

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Berdel-

Untersuchung der Funktion von G α 13 in hämatopoetischen Vorläuferzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Pereira Lopes, Manuel

aus
Barcelos (Portugal)

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Berdel. -
Referent: Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung der Funktion von G-alpha-13 in hämatopoetischen Vorläuferzellen

Manuel Pereira Lopes

G-Protein gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Gruppe von Oberflächenrezeptoren auf menschlichen Zellen dar. Sie sind an der zytosolischen Seite mit einem heterotrimeren G-Protein gebunden, das sich aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammensetzt. Die $G\alpha$ -Untereinheit kann in vier weitere Subgruppen aufgeteilt werden, wobei die Subgruppe $G\alpha 12$ im Fokus unserer Untersuchungen stand. Sie setzt sich aus zwei Vertretern zusammen: $G\alpha 12$ und $G\alpha 13$.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss von $G\alpha 13$ auf myeloische Vorläuferzellen im Modell der murinen myeloischen Vorläufer-Zelllinie 32D-cl3. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Fibroblasten-Zelllinien, zeigten die $G\alpha 13$ überexprimierenden myeloischen Vorläuferzellen keine unmittelbaren Transformationszeichen wie gesteigerte Proliferation oder Faktor-unabhängige Kolonienbildung. Die Überexpression von $G\alpha 13$ führte jedoch zu deutlichen zellmorphologischen und funktionellen Veränderungen. Wir beobachteten, in Abhängigkeit von IL-3, Veränderungen des Aktinskeletts der Zellen und die Ausbildung von Lamellipodien. Die $G\alpha 13$ -Überexpression führte ferner zu einer deutlich gesteigerten Migration, sowohl der ungerichteten als auch der gerichteten Migration. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die durch $G\alpha 13$ induzierten Veränderungen von Zytoskelett und Migrationsverhalten in myeloischen Zellen durch die Aktivierung von RhoA vermittelt werden. Durch die Blockade einzelner Signalwege konnten wir ferner zeigen, dass Src eine zentrale Rolle bei der $G\alpha 13$ vermittelten Migration spielt. So führte die Hemmung des Src-Signalweges zu einer fast vollständigen Aufhebung der Migration. Diese Ergebnisse deuten auf eine enge Interaktion von $G\alpha 13$ mit dem Src-Signalweg hin, die in Folgeuntersuchungen genauer analysiert werden muss.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Ätiologie</i>	2
1.1.3 <i>Pathogenese</i>	2
1.1.4 <i>Klinisches Bild</i>	3
1.1.5 <i>Diagnose und Klassifikation</i>	3
1.1.6 <i>Morphologie und Zytochemie</i>	4
1.1.6.1 <i>Immunphänotypisierung</i>	6
1.1.6.2 <i>Zytogenetik</i>	6
1.1.6.3 <i>Molekularbiologie</i>	7
1.2. Signaltransduktion	9
1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	9
1.3.1 <i>Regulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren</i>	10
1.3.2 <i>G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Zellproliferation</i>	11
1.3.3 <i>Die Rolle von Gα12/13 im Zellwachstum und malignen Transformation</i>	13
1.3.4 <i>Gα12 /13 und Zellzyklus</i>	15
1.3.5 <i>In vivo Funktionen des Gα12 /13 in Gα12 /13 – defizienten Mäusen</i>	15
1.4 Kleine G-Proteine	16
1.4.1 <i>Struktur der kleinen G-Proteine</i>	17
1.4.2 <i>Ihre Rolle als molekulare Schalter</i>	17
1.4.3 <i>Regulatoren der kleinen G-Proteine</i>	18
1.4.4 <i>Vorkommen und Lokalisation</i>	19

1.5. Zellmigration	20
1.5.1 Zellwanderung und ihre biologische Bedeutung	20
1.5.2 Kleine G-Proteine und ihre Rolle bei Aktin-Rearrangements	21
1.5.3 Chemokinesis und Chemotaxis	23
1.6. Aufgabenstellung	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Zellen	28
2.1.2 Kulturmedien und Puffer	29
2.1.3 Chemikalien	30
2.1.4 Antikörper, Taqman Primer und Probes, PCR-Primer, Enzyme, Inhibitoren, Zytokine, Plasmide	32
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.6 Geräte	34
2.2 Methoden	36
2.2.1 Subklonieren der G-alpha-13-Konstrukte vom Cis-Vektor in den pAL- Vektor	36
2.2.1.1 Reinigung von Plasmid-DNA aus E.coli – Kulturen mit Qia-Prep Spin Kit	36
2.2.1.2 Amplifikation mit Pfu-Polymerase	36
2.2.1.3 GenClean	37
2.2.1.4 A-Overhang	37
2.2.1.5 TA-Cloning	37
2.2.1.6 Restriktionsverdau	38
2.2.2 Zellkultur	38
2.2.3 Stabile Transfektion von 32D-cl3 Zellen mittels Elektroporation	38

	38
2.2.4 Sequenzierung	39
2.2.5 Taqman PCR	39
2.2.6 Westernblot	40
2.2.7 FITC-Phalloidin färbung/ Cytospin	41
2.2.8 Konfokale Mikroskopie	42
2.2.9 Adhäsions- Assay	43
2.2.10 Migrations – Assay	44
2.2.11 Proliferationsassay (3H-Thymidin Inkorporation)	45
2.2.12 Colony-Assay	45
2.2.13 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid	46
2.2.14 Messung des Aktivitätszustandes kleiner G-Proteine im GST-Pulldown	46
3. Ergebnisse	48
3.1 Morphologische Veränderung nach Überexpression von Gα13 in 32D-cl3 Zellen	48
3.2 Adhäsionsverhalten Gα13-überexprimierender 32D-cl3 Zellen	52
3.3 Gα13-Überexpression steigert die ungerichtete Migration	53
3.4 Steigerung vor allem der gerichteten Migration durch Gα13-Überexpression	54
3.5 Einfluss spezifischer Signalweginhibitoren auf die Migration	57
3.6 Proliferationsverhalten Gα13-überexprimierender 32D-cl3 Zellen	60
3.7 Einfluss von Gα13 in myeloischen Vorläuferzellen auf den Zellzyklus	64
3.8 Gα13 führt zu einer RhoA-Aktivierung	66
3.9 Transfektion von daRhoA in 32D-cl3 Zellen und die Auswirkungen auf das Migrationsverhalten	68
4. Diskussion	71
Literaturverzeichnis	83
Lebenslauf	
Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.** Verteilung der kleinen G-Proteine innerhalb der migrierenden Zelle, Schaubild entnommen aus Xu et al.¹²⁸ *Seite 23*
- Abbildung 2.** G α 13-mRNA-Expression in 32D-cl3 Zellen nach Transfektion mit leerem pAL-Vektor, G α 13-WT und konstitutiv aktiver Form (G α 13-QL) *Seite 49*
- Abbildung 3.** G α 13-Expression nach Transfektion in 32D-cl3 Zellen mit leerem pAL-Vektor, G α 13-WT und konstitutiv aktiver Form (QL), Proteinebene *Seite 49*
- Abbildung 4.** Morphologische Veränderung der 32D-cl3 Zellen nach Überexpression des G α 13 WT und der konstitutiv aktiven Form (QL), lichtmikroskopische Aufnahme *Seite 50*
- Abbildung 5.** Konfokalmikroskopische Darstellung der G α 13-überexprimierenden Zellen *Seite 51*
- Abbildung 6.** Adhäsionsverhalten G α 13-überexprimierender Zellen mit Fibronektin in Abhängigkeit von IL-3 *Seite 52*
- Abbildung 7.** Der Einfluß von G-alpha-13 auf die Migration in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration *Seite 53*
- Abbildung 8.** Ungerichtete und gerichtete Migration (SDF-1a als Chemokin) *Seite 55*
- Abbildung 9.** IL-8 abhängige Migration *Seite 56*
- Abbildung 10.** Einfluss einzelner Inhibitoren auf das Migrationsverhalten G α 13 überexprimierender 32D Zellen *Seite 59*
- Abbildung 11.** Der Einfluss der Interleukin 3 Konzentration auf die G α 13 – induzierte Proliferation in 32D-cl3 Zellen *Seite 60*
- Abbildung 12.** Der Einfluss von G α 13 auf die Proliferation in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration *Seite 61*

- Abbildung 13.** Verteilung der Zellzyklusphasen in 32D-cl3 Zellen mit leerem pAL-Vektor *Seite 62*
- Abbildung 14.** Verteilung der Zellzyklusphasen in 32D-cl3 Zellen mit konstitutiv aktivem G α 13 *Seite 63*
- Abbildung 15.** Verteilung der Zellzyklusphasen in G α 13-Wildtyp-überexprimierender 32D-cl3 Zellen *Seite 64*
- Abbildung 16.** Der Einfluss von G-alpha-13 auf die Aktivierung der kleinen G-Proteine der Rho-A-Familie *Seite 67*
- Abbildung 17.** konstitutiv aktives RhoA induziert Migration in 32D-cl3 Zellen *Seite 68*
- Abbildung 18.** Die RhoA-induzierte Migration ist Src-abhängig *Seite 69*

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	<i>gip2-Onkogen</i>	Gamma-tubulin Interacting Protein
A	Ampere	<i>GPCR</i>	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
ADP	Adenosin Diphosphat	<i>G-Protein</i>	GTP-bindendes Protein
ALL	akute lymphatische Leukämie	<i>Grb2</i>	growth factor receptor bound protein
AML	akute myeloische Leukämie	<i>GRK's</i>	G-Protein coupled receptor Kinases
<i>A-Overhang</i>	Adenosin-Anhängung	<i>Gs</i>	G-Protein alpha Untereinheit
<i>Arp</i>	apurinic endonuclease-redox protein	<i>gsp-Onkogen</i>	glutathionylspermidine synthase
<i>ATP</i>	Adenosin Triphosphat	<i>GTP</i>	Guanosintriphosphat
<i>ATRA</i>	All-trans-Retinsäure	<i>Ga13 WT</i>	G-alpha 13 Wildtyp
<i>Bmx</i>	Non Rezeptor Tyrosinkinase	<i>Ga13-QL</i>	G-alpha 13 konstitutiv aktive Form
<i>bp</i>	Basenpaare	<i>h</i>	Stunden
<i>BSA</i>	Bovines Serumalbumin	<i>H₂O</i>	Wasser
<i>BTK</i>	Bruton's tyrosine kinase	<i>Hax-1</i>	HCLS1 associated X-1
<i>Ca²⁺</i>	Kalzium	<i>HTLV</i>	humanes T-Zell Leukämie Virus
<i>cAMP</i>	zyklisches Adenosinmonophosphat	<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>CD</i>	Clusters of Differentiation	<i>IL</i>	Interleukin
<i>Cdc42</i>	cell division cycle 42	<i>IMDM</i>	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
<i>CDK</i>	cyclin-dependent kinase	<i>inv</i>	Inversionen
<i>cDNA</i>	komplementäre DNA	<i>IP3</i>	Inositol 1,4,5,-tris-phosphate
<i>CLL</i>	chronische lymphatische Leukämie	<i>ITD</i>	interne Tandemduplikationen
<i>CML</i>	chronische myeloische Leukämie	<i>JAM-1</i>	junctional adhesion molecule
<i>CMV</i>	Zytomegalie Virus	<i>JNK</i>	c-Jun NH2-terminal kinase
<i>CO₂</i>	Kohlendioxid	<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>Cox</i>	Cyclooxygenase	<i>KSHV</i>	Kaposi Sarkom assoziierten Herpes Virus
<i>CRAC</i>	cytosolic regulator of adenyllyl cyclase	<i>LY 294002</i>	phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor
<i>cta-Gens</i>	Concertinagen	<i>MAK</i>	Mitogen aktivierte Kinase
<i>CXC</i>	Chemokin	<i>MAPK</i>	Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen
<i>DAPI</i>	4',6-Diamidino-2-phenylindol	<i>mas-Onkogen</i>	multifunctional mycocerosic acid synthase
<i>DbI</i>	Duffy bindinglike	<i>MEK</i>	MAP kinase-ERK kinase
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid	<i>MEKK</i>	MAP kinase-ERK kinase kinase
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure	<i>MKK</i>	MAP Kinase Kinase
<i>DTT</i>	Dithiothreitol	<i>MLCK</i>	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	<i>MLCP</i>	Myosin light Chain Phosphatase
<i>EGF</i>	epidermal growth factor	<i>M-Phase</i>	Mitose-Phase
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	<i>mRNA</i>	messenger Ribonukleinsäure
<i>Egr-1</i>	early growth response protein	<i>NF-AT</i>	nuclear factor of activated T-cell
<i>ERK</i>	extracellulär signaling regulated kinase	<i>NIH3T3-Zellen</i>	immortalisierte Fibroblasten Zelllinie
<i>ERM</i>	ezrin/radixin/moesin-like protein	<i>p130Cas</i>	CRK-associated substrate
<i>ETOH</i>	Ethanol	<i>p160ROCK</i>	p160 Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
<i>EZM</i>	extrazelluläre Matrix	<i>PAS</i>	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
<i>FAB</i>	French-American-British	<i>PBS Buffer</i>	phosphate buffered saline
<i>FACS</i>	fluorescence activated cell sortin	<i>PCR</i>	Polymerasekettenreaktion
<i>FAK</i>	fokalen Adhäsionskinase	<i>PD 098059</i>	MAPKK1-Inhibitor
<i>FCS</i>	fetales Kalbsserum	<i>PECAM-1</i>	platelet/endothelial cell adhesion molecule
<i>FITC</i>	Fluoresceinisothiocyanat	<i>Pfu-Polymerase</i>	Pyrococcus furiosus-Polymerase
<i>Flt3</i>	FMS-like tyrosine kinase 3	<i>PH-Domain</i>	Plecktrin-Homology-Domain
<i>G1-Phase</i>	Gap1-Phase	<i>Pi</i>	Propidiumiodid
<i>G2-Phase</i>	Gap2-Phase	<i>PI-3</i>	Phosphatidylinositol-3
<i>G-alpha-13</i>	G-Protein alpha Untereinheit	<i>PI3-Kinase</i>	Phosphoinositid-3-Kinase
<i>GAP's</i>	GTPase activating protein	<i>PI4K</i>	Phosphoinositid-4-Kinase
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	<i>PKB</i>	Protein Kinase B
<i>GAPIM</i>	GTPase-activating protein of ras	<i>PLD</i>	Phospholipase D
<i>G-CSF</i>	Granulocyte-Colony Stimulating Factor	<i>PML/RAR-α</i>	Promyelozytenleukämie/Retinsäurerezeptor
<i>GDI's</i>	Guanin Nucleotid Dissociation Inhibitor	<i>POX</i>	Myeloperoxidase
<i>GDP</i>	Guanosindiphosphat		
<i>GEF's</i>	Guanin Nucleotid Exchange Protein		
<i>Gi</i>	G-Protein alpha Untereinheit		

<i>PP1</i>	Protein Phosphatase 1	<i>SCAR</i>	suppressor of cAMP receptor
<i>PtdIns</i>	Phosphatidylinositol	<i>SDF-1</i>	stromal cell derived factor-1
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homologue	<i>SDS</i>	sodium dodecyl sulfate
<i>Ptx</i>	Pertussis Toxin	<i>SOS</i>	Son of Sevenless
<i>PVDF</i>	Polyvinylidenfluorid	<i>S-Phase</i>	Synthese Phase
<i>Pyk-2</i>	pyruvate kinase	<i>Src</i>	sarcoma oncogene
<i>RAR-α</i>	Alpharezeptor der Retinsäure	<i>SRF</i>	serum response factor
<i>RGS-Proteinen</i>	Regulator of G-Protein Signaling	<i>STAT</i>	signal transducer and activator of transcription
<i>ROCK</i>	Rho stimulated kinase	<i>t</i>	Translokation
<i>rpm</i>	revolutions per minute	<i>TCR</i>	T-Cell-Rezeptor
<i>RPMI Medium</i>	Roswell Park Memorial Institute Medium	<i>V</i>	Volt
<i>RT</i>	Raumtemperatur	<i>WASP</i>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<i>RTK</i>	Rezeptotyrosinkinasen	<i>z. B.</i>	zum Beispiel
<i>SB</i>	p38 MAP kinase Inhibitor	<i>z. T.</i>	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie

Die Leukämie (griechisch λευχαιμία *leuchaimia*, von λευκός, *leukós* - weiß und αίμα, *haima* - das Blut) ist eine Erkrankung des blutbildenen Systems. Die Bezeichnung „Leukämie“ geht auf Rudolf von Virchow zurück, der 1844 bei einer Patientin eine erhebliche Vermehrung von weißen Zellen im Blut entdeckte und somit die Krankheitsbezeichnung prägte. Leukämien zeichnen sich durch stark vermehrte Bildung von weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und vor allem ihrer funktionsuntüchtigen Vorstufen aus. In Abhängigkeit vom Verlauf unterscheidet man akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien sind lebensbedrohliche Erkrankungen, die unbehandelt in wenigen Wochen bis Monaten zum Tode führen. Chronische Leukämien verlaufen meist über mehrere Jahre und sind im Anfangsstadium häufig symptomarm.

Die weitere Klassifikation der Leukämien basiert auf morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Leukämiezellen. Je nach beteiligtem Zelltyp unterscheidet man zunächst myeloische von lymphatischen Leukämien. Die wichtigsten Leukämieformen sind:

- akute myeloische Leukämie (AML)
- akute lymphatische Leukämie (ALL)
- chronische myeloische Leukämie (CML)
- chronische lymphatische Leukämie (CLL)

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit tritt die AML mit einer Inzidenz von 2,5 auf 100.000 Einwohnern auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 65 Jahre liegt. Die Inzidenz steigt proportional zum Lebensalter von 1 pro 100.000 bei 40jährigen auf 15 pro 100.000 bei 75jährigen ¹²⁴.

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der AML ist bei der überwiegenden Anzahl der Erkrankungsfälle ungeklärt.

Allerdings konnte in den letzten Jahren in epidemiologischen Untersuchungen eine Reihe von Faktoren herausgearbeitet werden, die für die Entstehung von einem kleinen Teil der Leukämien von Bedeutung sind. Dazu gehören die Exposition mit Röntgen-⁶¹ oder radioaktiven Strahlen⁴⁶, Chemikalien wie z.B. Benzole¹, Zytostatika wie z.B. Alkylanzien (durchschnittlich 4-6 Jahre nach Exposition) oder Topoisomerase II-Inhibitoren (durchschnittlich 1-3 Jahre nach Exposition), zudem aber auch langjähriges Zigarettenrauchen¹⁰⁰.

Man beobachtet bei der AML eine familiäre Häufung, so tragen Geschwister von AML-Patienten ein überdurchschnittlich hohes Risiko, ebenfalls an einer AML zu erkranken. Dieses Risiko ist bei eineiigen Zwillingen nochmals deutlich erhöht⁸⁴.

Mehrere genetische Erkrankungen wie z. B. Trisomie 21¹²² und Bloom-Syndrom⁸⁶ gehen mit einer erhöhten Leukämieinzidenz einher.

1.1.3 Pathogenese

Die AML entsteht durch die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks und anschließender Proliferation dieses neoplastischen Zellklons. Hierdurch kommt es zur Überschwemmung des Knochenmarks mit unreifen Vorläuferzellen der Granulopoese und konsekutiver Verdrängung der normalen Hämatopoese mit den klinischen Folgeerscheinungen der progredienten Knochenmarkinsuffizienz.

1.1.4 Klinisches Bild

Die AML kennzeichnet ein plötzlicher Beginn und ein schnell progredienter Verlauf. Zu den klinischen Symptomen gehören unspezifische Beschwerden wie Mattigkeit, Abgeschlagenheit, leichter Gewichtsverlust, Fieber und Knochenschmerzen über eine Dauer von 1-3 Monaten vor Diagnosestellung.

Zu den Beschwerden, die als Folge der hämatopoetischen Insuffizienz zu werten sind, also der Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, gehören: Müdigkeit, Blässe, Schwindel, Kopfschmerz (Anämie), Blutungsneigung mit petechialen Blutungen und Schleimhautblutungen (Thrombozytopenie) und Infektneigung (Granulozytopenie).

1.1.5 Diagnose und Klassifikation

Im Blutausstrich sieht man eine deutliche Anisozytose und Poikilozytose der Erythrozyten. Das weiße Blutbild zeichnet sich durch ein Fehlen der mittleren Entwicklungsstufen der Granulopoese aus (Hiatus leucaemicus). Das Knochenmark ist hyperzellulär mit mehr als 20% leukämischen Vorläuferzellen, den Blasten. Im Zytoplasma der myeloischen Vorstufen finden sich manchmal stäbchenförmige Einschlüsse, die Auer-Stäbchen genannt werden und ausschließlich bei der AML auftreten. Reife Granulozyten und erythrozytopoetische Vorstufen treten ganz in den Hintergrund.

Zur Diagnose und Klassifikation der AML werden mehrere sich ergänzende Verfahren genutzt. Den gemeinsamen Anfang macht die Knochenmarkspunktion. Das so gewonnene Material wird dann den unterschiedlichen Verfahren zugeleitet.

1.1.6 Morphologie und Zytochemie

Die weit verbreitete FAB-Klassifikation ^{11, 12} (French-American-British) schlägt eine Einteilung der AML in acht verschiedene Typen (M0 bis M7) vor. Sie basiert auf zytomorphologischen und zytochemischen Methoden (siehe unten). Wichtig ist zunächst die Unterscheidung zwischen Zellen der myeloischen und der lymphatischen Reihe. Innerhalb der myeloischen Leukämien ist die Identifikation einer AML-M3 (Akute Promyelozytenleukämie) wichtig, da sich aus dieser Diagnose eine spezifische Therapie ableitet. Bei undifferenzierten Leukämien kann häufig durch Morphologie und Zytochemie alleine keine genaue Diagnose erfolgen. In solchen Fällen leistet die Immunphänotypisierung eine wichtige Hilfe.

FAB-Klassifikation der AML:

AML-M0: akute unreifzellige Leukämie, myeloblastär minimal differenziert,
Häufigkeit: 2-10%

AML-M1: AML ohne myeloblastäre Reifezeichen, wenig differenziert,
Häufigkeit: 15-20%

AML-M2: AML mit myeloblastär Reifezeichen, differenziert, POX+, Häufigkeit: 30%

AML-M3: akute Promyelozytenleukämie, promyelozytär, POX+, Häufigkeit: 5-10%

AML-M4: akute myelomonozytäre myeloblastäre Leukämie, POX+ und monozytär
Esterase+, Häufigkeit: 15-25%

AML-M4Eo: akute myelomonozytäre Leukämie wie M4 mit POX+ und Eosinophilie
(>5%) Esterase +, Häufigkeit: 15-25%

AML-M5a: akute Monoblastenleukämie, monoblastär POX+ und Esterase+,
Häufigkeit: 10-15%

AML-M5b: akute Monozytenleukämie, monozytär POX+ und, Esterase +;
Häufigkeit: 10-15%

AML-M6: akute Erythroleukämie, myeloblastär, erythroblastär, PAS+,
Häufigkeit: 3-4%

AML-M7: akute Megakaryozyten- megakaryoblastär, Esterase+, Häufigkeit: 2-4%

POX = Myeloperoxidase; PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Esterase = Naphthylacetatesterase

1.1.6.1 Immunphänotypisierung

Bei der Immunphänotypisierung werden an der Zelloberfläche liegende Antigengruppen, so genannte „Clusters of Differentiation“ (CD), mit monoklonalen Antikörpern spezifisch nachgewiesen. An der Oberfläche von Zellen der Hämatopoese konnten annähernd 160 verschiedene Antigengruppen identifiziert werden. Typische myeloische Marker sind:

CD13, CD15, CD33 und bei monozytoider Differenzierung CD14. Durch die Auswahl geeigneter Antikörperkombinationen kann die Differenzierung einer Zelle sowie deren Reife mit großer Sicherheit bestimmt werden. Abnormal exprimierte Marker, die nicht mit der Zellherkunft übereinstimmen, können helfen, die neoplastischen Zellen von den normalen Zellen zu differenzieren. So kann eine Leukämiezelle aus bis zu 10 000 gesunden Zellen detektiert werden, was bei Patienten mit morphologisch unauffälligem Knochenmark bei der Diagnose der minimalen Resterkrankung genutzt wird.

1.1.6.2 Zytogenetik

Es finden sich chromosomale Veränderungen in annähernd 80% der Patienten mit AML⁷³. Hierzu zählen Deletionen (5q-, 7q-), Inversionen (inv(3), inv(16)) und spezifische Translokationen (t(8; 21) oder t(15; 17)). An der Stelle des chromosomalen Bruchs kommt es zur Dysregulation von spezifischen Genen durch Genfusion, was zur Leukämieentstehung beiträgt⁹². Dies sind oft Gene, die auch in der Entwicklung der normalen Hämatopoese eine Rolle spielen. Weitere genetische Veränderungen in der AML sind numerische Aberrationen wie +8 oder -7. Komplex aberrante Karyotypen werden in 15% der Fälle beobachtet.

Die unterschiedlichen chromosomalen Veränderungen können zum Teil den verschiedenen AML-Subtypen zugeordnet werden:

Bei der Promyelozytenleukämie (AML-M3) findet sich in 90% die Translokation t(15; 17). Dabei ist das Gen für den Alpharezeptor der Retinsäure (RAR- α) von Chromosom 17 auf Chromosom 15 transloziert, wo es das Fusionsgen PML/RAR- α bildet. Es resultiert ein Stillstand der myeloischen Differenzierung auf der Stufe des Promyelozyten. Dies wird verursacht durch den Verlust der Wildtyp RAR- α – Funktion

und durch die Fähigkeit des Fusionsproteins PML/RAR- α , DNA zu binden und Komplexe zu bilden, die die Chromatinkonformation derartig verändern, dass die Transkription von Genen, die die myeloische Differenzierung kodieren, unterdrückt wird^{34, 105}. Mit All-trans-Retinsäure (ATRA) kann diese Hemmung spezifisch aufgehoben werden. Somit besteht die Möglichkeit einer gezielten Therapie.

Die Translokation t(8; 21), die zur Produktion des Fusionsgenes AML1/ETO führt, findet sich in 18% der Fälle von AML-M2. Die Inversion (16) findet sich gehäuft bei der AML M4 mit Eosinophilie. Die Translokation t(1; 22) ist assoziiert mit der AML-M7. In zahlreichen Studien wurde die prognostische Bedeutung der verschiedenen zytogenetischen Aberrationen in der AML-Therapie untersucht^{18, 95, 106, 116}. Dabei werden üblicherweise drei Prognosegruppen unterschieden: Zur Hochrisikogruppe mit niedriger Remissionsrate und kurzer medianer Überlebenszeit gehören Patienten mit Veränderungen am langen Arm der Chromosomen 3, 5, 7 oder 11 sowie Patienten mit komplex aberranten Karyotypen. Als prognostisch günstig gelten die Translokationen t(15; 17) und t(8; 21) sowie die Inversion 16. Patienten mit einem normalen Karyotyp oder mit anderen Aberrationen als den zuvor genannten zählen zur intermediären Prognosegruppe. Im Rahmen von Studien werden derzeit risikoadaptierte Therapiekonzepte geprüft, bei denen sich diese unterschiedlichen Prognosegruppen in einer unterschiedlich intensiven Therapie widerspiegeln.

1.1.6.3 Molekularbiologie

Auch zur Einschätzung der Prognose können die Veränderungen auf der molekularbiologischer Ebene herangezogen werden.

Bei etwa 30% aller AML-Patienten kann eine Aktivierung der Flt3-Rezeptortyrosinkinase durch interne Tandemduplikationen (ITD) der juxtamembranären Region gefunden werden^{71, 75, 130}. Damit ist Flt3 das am häufigsten mutierte Gen in der AML. Flt3 ist auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert. Es wird auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und vermittelt bedeutende Funktionen in Proliferation, Differenzierung und Überleben^{64, 103}. Auch AML-Zellen exprimieren Flt3 und können durch den Flt3-Liganden FL zu gesteigerter Proliferation und Überleben angeregt werden⁵⁶.

In Zelllinienmodellen führen ITD-Mutationen von Flt3 (Flt3-ITD) zu ligandenunabhängiger Flt3-Aktivierung und Zelltransformation^{29, 40, 70, 112}. Das Vorliegen von Flt3-ITD ist assoziiert mit einer signifikant schlechteren Prognose im Vergleich zu Patienten ohne diesen Defekt^{65, 71, 89}.

Neben der Flt3-ITD-Mutation spielen weitere genetische Alterationen eine wichtige prognostische Rolle. So ist eine Mutation im NPM1 Gen mit einer günstigen Prognose assoziiert, vor allem in Kombination mit Flt3-Wildtyp, wie auch eine Mutation im CEPBA Gen mit einem verlängerten Überleben assoziiert ist. Hingegen führen Expressionen von MN1, BAALC und ERG zu einem kürzeren Überleben.

1.2 Signaltransduktion

Signaltransduktion ist einer der wichtigsten Prozesse lebender Zellen. Sie bietet einen effektiven Mechanismus der Adaptation lebender Zellen, von der einzelnen Zelle bis hin zum multizellulären Organismus. Zellen verfügen über eine Vielzahl von Signalkreisläufen, die eine extra-, intra- und interzelluläre Kommunikation erlauben. Zellen antworten auf Signale z.B. mit Proliferation, Differenzierung oder sogar mit der Initiierung des programmierten Zelltodes, wobei ein und dasselbe Signal zu unterschiedliche Zellantworten führen kann. Als biologische Signaleinheit können drei funktionelle Komponenten angesehen werden: 1. der Signal-Receiver (Empfänger), 2. der Signal-Transducer (Umwandler) und 3. der Signal-Amplifier (Verstärker).

Zellen verfügen über eine Vielzahl von Rezeptoren, die die eigene Signaltransduktionskette bei Stimulation in Gang setzen, aber auch andere Rezeptoren mit involvieren und so die Zellantwort auf unterschiedliche Kanäle weiterleiten. Zu den großen Rezeptorklassen gehören: G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Rezeptor-Tyrosinkinase, Zytokin-Rezeptoren und Zelladhäsions-Rezeptoren.

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Viele Wachstumsfaktoren übermitteln ihre Signale in das Zytoplasma durch Bindung und damit Aktivierung an Rezeptoren, die eine intrinsische Protein-Tyrosin-Kinaseaktivität besitzen oder durch Bindung an heterotrimeren G-Proteinen, sog. G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die GPCR bilden mit über 1000 verschiedenen Proteinen die größte Fraktion der Oberflächenrezeptoren und stellen über 1% der ca. 100000 kodierten Proteine des humanen Genoms dar. Sie besitzen ein gemeinsames strukturelles Motiv, die sog. seven-transmembrane-region, eine siebenmal die Membran umspannende Region. Diese Rezeptoren können durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden, dazu zählen: Wachstumsfaktoren, vasoaktive Polypeptide, Neurotransmitter, Chemokine, Hormone, Phospholipide, Photonen und olfaktorische Reize. Eine Aktivierung der GPCR durch entsprechende Liganden

führt zu einer Veränderung der transmembranären α Helices und damit verbunden zu Konformationsänderungen der intrazellulären Schleifen, die zu einer Freilegung der vorher maskierten G-Protein-Bindungsstelle führt. Die Bindung an den Rezeptor führt an der α -Untereinheit der G-Proteine zu einem Austausch von GDP für ein GTP und damit zu einer Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit. Die GTP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung, die eine Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Heterodimer zur Folge hat. Die $G\alpha$ -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Heterodimer initiieren unabhängig voneinander intrazelluläre Signalantworten durch Aktivierung von jeweils verschiedenen untergeordneten Effektoren. Zu ihnen zählen z.B. Adenylatzyklen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen, Ionenporter, Regulation der Ionenkanalaktivität und Regulation von Kinasen. Zurzeit sind 17 verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten identifiziert, die aufgrund sequenzieller Homologien in 4 Klassen unterteilt werden können: α_s , α_i , α_q und α_{12} . Ferner sind 5 β und 12 γ Untereinheiten bekannt, was eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten erlaubt. Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die $G\alpha$ -Untereinheit 13, die zur Subgruppe 12 der α -Untereinheiten gehört, die aus den beiden Vertretern $G\alpha_{12}$ und 13 gebildet wird. Zu ihren Effektoren gehören u. a.: p115-RhoGEF, PDZ-Rho-GEF, GTPase-activating protein of ras (GAPIM) und E-Cadherin⁴⁹.

1.3.1 Regulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

Die Regulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) unterliegt mehreren Mechanismen, die auf unterschiedlichen Ebenen und in unterschiedlichen Geschwindigkeiten erfolgen kann. Eine wichtige Funktion in der schnellen Regulation der GPCR über Ein- und Ausschaltmechanismen via GTP- bzw. GDP-Bindung an der α -Untereinheit wird den RGS-Proteinen (Regulator of G-Protein Signaling) zum Teil. Sie erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, und führen über ein Austausch von GTP mit GDP zu einem Abschalten der $G\alpha$ -Untereinheit¹³. Die RGS-Proteine können aber auch als Effektorantagonisten über eine Bindung an die G-Proteine die Interaktion des G-Proteins mit seinem Effektor blockieren^{74, 44}.

Als dritten Wirkmechanismus der RGS-Proteine ist eine Erhöhung der Affinität der $G\alpha$ -Untereinheit auf freie β/γ -Dimere beschrieben, die zu einer schnelleren Überführung in ein heterotrimeres G-Protein führt.

Weitere Regulationsmechanismen sind auch auf übergeordneten Ebenen beschrieben, z.B. Phosphorylierungen des Rezeptors mit konsekutiver Arrestinbindung und anschließender Dephosphorylierung in den Endosomen durch G-Protein coupled receptor Kinases (GRK's) ⁵³, wie auch Acetylierung, Myristylierung und reversible Palmitoylierung. Dies führt zu einer Änderung der Affinität der G-Proteine zur Membran ^{120, 74, 121}.

Langsame Regulationsmechanismen auf der Ebene der mRNA-Transkription spielen bei der raschen Zellantwort durch Ligandenstimulation keine entscheidende Rolle ⁶⁷.

1.3.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Zellproliferation

Durch den Einsatz von Pertussis Toxin (Ptx), welches zu einer ADP-Ribosylierung der G-Protein α -Untereinheit der α_i -Familie führt und damit eine Bindung zum Rezeptor verhindert, konnten erstmals eine Reihe von Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die über diesen Rezeptor ihre Signale vermitteln. Zu den Wachstumsfaktoren, die über GPCR agieren, zählen sowohl Ptx-sensitive als auch Ptx-nicht sensitive GPCR, wie zum Beispiel Thrombin, LPA, Bombesin, Bradykinin, Vasopressin, Angiotensin, Endothelin usw.

Durch konstitutive Aktivierung der Rezeptor-Protein Tyrosin-Kinasen, durch strukturelle Modifikation des Rezeptors selbst oder durch eine fehlregulierte Ligandenpräsentation, konnten 1985 Aaronson und Tronik ²⁰ eine maligne Transformation bei murinen Fibroblasten induzieren. Dies führte zu der Annahme, dass eine uneingeschränkte Aktivierung der proliferativen Signalwege zur malignen Transformation beiträgt. Die Entdeckung des *mas*-Onkogens, ein für einen GPCR codierendes Gen, zeigte erstmalig die Verbindung zwischen maligner Transformation und GPCR. Seitdem ist eine Vielzahl von GPCR bekannt, die über ein malignes Transformationspotential verfügen.

Zahlreiche GPCR-kodierende Sequenzen sind seither in DNA-Virus Genomen identifiziert worden, z.B. im humanen Zytomegalie Virus (CMV), im humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV) und beim Kaposi Sarkom assoziierten Herpes Virus (KSHV). Das CMV, welches vor allem Leukozyten, Fibroblasten und epitheliale Zellen infiziert, verfügt im Genom über 3 open reading frames, die häufige GPCR kodieren und die funktionelle Chemokine-Rezeptoren darstellen. Obwohl ihre Rolle in der viralen Entwicklung noch unklar ist, wird ihnen eine Bedeutung in der Abwendung der Wirtsabwehr durch molekulare Mimikrie von Proteinen zugesprochen, die normalerweise bei der Immunantwort aktiviert werden.

Das HTLV, welches mit der Entstehung von Leukämien und Lymphomen assoziiert wird, besitzt u. a. das *ecrf3*-Protein (kodiert von Gen SaHV2gp75 G protein-coupled receptor homologue [Saimiriine herpesvirus 2]) das als funktionelles Chemokine-Rezeptor agiert und eine identische Ligandenspezifität besitzt wie die des IL-8-Rezeptors.

Darüber hinaus fand man bei zahlreichen karzinomatösen Entartungen aktivierende Mutationen der $G\alpha$ -Untereinheiten, die als Transformationsgene in unterschiedlichen Stadien der Neoplasie identifiziert wurden. Von den insgesamt 17 α -Untereinheiten konnte für 10 eine Beteiligung in der Regulation des Zellwachstums nachgewiesen werden: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{16}$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$. So fand man bei Schilddrüsen- und Hirnanhangsdrüsentumoren Mutationen der $G\alpha_s$ -Untereinheit, das *gsp*-Onkogen, bei Ovarialtumoren Mutationen der $G\alpha_{i2}$ -Untereinheit, das *gip2*-Onkogen.

1.3.3 Die Rolle von $G\alpha_{12/13}$ im Zellwachstum und malignen Transformation

$G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, die zusammen die $G\alpha_{12}$ -Gruppe bilden, sind ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert. Bei einem molekularen Gewicht von 43 000 kDa teilen sie eine 66%-ige Aminosäuresequenzhomologie. Eine Deletion des *cta*-Gens (Concertinagen) bei *Drosophila*, welches dem $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ beim Menschen entspricht, zeigte eine Störung in der Entwicklung der vorderen Furche, welches erstmalig den Hinweis auf die Beteiligung des $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in der Regulation des Zellwachstums lieferte. Aaronson und Mitarbeitern²⁰ gelang 1993 erstmalig die Identifizierung des $G\alpha_{12}$ als transformierendes Onkogen für Weichteilsarkome. Auch $G\alpha_{12}$ -transformierte NIH3T3-Zellen (immortalisierte Fibroblasten) zeigten eine Verkürzung der Verdopplungszeit, Verlust der Kontaktinhibition, Kapazität zur Koloniebildung und bei infizierten athymischen „nude“ Mäuse (Naktmäusen) kam es zur Tumorbildung. Die transformierende Wirkung von $G\alpha_{12}$ war serumabhängig, die sich aber bei Expression einer GTPase-defekten, konstitutiv aktiven $G\alpha_{12}$ Mutante ($G\alpha_{12}$ Q229L) nicht mehr zeigte. Expressionsstudien der beiden aktivierten Mutanten $G\alpha_{12}$ Q229L und $G\alpha_{13}$ Q226L zeigten keine Veränderungen der konventionellen second Messenger, z.B. cAMP, Ca^{2+} oder IP_3 , dafür eine deutliche Aktivierung des JNK-Signalweges. Die Aktivierung erfolgte hierbei über die kleinen G-Proteine insbesondere Rho, Rac und Cdc42. Neben dem JNK-Signalweg kam es auch zu einer Ras- und Rac-abhängigen Aktivierung des ERK-Signalweges¹⁰⁹ und zu einer Rho-abhängigen Aktivierung des fokalen Adäsionskomplexes. Gleichzeitig konnte eine Beteiligung der Ras-abhängigen ERK-Aktivität und Ras- und Rac-abhängigen JNK-Aktivität in der Progression des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase gezeigt werden. Der Synergismus entlang beider Signalwege wird durch das $G\alpha_{12}$, Raf1 und Rac1 reguliert, wobei Fehlfunktionen auf eben dieser Ebene eine Schlüsselrolle in der $G\alpha_{12}$ -vermittelten malignen Transformation der NIH3T3 Zellen zugeschrieben wird.

Des Weiteren ist $G\alpha_{12}$ an einer Vielzahl von anderen Signaltransduktionswegen und zellulären Ereignissen involviert. So konnte eine $G\alpha_{12}$ -vermittelte Potenzierung der serumabhängigen Arachidonsäurefreisetzung gezeigt werden, zudem eine $G\alpha_{12}$ -

vermittelte Phosphorylierung und damit Aktivierung zahlreicher Tyrosinkinasen, wie z.B. FAK, Tec/Bmx und Pyk-2. Darüber hinaus verfügt $G\alpha_{12}$, durch die Fähigkeit kleine G-Proteine zu aktivieren, über ein großes Wirkspektrum. So kann es Ras/Rho-abhängig Einfluss auf PC-PLC oder PLD nehmen und Rac/Rho-abhängig PI4K, PIP4K und PIP5K mit beeinflussen. In $G\alpha_{12}Q229L$ und $G\alpha_{13}Q226L$ -transformierten NIH3T3 Zellen zeigte sich eine Aktivierung der sog. primary response Gene, z.B. Srf und Egr-1, und eine Aktivierung des Cox-2-Signalweges.

Der genaue Mechanismus, wie $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ das Signal an die kleinen G-Proteine weiterleitet, ob direkt oder über Mediatoren, ist bislang größtenteils unbekannt. $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ kann kleine G-Proteine über ihre übergeordneten Regulatoren beeinflussen, dazu zählen:

1. Stimulation der GEF's (Guanin Nucleotid Exchange Protein)
2. Kompetitive Hemmung der GDI's (Guanin Nucleotid Dissociation Inhibitor)
3. Inhibition spezifischer GAP's (GTPase activating protein)

Darüber hinaus konnte eine physikalische Interaktion des RGS-Motiv tragenden p115RhoGEF mit $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ gezeigt werden. Während die Signalvermittlung vom $G\alpha_{13}$ zu Rho, sowohl Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR als auch anderen nicht Rezeptortyrosinkinasen mit involviert, so erscheint die $G\alpha_{12}$ -Rho-Signalvermittlung Tyrosinkinasen - unabhängig zu sein.

1.3.4 G α _{12/13} und Zellzyklus

Wie oben dargestellt, werden die proliferativen Signale von G α _{12/13} hauptsächlich über kleine G-Proteine vermittelt. Ras, Rho, Rac und Cdc42 werden dabei wichtige Funktionen in der für den Zellzyklus essentiellen Progression von der G1 zur S-Phase zugeschrieben, dem Rac zusätzlich in der Progression von der G2 zur M-Phase. Daher erscheint es als wahrscheinlich, dass eine G α _{12/13} – vermittelte Ras-, Rac-, Rho- und Cdc42 Aktivierung eine Akzeleration des Zellzyklus zur Folge haben kann. Darüber hinaus verfügt Rho über regulierende Funktionen im Bereich des Zytoskelettes mit Einfluss auf die Zellteilung und die Proliferation.

1.3.5 In vivo Funktionen von G α _{12/13} in G α _{12/13} – defizienten Mäusen

In einem G α ₁₃ – defizienten Mausmodell führte der Verlust von G α ₁₃ zu einer frühen embryonalen Letalität. Entscheidend war eine durch den Verlust von G α ₁₃ ausgelöste Störung des vaskulären Systems. Dabei wurde die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Endothelien durch den Verlust von G α ₁₃ nicht beeinflusst, jedoch kam es zu deutlichen Beeinträchtigungen der Angiogenese mit Störungen von Wachstum, Migration und Remodeling existierender Endothelien. In Fibroblasten führte der G α ₁₃ Verlust zu einem kompletten Verlust der Thrombin-vermittelten Migration, was das Vorhandensein einer intakten G α ₁₃-Funktion für eine adäquate und vollständige Migration dieser Zellen nahe legt. Zusätzlich führte der G α ₁₃ Verlust zu Störungen der Aktivierung und Migration von Blutplättchen⁷⁸.

1.4 Kleine G-Proteine

Kleine GTP-bindende Proteine (G-Proteine) sind monomere G-Proteine mit molekularen Massen um 20-40 kDa. Um 1980 wurden erstmals kleine G-Proteine als Onkogene des Sarkoma Virus beschrieben. Später konnten diese zellulären Onkogene auch in humanen Zellkulturen identifiziert und gleichzeitig auch Mutationen bei einigen humanen Karzinomen nachgewiesen werden. Die Mutationen der G-Proteine führte zu einer gesteigerten Proliferation und Transformation kultivierter Zellen und zu eine Induktion der Zelldifferenzierung in neuronalen Zellen. Durch die sequenzielle Strukturhomologie vor allem im Bereich des Aktivierungsmechanismus mit den heterotrimeren G-Proteinen, wie z.B. Gs und Gi, ordnete man sie der Gruppe der G-Proteine zu.

Heute sind über 100 eukaryote kleine G-Proteine identifiziert. Die kleinen G-Proteine sind in 5 Untergruppen aufgeteilt:

- 1. Ras-Familie** (4 Mitglieder*)
- 2. Rho-Familie** (6 Mitglieder*)
- 3. Rab-Familie** (11 Mitglieder*)
- 4. Sar/Arf-Familie** (7 Mitglieder*)
- 5. Ran-Familie** (2 Mitglieder*) *Angaben für Hefen

wobei jeder Untergruppe z.T. gemeinschaftliche aber auch unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden können. So ist die Ras-Familie hauptsächlich an der Regulation der Genexpression involviert, die Rho-Familie insbesondere das Rho/Rac/Cdc42 mit der Reorganisation der Zytoskelettes und der Regulation der Genexpression. Zu den Funktionen der Rab- und Sar/Arf-Familie gehören die Steuerung des intrazellulären Vesikeltransportes, während die Ran-Familie an der Steuerung des nukleozytoplasmatischen Transportes in der G₁, S und G₂-Phase des Zellzyklus und der Mikrotubuli Organisation in der M-Phase mitbeteiligt ist.

1.4.1 Die Struktur der kleinen G-Proteine

Die Aminosäuresequenz der Ras-Proteine in unterschiedlichen Spezies zeigt eine Homologie von 30-55%, wobei die Homologie der Ras-Proteine untereinander 50-55% beträgt. Die homologen Sequenzen codieren für Aminosäuresequenzen, die für die spezifischen Eigenschaften der kleinen G-Proteine verantwortlich sind:

1. Bindungsstellen für das GDP/GTP (GDP/GTP-binding Domains)
2. GTPase-Aktivität, die GTP in GDP + P_i hydrolysiert

1.4.2 Die Rolle der kleinen G-Proteine als molekulare Schalter

Je nach Bindung von GDP oder GTP können die kleinen G-Proteine zwischen einem inaktiven (GDP-gebunden) oder einem aktiven (GTP-gebunden) Zustand wechseln. Ein übergeordnetes Signal stimuliert die Dissoziation des GDP vom G-Protein und ermöglicht so das Anbinden des GTP. Dieses führt u. a. zu Konformationsänderungen und damit möglichen Freilegung von Bindungsregionen für untergeordnete Effektoren, die nun Signale weiterleiten können. Die aktive, GTP-gebundene Form, konvertiert durch seine intrinsische GTPase-Aktivität das G-Protein in seine inaktive, GDP-gebundenen Form zurück und beendet so die Interaktion mit den nachgeschalteten Effektoren.

1.4.3 Regulatoren der kleinen G-Proteine

Der limitierende Schritt des GDP/GTP Austausches ist die Dissoziation des GDP vom G-Protein. Diese Reaktion verläuft extrem langsam. Unter der Mitwirkung von GEP's (Guanin Nukleotid Exchange Protein, z. T. auch als GEF bez.) kommt es zu einer extremen Beschleunigung dieser Reaktion. Dazu interagiert das GEP mit dem inaktiven G-Protein und bildet mit ihm ein Komplex, was zur Freisetzung des GDP führt. Dissoziiert nun das GEP vom G-Protein wird es durch GTP ersetzt und damit das G-Protein aktiviert. Die meisten GEP's, wie z.B. *Son of Sevenless* (SOS), Ras-GEP und Rab3 GEP sind für jedes kleine G-Protein spezifisch, andere, wie z.B. Dbl, können mit mehreren kleinen G-Proteinen interagieren.

Neben den GEP's gibt es zwei weitere Gruppen von Regulatoren der G-Proteine, die GDI's und die GAP's. Die GDI's (Guanin Nukleotid Dissociation Inhibitor) inhibieren sowohl die basale als auch die GEP vermittelte GDP Dissoziation und halten so die kleinen G-Proteine im inaktiven Zustand. Zu ihnen zählt das Rho-GDI und Rab-GDI, die, verglichen mit den GEP's, eine ausgedehntere Substratspezifität zeigen.

Die GTPase Aktivität kleiner G-Proteine ist unterschiedlich und in der Regel langsam. Durch den Einfluss von GAP's (GTPase activating protein) kommt es zu einer Erhöhung der GTPase Aktivität und damit zu einer schnelleren Inaktivierung der kleinen G-Proteinen. Die meisten GAP's, wie z.B. Ras-GAP oder das Rab3-GAP, sind äußerst substratspezifisch und interagieren meist mit nur einem G-Protein.

1.4.4 Vorkommen und Lokalisation

Kleine G-Proteine und heterotrimere G-Proteine findet man ausschließlich in Eukaryonten, von der Hefe bis zum Menschen. G-Proteine der Proteinsynthese hingegen, wie z.B. Elongationsfaktoren, findet man sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten. Die meisten G-Proteine sind in Säugerzellen und ihren Geweben weit verbreitet, zeigen z. T. aber erhebliche Unterschiede im Expressionsprofil. Einige wenige kleine G-Proteine sind sehr gewebsspezifisch, wie z.B. das Rab3A, das ausschließlich in Neuronen, neuroendokrinen und exokrinen Zellen vorkommt.

Intrazellulär sind die kleinen G-Proteine größtenteils im Zytosol oder an Membranen lokalisiert, wobei jedes kleine G-Protein an einer spezifischen Membranstelle gebunden ist. Ihre unterschiedlichen Bindungsorte an den Membranen werden durch posttranslationelle Modifikationen vermittelt, wie z.B. durch das Anhängen von Farnesyl- oder Palmitylresten.

1.5. Zellmigration

1.5.1 Zellwanderung und ihre biologische Bedeutung

Zellmigration, die Fortbewegung von Zellen, ist für viele physiologische Funktionen essentiell. Viele krankhafte Veränderungen eines Organismus sind mit einer eingeschränkten oder überschüssigen Zellmigration verbunden. Einige Zelltypen sind auf die Zellmigration spezialisiert, z.B. neutrophile Granulozyten, in anderen Geweben ist die Migration normalerweise unterdrückt, kann aber im Rahmen der Wundheilung oder der malignen Transformation aktiviert werden.

Ein wesentliches Charakteristikum von Entzündungsreaktionen stellt die gerichtete Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe dar. Dieser Prozess wird durch eine Kaskade von Leukozyten-Endothel-Wechselwirkungen vollzogen, die über unterschiedliche interzelluläre Adhäsionsmoleküle vermittelt werden. Während Selektine und deren Liganden für einen ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel verantwortlich sind, wird eine sich anschließende feste Adhäsion durch Chemokin-induzierbare Integrine (Leukozyten) bzw. Ig-Familienmitglieder (Endothel) getragen. An diese Adhärenz schließt sich im Einfluss chemotaktischer Gradienten eine gerichtete Migration der Leukozyten durch die Schicht der Endothelzellen und die Basalmembran an den eigentlichen Ort der Entzündung an. Hierbei scheint zumindest in den meisten Fällen etabliert, dass die eigentliche Penetration des einschichtigen Endothels größtenteils parazellulär, d.h. auf der Ebene der endothelialen Zell-Zell-Kontakte, durch einzelne Endothelzellen hindurch, erfolgt. Es wird somit postuliert, dass die transendotheliale Migration von einem geregelten Öffnen und Schließen interendothelialer Verknüpfungsstrukturen (junctions) begleitet ist. Unterstützt wird diese Sichtweise u. a. durch die Tatsache, dass Antikörper gegen interendotheliale Adhäsionsmoleküle wie PECAM-1 und JAM-1 die transendotheliale Migration von Leukozyten blockieren können. In einigen Fällen erfolgt aber die transendotheliale Migration nicht „parazellulär“ sondern „transzellulär“. Bei der transzellulären Migration wandern die Leukozyten durch transient formierte Poren in den Zellkörper der Epithelzellen.

1.5.2 Kleine G-Proteine und ihre Rolle bei Aktin-Rearrangements

Die Migration der Leukozyten wird durch signifikante Umlagerungen im Zytoskelett der beteiligten Zellen begleitet. In erster Linie sind hier die Veränderungen im Aktin-Zytoskelett der migrierenden Leukozyten zu nennen, die nach fester Adhäsion der Zellen beobachtet werden und Voraussetzung für die Polarisation der Zellen und ihre gerichtete Wanderung an den Ort der Entzündung sind.

An der Veränderung des Aktin-Zytoskelettes sind unter anderem die kleinen G-Proteine beteiligt, unter deren Einfluss es z.B. zur Bildung von *Filopodien*, *Lamellopodien* und/ oder *Stressfasern* kommt.

Filopodien zeichnen sich durch dichte Aktinbündel auf der dem Reiz zugewandten Seite aus, die zylinderförmig zur Bewegungsrichtung hin ausgerichtet sind.

Lamellopodien sind ebenfalls am vorderen Ende der Zelle lokalisiert, es handelt sich um dünne, blattartige Netzwerke, die die Vorwärtsbewegung der Zelle initiieren und der Zellmembran ein charakteristisches Erscheinungsbild geben.

Die Stressfasern bestehen aus Bündeln kurzer Aktinfilamente mit eingelagerten Myosinfilamenten. Sie durchziehen parallel zu den Längsseiten den Zellkörper und bewegen durch Kontraktion den Zellkörper vorwärts⁶⁹. Aktin-Stressfasern sind mit der Innenseite der Plasmamembran über Integrine und den so genannten fokalen Adhäsionskomplex verbunden, der neben Strukturproteinen wie Talin, Vinculin und alpha-Aktinin einige Proteinkinasen einschließlich der fokalen Adhäsionskinase (FAK) enthält⁵⁷.

Die Aktin-Polymerisation wird über die kleinen G-Proteine der Rho-Familie reguliert, zu denen, wie bereits beschrieben, Rho, Rac und Cdc42 gehören. Durch die Aktivierung von Rho kommt es zur Bildung der Aktin-Stressfasern und des fokalen Adhäsionskomplexes. RhoA kann beispielsweise über nachgeschaltete Kinasen die Phosphorylierung der Myosin-II-Leichtkette induzieren und damit direkt eine Aktin-Myosin-Kontraktion auslösen^{6, 51}. Die Bildung der Lamellopodien wird Rac-vermittelt. Eine Aktivierung des Rac führt in einigen Zellsystemen zu einer Neustrukturierung des Zytoskelettes und damit zur Bildung der Lamellopodien.

Rac ist aber auch an der Ausbildung von Adhärenzkontakten zwischen Zellen beteiligt, da es die Bildung von E-Cadherin und F-Actin stimuliert.

Bei der Bildung der Filopodien ^{76, 77}, aber auch an der Bestimmung der Zellpolarität ist Cdc42 beteiligt. Eine Blockade von Cdc42 führt zu einer ungezielten Ausbildung von Lamellipodien in alle Richtungen und erschwert dadurch eine gerichtete Migration.

Cdc42 ist nicht für die Protrusion an sich sondern für deren Lokalisation in der Zelle verantwortlich ¹⁷. Cdc42 ist die wichtigste Determinante für die Zellpolarität als Antwort auf einen externen Stimulus.

Nicht nur die Aktivierung der G-Proteine ist für die Zellwanderung von Bedeutung, sondern auch ihre räumliche Verteilung innerhalb der Zelle bzw. Zellmembran. Während Rac und Cdc42 vornehmlich an der „leading edge“ (Frontmembran) lokalisiert sind und jeweils dort ihre unterschiedlichen Effekte auf das Aktin ausüben, ist Rho am Zellkörper lokalisiert.

- Rac reguliert die Aktinpolymerisation an der Zellfront, um die Protrusion zu veranlassen;
- Cdc42 agiert an der Zellfront, um die Richtung als Antwort auf einen externen Reiz zu kontrollieren;
- Rho stimuliert die Aktin-Myosinkontraktion im Zellkörper

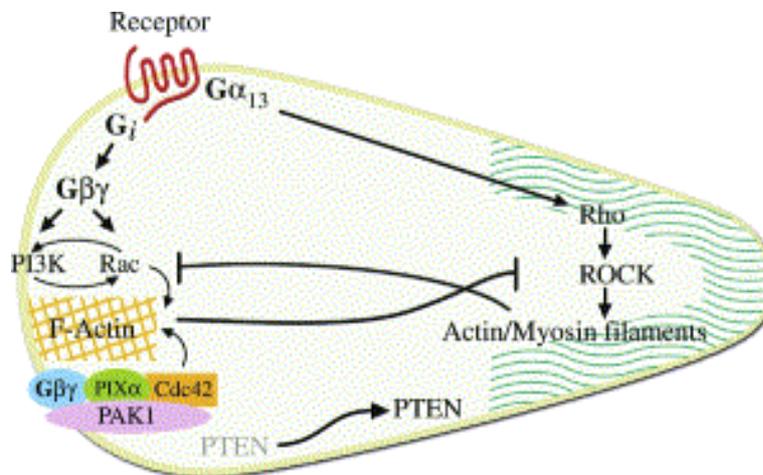


Abbildung 1. Verteilung der kleinen G-Proteine innerhalb der migrierenden Zelle. Während Rho vornehmlich am Zellkörper lokalisiert ist, ist Rac und Cdc42 an der Frontmembran zu finden, Schaubild entnommen aus Xu et al. ¹²⁸

1.5.3 Chemokinesis und Chemotaxis

Viele Zellen können eine polarisierte Morphologie annehmen mit einer Front und einem Ende und besitzen die Fähigkeit zu migrieren. Dies führt nur zu einer zufälligen Bewegung (random walk), welches primär als *Chemokinesis* bezeichnet wird.

Bei der *Chemotaxis* hingegen kommt es als Antwort auf einen externen Reiz zu einer gerichteten Bewegung, deren Richtung durch Cdc42 kontrolliert wird. Gut untersucht ist dies in Makrophagen mit einem Chemoattractant (Chemoattraktor), wo eine Blockade des Cdc42 von einer gerichteten Bewegung zu einer zufälligen, ungerichteten Bewegung der Zelle führt. Wird hingegen Rac blockiert kommt es zu überhaupt keiner Bewegung der Zelle mehr ⁵.

Gesteuert wird die Wanderung durch Gradienten von Chemoattraktantien (s.o.), die an spezifische Rezeptoren der Leukozytenoberfläche binden und diese aktivieren. In der Regel handelt es sich dabei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung durch Ligandenbindung u. a. eine Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Enzyme wie Adenylatcyclase, Phospholipase C und Phosphatidylinositol-3 (PI-3) Kinase sowie eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach sich zieht. Unter Beteiligung kleiner GTPasen der Rho Familie (s. o.) werden hierdurch am führenden Ende (leading edge) der Leukozyten Umstrukturierungen im Aktin-Zytoskelett ausgelöst, die die Voraussetzung für eine gerichtete Wanderung sind. Die Migration kann einerseits relativ spät in der Signalkette durch Inaktivierung von Rho GTPasen, andererseits aber auch zu einem früheren Zeitpunkt durch Desensitivierung der Chemoattraktans-Rezeptoren inhibiert werden. Letzteres konnte durch anti-inflammatorisch wirkende Peptide des Annexin 1 Proteins erreicht werden, die an den Formylpeptidrezeptor von Granulozyten binden und durch dessen Desensitivierung die Migration der Zellen im Formylpeptid-Gradienten hemmen.

Bei Transmigrationsprozessen durch Endothelien ist neben dem Zytoskelett der migrierenden Leukozyten wahrscheinlich auch das Aktin-Zytoskelett der durchwanderten Endothelzellen in dem Transmigrationsprozeß in aktiver Weise beteiligt. So konnte an Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass Destabilisierung wie auch Stabilisierung endothelialer Aktinfilamente die transendotheliale Migration von Monozyten verhindern und dass der Regulation des endothelialen Aktomyosinsystems durch die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) eine Bedeutung bei der Transmigration von Granulozyten und Monozyten zukommt. Daneben zeigen Inaktivierungsstudien mit bakteriellen Toxinen, dass Vertreter der Rho GTPasen, die das Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen regulieren, eine Funktion bei der Regulation der Migration von Lymphozyten durch das Endothel der Blut/Hirn-Schranke sowie von Monozyten durch mikrovaskuläre Endothelien ausüben. Weitere Elemente der hier relevanten Rho Signalkaskaden wie auch der jeweiligen Rho-Zielproteine sind bislang nicht identifiziert. Wie aber bereits oben diskutiert muss kritisch angemerkt werden in

wieweit wirklich eine Transmigration stattfindet oder nicht eher eine interendotheliale (parazelluläre) Migration die häufigere Migrationsform ist. Dies ist mit den bislang durchgeführten Untersuchungen noch nicht abschließend geklärt.

1.6. Aufgabenstellung

G-alpha-13 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, dessen Aktivierung am Anfang vieler Signaltransduktionskaskaden steht. G-alpha-13 könnte eine entscheidende Rolle in der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse zugeteilt werden. Die wichtigsten davon sind die Regulation von Migration und Proliferation bis hin zur malignen Transformation von Zellen. Bislang wurden die meisten Untersuchungen in Fibroblastenzelllinien durchgeführt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Funktion von G-alpha-13 im Kontext myeloischer Zellen. Die Bestätigung der Relevanz von G-alpha-13 bei der Migration, Proliferation oder gar Transformation für diese Zellen, würde einen neuen und viel versprechenden therapeutischen Ansatzpunkt für Krankheiten, die mit einer Transformation oder dysregulierten Migration myeloischer Zellen einhergehen, insbesondere aber der Akuten myeloischen Leukämie, darstellen. In Kontext der Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die G-alpha-13 Aktivierung auf das Zytoskelett und das Migrationsverhalten myeloischer Zellen?
- Beeinflusst G-alpha-13 die Proliferation oder gar Transformation myeloischer Zellen?
- Was sind die zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Zellen

Die murine myeloische 32D-cl3 Zelllinie wurde von Dr. Felicitas Rosenthal aus Freiburg zur Verfügung gestellt. Etabliert wurde die Zelllinie durch Infektion von Langzeit- Knochenmarkskulturen aus C3H/HeJ Mäuse mit dem „Friend murine leukemia virus“.

Sie zeichnen sich durch eine IL-3 Abhängigkeit aus, die bei Abwesenheit zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase und schließlich zum Zelltod führt. IL-3 Starving (12-24h) und anschließende erneute Zugabe von IL-3 führen zur Synchronisation des Zellzyklus. Bei alleiniger IL-3 Zugabe bleiben die Zellen undifferenziert, jedoch bei zusätzlicher G-CSF Stimulation kommt es zu einer Differenzierung entlang der granulocytären Zelllinie. Zu ihren immunphänotypischen Merkmalen zählen: CD3-, CD10+, CD13-, CD19+, CD37+, HLA-DR+, sm/cylgM-, sm/cylgG-.

2.1.2 Kulturmedien und Puffer

Zellkultur: RPMI 1640 Medium mit 20mM HEPES (Biochrom), L – Glutamin (Gibco BRL), Natrium Pyruvat 100mM (Biochrom), Fetales Kälber Serum (FCS) (Gibco BRL), WEHI, Pentamycin/Streptomycin

Medien für Colonyassay: Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Life Technologies), STEMPro 2,3 % Methylcellulose (Gibco BRL)

Lysis Buffer: 50mM HEPES, pH 7.4, 10 v% Glycerol, 150mM NaCl, 1 v% TritonX 100, 1mM EGTA, 1mMEDTA, 50mM ZnCl₂, 25mM NaF. Direkt vor dem Lysieren werden zugegeben: 1x Complete Protease Inhibitor (1000x: STI (Trypsininhibitor) 50 mg/ml, Leupeptin 12.5 mg/ml, Aprotinin 12.5 mg/ml, 1mM NaV204 (Phosphataseinhibitor), 1mM Pepstatin (Biochem))

Gel Running Buffer (10x): 30.3 g Tris Base, 144.2 g Glycine, 10 g SDS, mit H₂O auf 1 l auffüllen.

Special Blotto Buffer (SBB): 1.21 g Tris-Hydrochlorid (Sigma), 4.38 g NaCl (Riedel-de-Haen), 1.0 ml Tween, 0.372 g EDTA in 1 l Aqua dest. lösen und mit HCL den pH auf 7.4 einstellen.

Transferbuffer: 12.11 g Tris Base, 57.65 g Glycerine, 0.8 l Methanol, 3.2 l H₂O

Blockierungsbuffer: 1x Special Blotto Buffer, 1 % bovine Serum Albumin (Sigma), 2 % Egg Albumin (Sigma)

Stripping-Buffer: 62.5 mM Tris, pH 8.0, 2 % SDS, 0.1 M Mercaptoethanol, 15.2 ml H₂O

Lysis/Wash Buffer für GST-Pulldown (Upstate Technology): 18 ml des 125 mM HEPES, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10 % Glycerol

2.1.3 Chemikalien

Agarose Ultra pure	(Gibco)
Preparagarose, Seaplaque GTG Agarose	(Biozyme)
Albumine Chicken Egg	(Sigma)
Bactoagar	(Difco Laboratories)
Bisbenzimid	(Klinikumsapotheke)
Bovine Serum Albumin	(Sigma)
DMSO 0,1%	(Merck)
DTT (Dithiotreitol)	(Sigma)
ECL (Enhanced Chemoluminescens)	(Pharmacia)
EDTA (Ethylendiamidtetraacetat)	(Sigma)
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	(Sigma)
Ethanol 96%	(Sigma)
Facs Flow	(Becton & Dickinson)
Gene clean Kit	(Bio 101)
Glycin	
HEPES (2-Hydroxyethylpiperazin- Ethansulfonidsäure)	(Biochrom)
Lauryl-Sulfat (SDS:Sodium Dodecyl Sulfat)	(Sigma)
Luria Broth Base	(Gibco)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	(Merck)
Mercaptoethanol	(Sigma)
Methanol	(Sigma)
Mini/Midi/Maxiprep Kit	(Qiagen)
Natriumchlorid	(Reidel-de-Haen)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
PBS Dulbecco's	(Gibco)
PVDF- Membran (Immobilon-P)	(Millipore)
Quicklyser QLY- 200	(Sysmex)
RPMI 1640 Medium w.20mm HEPES	(Biochrom KG)
Sephadex TM G-50 Fine DNA Grade	(Amersham Pharmacia)

Sodium Pyruvat 100 mM	(Biochrom KG)
SyBR Green PCR Master Mix	(PE Biosystems)
Thiourea 99%	(Sigma)
Trizma Base (Trishydroxymethylaminoethan	(Sigma)
Trizma Hydrochlorid	(Sigma)
Trizol Reagent, ultra Pure	(Gibco)
Trypan Blue stain 0.4%	(Gibco)
Universal PCR Mastermix	(PE Biosystems)

2.1.4 Antikörper, Taqman Primer und Probes, PCR Primer, Enzyme, Inhibitoren, Zytokine, Plasmide

Der polyklonale anti-mouse G-alpha13 Antikörper sc- 81903, der polyklonale anti-mouse Flt3 sc – 21788 Antikörper, wie auch anti-Rho sc- 418, anti-Rac sc- 217 und anti-Cdc42 sc- 8401 wurden bei SantaCruz Biotechnology erworben.

Den monoklonalen anti-Phosphotyrosin (Anti-Maus) Antikörper erwarben wir bei Transduction Laboratories.

Taqman Primer und Proben wurden von EUROGENTEC Germany hergestellt.

Restriktionsenzyme bezogen wir von Gibco, Ligase von Promega, Pfu Polymerase von Stratagene.

Die Inhibitoren PD 098059, LY 294002 und SB wurden von Calbiochem geliefert, das PP1 und C3 Exoenzym (des Clostridium Botulinum) von Biomol.

Rekombinantes murines Interleukin-3 sowie rekombinantes humanes FL wurden bei Repro Tech, humanes rekombinantes Interleukin-8 von Sigma erworben.

Das Cytokin SDF-1 (rekombinant, human) wurde von R&D Systems erworben.

Den plasmidischen Vektor TOPO-TA-Vektor erwarben wir bei der Firma Invitrogene, den pAL-Vektor erhielten wir freundlicherweise von Dr. M. Mizuki.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Nunclon^{TC} –Dish 35x10 mm, NunclonTM – Surface 6/12/24 well plates, NunclonTM – Surface Kulturflaschen (max.5, 20 und 50 ml) sowie 96-well plates NunclonTM – Delta wurden von NUNC erworben.

15 und 50 ml Falcon–Röhrchen sowie 145/20 mm Petrischalen wurden von Greiner Labortechnik erworben.

Des weiteren:

1,5 ml RNA Tubes -RNase free-, Costar microcentrifuge Tube

4 mm gap width, 800 µl vol. Elektroporationkuvetten, Eppendorf
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12x75 mm style, Falcon (Becton & Dickinson)
5 und 10 ml sterile Einmalspritzen, Amefa
50 ml Tubes, Sarstedt
96 well reaction plate (Micro Amp Optical), Applied Biosystems
Art Pipet tips, Molecular Bioproducts
Falcon Pipetten 1-50 ml
Melti-Lex™ A, Wallac
Millex- GX 0.22 µm Filterunit, Millipore
MultiScreen Filter Plates, Millipore
Multiscreen Filtration System, Millipore
Optical caps, Applied Biosystems
Original Eppendorf Pipettips 20-1000 µl
Printed Filtermat A for use with Microbeta, Wallac
Safeskin Einmalhandschuhe, Satin plus
Sample Bag, Wallac
Supra einmal Kanüle, 2x80 mm, Ehrhardt Söhne GMBH
Transwell Migrationplates, 5 µm pore size, 6.5 mm Diameter, Costar

2.1.6 Geräte

Auto Dilutor AD-260, Sysmex

0.100 mm, 0.0025 mm² Neubauer improved Zählkammer Brand

Biodancer, New Brunswick Scientific Biodancer

Bench: ClanLAF VFB 1806

BioRad Power Pac 200 Netzgerät

BioRad ready Gel cell

Blockthermostat BT200, Kleinfeld Labortechnik

Cycler (Mastercycler gradient), Eppendorf

Cytospin 2 Shandon

E.coli Pulser, BioRad

FACS Calibur, Becton & Dickinson

PC-Programm: CellQuest

ModFit LT (Zellzyklusanalyse)

Fluoreszenzmikroskop: Axioskop Zeiss MC 100 spot

Gelelektrophorese: Geldoc 1000 (Kammer), BioRad

PC-Programm: Geldoc Multianalyst

Harvester, INOTECH

Heat Sealer 1295-012, Wallac

Incubationsschrank: Cytoperm Heraeus

Lichtmikroskop: Olympus IMT-2

Microbeta 1450, Wallac

Microcellcounter F300, Sysmex

Microwelle, AEG micromat

Millipore Vacuum Pump XF54 23050

Multilmager: Flour-STM Multilmager, BioRad

PH-Meter, MP225 Mettler Toledo

Pipettes: Eppendorf Reference Pipettes

Pipetboy accu integra, Biosciences

RCT basic Heater, IKA Labortechnik

Rotator, Heidolph

Shaker, CAT ST5

Sonicator: G-Heinemann Ultraschall und Labortechnik (Branson Digital Sonigier Model 250D)

Trans-Blot SD semi dry Transfer cell

UV-Spektrometer: UV 1202 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, SHIMADSU

Vacu Gene Pump, Pharmacia

Vortex (Jahnke & Kunkel), IKA Labortechnik

Waage, Mettler PM2000

Wasserbad, Thermolab GFL und Köttermann

Zentrifugen: Sorvall MC 12V Du Pont

Sorvall Super T 2

Heraeus sepatech Cryofuge M7000

Eppendorf centrifuge 5417R

2.2 Methoden

2.2.1 Subklonieren der G-alpha-13 Konstrukte vom pCis-Vektor in den pAL-Vektor

2.2.1.1 Reinigung von Plasmid-DNA aus E.coli – Kulturen mit Qia-Prep Spin Kit

Unser untersuchtes Gen, G α 13 (Wildtyp und die konstitutiv aktive Form G-alpha-13Q226L (G-alpha-13QL)), lag im pCis-Vektor vor. Zuerst wurden die E.coli Kulturen, in denen das Plasmid amplifiziert wurde, für 15 Min. bei 4300rpm herunterzentrifugiert, das überstehende LB Medium (Luria – Bertani) wurde abgesaugt. Die pelletierten Bakterien wurden resuspendiert in Puffer P1 und in ein Microfuge Röhrchen transferiert. Anschließend wurden 250 μ l Puffer P2 zugegeben und das Röhrchen vorsichtig 4 – 6 gedreht. Nun wurden 350 μ l Puffer N 3 zugefügt, es wurde vorsichtig gemischt, um eine lokalisierte Präzipitation zu vermeiden und danach für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in Qiaprep Spin Columns aufgetragen und für 30 sec. zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde weggeschüttet. Nun wurde die Säule gewaschen mit 750 μ l Puffer PB und es wurde wiederum 30 – 60sec. zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und durch ein erneutes Zentrifugieren wurde das Pellet von verbleibendem Wasch – Puffer befreit. Die Qiaprep Spin Column wurde in einem neuen 1.5ml Microfuge Röhrchen platziert. Um die DNA zu lösen wurde 50 μ l vom EB Puffer oder ersatzweise Aqua 50 μ l dest. in das Zentrum der Column pipettiert. Die Säule wurde für 10 Min. unter den Abzug gestellt, abschließend für eine Minute zentrifugiert.

2.2.1.2 Amplifikation mit Pfu-Polymerase

Die Amplifikation unserer Plasmid-DNA erfolgte mit der Pfu-Polymerase, einer sog. „high-accuracy polymerase“. Diese ist der häufig gebrauchten Taq-Polymerase vorzuziehen, da sie eine geringere Lesefehlerquote verursacht. Es wurde zunächst in einem Eppendorf-Tube 20 μ l 10xBuffer, 16 μ l dNTP (2,5mM), 0,5 μ l unserer DNA (G α 13, WT und QL), jeweils 2 μ l Primer CMV I und CMV II, 5 μ l Pfu-Polymerase und 154,5 μ l H₂O pipettiert und in jeweils 4 neue Tubes verteilt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Cycler über 4h.

2.2.1.3 GenClean

Das GenClean-Kit dient der Isolierung von DNA von mehr als 200 bp Größe aus Agarosegelen. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann nach der Amplifikation und Gelelektrophorese das gewünschte PCR-Produkt von unspezifischen Banden getrennt werden. Nach der Amplifikation mit Pfu-Polymerase, Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung des Gels wurde die gewünschte Gelbande ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und das dreifache Volumen NaCl hinzu gegeben. Nach Erhitzung für 5 Min. auf 55°C wurde das Gelfragment mit Hilfe einer Pipette suspendiert unter Zugabe von 5µl Glasmilch pro 5µg DNA. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach 5 Min. wurde bei Raumtemperatur das Eppendorf Reaktionsgefäß für 30sec. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in New Wash Lösung resuspendiert und der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nun wurde das Pellet im gleichen Volumen Wasser gelöst, das vorher an Glasmilch verwendet worden war. Nach 1 Min. zentrifugieren bei Höchstgeschwindigkeit wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.4 A-Overhang

Nach der Aufreinigung der DNA führten wir ein A-Overhang zur Subklonierung in den Topo-TA-Vektor pCR2.1 durch. Dazu pipettierten wir 2,5µl 10x Buffer, 1,5µl MgCl, 0,2 µl Taq-Polymerase, 0,5µl dATP und 20,3µg DNA (Gα13, WT und QL) und amplifizierten es im Cycler 30 Min. bei 72°C.

2.2.1.5 Topo-TA-Cloning

Nach dem A-Overhang wurde Gα13 in den gemäß der Anleitung des Herstellers in den Topo-TA-Vektor pCR2.1 subkloniert (3µg A-Overhang-DNA + 1µl Topo-TA-Vector + 1µl Salt-Solution).

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Nach erfolgreichem Subklonieren in den Topo-TA-Vektor pCR2.1 wurde zunächst ein diagnostischer, später auch präparativer Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Cla I und Not I durchgeführt (10µl 10x Buffer, jeweils 0,2µl Cla I und Not I, 5µg DNA und 84,6µl H₂O). Im Anschluss erfolgte eine erneute Subklonierung in den später verwendeten pAL-Vector.

2.2.2 Zellkultur

Das Arbeiten im Bereich der Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendete hämatopoetische Vorläuferzelllinie 32D-cl3 wurde als Suspensionszelle in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 1% L-Glutamin, 1% Natrium Pyruvat, 1% P/S, 10% FCS und 10% WEHI als IL-3-Quelle angereichert wurde. Die Kultur erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre, wobei täglich eine Mediumkontrolle, sowie mikroskopische Kontrolle von Größe und Dichte der Suspensionszellen erfolgte.

2.2.3 Stabile Transfektion von 32 D Zellen mittels Elektroporation

48h vor der Elektroporation wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml Kulturmedium inkubiert.

Pro Elektroporation wurden zwischen 6×10^6 und 1×10^7 Zellen verwendet. Die Vitalität der Zellen betrug mindestens 90%. Zuerst wurden die Zellen einmal in RPMI Medium (w 20mM HEPES, FCS10%) gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl Medium mit 10% FCS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 4mm-Gap Elektroporationsküvette überführt und die DNA zugefügt. Die Elektroporation führten wir bei 300 Volt und 960 Faraday durch. Abschließend wurden die Zellen in 20ml Medium mit 10% FCS gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4 Sequenzierung

Zur Bestätigung der erfolgreichen Subklonierung wurden die neu hergestellten G-alpha-13 Konstrukte sequenziert. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit den ABI PRISM™-Systemen, welches fluoreszenzmarkierte DNA-Stränge ihrer Länge entsprechend auftrennt und detektiert. Verwendet wurden jeweils ein forward und ein reverse Primer. Zunächst wurde 1µg Plasmid-DNA mit 1µl Primer (forward oder reverse) und 4µl DTRM in einem Gesamtvolumen von 20µl zusammengegeben und anschließend im Cycler amplifiziert (96°C für 30 sec., 45°C für 15 sec. und 60°C für 4 min.). Die Sequenzierungsreaktion wurde nach der Amplifikation durch Zugabe von 80µl H₂O, 10µl 3M NaAc (PH 5,2), 250 µl 99%ETOH und 1µl Dextranblau gestoppt. Ferner wurde für 30 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl ETOH (70%) gelöst und erneut für weitere 10 Min. bei gleicher Umdrehungsgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Reaktionsgefäß 30 Min. bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 25µl TSR gelöst, 2 Min. bei 92°C denaturiert und für weitere 2 Min. auf Eis gelegt. Anschließend erfolgte die Auswertung.

2.2.5 TaqMan PCR

Bei der TaqMan PCR (Real-Time-RT-PCR) handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung von mRNA eines Genes. Im Unterschied zur konventionellen PCR enthält der Ansatz neben den beiden Primern eine Probe, die an einer Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Wenn die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die Probe gebunden nahe zusammen sind, wird nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen und nur dieser emittiert Licht. Während der PCR werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase so lange verlängert, bis sie auf die Probe treffen. Dort wird dann die Probe von dem DNA-Strang gelöst und mit Hilfe der 5'Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Das Resultat ist, dass die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nicht

mehr zusammen sind und somit kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Es können nun beide Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittieren. Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist proportional zur gebildeten DNA-Menge. Da diese Reporterfluoreszenz alle sieben Sekunden gemessen werden kann, ohne dass das PCR-Tube geöffnet werden muss, kann somit relativ einfach der Verlauf der PCR-Reaktion verfolgt werden. Innerhalb der Amplifikationskurve kann dann ein geeigneter Punkt für die Quantifizierung gewählt werden.

Ansatz: Nach der RNA-Isolierung und anschließenden RT (Reverse Transcription), für die Gewinnung von cDNA, erfolgt der Real-Time PCR-Ansatz nach folgendem Schema: 12,5µl Mastermixlösung (Taq-Polymerase, Mg, Nucleotide, PCR Puffer)

0,75µl forward Primer

0,75µl reverse Primer

0,5µl Probe

6,5µl H₂O

+4,0µl cDNA (cDNA in einer Verdünnungsreihe 1:4, insgesamt 5 Ansätze)

Als Housekeeping-Gen zur Normalisierung der Messwerte wurde GAPDH verwendet. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 2 Min. bei 94°C Inaktivierung/Denaturierung, 40x (15 sec. 94°C, 1 Min. 60°C), anschließend hold 25°C.

2.2.6 Westernblot

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Proteine, nachdem sie auf eine Trägermembran übertragen wurden, nachgewiesen werden können. Wir verwendeten 10^7 Zellen und zentrifugierten diese bei 1400rpm für 5 Min.. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen einmal mit gekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Lyse Buffer (5ml+ complete protease I, pepstatin I, Na₂V₂O₄ 23 inhibitor 200 I) auf Eis lysiert und für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 14000 rpm bei 4°C für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Der Probe wurde 3X Lämmli-Buffer zugemischt. Dieser enthält 3% DTT als

reduzierendes Reagenz. Das Gemisch wurde zum Denaturieren für 5 Min. auf 100°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS – Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde für 20 Min. bei 80 Volt und für 80 Min. bei 100 Volt durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese in einer Semi - Dry Trans – Blot Zelle über 1h mit 15V und 0,7A vom Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Dazu wurden pro Gel 6 zugeschnittene Whatmanfilterpapiere und die PVDF-Membran zuerst mit Methanol befeuchtet, dann mit H₂O abgespült und in Transferbuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in folgender Anordnung: 3 Whatmanpapiere, die PVDF-Membran, das Acrylamidgel, wieder 3 Whatmanpapiere. Nach dem blotten erfolgt die Proteindetektion. Hierzu wurde die Membran für 2h bei RT in Blockierungspuffer in ständiger Bewegung inkubiert, anschließend 3 mal mit Special Blotto Buffer gewaschen und danach mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Special Blotto Buffer wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper 1h bei RT inkubiert, erneut 3x gewaschen und anschließend in ECL – Lösung entwickelt. Dabei führt die Oxidation von Luminol durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase zu Emission von Licht, welches zur Belichtung eines Röntgenfilms führt.

2.2.7 FITC-Phalloidin - Färbung / Cytospin

Die Zellen für die FITC-Phalloidin-Färbung wurden mittels Zytospin auf Objektträger aufgetragen. Pro Objektträger wurden 10000-20000 Zellen verwendet, die in 100µl RPMI (+ 20%FCS) suspendiert sind. Im ersten Durchgang wurden zunächst die Objektträger mit 100 µl PBS eine Minute lang bei 500 rpm befeuchtet. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension (100µl) auf die Objektträger aufgetragen (4 Minuten bei 400 rpm). Danach wurden die Objektträger 2h bei Raumtemperatur getrocknet. Alternativ wurden die Objektträger nach dem Autoklavieren in eine Petrischale gelegt und die Zellsuspension auf die Objektträger pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 2h bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Objektträger mit den Zellen (entweder durch Zytospin aufgetragene Zellen oder durch Wachstum auf den Objektträgern) wurden für die FITC/Phalloidinfärbung in PBS gewaschen, anschließend mit 1% Formaldehyd über Nacht fixiert. Nach der Fixierung mussten die Objektträger erneut mit PBS gewaschen und danach 10 Min. in Triton X-100 behandelt werden. Dieses permeabilisiert die Zellmembranen und ermöglicht somit das Eindringen des Farbstoffes. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Objektträger 10 Min. in DAPI im Verhältnis 1:200 in PBS gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger nach einem weiteren Waschvorgang in PBS mit Tritc-Phalloidin (1:400 in PBS [1mg/ml]) für weitere 10 Min. gefärbt. Die Zellkerne werden dabei mit der DAPI-Färbung blau, die Aktinstrukturen werden mit dem Phalloidin rot gefärbt.

2.2.8 Konfokale Mikroskopie

Beim konventionellen Lichtmikroskop wird das Lampenlicht durch die Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert, und das vom Objekt ausgehende Licht wird durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Es wird durch die Okularlinse das so entstehende Bild betrachtet. Nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene erreicht bei diesem Mikroskop das Auge. Die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops ist durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht eingeschränkt.

Beim konfokalen Mikroskop wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Die einfachste Konstruktion sei hier erklärt: Die Kondensorlinse wird durch eine Linse ersetzt, die der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende beschränkt, die auf dem Objekt scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, dass Licht aus Bereichen des Objekts, das nicht in der Brennebene liegt, nicht in die Apertur der Blende fällt und damit ausgeblendet wird.

In den Photomultiplier (PMT) gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts.

Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop also zunächst nur einen Bildpunkt, der allerdings genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muss das Objekt Punkt für Punkt gerastert (gescannt) werden. Dies geschieht dadurch, dass das Objekt jeweils eine kleine Strecke verschoben wird, bevor der nächste Punkt vom Photomultiplier registriert wird ("stage scanning"). Die dabei gesammelten Bildpunkte werden dann von einem Rechner zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt. Der Bildaufbau kann aber auch optisch (ohne Rechner) mit Hilfe einer Nipkow-Scheibe erreicht werden. Bei den meisten modernen Konfokalmikroskopen wird nicht das Objekt bewegt, sondern ein Laserstrahl wird Punkt für Punkt über das Objekt geführt, und das Bild entsteht durch digitale Verarbeitung im Rechner.

2.2.9 Adhäsions- Assay

Wir verwendeten 5ml Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ ml gelöst in RPMI) und inkubierten diese 3H-Thymidin ($2\mu\text{Ci}/ 5\text{ml}$ Zellsuspension) für 36h bei 37°C .

Präparation der Adhäsionsplatten: Wir verwendeten 96-Well ELISA-Platten und beschichteten sie mit einer Coating Solution ($100\mu\text{l}$) für 2h bei 37°C . Die Coating Solution bestand aus RPMI und Fibronectin in einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nach Inkubation mit der Coating Solution wurde Blocking Buffer zugesetzt (RPMI+ 3% BSA+ 20mM HEPES) und 1h bei 37°C inkubiert. Die Wells wurden 3x mit Binding-Medium gewaschen, anschließend wurde $50\mu\text{l}$ pro Well Binding Medium eingefüllt, mit oder ohne IL-3 (Konzentration: $2\text{ng}/\text{ml}$).

Nach 36h 3-H-Thymidin-Inkorporation wurde in jedes Well $50\mu\text{l}$ Binding Buffer mit 10^4 Zellen mit oder ohne IL-3 gegeben. Die 96-Well ELISA-Platte wurde 3h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände und die anschließende 2-maligen Waschlösungen ($2 \times 100\mu\text{l}$) in separate Wells umgefüllt. Die 96-Well-Platten wurden über Nacht bei -20°C eingefroren, was zu einem Zellzerfall und Freiwerden

von DNA und des damit inkorporiertem 3H-Thymidins führt. Nach Auftauen der Platten wurden diese durch einen Filter angesaugt, an dem die DNA mit dem inkorporierten 3H-Thymidin haften bleibt. Die vom Filter emittierte beta-Strahlung wurde mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.10 Migrations – Assay

Zur Durchführung der Migrationsassays wurde ein Transwell-Kammersystem von Costar mit einer Porengröße von 5µm verwendet. Bei diesem Assay werden die Zellen in ein oberes Kompartiment gegeben, das vom unteren Kompartiment durch eine Porenmembran getrennt ist. Die durch die Poren gewanderten im unteren Kompartiment befindlichen Zellen werden quantifiziert. Zum Ausschluss von Begleiteinflussgrößen werden die Zellen zuvor ohne IL3 kultiviert.

Für die Auswertung verwendeten wir zwei Verfahren:

1. Radioaktive Markierung der Zellen und Messung der Radioaktivität der migrierten und nicht migrierten Zellfraktionen
2. Auszählung der migrierten und nicht migrierten Zellen mittels Durchflußzytometrie

In die untere Kammer wurde 500µl RPMI-Medium eingefüllt, mit oder ohne Chemoattractant/FCS/WEHI/Inhibitoren, in die obere Kammer wurden 100 µl einer Zellsuspension ($=1 \times 10^5$) gegeben in ebenfalls jeweils unterschiedlichen Ansätzen (mit oder ohne Chemoattractant/ FCS/ WEHI/ Inhibitoren; wir benutzten verschiedene Chemoattractants und Inhibitoren, bzgl. der einzelnen Konzentrationen der Zusätze siehe Ergebnisse). Nach einer Migrationsdauer von 3h erfolgte die Auswertung entweder durch Detektion des inkorporierten 3-H-Thymidins oder durch FACS-Auszählung der in die untere Kammer gelangten Zellen.

2.2.11 Proliferationsassay (3H-Thymidin Inkorporation)

Die Zellen wurden zunächst 2-mal mit PBS gewaschen und in 10 ml RPMI (mit 10% FCS, ohne WEHI) resuspendiert. Es folgte ein IL3-Entzug für 6h bei 37°C und 5% CO₂, in einer Zellzahlkonzentration von 1×10^5 /ml. Zu 100 µl der gestarvten Zellen (= 1×10^4 Zellen) wurden jeweils 100 µl einer IL-3 Verdünnungsreihe gegeben, so dass IL3-Endkonzentration von 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,001 ng/ml bzw. 0ng/ml entstanden oder sie kein IL-3 enthielten. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 2µl des radioaktiven 3H-Thymidins (1 mCi/ml) und eine erneute Inkubation für 5h unter gleichen Bedingungen. Im Anschluss dessen wurden die Zellen im Harvester auf Glasfaser Filterpapiere transferiert, und die Strahlung der neu gebildeten DNA wurde in einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.12 Colony-Assay

Zur Durchführung der Koloniebildungsversuche wurde jeweils 1ml einer Kulturlösung verwendet. Diese besteht aus Iscove`s modified Dulbecco`s medium (IMDM), 1% Methylcellulose, 20%FCS, 1% L-Glutamin, und unterschiedlichen Zellkonzentrationen. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer.

Es werden immer 4.6ml eines Ansatzes hergestellt und dann jeder Versuch in dreifacher Ausführung durchgeführt. Dafür nimmt man mit einer Spritze und einer großlumigen Kanüle 2ml Methylcellulose auf und gibt sie möglichst ohne den Rand zu berühren in 50ml Falcon-Röhrchen. Die Zugabe geringer Mengen an Antibiotika, Zytokinen oder Inhibitoren erfolgt nach vorherigen Lösen der entsprechenden Menge in IMDM. Diese orientiert sich an dem Volumen der Zellsuspension. Vor dem Verteilen der Ansätze werden diese vorsichtig geschwenkt, um sie zu durchmischen, und für ca. 10 Min. in den Inkubationsschrank gestellt. Die Ansätze wurden auf eine Hydratationsplatte platziert. Die Inkubation dauert 5 bis 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂. Die Auswertung erfolgte durch mikroskopische Quantifizierung der gewachsenen Kolonien, wobei mehr als 50 Zellen als eine Kolonie definiert wurden.

2.2.13 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid

Für die Zellzyklusanalyse wird Propidiumjodid verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Die Exzitationswellenlänge liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 60 nm. Wird ein mit Propidiumjodid inkubierte Zellsuspension im Durchflußzytometer analysiert, ist es aufgrund der Bindung an doppelsträngiger DNA möglich, die Zellen der Intensität des detektierten Fluoreszenzsignales entsprechend den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen (G0/1: diploid = Chromosomensatz 1n, G2 tetraploid = Chromosomensatz 2n, S = zwischen di- und tetraploid = Chromosomensatz zwischen 1n und 2n).

Aus einer Zellkultur, die am Vortag in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml angesetzt wurde, wurden 3 ml Zellsuspension entnommen und 5 Min. bei 400rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml eisgekühltem PBS aufgenommen und in einem FACS-Röhrchen umgefüllt. Anschließend wurde Tröpfchenweise 99%-iger auf -20°C gekühlter Ethanol hinzu gegeben und der Ansatz für 20 Min. bei 4°C gelagert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (10 Min. bei 300 rpm) und in 1,5 ml PBS+ 15µl Propidiumjodid+ 10µl RnaseA resuspendiert und für 5 Min. inkubiert. Anschließend wurde das Propidiumjodidsignal durchflußzytometrisch gemessen und die Zellzyklusverteilung mit der Modfit® - Software ausgewertet.

2.2.14 Messung des Aktivitätszustandes kleiner G-Proteine im GST-Pulldown

Bei der Messung des Aktivitätszustandes kleiner G-Proteine im GST-Pulldown macht man sich zunutze, dass deren Effektoren nur an dieses binden, wenn die kleinen G-Proteine aktiv, also GTP-gebunden sind. Hierzu wurde z.B. die Rho-Bindungsdomäne des Effektors Rhotekin als GST-Fusionsprotein verwendet. Für Rac1 und Cdc42 wurde PAK1-GST verwendet. Das GST-Fusionsprotein wurde an Gluthation-Sepharose-Beads gebunden.

Den initial angefertigten Zelllysaten wurde 3 mg Protein in 500 µl RIPA-Puffer gegeben, hiervon 30 µg als Beladungskontrolle abgenommen und pro Ansatz 25 µg der entsprechenden GST-Fusionsproteins zugegeben. Die Inkubation erfolgte 45

Min. bei 4 °C in einem Überkopfmischer. Dabei wurde das GTP-gebundene kleine G-Protein von dem Fusionsprotein spezifisch gebunden. Nun wurde das Pellet viermal in Rho-RBD-Waschpuffer gewaschen und mit einer 50- μ l-Hamilton-Spritze trocken gesaugt. Anschließend wurde zu jeder Probe 30 μ l SDS-Probenpuffer gegeben, und diese für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Die so eluierten Proteine wurden wie die Beladungskontrollen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Westernblot) und anschließend eine Detektion des entsprechenden kleinen G-Proteins durchgeführt.

3. Ergebnisse:

Überexpression von G-alpha 13 in der murinen myeloischen Progenitorzelllinie 32D-cl3cl3

Zur Untersuchung der biologischen Funktion von G-alpha-13 wählten wir die murine myeloische Vorläuferzelllinie 32D-cl3. Sie zeichnen sich durch eine IL-3 Abhängigkeit aus, die bei Abwesenheit zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase und schließlich zum Zelltod führt. Bei alleiniger IL-3 Zugabe bleiben die Zellen undifferenziert, jedoch nach G-CSF Gabe kommt es zu einer Differenzierung zu Granulozyten. Das initial im pCis-Vektor vorliegende G α 13, Wildtyp und konstitutiv aktive Form, wurde in den pAL-Vektor subkloniert. Wir wählten den pAL-Vektor zur Überexpression unseres Zielgenes aufgrund der hohen Expressionsraten in 32D-cl3 Zellen. Da kein Resistenzgen im pAL-Vektor vorliegt wurde eine Co-Transfektion mit dem Vektor pMAM2-BSD durchgeführt, der ein Resistenzgen gegen Blastizidin enthält. Neben der Transfektion mit dem G α 13 WT und der konstitutiv aktiven Form G α 13 (Q226L; QL) wurde als Kontrolle die Transfektion mit dem leeren pAL-Vektor vorgenommen.

Die G α 13-Expression wurde zunächst auf RNA-Ebene mittels TaqManPCR, später auf der Proteinebene mittels Western-blot überprüft. Die Abbildung 2. (G α 13-mRNA-Expression) zeigt die G α 13-mRNA-Expression nach Transfektion. Im Vergleich zur Transfektion mit dem leeren pAL-Vektor (Kontrolle), kommt es zu einer 37-fache höheren Expression der G α 13-Expression nach Transfektion von G α 13 WT und eine sogar 121-fache höhere G α 13-Expression nach Transfektion von G α 13-QL.

Vielfaches der G α 13 mRNA-Expression
im leeren pAL-Vektors

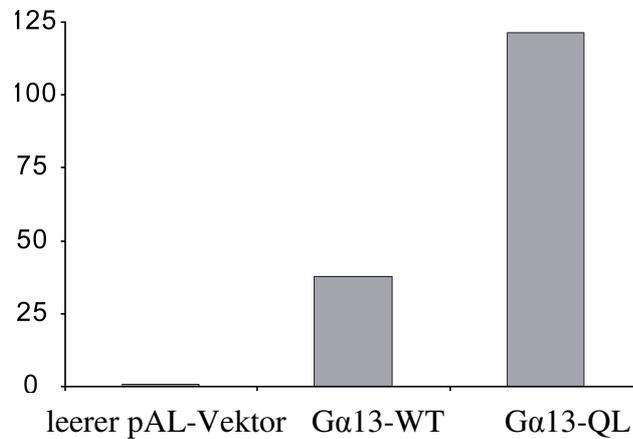


Abbildung 2. G α 13- mRNA-Expression in 32D-cl3 Zellen nach Transfektion mit leerem pAL-Vektor, G α 13-WT und konstitutiv aktiver Form (G α 13-QL)

Auf der Proteinebene zeigte sich ebenfalls einer Überexpression des G α 13-WT und des G α 13-QL im Vergleich zum leeren pAL-Vektor nach Transfektion in 32D-cl3 Zellen (siehe Abb. 3). Die unterschiedlichen Expressionraten auf der mRNA- und Proteinebene des Wildtyps und der konstitutiv aktivierten Form waren reproduzierbar und können möglicherweise auf eine posttranskriptionelle Regulation hinweisen.

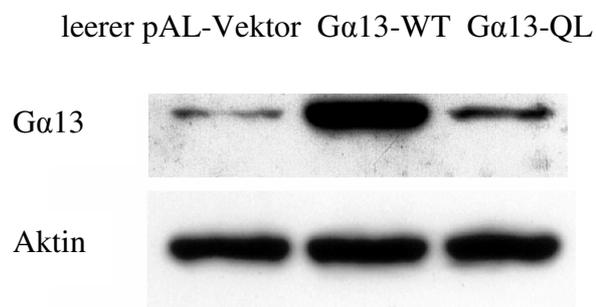


Abbildung 3. G α 13-Expression in 32D-cl3 Zellen nach Transfektion in 32D-cl3 Zellen mit leerem pAL-Vektor, G α 13-WT oder G α 13-QL. Actin ist als Ladekontrolle mit dargestellt

3.1 Morphologische Veränderung nach Überexpression von G α 13 in 32D-cl3 Zellen

Bereits einige Tage nach Transfektion und Selektion zeigte sich in den G α 13-überexprimierenden 32D-cl3 Zellen, vor allem in den Zellen mit konstitutiv aktivem G α 13QL eine Veränderung der Zellmorphologie. Die Zellen verloren ihre homogene rundliche Struktur, und entwickelten z. T. Ausläufer vor allem nach IL-3-Zugabe (siehe Abbildung 4).

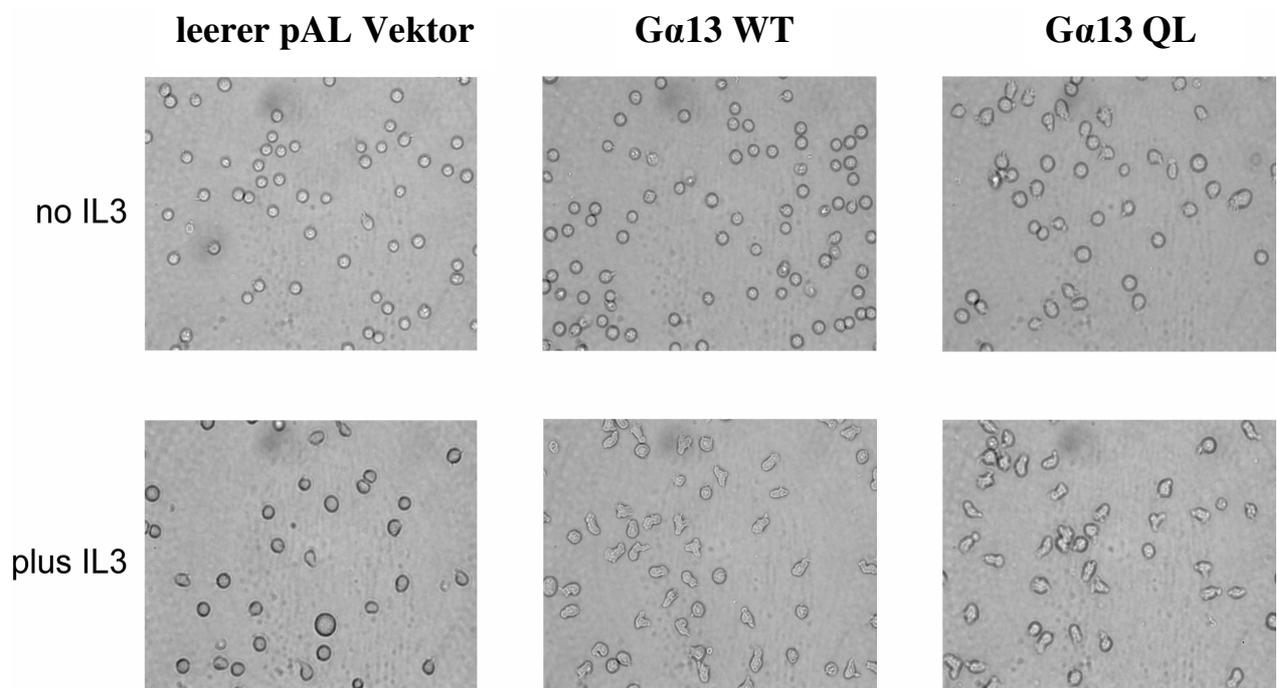


Abbildung 4. Morphologische Veränderung der 32D-cl3 Zellen nach Überexpression von G α 13 WT und G α 13 QL (konstitutiv aktive Form) im Vergleich zu Kontrollzellen.

(Lichtmikroskopische Darstellung)

Die lichtmikroskopische Betrachtung legte die Vermutung nahe, dass die morphologischen Veränderungen auf einer Reorganisation des Zytoskelettes beruhen, die zu einer konsekutiven Ausbildung der Zellausläufer führte. Um diese Reorganisation nachzuweisen, führten wir eine Darstellung des Aktin-Zytoskelettes mittels Färbung der Zellen mit fluoreszenzgefärbten Phalloidin. Das Phalloidin, isoliert aus dem Pilz *Amanita phalloides*, eignet sich für die Darstellung des Aktin-Zytoskelettes, da es spezifisch an der Verbindungsstelle von F-Aktin mit seinen Untereinheiten bindet. Da diese Stelle kaum von aktinbindenden Proteinen genutzt werden, ist ein Großteil des F-Aktins in den Zellen für die Phalloidinbindung verfügbar. Bei den anschließenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich in den $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine kräftigere Aktinfärbung. Darüber hinaus war eine deutliche Konzentrierung der Aktinfärbung in den Ausläufern zu beobachten (siehe Abbildung 5).

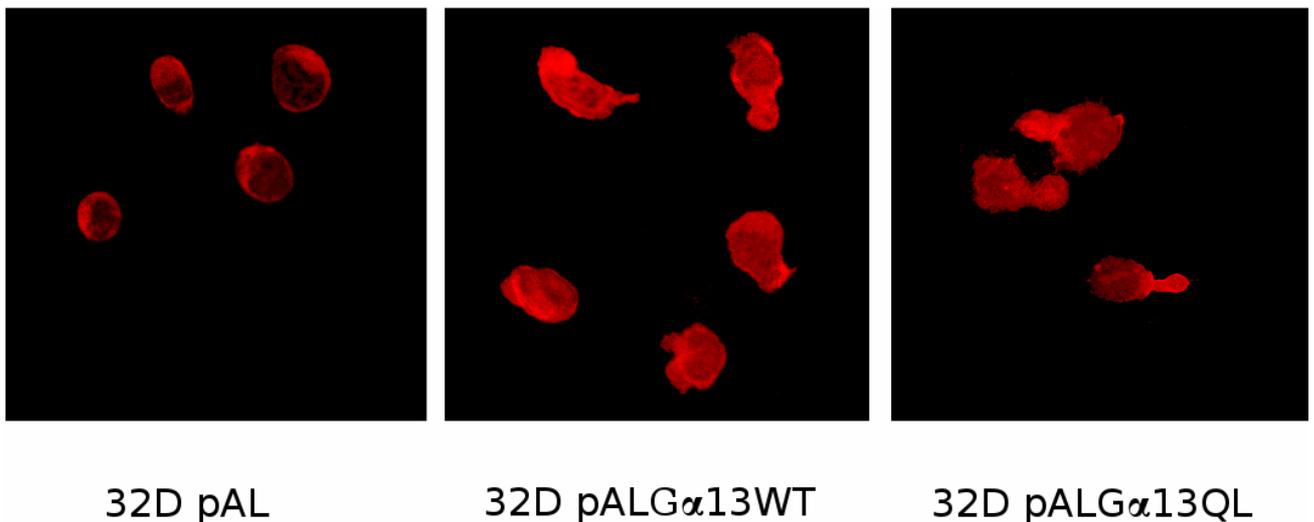


Abbildung 5. Konfokalmikroskopische Darstellung der $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3-Zellen ($G\alpha$ WT und $G\alpha$ QL) im Vergleich zu den Kontrollzellen (pAL) nach Aktinfärbung mit Phalloidin.

3.2 Adhäsionsverhalten $\alpha 13$ -überexprimierender 32D-cl3 Zellen:

In weiteren Versuchen gingen wir der Frage nach, ob neben den $\alpha 13$ vermittelten zellmorphologischen Veränderungen auch funktionelle Unterschiede bei 32D-cl3 Zellen zu beobachten sind. Hierfür untersuchten wir zunächst das Adhäsionsverhalten unserer $\alpha 13$ -überexprimierender Zellen gegenüber Kontrollzellen in Anwesenheit von Fibronectin und in Abhängigkeit des IL-3.

Während die mit dem Leervektor transfizierten Zellen die höchste Adhäsionsrate zeigten, war die Adhäsionsrate bei den $\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen erniedrigt. Die Überexpression von $\alpha 13$ reduzierte somit die Adhäsion an Fibronectin beschichtete Oberflächen in 32D-cl3 Zellen.

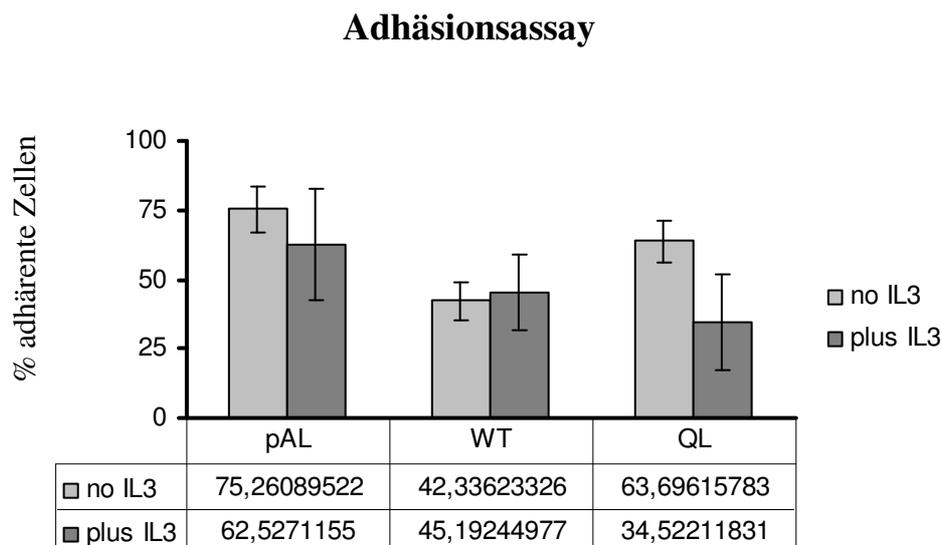


Abbildung 6. Der Einfluß von $\alpha 13$ auf die Adhäsion in Abhängigkeit von IL-3

3.3 α 13-Überexpression steigert die ungerichtete Migration

Die Entwicklung von Zellausläufern bei α 13-überexprimierenden Zellen führte zur Annahme, dass die α 13-Überexpression eine zentrale Rolle in der Migration myeloische Zelle spielen könnte.

Wir überprüften dies in einem Migrations-Assay unter Verwendung eines Costar-Transwellsystems® mit einer Porengröße von 5 μ m und wählten unterschiedliche Bedingungen.

Zunächst wurde das unspezifische Migrationsverhalten in Abhängigkeit von fetalem Kalbsserum (FCS) untersucht. Den Kontroll- und α 13-überexprimierenden Zellen wurde, in Abwesenheit von IL3, entweder 10% FCS, 1% FCS oder kein FCS hinzugefügt. Während sich ohne FCS-Zusatz kein Unterschied zwischen den Kontroll- und α 13-überexprimierenden Zellen fand, konnte dosisabhängig durch den FCS-Zusatz eine deutlich gesteigerte Migration bei den α 13-überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Dieser FCS abhängige Anstieg fiel zudem im Vergleich zu den Kontrollzellen höher aus (siehe Abbildung 7).

FCS-abhängige Migration

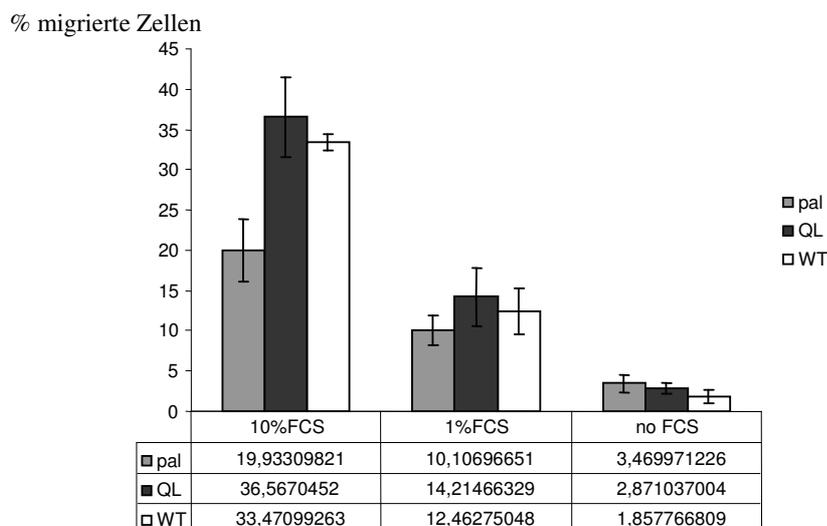


Abbildung 7. Der Einfluss von α 13 auf die Migration in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration (pal = Leervektor, QL = α 13QL, WT= α 13-Wildtyp).

3.4 Steigerung der gerichteten Migration durch G α 13-Überexpression

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde der Einfluss von IL-3 und SDF-1a auf die gerichtete Migration (Chemokinesis) untersucht.

Wie in Abb. 8 dargestellt, ist die ungerichtete Migration (ohne Chemokin) der Kontrollzellen nur gering und nicht IL-3 abhängig. Die G α 13-überexprimierenden Zellen hingegen haben auch ohne IL-3 bereits eine höhere Migrationsrate als die Kontrollzellen, wobei die IL-3 Zugabe zusätzlich zu einer deutlichen Zunahme der Migrationsrate der G α 13 überexprimierenden Zellen führt.

Neben der ungerichteten Migration untersuchten wir die gerichtete Migration (chemokinesis) entlang eines Konzentrationsgradienten eines Chemokins, hier SDF-1a (stromal-derived factor). Das Chemokin SDF-1a wird der Gruppe der CXC Chemokine zugerechnet. Chemokine sind chemotaktisch aktive Cytokine und bewirken eine Wanderung von Zellen entlang des Chemokiengradienten. Das Chemokin SDF-1a ist ein wichtiger chemotaktischer Regulator hämatopoetischer Stammzellen. Von der großen Familie der CXC Chemokine ist „stromal derived – factor 1a“ (SDF - 1a) das erste Chemokin, welches als chemotaktischer Faktor für unreife, CD34+ - Blutzellen entdeckt wurde^{2, 3, 36, 91}.

Sein einziger Rezeptor ist CXCR4. Jüngere Publikationen zur Chemotaxis von Stammzellen haben gezeigt, dass CXCR4 der einzige relevante Chemokinrezeptor auf hämatopoetischen Stammzellen ist und dass das von Knochenmarkstromazellen gebildete SDF - 1a daher eine herausragende Rolle für das „homing“ dieser Zellen ins Knochenmark spielt¹²⁶.

Entlang des chemotaktischen Gradienten von SDF-1a, kommt es zu einer erhöhten Migrationsrate der Kontrollzellen auf 11,6% (Steigerung auf das 2,7 fache). Bei den G α 13-überexprimierenden Zellen kommt es ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Migrationsrate (56-67% aller Zellen). Aufgrund der bereits erhöhten ungerichteten Migration fällt diese jedoch etwas geringer aus (1,7- 1,9-fache), jedoch ist die Gesamtmigrationsrate durch die Überexpression von G α 13 um 4,8 bzw. 5.8-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht (siehe Abbildung 8 und 9).

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass $G\alpha 13$ die ungerichtete und gerichtete Migration in Abhängigkeit von IL3 (in 32D-cl3 Zellen) induziert.

ungerichtete und gerichtete Migration (SDF-1a als Chemokin)

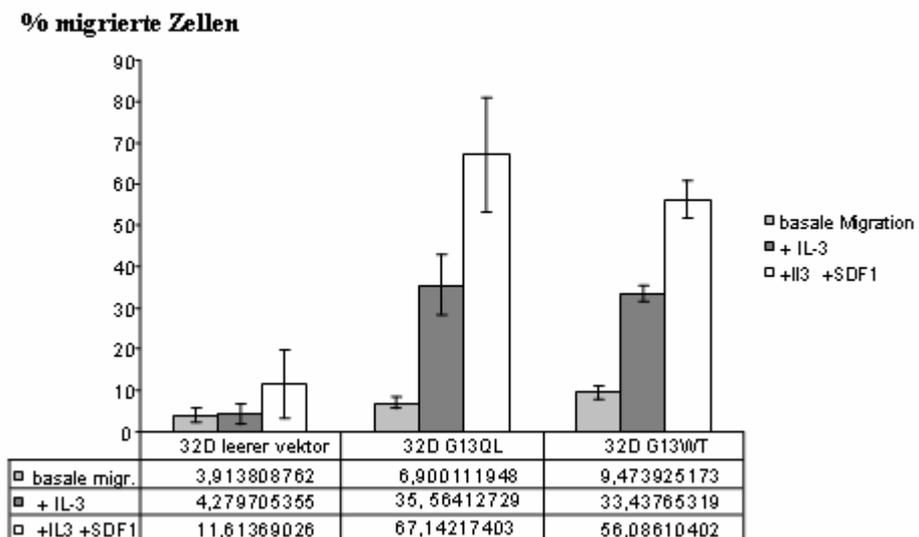


Abbildung 8. Migrationsrate der Kontrollzellen im Vergleich zu den $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3-Zellen. Darstellung der basalen Migration (ohne IL-3), der ungerichteten Migration (+IL 3) und der gerichteten Migration mit SDF-1a als Chemokin (+IL-3 und + SDF-1a)

Um die Validität dieser Beobachtungen auch für andere Chemokine zu überprüfen, haben wir ein weiteres Chemokine, Interleukin 8, welches von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten gebildet wird, verwendet. Konkordant zum Migrationsverhalten unter Verwendung des SDF-1a als Chemokin, war auch die Migrationsrate mit IL-8 als Chemokin bei den $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen deutlich gesteigert.

IL-8 abhängige Migration

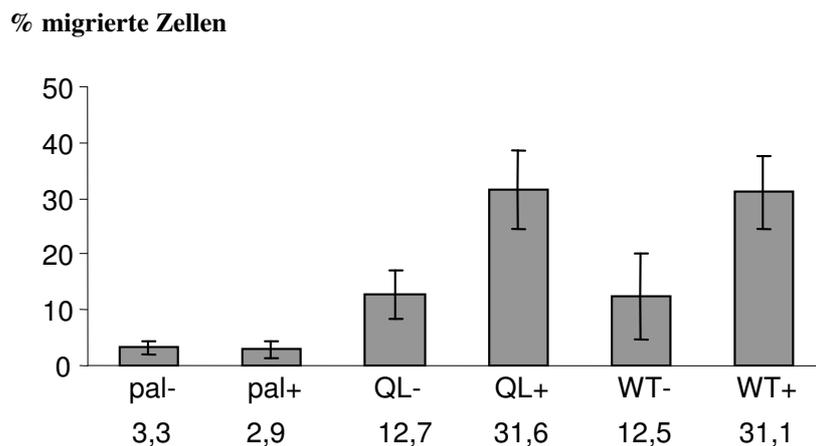


Abbildung 9. Gerichtete Migration der mit dem Leervektor transfizierten Zellen (pAL) gegenüber $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen mit IL-8 (+) als Chemokin

3.5 Einfluss spezifischer Signalweginhibitoren auf die Migration

In einem nächsten Schritt versuchten wir untergeordnete Effektoren zu identifizieren, über die das G α 13-vermittelte Migrationssignal übertragen wird, bzw. Schlüsselrollen in diesem Prozess einnehmen. Eine wichtige Rolle in der G α 13-Signalkaskade spielen die kleine G-Proteine mit ihren Regulatoren (GEP's, GDI's, GAP's). Eine herausragende Stellung wird vor allem den Vertretern der Rho-Familie zugeschrieben, dem RhoA, Rac und Cdc42, aber auch der Ras-Familie, die früh in der Signalkaskade von G α 13 aktiviert werden. Durch die gezielte Blockade einzelner Elemente in der Signaltransduktionskette, unter Verwendung spezifischer Inhibitoren, erhofften wir Schlüssel-Signalwege zu identifizieren, über die die G α 13-induzierte Migration vermittelt wird.

Zur Inhibition des Ras/ Raf/ MEK/ ERK-Signalweges verwendeten wir den PD 184352 (CI-1040)-Inhibitor, einen hoch potenten und selektiven Inhibitor von MEK1 und MEK2⁹⁷. Hierunter konnte keine Inhibition der Migrationsrate beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Eine selektive Inaktivierung der Rho-Familie wurde über die Applikation von C3-ADP-Ribosyltransferase (C3) erreicht (5 μ g/ml). Das aus Clostridium botulinum stammende Exoenzym führt am Asparagin-41 zu einer selektiven ADP-Ribosylierung und damit Inaktivierung des RhoA, RhoB und RhoC⁹⁸.

Als dritten Inhibitor verwendeten wir PP1 (80 μ M), einen selektiven Src-Inhibitor. Der Src-Kinase-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation, Migration, Angiogenese und Adhäsion. Die ubiquitär exprimierten Src-Tyrosinkinasen gehören zur Gruppe der zytosolischen Tyrosinkinasen. Sie können sowohl durch Rezeptortyrosinkinasen als auch durch G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden.

Es gibt vielfache Hinweise auf eine Beteiligung der Src-Familie bei der mitogenen Signaltransduktion über Gi-gekoppelte Rezeptoren. Die Aktivierung erfolgt dabei über die β/γ – Untereinheit des G-Proteins gekoppelten Rezeptors und führt über das Ras zur MAPK- Aktivierung.

Als weiteren Inhibitor verwendeten wir das **LY294002**, welches spezifisch die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase) inhibiert (0,2 μ l/ml). Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase) bilden eine Molekülfamilie ubiquitär exprimierter Lipidkinasen, die Inositollipide an der Position 3 des Inositolringes phosphorylieren. Eine große Zahl zellulärer Oberflächenrezeptoren, insbesondere solche mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität, entfaltet ihre Wirkung über die PI-3-Kinase. Aber die PI3-Kinase ist auch als Effektor für die kleinen G-Proteine Rho, Rac und Cdc42 beschrieben^{131, 110, 14, 132}.

Als hoch potenten und selektiven Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase p160ROCK und des ROCK II verwendeten wir das **Y 27632**. ROCK gehört zu den wichtigsten untergeordneten Effektoren des Rho und hat einen wichtigen Einfluss in der Bildung von Stressfasern und Fokaladhäsionen^{43, 86}. Zu den ROCK-Effektoren gehören das Cofilin, ERM, Myosin light Chain Phosphatase (MLCP) und Myosin light Chain^{59, 30, 6}.

Als letzten Inhibitor untersuchten wir den Einfluss des selektiven und potenten p38 MAK Kinaseinhibitor **SB 202190** auf die Migration $G\alpha 13$ -überexprimierender 32D-cl3 Zellen (1 μ l/ml). Die MAP-Kinasen spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung^{104, 111, 23}.

Es sind 3 große MAP-Kinasen-Kaskaden in Säugern beschrieben, die synergistisch auf unterschiedliche übergeordnete Signale antworten. Die best bekannteste und untersuchte MAP-Kinase-Kaskade ist die ERK1/ ERK2 MAP-Kinase (EGF/ Rezeptortyrosinkinase/ Grb2/ Sos/ Ras/ Raf/ MEK/ ERK)^{41, 125, 10, 93, 88, 16, 22, 119, 60, 54, 72, 25, 37}.

Die jüngst entdeckte MAP-Kinase-Kaskade ist die p38 Kinase Kaskade. Als Antwort auf inflammatorischen Cytokinen, Endotoxine und osmotischer Stress kommt es zu einer Aktivierung von MEKK/ MKK3 und schließlich zu einer Aktivierung von p38⁹⁰.

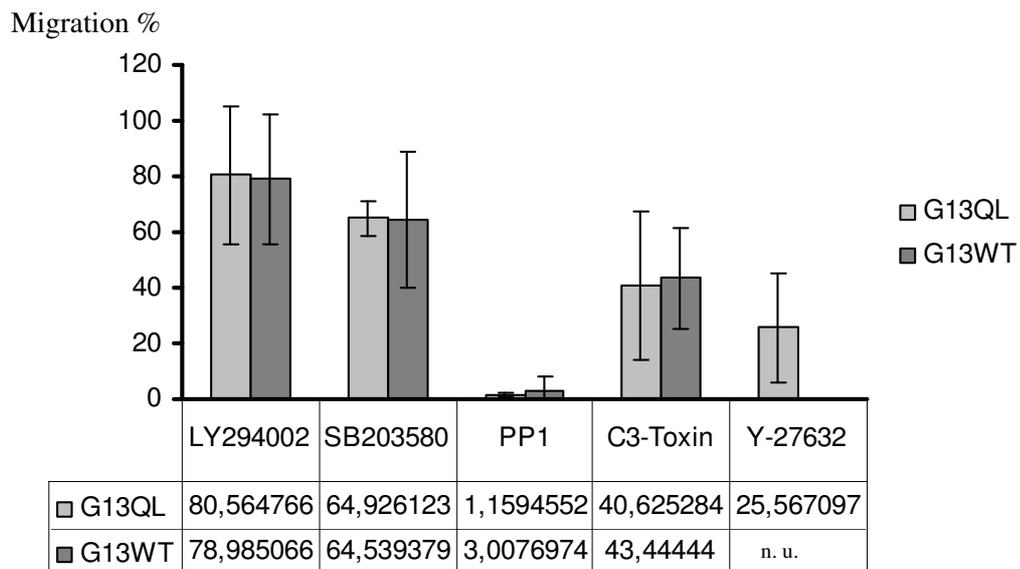


Abbildung 10. Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf das Migrationsverhalten Galpha13 überexprimierender 32D-cl3 Zellen. Den größten Einfluss auf die Migration hat die Blockade des Src-Signalweges.

Wie in der Abb. 10 dargestellt, führte eine Blockade der PI3-Kinase unter Verwendung des Inhibitors LY 294002 zu keiner bzw. nur einer geringen Inhibition (siehe Standardabweichung), wie auch die Blockade der p38-MAP-Kaskade durch den Inhibitor SB 203580 ebenfalls keinen bzw. nur geringen Einfluss auf die Migrations hatte. Trotz der z. T. großen Standardabweichung lässt sich der Abb. 11 entnehmen, dass eine Inhibition des Rho (C3 als Inhibitor) und des p160ROCK (Y 27632) zu einer deutlichen Reduktion der Migration Gα13-überexprimierenden Zellen führte. Durch eine Inhibition des Src-Kinase-Signalweg lies sich die Migration Gα13-überexprimierenden Zellen gänzlich unterdrücken, dieser Effekt unterschied sich zudem deutlich von den Kontrollzellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.6 Proliferationsverhalten G α 13-überexprimierender 32D-cl3 Zellen

Eine Beteiligung der G α -Untereinheiten an der Proliferation und malignen Transformation ist vielfach publiziert, insbesondere unter Verwendung aktivierter G α o, α i2, α q und α 12^{49, 50, 52, 80, 115}. Auch für die von uns untersuchte G α 13-Untereinheit konnte eine maligne Transformation nachgewiesen werden⁸⁵. In Fibroblasten-Zelllinien wurde die maligne Transformation des G α 13 sogar als die potenteste G α -Untereinheit bezeichnet zur malignen Transformation der bislang überprüften G α -Untereinheiten^{127, 49, 28, 115, 117, 118}. Die konstitutiv aktivierte G α 13-Untereinheit aktiviert die Transkription von Egr-1, eines der ersten Zielgene in der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung¹¹⁵. Aber auch die Aktivierung der Transkription des Cox-2-Signalweges spielt eine wichtige Rolle in der G α 13-induzierten malignen Transformation.

Proliferation ohne und mit IL-3 (in unterschiedlichen Konzentrationen)

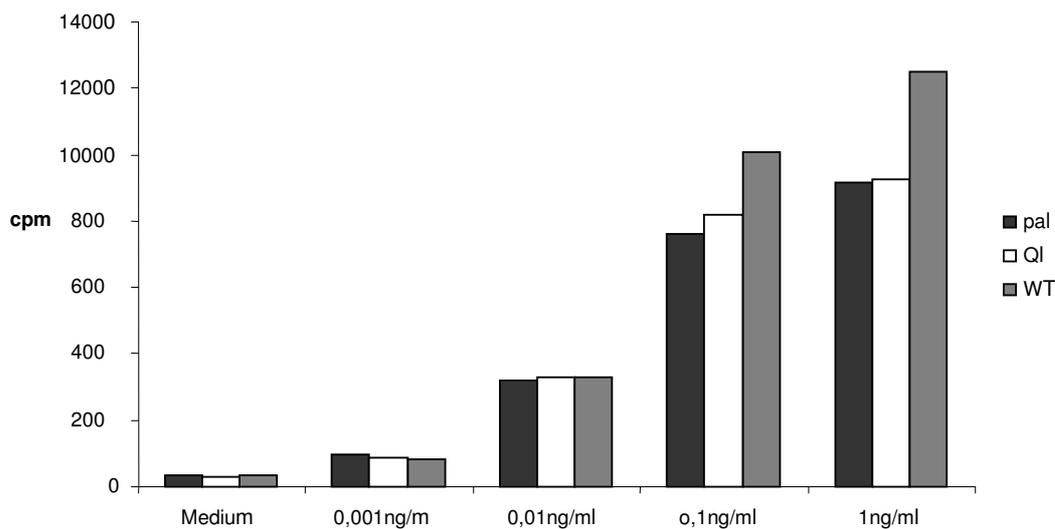


Abbildung 11. Proliferationsverhalten G-alpha13-überexprimierender myeloischer Vorläuferzelllinie gegenüber Kontrollzellen in IL-3-Abhängigkeit (unterschiedlichen IL-3-Konzentrationen)

Den Einfluss von $G\alpha 13$ in der Proliferation myeloischen Vorläuferzellen untersuchten wir in Abhängigkeit von IL-3 und FCS. Ohne IL-3 Zugabe (siehe Abb. 11) konnte kein Unterschied in der Proliferation zwischen den Kontrollzellen und $G\alpha 13$ -überexprimierender 32D-cl3 Zellen nachgewiesen werden. Auch in niedrigen IL-3 Konzentrationen fand sich kein Unterschied in der Proliferation, hingegen in hohen IL-3 Konzentrationen war die Proliferationsrate des $G\alpha 13$ -Wildtyps im Vergleich zu den Kontrollzellen und der $G\alpha 13$ -konstitutiv aktivierten Form diskret erhöht. Die Proliferationsrate in Abhängigkeit von FCS zeigte bei hohen FCS-Konzentrationen ein langsames Wachstum der $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen, wobei die konstitutiv aktive $G\alpha 13$ -Form sogar die langsamste Proliferationsrate aufwies (siehe Abb.12).

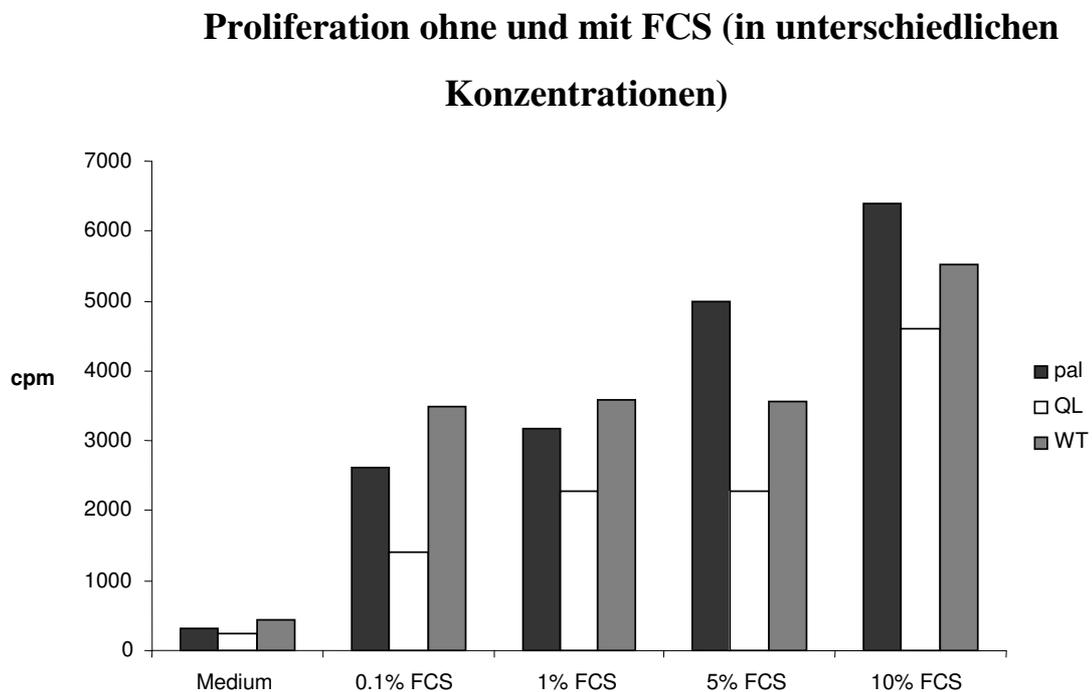


Abbildung 12. Der Einfluss von $G\alpha 13$ auf die Proliferation in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration (in unterschiedlichen FCS-Konzentrationen)

Im Gegensatz zum beobachteten Proliferationsverhalten in Fibroblastenzelllinien führt die konstitutiv aktivierte $G\alpha 13$ -Form in myeloischen Vorläuferzellen zu keinem beschleunigten Zellwachstum. Vielmehr führt sie in der FCS abhängigen Proliferation sogar zu einem eher verlangsamten Zellwachstum.

Auch die Überexpression des $G\alpha 13$ -Wildtyps in myeloischen Vorläuferzelllinie führte in Abwesenheit von IL-3 zu keiner Steigerung der Proliferation. Bei Zugabe von hohen IL-3 Konzentrationen konnte eine allerdings erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen und den konstitutiv aktiven $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen nachgewiesen werden. Dieser Anstieg kann allerdings nur als ein Trend erachtet werden.

Zellzyklusanalyse Kontrollzellen

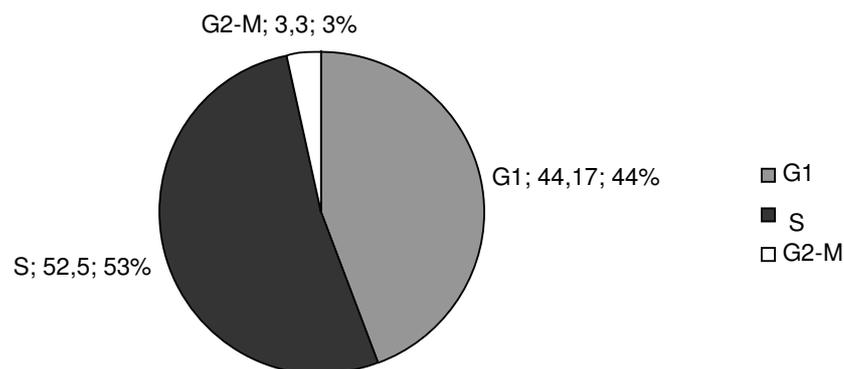


Abbildung 13. Verteilung der Zellzyklusphasen in 32D-cl3 Kontrollzellen.

Das Ergebnis der Proliferationsversuche war konkordant zu den Kolony-Assays. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Koloniebildung zwischen den Kontrollzellen und $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Das beobachtete $G\alpha 13$ -abhängige Proliferationsverhalten in fibroblastischen Zelllinien kann somit nicht direkt auf myeloische Vorläuferzellen übertragen werden. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven $G\alpha 13$ -Form führt nicht zu einer Steigerung der Proliferationsrate, unter bestimmten Bedingungen führt $G\alpha 13$ sogar zu einer verminderten Proliferationsrate. Die Überexpression des $G\alpha 13$ -Wildtyps führt unter den gewählten Bedingungen zu einem uneinheitlichen Wachstumsverhalten, nur in sehr hohen IL-3 Konzentrationen konnte eine diskret erhöhte Proliferation nachgewiesen werden. Die Steigerung der Proliferation durch Überexpression von $G\alpha 13$ -Wildtyp lässt sich somit in unserem Modell myeloischer Vorläuferzellen nicht reproduzieren.

Zellzyklusanalyse konsekutiv aktiviertes $G1\alpha 3$

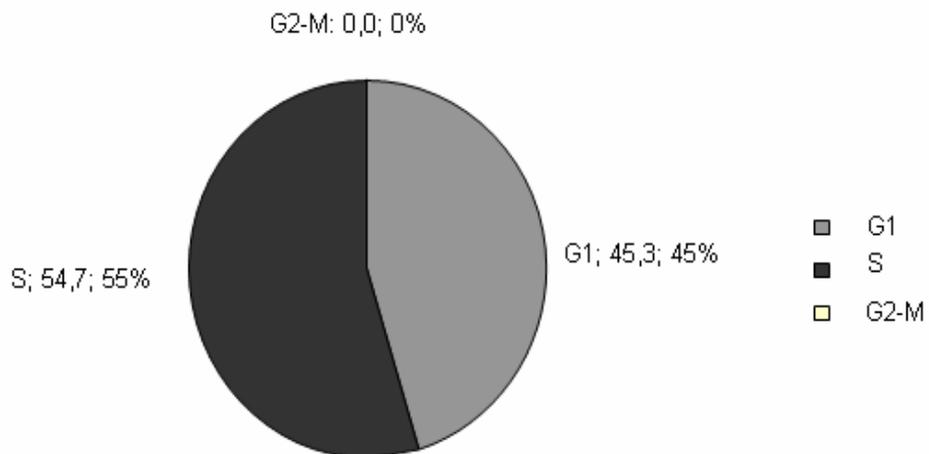


Abbildung 14. Verteilung der Zellzyklusphasen in 32D-cl3 Zellen mit konstitutiv aktivem $G\alpha 13$. Es sind keine Zellen in der G2-M-Phase nachweisbar

Zellzyklusanalyse G13 Wildtyp

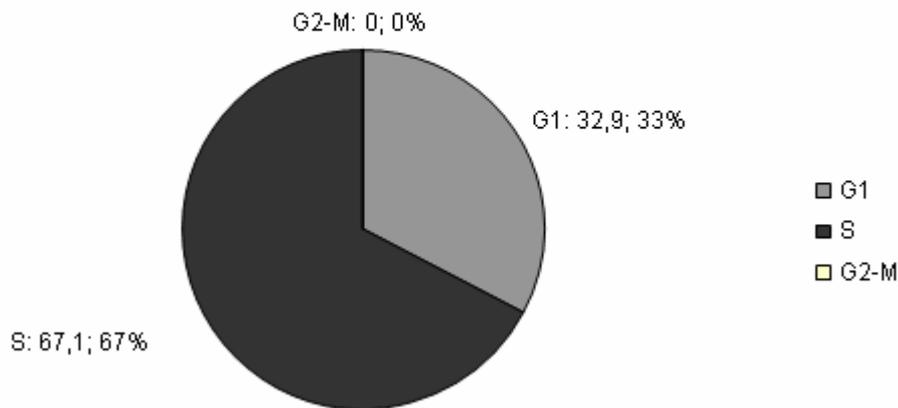


Abbildung 15. Verteilung der Zellzyklusphasen in G α 13-Wildtyp-überexprimierenden 32D-cl3 Zellen. Auch hier sind keine Zellen in der G2-M-Phase nachweisbar.

3.7 Einfluss von G α 13 in myeloischen Vorläuferzellen auf den Zellzyklus

Eine Beteiligung der kleinen G-Proteine in der Zellzykluskontrolle ist vielfach beschrieben, insbesondere für die Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42). In Fibroblasten und epithelialen Zellen ist ein beschleunigter G1-Eintritt und eine Progression in die S-Phase sowohl für das Rho, als auch für Rac und Cdc42 beschrieben. Wir untersuchten welchen Einfluss die Überexpression von G α 13 auf die Verteilung der Zellzyklusphasen in myeloische Vorläuferzellen ausübt.

Abbildung 13 zeigt die Zellzyklusverteilung unserer Kontrollzellen (s.o.), die Abbildungen 14 und 15 stellen die Zellzyklusverteilung der konstitutiv aktivierten bzw. des Wildtyps der G α 13-überexprimierenden Zelllinie dar. Während die Kontrollzellen einen G2-M-Phasenanteil von 3,3% haben, ist in den G α 13-überexprimierenden Zellen (konstitutiv aktivierte Form und Wildtyp) keine Zelle in der G2-M-Phase.

Bei den konstitutiv aktivierten G α 13-Zellen besteht kaum ein Unterschied in dem G1- und S-Phasenanteil im Vergleich zu den Kontrollzellen, wo hingegen sich lediglich 32% der G α 13-Wildtypzellen in der G1-Phase befinden und der überwiegende Anteil (2/3) in der S-Phase.

Eine G α 13-Überexpression führt zu einer Progression in die G1-Phase, unabhängig von der Überexpression des Wildtyps oder der konstitutiv aktivierten Form.

Eine Progression von der G1-Phase in die S-Phase wird vor allem bei den Wildtyp-überexprimierenden 32D-cl3 Zellen beobachtet.

Auch wenn zwar die G α 13-Überexpression nicht zu einer Änderung des Proliferationsverhaltens führt, konnten wir doch zeigen, dass eine G α 13-Überexpression in den Zellzyklusablauf eingreift und somit als möglicher Co-Faktor im Proliferationsverhalten und in der malignen Transformation eine entscheidende Rolle spielen könnte.

3.8 G α 13 führt zu einer RhoA-Aktivierung

Die kleinen G-Proteine kommen in zwei Konformationsformen vor:

1. aktive, GTP-gebunden oder
2. GDP-gebunden, inaktive Form ^{15, 35, 108}

Ein übergeordnetes Signal führt zu einer Dissoziation des GDP's vom kleinen G-Protein, wo sich anschließend ein GTP an diese Stelle binden kann. Die GTP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung, so dass die untergeordnete Effektor-Bindungsregion frei wird und mit einem untergeordneten Effektor interagieren kann. Die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen G-Proteine konvertiert das aktive G-Protein zurück in den GDP-/ inaktiven Zustand.

Um den Einfluss des G α 13 in myeloischen Vorläuferzellen auf den Aktivierungszustand der kleinen G-Proteine der Rho-Familie zu untersuchen, führten wir einen GST-Pulldown-assay durch. Bei diesem Versuch wird nur das aktive, GTP-gebundene kleine G-Protein an einem Fusionsprotein (GST-PAK, bzw. GST-Rhotekin für RhoA) gebunden und anschließend in einem Western-blot dargestellt. Wir führten den PAK-1-Pulldown-assay für RhoA, Rac1 und Cdc42 durch, jeweils in Abhängigkeit von IL-3 und suchten nach Unterschiede in dem Aktivierungsgrad der kleinen G-Proteine in G α 13-überexprimierende 32D-cl3 Zellen (Wildtyp und konstitutiv aktivierte Form) und Kontrollzellen (siehe Abbildung 16).

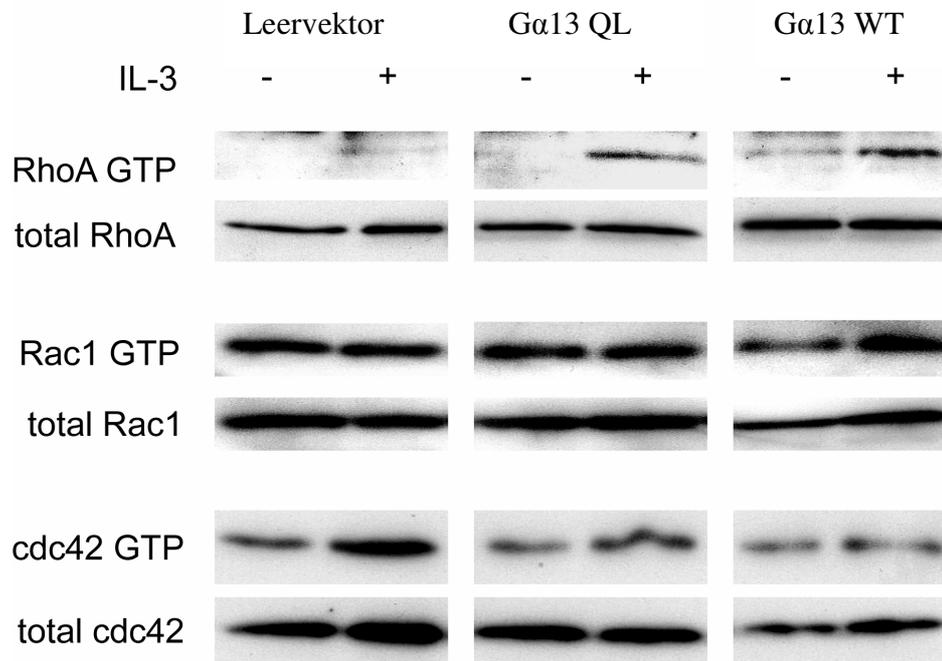


Abbildung 16. Der Einfluss von G-alpha-13 auf die Aktivierung der kleinen G-Proteine der Rho-Familie im PAK-1-Pulldown-Assay. Hohe Aktivierungsgrade (GTP-gebundenes kleines G-Protein) für Rac1 und Cdc42 ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Aktiviertes, GTP-gebundenes RhoA nur in den Gα13-überexprimierenden 32D-cl3 Zellen nach IL-3 Stimulation.

Während in allen 3 Zelllinien hohe Aktivierungsgrade für Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden konnte, war der Aktivierungsgrad von RhoA nur mäßig bis überhaupt nicht nachweisbar. Ein aktiviertes, GTP-gebundenes RhoA war nur in den Gα13-überexprimierenden 32D-cl3 Zellen unter IL3 Stimulation detektierbar, während bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen, selbst in Anwesenheit von IL3, GTP-gebundenes RhoA nicht nachweisbar war.

3.9 Der Einfluß von konstitutiv aktivem RhoA auf die Migration myeloischer Zellen

Schließlich überprüften wir, in wie weit das beobachtete gesteigerte Migrationsverhalten durch $G\alpha 13$ -Überexpression in 32D-cl3 Zellen durch die alleinige Überexpression von aktiviertem RhoA erzielt werden kann. Wir transfizierten 32D-cl3 Zellen mit dominant aktivierten RhoA und führten erneut Migrationsversuche unter Verwendung von IL-8 als Chemokin durch (siehe Abbildung 17).

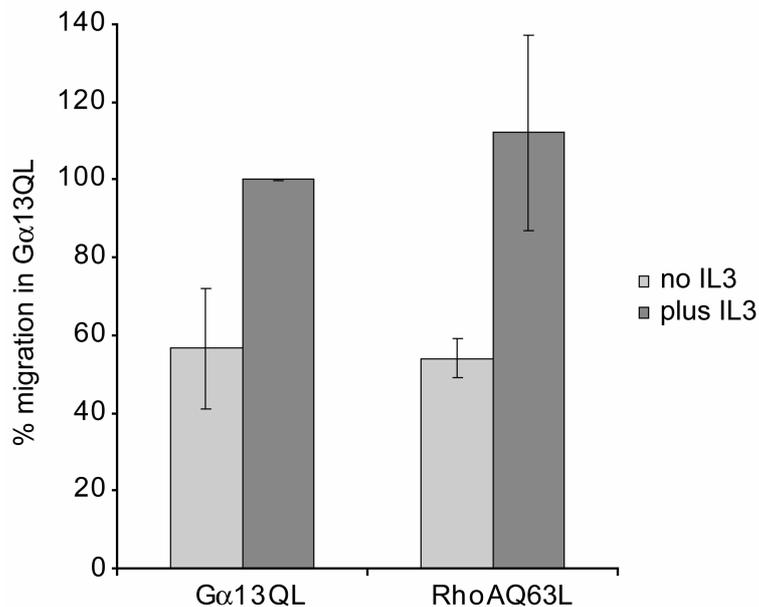


Abbildung 17. Der Einfluß von konstitutiv aktivem Rho A auf die Migration myeloischer Zellen.

Dominant aktives RhoA (RhoA-QL) führt in 32D-cl3 Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten Migration wie $G\alpha 13$ -überexprimierende 32D-cl3 Zellen (hier die konstitutiv aktivierte Form $G\alpha 13$ QL dargestellt).

In der Zelllinie mit konstitutiv aktivem G-alpha-13 fand sich das bereits oben beschriebene Migrationsverhalten mit einer Zunahme der Migrationsrate nach IL-3-Zugabe, während ein IL-3-Entzug zu einer Migrationseinbuße führte.

Bei den daRhoA-transfizierten Zellen zeigte sich das gleiche Migrationsverhalten mit ebenfalls einer IL-3-Abhängigkeit der Migration.

In der Abbildung 18 dargestellt, gingen wir der Frage nach, ob eine Inhibition von Src auch zu einer Abnahme der Migration in daRhoA (konstitutiv aktiviert) überexprimierenden 32D-cl3 Zellen führt.

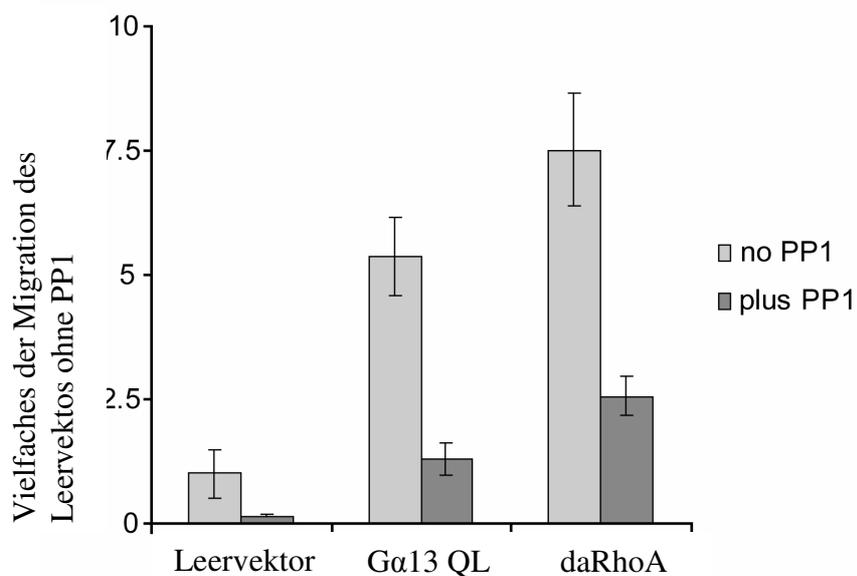


Abbildung 18. Die Inhibition von Src (PP1 als Inhibitor) führt auch in dominant aktivierten, RhoA-überexprimierenden Gα13 Zellen zu einer verminderten Migration.

Auch in den daRhoA -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen führt eine Blockade der Src zu einer Hemmung der Migration.

Zusammenfassend konnten wir zeigen dass:

- $G\alpha 13$ zu morphologischen Veränderungen mit Zellausläufern im myeloischen Vorläuferzellen (32D-cl3 Zellen) führt. An den Zellausläufern findet man eine Aktinmehranreicherung
- Die Überexpression von $G\alpha 13$ reduziert die Adhäsion an fibronectinbeschichteten Oberflächen
- $G\alpha 13$ steigert die ungerichtete und gerichtete Zellmigration
- Eine Inhibition des Rho und p160 ROCK führt zu einer Reduktion der Migration in $G\alpha 13$ überexprimierender 32D-cl3 Zellen. Eine Inhibition der Src-Kinase unterdrückt die Migration fast gänzlich
- $G\alpha 13$ führt in 32D-cl3 Zellen weder zu einer gesteigerten Proliferation noch zu einer Koloniebildung
- Eine $G\alpha 13$ -Überexpression führt zu einer Progression in die G1-Phase, unabhängig von der Überexpression des Wildtyps oder der konstitutiv aktivierten Form
- Eine Progression von der G1-Phase in die S-Phase wird vor allem bei den Wildtyp- überexprimierenden 32D-cl3 Zellen beobachtet
- $G\alpha 13$ führt zu einer RhoA-Aktivierung
- In 32D-cl3 Zellen hat konstitutiv aktives RhoA den gleichen Einfluss auf die Migration wie aktiviertes G-alpha-13. Auch die RhoA-induzierte Migration ist Src-abhängig.

4. Diskussion

Die größte Gruppe von Oberflächenrezeptoren bilden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die ca. 1% des gesamten Genoms ausmachen. Sie besitzen eine siebenmal die Zellmembran umspannende Helix, die an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt ist ¹³³. Eine Ligandenbindung an dem GPCR führt zu einer Konformationsänderung und Freilegung der GDP/ GTP-Bindungsdomäne am G-Protein und damit Initialisierung der Aktivierungskaskade ^{32, 81, 96}. Die heterotrimeren G-Proteine setzen sich aus 3 unterschiedlichen Untereinheiten zusammen: α -Untereinheit, β -Untereinheit und einer γ -Untereinheit, wobei die β - und γ -Untereinheit nur als Dimer ($\beta\gamma$ -Untereinheit) in der Natur vorkommen. Aktuell sind 17 α -Untereinheiten (aufgeteilt in 4 Gruppen) ¹⁰⁷, 5 β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten bekannt, so dass allein durch die diversen Kombinationsmöglichkeiten (1020) der unterschiedlichen Untereinheiten eine außerordentliche Vielfalt an Rezeptoren sich bietet.

In meiner Promotionsarbeit richteten wir das Augenmerk auf das $G\alpha 13$, das mit $G\alpha 12$ die Subgruppe der α -Untereinheit 12 bildet, und untersuchten, welchen Einfluss $G\alpha 13$ auf myeloische Vorläuferzellen hat.

Nach erfolgreichem Subklonieren des $G\alpha 13$ -Wildtyp und der konstitutiv aktivierten Form (durch Austausch von Glutamine mit Leucin an der G3-Region Q226L, (QL)), vom pCis-Vektor in den stark exprimierenden pAL-Vektor, transfizierten wir $G\alpha 13$ in die murine myeloische Vorläuferzelllinie 32D-cl3.

Wir konnten zunächst zeigen, dass das $G\alpha 13$ in 32D-cl3 Zellen exprimiert wird. Durch die Transfektion im pAL-Vektor wird $G\alpha 13$ -WT und -QL, in unserer 32D-cl3-Zelllinie überexprimiert. Die Überexpression konnte sowohl auf der RNA- (Siehe TaqMan-Daten, Abb. 2) als auch auf der Proteinebene (siehe Western-Blot, Abb. 3) nachgewiesen werden.

Gut sichtbar in den konfokalen und lichtmikroskopischen Aufnahmen führte die $G\alpha 13$ -Überexpression zu einem Aktinrearrangement und zu einer Veränderung der Zellmorphologie mit Ausbildung von Pseudopodien vor allem nach IL-3-Gabe.

Zu den bekannten untergeordneten Effektoren des $G\alpha 13$ gehören die Regulatoren der kleinen G-Proteine^{26, 102, 99, 63}. Über eine Aktivierung der Regulatoren der kleinen G-Proteine werden diese ihrerseits wiederum aktiviert. Hier sind zunächst die kleinen G-Proteine der Rho-Familie zu nennen, RhoA, Rac und Cdc42. Die Rho-Familie spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmorphologie. Während RhoA zu einer Aktin-Myosinkontraktion am Zellkörper und Induktion von Stressfibers führt, kommt es Rac-vermittelt zur Aktinpolymerisation an der Zellfront, um die Zellprotrusion zu veranlassen und zur Ausbildung von Lamellipodien und Membrane-Ruffles. Cdc42 agiert an der Zellfront, bestimmt die Polarität und Migrationsrichtung der Zelle und ist an der Ausbildung von Filopodien beteiligt.

Es ist zu erwarten, dass die $G\alpha 13$ -induzierte Veränderung der Zellmorphologie und Ausbildung von Pseudopodien a. e. über die kleinen G-Proteine der Rho-Familie, dem RhoA, Rac und Cdc42 vermittelt wird.

Die lichtmikroskopisch sichtbaren zellmorphologischen Veränderungen in den G-alpha-13 überexprimierenden Zellen legen die Vermutung nahe, dass dieses Protein in der Migration, Adhäsion und Regulation der Aktinverteilung in myeloischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Deshalb wurden funktionelle Untersuchungen zum Migrations- und Adhäsionsverhalten myeloischer Zellen unter dem Einfluss von G-alpha-13 durchgeführt.

Die Zelladhäsion erfolgt an bestimmten, fokalen Arealen, die eine Bindung der Zelle zum Substrat bewirken. Wichtiger Bestandteil an diesen Adhäsionsstellen sind vor allem Integrine⁴⁵, die über ihre extrazelluläre Domäne an spezifische Aminosäuresequenzen der extrazellulären Matrix (EZM) binden⁴.

Frühe Adhäsionen entstehen nahe der Zellfront und werden Fokalkomplexe genannt. Die meisten Fokalkomplexe lösen sich während des Zurückziehens des Lamellipodiums wieder auf, die übrigen vergrößern sich und reifen zu stabilen fokalen Adhäsionen. Für schnell migrierende Zellen ist eine schnelle Adhäsion am Substrat wichtig, um eine Fortbewegung zu ermöglichen, aber auch eine ebenso schnelle Lösung der Adhäsion um den Vorschub der Zelle nicht zu behindern.

Wir untersuchten das Adhäsionsverhalten in Fibronectin beschichteten Wells. In Abbildung 6 lässt sich trotz der z. T. großen Standardabweichungen erkennen, dass die Gα13-Überexpression in hämatopoetischen Vorläuferzellen eine Reduktion der Adhäsionsrate unter Zugabe von IL-3 zur Folge hat. Vermutlich werden vorrangig Fokalkomplexe gebildet, da diese weniger stabil sind und im geringeren Ausmaß stabile fokaler Adhäsionen. Eine erhöhte Motilität korreliert eng mit einem geringeren Verhältnis von fokalen Komplexen, die sich zu fokalen Adhäsionen entwickeln.

Die Vermutung, dass die Gα13-Überexpression zu einer gesteigerten Migration führt, konnten wir in den anschließenden Migrationsassays bestätigen, die sowohl die ungerichtete als die gerichtete Migration einschlossen.

Die Überexpression von $G\alpha_{13}$ führte zu einer IL-3-abhängigen Erhöhung (um das 5- bzw. 3.5-fache) der ungerichteten Migration, während IL-3 keinen Effekt auf die Kontrollzellen hatte. Auch die gerichtete Migration wird durch die Überexpression von $G\alpha_{13}$ unter Verwendung potenter Chemokine (SDF-1 und IL-8) deutlich gesteigert.

In neutrophilen Granulozyten sind Chemoattractant-Rezeptoren vornehmlich an $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ gebunden ¹²⁸.

Die Signaltransduktion über $G\alpha_i$ wird auch über das Dimer β/γ vermittelt, während die Signaltransduktion über $G\alpha_{12/13}$ direkt übermittelt wird. Die Zellmigration wird aber nicht nur über GPCR vermittelt, sondern kann auch GPCR unabhängig über z.B. Rezeptorphosphorylierungen, Ca^{2+} -Kanäle, MAPK's oder STAT's erfolgen ^{9, 68, 58}.

Während der Chemotaxis findet eine Translokation von Proteinen mit Plecktrinhomology (PH)-Domains vom Zytosol an die Zellmembran, der Zellfront statt. Zu den PH-Domain-Proteinen zählen CRAC, cytosolic regulator of adenyl cyclase, und PKB (Protein Kinase B). Diese Proteine binden an der Zellmembran an PH-Domains-Proteine z.B. Phosphatidylinositol 3-4 (PtdIns (3,4)P2) und an PtdIns (3,4,5) P3.

PtdIns (3,4,5) P3 wird durch PTEN (phosphatase and tensin homologue) inaktiviert. PtdIns (3,4,5) P3 steigert die Aktinpolymerisation und die Pseudopodienformation. Setzt man *D. discoideum* einem Chemoattractant aus, so kommt es zu einer Translokation von PI3K1 und 2, welche Phosphatidylinositol 3-4 (PtdIns (3,4)P2) zu PtdIns (3,4,5) P3 umwandeln, vom Zytosol an die Zellfront, während PTEN von der Zellfront an die Zellrückseite transloziert.

Die Entwicklung neuer Pseudopodien erfolgt vornehmlich an Stellen, an denen bereits „Flecken“ von PtdIns (3,4,5) P3 vorkommen. PtdIns (3,4,5) P3 beeinflusst nicht nur die Entstehung von Pseudopodien, sondern auch die Größe und Dauer. Aber in „chemotaktisch defekten“ *D. discoideum* ($pi3k1^- / pi3k2^-$) und in Säugetier PI3K γ -null Zellen ist zwar die Migrationsgeschwindigkeit und die Direktionalität vermindert, jedoch nicht vollständig aufgehoben.

Das PtdIns (3,4,5) P3-System wird als starker Verstärker und Direktor der chemoattraktantinduzierten Pseudopodienformation verstanden ¹¹⁴.

Wir konnten zeigen, dass die Blockade des PtdIns (3,4,5) P3-Systems keinen Einfluss auf die gerichtete Migration von G α 13-überexprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen hat. Eine G α 13-Überexpression führt demnach bereits alleine zu einem suffizienten Stimulus für die Zellmigration, so dass keine zusätzliche Amplifikation durch PtdIns (3,4,5) P3-System nötig ist. Demnach bedarf es keiner Aktivierung des PtdIns (3,4,5) P3-Systems über das Dimer β/γ .

Die Aktinpolymerisation wird über den Arp2/3 Komplex vermittelt, welcher seinerseits durch das Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) und dem WAVE/SCAR (suppressor of cAMP receptor) aktiviert wird. WASP und WAVE/SCAR werden u. a. über die kleinen G-Proteine der Rho-Familie aktiviert ^{87, 82, 27}.

Die Hauptdeterminate für den Ort an dem die Aktinpolymerisation in der Zelle stattfindet, ist das aktivierte Rac. An welchen Stellen der Zelle Rac aktiviert ist hängt von der Konzentration von GEF's (Regulatoren der kleinen G-Proteine) in den jeweiligen Zellkompartimenten ab, die ihrerseits von lokal produzierten PtdIns (3,4,5) P3 oder durch direkte Rezeptoraktivierung reguliert werden.

Rac stimuliert oder rekrutiert PI3K an der Zellfront, die PtdIns (3,4,5) P3 produziert, das seinerseits Rac-GEF's aktiviert. Durch die $G\alpha 13$ -Überexpression kommt es vermutlich zu einer direkten und vollständigen Aktivierung der Rac-GEFs oder von Rac direkt, so dass eine Rac-vermittelte PtdIns (3,4,5) P3-Produktion zur Rac-GEF Aktivierung irrelevant ist.

Unsere Versuche haben gezeigt, dass eine gesteigerte Migration durch die alleinige Überexpression von $G\alpha 13$ ausgelöst werden kann. Diese wird auch unabhängig vom Ras/ Raf/ MEK/ ERK-Signalweg, und der p38-MAP-Kaskade vermittelt, da eine Inhibition dieser Signalweges keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten $G\alpha 13$ -überexprmierender myeloischer Vorläuferzellen hatte.

Für die Zellprotrusion ist nicht nur die Zellfront von Wichtigkeit, sondern auch der Zellkörper und die Zellrückseite, an denen man vornehmlich Myosinfilamente findet, die eine Zellretraktion bewirken. Die Formation von Myosinfilamenten wird durch die MLCK (Myosin light chain Kinase) reguliert, die ihrerseits durch Ca^{2+} und Rho stimulated kinase (ROCK) aktiviert werden. Die gesteigerte Migration, vermittelt durch $G\alpha 13$ -Überexpression, wird durch eine Inhibition des RhoA und des p160ROCK deutlich gemindert.

An welchem Zellkompartiment die $G\alpha 13$ -Überexpression vornehmlich die gesteigerte Migration vermittelt, bleibt unklar. Überwiegt der Einfluss des $G\alpha 13$ durch z. B. direkte Aktivierung von Rac-GEF's auf die Zellfront oder überwiegt der Einfluss auf den Zellkörper und Zellrückseite über eine Aktivierung des RhoA und damit schnellen Zellretraktion? Oder spielen andere, G-Protein-unabhängige Signalwege, eine entscheidende Rolle?

Die stärkste Blockade der G α 13-vermittelten Migration konnte über eine Inhibition des Src-Signalweges erreicht werden.

Der Src-Signalweg ist von großer Wichtigkeit in der integrinvermittelten Zelladhäsion und Migration. Zum einen ist der Src-Signalweg in die Regulation von fokalen Adhäsionsformationen involviert⁹⁴, zum anderen führt er zu einer Aktivierung der kleinen G-Proteine: Rac-Aktivierung via p130Cas/Crk²¹ und Aktivierung von RhoA⁴⁸ zur Zellmigration. Aufgrund der multiplen Schnittstellen zwischen dem Src-Signalweg und der Zellmigration erklärt sich der größte Effekt auf die G α 13-vermittelte Zellmigration. Zwar können G α 13-vermittelt Regulatoren der kleinen G-Proteine und in Folge dessen die kleinen G-Proteine selbst aktiviert werden, jedoch sind neben den kleinen G-Proteinen zusätzliche untergeordnete Effektoren des Src für die Migration unabdingbar. Eine suffiziente Haftung der Zelle am Substrat von initial „lockeren“ fokalen Komplexen zu später „festeren“ fokalen Adhäsionen stellt eine unabdingbare Voraussetzung für eine funktionierende Migration dar. Auch wenn die kleinen G-Proteine bei der Bildung von fokalen Adhäsionen eine entscheidende Rolle spielen, sind zusätzlich eine Vielzahl von anderen Faktoren mitbeteiligt. Es stellt sich von daher die Frage, insbesondere aufgrund der ausgeprägten Inhibition der Migration durch Inhibition des Src-Signalweges, ob eine direkte Interaktion zwischen G α 13 und Src und dem damit verbundenen Einfluss auf die Migration besteht.

Einige Studien befassten sich mit dieser Thematik. So konnten Denker und Yamazaki zeigen, dass G α 13 nicht nur an der Zellmembran anzutreffen ist, sondern auch in intrazellulären Membranen und im Zytoplasma, also ubiquitär seine Wirkung entfaltet

24, 129

Shan et al. konnte zeigen, dass $G\alpha 13$ direkt mit Rac interagiert. Der Komplex aus $G\alpha 13$ und Rac ist vermutlich an der Auflösung von dorsal ruffles beteiligt¹⁰¹. Weil diese langsam abgebaut werden, können nur langsam Aktinpolymere, die für die Lamellipodien benötigt werden, gebildet werden, so dass der ganze Migrationsprozess verzögert wird.

Weitere Interaktionsmöglichkeiten von $G\alpha 13$ mit der Zellmigration sind zudem berichtet worden: So ist eine direkte Interaktion von $G\alpha 13$ mit dem Aktin bindendem Protein Radixin beschrieben worden¹¹³, sowie über eine Aktivierung von RhoA über p115Rho-GEF und damit Induktion von Stress fibers³⁹, wie auch eine direkte Interaktion mit Hax-1, welches zur BTK-Familie gehört.

Nicht nur über GPCR's werden Migrationssignale via $G\alpha 13$ ins Zellinnere übertragen sondern auch über andere Rezeptorklassen, z.B. Rezeptotyrosinkinasen (RTK). Shan und Kollegen konnten zeigen, dass bei der durch Wachstumsfaktoren und RTK – induzierten Zellmigration eine Beteiligung von $G\alpha 13$ vorliegt, die GPCR-unabhängig ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass $G\alpha 13$ mit Rac ein Komplex bildet, der bei Blockade von $G\alpha 13$ zu einer Störung der Zellmorphologie und der Zellmigration führt. Demnach ist das $G\alpha 13$ nicht nur an der Signalübermittlung von GPCR beteiligt, sondern auch als untergeordneter Effektor von RTK¹⁰¹.

Aufgrund der multiplen beschriebenen Einflussmöglichkeiten von $G\alpha 13$ auf die Zellmigration mit direkten Interaktionen auf unterschiedlichen Ebenen, auf der Rezeptorebene, frühen untergeordneten Effektorebene oder am Ende der Adhäsions- und Migrationskaskade, erscheint ein direkte Interaktion von $G\alpha 13$ mit dem Src-Signalweg möglich. Aufgrund der fast vollständigen Aufhebung der Migration durch Inhibition des Src-Signalweges sogar wahrscheinlich. Dies gilt es in weiteren Versuchen zu bestätigen.

Ob das $G\alpha 13$ und anschließenden Aktivierung der kleinen G-Proteine Allein- oder Hauptverantwortlich ist für die beobachtete $G\alpha 13$ -induzierte gesteigerte Migration kann nicht sicher beantwortet werden. Im PAK-1-Pulldown-Assay, bei dem wir die Aktivierungszustände (GTP-gebunden) der kleinen G-Proteine untersuchten, lagen Cdc42 und Rac bereits im hohen Maße in einer aktivierten, also GTP-gebundenen Form vor, sowohl bei den mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen, wie auch bei den $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen. Ein Unterschied konnte lediglich für RhoA nachgewiesen werden. Während in den Kontrollzellen mit und ohne IL-3 kein aktiviertes RhoA nachgewiesen werden konnte, führte die $G\alpha 13$ -Überexpression zu einer IL-3-abhängigen Rho-Aktivierung. Migrationsassays mit dominant aktives RhoA überexprimierenden Zellen zeigten ein ähnliches Migrationsverhalten wie die $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen. Eine Inhibition des Src-Signalweges führte bei den mit dominant aktivierten RhoA transfizierten 32D-cl3 Zellen ebenfalls zu einer ausgeprägten Reduktion der Migration. Dies deutet darauf hin, dass sich bezüglich der Migration Src unterhalb von RhoA in der Signaltransduktionskaskade befindet. Die funktionelle Rolle der anderen kleinen G-Proteine Rac und Cdc42 in myeloischen Zellen sollte mittels dominant aktiven und dominant negativen Mutationen in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Aus dem alleinigen Vergleich im PAK-1-Pulldown des aktivierten, GTP-gebundenen, Rac und Cdc42 in $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen lassen sich keine sicheren Rückschlüsse auf den Einfluss dieser kleinen G-Proteine auf die Migration bei $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen ableiten. Zwar besteht, wie oben beschrieben, in der quantitativen Bestimmung kein Unterschied zwischen den Menge von aktiviertem Rac und Cdc42 zwischen $G\alpha 13$ -überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen, jedoch spielt bei der Migration

nicht zwangsläufig die Menge aktivierten Rac's und Cdc42's, sondern vielmehr ihre räumliche Verteilung eine wichtige Rolle.

Eine Vielfache Beteiligung des $G\alpha 13$ an der Zellproliferation und malignen Transformation ist beschrieben, u. a. in NIH3T3-Zellen und bei athymischen „nude“ Mäusen (siehe Einleitung). Den Einfluss des $G\alpha 13$ auf myeloische Vorläuferzellen untersuchten wir in unseren stabilen 32D-cl3-Zelllinien.

Wir konnten kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und $G\alpha 13$ -überexprimierenden 32D-cl3 Zellen in der Proliferationsrate oder Koloniebildungsfähigkeit feststellen. Die $G\alpha 13$ -induzierten Veränderungen, u. a. in NIH3T3-Zellen, lassen sich somit nicht auf myeloische Vorläuferzellen übertragen, wobei eine Verifizierung im in vivo Modell geplant ist. Demnach scheint in myeloischen Vorläuferzellen die alleinige $G\alpha 13$ -Überexpression, als „single Hit“, nicht für eine maligne Transformation ausreichend zu sein. In Folgeversuchen gilt es zu klären, ob bei Vorliegen anderer Defekte eine $G\alpha 13$ -Überexpression zu einem Synergismus in der malignen Transformation führt.

Dies ist zu erwarten, da zwar kein Einfluss des $G\alpha 13$ auf die Proliferation oder Koloniefähigkeit beobachtet wurde, jedoch greift das $G\alpha 13$ in den Zellzyklus ein. Wir konnten zeigen, dass auch in der myeloischen Vorläuferzelllinie 32D-cl3 eine $G\alpha 13$ -Überexpression zu einer Progression von der G2-M-Phase in die G1-Phase führt. Eine Progression von der G1-Phase in die S-Phase konnten wir auch für den Wildtyp dokumentieren, nicht jedoch für die konstitutiv aktivierte Form. Wieso sich an diesem Checkpoint ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der konstitutiv aktivierten Form auftrat muss ebenfalls in Folgeversuchen eruiert werden.

Die $G\alpha 13$ induzierte Zellzykluskontrolle wird am ehesten über die kleinen G-Proteine vermittelt. Auch an der Zellzykluskontrolle ist eine Beteiligung der kleinen G-Proteine beschrieben. In T-Zellen führt einer Internalisierung des TCR (T-Cell-Rezeptor) nach Antigenkontakt zu einer Rho-Aktivierung. Das führt via JNK MAP Kinase Kaskade zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT und erhöht die Expression von IL-2, was die G1-Progression begünstigt ¹⁹.

Rac hat 2 Aufgaben: 1. Kontrolle der Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes
2. Es führt zur Aktivierung von Vav, welches die Expression von Cyclin D2 reguliert ³³

Auch bei Fibroblasten und epitheliale Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Rho, Rac und Cdc42 alle für die Zellzyklusprogression in die G1-Phase beitragen. Alle können den G1-Eintritt beschleunigen und die Progression in die S-Phase bewirken ⁴⁷.

Rho scheint 2 Aufgaben zu haben: 1. Inhibition der Expression von cyclin/ CDK Inhibitor p21 ^{Waf1/cip1}
2. Induktion der Expression von cyclin D1 in der Mitte von G1 ^{123, 79}

In epitheliale Zellen ist Rac für die cyclin D1-Expression während der G1-Phase verantwortlich ⁶⁶.

Die in vitro gewonnen Erkenntnisse über die Funktion von G α 13 in myeloischen Zellen, vor allem in Bezug auf die Zellmigration, Adhäsion, Proliferation und Zellzykluskontrolle, gilt es in vivo Modellen zu verifizieren und komplettieren. Dies ist als Folgeprojekt im Mausmodell geplant. Erst dann lässt sich eine genauere Erkenntnis zur klinischen Relevanz und zur Sinnhaftigkeit therapeutischer Ansatzmöglichkeit an diesem Signaltransduktionsmechanismus gewinnen. Aufgrund der z. T. großen Einflussnahme in zellmorphologische und funktionelle Mechanismen von G α 13 in myeloischen Vorläuferzellen, ist eine Identifizierung der Signalwege von G α 13 über die kleinen G-Proteine hinaus von außerordentlicher Wichtigkeit. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang vor allem die Beteiligung am Src-Signalweg.

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adamson, R. H., and S. M. Seiber**, Chemically induced leukemia in humans. *Environ Health Perspect* 1981, 39:93-103
2. **Aiuti A, Tavian M, Cipponi A, Ficara F, Zappone E, Hoxie J, Peault B, Bordignon C**, Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol.* 1999 Jun;29(6):1823-31
3. **Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC.**, The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors peripheral blood. *J Exp Med.* 1997 Jan 6;185(1):111-20
4. **Alberts, B. et. al.**, Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 4. Auflage, 2002. ISBN 0815340729
5. **Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. & Jones, G. E.**, A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* 1998, 141, 1147–1157
6. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, and Kaibuchi K.**, Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996, 271: 20246-20249
7. **Ando S, Kaibuchi K, Sasaki T, Hiraoka K, Nishiyama T, Mizuno T, Asada M, Nunoi H, Matsuda I, and Matsuura Y.**, Posttranslational processing of rac p21s is important both for their interaction with the GDP/GTP exchange proteins and for their activation of NADPH oxidase; *J Biol. Chem.* 1992 Dec 25;267(36):25709-13
8. **Araki S, Kikuchi A, Hata Y, Isomura M, and Takai Y.**, Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor *J Biol Chem* 1990, 265: 13007-13015

- 9. Araki T, Gamper M, Early A, Fukuzawa M, Abe T, Kawata T, Kim E, Firtel RA, Williams JG.**, Developmentally and spatially regulated activation of a Dictyostelium STAT protein by a serpentine receptor. *EMBO J.* 1998 Jul 15;17(14):4018-28
- 10. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM.** Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci.* 1994 Jul;19(7):279-83.
Review
- 11. Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan,** Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976,33:451-8
- 12. Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan,** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group *Ann Intern Med* 1985, 103:620-5
- 13. Boguski MS, McCormick F.,** Proteins regulating Ras and its relatives *Nature*, 1993, 366:643–53
- 14. Bokoch GM, Vlahos CJ, Wang Y, Knaus UG, and Traynor-Kaplan AE,** Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 1996, 315: 775-779
- 15. Bourne HR, Sanders DA, and McCormick F. ,** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990, 348: 125-132
- 16. Burack WR, Sturgill TW.,** The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry.* 1997 May 20;36(20):5929-33.
- 17. Butty, A.-C. et al.,** A positive feedback loop stabilizes the guanine-exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J*, 2002. 21, 1565–1576

- 18. Byrd, J. C., K. Mrozek, R. K. Dodge, A. J. Carroll, C. G. Edwards, D. C. Arthur, J. Pettenati, S. R. Patil, K. W. Rao, M. S. Watson, P. R. Koduru, J. O. Moore, R. M. Stone, R. J. Mayer, E. J. Feldman, F. R. Davey, C. A. Schiffer, R. A. Larson, and C. D. Bloomfield** Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461) *Blood* 2002, 100:4325-36
- 19. Cantrell D.** , Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr Biol.* 1998 Jul 16;8(15):R535-8. Review
- 20. Chan AM, Fleming TP, McGovern ES, Chedid M, Miki T, Aaronson SA.,** Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product *Mol Cell Biol.* 1993 Feb;13(2):762-8
- 21. Chodniewicz D, Klemke RL.,** Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 5;1692(23):63-76. Review
- 22. Cobb MH, Xu S, Cheng M, Ebert D, Robbins D, Goldsmith E, Robinson M.,** Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways. *Adv Pharmacol.* 1996;36:49-65. Review
- 23. Das R, Vonderhaar BK.,** Activation of raf-1, MEK, and MAP kinase in prolactin responsive mammary cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;40(2):141-9
- 24. Denker SP, McCaffery JM, Palade GE, Insel PA, Farquhar MG.,** Differential Distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J Cell Biol.* 1996 Jun;133(5):1027-40

- 25. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ.** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):1025-37
- 26. Dhanasekaran N, Dermott JM.** , Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal.* 1996 Jun;8(4):235-45
- 27. Etienne-Manneville S, Hall A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629-35. Review
- 28. Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR.,** cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):7851-4
- 29. Fenski, R., K. Flesch, S. Serve, M. Mizuki, E. Oelmann, K. Kratz-Albers, J. Kienast, R. Leo, S. Schwartz, W. E. Berdel, and H. Serve,** Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells *Br J Haematol* 2000, 108:322-30
- 30. Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, and Kaibuchi K.** Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol* 1998, 141: 409-418
- 31. Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, and Takai Y.** Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 1990, 5: 1321-1328
- 32. Gether U.,** Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 2000 Feb;21(1):90-113. Review

- 33. Glassford, J. et al.** Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of mouse B lymphocytes activated via the antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 41040–41048
- 34. Grignani, F., S. De Matteis, C. Nervi, L. Tomassoni, V. Gelmetti, M. Cioce, M. Fanelli, M. Ruthardt, F. F. Ferrara, I. Zamir, C. Seiser, M. A. Lazar, S. Minucci, and P. G. Pelicci** Fusion proteins of the retinoic acid receptor α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia *Nature* 1998, 391:815-8
- 35. Hall A.** The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249: 635-640, 1990
- 36. Hamada T, Mohle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MA, Rafii S,** Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med.* 1998 Aug 3;188(3):539-48
- 37. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ.,** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994 Aug 5;265(5173):808-11
- 38. Hanke JH, Pollok BA, Changelian PS.,** Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation: targets for drug intervention *Inflamm Res.* 1995 Sep;44(9):357-71.
Review
- 39. Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., and Bollag, G.,** Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Ga13. *Science* 1998, 280, 2112–2114
- 40. Hayakawa, F., M. Towatari, H. Kiyoi, M. Tanimoto, T. Kitamura, H. Saito, and T. Naoe,** Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines *Oncogene* 2000, 19:624-31

- 41. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.,** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 1993 Nov;7(11):2135-48
- 42. Hiraoka K, Kaibuchi K, Ando S, Musha T, Takaishi K, Mizuno T, Asada M, Menard L, Tomhave E, Didsbury J, Snyderman R, and Takai Y.,** Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 182: 921-930
- 43. Hotchin N.A. and Hall A.,** The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 1995, 131, pp. 1857–1865
- 44. Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS.,** D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:11184–89
- 45. Hynes RO.,** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992 Apr 3;69(1):11-25. Review
- 46. Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J. L. Belsky,** Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukaemia *J Radiat Res (Tokyo)* 1978, 19:262-82
- 47. Ison, M. F., Ashworth, A. & Hall, A.,** An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995, 269, 1270–1272
- 48. Iwahara T, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H.,** CrkII induces serum response factor activation and cellular transformation through its function in Rho activation. *Oncogene.* 2003 Sep 4;22(38):5946-57

- 49. Jiang et al**, The G-Protein G alpha 12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and rasGAP through a conserved PH/BM domain *Nature*, 98; 395, 808-813
- 50. Kalinec G, Nazarali AJ, Hermouet S, Xu N, Gutkind JS.**, Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 1992 Oct; 12(10):4687-93
- 51. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, and Kaibuchi K.**, Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996, 273: 245-248
- 52. Kroll SD, Chen J, De Vivo M, Carty DJ, Buku A, Premont RT, Iyengar R.**, The Q205LGo-alpha subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation., *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):23183-8
- 53. Krupnick JG, Benovic JL**, The role of receptor kinases and arrestins in G-protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998, 38:289-319
- 54. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR**, The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994 May 12;369(6476):156-160
- 55. Leonard D, Hart MJ, Platko JV, Eva A, Henzel W, Evans T, and Cerione RA.** The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the Cdc42 Hs protein. *J Biol Chem* 1992, 267: 22860-22868

- 56. Lisovsky, M., Z. Estrov, X. Zhang, U. Consoli, G. Sanchez-Williams, V. Snell, R. Munker, A. Goodacre, V. Savchenko, and M. Andreeff** Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukaemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax *Blood* 1996, 88:3987-97
- 57. Lyman S, Gilmore A, Burridge K, Gidwitz S, White GC 2nd.,** Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants. *J Biol Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22538-47
- 58. Maeda M, Firtel RA.,** Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK2 by the chemoattractant folic acid in Dictyostelium. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23690-5
- 59. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, and Narumiya S.,** Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999, 285: 895-898
- 60. Martin GA, Bollag G, McCormick F, Abo A.,** A novel serine kinase activated by rac1/ Cdc42 Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* 1995 Sep 1;14(17):4385
- 61. Matanoski, G. M., R. Seltser, P. E. Sartwell, E. L. Diamond, and E. A. Elliott,** The current mortality rates of radiologists and other physician specialists: specific causes of death *Am J Epidemiol* 1975, 101:199-210
- 62. Matsui Y, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Kondo J, Teranishi Y, and Takai Y.,** Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *Mol Cell Biol* 1990, 10: 4116-4122

- 63. McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D, Mbamalu G, Settleman J, Dedhar S, Rozakis-Adcock M, Chen LB, Pawson T,** The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* 1993 Aug;12(8):3073-81
- 64. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon,** Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells *Blood* 2000, 95:3489-97
- 65. Meshinchi, S., W. G. Woods, D. L. Stirewalt, D. A. Sweetser, J. D. Buckley, T. K. Tjoa, I. D. Bernstein, and J. P. Radich,** Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia *Blood* 2001, 97:89-94
- 66. Mettouchi, A. et al.,** Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G1 phase of the cell cycle. *Mol. Cell* 2001, 8, 115–127
- 67. Milligan G.,** Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14:413–18
- 68. Milne JL, Wu L, Caterina MJ, Devreotes PN.,** Seven helix cAMP receptors stimulate Ca²⁺ entry in the absence of functional G proteins in Dictyostelium. *J Biol Chem.* 1995 Mar 17;270(11):5926-31
- 69. Mitchison TJ, Cramer LP.,** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):371-9. Review

- 70. Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T. Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W. E. Berdel, and H. Serve,** Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways *Blood* 2000, 96:3907-14
- 71. Moreno, I., G. Martin, P. Bolufer, E. Barragan, E. Rueda, J. Roman, P. Fernandez, P. Le n, A. Mena, J. Cervera, A. Torres, and M. A. Sanz,** Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukaemia *Haematologica* 2003, 88:19-24
- 72. Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E.,** Roles of the MAP kinase cascade in vertebrates. *Adv Pharmacol.* 1996;36:121-37. Review. No abstract available
- 73. Mrozek, K., K. Heinonen, A. de la Chapelle, and C. D. Bloomfield,** Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia *Semin Oncol*1997, 24:17- 31
- 74. Mumby SM.,** Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol*1997, 9:148–54
- 75. Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa.** Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukaemia *Leukemia* 1996, 10:1911-8
- 76. Nobes CD, Hall A.,** Rho, rac and Cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility *Biochem Soc Trans.* 1995 Aug;23(3):456-9. Review
- 77. Nobes CD, Hall A.** Rho, rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995 Apr 7;81(1):53-62

- 78. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI.**, Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice *Nature*. 1997 Sep 11;389(6647):183-6
- 79. Olson, M. F., Paterson, H. F. & Marshall, C. J.**, Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1 *Nature* 1998, 394, 295-299
- 80. Pace AM, Wong YH, Bourne HR.**, A mutant alpha subunit of Gi2 induces neoplastic transformation of Rat-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15;88(16):7031-5
- 81. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ.**, Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Sep;3(9):639-50. Review
- 82. Pollard TD, Borisy GG.**, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):453-65. Review. Erratum in: *Cell*. 2003 May 16;113(4):549
- 83. Poppe, B., H. Van Limbergen, N. Van Roy, E. Vandecruys, A. De Paepe, Y. Benoit, and F. Speleman**, Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies *Cancer Genet Cytogenet* 2001, 128:39-42
- 84. Pui, C. H.**, Childhood leukemias *N Engl J Med* 1995, 332:1618-30
- 85. Rhadika V. and Dhanasekaran**, Transforming G Proteins *Oncogene* 2001, 20, 1607-1614
- 86. Ridley A.J. and Hall A.**, The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992, 70, pp. 389–399

- 87. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR**, Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9. Review
- 88. Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, Stein B, Goldsmith E, Cobb MH**, Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem*. 1996 Nov 22;271(47):29734-9
- 89. Rombouts, W. J., I. Blokland, B. Lowenberg, and R. E. Ploemacher**, Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene *Leukemia* 2000, 14:675-83
- 90. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR**, A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):1027-37
- 91. Rosu-Myles M, Gallacher L, Murdoch B, Hess DA, Keeney M, Kelvin D, Dale L, Ferguson SS, Wu D, Fellows F, Bhatia M**, The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14626-31
- 92. Rowley, J. D** , The critical role of chromosome translocations in human leukemias *Annu Rev Genet* 1998, 32:495-519
- 93. Sagata N.**, What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays*. 1997 Jan;19(1):13-21. Review.
- 94. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D.**, Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 5;1692(2-3):77-102. Review.

- 95. Schoch, C., and T. Haferlach**, Cytogenetics in acute myeloid leukemia *Curr Oncol Rep* 2002, 4:390-7
- 96. Schoneberg T, Schulz A, Gudermann T.**, The structural basis of G-protein coupled receptor function and dysfunction in human diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2002;144:143-227. Review
- 97. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR**, Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo *Nat Med.* 1999 Jul;5(7):810-6
- 98. Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S.**, Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 1989 May 25;264(15):8602-5
- 99. Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA.** Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature.* 1992 Sep 10;359(6391):153-4
- 100. Severson, R. K., S. Davis, L. Heuser, J. R. Daling, and D. B. Thomas** Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukemia *Am J Epidemiol*1990, 132:418-22
- 101. Shan D, Chen L, Wang D, Tan YC, Gu JL, Huang XY.**, The G protein G alpha(13) is required for growth factor-induced cell migration. *Dev Cell.* 2006 Jun;10(6):707-18

- 102. Shou C, Wurmser A, Suen KL, Barbacid M, Feig LA, Ling K.,** Differential response of the Ras exchange factor, Ras-GRF to tyrosine kinase and G protein mediated signals. *Oncogene*. 1995 May 18;10(10):1887-93. Erratum in: *Oncogene* 1995 Nov 2;11(9):1929
- 103. Shurin, M. R., C. Esche, and M. T. Lotze,** FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application *Cytokine Growth Factor Rev* 1998, 9:37-48
- 104. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC.,** Hyperexpression of mitogen activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1478-83
- 105. Slack, J. L., and R. E. Gallagher,** The molecular biology of acute promyelocytic leukaemia *Cancer Treat Res* 1999, 99:75-124
- 106. Slovak, M. L., K. J. Kopecky, P. A. Cassileth, D. H. Harrington, K. S. Theil, A. Mohamed, E. Paietta, C. L. Willman, D. R. Head, J. M. Rowe, S. J. Forman, and F. R. Appelbaum,** Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study *Blood* 2000, 96:4075-83
- 107. Strathmann M, Wilkie TM, Simon MI.,** Diversity of the G-protein family: sequences from five additional alpha subunits in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7407-9
- 108. Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, and Kawata M.,** Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* 133: 187-230, 1992
- 109. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte SOakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM,** The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):6258-67

- 110. Tolias KF, Cantley LC, and Carpenter CL.** , Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 1995, 270: 17656-17659
- 111. Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA,** A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol.* 1997 Apr;4(4):311-6.
- 112. Tse, K. F., G. Mukherjee, and D. Small,** Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation *Leukemia* 2000, 14:1766-76
- 113. Vaiskunaite R, Adarichev V, Furthmayr H, Kozasa T, Gudkov A, Voyno Yassenetskaya TA,** Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26206-12
- 114. Van Haastert PJ, Devreotes PN.,** Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Aug;5(8):626-34. Review
- 115. Vara Prasad MV, Shore SK, Dhanasekaran N.** , Activated mutant of G alpha 13 induces Egr-1, c-fos, and transformation in NIH 3T3 cells, *Oncogene.* 1994 Aug;9(8):2425-9
- 116. Visani, G., P. Bernasconi, M. Boni, G. L. Castoldi, S. Ciolli, M. Clavio, M. C. Cox, A. Cuneo, G. Del Poeta, D. Dini, D. Falzetti, R. Fanin, M. Gobbi, A. Isidori, F. Leoni, V. Liso, M. Malagola, G. Martinelli, C. Mecucci, P. P. Piccaluga, M. C. Petti, R. Rondelli, D. Russo, M. Sessarego, G. Specchia, N. Testoni, G. Torelli, F. Mandelli, and S. Tura,** The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia- analysis of 848 patients *Leukemia* 2001, 15:903-9

- 118. Voyno-Yasenetskaya TA, Pace AM, Bourne HR.,** Mutant alpha subunits of G12 and G13 proteins induce neoplastic transformation of Rat-1 fibroblasts. *Oncogene*. 1994 Sep;9(9):2559-65
- 119. Waskiewicz AJ, Cooper JA.,** Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Dec;7(6):798-805. Review
- 120. Wedegaertner PB, Bourne HR.,** Activation and depalmitoylation of Gsa. *Cell* 1994, 77:1063–70
- 121. Wedegaertner PB. ,** Lipid modifications and membrane targeting of Ga. *Biol. Signals Recept*. 1998,7:125–35
- 122. Weinstein, H. J,** Congenital leukaemia and the neonatal myeloproliferative disorders associated with Down's syndrome *Clin Haematol* 1978, 7:147-54
- 123. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK.** Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol*. 2001 Nov;3(11):950-7
- 124. Wingo, P. A., T. Tong, and S. Bolden,** Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995, 45:8-30
- 125. Winston LA, Hunter T.,** Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. *Curr Biol*. 1996 Jun 1;6(6):668-71. Review
- 126. Wright N, Hidalgo A, Rodriguez-Frade JM, Soriano SF, Mellado M, Parmo Cabanas M, Briskin MJ, Teixido J,** The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5268-77

- 127. Xu N, Voyno-Yasenetskaya T, Gutkind JS.**, Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jun 15;201(2):603-9
- 128. Xu J., F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison, H. Bourn:** Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. *Cell, Volume 114, Issue 2, Pages 201-214*
- 129. Yamazaki, J., Katoh, H., Yamaguchi, Y., and Negishi, M. ,** Two G12 family G proteins, G a12 and G a13, show different subcellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 332, 782–786
- 130. Yokota, S., H. Kiyoi, M. Nakao, T. Iwai, S. Misawa, T. Okuda, Y. Sonoda, T. Abe, K. Kahsima, Y. Matsuo, and T. Naoe** Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines *Leukemia* 1997, 11:1605-9
- 131. Zhang J., King WG., Dillon S., Hall A., Geig I. and Rittenhouse SE.,** Activation of platelet PI3-Kinase requires the small GTP-binding Protein Rho *J. Biol. Chemistry*, 1993, 268: 22251-22254
- 132. Zheng Y, Bagrodia S, and Cerione RA.,** Activation of phosphoinositide 3 kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem* 1994, 269: 18727-18730
- 133. Zhou W, Flanagan C, Ballesteros JA, Konvicka K, Davidson JS, Weinstein H, Millar RP, Sealfon SC,** A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7 proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol.* 1994 Feb;45(2):165 70

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve, dass es trotz der zum Ende hin vorliegenden örtlichen Entfernung es gelungen ist, diese Arbeit fertig zu stellen, sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmittel und des Arbeitsplatzes und der besonderen Arbeitsatmosphäre innerhalb des Labors.

Ein großer Dank geht an Dr. J. Schwäble für die intensive Betreuung, für die stets offene und ehrliche Art des miteinander Umgehens und für die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie, vor allem meiner Ehefrau, die die Voraussetzungen für das Gelingen dieser Arbeit geschaffen hat. Die Ermöglichung des Studiums bildete die Basis für diese Promotion, aber ebenso wichtig war der stetige Rückhalt, das Verständnis für den zeitlichen Aufwand und die Ermunterung zur Zielerreichung der beruflichen Ambitionen.