine detektierbare Aktivität auf. Der Grund für die unterschiedliche Aktivität der beiden STAT-abhängigen Promotoren liegt darin, dass es sich beim  $\alpha$ -2M um einen natürlichen Promotor handelt. Dieser ist gewöhnlich in Hepatozyten und daher auch in Hepatoblastomzellen aktiv. Die Ursache für die erhöhte  $\alpha$ -2M-Aktivität in HepG2-Zellen muss daher auf die Kopplung des STAT3-abhängigen Response-Elements an leberspezifische Elemente zurückgeführt werden, die in der Hepatoblastom-Zelllinie aktiviert sind. Diese Kopplung bewirkt eine Signalverstärkung und damit deutliche Detektierbarkeit von STAT3-Promotoraktivität.

Im Allgemeinen handelt es sich bei den STAT-Faktoren um relativ schwache Transkriptionsfaktoren, die erst in Kombination mit anderen Faktoren/ Signaltransduktionswegen eine effiziente Transkriptionsaktivität erzeugen. (Heinrich et al.

1998; Schulz 2005) Erst die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder die Aktivierung der STATs durch andere Signaltransduktionswege wie den MAPKs potenziert die primären STAT-aktivierenden Stimuli und führt so zu einer effektiven Transkriptionsfaktoraktivierung. (Aaronson and Horvath 2002) Dieses erklärt, dass es nur in HepG2 zu einer Aktivierung des Alpha-2M-Promotors durch STAT3 kommt, nicht aber zu einer Aktivierung eines isolierten STAT3-Promotors. In den Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen sind keine entsprechenden Co-Aktivatoren zu erwarten. Es ist nicht bekannt, welche Transkriptionsfaktoren und Signalwege speziell in urothelialen Zellen mit STAT-Faktoren interagieren. Daher lässt sich mit der hier verwendeten Methodik offenbar nicht sicher bestimmen, in welchem Umfang der STAT-Signaltransduktionsweg in den Harnblasenkarzinomzelllinien und in den normalen uroepithelialen Zellen aktiv ist und die Zellproliferation beeinflusst. Alternativ müsste der Phosphorylierungszustand von STAT-Faktoren oder ihre Bindung an DNA direkt untersucht werden. Doch das Beispiel des MAPK-Signaltransduktionswegs zeigt (vgl. Abschnitt 4.1.10), das auch nicht immer aus dem Phosphorylierungszustand auf die Promotoraktivität geschlossen werden kann.

Gegen eine wichtige Funktion des STAT-Signaltransduktionswegs spricht, dass sich die STAT-Aktivität am  $\alpha$ -2M-Promotor mit STAT3-Element in den Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen nicht induzieren ließ. Die Anwesenheit des IL-6/IL-6-Rezeptor-Komplexes führte zu keiner weiteren Steigerung der Promotoraktivität. Bei Zunahme der STAT-Aktivität durch IL-6+IL-6-Rezeptor in HepG2 erwies sich dort die JAK/STAT-Signalkaskade als intakt.

Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass eine Induktion der STAT-abhängigen Promotoren, mit Hilfe des gewählten Versuchsaufbaus nicht detektiert werden kann. Eine Erklärung für eine falsch negativ detektierte STAT-Aktivität in den Harnblasenkarzinomzelllinien wäre die Beobachtung, dass in vielen Systemen die STAT-Aktivierung transient ist. (Heinrich et al. 1998; Bowman et al. 2000) Eine transiente Aktivierung von unter Umständen nur Minuten bis wenigen Stunden wäre womöglich bei einer Messung nach 24 Stunden Inkubation mit IL-6+IL-6-Rezeptor, wie es in diesem Versuchsaufbau geschah, nicht mehr ausreichend messbar. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass bei einem relevanten Einfluss transientser STAT-Aktivität auf die Zellproliferation der Harnblasenkarzinomzelllinien nach 24 Stunden anders als in der Zelllinie HepG2 keine detektierbare Restaktivität vorhanden ist.

Da im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch nur die Induktion durch IL-6 untersucht wurde, bleibt zu untersuchen, ob in den Harnblasenkarzinomzelllinien eine STAT-Aktivierung durch andere Mediatoren als IL-6 erfolgen kann. Neben Zytokinen der IL-6-Familie, zu denen beispielsweise IL-11, OSM (Oncostatin M), oder CT-1 (Cardiotrophin-1) gezählt werden,

sind die STAT-Faktoren nämlich ebenso in die Signalweitergabe von Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF involviert. (Jove 2000; Silva 2004)

Falls der der STAT-Signaltransduktionswege in uroepithelialen Zellen tatsächlich inaktiv ist, bleibt zu untersuchen, ob er grundsätzlich für die Zellproliferation irrelevant ist oder ob er durch inhibitorische Effekte aktiv reprimiert ist. Dabei sind verschiedene Möglichkeiten der Negativregulation denkbar. In Frage kämen negative Feedback-Inhibitoren wie die SOCS, Inhibition durch andere Signaltransduktionswege (Cross-Talk) oder ein Abbau des Agonist-Rezeptorkomplexes durch Endozytose, wie er beim IL-6-R-Komplex beobachtet wurde. (Heinrich et al. 1998). Wie MAP-Kinasen üben auch STAT-Faktoren neben Proliferationseffekten andere Effekte aus. BCG (Bacillus Calmette-Guerin), welches als sehr effektives adjuvantes Agens in der Therapie von oberflächlichen Harnblasentumoren eingesetzt wird, wirkt interessanterweise über Stimulation der IL-6-Expression in einigen Urothelkarzinomen antiproliferativ. Über IL-6 abhängige Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF-IL-6 und NF $\kappa$ B wird dadurch eine komplexe immunologisch-entzündliche Reaktion ausgelöst. (Chen et al. 2002)

### **5.3 Der Wnt-Signalweg in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen**

Während der MAPK- und STAT-Signaltransduktionswege klassische Signaltransduktionswege der Zellproliferation sind, reguliert der Wnt-Signalweg Zelldifferenzierung und Gewebehomöostase. Auch bei diesem Weg führen Mutationen beispielsweise im Colonkarzinom zu ungehemmter Zellproliferation und sind damit für die Tumorgenese verschiedener Gewebe entscheidend. Zudem wird ihm eine Funktion bei der Erhaltung von Gewebestammzellen zugeschrieben. (Reya and Clevers 2005)

Die untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien wiesen jedoch allesamt keine Basalaktivität des Wnt-abhängigen Promotors TCF auf. Die Ergebnisse konnten im Rahmen einer anderen Arbeit wiederholt werden. (Thievessen et al. 2003) Die dort untersuchte Zelllinie HepG2 diente als Positivkontrolle und wies wie erwartet eine deutliche TCF-Basalaktivität auf. Damit konnte ein methodischer Fehler des Versuchsaufbaus ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse in den Harnblasenkarzinomzelllinien belegen, dass dort die Zellproliferation unabhängig vom Wnt-Signaltransduktionsweg ist. Das Ergebnis kann darauf hindeuten, dass nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* das Wachstum von urothelialen Tumoren vom Wnt-Signaltransduktionsweg unbeeinflusst ist. Nicht auszuschließen ist jedoch wie schon bei den

anderen beiden bereits diskutierten Signaltransduktionswegen, dass unter den Kulturbedingungen für die einzelnen Signaltransduktionswege essentielle Mediatoren nicht vorhanden sind und es dadurch zu falsch negativen Ergebnissen führt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die weitgehend autonome Zellproliferation der Harnblasenkarzinomzelllinien nicht auf einer autokrinen Stimulation durch Wnt-Faktoren oder auf einer Aktivierung intrazellulärer Wnt-abhängiger Mediatoren beruht.

Mittels Lithiumacetat, welches die Aktivität der GSK3 $\beta$  hemmt, sollte die Aktivitätsmöglichkeit des Wnt-Signaltransduktionswegs in den Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht werden. (Hedgepeth et al. 1997) Die Hemmung der GSK3 $\beta$  führt zu einer Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins und somit zu einer Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs auf Höhe des Destruktionskomplexes aus Axin, APC und  $\beta$ -Catenin. Durch Lithiumacetat konnte jedoch keine signifikante Aktivitätssteigerung in den untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien erreicht werden. Grund hierfür kann eine zytotoxische Wirkung von Li<sup>+</sup> auf die Zelllinien sein. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass ab einer bestimmten Lithiumacetatkonzentration im Serum (10 mM) die Zelldichte deutlich abnahm. (Thievensen, 2003) Möglicherweise beruht die zytotoxische Wirkung darauf, dass die GSK3 $\beta$  neben ihrer Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg weitere zelluläre Funktionen wie in der Regulation des Glykogenstoffwechsels oder in der Regulation der Proteinkinase B, welche das Zellüberleben beeinflusst. (Harwood 2001; Mora et al. 2001)

Jedoch gelang in zwei Zelllinien, SW1710 und 5637, mittels Transfektion von konstitutiv aktivem  $\beta$ -Catenin die Induktion der TCF-Promotoraktivität. Die anderen Karzinomzelllinien zeigten keine erhöhte Promotoraktivität. Dies könnte bedeuten, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg in den Zelllinien ausgenommen SW1710 und 5637 unterhalb des Komplexes aus GSK3 $\beta$ , Axin, APC und  $\beta$ -Catenin reprimiert ist.

In normalen uroepithelialen Zellen konnte wie in den Harnblasenkarzinomzelllinien ebenfalls keine Basalaktivität nachgewiesen werden. (Thievensen 2003) Eine Induktion durch konstitutiv aktives  $\beta$ -Catenin gelang ebenfalls nicht. Damit unterscheidet sich der Wnt-Signaltransduktionsweg vom MAPK-Signaltransduktionsweg, der in den normalen uroepithelialen Zellen deutlich aktiv war. Während der MAPK-Signaltransduktionsweg möglicherweise *in vivo* die Proliferation von normalen Uroepithelzellen beeinflusst, könnte die fehlende Basalaktivität des Wnt-Signaltransduktionswegs in den normalen uroepithelialen Zellen bedeuten, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg *in vivo* nicht an Vorgängen der urothelialen Gewebshomöostase und Tumorgenese beteiligt ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Mutationsanalysen von Harnblasenkarzinomzelllinien und primären urothelialen

Harnblasentumoren. Die in anderen Tumoren am häufigsten mutierten Wnt-Komponenten APC und  $\beta$ -Catenin wiesen hier keine Mutationen auf und waren auf normalem Niveau exprimiert. (Stoehr et al. 2002)

Grund hierfür können die zelltypischen Eigenschaften des Urothelkarzinoms sein, die es von anderen Tumoren mit bekannter Wnt-Aktivität, wie dem Colonkarzinom, unterscheiden. Möglicherweise sind Signaltransduktionswege wie der Wnt-Signaltransduktionsweg, die stammzellerhaltenden Charakter haben, im Urothelkarzinom nicht mehr aktiv, da dieses aus Zellen mit bereits fortgeschrittenem Differenzierungsstatus besteht.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In Urothelkarzinomen findet man auf unterschiedlichen Ebenen genetische Veränderungen, die für die ungehemmte Zellproliferation und Tumorprogression verantwortlich zu sein scheinen. Wachstumsfaktoren, Onkogene, und Tumorsuppressorgene sind als die Tumorproliferation, -progression beeinflussende Faktoren identifiziert worden. Die intrazelluläre Informationsweitergabe dieser Komponenten geschieht über so genannte Signaltransduktionswege.

Wichtige Vertreter hierfür sind der MAPK-, JAK/STAT- und Wnt-Signaltransduktionsweg. Unter physiologischen Bedingungen regulieren sie in unterschiedlichen Geweben das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zelle. Über ihre Rolle in Urothelkarzinomen ist jedoch bisher erstaunlicherweise wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden diese Signaltransduktionswege in Harnblasenkarzinomzelllinien und Primärkulturen normaler uroepithelialer Zellen vergleichend untersucht. Aktivität und Aktivierbarkeit wurden mit Hilfe von Reporterassays und die Expression wichtiger Komponenten mittels Westernblots bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg gemessen an der Promotoraktivität von SRE-luc und AP1-luc in proliferierenden normalen uroepithelialen Zellen hoch aktiv war. Die fehlende Induzierbarkeit durch MEKK4 spricht für eine nahezu maximale Basalaktivität. Der MEK-Inhibitor PD 98059 führte in den normalen uroepithelialen Zellen zu einem Rückgang der DNA-Syntheserate.

Im Gegensatz dazu wiesen die Harnblasenkarzinomzelllinien nur geringe MAPK-Aktivität auf, die jedoch durch MEKK4 deutlich induzierbar war. Dies spricht für das Intaktsein der MAPK-Signalkaskade in den Harnblasenkarzinomzelllinien, die möglicherweise jedoch aktiv reprimiert ist. Sowohl die Harnblasenkarzinomzelllinien als auch die normalen uroepithelialen Zellen zeigten bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen und in Anwesenheit von hoher EGF-Konzentrationen keine Aktivitätsunterschiede. Sie scheinen daher losgelöst von externen Stimuli zu sein. Dies erstaunt besonders bei den normalen uroepithelialen Zellen, da dort der MAPK-Signaltransduktionsweg aufgrund seiner hohen Basalaktivität für das Zellwachstum relevant zu sein scheint.

Die Expressionsanalyse MAPK-abhängiger Promotoren bestätigte die Ergebnisse der Promotorstudien. Sowohl aktiviertes als auch nicht aktiviertes MEK1/2 wurde am stärksten in den normalen uroepithelialen Zellen nachgewiesen. Die Expression von MEK1/2 war in den Harnblasenkarzinomzelllinien inhomogen und relativ schwach. Damit deckt sich dies mit

den Ergebnissen der Promotorstudien. ERK wurde gleichermaßen unphosphoryliert und phosphoryliert in normalen uroepithelialen Zellen und Harnblasenkarzinomzelllinien nachgewiesen. Damit scheint die Signalkaskade „downstream“ von ERK in den Harnblasenkarzinomzelllinien reprimiert zu sein.

STAT-abhängige Promotoren zeigten weder in Harnblasenkarzinomzelllinien noch in normalen uroepithelialen Zellen eine erhöhte Aktivität. Diese konnte auch nicht durch Anwesenheit IL-6-/ IL-6-Rezeptor induziert werden. Bei den STAT-Faktoren handelt es sich jedoch erfahrungsgemäß um schwache Transkriptionsfaktoren, die erst durch Interaktion mit Co-Aktivatoren eine relevante Transkriptionsfaktoraktivität induzieren. Daher ist trotz nicht nachweisbarer Basalaktivität der STAT-Faktoren nicht sicher auszuschließen, dass sie durch Beeinflussung von noch unbekanntem Co-Aktivatoren indirekt Einfluss auf die Zellproliferation in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen nehmen und somit auch für die Genese von Harnblasentumoren relevant sein können.

Der Wnt-abhängige Promotor TCF zeigte in Harnblasenkarzinomzelllinien und in den normalen uroepithelialen Zellen keine nachweisbare signifikante Aktivität. Das weitgehend autonome Zellwachstum der Harnblasenkarzinomzelllinien scheint daher nicht auf einer autokrinen Stimulation durch Wnt-Faktoren oder auf einer Aktivierung intrazellulärer Wnt-abhängiger Mediatoren zurückzuführen sein. Die TCF-Basalaktivität ließ sich auch nicht durch Aktivatoren wie Lithiumacetat induzieren. Dies deutet auf eine aktive Repression des Signalwegs hin. Die Beobachtung würde somit erklären, weshalb bislang in Harnblasenkarzinomen nur wenige Mutationen in Genen dieses Signalweges gefunden wurden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, D.S. and C.M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**: 1653-5.
- Akashi, M. and E. Nishida. 2000. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev* **14**: 645-9.
- Alessi, D.R., A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, and A.R. Saltiel. 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**: 27489-94.
- Bienz, M. 2001. Spindles cotton on to junctions, APC and EB1. *Nat Cell Biol* **3**: E67-8.
- Billerey, C., D. Chopin, M.H. Aubriot-Lorton, D. Ricol, S. Gil Diez de Medina, B. Van Rhijn, M.P. Bralet, M.A. Lefrere-Belda, J.B. Lahaye, C.C. Abbou, J. Bonaventure, E.S. Zafrani, T. van der Kwast, J.P. Thiery, and F. Radvanyi. 2001. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* **158**: 1955-9.
- Bochner, B.H. 2003. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *UpToDate* **11.3**.
- Böhle, A., M. Müller, and T. Otto. 2001. Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie. *AWMF online*.
- Bokemeyer, D., A. Sorokin, and M.J. Dunn. 1996. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int* **49**: 1187-98.
- Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**: 2474-88.
- Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A.H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein, and C.A. Schmitt. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**: 660-5.
- Bromberg, J. and J.E. Darnell, Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**: 2468-73.
- Bui, T.D., T. O'Brien, J. Crew, D. Cranston, and A.L. Harris. 1998. High expression of Wnt7b in human superficial bladder cancer vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer* **77**: 319-24.
- Burch, J.D., T.E. Rohan, G.R. Howe, H.A. Risch, G.B. Hill, R. Steele, and A.B. Miller. 1989. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer* **44**: 622-8.
- Cadigan, K.M. and R. Nusse. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**: 3286-305.
- Capon, D.J., E.Y. Chen, A.D. Levinson, P.H. Seeburg, and D.V. Goeddel. 1983. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* **302**: 33-7.
- Cappellen, D., C. De Oliveira, D. Ricol, S. de Medina, J. Bourdin, X. Sastre-Garau, D. Chopin, J.P. Thiery, and F. Radvanyi. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* **23**: 18-20.
- Cavanaugh, J.E. 2004. Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur J Biochem* **271**: 2056-9.
- Chang, F., L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, and J.A. McCubrey. 2003a. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**: 1263-93.
- Chang, F., L.S. Steelman, J.G. Shelton, J.T. Lee, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R. Franklin, and J.A. McCubrey. 2003b. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* **22**: 469-80.

- Chen, F.H., S.A. Crist, G.J. Zhang, Y. Iwamoto, and W.A. See. 2002. Interleukin-6 production by human bladder tumor cell lines is up-regulated by bacillus Calmette-Guerin through nuclear factor-kappaB and Ap-1 via an immediate early pathway. *J Urol* **168**: 786-97.
- Cheng, Y.T., Y.L. Li, J.D. Wu, S.B. Long, T.S. Tzai, C.C. Tzeng, and M.D. Lai. 1995. Overexpression of MDM-2 mRNA and mutation of the p53 tumor suppressor gene in bladder carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* **13**: 173-81.
- Clavel, J., S. Cordier, L. Boccon-Gibod, and D. Hemon. 1989. Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. *Int J Cancer* **44**: 605-10.
- Clevenger, C.V. 2004. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* **165**: 1449-60.
- Cobb, M.H. 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 479-500.
- Cohen, S.M. and S.L. Johansson. 1992. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am* **19**: 421-8.
- Coletta, R.D., P. Jedlicka, A. Gutierrez-Hartmann, and H.L. Ford. 2004. Transcriptional control of the cell cycle in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**: 39-53.
- Cote, R.J., M.D. Dunn, S.J. Chatterjee, J.P. Stein, S.R. Shi, Q.C. Tran, S.X. Hu, H.J. Xu, S. Groshen, C.R. Taylor, D.G. Skinner, and W.F. Benedict. 1998. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* **58**: 1090-4.
- Daksis, J.I., R.Y. Lu, L.M. Facchini, W.W. Marhin, and L.J. Penn. 1994. Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**: 3635-45.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* **277**: 1630-5.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-52.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C.A. Renard, M.A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn, and C. Perret. 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8847-51.
- Dudley, D.T., L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, and A.R. Saltiel. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7686-9.
- Eastman, Q. and R. Grosschedl. 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 233-40.
- Evan, G.I. and K.H. Vousden. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-8.
- Fang, J.Y. and B.C. Richardson. 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* **6**: 322-7.
- Faris, M., N. Kokot, K. Latinis, S. Kasibhatla, D.R. Green, G.A. Koretzky, and A. Nel. 1998. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J Immunol* **160**: 134-44.
- Force, T. and J.V. Bonventre. 1998. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* **31**: 152-61.
- Franklin, R.A. and J.A. McCubrey. 2000. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* **14**: 2019-34.
- Freeman, M.R., J.J. Yoo, G. Raab, S. Soker, R.M. Adam, F.X. Schneck, A.A. Renshaw, M. Klagsbrun, and A. Atala. 1997. Heparin-binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder. *J Clin Invest* **99**: 1028-36.

- Furukawa, T., M. Sunamura, F. Motoi, S. Matsuno, and A. Horii. 2003. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* **162**: 1807-15.
- Gregorieff, A. and H. Clevers. 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* **19**: 877-90.
- Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson, and et al. 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**: 589-600.
- Harwood, A.J. 2001. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell* **105**: 821-4.
- Hayashi, M. and J.D. Lee. 2004. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* **82**: 800-8.
- Hedgepeth, C.M., L.J. Conrad, J. Zhang, H.C. Huang, V.M. Lee, and P.S. Klein. 1997. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* **185**: 82-91.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**: 1-20.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 ( Pt 2)**: 297-314.
- Hermeking, H., C. Rago, M. Schuhmacher, Q. Li, J.F. Barrett, A.J. Obaya, B.C. O'Connell, M.K. Mateyak, W. Tam, F. Kohlhuber, C.V. Dang, J.M. Sedivy, D. Eick, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 2000. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2229-34.
- Hilger, R.A., M.E. Scheulen, and D. Strumberg. 2002. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**: 511-8.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**: 2548-56.
- Hoffman, D., Y. Masuda, and E.L. Wynder. 1969. Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature* **221**: 255-6.
- Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, S. Ari-i, H. Wada, J. Fujimoto, and M. Kohno. 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**: 813-22.
- Hynes, N.E. and H.A. Lane. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**: 341-54.
- Jebar, A.H., C.D. Hurst, D.C. Tomlinson, C. Johnston, C.F. Taylor, and M.A. Knowles. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* **24**: 5218-25.
- Jove, R. 2000. Preface: STAT signaling. *Oncogene* **19**: 2466-7.
- Kasibhatla, S., T. Brunner, L. Genestier, F. Echeverri, A. Mahboubi, and D.R. Green. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* **1**: 543-51.
- Kinzler, K.W. and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Knowles, M.A. 1999a. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* **84**: 412-27.
- . 1999b. Identification of novel bladder tumour suppressor genes. *Electrophoresis* **20**: 269-79.
- . 2001. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* **54**: 215-21.

- Kolch, W., A. Kotwaliwale, K. Vass, and P. Janosch. 2002. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* **2002**: 1-18.
- Kondoh, K., S. Torii, and E. Nishida. 2005. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* **114**: 86-91.
- Lango, M.N., D.M. Shin, and J.R. Grandis. 2001. Targeting growth factor receptors: integration of novel therapeutics in the management of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* **13**: 168-75.
- Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, M., J.Y. Zhou, Y. Ge, L.H. Matherly, and G.S. Wu. 2003. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **278**: 41059-68.
- Liu, T., A.J. DeCostanzo, X. Liu, H. Wang, S. Hallagan, R.T. Moon, and C.C. Malbon. 2001. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* **292**: 1718-22.
- Lustig, B. and J. Behrens. 2003. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**: 199-221.
- McCubrey, J.A., L.S. Steelman, P.W. Moye, P.E. Hoyle, C. Weinstein-Oppenheimer, F. Chang, M. Pearce, M.K. White, R. Franklin, and W.L. Blalock. 2000. Effects of deregulated RAF and MEK1 expression on the cytokine-dependency of hematopoietic cells. *Adv Enzyme Regul* **40**: 305-37.
- Miller, J.R. 2002. The Wnts. *Genome Biol* **3**: REVIEWS3001.
- Miller, J.R., A.M. Hocking, J.D. Brown, and R.T. Moon. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* **18**: 7860-72.
- Mittnacht, S., H. Paterson, M.F. Olson, and C.J. Marshall. 1997. Ras signalling is required for inactivation of the tumour suppressor pRb cell-cycle control protein. *Curr Biol* **7**: 219-21.
- Moon, R.T., B. Bowerman, M. Boutros, and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**: 1644-6.
- Mora, A., G. Sabio, R.A. Gonzalez-Polo, A. Cuenda, D.R. Alessi, J.C. Alonso, J.M. Fuentes, G. Soler, and F. Centeno. 2001. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K<sup>+</sup> deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem* **78**: 199-206.
- Morrison, A.S. 1984. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* **11**: 557-66.
- Nakamura, Y. 1997. Cleaning up on beta-catenin. *Nat Med* **3**: 499-500.
- Peeper, D.S., T.M. Upton, M.H. Ladha, E. Neuman, J. Zalvide, R. Bernards, J.A. DeCaprio, and M.E. Ewen. 1997. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* **386**: 177-81.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837-51.
- Pouyssegur, J. and P. Lenormand. 2003. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* **270**: 3291-9.
- Preger, E., I. Ziv, A. Shabtay, I. Sher, M. Tsang, I.B. Dawid, Y. Altuvia, and D. Ron. 2004. Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene with altered subcellular localization and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1229-34.
- Pritchard, C.A., M.L. Samuels, E. Bosch, and M. McMahon. 1995. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **15**: 6430-42.
- Puddicombe, S.M. and D.E. Davies. 2000. The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium. *Clin Exp Allergy* **30**: 7-11.

- Raghavan, D. 2003. Molecular targeting and pharmacogenomics in the management of advanced bladder cancer. *Cancer* **97**: 2083-9.
- Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**: 1281-3.
- Reya, T. and H. Clevers. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843-50.
- Roose, J. and H. Clevers. 1999. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1424**: M23-37.
- Rübben, H. and T. Otto. 2001. Harnblasenkarzinom, Uroonkologie. *Springer* **3**: 85-168.
- Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka, and Y. Nakamura. 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* **24**: 245-50.
- Schulz, W.A. 2005. Molecular Biology of Human Cancers. *Springer*.
- Schulz, W.A., N. Crawford, and J. Locker. 1988. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression and DNA methylation in rat hepatoma cell lines. *Exp Cell Res* **174**: 433-47.
- Sebolt-Leopold, J.S. and R. Herrera. 2004. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 937-47.
- Seifert, H.H., Schulz, W.A. 2005. DNA Methylation in urological cancers. *Landes Bioscience*.
- Shinohara, N. and T. Koyanagi. 2002. Ras signal transduction in carcinogenesis and progression of bladder cancer: molecular target for treatment? *Urol Res* **30**: 273-81.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5522-7.
- Sibley, K., D. Cuthbert-Heavens, and M.A. Knowles. 2001a. Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma. *Oncogene* **20**: 686-91.
- Sibley, K., P. Stern, and M.A. Knowles. 2001b. Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene* **20**: 4416-8.
- Silva, C.M. 2004. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* **23**: 8017-23.
- Spruck, C.H., 3rd, P.F. Ohneseit, M. Gonzalez-Zulueta, D. Esrig, N. Miyao, Y.C. Tsai, S.P. Lerner, C. Schmutte, A.S. Yang, R. Cote, and et al. 1994. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* **54**: 784-8.
- Steinhoff, C. 2001. Nutzung tumorspezifischer Veränderungen für die selektive Reexpression des Tumorsuppressorgens p53 in Harnblasenkarzinomen. *Inaugural-Dissertation*.
- Stoehr, R., R.C. Krieg, R. Knuechel, F. Hofstaedter, C. Pilarsky, D. Zaak, R. Schmitt, and A. Hartmann. 2002. No evidence for involvement of beta-catenin and APC in urothelial carcinomas. *Int J Oncol* **20**: 905-11.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.P. Saint-Jeannet, and X. He. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530-5.
- Taniguchi, K., L.R. Roberts, I.N. Aderca, X. Dong, C. Qian, L.M. Murphy, D.M. Nagorney, L.J. Burgart, P.C. Roche, D.I. Smith, J.A. Ross, and W. Liu. 2002. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* **21**: 4863-71.
- Tetsu, O. and F. McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-6.
- Theodorescu, D., I. Cornil, B.J. Fernandez, and R.S. Kerbel. 1990. Overexpression of normal and mutated forms of HRAS induces orthotopic bladder invasion in a human transitional cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9047-51.

- Thievensen, I., H.H. Seifert, S. Swiatkowski, A.R. Florl, and W.A. Schulz. 2003. E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells. *Br J Cancer* **88**: 1932-8.
- Varley, C., G. Hill, S. Pellegrin, N.J. Shaw, P.J. Selby, L.K. Trejdosiewicz, and J. Southgate. 2005. Autocrine regulation of human urothelial cell proliferation and migration during regenerative responses in vitro. *Exp Cell Res* **306**: 216-29.
- Vogt, P.K. 2002. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nat Rev Cancer* **2**: 465-9.
- Wagener, C. 1999. Molekulare Onkologie. *Thieme* **2**.
- Watanabe, T., N. Shinohara, K. Moriya, A. Sazawa, Y. Kobayashi, Y. Ogiso, M. Takiguchi, J. Yasuda, T. Koyanagi, N. Kuzumaki, and A. Hashimoto. 2000. Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB Life* **49**: 317-20.
- Wehrli, M., S.T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Vaizel-Ohayon, E. Schejter, A. Tomlinson, and S. DiNardo. 2000. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**: 527-30.
- Willert, K., M. Brink, A. Wodarz, H. Varmus, and R. Nusse. 1997. Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *Embo J* **16**: 3089-96.
- Wilson, N.J., A. Jaworowski, A.C. Ward, and J.A. Hamilton. 1998. cAMP enhances CSF-1-induced ERK activity and c-fos mRNA expression via a MEK-dependent and Ras-independent mechanism in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 475-80.
- Zeegers, M.P., R.A. Goldbohm, and P.A. van den Brandt. 2002. A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* **13**: 83-90.
- Zhang, Z.T., J. Pak, H.Y. Huang, E. Shapiro, T.T. Sun, A. Pellicer, and X.R. Wu. 2001. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene* **20**: 1973-80.

## 8. ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
AP-1	Activating Protein 1
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
BPE	Bovine Pituitary Extract
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FAP	Familiar Adenomatosis Polyposis
FGF	Fibroblast Growth Factor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosin Triphosphat
IL	InterLeucin
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
LB	Luria-Bertani Medium
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Protein Kinase C
RB	Retinoblastom
RTK	Receptor Tyrosin Kinase
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SDS	Natriumdodecylsulphat
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
SOS	Son Of Sevenless
SRE	Serum Response Element
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMED	N,N,N',N'-tertramethyl-ethylendiamin
TCF	T-Cell Factor
TK	Thymidin Kinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) aminomethan
WNT	Wingless/INT

## 9. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. W. A. Schulz möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die sehr gute Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn PD Dr. Freimut Schliess danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christine Steinhoff, die mich im Forschungslabor betreut und mir jederzeit hilfreich und kompetent zur Seite gestanden hat.

Frau Andrea Meier danke ich für ihre Unterstützung in der Zellkultur sowie Weiterführung der Expressionsanalysen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen aus der Urologie und Kinderklinik für Hilfestellungen und Diskussionen:

Frau C. Hader, Frau Dr. Andrea Linnemann-Florl, Herrn Dr. I. Thievessen, Herrn Dr. H.-H. Seifert, Herrn Dr. S. Santourlidis, Frau Dr. Ute Brosius, Herrn Dr. M. Cronauer und Herrn Dr. F. Kimura.

Prof. Dr. R. Ackermann und den Kolleginnen und Kollegen der Urologischen Klinik danke ich für die Bereitstellung von Gewebeproben.

Für die Einführung in die Westernblot-Methode gilt mein Dank Herrn Dr. oec. troph. Boris Görg aus der Gastroenterologischen Klinik.

Für das Korrekturlesen danke ich André Heinen.

Meiner Mutter und meiner Patentante Inge möchte ich besonders für den familiären Rückhalt und die stete Unterstützung und Förderung danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben

Name, Vorname: Swiatkowski, Sandra  
Geburtsdatum: 02.11.1976, Oberhausen  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

## Schulbildung

1983-1987 Lindnerschule, Oberhausen  
1987-1996 Abtei-Gymnasium, Duisburg  
1996 Abitur

## Studium

1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin,  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
1998 Ärztliche Vorprüfung  
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2000-2001 Auslandsstudium an der Faculté de Médecine, Université de  
Nantes, Frankreich (Erasmus-Austauschprogramm)  
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Tätigkeit

seit 03/2004 Assistenzärztin, Zentrum für Innere Medizin,  
Kliniken St.Antonius, Wuppertal  
CÄ: PD Dr.Goerg, Prof. Dr. Rasche, Dr. Sandmann

## Promotion

1999-2006 Thema: Signaltransduktionswege in Harnblasenkarzinomzelllinien  
und uroepithelialen Zellen  
Betreuer: Prof. Dr.W.A.Schulz, Forschungslabor der  
Urologischen Klinik, Uniklinik Düsseldorf  
2001 1.Posterpreis, 53.Kongress der Deutschen Gesellschaft für  
Urologie:  
Aktivität von Signaltransduktionswegen in Harnblasen-  
karzinomzellien und Primärkulturen von Uroepithelzellen  
(HH. Seifert, S. Swiatkowski, C.Steinhoff, WA. Schulz)

## **Publikationen**

Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievensen I, Schliess F, Schulz WA  
Activities of MAP-Kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma  
cell lines

Experimental Cell Research 282, 48-57 (2003)

Thievensen I, Seifert HH, Swiatkowski S, Florl AR, Schulz WA  
E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signaling in urothelial carcinoma  
and normal urothelial cells

British Journal of Cancer 88(12):1932-8, 2003 Jun 16

Kimura F, Seifert HH, Florl AR, Santourlidis S, Steinhoff C, Swiatkowski S, Mahotka C,  
Gerharz CD, Schulz WA

Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional  
cell carcinoma

International Journal of Cancer 104(5):568-78, 2003 May 1