

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl Biotechnologie der Nutztiere

Untersuchungen zur Identifizierung von Zielmolekülen für die Entwicklung neuer Krebstherapien

Carolin Steinbrücker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. E. Schnieke

2. Hon.-Prof. Dr. Dr. h.c. A. Ullrich
(Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Die Dissertation wurde am 25.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.11.2014 angenommen.

science must be done for itself, for the beauty of science
and then there is always the chance that a scientific
discovery may become a benefit for humanity

Marie Curie

1. Einleitung	1
1.1 Statistik einer Volkskrankheit	1
1.2 Was ist Krebs?	2
1.3 Strategien für die Krebstherapie.....	6
1.3.1 Chemotherapie	6
1.3.2 Gezielte Krebstherapie	7
1.3.2.1. „Small molecule inhibitors“	8
1.4 Kontrolle der Signalübertragung durch Kinasen	8
1.4.1 Die Bedeutung der DYRK homologen Proteine in Prokaryonten und niederen Eukaryonten	11
1.4.1.1. Die Bedeutung der DYRK Familie in mehrzelligen Organismen	11
1.4.2 Die Funktion und Regulierung der DYRK-Kinasen in Säugetieren.....	12
1.4.2.1. Die Funktion von DYRK1A und DYRK1B	13
1.4.2.2. Die Funktion von DYRK3 und DYRK4	15
DYRK2 induziert die P53 kontrollierte Apoptose nach DNA Schäden	16
Die Abwesenheit von DYRK2 fördert den Übergang von der G1 zu S Phase	17
1.5 Rezeptortyrosinkinasen	18
1.5.1 Die Familie der TAM Rezeptor Tyrosin Kinasen	19
1.5.1.1. Die Rezeptor Tyrosin Kinasen TYRO3 und MER	20
1.5.1.2. Die Rezeptor Tyrosin Kinase AXL	21
1.5.1.3. Mechanismen der AXL induzierten Signaltransduktion	22
1.5.1.4. Die Bedeutung von AXL in Krebs	22
1.5.1.5. AXL als Zielmolekül für die Krebstherapie	23
1.5.2 Die „Hepatocyte Growth Factor“ Rezeptor Familie.....	24
1.5.2.1. Die Rezeptor Tyrosin Kinase RON	24
1.5.2.2. Die Rezeptor Tyrosin Kinase MET	25
1.5.2.3. Mechanismen der MET induzierten Signaltransduktion und deren Bedeutung in Krebs	27
1.5.2.4. Strategien der MET-Inhibition zur Behandlung von Krebs.....	29
2. Ziel der Arbeit.....	30
3. Materialien.....	31
3.1 Chemikalien	31
3.2 Enzyme	31
3.3 „Kits“ und sonstige Materialien	31
3.4 Wachstumsfaktoren.....	32
3.5 Medien.....	32
3.6 Zellkulturmedien und Additive	32
3.7 Stammlösungen für Puffer	33
3.8 Bakterienstämme.....	35
3.9 Zelllinien	35
3.10 Inhibitoren	37
3.11 primäre Antikörper	37
3.12 sekundäre Antikörper	37
3.13 Plasmide	37
3.13.1 primäre Vektoren	37
3.13.2 Konstrukte.....	38
3.14 Oligonukleotide.....	39
3.14.1 Klonierungsprimer.....	39

3.14.2 kurze interferierende RNS.....	40
3.14.3 TagMan Sonden.....	40
3.15 Tiere	40
3.16 Software	40
4. Methoden.....	41
4.1 Arbeiten mit Escherichia coli.....	41
4.1.2 Herstellung kompetenter Zellen.....	41
4.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien.....	41
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	41
4.2.1 Aufreinigung von DNS	41
4.2.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	41
4.2.3 Gelelektrophorese von DNS.....	42
4.2.4 Amplifikationsanalyse mittels Southern Blot Technik.....	42
4.2.5 Isolierung von DNS-Fragmenten	42
4.2.6 Sequenzierung von DNS.....	42
4.2.7 Enzymatische Behandlung von DNS.....	43
4.2.7.1. Vervielfältigung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion	43
4.2.7.2. Quantitative Real-Time-PCR	44
4.2.7.3. Verdau von DNS Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen.....	45
4.2.7.4. Dephosphorylierung und Ligation von DNS Fragmenten.....	45
4.2.7.5. Einführen von Punktmutationen in Expressionsplasmide.....	45
4.2.8 Arbeiten mit RNS.....	45
4.2.8.1. Präparation von RNS	45
4.2.8.2. Elektrophoretische Auftrennung von RNS	46
4.2.8.3. Reverse Transkriptions -PCR.....	46
4.3 Methoden der Zellkultur	46
4.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	46
4.3.2 Herstellung polyklonaler Zelllinien.....	47
4.3.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien	47
4.3.4 Calcium-Phosphat-Transfektion	47
4.3.5 Retroviraler Gentransfer in NIH/3T3 Maus Fibroblasten	47
4.3.6 Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	48
4.3.7 siRNS-Transfektion	48
4.3.8 Plasmid-Transfektion	48
4.3.9 Proliferationsassay	48
4.3.11 Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Soft-Agar-Assay.....	48
4.3.12 Focus-Formation-Assay	49
4.3.13 Untersuchung der Zellen im In-Vitro-Woundhealing-Assay	49
4.3.14 Untersuchungen zum Migrationsverhalten von Zellen	49
4.3.15 Untersuchungen zum Verhalten von Zellen nach HGF induziertem Scattering „Scattering Assay“	50
4.3.16 Untersuchung der Zellen im „Matrigel outgrowth assay“	50
4.4 Injektion der immun defizienten Mäuse	51
4.5 Proteinanalytische Methoden	51
4.5.1 Zellyse.....	51
4.5.2 Proteinbestimmung.....	51
4.5.3 Immunpräzipitation von Proteinen.....	52

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
4.5.5 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	52
4.5.6 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran.....	52
4.5.7 Immundetektion (Westernblot-Analyse)	53
4.6 Produktion eines polyklonalen Antiserums	53
4.6.1 Aufreinigung eines 28kDa DYRK2 Proteinfragmentes	53
4.6.2 Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen	54
5. Ergebnisse	55
5.1 Untersuchungen zur Funktion von DYRK2	55
5.1.1 Untersuchungen zur genomischen Amplifikation des <i>DYRK2</i> Gen.....	55
5.1.2 Expression des <i>DYRK2</i> Gens in Brust-, Lungen-, und Melanomkrebszelllinien auf mRNS-Ebene	56
5.1.3 Generierung verschiedener Hilfsmittel für die weiterführende Arbeit mit <i>DYRK2</i>	59
5.1.3.1. Erzeugung von Expressionsplasmiden.....	59
5.1.3.2. Untersuchungen zur Funktionalität der erzeugten Plasmide	60
5.1.3.3. Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen das <i>DYRK2</i> Protein	61
5.1.4 Untersuchungen zum transformierenden Potenzial von <i>DYRK2</i>	63
5.1.4.1. Die Überexpression des <i>DYRK2</i> Gens erhöht die Proliferationsrate in Mausfibroblasten	63
5.1.4.2. Die mit 528 Aminosäuren kürzere Isoform von <i>DYRK2</i> besitzt onkogenes Potenzial... 65	
5.1.4.3. Die lange <i>DYRK2</i> Isoform induziert Tumorwachstum von NIH/3T3-Zellen in immundefizienten Mäusen	66
5.1.5 Funktionelle Untersuchungen der <i>DYRK2</i> Kinase in MCF7.....	67
5.1.5.1. <i>DYRK2</i> spielt eine Rolle in der Proliferationskapazität in MCF7 Zellen.....	68
5.1.5.2. Die stabile Überexpression der kinaseinaktiven Isoformen in MCF7 erhöht die Geschwindigkeit des Wundheilungsprozesses.....	69
5.1.5.3. Die stabile Überexpression der kinaseinaktiven Isoformen in MCF7 erhöht die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum	69
5.1.5.4. Eine Veränderung der <i>DYRK2</i> Expression führt zu morphologisch veränderten Wachstum.....	71
5.2 Die Rezeptortyrosinkinase AXL und MET als Zielmolekül für einen im Haus entwickelten niedrig molekularen Inhibitor	73
5.2.1 Untersuchungen zur <i>AXL</i> und <i>MET</i> Expression in Melanom-, Lungenkrebs und Brustkrebszelllinien	73
5.2.2 Untersuchungen zum Potenzial von <i>AXL</i> und <i>MET</i> , raumforderndes Wachstum zu induzieren.....	76
5.2.3 Ein siRNA induzierter Knock-down von <i>AXL</i> reduziert die Fähigkeit zur Bildung von Zellausläufern in einer extrazellulären Matrix	77
5.2.3.1. Die als <i>MET</i> - Inhibitoren beschriebenen „small molecule inhibitor“ AMG und BMS zeigen weniger Potenzial, das invasive Wachstum in <i>AXL</i> abhängigen Zelllinien zu inhibieren, als die auf Sulfonamiden basierenden <i>AXL</i> / <i>MET</i> Inhibitoren	77
5.2.4 <i>AXL</i> inhibiert die Proliferation von Lungenkrebszelllinien.....	80
5.2.4.1. Vergleichenden Untersuchungen zum proliferationshemmenden Effekt zwischen den im Haus entwickelten SMI's und zwei Kontroll-Inhibitoren	83
5.2.5 In den Lungenkrebszelllinien NCI-H1299 ist <i>AXL</i> am Migrationsprozess beteiligt.....	85

6. Diskussion.....	90
6.1 DYRK2 spielt eine Rolle in der Krebsentwicklung.....	90
6.1.1 Unterschiede in der DYRK2 Expressionen fördern maligne Entwicklungen.....	90
6.1.2 DYRK2 besitzt transformierendes Potenzial im Mausmodell	93
6.1.3 Die Überproduktion einer kinase-inaktiven DYRK2 Mutante erhöht das maligne Potenzial einer Brustkrebszelllinie	94
6.1.4 DYRK2 moduliert neben der Zellantwort für genotoxische und hypertoxische Bedingungen auch die Zellantwort unter Wachstumsfaktorenentzug	97
6.1.5 DYRK2 als Target für eine inhibitorische Krebstherapie?	98
6.2 Der Einfluss von AXL und c-MET auf den Phänotyp von Krebszellen	99
6.2.1 AXL und MET haben proliferationsmodulierende Wirkung in Lungenkrebszelllinien	100
6.2.2 AXL, aber nicht MET modulierenden die Invasivität in Brust-und Lungenkrebszelllinien	101
6.2.3 Niedrig molekulare Inhibitoren sind geeignet AXL und MET abhängige Phänotypen zu blockieren	103
7. Zusammenfassung.....	107
8. Summary.....	109
9. Literaturverzeichnis.....	111
10. Abkürzungsverzeichnis	133
Danksagung.....	135

Abbildung 1: Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses.....	5
Abbildung 3: Zusammenfassung der im humanen Genom beschriebenen Proteinkinasen.	10
Abbildung 4: Strukturelle Zusammenfassung der AXL Rezeptor Familie	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung von HGF und dem MET Rezeptors	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung der MET aktivierten Signalkaskaden.....	28
Abbildung 7: Southern Blot Analyse des Dyrk 2 Gens.....	56
Abbildung 8: Dyrk 2 mRNA Expression in verschiedenen Geweben	58
Abbildung 9: Luziferaseassay in transient transfizierten Jurkat Zellen	61
Abbildung 10: Antikörperherstellung und Testung.....	62
Abbildung 11: Proliferationsanalyse in NIH3T3 Zellen	64
Abbildung 12: Focus Formation Assay	66
Abbildung 13: Tumorformation im Xenograftmodel	67
Abbildung 14: Phänotypische Untersuchungen von DYRK2 exprimierenden Zellen.....	70
Abbildung 15: Morphologische Veränderung nach DYRK2 Expression	72
Abbildung 16: AXL und c-MET Expression in Lungen-, Melanom- und Brustkrebszelllinien	75
Abbildung 17 Matrigeloutgrowthassay	79
Abbildung 18: Proliferation von Hop 62 Zellen nach siRNA induziertem Knock-down....	81
Abbildung 19: Proliferation von Krebszelllinien nach siRNA induziertem AXL Knock-down	82
Abbildung 20: Proliferation von Krebszelllinien nach Inhibitorbehandlung	84
Abbildung 21: Migrationsassay nach AXL Knock-down	86
Abbildung 22: Scatteringassay nach Inhibitorbehandlung.....	88
Abbildung 23: Analyse des Phosphorylierungsstatus zweier Prostatakrebszelllinien.....	89

1. Einleitung

In der Entwicklung höherer Lebensformen ist eine Aufgabenteilung zwingend erforderlich. Die Notwendigkeit, Aufgaben zu teilen, setzt die Fähigkeit zur Kommunikation zwischen einzelnen Kompartimenten voraus.

Die Regelung komplexer Prozesse wie bei der Embryonalentwicklung, Gewebsdifferenzierung und bei anderen Wachstumsprozessen, aber auch die Regeneration nach Verletzungen oder Infektionen macht Kommunikation also zu einem Schlüsselkonzept in multizellularen Organismen. Die Verständigung zwischen einzelnen Zellen und Gewebekomplexen geschieht, indem extrazelluläre Signale in intrazelluläre Signaltransduktionswege umgesetzt werden. Eine Erregungweiterleitung kann einerseits eher physikalischer Natur sein, wie im Falle von Nervenzellen, welche Signale durch Ionenflüsse oder Aktionspotenziale weitergeben können, oder andererseits auf chemischem Weg durch verschiedenste Botenstoffe stattfinden. In letzterem Fall leiten Liganden durch ihre Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalweiterleitungskaskaden ein und regulieren somit die Genexpression als auch die davon abhängigen physiologischen und biochemischen Prozesse.

So vielfältig diese, durch Botenstoffe angestoßenen Kommunikationssysteme sind, so zahlreich sind dabei auftretende Störungen, wie sie durch Mutationen, Überexpression, konstitutive Aktivierung oder den Verlust katalytischer Domänen entstehen können. Bei der Genese von Krankheiten mit unkontrolliertem Wachstum wie Krebs spielen fehlende negativregulatorische Mechanismen oder fehlerhafte Signalübertragungswege eine entscheidende Rolle. Folglich hat die exakte Einhaltung dieser Signalweiterleitungsprozesse eine hohe Bedeutung für die zelluläre Kommunikation (Alroy and Yarden 1997, Pan, Xiong et al. 2012).

1.1 Statistik einer Volkskrankheit

Im Jahr 2008 sind 7,6 Millionen Menschen weltweit an Krebs gestorben, das sind 0,13 Prozent der Weltbevölkerung (WHO 2012). Die Zahl der Todesopfer als Folge einer Krebserkrankung soll im Jahr 2030 auf 13,1 Millionen steigen (Globocan 2008). Der Jahresumsatz der acht umsatzstärksten Krebsmedikamente betrug 2008 weltweit 3,3 Milliarden US Dollar (Handelsblatt 2011).

Nach Herz-Kreislaufkrankungen (352.000 Sterbefälle) war der Tod infolge bösartiger Neubildungen mit 219.000 Toten im Jahr 2010 die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, gefolgt von Atemwegserkrankungen mit 60.000 Sterbefällen (Statista 2011).

Etwa 440.000 Menschen erkrankten 2008 in Deutschland an Krebs, ungefähr die Hälfte von ihnen starb an den Folgen der Erkrankung. Dabei sind Lungen- Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs die häufigsten Todesursachen (15.000). 12.000 Männer starben 2008 an den Folgen von Prostatakrebs. Bei Frauen ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung mit jährlich 17.000 Todesfällen. Bei Prostatakrebs liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren. Frauen erkranken durchschnittlich im Alter von 64 Jahren an Brustkrebs, wobei allerdings 40 Prozent der erkrankten Frauen unter 60 Jahre ist. Obwohl meist im fortgeschrittenen Lebensalter diagnostiziert, erkrankten 2008 auch 1800 Kinder unter 15 Jahren an Krebs – allerdings liegen die Heilungschancen hier bei etwa 80 Prozent (Dr. Peter Kaatsch 2012). Die Überlebensrate bei Krebserkrankungen steigt langsam an, wobei die Ursachen dafür auch in einer verbesserten Früherkennung liegen (Siegel, Naishadham et al.). 2002 betrug die Krankheitskosten, welche durch bösartige Neubildungen in Deutschland verursacht wurden, 11,5 Milliarden Euro. Sie stiegen 2008 auf 15,5 Milliarden Euro und machen damit etwa 6 Prozent aller krankheitsbedingten Ausgaben in der Bundesrepublik Deutschland aus (Statistisches Bundesamt 2011)

1.2 Was ist Krebs?

So vielfältig wie die Ursachen für Krebs sind, so vielgestaltig sind auch dessen Krankheitsbilder. Mehr als 300 verschiedene Krebsarten sind mittlerweile bekannt. Eingeteilt werden diese in systemische Erkrankungen des Lymph- und Blutsystems, auch als Lymphome und Leukämien bekannt, und in solide Tumoren mit Geschwulstbildung. Die Medizin definiert Krebs als bösartige Gewebsneubildung. Es wird davon ausgegangen dass ein Großteil der Krebsarten sechs verschiedene Charakteristika aufweist, welche Krebszellen von Normalgewebe unterscheiden (Hanahan and Weinberg 2000). Diese sechs Charakteristika (Abbildung 1) sind dementsprechend die Angriffspunkte, an denen verschiedene Krebstherapien ansetzen. Die Akteure, welche zu den im Weiteren näher beschriebenen Phänotypen führen, können unter den Begriffen Onkogene und Tumorsuppressoren zusammen gefaßt werden.

Onkogene sind vielfältig und meist durch Mutationen aus Protoonkogenen oder durch Veränderungen in ihren Regulationsmechanismen entstanden. Oftmals sind die Produkte der

Protoonkogene unter den Wachstumsfaktoren zu finden und lassen sich in die Klasse der Zelloberflächenrezeptoren einordnen. Sie können Proteinkinasen, also Schlüsselenzyme der Signaltransduktion sein, oder spielen als Transkriptionsfaktor eine regulatorische Rolle in der Zelle. Tumorsuppressoren wiederum sind Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren und normalerweise einer Transformation der gesunden Zelle zur Tumorzelle entgegenwirken. Daher führt eine Deletion, Mutation oder abnorme Regulation in den für Tumorsuppressoren kodierenden Genen oftmals zu einer malignen Zelle.

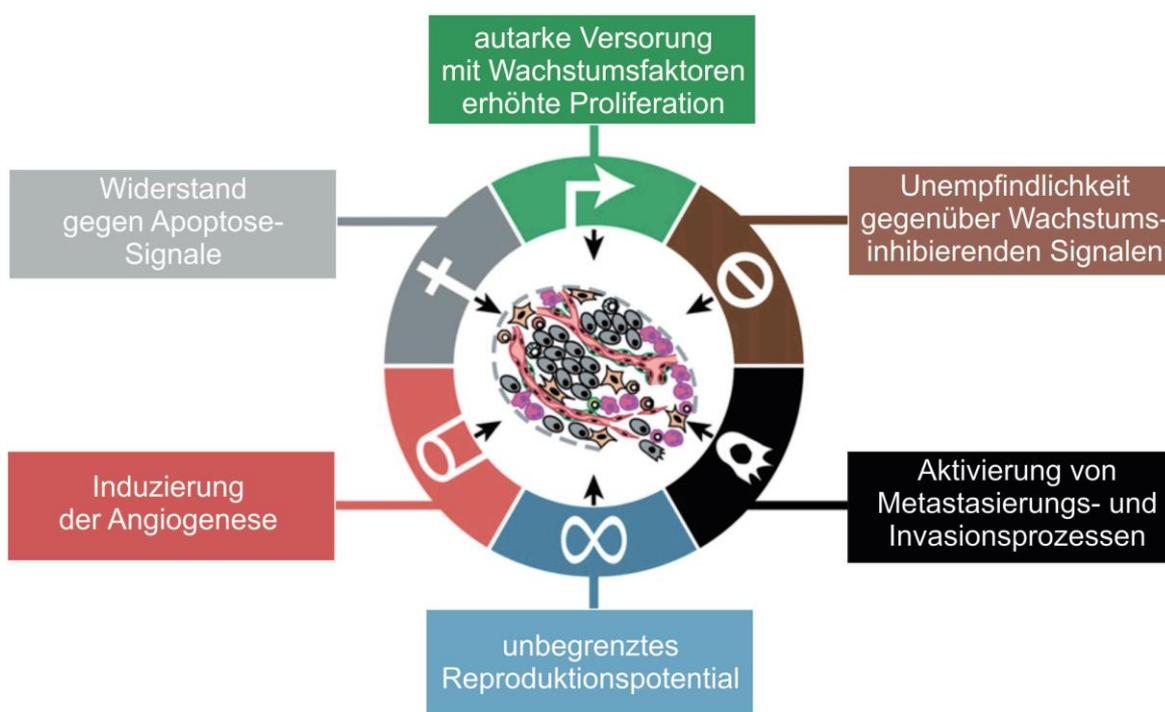


Abbildung 1: Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen (Hanahan and Weinberg 2000)

Erstes Charakteristikum und Grundvoraussetzung für autarke Proliferation ist die Unabhängigkeit von bzw. die Selbstversorgung mit externen Wachstumssignalen (P Fedi 1997). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Unabhängigkeit zu erreichen – ein prominentes Beispiel ist der HER2/NEU-Rezeptor, welcher in Brust- und Magenkrebs überexprimiert ist und zu einer Hyperaktivität führt. Die exprimierenden Zellen reagieren dabei auf normale Konzentrationen von Wachstumsfaktoren mit gesteigerter Proliferation (Slamon, Clark et al. 1987). Eine weitere Ursache kann eine mutationsbedingte strukturelle Veränderung eines Rezeptors sein. So führt der Verlust der zytoplasmatischen Domäne des EGF-Rezeptors zu einer konstitutiv aktiven Signalweiterleitung, diese ist unabhängig von einer Ligandenbindung (P Fedi 1997).

Zweites Charakteristikum von Krebszellen ist die fehlende Sensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen. Diese können Wachstum auf zweierlei Arten blockieren: Zum

einen erfolgt dies über einen signalgesteuerten Zellzyklusarrest, dabei verharrt die Zelle reversibel in der G₀-Phase des Zellzyklus oder zum anderen über den Eintritt in eine postmitotische Phase, welche oftmals das Ende einer Differenzierungsphase kennzeichnet. Diese Wege sind meistens über das Retinoblastomprotein (PRB) gesteuert (Weinberg 1995) und in einem Großteil von Krebszellen verändert.

Ein drittes Kriterium ist die Resistenz gegenüber Apoptose. Es sind zwei charakteristische Haupt-Signalwege des programmierten Zelltods bekannt, welche beide in einer gemeinsamen Signalkaskade münden. Sowohl der extrinsische Weg, dessen Auslösung über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren beginnt (Nagata 1999), als auch der intrinsische Weg, welcher durch Signale aus dem Inneren der Zellen und über Mitochondrien vermittelt wird (Riedl and Shi 2004), führen zu einer umfassenden Proteolyse durch Caspasen und die anschließende Beseitigung der Zelle durch Phagozytose (Letai 2008). Normalerweise wird der Großteil der Zellen, deren Kontrolle durch onkogene Mutationen gestört ist, durch Apoptose entfernt. Wie essenziell wiederum die Verhinderung von Apoptose für Krebszellen ist, zeigt sich in der Vielfalt der Mechanismen, die in diesem Zusammenhang in verschiedenen Krebsarten gefunden wurden (Vaux, Cory et al. 1988, Korsmeyer 1992, Symonds, Krall et al. 1994, Igney and Kramer 2002).

Kriterium Nummer vier umfasst das nahezu unlimitierte replikative Potenzial, das Krebszellen entwickeln. Nahezu alle normalen Zellen verfügen über ein intrinsisches, zell-autonomes Programm, das die Replikationsfähigkeit der Zelle limitiert (Hayflick 1997), bekannt unter dem Begriff Seneszenz. Dieses Programm läuft unabhängig von externen Signalen ab und arbeitet über die Länge von sogenannten Telomeren, welche bei jedem Replikationszyklus verkürzt werden (Counter, Avilion et al. 1992). Durch eine Verlängerung der Telomere infolge vermehrter Produktion des Enzyms Telomerase entgehen Krebszellen häufig der Seneszenz (Bryan and Cech 1999).

Ein weiteres krebszellspezifisches Charakteristikum ist die Fähigkeit zur Angiogenese. Jeder Tumor benötigt Sauerstoff zum Wachsen. Die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff ist jedoch ab einer gewissen Größe durch Diffusion nicht mehr gewährleistet. Um dem Sauerstoffmangel entgegenzuwirken, wird das Einwachsen von Blutgefäßen in den Tumor durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF oder EGF induziert (Veikkola and Alitalo 1999).

Das sechste Kriterium kann unter der Überschrift: „Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung“ zusammengefaßt werden (siehe Abbildung 2). Über 90 Prozent aller

Krebspatienten sterben nicht am Primärtumor, sondern an Ansiedelungen in anderen Organen. Diese Aussaat ist nicht selbstverständlich, nur jede millionste Tumorzelle überlebt die Wanderschaft durch den Körper (Fidler and Hart 1982). Sie muß in einem vielstufigen Prozess so transformiert sein, dass sie die Turbulenzen des Blutstroms, die Immunantwort des Körpers und viele weitere Hindernisse überwinden kann (Fidler and Ellis 1994). Verschiedenste Prozesse spielen hierbei eine Rolle: So sind beispielsweise Metalloproteasen (MMP's) behilflich bei der Loslösung vom Primärtumor, eine verminderte Expression von Cadherinen erhöht die Motilität der Krebszellen, die Überexpression bestimmter Integrine helfen bei der Anheftung im Zielgebiet. Ebenso spielt die Fähigkeit zur Angiogenese erneut eine Rolle (Liotta and Stetler-Stevenson 1991, Fidler and Ellis 1994, Kohn and Liotta 1995, Steeg 2003, Duffy, McGowan et al. 2008).

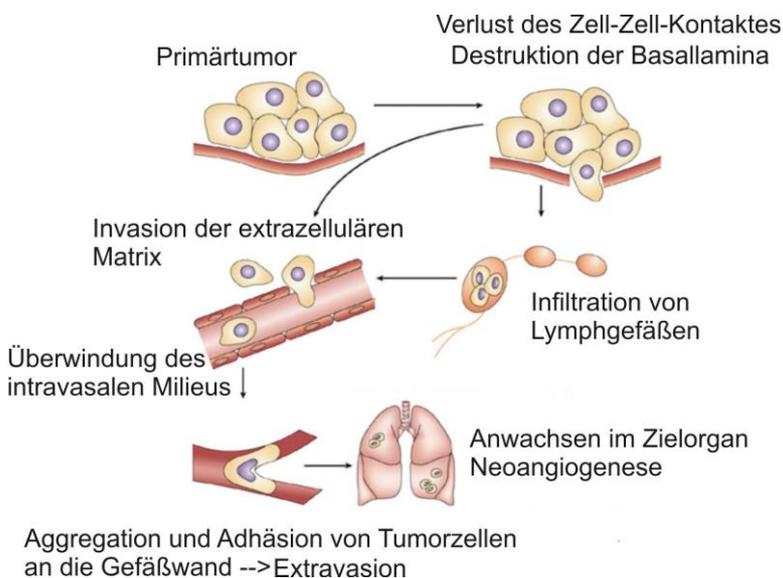


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses (Steeg 2003)

Ein weiteres grundlegendes Markenzeichen von Krebszellen ist ihr instabiles Genom (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Die Anhäufung verschiedener Mutationen, die ursächlich für die Transformation einer gesunden Zelle zur Krebszelle sind, ohne Fehler im zelleigenen Reparatursystem nicht denkbar. Das Protein P53, welches auch als „Wächter des Genoms“ (Lane 1992) beschrieben wird, spielt eine zentrale Rolle im DNS-Reparaturapparat und ist in nahezu allen Krebszellen in irgendeiner Art und Weise mutiert oder in seiner Funktion gestört (Levine 1997).

Weitere Markenzeichen von Krebszellen wurden in der neueren Zeit diskutiert und bestätigt. Das körpereigene Immunsystem spielt in der Krebsentwicklung eine besondere Rolle. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Fehler in der Entwicklung von CD8+ T-

Lymphozyten, CD4+ T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen die Entwicklung von Tumoren fördern (Teng, Swann et al. 2008). Dem Mikromilieu, in dem sich die Krebszelle befindet (Qian and Pollard 2010), gilt in vielen Arbeiten ebenso erhöhte Aufmerksamkeit wie dem Energiebedarf der Krebszelle und den Mechanismen zu dessen Deckung (Jones and Thompson 2009).

1.3 Strategien für die Krebstherapie

Aufgrund der unter Punkt 1.2 genannten Charakteristika und der daraus resultierenden Vorstellung über die Entstehung und Ausbreitung von Krebs ergeben sich folgende prinzipielle Ansatzpunkte für eine medikamentöse Therapie:

Erstens die Hemmung des Wachstums oder die völlige Zerstörung von Tumorzellen durch zelltoxische Substanzen (z. B. Störung der DNA-Synthese, der DNA-Struktur oder der Proteine der Zellteilung → zytostatische-/Chemotherapien). Weiterhin ist es möglich, die bei Krebs außer Kontrolle geratenen molekularen Mechanismen der Proliferation oder der Apoptose gezielt zu beeinflussen. Zudem kann drittens die für die Tumorentwicklung essenzielle Angiogenese gehemmt und invasives Wachstum sowie die Metastasierung unterdrückt werden. Parallel dazu kann die Stärkung bzw. die Wiederherstellung der Immunabwehr mit medikamentösen Therapien gefördert werden. Ein weiterer Ansatz ist die Hormontherapie, worunter die Wachstumshemmung hormonabhängiger Tumore durch Blockade der Hormonwirkung zu verstehen ist. Diese Therapieform spielt oft eine Rolle bei der Behandlung geschlechterspezifischer Tumore, wie zum Beispiel bei hormonabhängig wachsenden Prostatakarzinomen beziehungsweise Mammakarzinomen.

1.3.1. Chemotherapie

Der Kampf gegen Krebs mittels medikamentöser Therapie begann 1942, als Louis Goodman und Alfred Gilman eine chemische Substanz (Bis(2-chlorethyl)sulfid), welche im Ersten Weltkrieg als biologischer Kampfstoff (Senfgas) eingesetzt wurde, zur Behandlung des fortgeschrittenen non-Hodgkins-Lymphom mit Erfolg einsetzten (Gilman 1963). Bei der Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen machte man sich die schnelle Teilungsfähigkeit von Tumorzellen zunutze, indem die eingesetzten Substanzen genau da ansetzten: Tumorzellen reagieren empfindlicher als gesunde Zellen auf Störungen der Zellteilung. Da auch gesunde Zellen mit ähnlich guter Teilungsfähigkeit auf die Chemotherapeutika reagieren, ist diese Therapieform reich an Nebenwirkungen. Nach den Arbeiten von Gilman und

Goodman wurden weitere alkylierende Wirkstoffe wie zum Beispiel Cyclophosphamid, Ifosfamid und die Platinverbindungen Cisplatin oder Carboplatin eingesetzt (Chabner and Roberts 2005). Die Gruppe der Zytostatika umfasst viele sehr unterschiedliche Wirkstoffe, die sich gliedern in Antibiotika (z.B. Doxorubicin), Mitosehemmstoffe (z.B. Paclitaxol und Docetaxel), Topoisomerase-Hemmstoffe (z.B. Etoposid) und in die Gruppe der Antimetabolite.

Antimetabolite sind Substanzen, welche die natürlichen Stoffwechselbausteine in den Krebszellen verdrängen und ersetzen. Die Folge sind Fehlfunktionen und Blockaden von Enzymen welche für die Krebszelle lebensnotwendig sind. Zu den Antimetaboliten zählen beispielsweise Methotrexat (Hall 1980) und Fluorouracil sowie die beiden zur Wirkstoffgruppe der Antagonisten von Purin- und Pyrimidin-Basen gehörigen Substanzen Capecitabin und Gemcitabin. Fluorouracil und Capecitabin dienen der Behandlung von Dick- und Enddarmkrebs, Brustkrebs und Tumoren an der Speiseröhre, der Leber, dem Kopf, Hals und der Harnblase (Hofheinz, Wenz et al. 2012). Gemcitabin wird vor allem bei Krebs der Bauchspeicheldrüse angewendet (Plunkett, Huang et al. 1995).

1.3.2 Gezielte Krebstherapie

Aufgrund der oft erheblichen Nebenwirkungen konventioneller Chemotherapien, bedingt durch ihre globalen und ungezielten Wirkmechanismen, und dank eines heute besseren Verständnisses molekularer Mechanismen der Krebserkrankung, versuchen Forscher gezieltere Krebstherapien zu entwickeln. Eine Form dieser Therapie bedient sich inhibierender Antikörper. Eine weitere nutzt niedermolekulare Wirkstoffe, die sogenannten „small molecule inhibitors“, die im nächsten Unterkapitel ausführlicher dargestellt werden. Therapeutika, die mit der Endung „mab“ versehen sind, deuten auf eine antikörperbasierte Behandlung hin. Die erste rationale zielgerichtete Krebstherapie basierte auf einem Medikament mit dem Handelsnamen Herceptin. Dessen Wirkstoff Trastuzumab, welcher den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/NEU inhibiert (Hudziak, Lewis et al. 1989), ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der 1998 in den USA erstmalig zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs bei Patientinnen mit einer HER2/NEU Überexpression zugelassen wurde (Shawver, Slamon et al. 2002).

1.3.2.1. „Small molecule inhibitors“

„Small molecules inhibitors“ sind organische Moleküle, die eine Größe von 800 Dalton nicht überschreiten. Durch ihre geringe Größe sind sie in der Lage, durch die Zellmembranen zu diffundieren, um in der Zelle ihre Wirkung zu entfalten. Bedingt durch ihre gute Bioverfügbarkeit eignen sich diese, mit der Endung „nib“ versehenen Therapeutika auch für eine orale Einnahme. Diese „small molecule inhibitors“ (SMI) sind in der Lage, die Zellsignalkaskaden zu modulieren – entweder durch eine allosterische Hemmung ihrer Zielmoleküle, Beispiel hierfür ist der als Arq197 bezeichnete c-Met Inhibitor (Adjei, Schwartz et al. 2011), oder durch eine Bindung an die ATP bindende aktivierende Domäne (Holland, Pan et al. 2010).

Imatinib (Gleevec) ist der erste von der „Food and Drug Administration (FDA)“ zugelassene SMI für die Behandlung von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) oder fortgeschrittenem gastrointestinalem Stroma Tumor (GIST) (Deininger, Buchdunger et al. 2005). Dieses Medikament war 2010 mit einem weltweiten Umsatz von 4,3 Milliarden US Dollar auf Platz vier der umsatzstärksten Krebsmedikamente (Handelsblatt 2011). Neben den SMI's, welche gezielt entwickelt wurden, um nur ein (Erlotinib) oder zwei (Lapatinib) Zielmoleküle zu inhibieren, werden auch Multikinaseinhibitoren wie Sunitinib oder Sorafinib erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt (Chow and Eckhardt 2007, Czubanka, Vinci et al. 2009).

1.4 Kontrolle der Signalübertragung durch Kinasen

Proteine können durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert beziehungsweise deaktiviert werden, hierbei werden Phosphatgruppen von ATP auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin übertragen. Proteine, die diese Phosphatgruppenübertragung katalysieren, sogenannte Protein-Kinasen, stellen eine der größten Familien im humanen Genom dar und spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion (Kostich, English et al. 2002). Nach vollständiger Sequenzierung des humanen Genoms wurden 518 für Kinasen kodierende Gene publiziert (Manning, Whyte et al. 2002). Aufgrund der Ähnlichkeiten in den Kinasedomänen können diese Proteine in Stammbäumen dargestellt werden. Häufig ähneln sich Vertreter einzelner Kinase-Familien nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sondern besitzen auch ähnliche funktionelle Eigenschaften (Plowman, Sudarsanam et al. 1999). Diese Arbeit befasst sich mit zwei Zweigen und den darin gruppierten Proteinkinasen (Abbildung 3).

Eine große Gruppe im Stammbaum der Protein-Kinasen lässt sich unter dem Begriff der CMGC-Kinasen zusammenfassen (Hunter und Plowman 1997). Die **C**DK,- **M**APK,- **G**SK3,- und **C**LK-Proteine lassen sich wiederum in weitere Untergruppen einteilen. Ein Teil der unter dem Namen HIPKinasen zusammengefassten Proteine (Engelhardt, Boutell et al. 2003) (Abbildung 3) bildet die **D**ual specificity **t**yrosine **R**egulated **K**inases (DYRK's) (Miyata and Nishida 1999), welche das Thema des ersten Teiles dieser Arbeit ist. Die Tyrosinkinase bilden eine weitere Gruppe der Kinasen, welche sich in nicht membrangebundene und membrangebundene Tyrosinkinase unterteilen lassen. Mit zwei Proteinen aus der Gruppe dieser Rezeptortyrosinkinase wird sich schließlich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befassen.

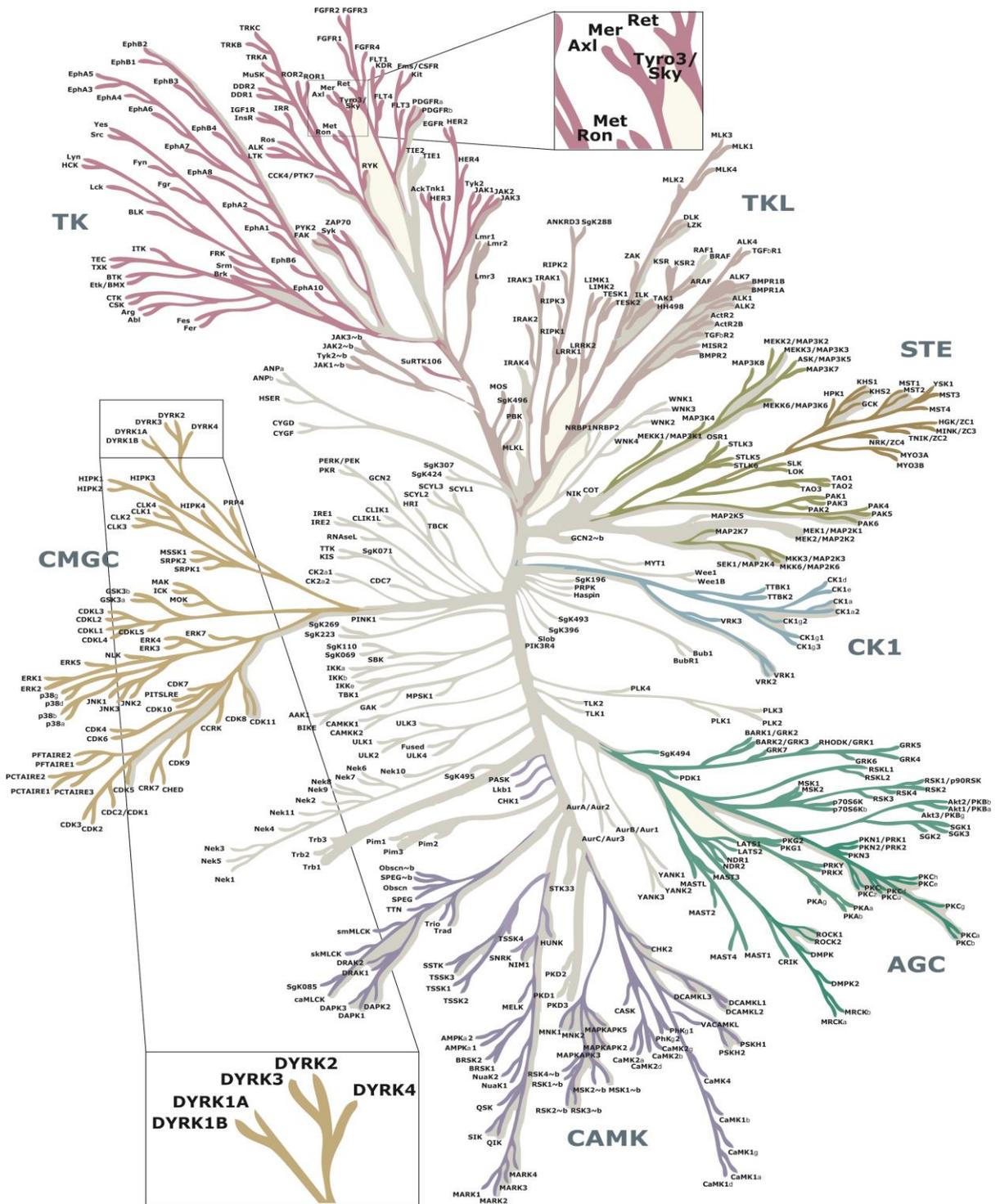


Abbildung 3: Zusammenfassung der im humanen Genom beschriebenen Proteinkinasen. Innerhalb der CMGC-Gruppe sind die DYRK-Kinasen vergrößert dargestellt und aus dem Bereich der Tyrosinkinasen ist ein Ausschnitt vergrößert dargestellt, welcher die in der Arbeit behandelten membranständigen Rezeptortyrosinkinasen visualisiert (verändert nach Manning 2002)

1.4.1 Die Bedeutung der DYRK homologen Proteine in Prokaryonten und niederen Eukaryonten

Zu den in Säugetieren beschriebenen DYRK Kinasen existieren homologe Proteine. In dem Prokaryont *Bacillus anthracis* ist eine DYRK ähnliche Kinase (PRKD) beschrieben, welche nach Autophosphorylierung an einem Tyrosinrest eine Pyruvatkinase an Ser/Threonin phosphoryliert (Arora, Sajid et al. 2012). DYRK Kinasen finden sich auch in niederen Eukaryonten: So ist in *Saccharomyces cerevisiae* ein Protein namens YAK1P beschrieben, des Weiteren findet sich in *Schizosaccharomyces pombe* ein als POM1P bezeichnetes Protein. YAK1P moduliert die Proliferation unter limitiertem Nahrungsangebot, indem YAK1P im Ras/cAMP Signalweg eine inhibierende Funktion hat (Garrett and Broach 1989). In der Rapamycin (TOR) Signalkaskade wird YAK1P von der Protein Kinase A aktiviert. Die aktivierte Proteinkinase A phosphoryliert ihrerseits den Transkriptionsfaktor CRF, welcher dann im Komplex mit dem FHL1 Protein an den Promotor des ribosomalen Proteins bindet und dessen Expression somit inhibiert (Martin, Soulard et al. 2004). POM1P spielt eine Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums und der Zellteilung (Bahler and Pringle 1998, Bahler and Nurse 2001), indem die Kinase indirekt den Übergang zwischen G2 und M Phase des Zellzyklus reguliert (Martin and Berthelot-Grosjean 2009, Moseley, Mayeux et al. 2009). Interessanterweise ist bei beiden Kinasen die Lokalisation in der Zelle der Schlüssel zu ihrer jeweiligen Funktion (Moriya, Shimizu-Yoshida et al. 2001, Tatebe, Nakano et al. 2008). Ein homologes in *Dictyostelium discoideum* namens YAK A hat ähnliche Funktionen wie YAK1P in *Saccharomyces cerevisiae*. YAK A ist ein Regulator der Wachstumsrate und des Zellüberlebens und wird als Reaktion auf zelluläre Stresssituationen produziert und ausgeschüttet (Taminato, Bagattini et al. 2002).

1.4.1.1. Die Bedeutung der DYRK Familie in mehrzelligen Organismen

Zwei DYRK-Kinasen, die mit Minibrain Homologen 1 (Klasse 1) und 2 (Klasse 2) (MBK1 und MBK2) bezeichnet werden, sind aus den Nematoden *Caenorhabditis elegans* bekannt. Die Deletionsmutanten von *Mbk1* in *C. elegans* zeigen keine morphologischen Veränderungen, allerdings führt die Überexpression von *Mbk1* zu Verhaltensstörungen bezüglich der Chemotaxis. Die Deletionsmutante des *Mbk2* Gens ist letal (Raich, Moorman et al. 2003). Das Produkt des *Mbk2* Gens ist ein Regulator des Zellzyklus während des Übergangs von der Oozyte zur Zygote und ist damit relevant in der embryonalen Entwicklung (Cheng, Klancer et

al. 2009). In MKB2 Mutanten wird die erste mitotische Teilung des Embryos gestört, da der dafür notwendige Spindelapparat nicht korrekt platziert wird (Pang, Ishidate et al. 2004). Des Weiteren ist beschrieben, dass das MKB2-eigene autophosphorylierte Tyrosin von einer Pseudophosphatase gebunden werden kann und somit die Fähigkeit von MKB2, ihre Substrate zu phosphorylieren, inhibiert (Tonks 2009).

In *Drosophila melanogaster* sind drei Homologe der DYRK-Kinasen beschrieben. Das Produkt des Minibrain Gens (*Mnb*) spielt eine Rolle in der postembryonalen Neurogenese. Beeinträchtigungen in der Funktion von MNB führen zu einer verminderten Gehirngröße und damit einer reduzierten Anzahl von Neuronen, was zu unnormalem Lernverhalten, Störungen im Erinnerungsvermögen und der Wahrnehmung visueller und olfaktorischer Reize führt (Tejedor, Zhu et al. 1995). *DDYRK2* zeigt die größten Homologien mit den *DYRK4* Genen von Säugetieren und ist in allen Entwicklungsphasen der schwarzbäuchigen Taufliege aktiv, wobei die höchsten Expressionsraten während der Embryogenese und der Verpuppung zu messen sind (Lochhead, Sibbet et al. 2003). *DDYRK3* wurde im Zusammenhang mit der Regulation des Transkriptionsfaktors NFAT beschrieben (Gwack, Sharma et al. 2006).

In *Danio rerio*, dem Zebrafisch, ist ein Homolog des *DYRK1B* Gens bekannt, dessen Produkt Einfluss auf die endodermale Formation und die kraniofaziale Entwicklung während der frühen Embryogenese hat (Mazmanian, Kovshilovsky et al. 2010).

1.4.2 Die Funktion und Regulierung der DYRK-Kinasen in Säugetieren

Im Säugetier sind fünf DYRK Kinasen beschrieben. Die Analyse der Genstruktur lässt vermuten, dass alle Familienmitglieder durch Genduplikation in der späteren Periode der Metazoenentwicklung entstanden sind (Aranda, Laguna et al. 2011). Ein wichtiger Indikator für die Funktion eines Proteins innerhalb einer Zelle ist seine Lokalisation. Aus diesem Grund ist eine Einteilung in Kern-lokalisierte und zytosolische DYRK-Proteine sinnvoll (Lochhead, Sibbet et al. 2003). *DYRK1A* und *DYRK1B* tragen eine Kernlokalisationssequenz und das PEST Motiv im N-Terminus, während die drei verbleibenden DYRK-Proteine keine klassische Kernlokalisationssequenz zeigen (Becker, Weber et al. 1998). Mitglieder der DYRK-Familie tragen eine als NAPA Domäne bezeichnete Region, welche essenziell für die katalytische Aktivität ist, weil sie die für die Funktion notwendige Autophosphorylierung erst ermöglicht. (Han, Miranda-Saavedra et al. 2012). Die NAPA Domäne ist auch in anderen Eukaryonten konserviert, hat eine chaperonähnliche Funktion und könnte eine ursprüngliche Entwicklung zur Aktivierung von Kinasen sein (Kinstrie, Luebbering et al. 2010).

DYRK1A ist eine Arginin-abhängige Serin/Threoninkinase, welche die Motive Rx(S/T)P oder Rxx(S/T)P phosphoryliert (Himpel, Tegge et al. 2000). Die anderen DYRK's zeigen *in vivo* ähnliche Spezifität bezüglich ihrer Primärsequenz, wobei ein Arginin in Position -2 bzw -3 bedeutend ist, während das Prolin an Position +1 durch Valin ausgetauscht werden kann (Kassis, Melhuish et al. 2000, Moriya, Shimizu-Yoshida et al. 2001, Woods, Cohen et al. 2001, Campbell and Proud 2002).

DYRK Kinasen unterscheiden sich nur bedingt in ihrer Substratspezifität, es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass DYRK1A und DYRK2 den Translations-Initiationsfaktor EIF2B, das Mikrotubuli assoziierte Protein TAU sowie STAT3 phosphorylieren können (Matsuo, Ochiai et al. 2001, Woods, Cohen et al. 2001)

Um Funktionsunterschiede zwischen den DYRK-Kinasen zu erzeugen, muss die gezielte Phosphorylierung von bestimmten Substraten durch andere Mechanismen sichergestellt werden. Spezifität kann hier durch Unterschiede in der Gewebsverteilung ihrer Expression, durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung, durch Inaktivierung über Phosphatasen oder andere bisher noch nicht bekannte Mechanismen entstehen.

1.4.2.1. Die Funktion von DYRK1A und DYRK1B

DYRK1A ist das am häufigsten untersuchte Mitglied der DYRK-Familie. Die homozygote Deletion von *DYRK1A* in Mäusen ist letal, heterozygote *DYRK 1A*^{+/-} Mäuse wiesen eine verringerte Anzahl von Neuronen in einer bestimmten Hirnregion auf (Fotaki, Dierssen et al. 2002). Transgene Mäuse, welche eine zusätzliche Kopie von DYRK1A tragen, zeigen Lern- und Gedächtnis-Defekte (Smith, Stevens et al. 1997). Die cDNS gesteuerte Überexpression von *DYRK1A* äußert sich in einer verlangsamten neuromotorischen Entwicklung sowie in kognitiven Defekten (Altafaj, Dierssen et al. 2001). DYRK1A scheint eine ähnliche Rolle bei regulatorischen Prozessen zu spielen wie MNB (*D. melanogaster*) und MBK1 in *C.elegans* (Tejedor, Zhu et al. 1995, Raich, Moorman et al. 2003).

Beim Menschen steht DYRK1A im Verdacht, die Ursache für geistige Fehlentwicklungen beim Downsyndrom zu sein (Guimera, Casas et al. 1996). Die für das Syndrom kritische Region liegt auf dem Chromosom 21, hier ist auch das *DYRK1A* Gen lokalisiert (Kentrup, Becker et al. 1996, Shindoh, Kudoh et al. 1996, Song, Sternberg et al. 1996). Eine 2004 durchgeführte Analyse der Gewebsverteilung von DYRK1A ergab hier eine zelltyp- und gehirnstrukturabhängige Expression und Verteilung dieser Kinase. In Gehirnen von Downsyndrom-Patienten ist DYRK1A überexprimiert (Wegiel, Kuchna et al. 2004), allerdings

ist der molekulare Mechanismus hinter dem DYRK1A Phänotyps noch nicht verstanden. Mehr als 40 Bindungspartner von DYRK1A sind beschrieben (Aranda, Laguna et al. 2011), neben Histon H3 (Himpel, Tegge et al. 2000), NFAT (Gwack, Sharma et al. 2006), Cyclin D (de Graaf, Hekerman et al. 2004) und der Glykogen-Synthase (Skurat and Dietrich 2004) finden sich auch Gene, die klassisch im Zusammenhang mit Krebs genannt werden, wie P53, B-RAF und RAS (Kelly and Rahmani 2005).

Für DYRK1B, auch MIRK genannt, sind 14 Bindungspartner beschrieben, unter Anderem die von DYRK1A bekannten Zielmoleküle Histon H3, Cyclin D und die Glykogensynthase (Aranda, Laguna et al. 2011). Innerhalb der katalytischen Domäne sind DYRK1A und DYRK1B zu 85 Prozent identisch, allerdings zeigen beide Enzyme in ihrem 500 Aminosäuren umfassenden C-Terminus keine Ähnlichkeiten. Das MRNS-*Splicing* erzeugt zwei Isoformen, welche gewebspezifisch exprimiert werden und sich in ihrer katalytischen Aktivität unterscheiden (Leder, Czajkowska et al. 2003). Die Transkription von DYRK1B wird in Skelettmuskelzellen, verglichen mit anderen Geweben, überexprimiert und während der Muskelzellendifferenzierung durch RHO induziert (Lee, Deng et al. 2000). Die Muskelfaserzelllinie C2C12 ist ein Modellsystem, um die Muskeldifferenzierung zu studieren. Hier stabilisiert MIRK den für die Differenzierung essenziellen G0/G1 Arrest. Dies erfolgt durch die Stabilisierung von CDKN1B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B/P27*) und die Destabilisierung von Cyclin D (Mercer, Ewton et al. 2005). Ebenso phosphoryliert MIRK P21 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) und wirkt somit antiapoptotisch (Asada, Yamada et al. 1999). Im Kontrast dazu ist MIRK auch in Verbindung mit Krebs publiziert. So ist MIRK in 10-20 Prozent der Fälle von Bauchspeicheldrüsenkrebs und in 30 Prozent der untersuchten Eierstockkrebsfälle überexprimiert, ebenso findet sich die Überexpression im kleinzelligen und nicht kleinzelligen Lungenkrebs (Karhu, Mahlamaki et al. 2006, Moniaux, Nemos et al. 2006). In fünf Bauchspeicheldrüsenkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass nach RNSi induzierter Herabregulation der Genexpression die Zellen nicht mehr in der Lage waren, in der G0 Phase zu verweilen (Ewton, Hu et al. 2011). Die Funktion von MIRK scheint in Verbindung mit der zellulären Stressantwort zu stehen (Deng, Ewton et al. 2006): So beginnen Darmkrebszelllinien, welche MIRK stabil überexprimieren, unter serumfreien Medium verstärkt zu proliferieren (Lee, Deng et al. 2000).

1.4.2.2. Die Funktion von DYRK3 und DYRK4

DYRK3, ein weiterer Vertreter der DYRK-Proteine, der auch unter dem Namen REDK (*Regulatory Erythroid Kinase*) beschrieben ist, wird in fötaler Leber, Knochenmark und Hoden exprimiert (Becker, Weber et al. 1998, Lord, Creasy et al. 2000). DYRK3 spielt eine bedeutende Rolle in einem frühen Entwicklungsstadium von Erythrozyten. Knochenmarkszellen reagieren auf die Stimulation mit Erythropoetin (EPO) und Stammzellfaktor (SCF) mit einer Zunahme der DYRK3 mRNA (Lord, Creasy et al. 2000). Eine siRNA induzierte Reduktion der DYRK3 mRNA führt zur vermehrten Proliferation der erythroiden Vorläufer, wobei dieser Prozess unabhängig von der EPO Konzentration ist (Geiger, Knudsen et al. 2001).

Es existieren nur zwei Publikationen über DYRK4. Die erste beschäftigt sich mit dem Einfluss dieser dualen Kinase auf die Spermatogenese und ihrer Lokalisation im Zytoplasma (Sacher, Moller et al. 2007). Papadopoulos und Kollegen wiederum arbeiten an der gewebespezifischen Expression der zwei, durch mRNA-Splicing entstandenen DYRK4 Isoformen. Die längere Isoform findet sich in der Lunge, im Plazenta- und Nierengewebe sowie in Hoden und dem fötalen Gehirn, während die kurze Isoform ausschließlich in den Hoden exprimiert ist (Papadopoulos, Arato et al. 2011).

1.4.2.3 Expression und Bedeutung von DYRK2

Das *DYRK2* Gen liegt auf dem Chromosom 12 im Locus 12q14. Ausgehend von einer 6159 bp großen mRNA werden zwei verschiedene Isoformen mit 528 beziehungsweise 601 Aminosäuren durch alternatives „Splicing“ gebildet.

DYRK2 ist amplifiziert und überexprimiert in Speiseröhrenkrebs, Barrettkarzinom, Lungenadenokarzinomen und Magenkrebs (Miller, Aggarwal et al. 2003, Miller, Moy et al. 2003, Gorringer, Boussioutas et al. 2005). In gastrointestinalen Stroma Tumoren (GIST) konnte eine leichte Überexpression von *DYRK2* gezeigt werden (Koon, Schneider-Stock et al. 2004). Die Expression von *DYRK2* könnte sich auch als prognostischer Marker in Lungenadenokarzinoma und kleinzelligem Lungenkrebs eignen (Yamashita, Chujo et al. 2009, Yamashita, Chujo et al. 2009).

Alle dahingehend untersuchten DYRK-Kinasen besitzen die Fähigkeit zur Autophosphorylierung an einem Tyrosinrest, phosphorylieren aber ihre Substrate nur an Serin/Threonin. Es existiert eine umfassende Arbeit über den Mechanismus der

Autophosphorylierung in MNB und dDYRK2 (Lochhead, Sibbet et al. 2005). In dDYRK2 (*D.melangogaster*) sowie im humanen DYRK2 liegt ein Motiv mit der Aminosäureabfolge YTYIQSR in der essenziellen Aktivierungsschleife. Hier sinkt die Kinaseaktivität auf 10 Prozent im Vergleich zum Wildtyp, wenn das zweite Tyrosin (Position 358 in *D.melangogaster*) zu einem Phenylalanin mutiert wird. Nur während der Translation findet die Autophosphorylierung durch ein DYRK2 Intermediat statt, das Volllängenprotein ist nicht in der Lage, sich selbst zu phosphorylieren (Lochhead, Sibbet et al. 2005). In der Literatur sind verschiedene Funktionen von DYRK2 beschrieben: erstens der Einfluss von DYRK2 auf die P53 induzierte Apoptose nach DNS-Schäden und zweitens der Einfluss auf den Zellzyklus durch Regulation der Proteinstabilität. Obwohl nur 51 Publikationen in der NCBI-Datenbank gefunden werden konnten, in denen DYRK2 im Abstrakt genannt wird, sind doch einige Zielmoleküle dieser Kinase bekannt, deren bedeutendste in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

Protein	Funktion	Publikation
DDB1	DNS Reparatur	(Maddika and Chen 2009)
EDD/UBR5	E3 Ligase Komplex	(Maddika and Chen 2009)
DCAF1	E3 Ligase Komplex	(Maddika and Chen 2009)
Katanin p60	Mikrotubulidynamik	(Maddika and Chen 2009)
EIF2B	Protein Synthese	(Woods, Cohen et al. 2001)
TAU	Mikrotubulidynamik	(Woods, Cohen et al. 2001)
CRMP4	Mikrotubulidynamik	(Cole, Causeret et al. 2006)
Glykogen Synthase	Metabolismus	(Woods, Cohen et al. 2001)
GLI2/GLI3	Transkriptionsfaktor	(Varjosalo, Bjorklund et al. 2008)
NFATc2/NFAT1	Transkriptionsfaktor	(Gwack, Feske et al. 2007)
MDM2	Inhibition von P53	(Taira, Yamamoto et al. 2010)
P53	Regulation des Zellzyklus	(Taira, Nihira et al. 2007)
c-MYC/c-JUN	Regulation des Zellzyklus	(Taira, Mimoto et al. 2012)

DYRK2 induziert die P53 kontrollierte Apoptose nach DNA Schäden

Unter normalen Bedingungen liegt DYRK2 entweder stabil im Zytoplasma vor oder im Zellkern, wo es von MDM2 ubiquitinyliert und somit abgebaut wird (Taira, Yamamoto et al. 2010). Nach der Induktion von DNA-Schäden durch UV-Licht, Adriamycin oder Etoposid ist DYRK2 allerdings in der Lage, P53 an Ser 46 zu phosphorylieren und damit eine Signalkaskade in Gang zu setzen, welche zum gezielten Absterben der Zelle führt (Taira, Nihira et al. 2007). Wird die DNA irreparabel geschädigt, phosphoryliert die Serin-Threoninkinase ATM DYRK2 an Thr33 und Serin 369. Aufgrund dieser Phosphorylierung entgeht DYRK2 der Markierung durch MDM2 und wird somit im Kern stabilisiert. DYRK2

phosphoryliert nun seinerseits P53 an Ser46 und induziert Apoptose (Taira, Yamamoto et al. 2010).

Die Abwesenheit von DYRK2 fördert den Übergang von der G1 zu S Phase

Eine weitere Publikation beleuchtet die Fähigkeit von DYRK2, die Zellzyklusregulatoren C-MYC und C-JUN an Ser62 beziehungsweise Ser243 zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung macht eine Markierung durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) möglich. Die Expressionen von C-MYC und C-JUN sind notwendigerweise stark reguliert (Taira, Mimoto et al. 2012). Wird eine Zelle, die sich in der G1 Phase des Zellzyklus befindet, stimuliert, erhöht sich die Menge an funktionsfähigem C-MYC/C-JUN. Diese beiden Proteine akkumulieren und leiten damit den Übergang von der G1 in die S Phase ein, die Zelle beginnt zu proliferieren. Unter normalen Bedingungen fördert DYRK2 den Abbau dieser Proteine und somit den Verbleib der Zelle in der Ruhephase, indem es C-MYC und C-JUN für die Degradation durch die GSK3 induzierte Ubiquitinulierung markiert. Eine siRNS induzierte Reduktion von DYRK2 führt über die Akkumulation von C-MYC und C-JUN zu stark erhöhter Proliferation (Taira, Mimoto et al. 2012).

Maddika und Kollegen untersuchten die Funktion von DYRK2 bei der Zusammensetzung des E3 Ligasekomplexes und dessen Rolle beim Übergang von der G2 zu M Phase (Maddika and Chen 2009). In diesem Teil des Zellzyklus hat DYRK2 im Widerspruch zu den von Taira et al. publizierten Ergebnissen eine positive Rolle auf das Fortschreiten des Zellzyklus. Ebenfalls ist DYRK2 ein Negativregulator der NFAT Aktivität. Durch DYRK2 phosphoryliertes NFAT ist im Zytoplasma lokalisiert und kann so seiner Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr nachkommen (Gwack, Sharma et al. 2006). Dephosphoryliertes NFAT ist im Zellkern von T-Lymphozyten zu finden, hier bindet es an den Promoter von Interleukin 2 und hat einen expressionssteigernden Effekt. Interleukin 2 bindet an den Interleukin 2 Rezeptor und aktiviert den T-Lymphozyten, der aufgrund dessen zu proliferieren beginnt.

Reimar Abraham fand in seiner Arbeit, mit gegen das Chemotherapeutikum Gemcitabine resistenten Blasenkrebszelllinien, eine zweifach erhöhte Expression von DYRK2 auf mRNA Ebene. Zusätzlich konnte er zeigen, dass sich der wachstumsinhibitorische Effekt von Gemcitabine in MCF7 und T24 Zellen nach der Behandlung mit einer gegen *DYRK2* gerichteten siRNS erhöht (Daten noch nicht veröffentlicht).

1.5 Rezeptortyrosinkinasen

Die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bilden eine Familie mit 58 verschiedenen Rezeptortypen, welche in 20 Untergruppen eingeteilt sind (Robinson, Wu et al. 2000). Drei miteinander verbundene Domänen bilden die RTK. Eine extrazelluläre Domäne ist durch eine membrandurchspannende Helix mit dem intrazellulären, enzymatisch aktiven Teil, der Rezeptortyrosinkinase, verbunden (Hubbard and Till 2000). Die extrazelluläre Domäne ist in der Lage, ein lösliches Polypeptid, auch als Ligand bezeichnet, spezifisch zu binden und besteht häufig aus Immunglobulin-ähnlichen Domänen, Fibronectin Typ3 Domänen, cysteinreichen Domänen oder EGF-ähnlichen Strukturen. Der Rezeptor liegt im inaktiven Zustand häufig als Monomer vor und bildet nach Ligandenbindung ein Dimer. Der cytoplasmatische Teil der RTK ist einfacher aufgebaut und besteht aus einem Juxtamembranbereich, gefolgt von der katalytischen Einheit und einem Carboxyterminus (Hubbard and Miller 2007). In der katalytischen Einheit befindet sich eine für die Phosphorylierung essenzielle ATP-Bindestelle, die in der intrazellulären Domäne hochkonserviert ist. Der Wirkmechanismus der RTK ist gekennzeichnet durch eine reversible Phosphorylierung von phenolischen Hydroxylgruppen an Tyrosinresten. Die Dephosphorylierung wiederum erfolgt durch Proteintyrosinphosphatasen: Somit ist es der Zelle möglich, diese Form von Signaltransduktion sehr genau zu kontrollieren (Stoker 2005). Die Aktivierung von RTK's besteht üblicherweise aus zwei Prozessen. Die Signalübertragung wird gesteuert über die Bindung des jeweiligen Liganden an den Rezeptor. Die somit induzierte ligandengesteuerte Konformationsänderung führt in den meisten Fällen zu einer Dimerisierung zweier Rezeptormonomere, wodurch die Transphosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste ermöglicht wird. Nach dieser Autophosphorylierung findet eine weitere Konformationsänderung statt, die der katalytischen Domäne die Möglichkeit bietet, weitere Substratmoleküle zu phosphorylieren (Lemmon and Schlessinger 1994). Weiterhin führt die Bindung zytosolischer Proteine an tyrosinphosphorylierte Proteinmotive oftmals zur Steuerung intrazellulärer Signalkaskaden (Songyang, Shoelson et al. 1993). Es sind auch ligandenunabhängige Aktivierungen von RTK's beschrieben (Daub, Weiss et al. 1996). Das transformierende Potenzial von falsch regulierten RTK's ist vielfältig (Porter and Vaillancourt 1998) und mit vielen Beispielen belegt. Häufig sind die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR) in Brusttumoren überexprimiert und eignen sich als Ansatz für eine Anti-Krebs-Therapie (Wallasch, Weiss et al. 1995, Zwick, Bange et al. 2001). Beispielhaft ist auch der AXL-Rezeptor, dessen transformierendes Potenzial erstmals 1991

beschrieben wurde (O'Bryan, Frye et al. 1991) sowie das Produkt des *C-MET* Gens, der „Hepatocyte Growth Factor Receptor“, dessen Deregulation in Nieren-, Leber-, Lungen-, Magen-, Brust- und Gehirntumoren gezeigt werden konnte (Bottaro, Rubin et al. 1991, Bonine-Summers, Aakre et al. 2007, Lawrence and Salgia 2010).

1.5.1 Die Familie der TAM Rezeptor Tyrosin Kinasen

Unter dem Begriff AXL beziehungsweise TAM Rezeptor Tyrosin Kinasen (Abbildung 4) werden drei RTK's zusammengefasst. **TYRO 3**, **AXL** und **MER** haben die Vitamin K abhängigen Proteine Gas6 und Protein S als Liganden (Varnum, Young et al. 1995). Die extrazelluläre Domäne der TAM Rezeptor Tyrosin Kinasen besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, gefolgt von zwei Fibronectin 3 Domänen (Hafizi and Dahlback 2006). Die beiden Liganden bestehen aus einer „Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxyglutamic“ (Gla) Region, vier epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF)-ähnlichen Bereichen und der rezeptorbindenden Sexualhormon-bindenden Globulin (SHBG)-Domäne.

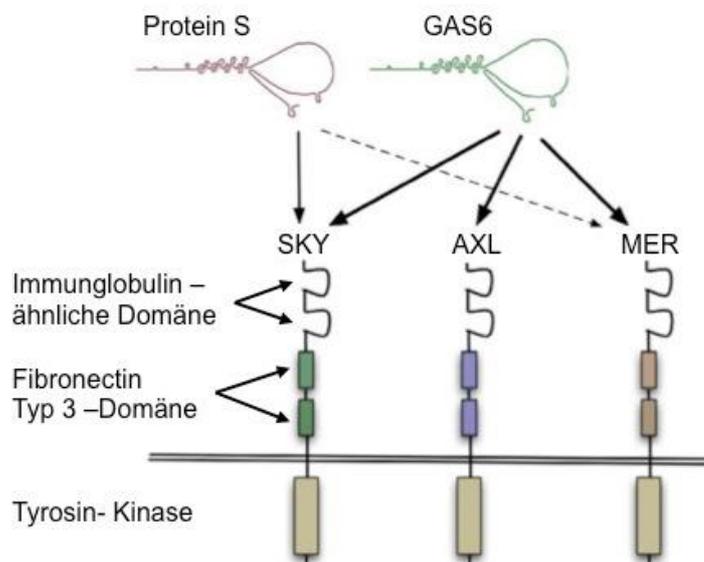


Abbildung 4: Strukturelle Zusammenfassung der AXL Rezeptor Familie (verändert nach (Hafizi and Dahlback 2006)

Die TAM Rezeptor Tyrosin Kinasen werden vorwiegend in dendritischen Zellen, Zellen des Immunsystems und des vaskulären Systems sowie in Zellen des Reproduktionszyklus exprimiert, weiterhin sind sie wichtige Faktoren bei der Aufrechterhaltung der Gewebeshomöostase. AXL Rezeptor Tyrosin Kinase dreifach Knock-out-Mäuse entwickeln systemische Autoimmunerkrankungen aufgrund von fehlerhafter Signaltransduktion in der T-

Zell-Entwicklung (Ye, Han et al. 2011, Ye, Li et al. 2011). Bei *AXL/TYRO3* Knock-out-Mäusen konnten regionale Unterschiede in der Funktion von Gonadoliberin produzierenden Neuronen festgestellt werden, welche mit einer erhöhten Apoptoserate einhergehen (Pierce, Bliesner et al. 2008, Pierce, Xu et al. 2011). Die Stimulation der TAM Rezeptoren inhibiert die Aktivität von Makrophagen und dendritischen Zellen (Lemke and Rothlin 2008), weiterhin blockiert der aktivierte TAM-Rezeptor die Fähigkeit von natürlichen Killerzellen metastasierenden Krebszellen zu vernichten (Paolino, Choidas et al. 2014).

1.5.1.1. Die Rezeptor Tyrosin Kinasen TYRO3 und MER

Die codierende Sequenz für die Rezeptor Tyrosin Kinase TYRO 3 wurde erstmals 1993 beschrieben (Polvi, Armstrong et al. 1993). TYRO 3 ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert und die 4001 Basenpaare mRNS (RefSeq NM_006293) codiert für ein 890 Aminosäure Protein (RefSeq NP_006284). Die RTK TYRO3 wurde unter verschiedenen Namen publiziert: BRT (Fujimoto and Yamamoto 1994), RSE (Mark, Scadden et al. 1994), DTK (Crosier, Hall et al. 1994), TIF (Dai, Pan et al. 1996), SKY (Ohashi, Mizuno et al. 1994). TYRO3 wird vorwiegend im Gehirn exprimiert (Zhao, Li et al. 2012) und spielt eine Rolle bei der Entwicklung und der Funktion des zentralen Nervensystems (Fujimoto and Yamamoto 1994, Ohashi, Mizuno et al. 1994), ist aber auch in Verbindung mit akuter myeloider Leukämie beschrieben (Dai, Pan et al. 1996). Ebenso hat TYRO3 ein transformierendes Potenzial, welches über den Phosphoinositid-3-Kinasen Signalweg induziert wird (Lan, Wu et al. 2000). Die 3632 Basenpaar lange mRNS-Sequenz (RefSeq NM_006343) der RTL MER codiert ein 999 Aminosäure Protein (RefSeq NP_006334) und ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert. Humanes MER wurde 1994 in peripheren Monozyten nachgewiesen (Graham, Dawson et al. 1994) und zeigt große Homologien zum dem aus einem Retrovirus isolierten Proto-Onkogen *c-eyk* (Jia and Hanafusa 1994). In weiteren Studien konnte die Expression von MER in somatischen Zellen des Hodens gezeigt und die Wirkung auf das Überleben dieser Zellen untersucht werden (Chan, Mather et al. 2000). MER spielt auch eine Rolle bei der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen. MER gesteuerte Phagozytose in der Retina (Burstyn-Cohen, Lew et al. 2012) induziert die Reorganisation des Zytoskeletts (Graham, Bowman et al. 1995). Ebenso wesentlich ist es bei der intrinsischen Hemmung der Entzündungsreaktion, die durch eine Toll-like-Rezeptor-Aktivierung ausgelöst wird (Choi, Park et al. 2013). MER ist überexprimiert in Glioblastoma (Wang, Moncayo et al. 2013), wird

in Verbindung mit Leukämie publiziert (Brandao, Migdall-Wilson et al. 2011) und auf die Eignung als Zielmolekül für neue Krebstherapien hin untersucht (Verma, Warner et al. 2011).

1.5.1.2. Die Rezeptor Tyrosin Kinase AXL

1991 wurde die AXL RTK unter dem Namen UFO als eine RTK mit onkogenem Potenzial beschrieben. Bei AXL handelt es sich um ein 894 Aminosäure (RefSeq NP_001690) großes Polypeptid, dessen 4723 Basenpaare lange mRNA (RefSeq NM_001699) auf dem Chromosom 19 lokalisiert ist (Janssen, Schulz et al. 1991). In der intrazellulären Kinase Domäne finden sich drei Tyrosine (Tyr⁷⁷⁹, Tyr⁸²¹, Tyr⁸⁶⁶), die über den Mechanismus der Autophosphorylierung zur Aktivierung beitragen (Korshunov 2012). Die DNS des 140 kDa großen Proteins wurde aus Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie isoliert und induziert überexprimiert die Transformation von NIH3T3 Mausfibroblasten. Der Name des wahrscheinlich glykosyliert vorliegenden AXL stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie „unkontrolliert“. Das AXL Gen ist in den Vertebraten hoch konserviert und wird in Zelllinien mit epithelalem, mesenchyalem und hämatopoetischem Ursprung exprimiert (O'Bryan, Frye et al. 1991). AXL und TYRO3 dienen als Einstiegsfaktoren für den mit dem Ebola- und dem Marburgvirus verwandten Filovirus (Shimojima, Takada et al. 2006). RNS in situ Analysen in Mäusen zeigen AXL Expression in der späten Embryogenese, bei adulten Tieren ist die mRNA in die Organe umhüllenden Zellen und in Zellen von verbindenden Geweben zu finden (Faust, Ebensperger et al. 1992). Die Promotersequenz von AXL ist GC-reich und enthält potenzielle Bindestellen für transaktivierende Faktoren wie die dem speziellen Protein 1 (SP1), dem speziellen Protein 2 (SP2) (Mudduluru and Allgayer 2008) und dem aktivierenden Protein 2 (AP-2), welche eine Rolle in der frühen humanen Entwicklung spielen sowie dem „cAMP response-element-binding protein“, (CREB) (Schulz, Schleithoff et al. 1993), das für die Neusynchronisation der inneren Uhr mit Hilfe von Lichtimpulsen relevant ist (Montminy, Gonzalez et al. 1990).

AXL und sein Ligand GAS6 wird im für den Angiogeneseprozess wichtigen Zelltyp der Pericyten exprimiert (Collett, Wood et al. 2003), weiterhin ist GAS6 über eine Aktivierung der AXL RTK ein Chemoattraktans, das zur Migration von vaskulären glatten Muskelzellen führt. Dieser Zelltyp befindet sich in den Wänden von Blutgefäßen und beeinflusst die lokale Regulation des Blutdrucks, um zum Beispiel auf erhöhten Sauerstoffbedarf zu reagieren (Fridell, Villa et al. 1998). Die AXL-GAS6 Interaktion fördert eine Zell-Zell-Adhäsion während der Angiogeneseprozesse und der embryonalen Entwicklung (McCloskey, Fridell et al. 1997).

1.5.1.3. Mechanismen der AXL induzierten Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der AXL Rezeptor Tyrosin Kinase wird im Normalfall durch eine Bindung mit dem Liganden angestoßen. Es folgt eine Konformationsänderung und die Dimerisierung zweier Rezeptoren (Sasaki, Knyazev et al. 2006). Dies führt zur Stabilisierung der zytoplasmatischen Domänen, es entstehen Bindungsstellen für diverse Signalmoleküle (Hafizi and Dahlback 2006). Auch ligandenunabhängige Aktivierungen (Heiring, Dahlback et al. 2004) sowie konstitutiv aktive Rezeptoren (Hafizi, Alindri et al. 2002) sind beschrieben, wobei ligandenunabhängige Aktivierungen eher pathophysiologischen Ereignissen in Verbindung mit oxidativem Stress zugeordnet werden (Korshunov 2012). Die primären, nachgeschalteten Signaltransduktionswege laufen über den Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Weg (PI3K/AKT) (Shankar, O'Guin et al. 2006) oder über den STAT-Kinase Weg (Lemke and Rothlin 2008). AXL Homomere können auch mit TYRO3 und MER Dimere bilden (Lemke and Rothlin 2008). Die Bindung der AXL extrazellulären Domäne mit einer extrazellulären Domäne eines AXL-Rezeptors auf einer Nachbarzelle ist möglich und führt neben einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege zur Aggregation von Zellen (Bellosta, Costa et al. 1995). Ein weiterer interessanter Mechanismus der AXL Regulation ist das Vorhandensein der extrazellulären Domäne des AXL-Rezeptors, der GAS6 bindet und somit die Menge des Liganden für die Bindung an den vollständigen in der Zellmembran gebundenen Rezeptor limitiert (Korshunov 2012). Die Regulation von AXL ist noch nicht vollständig verstanden, so finden sich keine Genamplifikationen oder somatische Mutationen, die zu einer erhöhten Expression der AXL RTK in Brustkrebs führen können, eventuell kann die Deregulierung der Expression der post-transkriptionellen Ebene zugeschrieben werden. Zwei verschiedene Forschergruppen haben eine microRNS's identifiziert, die AXL mRNA-Transkripte dem Abbau zuführen (Mudduluru, Ceppi et al. 2011). Eine veränderte Expression dieser microRNS führt zu veränderten AXL-Proteinmengen (Mackiewicz, Huppi et al. 2011).

1.5.1.4. Die Bedeutung von AXL in Krebs

Ausgehend von der Rolle der AXL RTK in der Stressantwort, dem Einfluss auf Migration (Fridell, Villa et al. 1998) und Invasion, der Differenzierung von Zellen sowie deren Apoptoseverhalten als auch der transformierenden Eigenschaften von AXL im Focus Formations Assay (O'Bryan, Frye et al. 1991), liegt es nahe, die Bedeutung von AXL in Krebs zu untersuchen.

Die Expression von *AXL* wurde in verschiedenen Tumoren sowie Krebszelllinien nachgewiesen. So ist die Menge an *AXL* in Brustkrebs- (Meric, Lee et al. 2002), Lungenkrebszelllinien (Wimmel, Glitz et al. 2001), in Leukämie und Lymphomazelllinien (Challier, Uphoff et al. 1996) sowie in metastasierendem Darmkrebs (Craven, Xu et al. 1995), klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Gustafsson, Bostrom et al. 2009) und Eierstockkrebs (Rankin, Fuh et al. 2010) im Vergleich zum normalen Gewebe verändert. Die Inhibition von *AXL* durch die Expression einer dominant-negativen *AXL* Mutante führt zu Wachstumshemmung und verringerter Invasion von Hirntumorzellen (Vajkoczy, Knyazev et al. 2006), auch moduliert *AXL* die Motilität und Invasivität in hochinvasiven Brustkrebszelllinien (Zhang, Knyazev et al. 2008). Weiterhin induziert *AXL* den Übergang vom epithelialen zu mesenchymalen Wachstum in Brustkrebszellen, fördert so die maligne Progression und verschlechtert die Überlebensrate der Patientinnen (Gjerdrum, Tiron et al. 2010). *AXL* reguliert Proliferation und Invasion in Mesotheliomen (Ou, Corson et al. 2011) und wird mit Angiogenese in Verbindung gebracht (Holland, Powell et al. 2005).

1.5.1.5. *AXL* als Zielmolekül für die Krebstherapie

Eine Möglichkeit, *AXL*-abhängige Signalkaskaden zu modulieren, ist die Blockierung der Ligandenbindungsstelle durch einen inhibitorischen Antikörper. Der monoklonale Antikörper YW327.6S2 induziert Apoptose und hemmt die Proliferation im nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Li, Ye et al. 2009), reduziert tumorassoziierte Gefäße und hemmt die Sekretion von Cytokinen und Chemokinen in tumorassoziierten Makrophagen (Ye, Li et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit, *AXL* zu inhibieren, sind niedrig molekulare Inhibitoren (SMI). Der SMI mit der Bezeichnung R-428 der Firma Rigel Pharmaceuticals Inc. ist ein selektiver Inhibitor von *AXL* und blockiert die Ausbreitung der Tumorzellen in einem Modell für metastasierenden Brustkrebs (Holland, Pan et al. 2010). LDC1267 ein weiterer niedermolekularer Inhibitor der TAM Rezeptoren entfesselt das Potential von natürlichen Killerzellen Tumorzellen *in vivo* zu bekämpfen (Paolino, Choidas et al. 2014).

1.5.2 Die „Hepatocyte Growth Factor“ Rezeptor Familie

Unter dem Namen „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) Rezeptor Familie werden die zwei Rezeptor Tyrosin Kinasen MET (SefReq NP_000236) und RON (SefReq NP_001231866) zusammengefasst (Robinson, Wu et al. 2000), welche von den Genen *C-MET* (SefReq NM_000245) und *MST1R* (SefReq NM_001244937) verschlüsselt werden. Beide RTK sind Heterodimere, die aus einer extrazellulären α Kette bestehen, welche, über Disulfidbrücken mit einer membrandurchspannenden β Kette verbunden ist (Giordano, Ponzetto et al. 1989). Der intrazelluläre Teil der HGF-Rezeptoren besteht aus einer Juxtamembrandomäne gefolgt von der katalytischen Kinase region und einer carboxyterminalen, multifunktionellen Domäne, die als Bindungsstelle für verschiedene Adaptorproteine und SH2-Signaltransduktionsvermittlerproteine, wie zum Beispiel RAS und PI3 Kinase, fungiert (Ponzetto, Bardelli et al. 1994). Die Mitglieder dieser Genfamilie teilen eine einzigartige Funktion: Unter physiologischen Bedingungen vermitteln sie eine besondere Form der Motilität, auch als „scattering“ bezeichnet, und tragen unter fehlregulierten Bedingungen zur Invasivität von Tumorzellen bei (Comoglio and Boccaccio 1996). Weiterhin vermitteln MET und RON Zellproliferation, Zellpolarisation und Tube Formation (K. Michael Weidner 1993, Medico, Mongiovi et al. 1996). Aktiviert werden die beiden RTK's durch verschiedene Liganden, wobei der „hepatocyte growth factor/scatter factor“ den MET Rezeptor aktiviert und der Familie ihren Namen gibt. RON wird durch einen HGF-ähnlichen, auch als Makrophagen aktivierendes Protein (MSP) genannten Liganden aktiviert (Gaudino, Follenzi et al. 1994).

1.5.2.1. Die Rezeptor Tyrosin Kinase RON

Die Rezeptor Tyrosin Kinase Ron wurde 1993 erstmals von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Während Lee et al. die mRNA von RON in kultivierten und normalen menschlichen Melanozyten nachweisen konnten (Lee, Strunk et al. 1993), veröffentlichte eine französische Arbeitsgruppe eine Studie über ein Gen, welches in einer cDNS Bibliothek von menschlichen Tumoren gefunden wurde. Diese Gen, dessen mRNA auch in normalem Lungengewebe zu finden ist, wurde als *RON* (Recepteur d'Origine Nantais) bezeichnet, liegt auf dem Chromosom 3 und verschlüsselt eine 1400 Aminosäure sowie eine 180 kDa schwere Rezeptor Tyrosin Kinase (Angeloni, Danilkovitch-Miagkova et al. 2000), deren intrazelluläre Domäne 63% Homologie mit *C-MET* zeigt (Ronsin, Muscatelli et al. 1993). Das Homologe von RON in Maus wurde unter dem Namen STK in hämatopoetischen

Stammzellen beschrieben (Iwama, Okano et al. 1994) und zeigt in Hühnern die höchste mRNA Konzentrationen in der peripheren Populationen weißer Blutzellen und im Darm (Huff, Jelinek et al. 1993). Ein homozygoter Knock-Out von *RON* in Mäusen ist letal. Heterozygote *RON*^{+/-} Mäuse wachsen aus, allerdings führt die Inaktivierung des *RON*-Gens zu einer erhöhten entzündlichen Reaktionen und zur Anfälligkeit für Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten septischen Tod bei Mäusen (Muraoka, Sun et al. 1999). Die Aktivierung von RON stimuliert die Makrophagen, es kommt zur Induktion von Migrations- und Phagozytoseprozessen. Zusätzlich hemmt MSP, der Ligand von RON, die LPS-induzierte Produktion von Entzündungsmediatoren, einschließlich induzierbare Stickstoffmonoxid und Prostaglandine (Wang, Zhou et al. 2002). RON beziehungsweise Splicingvarianten von RON sind auch im Zusammenhang mit der Krebsinitiation, -progression und -malignität beschrieben (Wang, Wang et al. 2003, Lu, Yao et al. 2007) Die Eignung von RON als Zielmolekül für die Krebstherapie ist unumstritten (Benight and Waltz 2012, Eyob, Ekiz et al. 2013, Tong, Zhang et al. 2013, Yao, Zhuang et al. 2013). Erste Erfolge bei der Blockierung von RON konnten erzielt werden, wobei zum Beispiel das Tumorwachstum durch neutralisierende Antikörper (O'Toole, Rabenau et al. 2006) oder SMI inhibiert werden konnte (Zhang, Kaplan-Lefko et al. 2008).

1.5.2.2. Die Rezeptor Tyrosin Kinase MET

Das MET Protoonkogen wurde erstmals 1984 aus einer chemisch transformierten humane Osteosarkom Zelllinie isoliert (Cooper, Park et al. 1984), ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und codiert für eine 1390 Aminosäure lange Rezeptortyrosinkinase. Die codierte RTK wird MET bzw. HGF Rezeptor genannt, unterstützt die Gewebsentwicklung, spielt eine Rolle im Heilungsprozess von Wunden und hat Anteil an der Organentwicklung. Der Ligand für diese Rezeptortyrosinkinase wurde unabhängig voneinander von mehreren Arbeitsgruppen unter dem Namen „scatter factor“ bzw. „hepatocyte growth factor“ beschrieben (Nakamura, Nishizawa et al. 1989, Zarnegar and Michalopoulos 1989, Naldini, Weidner et al. 1991). Der „scatter factor“ wird als parakriner Effektor epithelial-mesenchymalen Interaktion beschrieben, verändert die interzelluläre Verbindungen und die Mobilität von normalen Epithelzellen (Stoker, Gherardi et al. 1987). Der extrazelluläre Teil des MET Rezeptors besteht aus einer α Sema-Domäne, die über eine Disulfidbrücke mit einer weiteren β Sema-Domäne verbunden ist. Die β Sema-Domäne bildet den Anfang einer transmembranen Einheit,

welche durch einen cysteinreichen Bereich und vier Immunglobulin-ähnliche Domänen vervollständigt wird.

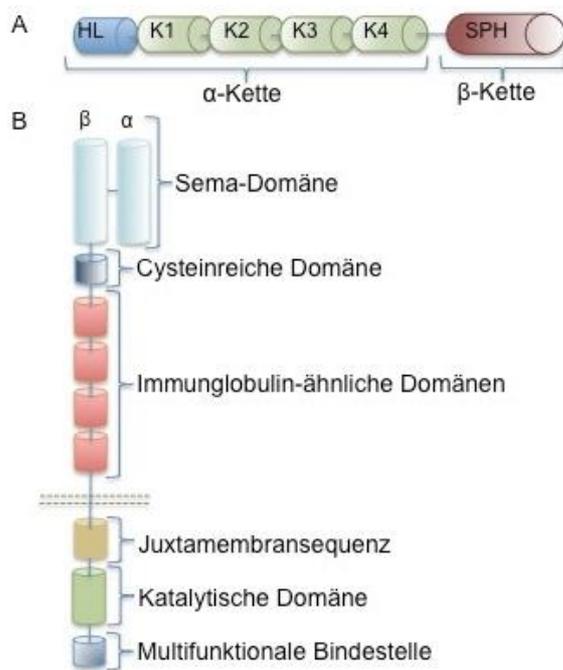


Abbildung 5: Schematische Darstellung des A: Hepatocysten-Wachstumsfaktor und des B: MET Rezeptors verändert nach (Comoglio, Giordano et al. 2008)

Der intrazelluläre Komplex wird aus einer Juxtamembransequenz, der katalytischen Kinase Domäne und einer multifunktionalen Bindestelle gebildet (siehe Abbildung 5 B). Der Ligand des MET Rezeptors besteht aus sechs Domänen (siehe Abbildung 5 A). Ein N-terminaler „hairpin-loop“ und die anschließenden vier „kringle“-Domänen bilden eine α-Kette, die β-Kette beinhaltet eine Serineprotease ähnliche Domäne, deren katalytische Aktivität bisher noch nicht gezeigt werden konnte (Trusolino, Bertotti et al. 2010). Der Hepatocysten-Wachstumsfaktor (HGF) wird von mesenchymalen Zellen sezerniert und wirkt als ein multifunktionales Cytokin an Zellen mit hauptsächlich epithelialen Ursprung (Weidner, Hartmann et al. 1993). Seine Fähigkeit, über die Aktivierung des MET Rezeptors Mitogenese, Zellmotilität und Matrix-Invasion zu stimulieren, weist dem MET/HGF System eine zentrale Rolle bei der Angiogenese, Tumorentstehung und Geweberegeneration zu (Humphrey, Zhu et al. 1995). Homozygot mutierte HGF^{-/-} Maus-Embryonen zeigen Fehler in der Entwicklung der Plazenta, verursacht durch eine reduzierte Zahl von labyrinthischen Trophoblastenzellen, und sterben *in utero* (Uehara, Minowa et al. 1995). Die Leber dieser HGF^{-/-} Maus-Embryonen ist deutlich verkleinert, zeigt weniger Parenchymzellen, verliert Zellularität und Sinuside im Vergleich zur Kontrollgruppe (Schmidt, Bladt et al. 1995). In Mausexperimenten konnte

ebenfalls gezeigt werden, dass die Entwicklung des sensorischen Nervensystems in Mäusen mit mutiertem MET-Rezeptor gestört ist (Maina, Hilton et al. 1998). Das MET/HGF System ist für das Überleben der Spinalganglien *in vivo* essenziell (Maina, Hilton et al. 1997).

1.5.2.3. Mechanismen der MET induzierten Signaltransduktion und deren Bedeutung in Krebs

Zellen mesenchymalen Ursprungs sind die Hauptproduzenten des parakrin wirkenden HGF's, während als Zielzellen Epithelzellen, welche den MET-Rezeptor exprimieren, zu nennen sind (Sonnenberg, Meyer et al. 1993). Nach Gewebeschäden und Invasionsprozessen im Zusammenhang mit Krebs werden Zytokine freigesetzt, die wiederum die Expression von HGF in Fibroblasten und Makrophagen und des MET-Rezeptors in Epithelzellen fördern (Michalopoulos and DeFrances 1997).

Nach der Bindung von HGF an seinen Rezeptor dimerisiert dieser und ist dadurch in der Lage, zwei für die Katalyse notwendige Tyrosinreste zu phosphorylieren. Anschließend werden zwei weitere Tyrosinreste durch Phosphorylierung in die Lage versetzt, die Funktionalität einer multiplen Bindungsstelle am carboxyterminalen Ende der intrazellulären Einheit zu gewährleisten (Ponzetto, Bardelli et al. 1994). Die Phosphorylierung dieser multiplen Bindungsstelle vermittelt mittel bis hoch-affine Wechselwirkungen mit mehreren „Src homology 2“ (SH2)-haltigen Signalgebern – einschließlich der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) der Phospholipase C gamma (PLC γ 1) sowie der pp60c-src Kinase. STAT3, die Src Kinase, das SHC Bindeprotein und der Wachstumsfaktorrezeptor Bindeprotein 2 (GRB 2) sind weitere Bindungspartner (Pelicci, Giordano et al. 1995, Fixman, Fournier et al. 1996). Aktivierte Signalkaskaden sowie deren Phänotypen nach Kaskadenaktivierung sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

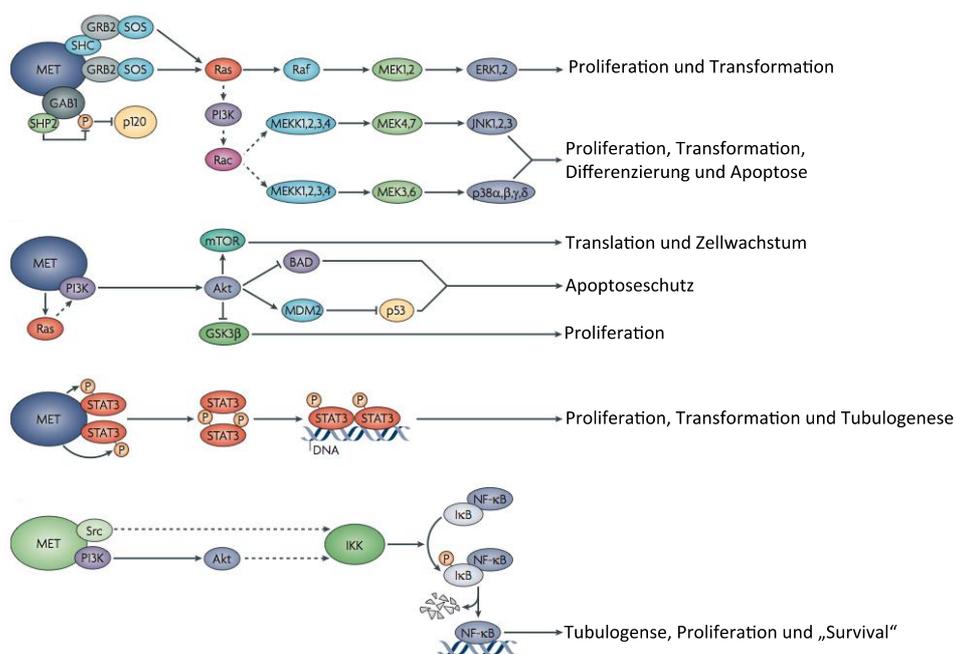


Abbildung 6: Schematische Darstellung der MET-aktivierten Signalkaskaden, verändert nach (Trusolino, Bertotti et al. 2010)

Bei einem Rezeptor, dessen Aktivierung so vielfältige Phänotypen hervorbringt wie der MET-Rezeptor, ist ein Transformations-förderndes Potenzial als Folge einer irgendwie gearteten Fehlfunktion naheliegend. Humane Zelllinien, die *c-MET* oder *HGF* ektopisch überexprimieren, induzieren maligne Wucherungen in Nacktmäusen (Rong, Segal et al. 1994), wohingegen eine siRNS gesteuerte Herabregulation von *c-MET* oder *HGF* in humanen Tumorzellen das maligne Potenzial verringert (Abounader, Lal et al. 2002). Die unangemessene Aktivierung von MET kann durch genetische Läsionen, Amplifikation, transkriptionsbedingte Hochregulation des *c-MET*-Gens oder Liganden-abhängige autokrine und parakrine Mechanismen induziert werden. Eine Protein-Überexpression und/oder eine konstitutive Kinase-Aktivierung wurde bei vielen primären humanen Tumoren, einschließlich Magen- und Speiseröhrenkrebs, kolorektalen Karzinomen (Houldsworth, Cordon-Cardo et al. 1990, Kuniyasu, Yasui et al. 1992, Hara, Ooi et al. 1998), nicht- kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) (Sun, Ai et al. 2013) und Brustkrebs (Camp, Rimm et al. 1999) nachgewiesen. Die MET-Aktivierung ist ein spätes Ereignis, das die intrinsischen Eigenschaften von malignen, bereits transformierten Zellen durch die Vermittlung antiapoptotischer, proliferativer und migratorischer Signale verstärkt (Comoglio, Giordano et al. 2008). Zusätzlich stehen *MET*-Expression und Resistenzen gegen Therapeutika in der Krebsbehandlung in engem Zusammenhang (Engelman, Zejnullahu et al. 2007, Hage, Rausch et al. 2013, Jahangiri, De Lay et al. 2013).

1.5.2.4. Strategien der MET-Inhibition zur Behandlung von Krebs

Derzeit werden drei verschiedene Strategien verfolgt, um die Funktion des MET-Rezeptors zu modulieren: zum ersten Kompetitoren von MET oder HGF, zweitens monoklonale inhibitorische Antikörper oder drittens „small molecule inhibitors“.

Kompetitoren bzw. Antagonisten konkurrieren mit dem natürlichen Liganden (HGF) um die Bindungsstelle am MET-Rezeptor, führen aber nicht zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden. Zum Beispiel scheint NK4, ein internes HGF Fragment, welches den c-Met-Rezeptor bindet, jedoch nicht aktiviert, ein erhebliches therapeutisches Potenzial für Krebspatienten zu haben (Matsumoto and Nakamura 2003).

AMG102 (Rilotumumab), ein von Amgen, Inc. entwickelter inhibitorischer Antikörper, befindet sich in der dritten klinische Phase zur Behandlung von Magen- und Adenokarzinomen (Reichert 2013). Weitere inhibitorische MET- Antikörper wurden gegen Bauchspeicheldrüsenkrebs (Jin, Yang et al. 2008) und Lungenkrebs (Stabile, Rothstein et al. 2008) erfolgreich getestet.

Die dritte Strategie zur Hemmung von MET gesteuerten Signalkaskaden ist der Einsatz von SMI's. Die Inhibition von MET durch BMS-777607 könnte bei der Behandlung von fortgeschrittenen Prostatakrebs helfen (Dai and Siemann 2010). ARQ 197 (Tivantinib) befindet sich in der zweiten klinischen Phase als Monotherapie bei Patienten mit rezidierten oder refraktären Keimzelltumoren (Feldman, Einhorn et al. 2013), weiterhin zeigt sich Tivantinib als vielversprechender Kandidat in einer Kombinationstherapie zur Behandlung von hepatozellulären Tumoren (Rimassa, Personeni et al. 2013, Santoro, Rimassa et al. 2013, Santoro, Simonelli et al. 2013, Trojan and Zeuzem 2013). AMG-458 (Amgen, Inc.) ist ein weiterer, als selektiver MET Inhibitor beschriebener SMI, welcher das Tumorwachstum im Xenograftmodel inhibiert (Liu, Siegmund et al. 2008)

2. Ziel der Arbeit

Die medizinische Versorgung von Krebspatienten wird stetig weiter entwickelt. Nach anfänglichen Erfolgen der klassischen Chemotherapie führten die starken Nebenwirkungen dieser zytotoxischen Substanzen gepaart mit dem häufigen Auftreten von Therapieresistenzen zur Etablierung neuer spezifischerer Strategien im Kampf gegen maligne Erkrankungen.

Kinasen regulieren eine große Vielfalt von zellulären Prozessen inklusive Proliferation, Migration und Invasion. Fehlfunktionen dieser Kinasen gesteuerten Prozesse sind in nahezu allen transformierten Zellpopulationen zu finden. Ein Strukturmerkmal von Kinasen ist ihre, für die Katalyse notwendigen ATP-Bindungsstelle. Ist diese Bindestelle verändert oder blockiert, ist die Funktion der Kinase nicht mehr gegeben. Auf Grund dessen eignen sich Kinasen für die Hemmung durch „small molecule inhibitors“. Diese in etwa 800 Da kleinen Moleküle diffundieren durch Zellmembranen und eignen sich damit auch für eine, oft als angenehmere empfundene, orale Einnahme.

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss der intrazellulären Kinase DYRK2 auf die Tumorentstehung- und Progression näher zu erforschen. Weiterhin soll die Eignung dieser Kinase für eine Inhibition durch SMI's aufgeklärt werden, um sie als Kandidatengen für eine gezielte Therapie zu validieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen im Haus entwickelte „small molecule inhibitor“ näher untersucht werden. Diese hemmen die Rezeptortyrosin -Kinase AXL. SMI's sind nicht spezifisch für nur ein Target. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in der ATP-Bindungsstelle von c-MET und AXL treffen diese Inhibitoren oftmals beide RTK.

Es soll ein geeigneten zelluläres Testsystemen gefunden werden, in dem eine Doppel-Inhibition von c-MET und AXL durch SMI's untersucht werden kann. Ist das verwendete SMI geeignet um Proliferation, Apoptose, Invasion und Migration in einem c-MET oder AXL abhängigem Zellsystem zu hemmen?

3. Materialien

3.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	BRL, Eggenstein
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Deoxynucleotid (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu Ulm
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Serva, Heidelberg
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
PEG (Polyethylenglycol) 4000, 6000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Aldrich Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

3.2 Enzyme

AMV reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
Ribo Lock RNase Inhibitor	MBI Fermentas, St.Leon Rot
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St.Leon Rot
Pfu Ultra DNS Polymerase	Stratagene USA

3.3 „Kits“ und sonstige Materialien

Zellkultur – Plastikwaren	Greiner, Solingen
Corning Incorporated,	USA Nunclon, Dänemark Falcon,
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
CapFinder PCR Synthese Kit	Clontech, USA
(Primer K1 und K2)	
Cellulose Nitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, Mannheim
ECL Kit®	PerkinElmer, Köln
Hyperfilm MP®	Amersham, USA

Lipofectamin RNSi MAX®	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Megaprime DNS Labelling Kit	Pierce, Sankt Augustin
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Parafilm®	Dynatech, Denkendorf
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder®	Qiagen, Hilden
RNase Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNS Ligation Kit	Roche, Mannheim
REDTaq ReadyMix	Sigma, Taufkirchen
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, USA
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
Whatman 3mm	Whatman, USA
[γ -32P] ATP >5000 Ci/mmol	PerkinElmer, Köln

3.4 Wachstumsfaktoren

rhHGF	R&D Systems
-------	-------------

3.5 Medien

Medium für E.coli	LB-Medium Sigma
	1.0% Trypton
	0.5% Hefe Extrakt
	1.0% NaCl pH7.2

Für Mediumplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar hinzugegeben.
Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 100 ug/ml Ampicillin.

3.6 Zellkulturmedien und Additive

FCS	Gibco, Eggenstein
Glutamin	Gibco, Eggenstein
Natrium-Pyruvat	Gibco, Eggenstein
RPMI-1640	Gibco, Eggenstein
DMEM	Gibco, Eggenstein
MEM	Gibco, Eggenstein
OptiMEM	Gibco, Eggenstein
Ham's F12	Gibco, Eggenstein
Neomycin	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein
Einfriermedium: 90% Hitze-inaktiviertes FCS, 10% DMSO	

3.7 Stammlösungen für Puffer

DNS Ladepuffer (6x)	0.25% Bromphenol-Blau 0.25% Xylencyanol 30.0% Glycerin 100.0 mM EDTA pH 8.0
LaemmLi Puffer (2x)	187.5 mM Tris/HCl pH 6.8 6.0% SDS 30.0% Glycerin 0.01% Bromphenol-Blau 5.0% β -Mercaptoethanol
NET (1x)	150.0 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris 0.05% Triton X-100 pH 7.4 (HCl)
PBS	13.7 mM NaCl 2.7 mM KCl 80.9 mM Na_2HPO_4 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4 (HCl)
HNTG Puffer	20 mM HEPES pH 7.5 150 mM NaCl 0.1% TritonX-100 10% Glycerin 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
“Strip” Puffer	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 2.0% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
SD-Transblot	50.0 mM Tris/HCl pH 7.5 40.0 mM Glycerin 20.0% Methanol 0.004% SDS
SSC (20x)	3.0 M NaCl 0.3 M Natriumcitrat TAE (10x) 400 mM Tris/Acetat 10 mM EDTA pH 8.0 (Essigsäure)
TAE (10x)	40 mM Tris/Acetat pH 8.0 1 mM EDTA

Material

Tris-Glycin-SDS (10x)	248.0 mM Tris/HCl pH 7.5 1918.0 mM Glycin 1.0% SDS
Triton X-100 Lysis Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10% Glycerin 1% Triton X-100 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 2 mM VaO ₅ 10 mM NaF 100 ug/l Aprotinin
RIPA Lysis Puffer	50 mM Tris/HCl, pH8,0 150 mM NaCl 1% Nonidet-P40 0.5% Desoxycholot 0.1% SDS 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 2 mM VaO ₅ 10 mM NaF 100 ug/l Aprotinin
2xPre-Hybridisierungs- Puffer 10x	10x Denhardt 10x SSC 10 mM NaPO ₄ (pH 6,8) 2 mM Na ₄ P ₂ O ₇
Hybridisierungspuffer	5x SSC 0,1 % SDS
Waschpuffer 1	2x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer 2	0,2x SSC 0,1 % SDS

3.8 Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Rosetta 2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE23 (CamR)	Novagen (Darmstadt, D)

3.9 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
Ac-745	humane epitheliale Brustzellen	Sugen
BT-20	humane Brustadenokarzinomazellen	ATCC
BT-549	humane Brustkarzinomzellen	ATCC
BT-483	humane Brustkarzinomzellen	Sugen
BT-474	humane Brustkarzinomzellen	Sugen
DU 44-74	humane Brustkarzinomzellen	ATCC
Hbl 100	humane epitheliale Brustzellen	ATCC
Hs 578T	humane Brustkarzinomzellen	U3 Pharma
MCF 10A	humane epitheliale Brustzellen	ATCC
MCF 7	humane Brustadenokarzinomazellen	DKFZ
MDA-MB-157	humane medulläre Brustkarzinomzellen	ATCC
MDA-MB-175VII	humane duktale Brustkarzinomzellen	ATCC
MDA-MB-231	humane Brustadenokarzinomazellen	U3 Pharma
MDA-MB-361	humane Brustadenokarzinomazellen	Sugen
MDA-MB-415	humane Brustadenokarzinomazellen	DKFZ
MDA-MB-436	humane Brustadenokarzinomazellen	DKFZ
MDA-MB-453	humane metastasierende Brustkarzinomzellen	ATCC
MDA-MB-468	humane duktale Brustkarzinomzellen	ATCC
MDA-MB-435S	humane Brustadenokarzinomazellen	ATCC
Sk-Br-3	humane Brustadenokarzinomazellen	ATCC
T47D	humane duktale Brustkarzinomzellen	ATCC
ZR-75-1	humane duktale Brustkarzinomzellen	Sugen
ZR-75-30	humane duktale Brustkarzinomzellen	Sugen
A-459	humane Epidermoidkarzinomzelllinie	DKFZ
A-427	humane Lungenadenokarzinomzelllinie	DKFZ
Calu 1	humane anaplastische Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
Calu 3	humane Lungenadenokarzinomzelllinie	DKFZ
Calu 6	humane Lungenadenokarzinomzelllinie	DKFZ
Hop 62	humane großzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
Colo699	humane Plattenepithelkarzinomzelllinie	ATCC
LcLc 103H	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	DKFZ
Lou NH 91	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H69	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H128	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC

NCI-H146	humane Mucoepidermoidkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H209	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H292	h. bronchioalveolare Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H345	humane großzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H358	humane papilläre Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H460	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H441	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H446	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H510A	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H522	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H596	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H661	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H1299	h. bronchioalveolare Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H1993	humane großzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H1650	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
NCI-H1975	humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie	ATCC
SW-900	humane Plattenepithelkarzinomen	ATCC
Melanozyten	humane Melanozytenzelllinie	ATCC
C-8161	humane hochinvasive Melanomzelllinie	DKFZ
F-01	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
G361	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
Hs 294T	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
Hs 659T	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
IGR-39	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
Lox IMVI	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
MM-Alb	humane maligne Melanomzelllinie	Hermeking
MM-Alt	humane maligne Melanomzelllinie	Hermeking
MM-Arn	humane maligne Melanomzelllinie	Hermeking
MM-Leh	humane maligne Melanomzelllinie	Hermeking
MM-Su	humane maligne Melanomzelllinie	Hermeking
Sk-Mel-1	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
Sk-Mel-2	humane maligne Melanomzelllinie	ATCC
Sk-Mel-28	humane maligne Melanomzelllinie	DKFZ
DU 145	humane Prostatakarzinomzelllinie	DKFZ
PC 3	humane Prostataadenokarzinomzelllinie	DKFZ
Jurkat	humane Leukämiakrebszelllinie	ATCC
NIH/3T3	embryonale Mausfibroblasten	ATCC
Phoenix E	modifizierte HEK293-Zellen zur Produktion helfervirusfreier, ecotropher Retroviren	ATCC

3.10 Inhibitoren

Inhibitor		Referenz	Hersteller (Synthese)
SKI-606	(SKI)	(Golas, Arndt et al. 2003)	Vichem Chemie Research Ltd.
BMS-777607	(BMS)	(Dai and Siemann 2010)	Vichem Chemie Research Ltd.
AMG-458	(AMG)	(Liu, Siegmund et al. 2008)	Vichem Chemie Research Ltd.
MPGD93230 (93230)	Beispiel 110	(Ullrich, Torka et al. 2011)	Vichem Chemie Research Ltd.
MPGD84111 (84111)	Beispiel 12	(Ullrich, Torka et al. 2011)	Vichem Chemie Research Ltd.
MPGD84578 (84578)	Beispiel 24	(Ullrich, Torka et al. 2011)	Vichem Chemie Research Ltd.

3.11 primäre Antikörper

Antigen	Hersteller/Verdünnung	Spezies
p-AKT (Ser473)	Cell Signaling 1:1000	Kaninchen
AXL (C- 20)	Santa Cruz 1:1000	Ziege
Dyrk2 (home made) IP	diese Arbeit 2-4 ul	Kaninchen
Dyrk2 WB	R&D 1:1000	Schaf
Flag-Tag F3165	Sigma 1:1000	Maus
p-ERK	Cell Signaling 1:2000	Kaninchen
c-MET (C-28)	Santa Cruz 1:1000	Kaninchen
p-Met	Cell Signaling 1:1000	Kaninchen
Tubulin	Sigma 1:10000	Maus

3.12 sekundäre Antikörper

HRP-konjugiert, Ziege anti-Maus (WB)	Sigma, Taufkirchen
HRP-konjugiert, Ziege anti-Schaf (WB)	Dianova, Hamburg
HRP-konjugiert, Ziege anti-Kaninchen (WB)	BioRad, München
HRP-konjugiert, Esel anti-Ziege (WB)	Dianova, Hamburg

Die sekundären Antikörper wurden in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt

3.13 Plasmide

3.13.1 primäre Vektoren

pLXSN	Expressionsvektor für retroviralen Gentransfer, SV40 Promotor, Ampicillin- und Neomycinresistenz, Origin von pBR322, 5'-LTR and 3'-LTR von MoMuLV, (Clontech, Palo Alto, USA)
pcDNA3 J Flag	Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl, veränderte Cloning Site, Flag Tag (Invitrogen, USA, verändert Jens Ruhe)

3.13.2 Konstrukte

pLXSN <i>DYRK2 528</i>	über EcoR1/Xho eingefügte kurze DYRK2 (1584 Bp) Isoform (diese Arbeit)
pLXSN <i>DYRK2 601</i>	über EcoR1/Xho eingefügte kurze DYRK2 (1804 Bp) Isoform (diese Arbeit)
pLXSN <i>DYRK2 528KR</i>	über EcoR1/Xho eingefügte kurze DYRK2 (1584 Bp) Isoform mit Lysin zu Argenin Mutation in der ATP Bindungstasche (diese Arbeit)
pLXSN <i>DYRK2 601KR</i>	über EcoR1/Xho eingefügte kurze DYRK2 (1804 Bp) Isoform mit Lysin zu Argenin Mutation in der ATP Bindungstasche (diese Arbeit)
pcDNA3 <i>DYRK2 528</i>	über HindIII/Xba eingefügte kurze DYRK2 (1584 Bp) Isoform und N-terminalen Flag Tag (diese Arbeit)
pcDNA3 <i>DYRK2 601</i>	über HindIII/Xba eingefügte kurze DYRK2 (1804 Bp) Isoform und N-terminalen Flag Tag (diese Arbeit)
pcDNA3 <i>DYRK2 528KR</i>	über HindIII/Xba eingefügte kurze DYRK2 (1584 Bp) Isoform mit Lysin zu Argenin Mutation in der ATP Bindungstasche und N-terminalen Flag Tag (diese Arbeit)
pcDNA3 <i>DYRK2 601KR</i>	über HindIII/Xba eingefügte kurze DYRK2 (1804 Bp) Isoform mit Lysin zu Argenin Mutation in der ATP Bindungstasche und N-terminalen Flag Tag (diese Arbeit)
pLXSN Her2	(Wallasch, Weiss et al. 1995)
pRL-TK	Renilla Luziferase-Kontroll-Plasmid von Promega
pGL-3	(Wilkins, Dai et al. 2004)
pETM22_SLIC_ Dyrk2	modifiziert nach (Li and Elledge 2007) mit N-terminalem 28kDa Dyrk2 Fragment

3.14 Oligonukleotide

3.14.1 Klonierungsprimer

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Verwendung
Dyrk2/Iso1-HindIII fo	ACG TAA GCT TAC CGC CAT GTT AAC CAG GAA ACC TTC GG	Vorwärtsprimer für die Klonierung der kurzen Isoform in pcDNS3 inklusive CODAC Sequenz und HindIII Schnittstelle
Dyrk2/Iso1-XbaI rev	ACG TTC TAG AGC TAA CAA GTT TTG GCA ACA CTG	Rückwärtsprimer für die Klonierung der kurzen Isoform in pcDNS3 inklusive XbaI Schnittstelle
Dyrk2/Iso2-HindIII fo	ACG TAA GCT TAC CGC CAT GAA TGA TCA CCT GCA TGT CGG CAG	Vorwärtsprimer für die Klonierung der langen Isoform in pcDNS3 inklusive CODAC Sequenz und HindIII Schnittstelle
Dyrk2/Iso2-XbaI rev	ACG TTC TAG AGC TAA CAA GTT TTG GCA ACA CTG TCC	Rückwärtsprimer für die Klonierung der langen Isoform in pcDNS3 inklusive XbaI Schnittstelle
Dyrk2/Iso1-EcoR1 fo	ACG TGA ATT CAC CGC CAT GTT AAC CAG GAA ACC TTC GG	Vorwärtsprimer für die Klonierung der kurzen Isoform in pLXSN inklusive CODAC Sequenz und EcoR1 Schnittstelle
Dyrk2/Iso1-XhoI rev	ACG TCT CGA GGC TAA CAA GTT TTG GCA ACA CTG	Rückwärtsprimer für die Klonierung der kurzen Isoform in pLXSN inklusive XhoI Schnittstelle
Dyrk2/Iso2-EcoR1 fo	ACG TGA ATT CAC CGC CAT GAA TGA TCA CCT GCA TGT CGG CAG	Vorwärtsprimer für die Klonierung der langen Isoform in pLXSN inklusive CODAC Sequenz und EcoRII Schnittstelle
Dyrk2/Iso2-XhoI rev	ACG TCT CGA GGC TAA CAA GTT TTG GCA ACA CTG TCC	Rückwärtsprimer für die Klonierung der langen Isoform in pLXSN inklusive XhoI Schnittstelle
Dyrk2 seq 1	GGT GGG CCC AAC AAT GGT GG	Im Gen liegender Sequenzierungsprimer
Dyrk2 seq 2	CGA CCT ACG TAG GTT TGC TGC	Im Gen liegender Sequenzierungsprimer
Dyrk2 Mut fo	GCA CGT GGC CCT AGA GAT GGT GCG GAA TG	Vorwärts- Mutageneseprimer Lysin in Argenin

Dyrk2 Mut re	CAT TCC GCA CCA TCT CTA Rückwärts- GGG CCA GCT GC Mutageneseprimer Lysin in Argenin
Dyrk2 pET fo	AAG TTC TGT TCC AGG GGC Vorwärtsprimer für pET CCA TGG GTT ATC CCC GTT Vektoren ACT GCA CTG
Dyrk2 pET rev	CCC CAG AAC ATC AGG TTA Rückwärtsprimer für pET ATG GCG TCA GCT AAC AAG Vektoren TTT TGG CAA CAC TG

3.14.2 kurze interferierende RNS

Block-iT TM Alexa Flour Red (Kontrolle)	cat:14750-100	Invitrogen
siRNS 1	Hs_DYRK2_2 FlexiTube siRNS (SI00053291)	Qiagen
siRNS 2	1473 silencer validated Dyrk2 cat: AM51331	Ambion
siRNS AXL 1	s1845 silencer select AXL cat: AM4390824	Ambion
siRNS AXL 2	s1846 silencer select AXL cat: AM4390824	Ambion
siRNS MET 1	s8701 silencer select MET cat: AM4390824	Ambion

3.14.3 TagMan Sonden

Assay ID	Gen-Name	Produktgröße
Hs00389256_m1	DYRK2	94 Bp
Hs00242357_m1	AXL	70 Bp
Hs01565584_m1	MET	73 Bp
Hs99999905_m1	GAPDH	122 Bp

Die TagMan Sonden und der entsprechende Master Mix wurden bei Applied Biosystem bezogen.

3.15 Tiere

Die Produktion polyklonaler Antikörper fand durch Immunisierung von neuseeländischen Kaninchen statt, die in der Versuchstierhaltung des Max-Planck-Instituts entsprechend den derzeit gültigen Bestimmungen und unter spezifischen, pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Für die weitere Arbeit wurden die Kaninchen nach der Immunisierung schmerzfrei durch den Tierpfleger getötet, um das Blut der Tiere ernten zu können. Die Xenograft-Versuche mit Rag2 -/-, yc -/- BALB c Mäusen fanden in der Versuchstierhaltung der Universität von Padua (Italien) entsprechend den derzeit gültigen Bestimmungen und unter spezifischen, pathogenfreien Bedingungen statt.

3.16 Software

AIDA	Raytest (Kanada)
StepOne TM Software v2.2.2	Applied Biosystems
Auswertungssoftware Migrations Assay, Soft Agar Assay	(Vlaicu 2011)
Primer und Vektordesign	Vector NTI (Invitrogen, USA)
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.htm

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Chung und Miller (Chung and Miller 1988). Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationsfrequenz lag zwischen 10^5 und 10^7 Kolonien/ μg DNS.

4.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNS verwendet welche zu $20 \mu\text{l}$ kompetenten und auf Eis aufgetauten *E.coli*-Bakterien pipettiert wurden. Der Ansatz wurde daraufhin 20 min auf Eis inkubiert und nach einem ein minütigen Hitzeschock bei 42°C weitere 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1 ml LB-Medium (enthielt Ampicillin) versetzt und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden $250 \mu\text{l}$ des Reaktionsansatzes auf LB/Ampicillin- Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um ausreichend Plasmid-DNS zu generieren, wurden am nächsten Tag Kolonien gepickt und damit jeweils 5 ml LB-Ampicillin angeimpft. Die Kultur wurde dann 3-4h bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine ausreichende Trübung erreicht war. Schließlich wurden mit dieser Vorkultur weitere 500 ml LB-Ampicillin Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag kante dann die Aufreinigung der Plasmid-DNS durchgeführt werden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Aufreinigung von DNS

Die Plasmid-DNS wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Kit nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Aufreinigung größerer DNS Mengen erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Die Aufreinigung von DNS Fragmenten nach Restriktion erfolgte mit QIAquick Gel Extraction Kit. Die Aufreinigung eines PCR Ansatzes erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Alle Aufreinigungen erfolgten nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (RNS und DNS) erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Thermo *Scientific*, Nanodrop) bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw 280 nm.

4.2.3 Gelelektrophorese von DNS

Doppelsträngige DNS-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%igen horizontalen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE mit Ethidiumbromid. Die aufzutrennende DNS wurde mit DNS-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h beziehungsweise über Nacht.

4.2.4 Amplifikationsanalyse mittels Southern Blot Technik

Für die Southern Blot Analyse wurden 10 µg genomische DNS eingesetzt. Die Restriktion erfolgte über Nacht mit HindIII nach Angaben des Herstellers. Die Auftrennung des Restriktionsansatzes sowie die Weiterbearbeitung erfolgte wie von Koul im Jahr 2000 beschrieben (Koul, Choidas et al. 2000). Für das Einscannen der Nitrocellulose Filter wurde ein Fuji Film BAS-2500 Imager verwendet, die densitometrische Auswertung erfolgte mit der AIDA Software.

4.2.5 Isolierung von DNS-Fragmenten

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QiaQuick Kits für Gelextraktion der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

4.2.6 Sequenzierung von DNS

Zur Überprüfung der Sequenzen von Expressionsplasmiden wurden deren Inserts mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) an einem ABI 3730 Sequencer in der Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biochemie sequenziert. Zusätzlich zu den im Gen liegenden Dyrk2 Primern wurden folgende Primer verwendet:

Für pcDNA3-Konstrukte:

pcDNA3 Fwd	CATGCTTACTGGCTTATCG
pcDNA3 Rev	TGGCAACTAGAAGGCACAG

Für pLXSN-Konstrukte:

pLXSN Rev	GACTTTCCACACCCTAACTG
pLXSN Fwd	CTCTCCCCCTTGAACCTC

4.2.7 Enzymatische Behandlung von DNS

4.2.7.1. Vervielfältigung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit einen DNS Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNS, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis and Faloona 1987) Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNS
 1 µl *sense* Oligomer,
 10 pmol 1 µl *antisense* Oligomer,
 10 pmol 5 µl 10x Pfu-Polymerase Puffer
 1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
 1 µl Pfu-Polymerase (0,1-0,5 U) ad 50 µl H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNS durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in dem Thermocycler „Mastercycler gradient“ von Eppendorf durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min 95°C
Amplifikation 25-30 Zyklen:	0,5-1 min 95°C (Denaturierung) 0,5-1 min X°C (Hybridisierung) x min 72°C (Synthese)
letzte Synthese	8 min 72°C abkühlen auf 4°C

Die zur Hybridisierung erforderliche Temperatur X ist vom GC- und AT-Gehalt des Oligomers abhängig. Üblicherweise liegt sie zwischen 52 und 60°C und wurde mit dem Online verfügbaren Programm Oligo Calc. ermittelt. Die Synthesezeit x ist von der Länge des zu amplifizierenden Stranges abhängig (pro Minute werden ca. 2000 Bp amplifiziert). Die Synthese des Dyrk2 Fragmentes, welches für die Klonierung benötigt wurde, konnte mit Hilfe einer Gradienten PCR aus der cDNS von MCF 7 gewonnen werden. Hierbei erfolgte die Hybridisierung für 30 sec bei 56°C und wurde 12 Zyklen lang um 0.5 °C pro Zyklus erhöht. Die verbleibenden 18 Zyklen erfolgten bei 68°C.

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde das PCR Fragment aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

4.2.7.2. Quantitative Real-Time-PCR

Um die relative Genexpression zu bestimmen, wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt (StepONE *Real-Time PCR Systems*, *Applied Biosystems*). Dafür wurden hydrolysierende TaqMan®-Sonden verwendet. Der proportionale Zusammenhang zwischen der entstehenden Fluoreszenz und der Menge des gebildeten PCR-Produktes ermöglicht dabei eine direkte Quantifizierung der Zielsequenz.

Hydrolysierende TaqMan®-Sonden

TaqMan®-Sonden sind Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (FAM), und am 3'-Ende einen Quencher tragen, der die Emission des Reporters unterdrückt. Während der PCR wird die Sonde durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNS-Polymerase von der Zielsequenz verdrängt. Durch die Trennung vom Quencher beginnt der Reporter-Farbstoff zu fluoreszieren. Der daraus resultierende Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte.

Durchführung der qRT-PCR

Die PCR wurde in einer 96-Well-Platte (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*) durchgeführt. Pro 20µl Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

- 10 µl TaqMan® Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*)
- 1 µl Assay Mix (*Applied Biosystems*)
- 2 µl cDNS (1:10) – 7 µl Wasser

Der Assay-Mix enthält sowohl eine sequenzspezifische Sonde, als auch ein sequenzspezifisches Primerpaar. Vor Beginn der PCR wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und für eine Minute bei 1500 rpm zentrifugiert.

Die PCR erfolgte für alle Proben und Zielgene nach folgendem Schema:

- Vorbereitung: 2 min bei 50°C
- Denaturierung: 10 min bei 95°C
- Amplifikation: 15 sek bei 95°C und 1 min bei 60°C; 40 Zyklen

Quantifizierung

Zur Quantifizierung wird der Beginn der exponentiellen Phase der PCR herangezogen, in welcher sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als C_T-Wert (Cycle Threshold = „Schwellenwert-Zyklus“) bezeichnet (Saiki, Scharf et al. 1985). Die Expression des Zielgenes wird mit einem Referenzgen (GAPDH) normalisiert.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (Kontrolle-Probe)}}$$

R= relative Expression

E= Effizienz der PCR (in Vorversuchen wurde ein Wert von 1,9 ermittelt)

ΔC_T = Differenz der C_T -Werte von Kontrolle und Probe

4.2.7.3. Verdau von DNS Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1 Stunde bei 37°C.

4.2.7.4. Dephosphorylierung und Ligation von DNS Fragmenten

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. Anschließend erfolgte das Einbringen des gewünschten DNS Fragmentes durch Ligation. Beide Prozesse wurden mit dem Rapid DNS Ligation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 10 µl dieses Ligationsansatzes wurden für die Transformation in *Escherichia coli* verwendet.

4.2.7.5. Einführen von Punktmutationen in Expressionsplasmide

Für die Herstellung der Konstrukte, die benötigt wurden um die KR Mutante des Dyrk2 Genes zu exprimieren, wurde eine PCR gestützte Punktmutagenese durchgeführt. Diese erfolgte mittels der Dyrk2 Mut fo und Dyrk2 Mut rev Oligonukleotiden. Nach Amplifikation des Plasmides mit Hilfe der Oligonukleotide erfolgte der enzymatische Verdau des parentalen DNS Stranges. Diese Arbeiten wurden durchgeführt mittels des QuikChange XL Site-Direkted Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers.

4.2.8 Arbeiten mit RNS

Die Präparation von RNS macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore™-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNS-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

4.2.8.1. Präparation von RNS

Die Präparation von RNS aus Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) für die RNS Isolation nach Herstellerprotokoll ("*RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNS from Animal Cells*"). Die Probe wurde mit DNase nach Herstellerangaben behandelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm

gemessen. Die Qualität der RNS wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

4.2.8.2. Elektrophoretische Auftrennung von RNS

Die Auftrennung der RNS erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegelkammern. Die RNS wurde unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

4.2.8.3. Reverse Transkriptions -PCR

Für die Präparation von cDNS wurden ein Oligo-dT-Primer, der das 3' Ende von mRNA erkennt (K1, Clontech Inc., U.S.A.), und ein „SMART“-Primer (Clontech Inc., U.S.A.), der die 5' terminale CAP-Struktur von mRNA erkennt (K2), verwendet. Es erfolgte nur die Synthese des zu der RNS komplementären DNS-Stranges. Es wurden jeweils 5 μ g der totalRNS eingesetzt, nachdem die Integrität im Agarosegel überprüft wurde. Die RT-PCR wurde wie folgt angesetzt:

5 μ g RNS
10 pmol K1 Primer
5 pmol K2 Primer
auffüllen mit H₂O auf 7,5 μ l

Nach 2-minütiger Hybridisierung bei 68°C und anschließender Inkubation für 10 min bei Raum Temperatur wurden folgende Reagenzien zu dem Ansatz zugegeben:

2 μ l dNTP-Mix (10 mM)
4 μ l 5 x AMV-RT Puffer
1 μ l RNase Inhibitor (40 E/ μ l)
1 μ l DTT (10 mM)
2 μ l AMV-Reverse Transkriptase
2,5 μ l H₂O

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Pipettieren des Ansatzes 2 Stunden bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit findet die cDNS Synthese statt. Anschließend wurde die cDNS mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, mit 30 μ l H₂O bidest. eluiert und 5 μ l auf einem 1 %- Agarosegel überprüft. Die cDNS wurde bei -20 °C aufbewahrt. Für die Real Time PCR wurde diese cDNS 1:10 verdünnt.

4.3 Methoden der Zellkultur

4.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, *HERAcell 150*) bei 7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, *Laminair*) durchgeführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des Coulter-Counters ZM der Firma Coulter. Die

Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium nach Angaben des Herstellers versorgt und passagiert.

4.3.2 Herstellung polyklonaler Zelllinien

Die retroviral infizierten Maus Fibroblastenzellen wurden 48 Stunden nach Infektion auf 10 cm Platten ausgesät und 14 Tage in Gegenwart von Neomycin (1 mg/ml) im Wachstumsmedium kultiviert. Nach mindestens 5 Passagen wurde ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot auf die Expression des gewünschten Proteins hin untersucht.

4.3.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien

Die mit Lipofectamin transfizierten MCF7 Brustkrebszellen wurden 48 Stunden nach Transfektion auf 10 cm Platten ausgesät. Die dadurch vereinzelt Zellen wurden 14 Tage in Gegenwart von Neomycin (1 mg/ml) im Wachstumsmedium kultiviert bis sie zu Kolonien von circa einem halben Zentimeter Durchmesser herangewachsen waren. Danach wurden die Klone gepickt, einzeln in 48-Loch-Platten überführt und weiter kultiviert. Nach einer weiteren Passage in 6-Loch Platten wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf die Expression des gewünschten Proteins hin untersucht.

4.3.4 Calcium-Phosphat-Transfektion

Die Phönix E Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät und nach 24 Stunden bei einer Konfluenz von 80% transfiziert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Okayama (Chen and Okayama 1987). Bei diesem Protokoll bilden sich die Calcium-Phosphat-DNS-Komplexe graduell im Medium während der Inkubation mit den Zellen. Das HEPES-S wurde tropfenweise zu der Mischung aus CaCl₂, DNS und TE gegeben. Danach wurde der Mix auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei einer CO₂- Konzentration von 3% inkubiert.

Ansatz	1 x	2 x	3 x
CaCl ₂	20 µl	44 µl	66 µl
DNS	10 µl	22 µl	33 µl
TE	170 µl	374 µl	561 µl
HEPES-S	200 µl	440 µl	660 µl

Zusammensetzung des Transfektionsmixes (6 cm Schale)

4.3.5 Retroviraler Gentransfer in NIH/3T3 Maus Fibroblasten (Pear, Nolan et al. 1993)

Für die Produktion des retroviralen Überstandes wurden Phoenix-E-Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode mit den pLXSN Konstrukten transfiziert. Um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen, wurde zudem Chloroquin (50µM) zu den Zellen hinzugegeben. Am Tag der Transfektion wurden außerdem die Zielzellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Einen

Tag nach der Transfektion konnte der retrovirale Überstand dreimal im Abstand von 3 h geerntet werden. Die Überstände wurden filtriert (0,45 µm Filter), mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt und direkt auf die Zielzellen gegeben.

Zwei Tage nach der Infektion erfolgte die Selektion der Zielzellen für zwei Wochen mit Neomycin (1 mg/ml).

4.3.6 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test wurden Säugerzellen mit einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP), wie beschrieben, transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um den prozentualen Anteil der GFP-exprimierenden Zellen zu bestimmen.

4.3.7 siRNS-Transfektion

Die reverse Transfektion von doppelsträngigen siRNS-Konstrukten erfolgte mit Hilfe der Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMax von Invitrogen. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.3.8 Plasmid-Transfektion

Die Transfektion der pcDNA 3 Plasmide erfolgte mit Lipofectamin 2000 von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

4.3.9 Proliferationsassay

Um die Hemmung der Proliferation quantitativ bestimmen zu können wurden 1000 Zellen pro Loch in einer 96 Loch Platte in Triplikaten in Wachstumsmedium ausgesät. Nach 16 Stunden erfolgte die Behandlung mit siRNS oder Plasmiden wie in den Herstellerangaben des Transfektionsreagenz beschrieben. Das Transfektionsmediumgemisch wurde nach 6 Stunden gegen frisches Wachstumsmedium ausgetauscht. Die Behandlung mit Small Molecule Inhibitors erfolgte ebenfalls 16 Stunden nach Aussaat und wurde 72 Stunden nach Beginn der Behandlung wie nachfolgend beschrieben ausgewertet. Um das Auswerten des Experimentes möglich zu machen wurde der cellTiter Glo Assay von Promega verwendet. Hierzu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, durch 50 µL ein 1:1 Gemisch aus FCS freien Medium und Assayreagenz ersetzt und 30 min im Zellkulturschrank lysiert. Der Assay wurde abhängig von der Fragestellung zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Micro Lumat Plus Microplate Luminometer LB 96V von Eg&G Berthold ausgewertet.

4.3.11 Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Soft-Agar-Assay

Eine Eigenschaft von malignen Tumorzellen besteht darin, ohne Kontakt zu einem spezifischen Untergrund Kolonien zu bilden und somit autonomes Wachstum zu betreiben. Um diese Fähigkeit in den zu charakterisierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde der Soft-Agar-Assay angewendet. Der Assay konnte in einer 96 Loch Platte durchgeführt werden wobei

jede Zelllinie mindestens achtfach aufgetragen wurde. Hierbei wurden zunächst ca. 50 µl Bottom-Agar in die einzelnen Vertiefungen der 96 Loch Platte pipettiert und zum Aushärten unter der Sterilbank belassen. 1000 Zellen wurden in der entsprechenden Menge Top-Agar kurz gemischt und dann auf den Bottom-Agar gegeben. Zum Aushärten des Top-Agars wurde die Platte für ca. 20 min auf geradem Untergrund bei Raumtemperatur belassen, anschließend mit 50 µl IMDM Medium überschichtet und im Inkubator bei 37 °C ebenfalls auf gerader Fläche für bis zu 21 Tage inkubiert. Das Zellwachstum wurde unter dem Lichtmikroskop (Axio Observer A1 Zeiss) fotografiert (MetaVue Zeiss) und wie in (Vlaicu 2011) beschrieben ausgewertet.

Um den jeweiligen Agar flüssig zu halten, sowie die Zerstörung der Zellen und die Denaturierung der Zusätze durch Hitze zu verhindern, wurde der Agar auf max. 55 °C erhitzt während die restlichen Zusätze bei 37 °C gewärmt wurden.

Bottom Agar:	0.5 % Agar	(Difco Noble agar, cat: 214230)
	20 % FCS	
Top Agar:	IMDM Medium	(Gibco cat: 21056-023)
	0.2 % Agar	(Difco Noble agar, cat: 214230)
	IMDM Medium	(Gibco cat: 21056-023)

4.3.12 Focus-Formation-Assay

Als Methode zur Analyse der Transformation von Zellen *in vitro* wurde der Focus-Formation-Assay verwendet (Riedel, Massoglia et al. 1988, Cox and Der 1994, Jeffers, Schmidt et al. 1997). Dafür wurden NIH3T3-Zellen retroviral infiziert und die infizierten Zellen am Tag nach der letzten Infektion in 6 Loch-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen). Nach 24 h wurde das Medium auf 4 % FCS gewechselt und 21 Tage bei 3 tägigem Mediumwechsel kultiviert. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit Kristallviolett-Lösung inkubiert. Nach dem Abwaschen überflüssiger Färbelösung wurden die Platten getrocknet und anschließend eingescannt.

4.3.13 Untersuchung der Zellen im In-Vitro-Woundhealing-Assay

Um die Invasivität von Tumoren zu beurteilen, ist die Fähigkeit von Zellen, ihren Zellverband zu verlassen und zugefügte Wunden zu schließen maßgebend. Um sich der Charakterisierung dieser Eigenschaft der Zelllinien *in vitro* zu nähern, wurde auf den In-Vitro-Woundhealing-Assay zurückgegriffen. Die Zellen wurden auf 12 Loch-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wurde nun pro Loch ein „Kratzer“ gezogen. Anschließend wurden die Löcher mehrmals mit PBS gewaschen, das Zellkulturmedium ausgetauscht und die Platten für mindestens 24 h im Inkubator belassen. Im Verlauf wurde beobachtet, ob die Zellen in der Lage waren, in den freien Raum auf der Zellkulturschale zu migrieren und die entsprechenden Stellen erneut zu bewachsen. In verschiedenen Zeitabständen wurden die Platten analysiert und fotografiert, um das Migrationsverhalten zu dokumentieren.

4.3.14 Untersuchungen zum Migrationsverhalten von Zellen

NIC-H1299 Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in Standardmedium ohne FCS resuspendiert. In die untere Kammer einer 24-Lochplatte wurden

700 µl mit Serum versetztes RPMI Medium gefüllt und Zellkultureinsätze mit einer Polykarbonatmembran (Falcon™ Cell Culture Inserts, 6,5 mm Durchmesser, 8 µm Porengröße, BD Biosciences, Pharmingen) luftblasenfrei mit einer Pinzette eingesetzt. Anschließend wurden 65000 Zellen in 500 µl Medium ohne FCS auf der Membran ausgesät. Die Zellen durften innerhalb der nächsten 6-18 Stunden in Richtung des Chemoattraktanten migrieren. Bei Harvath (Harvath, Falk et al. 1980) wurde erstmals eine Methode für Boyden Kammer Assays beschrieben, die darauf basiert, die nicht migrierten Zellen von der Membranoberfläche zu entfernen, die zur Unterseite durchgewanderten Zellen zu färben und unter einem Mikroskop auszuzählen. Über den Vergleich der Zellzahlen erhält man schließlich eine Aussage über die migrativen Eigenschaften von Zelllinien.

Die Zellen wurden auf der Membranunterseite mit einer Kristallviolettlösung (20,0% (v/v) Methanol, 0,5% (w/v) Kristallviolett) 10 min gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser konnte die Membran unter einem Mikroskop untersucht und fotografiert werden. Die Auswertung erfolgte wie in (Vlaicu 2011) beschrieben.

4.3.15 Untersuchungen zum Verhalten von Zellen nach HGF induziertem Scattering „Scattering Assay“

Für den „Scattering Assay“ wurden jeweils 15 000 Zellen in Doppelbestimmung in 12 Loch Platten auf Medium mit 10% FCS ausgesät. 24 Stunden später wurde rekombinantes HGF in einer Konzentration von 50 nM/ml hinzugegeben und die Zellkulturplatten in den entsprechenden Konzentrationen mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt. Die Auswertung erfolgte 24 Stunden später mittels mikroskopischer Begutachtung. Als Kontrolle diente DMSO. Für die siRNS Versuche wurden die Zellen 24 Stunden vor Einsaat wie in 4.3.7 beschrieben mit siRNS behandelt. Um die Phosphorylierung der Zielmoleküle beurteilen zu können musste das oben beschriebene Verfahren abgeändert werden. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Einsaat mit PBS gewaschen und für weiter 24 Stunden in Medium ohne FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 1 Stunde mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen behandelt und 20 min mit 10% FCS haltigem Medium dem 50 nM/ml rekombinantes HGF hinzugefügt wurde stimuliert. In Folge dessen wurden die Zellen wie in 4.5.1 beschrieben lysiert.

4.3.16 Untersuchung der Zellen im „Matrigel outgrowth assay“

In dem „Matrigel outgrowth Assay“ beurteilt man das Vermögen von Zellen auf einer Matrix (Matrigel BD Bioscience) welche aus Komponenten der Basalmembran besteht zu wachsen. Die Zellen zeigen hier ihre Fähigkeit die Matrix lokal zu degradieren und Ausläufer zu bilden. Das Matrigel wurde mit RPMI Medium auf einer Konzentration von 3 mg/ml Matrigel verdünnt, 75 µl dieser eiskalten Mischung 12 Stunden vor Versuchsbeginn in eine 96 Loch Platte überführt und im Inkubationsschrank bei 37°C gelagert. 5000 Zellen wurden in 75 µl RPMI Medium aufgenommen und auf das ausgehärtete Matrigel pipettiert, anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren. Die Zellen wurden nach 48 Stunden mit einem Zeiss Axiovert 300 (Carl Zeiss Jena) Mikroskop begutachtet und fotografiert

4.4 Injektion der immun defizienten Mäuse

Die Xenograft-Versuche mit Rag2 ^{-/-}, yc ^{-/-} double KO BALB c Mäusen fanden in der Versuchstierhaltung der Universität von Padua (Italien) entsprechend den derzeit gültigen Bestimmungen und unter spezifischen, pathogenfreien Haltungsbedingungen statt. Hierzu wurden 6-8 Wochen alte Mäuse an den Flanken rasiert und Zellsuspensionen verschiedener Konzentrationen (4×10^4 , 2×10^5 , 1×10^6 in 250 μ l PBS) subcutan injiziert. Sechs Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet und das Tumorstadium begutachtet. Als Negativ-Kontrolle wurden polyklonale NIH/3T3 Zellen verwendet welche den Leervektor exprimierten, als Positiv-Kontrolle dienten NIH/3T3 Zellen welche das Her2 PLXSN Konstrukt exprimierten.

4.5 Proteinanalytische Methoden

4.5.1 Zellyse

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Für die Versuche mit den DYRK 2 Proteinen wurde RIPA-Puffer verwendet, da dieser Puffer auch die Zellkernmembran zerstört und somit auch Kernproteine gezeigt werden können. Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden dem Lysepuffer vor der Verwendung frisch zugegeben:

10 μ g/ml	Aprotinin
1,0 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF in EtOH gelöst)
10,0 mM	Natriumfluorid (NaF)
2,0 mM	Natriumorthovanadat (pH 10,0)

Nach 10 Minuten Lyse auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) konnten unlösliche Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett abgetrennt werden. Der Überstand, der alle zytosolischen und die meisten membranständigen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entweder zur Immunpräzipitation weiterverwendet oder als Gesamtlysate benutzt.

4.5.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der "Micro BCA Protein Assay Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Kupfer-Ionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) durch verschiedene Seitengruppen von Aminosäuren (hauptsächlich Cystein, Tryptophan und Tyrosin), die als Reduktionsmittel fungieren. Die Proteinbestimmung wird nicht durch Detergenzien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Die Kupfer-Ionen werden durch BCA (Bicinchonische Säure)

komplexiert und bilden die charakteristische violette Färbung, deren Extinktion in einem ELISA-Reader (Dynatech MR5000) gemessen wurde ($\lambda=570-490\text{nm}$). Als Vergleichsstandard (Kalibrierungskurve) wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-2000 μg Protein/ml) eingesetzt.

4.5.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zelllysaten dienen spezifische, an Protein-A- oder G-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann. Die Protein-A-/G-Sepharose wird in einer 20%igen ethanolischen Lösung aufbewahrt. Da Ethanol die Protein-Protein Wechselwirkungen stört, wurde die Sepharose dreimal mit 1x HNTG-Puffer gewaschen und schließlich eine 50%ige Suspension der Sepharose in Lysepuffer hergestellt, mit der im weiteren gearbeitet wurde. Zur Immunpräzipitation wurden je 30 μl Protein-A-/G-Sepharose und 3 μl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen Lysis-Puffer versetzten Zelllysaten gegeben und für 3-4 h oder ÜN bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 3000 rpm (3 min, 4°C) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit eiskaltem HNTG-Puffer gewaschen und in 50 μl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5 min bei 100°C aufgeköcht, um den Immunkomplex von der Protein-A/G-Sepharose zu lösen und anschließend für 1 min bei 11000 rpm abzentrifugiert.

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht und wurden wie von Maniatis 1989 (Maniatis 1989) beschrieben durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese diente der PageRuler Prestained Ladder von Fermentas.

4.5.5 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurde das Polyacrylamidgel nach der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade 1982). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 3 h bei 0,8mA/cm² Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, BA 85) auf einer "Semidry"-Blotapparatur.

4.5.6 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem erfolgten Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden diese für 1 min mit einer Lösung des roten Farbstoffs Ponceau S (2 g/l in 2% (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Unspezifisch angefärbte Bereiche der Nitrozellulose wurden mit destilliertem Wasser entfärbt, damit der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper oder die Proteine des Zelllysats sichtbar wurden. Dies diente neben dem Fixieren der Proteine auf der Membran, als Hinweis um anhand der Antikörperbanden abzuschätzen zu können, ob gleiche Mengen Protein aufgetragen worden waren. Die Nitrozellulose wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen in 1x NET-Gelatine (0,25% Gelatine in 1 x NET) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose abgesättigt.

4.5.7 Immundetektion (Westernblot-Analyse)

Bei der Westernblot-Analyse wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Verfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen primären Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch einen sekundären Antikörper erkannt werden, welche an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ (PerkinElmer).

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit NET-Gelatine (0,25% Gelatine in 1x NET) für jeweils 20 min wurde die Membran für 60 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (in NET-Gelatine) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte speziesspezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (PerkinElmer) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal für 20 min mit NET-Gelatine gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 nach Angaben des Herstellers inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert. ECL ist ein nicht radioaktives System zur Detektion von spezifischen Antigenen auf einer stationären Phase. Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch eine Inkubation in "Strip"-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 30 min in einem Warmwasserschüttler entfernt werden. Danach muss das β -Mercaptoethanol durch intensives Waschen mit NET-Gelatine für mindestens 4 h vollständig entfernt werden, bevor die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden kann.

4.6 Produktion eines polyklonalen Antiserums

4.6.1 Aufreinigung eines 28kDa DYRK2 Proteinfragmentes

Die Aufreinigung des Proteinfragmentes welches zur Immunisierung verwendet wurde, erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Frau Dr. Suppmann (Corefacility des Max Planck Institut für Biochemie) nach folgender Methode.

Die genetische Information für ein 28 kDa großes N-terminales DYRK2 Protein-fragment wurde mit Hilfe der unter 3.14.1 beschriebenen Dyrk2 pET fo/Dyrk2 pET rev Primer mittels PCR erzeugt. Als Quelle der genetischen Information diente der pcDNA3 *DYRK2 601* Vektor und das PCR Produkt wurde mittels sequence and ligation-independent cloning (SLIC) (Li and Elledge 2007) in einen pETM22 Vektor kloniert. Die autoinduzierte Expression des Proteins erfolgte in BL21 (DE3) Rosetta bei 24°C in OverNightExpress™ Instant TB Medium (Novagen). In einer Übernacht-Kultur wurden 5,2 g Biomasse erzeugt und in 20 ml Lysis Puffer (20 mM Tris pH 8,0, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, AEBSF 1 mM, 2 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin, 1 μ g/ml DNase, 240 U/ml Benzonase) mit Hilfe eines Hochdruck-homogenisators (Avestin) resuspendiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Lysatüberstand abgenommen. Nach Equibrilation der Talon Superflow Metal Affinity Resin Beads (Clontech) mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, AEBSF 1 mM, 2 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1

µg/ml Pepstatin) erfolgte die Bindung 20 min lang bei 4°C. Es folgten 3 Waschschrirte in 20 ml Waschpuffer für je 15 min bei 4°C mit anschließender 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm. Die Elution erfolgte mit 12 ml Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazol, AEBSF 1 mM, 2 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin) und wurde in 0,5 ml Schritten fraktioniert. Die Fraktionen wurden auf einen Protein 80 Series II Chip aufgetragen, analysiert und anschließend entsprechend der Analyse vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit einer Hi Trap Desalting Sephadex G-25 (GE Heathcare) Säule entsalzt und nach Dialyse gegen den Lagerungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, AEBSF 1 mM, 2 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin) in 0,1 mg Fraktionen (c=1,25 mg/ml) bei -80° C konserviert. Die Proteinausbeute betrug 2,5 mg.

4.6.2 Polyklonale Antikörpergewinnung aus Kaninchen

Die Immunisierung erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Tierhaus Facility des Max Planck Instituts für Biochemie, als Antigene diente das zuvor beschriebene 28 kDa DYRK2 Fragment. Vor der Immunisierung wurden den Kaninchen zunächst an der Ohrvene ca. 2 ml Prä-Immunsersum abgenommen. Zur ersten Immunisierung wurden jeweils 500 µg des Antigens mit dem gleichen Volumen „kompletten Freund´s Adjuvanz“ (Sigma) versetzt und in einer Kanüle zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde dem Kaninchen subcutan injiziert. In gleicher Weise erfolgten Immunisierungen zwei und nochmals vier Wochen später, mit dem Unterschied, dass nun „nicht-komplettes Freund´s Adjuvanz“ verwendet wurde. Acht Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet. Das Blut wurde ÜN bei 4°C zur Präzipitation des sogenannten Blutkuchens stehen gelassen. Anschließend wurde der flüssige Bestandteil abgenommen und 10 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nachfolgend schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C für 10 min. an. Danach wurde das Serum abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Funktion von *DYRK2*

Im folgenden Abschnitt soll die duale Kinase *DYRK2* auf Ihre Bedeutung in der Krebsentwicklung und Ihre Eignung als Zielmoleküle für die Hemmung durch einen niedrig molekularen Inhibitor hin untersucht werden.

5.1.1 Untersuchungen zur genomischen Amplifikation des *DYRK2* Gen

Unter dem Begriff genomische Amplifikation ist die Vermehrung von DNS Abschnitten zu verstehen, welche oft zur vermehrten Produktion der im Amplikon kodierten Proteine führt. Amplifikation spielt in Krebszellen eine große Rolle. So ergaben zum Beispiel Untersuchungen, dass Patientinnen mit einer *HER2* Genamplifikation frühzeitiger ein Tumorrezidiv entwickeln und eine kürzere Überlebenszeit aufweisen als die Kontrollgruppe (Slamon, Clark et al. 1987). Des Weiteren ist der Mechanismus der Genamplifikation auch als Anpassung an eine Chemotherapie beschrieben worden (Riordan, Deuchars et al. 1985). Im Jahr 2003 erschien eine Studie, welche die Amplifikation und Überexpression von *DYRK2* in Lungen- und Speiseröhrentumoren zeigt (Miller, Aggarwal et al. 2003)

Aus diesem Grund ist die genomische DNS in 18 Brustkrebszelllinien und der Brustepithel-Zelllinie MCF 10A im Hinblick auf eine Amplifikation des *DYRK2* Gens mithilfe einer Southern Blot Analyse untersucht worden (Abbildung 7 A). Die Auswertung der Intensitäten des radioaktiven Signals erfolgte densitometrisch. Da Krebszelllinien immer abnorme Chromosomensätze aufweisen (Bialy 2001), wurden diese Intensitätsdaten mit den in der Zelldatenbank ATCC befindlichen Daten über die chromosomale Ausstattung der jeweiligen Zelllinie in Relation gesetzt, anschließend auf das als Ladungskontrolle verwendete Haushaltsgen Aktin B normalisiert, um so näherungsweise die Anzahl der Genkopien in den untersuchten Zelllinien bestimmen zu können (Abbildung 7 B). Die als nicht maligne beschriebene Zelllinie MCF 10A diente als Kontrolle und weist nach diesem Verfahren die aufgrund des diploiden Chromosomensatzes zu erwartende Kopienzahl von zwei auf. In der als invasiv geltenden Zelllinie Hs 578T konnten sieben Kopien von *DYRK2* festgestellt werden. Die Zelllinie ZR-75-1, welche in weiteren Studien die höchste Expression *DYRK2* zeigt, weist eine Kopienzahl von sechs auf.

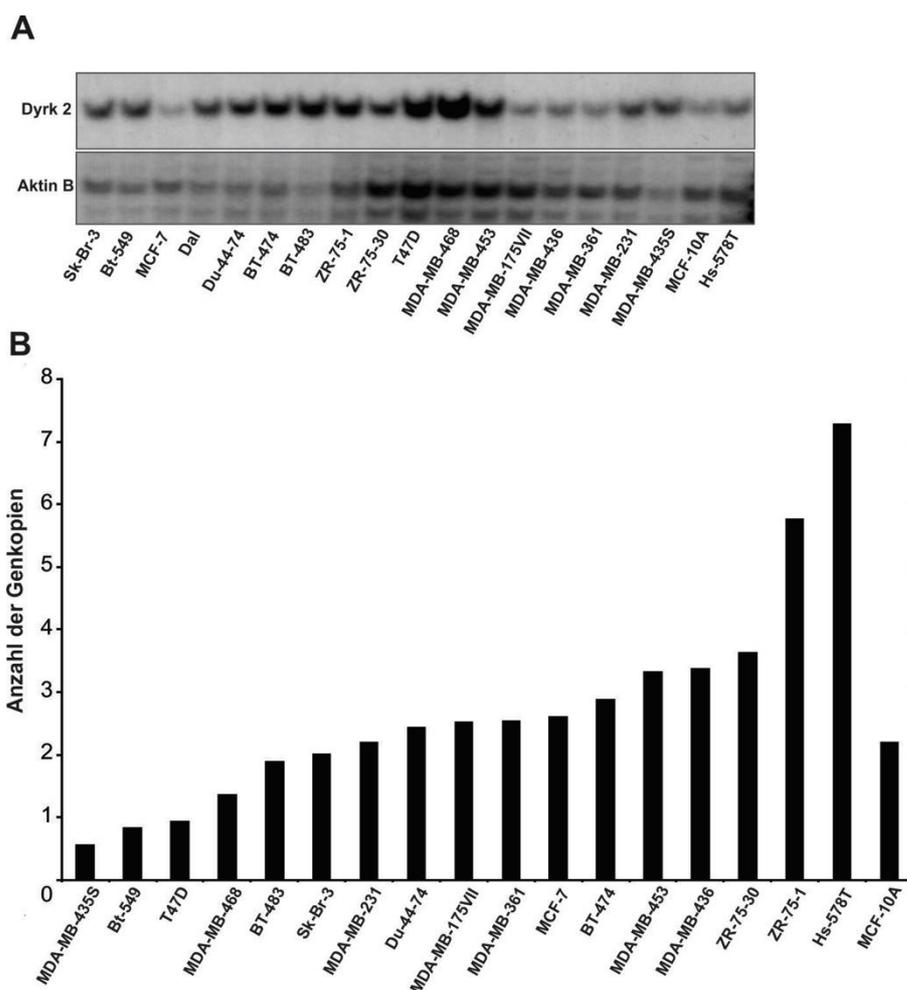


Abbildung 7: A: Southern Blot Analyse des Dyrk 2 Gens und der Ladungskontrolle Aktin B
B: Densitometrische Auswertung auf Grundlage der in A gezeigten Southern Blot Analyse mithilfe der Aida Software. Die Intensitätswerte wurde auf das Haushaltsgen Aktin B normalisiert und in Relation zur zellulären chromosomalen Ausstattung der einzelnen Zelllinien berechnet.

5.1.2 Expression des *DYRK2* Gens in Brust-, Lungen-, und Melanomkrebzelllinien auf mRNA-Ebene

Die systematische Untersuchung der mRNA Mengen von Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen in Tumorzellen kann wichtige Informationen über die Entstehung von Tumoren und deren weitere Entwicklung liefern. Um Aussagen über die Expression von *DYRK2* treffen zu können, sind die cDNAs der in Abbildung 8 gezeigten Zelllinien unter Verwendung des Real-Time PCR Systems untersucht worden. Das Expressionsniveau von *DYRK2* konnte mithilfe der Expression des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert werden. In den Brustkrebszellen diente die nicht tumorigene Zelllinie MCF 10A als Kontrollzelllinie. Die Menge der *DYRK2* cDNA in MCF 10A wurde als 100 Prozent Expression angenommen und die Expressionslevel der Brustkrebszelllinien in Relation dazu gesetzt. In den untersuchten Melanomzelllinien wurde die cDNA von primären Melanozyten als Kontrolle verwendet.

In den Brustkrebszelllinien (Abbildung 8 B) zeigen drei Zelllinien eine verglichen mit MCF 10A um den Faktor zehn erhöhte Expression, acht Zelllinien eine vier- bis sechsfach erhöhte Expression und neun weitere Zelllinien weisen eine geringere Expression auf wie die Kontrollzelllinie.

Um die Real-Time PCR Daten zu validieren, wurde eine semi-quantitative PCR durchgeführt (Abbildung 8 A), wobei Tubulin als Kontrolle diente. Diese Daten bestätigen die Real-Time PCR Ergebnisse.

In den Lungenkrebszelllinien wurde die Zelllinie mit der geringsten *DYRK2* Expression als Referenzzelllinie verwendet (SW-900). Vier von 16 getesteten cDNS zeigen eine mehr als zehnfach erhöhte Expression (Abbildung 8 C)

In den Melanomzelllinien erwies sich überraschenderweise die cDNS von Melanozyten als die Probe mit der höchsten *DYRK2* Expression (Abbildung 8 D).

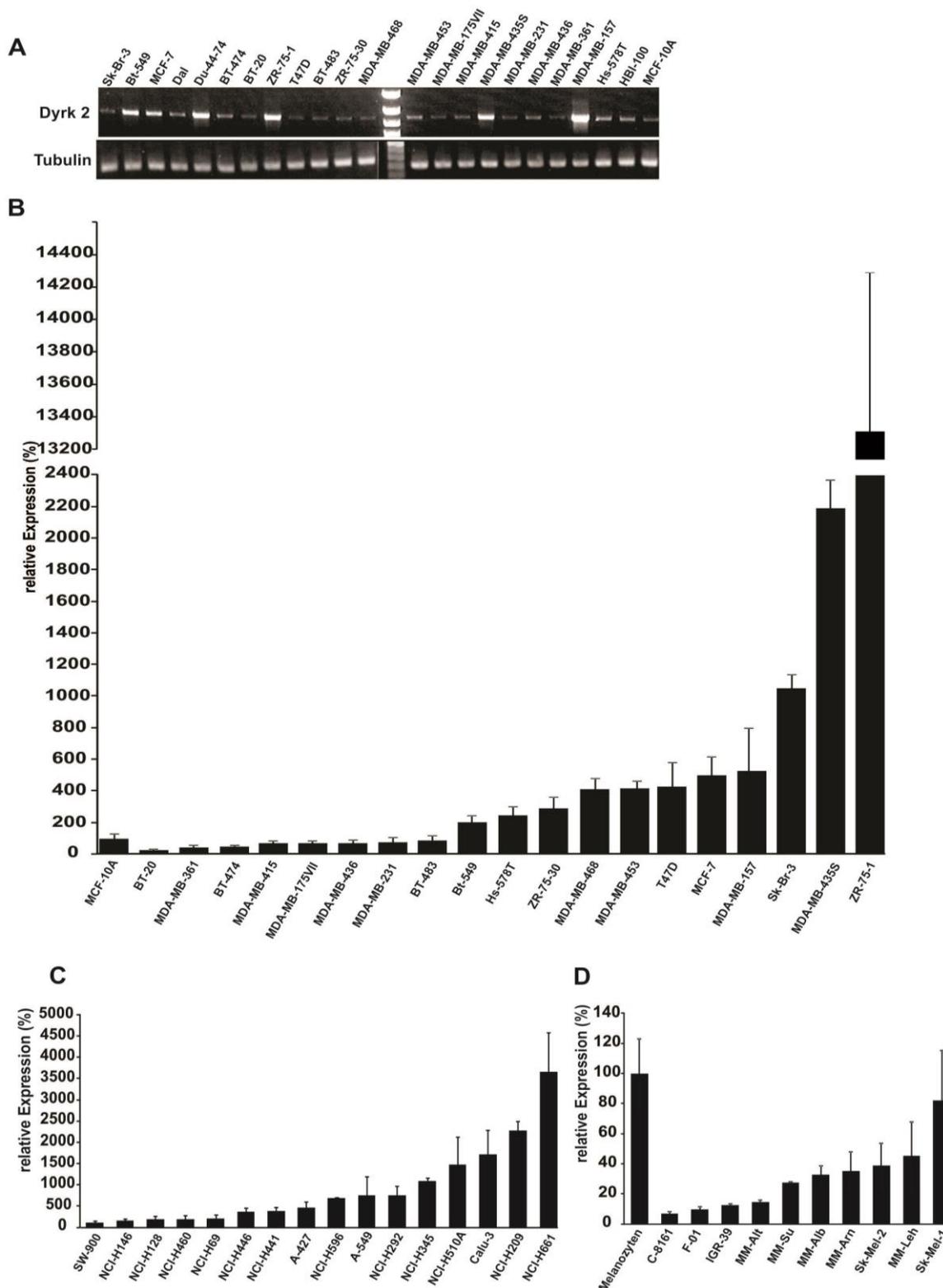


Abbildung 8: Dyrk 2 mRNA Expression in verschiedenen Geweben
A: Agarose-Gel der PCR- Produkte von Dyrk 2 und Tubulin in verschiedenen Brustkrebszelllinien
B: Real-Time PCR- Analyse der mRNA Expression, normalisiert auf *GAPDH* und in Relation zur Expression in MCF 10A Zellen in verschiedenen Brustkrebszelllinien
C: Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression, normalisiert auf *GAPDH* und in Relation zur Expression in Sw-900, in verschiedenen Lungenkrebszelllinien
D: Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression, normalisiert auf *GAPDH* und in Relation zur Expression von Dyrk 2 in Melanozyten, in verschiedenen Melanomzelllinien

5.1.3 Generierung verschiedener Hilfsmittel für die weiterführende Arbeit mit DYRK2

Zu Beginn dieser Arbeit war es erforderlich, Hilfsmittel zu erstellen, welche die Arbeit mit dem DYRK2 Protein ermöglichen. Zum einen soll die Expression des DYRK2 Protein erhöht werden, und durch die Expression einer Kinaseinaktiven Mutante das intakte Protein verdrängt werden um den Einfluss der Kinase auf die Funktion von DYRK2. Zum Anderen soll, da die kommerziell erhältlichen, gegen das DYRK2-Protein gerichteten Antikörper im Western Blot nicht die erwünschte Sensitivität erreichten, um endogenes DYRK2 Protein nachweisen zu können, ein Antiserum gegen das DYRK2 Protein produziert werden.

5.1.3.1. Erzeugung von Expressionsplasmiden

Die Entscheidung fiel auf zwei verschiedene Plasmidsysteme. Die aus MCF7 stammende *DYRK2* cDNS wurde in ein leicht modifiziertes pcDNA3 Vektorrückgrat und in ein pLXSN basiertes System kloniert.

Das pcDNA3 Plasmid bringt, neben einer Ampicillin Resistenzkassette für die Vermehrung in *E.Coli*, eine unter SV 40 Promotorkontrolle stehende Neomycin- Resistenz für die Erzeugung von stabilen Klonen in Zelllinien mit. Zusätzlich zu der von einem CMV Promotor kontrollierten multiplen Klonierungsregion wurde dieser Region der codierende Bereich für einen sogenannten Flag Tag hinzugefügt. In diese Klonierungsregion konnte über eine HindIII und eine XbaI Schnittstelle die cDNS für die 528 Aminosäuren (1584 Bp) - und die 601 Aminosäuren (1804 Bp) lange Dyrk2 Isoformen eingefügt werden. Diese beiden Konstrukte wurden N-terminal durch das Weglassen eines Stopkodons um die Aminosäuren DYKDDDDK, welche den Flag Tag bilden, verlängert. In zwei sequenzgleiche Konstrukte der *DYRK2* Isoformen wurde eine Punktmutation eingefügt, welche das Lysin (AS 178) der für die katalytische Aktivität essenziellen ATP-Bindungstasche in ein Arginin mutiert (im Weiteren KR-Mutante genannt).

Da es sich bei dem pcDNA3-Plasmid, bedingt durch den sehr aktiven CMV Promotor, um ein Überexpressionssystem handelt und es für verschiedene Experimente notwendig war, Zellen retroviral zu infizieren, wurden die oben beschriebenen *DYRK2* Konstrukte in einen pLXSN Vektor kloniert. In dem pLXSN Vektor wurden die vier Konstrukte über EcoR1/Xho Schnittstellen hinter einen SV40-Promotor kloniert.

5.1.3.2. Untersuchungen zur Funktionalität der erzeugten Plasmide

Ein Zielmolekül der Dyrk2 Kinase ist der Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells), welcher in Calcium abhängigen Signalkaskaden eine Rolle spielt. Dieses Protein wird von DYRK2 phosphoryliert und ändert über diesen Phosphorylierungsstatus seine Lokalisation in der Zelle. Phosphoryliertes NFAT befindet sich im Zytoplasma und kann somit seiner Rolle als Transkriptionsfaktor nicht mehr nachkommen. NFAT aktiviert unter anderen den Interleukin-2 Promotor (Gwack, Sharma et al. 2006). Um die Funktionalität der Expressionplasmide zeigen zu können, wurde ein Plasmid-System verwendet, in dem die Expression der Leuchtkeifer Luziferase durch Interleukin-2 Promotoren gesteuert wird. Wenn die erzeugten Expressionsplasmide ihre Funktion erfüllen, sollte das überexprimierte Wildtyp DYRK2 NFAT phosphorylieren und somit die aktivierende Wirkung von NFAT auf den Interleukin-2 Promotor unterbinden (Pan, Xiong et al. 2012). Die Expressionsplasmide, welche die KR-Mutation tragen, sind dem folgend nicht mehr in der Lage, potenzielle Zielmoleküle zu phosphorylieren und hemmen somit auch nicht mehr die Funktion von NFAT (siehe auch Einleitung Abschnitt 1.4.2.3).

Jurkat Zellen wurden transient, mit den Überexpressionsplasmiden und den Luziferaseplasmiden transfiziert und 40 Stunden später für acht Stunden mit Ionomycin, PMA und Calciumchlorid stimuliert, um NFAT zu aktivieren (siehe Abbildung 9). In der Leerkontrolle sowie bei Überexpression der beiden DYRK2 KR-Mutanten ist eine stimulationsabhängige Aktivität der Luziferase zu erkennen.

In den Proben, die mit den intakten DYRK2 Isoformen transfiziert wurden, sinkt die Luziferaseaktivität. Es kann also davon ausgegangen werden, dass jenes über Stimulation aktivierte NFAT von der DYRK2-Kinase phosphoryliert und damit inaktiviert wird.

A

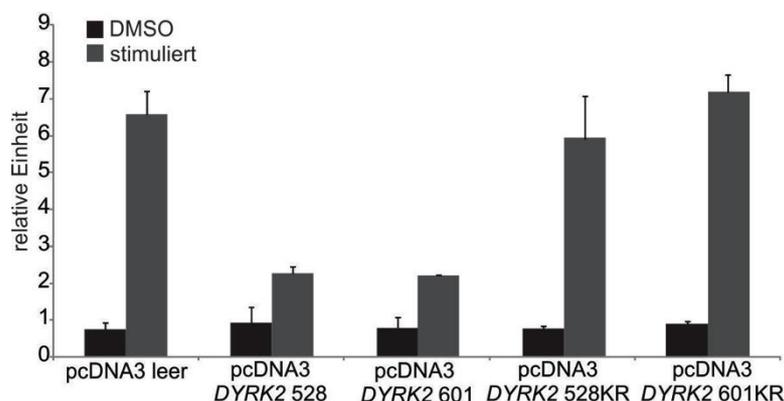


Abbildung 9: Luziferaseassay in transient transfizierten Jurkat Zellen. Die Kontrollzellen wurden mit 0,01% DMSO und die stimulierten Zellen für acht Stunden mit 1 μ M Ionomycin, 20 nM PMA und 2 mM CaCl_2 behandelt.

5.1.3.3. Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen das DYRK2 Protein

Zur Generierung ein Antikörperserums wurde Mithilfe der Core Facility des Max Planck Institutes für Biochemie ein His-Thioredoxin-DYRK2 Fusionsprotein gereinigt (siehe Abbildung 10 A), anschließend das Fusionsprotein endoproteolytisch abgespalten und mit dem gereinigten DYRK2 Fragment ein Kaninchen immunisiert.

Nach einer dreimaligen Immunisierung des Kaninchens konnte ein Serum aus dem Kaninchenblut gewonnen werden, welches nach einem Test auf Spezifität in der weiteren Arbeit für Immunpräzitationen eingesetzt wurde. Die Aufreinigung von IgG Antikörpern aus dem Serum erfolgte mittels einer Hi Trap Protein A Säule. Die Antikörperfraktion wurden anschließend gegen PBS Puffer dialysiert. Der so gewonnene Antikörper erkennt überexprimiertes DYRK2 Protein in einer Western Blot Analyse im Totallysats (Abbildung 10 C), allerdings reicht auch hier die Sensitivität nicht aus, um endogenes DYRK2 eindeutig detektieren zu können. In Abbildung 10 D ist eine Immunpräzitation zu sehen. Die kurze Isoform des DYRK2 Proteins ist 59 kDa groß und läuft somit kurz über einer 50 kDa Bande, welche charakteristisch für die schwere Kette des IgG Antikörpers ist. Eine Anreicherung des Proteins über eine Immunpräzitation bringt nur in der Überexpression den gewünschten Effekt. Da selbst mehrere getestete kommerzielle Antikörper endogenes DYRK2 nicht detektieren können, könnte das DYRK2 Protein in den Versuchsbedingungen in so geringen Mengen vorhanden sein, dass es mittels der gewählten Methoden nicht detektierbar ist. Ebenso wäre ein schneller Abbau des Proteins im Menschen oder auch in der zu immunisierenden Tierart möglich. Hinweise darauf bieten die PEST Sequenzen im N- Terminus des Proteins.

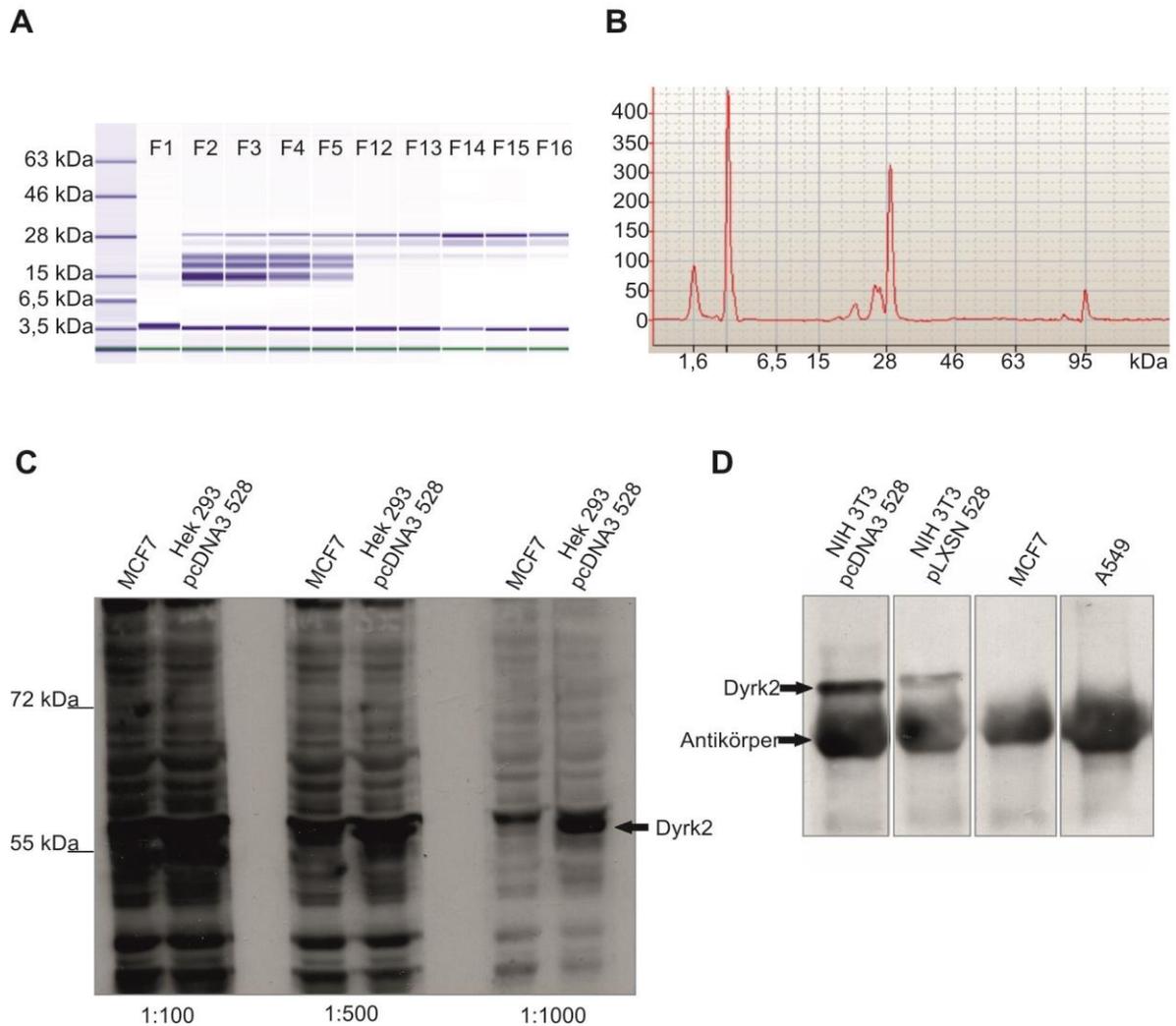


Abbildung 10: A: Reinigung des Zelllysates über Kobalt-basierte Affinitätschromatographie. Die Elution erfolgte mit einem imidazolhaltigen Puffer und die Auswertung über ein Protein 80 Series II Chip.
B: Elektropherogramm der finalen Reinigung, die erhaltene Probe enthält 58,5% des gesuchten Proteins, die Auswertung erfolgte über ein Protein 80 Series II Chip.
C: Test des Immunerums in verschiedenen Konzentrationen mittels Western Blot im Totallysat
D: Immunpräzipitation mit 3 ul des Immunerums, als Detektionsantikörper diente das aufgereinigte Immuserum

5.1.4 Untersuchungen zum transformierenden Potenzial von *DYRK2*

Der Übergang von normalen, in ihrem Wachstum kontrollierten Zellen zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen wird als maligne Transformation bezeichnet. Neben transformierenden Viren oder chemischen Substanzen sind auch in der Regulation oder der Basenabfolge gestörte Gene für die maligne Transformation verantwortlich. Transformierte Zellen zeigen viele Merkmale von Tumorzellen wie unkontrolliertes Wachstum, Veränderung der Kontaktinhibition, Wachstum in sogenanntem Weichagar und Ausbildung von Tumoren nach einer Injektion der Zellen in Mäuse. Die maligne transformierten Zellen verändern auch ihre Morphologie und verlieren typische Merkmale der ursprünglichen Zellarten (Entdifferenzierung). In den im Folgenden dargestellten Experimenten sollte untersucht werden, wie untransformierte Mausfibroblasten (NIH/3T3) auf eine genetische Veränderung mit denen im Abschnitt 5.1.3.1 beschriebenen Plasmiden reagieren.

5.1.4.1. Die Überexpression des *DYRK2* Genes erhöht die Proliferationsrate in Mausfibroblasten

Die präzise Kontrolle des Zellzyklus ist für die Entwicklung wachsender Tiere und Pflanzen ebenso essenziell wie für die Gewebs-Homeostase in adulten Lebewesen. Der Verlust der Zellzykluskontrolle führt oftmals zu einer erhöhten Proliferation von Zellen und wird als ein entscheidender Schritt für die Krebsentstehung beschrieben (Weinberg et al 2000). Kinasen als Hauptakteure der zellulären Signalübertragung spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proliferationsprozesse. Untersucht wurde deshalb, ob die Expression des *DYRK2* Genes eine Rolle in der Proliferationsgeschwindigkeit von NIH/3T3 Zellen spielt und ob der Prozess von der Kinaseaktivität dieser dualen Kinase abhängt.

Bei transients Überexpression der beiden *DYRK2* Wildtypisoformen konnte ein etwa 20 prozentiger Anstieg der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (GFP) gezeigt werden. Die KR Mutanten hingegen wiesen eine Verringerung der Proliferation um 20 Prozent (siehe Abbildung 11 A) auf.

Dieser Effekt kann durch die Verringerung des Serum Gehaltes noch verstärkt werden. So zeigen NIH/3T3 Mausfibroblasten die *DYRK2* polyklonal stabil Überexprimieren eine Erhöhung der Proliferation um 50 Prozent, verglichen mit Zellen welche nur den leeren Transfektionsvektor exprimieren (siehe Abbildung 11 C).

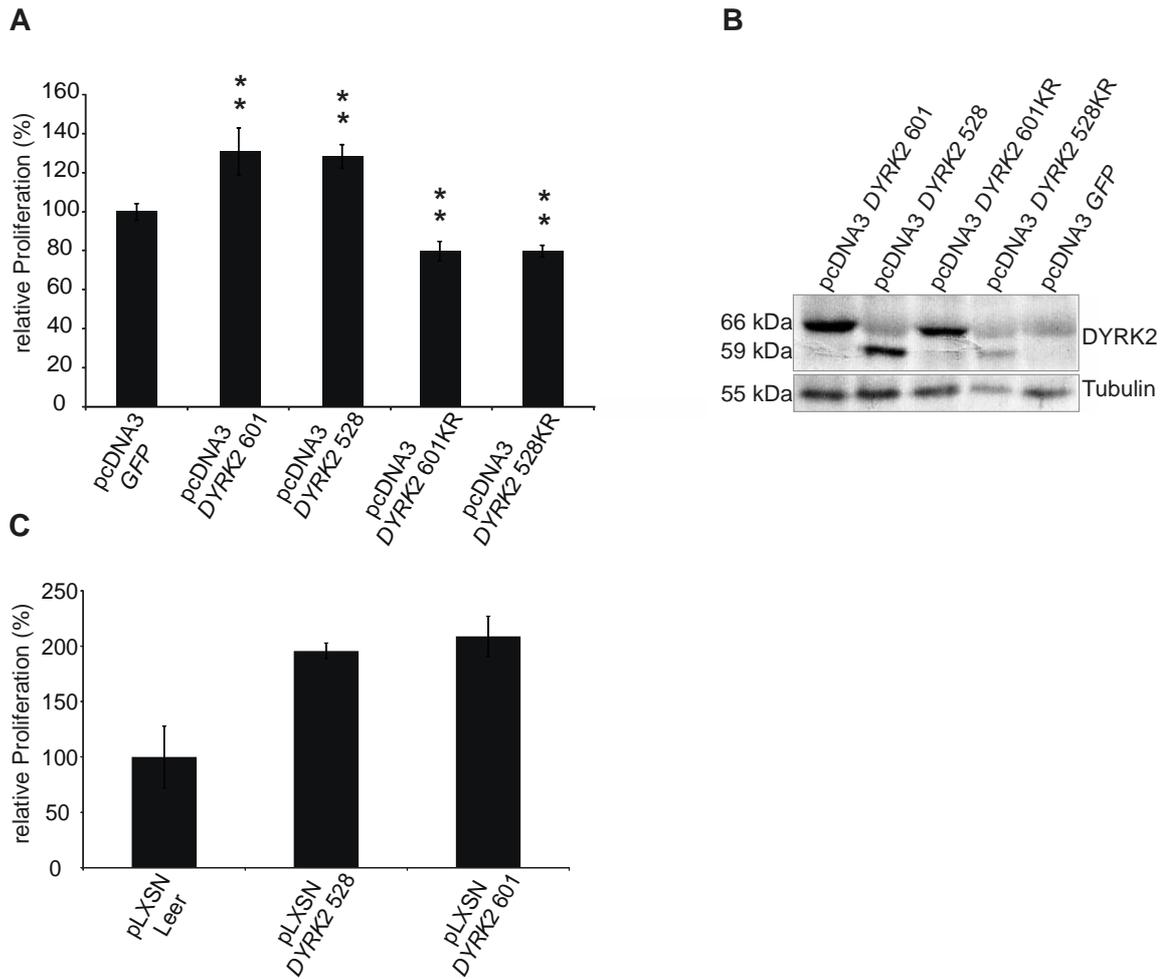


Abbildung 11: **A:** ATP-Assay in transient transfizierten NIH/3T3 Zellen. Die Zellen wurden nach der Transfektion in 4% FCS DMEM inkubiert und der Assay nach 48 Stunden ausgelesen. Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=3; **p<0.005 ermittelt mit dem Student T-test. **B:** Western Blot Analyse der Totallysate von transient transfizierten NIH/3T3 Zellen, als Antikörper diente Anti Flag (Sigma). **C:** ATP-Assay in stabilen polyklonalen NIH/3T3 Zellen. Die Zellen wurden nach der Transfektion in 1% FCS DMEM inkubiert und der Assay nach 72 Stunden ausgelesen. Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=3

5.1.4.2. Die mit 528 Aminosäuren kürzere Isoform von *DYRK2* besitzt onkogenes Potenzial

Nicht transformierte Zellen proliferieren, bis sie in Kontakt mit ihren Nachbarzellen treten und beenden anschließend den Proliferationsprozess. Der Verlust dieser sogenannten Kontaktinhibition ist eines der charakteristischen Merkmale transformierter Zellen. In der Mausfibroblastenzelllinie NIH/3T3 lässt sich durch Infektion mit einem Onkogen eine Transformation und der damit verbundene Verlust der Kontaktinhibition herbeiführen (Jacobsen, Groth et al. 2002). Infolgedessen wachsen die transformierten Zellen in mehreren Schichten übereinander und bilden sogenannte Foci, welche im Focusbildungstest durch Kristallviolett färbung sichtbar werden.

Um den Einfluss von *DYRK2* auf diesen Prozess zu untersuchen, wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, NIH/3T3-Zellen mit virushaltigem Überstand von Phönix E-Zellen infiziert. Die retroviralen Konstrukte trugen entweder die 528 AS oder die 601 AS Isoform des *DYRK2* Gens beziehungsweise die kinaseinaktive KR-Mutante beider Isoformen. Als negative Kontrolle fungierte ein pLXSN *GFP* Konstrukt, als Positivkontrolle pLXSN *HER2*. Die virusbehandelten NIH/3T3 Zellen wurden 21 Tage in 4% FCS-haltigem DMEM Medium kultiviert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt.

Im darauf folgenden Fokusbildungstest konnte beobachtet werden, dass neben dem Onkogen *HER2* lediglich die 528 AS Variante des *DYRK2* Proteins onkogenes Potenzial besitzt, erkennbar durch die Bildung von Foci. In diesem Versuch zeigte die 601 AS Isoform und die kinaseinaktiven Mutanten kein onkogenes Potenzial. Hier konnte keine Focibildung beobachtet werden. Die Zellen verhielten sich somit vergleichbar mit der Negativkontrolle (*GFP*), die mit Überstand von pLXSN-*GFP* transfizierten Phönix E-Zellen infiziert wurde (siehe Abbildung 12 A).

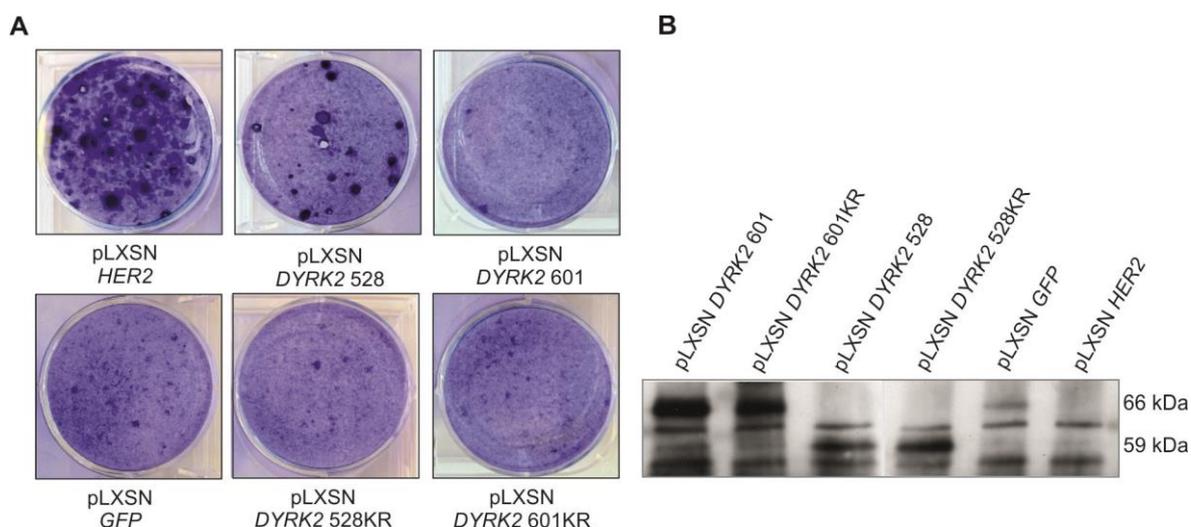


Abbildung 12 A: Foci nach Färbung mit Kristallviolett. HER2 diente als positiv-Kontrolle und GFP als negativ-Kontrolle. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Infektion ausgesät und 21 Tage in 4 % FCS DMEM Medium inkubiert, n=3 gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des Versuches. B: Immunpräzipitation von NIH/3T3 Lysaten 14 Tage nach viraler Infektion

5.1.4.3. Die lange *DYRK2* Isoform induziert Tumorwachstum von NIH/3T3-Zellen in immundefizienten Mäusen

Um das Tumorwachstum der *DYRK2* überexprimierenden NIH/3T3-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden diese Zellen in immundefiziente Mäuse implantiert. Für diese Arbeiten diente die lange *DYRK2* Isoform als DNS Konstrukt, da diese auch im humanen System dominant vorkommt. Parallel erfolgte die Implantation der als Kontrolle dienenden, vektor-transfizierten sowie *HER2*-überexprimierenden NIH/3T3-Zellen. Pro retroviral infizierte, polyklonale, stabile Zelllinie wurden je drei Mäusen in drei verschiedenen Zellkonzentrationen subkutan injiziert. Abbildung 13 A zeigt die Entwicklung der induzierten Tumore nach Injektion von 4×10^4 Zellen/Maus. Vektor-transfizierte NIH/3T3-Zellen waren nur in der höchsten Zellkonzentration in geringem Ausmaß in der Lage, Tumore zu bilden. Die *DYRK2* überexprimierenden Zellen wuchsen in allen Versuchstieren und allen Zellkonzentrationen zu Tumoren aus und übertrafen damit auch das Potenzial der *HER2* überexprimierenden Zellen. Es konnte demnach gezeigt werden, dass NIH/3T3-Zellen durch die Expression des *DYRK2*-Gens die Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* erlangen. Das *DYRK2*-Gen wurde somit als Proto-Onkogen klassifiziert.

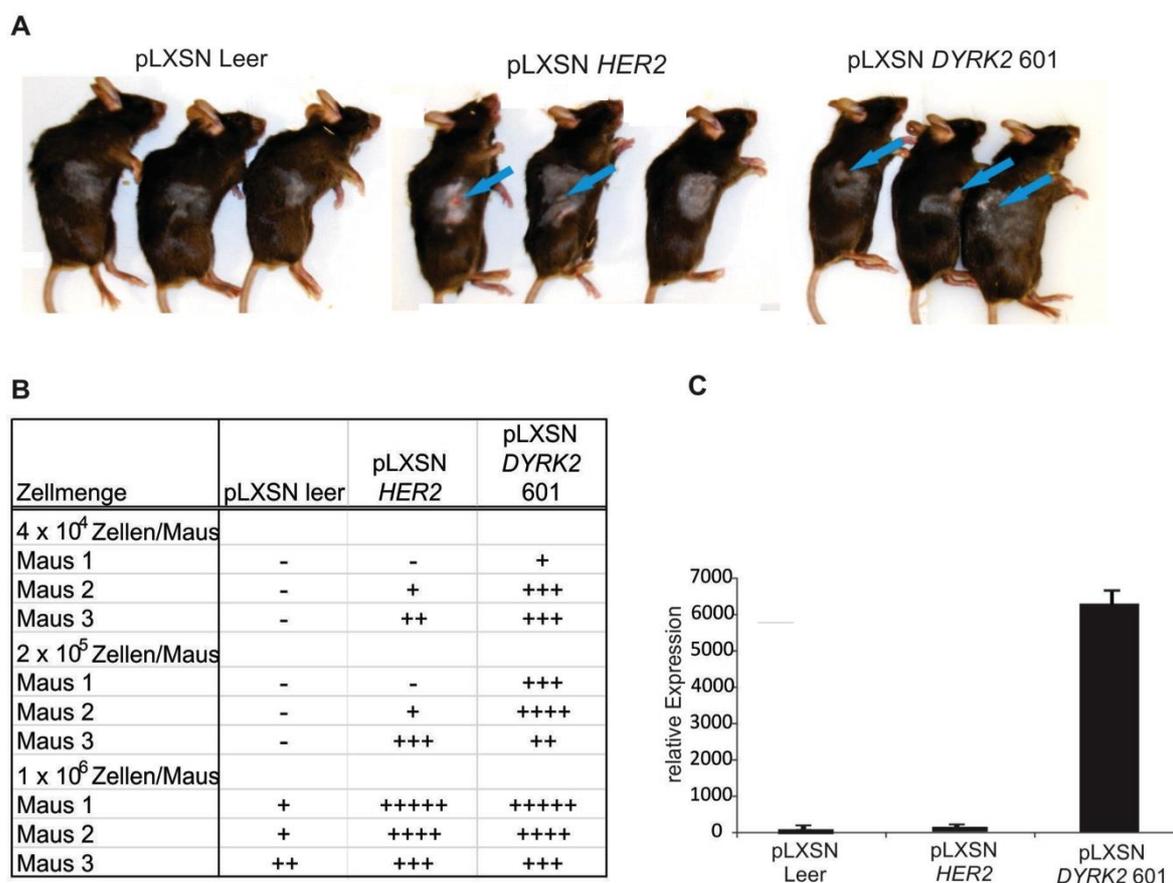


Abbildung 13 A Aufnahmen der Rag2^{-/-}, common g^{-/-} Mäuse, welche mit 4x 10⁴ Zellen der jeweiligen polyklonalen Zelllinien infiziert wurden B: Tabellarische Zusammenfassung der Tumorbildung in Mäusen C: Mittels Real Time PCR ermittelte DYRK2 Expression in den verwendeten polyklonalen Zelllinien

5.1.5 Funktionelle Untersuchungen der DYRK2 Kinase in MCF7 nach Überexpression

Die Suche nach den Angriffspunkten für gezielte Therapien beginnt mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen und der Identifikation der Signalwege in einem geeigneten Zellsystem. DYRK2 wurde als potenzieller Mitspieler im Krankheitsbild Krebs identifiziert. Daraufhin folgte der Versuch, in weiteren Experimenten dessen Eignung als Zielmolekül für eine mit „small molecule inhibitors“ durchgeführte Therapie zu validieren (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2).

Physiologische Untersuchungen wie Proliferations-, Invasions- und Wundheilungs-experimente geben einen guten Einblick in die Funktionsweise von Proteinen innerhalb einer Zelle und lassen damit Rückschlüsse auf den Einfluss des Proteins bei der Tumorbildung zu. Diese Art

der Vorgehensweise eignet sich besonders zur vergleichenden Untersuchung eines Proteins und seiner kinaseinaktiven Mutante.

Um die Funktion von *DYRK2* zu untersuchen, sind beide Isoformen und deren kinaseinaktiven Mutanten in der Brustkrebs-Zelllinie MCF 7 stabil überexprimiert worden. MCF7 ist eine Zelllinie, dessen p53 als nicht mutiert beschrieben ist (Komarova, Zelnick et al. 1997). P53 ist als Schlüsselenzym der Mitosekontrolle beschrieben, in vielen Tumoren verändert und als Interaktionspartner der *DYRK2* Kinase publiziert (Gwack et al). Das Expressionslevel von *DYRK2* in MCF7 liegt fünfmal höher als das endogene Level der nicht malignen Kontrollzelllinie.

5.1.5.1. *DYRK2* spielt eine Rolle in der Proliferationskapazität in MCF7 Zellen

Die Überexpression der *DYRK2* Isoformen in NIH/3T3 Mausfibroblasten erhöhte die Proliferationsfähigkeiten dieser Zellen um 20%, des Weiteren sank die Proliferationsgeschwindigkeit nach Überexpression der kinaseinaktiven Varianten. Um zu prüfen, ob diese Ergebnisse auf humane Krebszelllinien übertragen werden können, wurden MCF7 Zellen transfiziert und zu jedem Konstrukt drei monoklonale stabile Klone erzeugt. Ich erwartete, dass sich die humane Krebszelllinie homolog zu den Mausfibroblasten verhält. Überraschenderweise liefern die MCF7 Klone, welche das *DYRK2* Proteins tragen, zu den in NIH/3T3 gesammelten Daten konträre Ergebnisse. Die Überexpression der kinaseinaktiven Isoformen führt zu einer drastischen Erhöhung der Proliferationsrate, während sich die Klone, welche die Überexpressionen der Wildtypisoformen tragen, ähnlich verhalten wie die Zellklone, die nur den Leervektor exprimieren (siehe Abbildung 14 B).

Weiterhin wurde die verfügbare *DYRK2* mRNA in Wildtyp MCF7 Zellen reduziert. Die Zellen wurden mit siRNA, welche gegen *DYRK2* gerichtet ist behandelt und in FCS reduzierten Medium kultiviert. Hier konnte eine Verringerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle um 30% beobachtet werden (siehe Abbildung 14 C).

5.1.5.2. Die stabile Überexpression der kinaseinaktiven Isoformen in MCF7 erhöht die Geschwindigkeit des Wundheilungsprozesses

Zellen sind in der Lage, zugefügte Spalten in einem konfluenten Zellrasen zu schließen. Bei diesem Effekt spielen die Fähigkeiten der Zelle zur Proliferation und zur Migration eine entscheidende Rolle.

Pro Konstrukt sind drei verschiedene monoklonale Zelllinien erzeugt worden, welchen nach einem Zeitraum von 24 Stunden in serumfreien Medium (siehe Abschnitt 4.3.13) eine Wunde zugefügt wurde. Nach intensivem Waschen wurden die Zellen in 10% FCS haltigem RPMI Medium inkubiert und unter dem Mikroskop begutachtet. Hier konnte beobachtet werden, dass die Klone mit KR Mutation in der Lage sind, die zugefügte Wunde um ein Vielfaches schneller zu schließen (siehe Abbildung 14 D und E).

5.1.5.3. Die stabile Überexpression der kinaseinaktiven Isoformen in MCF7 erhöht die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum

Ein weiteres Merkmal transformierter Zellen ist deren Fähigkeit, ohne die Anhaftung an ein festes Substrat zu proliferieren. Um diese Eigenschaft *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Weich-Agar-Assay durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Agar-haltigem Zellkulturmedium ohne Anheftung an ein festes Substrat kultiviert. Abbildung 14 F und G zeigen repräsentative Zellkolonien der untersuchten Zelllinien, die im Laufe des Experiments entstanden sind. In den Zellkulturgefäßen der mit Leervektor beziehungsweise der wildtyp-*DYRK2* Isoformen transfizierten Zellen kam es nicht zur Bildung von Zellkolonien im Weich-Agar. Nur vereinzelt konnten Zwei- und Vierzellstadien beobachtet werden. MCF 7 Zellen, welche die Kinaseinaktiven *DYRK2* Isoformen überexprimieren, sind hingegen in der Lage, ohne Anheftung an die Kulturschale zu proliferieren und Kolonien im Weich-Agar zu bilden. Dabei verhalten sich beide Isoformen ähnlich in Bezug auf die Größe der Kolonien und die Häufigkeit. Durch die Expression der kinaseinaktiven Variante des *DYRK2* Gens erhalten die MCF7-Zellen somit die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum.

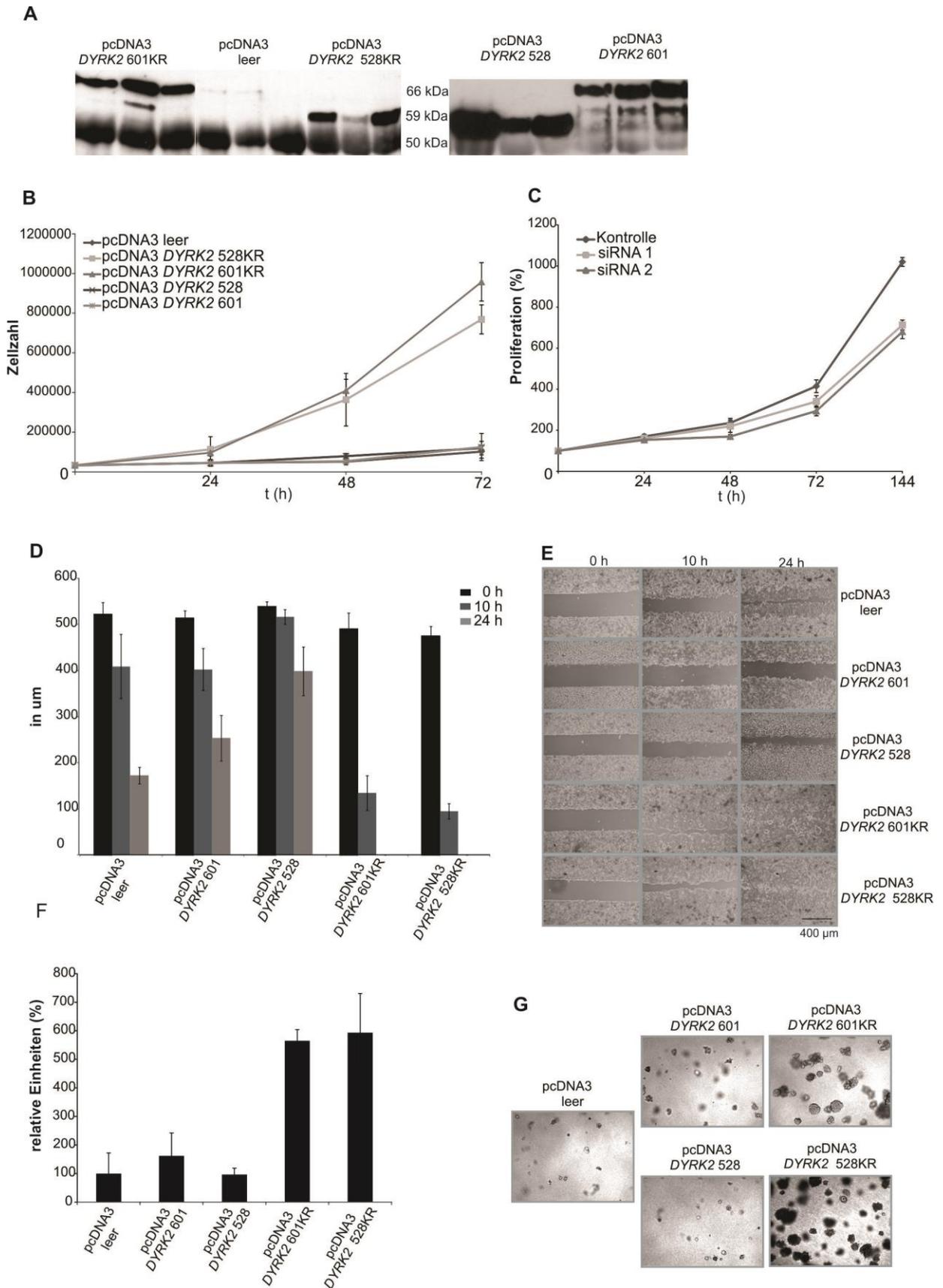


Abbildung 14: A: Immunpräzipitation der verwendeten DYRK2 Klone
B: Zellwachstum der DYRK2 Klone, wobei jeweils drei verschiedene Klone pro Konstrukt verwendet wurden. Gezeigt ist der Mittelwert aus n=3 Experimenten +/- Standardabweichung.

C: ATP Assay nach transienten Knock-down mit zwei verschiedenen siRNS gegen *DYRK2* und einer FCS-Konzentration von 4%. Gezeigt ist der Mittelwert aus n=2 Experimenten +/- Standardabweichung.

D: Wundheilungsexperiment der *DYRK2* Klone, wobei jeweils drei verschiedene Klone pro Konstrukt verwendet wurden. Gezeigt ist der Mittelwert aus n=3 Experimenten +/- Standardabweichung.

E: Repräsentative Mikroskopische Aufnahmen aus dem Wundheilungs-experimenten

F: Weich-Agar Formations Experiment der *DYRK2* Klone, wobei jeweils drei verschiedene Klone pro Konstrukt verwendet wurden. Gezeigt ist der Mittelwert aus n=2 Experimenten +/- Standardabweichung.

G: Repräsentative Mikroskopische Aufnahmen aus den Soft Agar Formations-experimenten

5.1.5.4. Eine Veränderung der *DYRK2* Expression führt zu morphologisch veränderten Wachstum

Während der Embryonalentwicklung können Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie ihre Zellkontakte auflösen und Adhäsionsmoleküle herunterregulieren. Die Zellen wachsen nicht mehr in den für Epithelzellen typischen Clustern und strecken sich, dadurch können die Zellen nun migrieren und die Basalmembran passieren. In ihrem Zielgebiet angekommen können sie sich zu verschiedenen Zellen oder wieder zu Epithelzellen differenzieren. Auch bei der Metastasierung von Tumoren kommt es zu einem Phänotypwechsel, bei dem die Tumorzellen ihre Morphologie und ihre zellspezifischen Eigenschaften verändern oder verlieren und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen. Die Überexpression der kinaseinaktiven *DYRK2* Variante führt zu einer morphologischen Veränderungen in den untersuchten Zellen mit epithelialen Ursprung (MCF7 und A549), während die Maus-Fibroblasten (NIH3T3) nur auf die Überexpression von *DYRK2* mit einem Wachstum reagieren welches typisch ist für transformierte NIH3T3 Zellen (Kwon, Owa et al. 1998, Zheng, Machida et al. 2010) (siehe Abbildung 15).

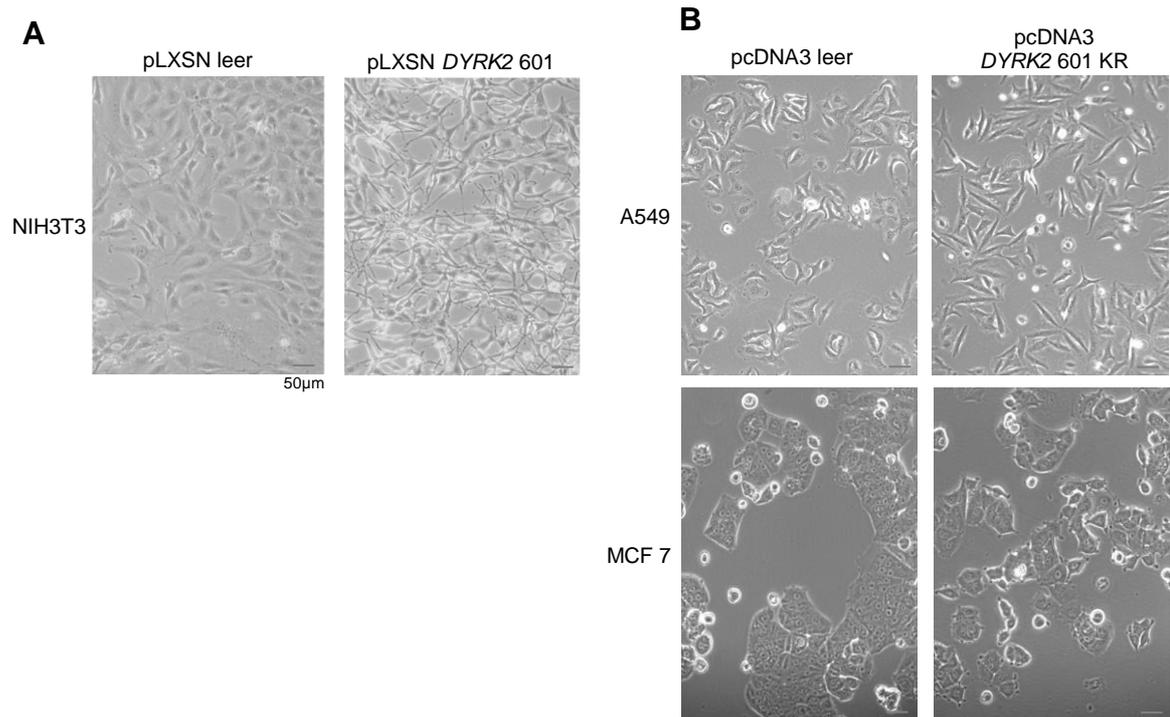


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von A: Polyklonale Maus-Fibroblasten (NIH3T3) welche die lange Isoform von DYRK2 und einem Kontrollvektor (pLXSN leer) exprimieren. B: Zellen epithelialen Ursprungs (A-549 und MCF 7) die einen Kontrollvektor (pcDNA3 leer) und die kinaseinaktive lange DYRK2 Isoform exprimieren.

5.2 Die Rezeptortyrosinkinasen AXL und MET als Zielmolekül für einen im Haus entwickelten niedrig molekularen Inhibitor

Die Rezeptortyrosinkinasen AXL und MET sind mehrfach (Zhang, Knyazev et al. 2008, Li, Ye et al. 2009, Canadas, Rojo et al. 2010) als geeignetes Zielmolekül für die Entwicklung einer Krebstherapie beschrieben. Mehrere MET Inhibitoren befinden sich in klinischen Phasen und auch an AXL Inhibitoren wird gearbeitet (Holland, Pan et al. 2010, Schoffski, Garcia et al. 2011).

Ziel dieser Untersuchung ist es, ein geeignetes *in vitro* Zellsystem zu finden, um die unter Patentnummer WO/2011/045084 (Ullrich, Torka et al. 2011) zusammengefassten SMI näher zu charakterisieren. Es sollte versucht werden, ein Zellsystem zu etablieren, welches abhängig von der AXL- beziehungsweise MET-Expression einen Phänotyp zeigt. Um die Abhängigkeit verschiedener Zellsysteme von der AXL- beziehungsweise MET- Expression zu untersuchen, sollten siRNS induzierte Knock-down Experimente durchgeführt und der Effekt des Knock-down auf Proliferation, Migration und Invasion untersucht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, diesen AXL beziehungsweise MET abhängigen Phänotyp mithilfe verschiedener Inhibitoren zu blockieren.

5.2.1 Untersuchungen zur AXL und MET Expression in Melanom-, Lungenkrebs- und Brustkrebszelllinien

Im ersten Schritt wurden mRNA Expressionsdatensätze verschiedener Melanom- und Lungenkrebszelllinien mit in der Onlinedatenbank Oncomine befindlichen Datensätze aus Microarraystudien verglichen (Wagner, Punnoose et al. 2007). Auf Basis der dort dokumentierten Expressionsdaten wurden fünf Melanom- und zwölf Lungenkrebszelllinien ausgewählt und deren AXL- und MET- Expression mithilfe der Real Time PCR Technik validiert. Als Kontrollen wurden zwei als AXL exprimierend beschriebene Brustkrebszelllinien verwendet (Mackiewicz, Huppi et al. 2011) (Abbildung 16 A). Anschließend sind aus den zuvor untersuchten Zelllinien sieben Lungenkrebszelllinien aufgrund ihres Expressionsmuster ausgewählt und im Westernblot auf Vorkommen des AXL- und MET- Proteins untersucht worden. Diese Westernblotanalyse (Abbildung 16 B) wurde um die Lungenkrebszelllinie NCI-H446, welche in der Literatur nach MET Knock-down einen Proliferationsphänotyp zeigt (Wang, Lu et al. 2011), ergänzt. Weiterhin haben wir zwei Prostatakrebszelllinien DU 145 und PC 3, die im Zusammenhang mit AXL Expression beschrieben sind und den MET abhängigen Phänotyp des „Scatterings“ zeigen (Humphrey, Zhu et al. 1995, Jacob, Kalapurakal et al.

1999), in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Die in Abbildung 16 A und B gezeigten Analysen verdeutlichen, dass im Fall der getesteten Zelllinien keine klare Aussage über eine Korrelation von RNS Expression und Proteinexpression getroffen werden kann. Die Zelllinie LcLc 103H zeigt nur eine sehr geringe *AXL* Expression, jedoch ein starkes Proteinsignal im Western Blot. Die Lungenkrebszelllinien NCI-H1650 und NCI-H1975 weisen vergleichbare *MET* Expression auf mRNA Ebene auf und auch die *MET* Proteinmengen im Western Blot sind ähnlich. Beide Zelllinien unterscheiden sich aber in der Expression von *AXL*, dieses Ergebnis kann auch auf Proteinebene bestätigt werden. Tendenziell stellt sich die RNS Expression von *AXL* eher als zu niedrig dar, da wir in den Untersuchungen aufgrund der RNS Expression niedrigere Proteinlevel erwartet hätten. Diese Ergebnisse könnten auf eine ineffizientere Tag Man Sonde hinweisen oder auf eine vergleichsweise erhöhte Stabilität der *AXL* mRNA. Da für die zelluläre Funktion das Protein eine höhere Bedeutung trägt als die mRNA, erfolgte die Auswahl der Zelllinien, welche in den weiteren Untersuchungen verwendet werden, anhand ihrer Proteinexpressionsmuster.

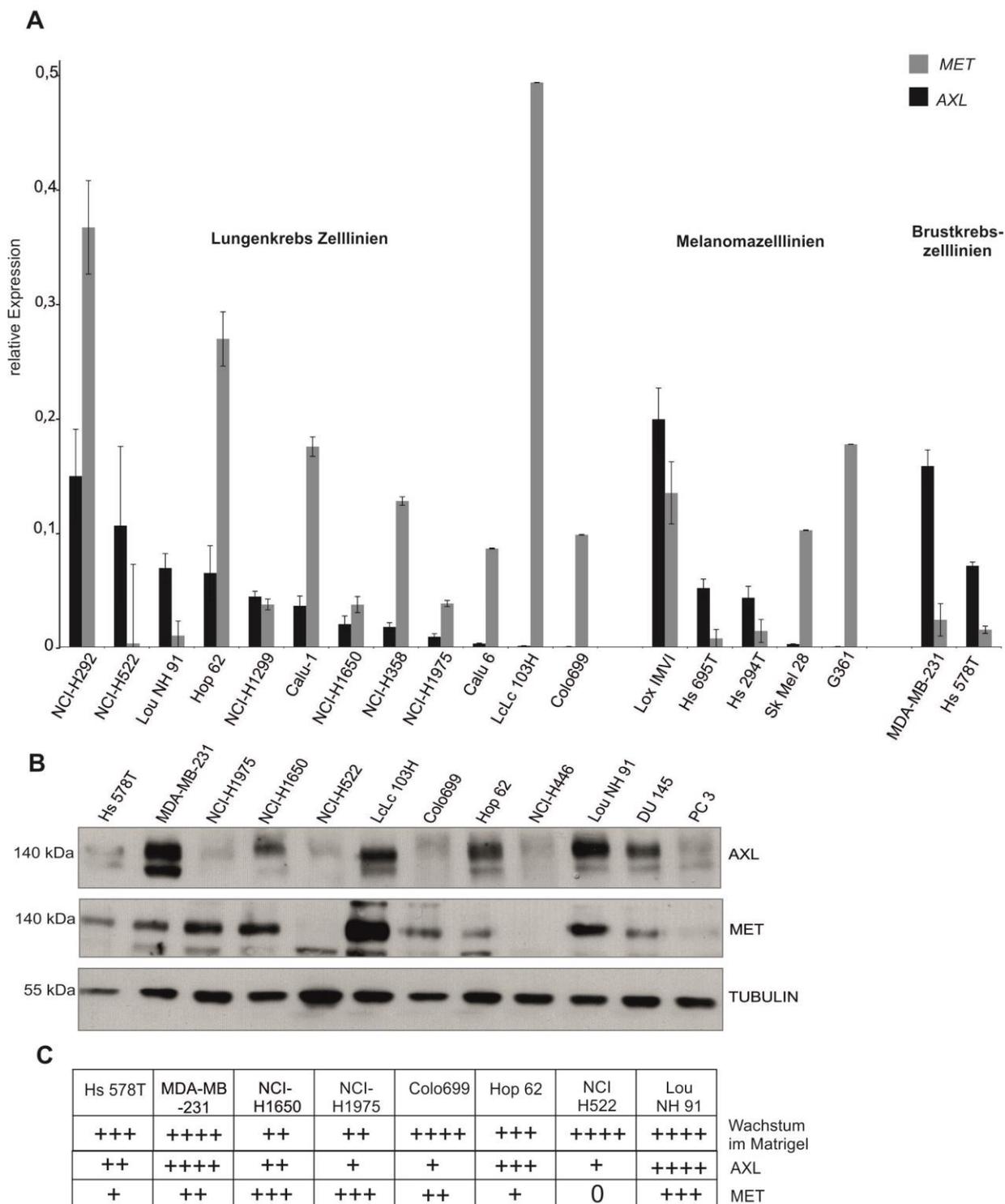


Abbildung 16: A: Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression, normalisiert auf GAPDH in Lungen-, Melanom- und Brustkrebszelllinien

B: Western Blot Analyse der Proteinexpression von AXL und MET in verschiedenen Krebszelllinien. Tubulin diente als Ladekontrolle.

C: Zusammenfassung der Branchingaktivität in Abhängigkeit von den AXL und MET Proteinmengen

5.2.2 Untersuchungen zum Potenzial von AXL und MET, raumforderndes Wachstum zu induzieren

Die Fähigkeit zur Migration und zur Invasion in das umgebende Gewebe sind Grundbedingungen des Metastasierungsprozesses und bilden somit hochpotente Angriffspunkte für eine erfolgreiche Krebstherapie. Einen Hinweis auf das invasive Potenzial von Zellen kann durch den sogenannten Branching Assay gewonnen werden. In diesem Experiment wird die Ausbildung von Zellausläufern und somit auch die Fähigkeit zur Degradation des umgebenden „Matrigels“ untersucht. Bei der Extrazellulärmatrix „Matrigel“ handelt es sich um ein Extrakt aus dem basalmembranreichen Engelbreth-Holm-Swarm Tumor, der neben natürlichen Basalmembranbestandteilen (Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat) auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β , EGF, IGF-1 und PDGF enthält (Negami and Tominaga 1989). Hierfür wurden Zellen ausgewählt, die sich in ihren AXL und MET Proteinleveln unterscheiden, auf einer Matrigel-Matrix ausgesät und in den folgenden 24 bis 48 Stunden hinsichtlich ihrer morphologischen Veränderungen beobachtet. Invasive Zellen sind im Stande, die Matrigelschicht aufzulösen und Ausläufer auszubilden. Weit voneinander entfernte Zellen können über ein Netz aus Zellausläufern miteinander Kontakt aufnehmen, doch ist diese Eigenschaft eher als gerichtete Migration zu werten.

Zu Beginn der Untersuchung wurden 18 Zelllinien mit unterschiedlicher AXL und MET Proteinexpression auf ihre Fähigkeit zum Wachstum in einer Matrigel-Matrix untersucht. Die Melanomzelllinien LoX IMVI, Hs 695T, Hs 294T, Sk Mel 28 und G361 sind unter den gewählten Versuchsbedingungen (siehe Abschnitt 4.3.16) nicht in der Lage, invasiv zu wachsen. Bei drei (Calu1, Calu6, und NCI-H358) von zehn getesteten Lungenkrebszelllinien lässt sich das Branching unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht induzieren, während die verbleibenden sieben Zelllinien (NCI-H1299, NCI-H1650, NCI-H1975, NCI-H522, Colo 699, Hop 62 und Lou NH 91) mit unterschiedlicher Intensität in das Matrigel einwachsen (Abbildung 16 C und 17 A). Die zwei untersuchten Brustkrebszelllinien MBA-MB-231 und Hs 578T sind ebenfalls in der Lage, den Branching Phänotyp auszubilden. Die Prostatakrebszelllinie PC 3 zeigt einen schwachen Branchingphänotyp, während die zweite Prostatakrebszelllinie DU 145 keine Ausläufer im Matrigel bildet. Eine klare Korrelation des Branching Phänotyps mit der Zelllinien spezifischen AXL- beziehungsweise MET Proteinexpression war nicht erkennbar. (Abbildung 16 C).

5.2.3 Ein siRNS induzierter Knock-down von AXL reduziert die Fähigkeit zur Bildung von Zellausläufern in einer extrazellulären Matrix

Um die Abhängigkeit der in Matrigel invasiv wachsenden Zelllinien von AXL und MET näher zu untersuchen, ist die mRNA Menge und somit auch die Proteinexpression (siehe Abbildung 16 B) von AXL und MET über einen siRNS induzierten Knock-down transient reduziert worden. Für die Versuche wurden im Matrigel invasive Zelllinien entsprechend ihrer AXL und MET Proteinexpression ausgewählt. Hierbei zeigten die Lungenkrebszelllinien Lou NH 91 und Colo699 und Hop 62 (Abbildung 17 A), obwohl diese sich in ihrer AXL Proteinexpressions stark unterscheiden, eine Reduktion der Branchingaktivität um mehr als 80%. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wies kein invasives Wachstum nach siRNS induzierten AXL Knock-down auf (Abbildung 17 A). Die Lungenkrebszelllinie NCI-H522 (Abbildung 17 A), welche im Western Blot nur ein sehr schwach detektierbares AXL Signal aufwies, zeigte keine Reaktion auf den AXL Knock-down bezüglich einer Veränderung ihrer Branchingaktivität ebenso wie die Lungenkrebszelllinie NCI-H1992 die trotz starken AXL Proteinsignal (Abbildung 19 A) keine Reduktion der Branchingaktivität nach Knock-down zeigt (Abbildung 17 A). Die getestete Prostatakrebszelllinie PC 3 zeigte ebenfalls keine Reduktion der Branchingaktivität. In den getesteten Zelllinien ist, trotz effektiven MET Knock-down (Abbildung 17 B), nur eine leichte Reduktion der Branchingaktivität zu beobachten. Der Effekt des siRNS induzierten MET Knock-downs auf den hier untersuchten Phänotyp liegt bei den analysierten Zelllinien unter 10% bezogen auf die Hemmung der Branchingaktivität (Abbildung 17 A).

5.2.3.1. Die als MET- Inhibitoren beschriebenen „small molecule inhibitor“ AMG und BMS zeigen weniger Potenzial, das invasive Wachstum in AXL abhängigen Zelllinien zu inhibieren, als die auf Sulfonamiden basierenden AXL/MET Inhibitoren

Um den Einfluss synthetischer Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten im Matrigel zu prüfen, wurden mehrere Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen in einer Reihe von Zelllinien im Branching Assay untersucht.

Um eine vergleichende Analyse vornehmen zu können, wurde diejenige Konzentration an SMI als spezifischer Wert verwendet, bei der 100% der Zellen kein Branching mehr zeigen (im Weiteren als IC₁₀₀ bezeichnet). In der Zelllinie NCI-H522 konnte mit den getesteten SMI (AMG, BMS, 84111) bei einer maximalen Konzentration von 12,5 µM kein IC₁₀₀ erreicht

werden. Die Zelllinie MDA-MB-231 hingegen zeigte ab einer Konzentration von 0,39 μM des AXL Inhibitors 84111 keinerlei Branchingaktivität mehr. In den Zelllinien die auf den Knock-down von AXL mit der Reduktion des Branchingaktivität reagieren, ist auch nach Inhibitorbehandlung eine Hemmung diese Phänotyps zu beobachten, während die Zelllinie die keine Reaktion auf den Knock-down zeigt auch keine Phänotypveränderung nach der Behandlung mit den AXL-spezifischeren Inhibitoren zeigt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 17 C tabellarisch zusammengefasst.

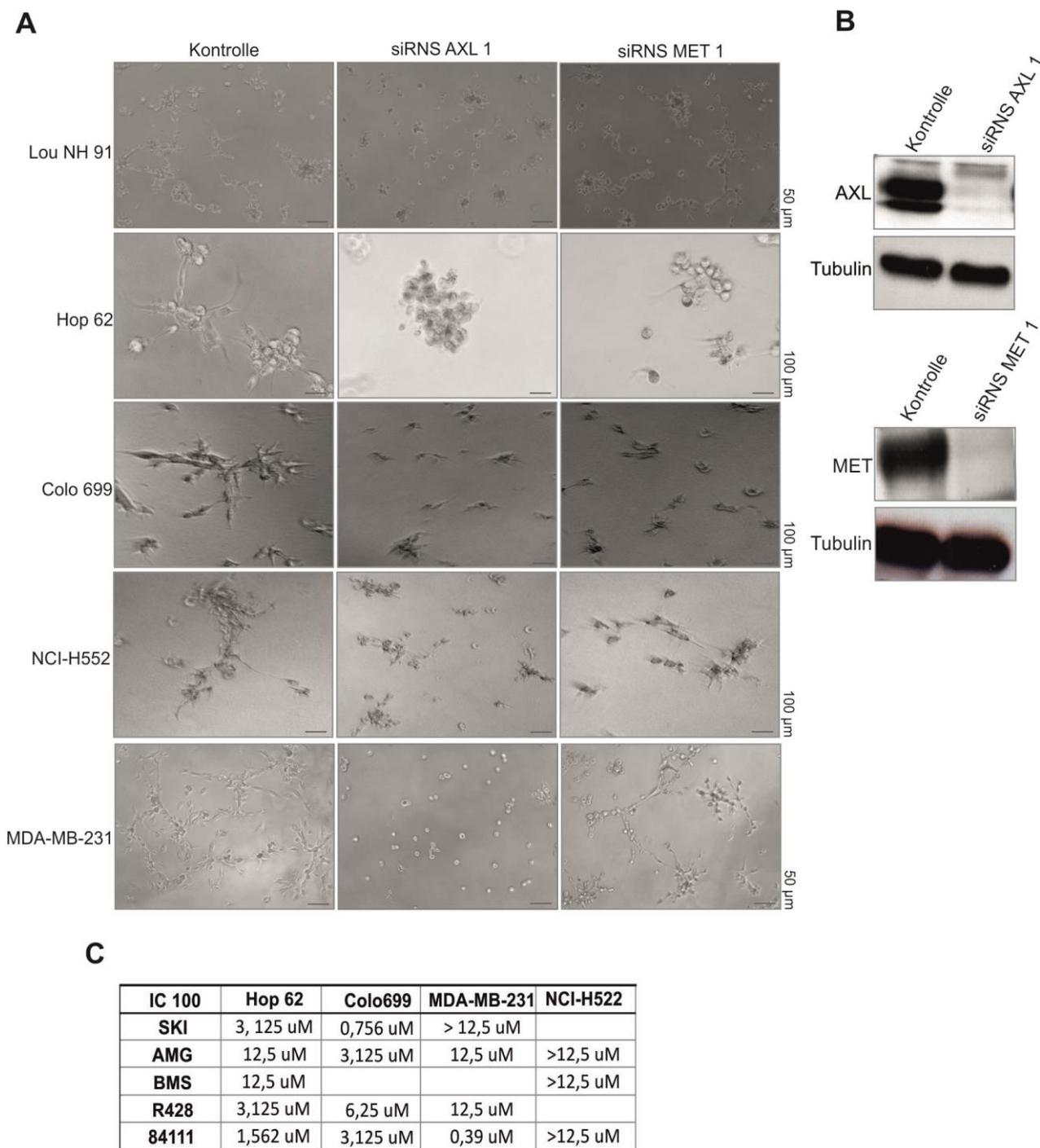


Abbildung 17 A: Auf einer mit 3 mg/ml konzentrierten Matrigel beschichteten 96-Lochplatte wurden jeweils 5000 Zellen 48 Stunden nach siRNS Behandlung in RPMI/0% FCS ausgesät. Als Kontrolle dienen mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Versuchszellen wurden mit AXL oder MET siRNS transient transfiziert und ebenfalls 48 Stunden später in RPMI/0% FCS ausgesät.

B: Western Blot Analyse der Knock-down Effizienz in MDA-MB-231 Zellen

C: Zusammenfassung der Branchingaktivität nach Inhibitorbehandlung

5.2.4 AXL inhibiert die Proliferation von Lungenkrebszelllinien

Um den Einfluss von AXL auf die Proliferation von Krebszellen zu untersuchen, wurde in verschiedenen Zelllinien ein siRNS induzierter Knock-down von AXL erzeugt. Im Anschluss wurden die Zellen 96 Stunden mit 10 % FCS im Medium kultiviert und in regelmäßigen Abständen ausgelesen. Für die Auswertung dieser Experimente diente die metabolische Aktivität als ein Maß für proliferierende Zellen. Mithilfe eines Lumineszenz Assays, welcher in der Lage ist, den ATP Gehalt der Zellen anzuzeigen, sind diese Wachstumsversuche anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet worden.

Nach Kontrolle eines effektiven Knock-downs mittels Westernblot (Abbildung 19 A) konnte in den zwei getesteten Brustkrebszelllinien (Hs 578T und MDA-MB-231) nur in den MDA-MB-231 Zellen eine Reduktion der Proliferation um 15% zum Ende der Messung gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Weiterhin wurden zwei Prostatakrebszelllinien (PC 3 und DU 145) nach AXL Knock-down im ATP Assay getestet. Es war keine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität nach AXL Knock-down zu erkennen (siehe Abbildung 19 G und F).

In den fünf getesteten Lungenkrebszelllinien wiesen vier Zelllinien eine deutliche Proliferationsinhibition nach AXL Knock-down auf. Die Zelllinie Colo699 zeigte eine Inhibition der Proliferation um 75%, bei Hop 62 Zellen ließ sich die Proliferation mittels AXL Knock-down um 95% reduzieren. Die Zelllinien NCI-H1993 und NCI-H1299, welche ebenfalls eine deutliche Reduktion der Proliferation aufwiesen, sind in Abbildung 19 B und C abgebildet. NCI-H522 zeigte auch nach 96 Stunden Wachstum in diesem Experiment keine Reaktion auf den Knock-down von AXL. Krebszelllinien deren Ursprung im Lungengewebe liegt zeigen eine deutliche Proliferationsreduktion nach AXL Knock-down während diese Proliferationshemmungen über 50% in Zelllinien anderen Ursprungs nicht beobachtet werden konnte. Diese Daten geben einen Hinweis auf einen gewebespezifischen Effekt von AXL.

Die siRNS induzierte Inhibition von MET in der Zelllinie NCI-H1993, welche einen MET-abhängigen Proliferationsphänotyp zeigt (Kubo, Yamamoto et al. 2009, Gentile, Lazzari et al. 2011) und der Lungenkrebszelllinie Hop 62 verursachte eine Verringerung der Proliferation nach 96 h um 40-bzw 75%. In den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und Hs 578T konnte keine Wachstumsinhibition beobachtet werden. Somit ist der MET Effekt auf die Neubildung von Zellen in den untersuchten Zelllinien geringer als die Proliferationsinhibition nach AXL Knock-down.

Bei der simultanen Inhibition von AXL und MET konnte trotz effektiven Knock-down (Abbildung 18 B) keine additiven Auswirkungen auf die Proliferation nachgewiesen werden (Abbildung 18 A).

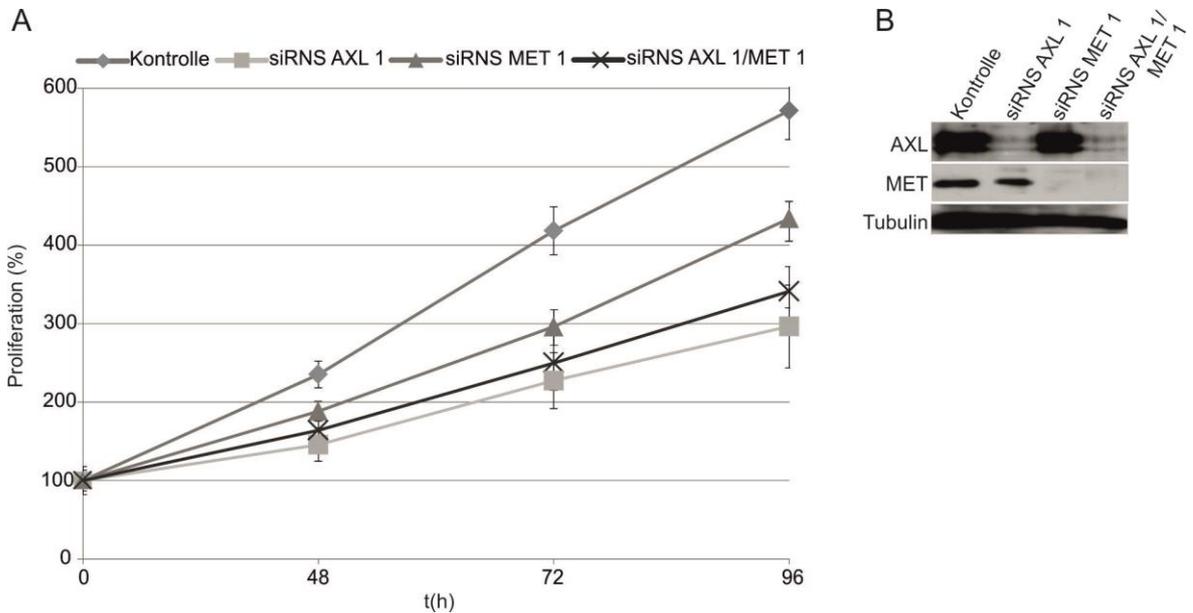


Abbildung 18: Proliferation von Hop 62 Zellen nach siRNS induziertem Knock-down. **A:** ATP Assay von Hop 62 Zellen nach Behandlung mit 1 gegen AXL gerichteten siRNS, 1 gegen c-MET gerichteter siRNS und die Kombination beider siRNS im simultanen Doppel-Knock-down. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=2. **B:** repräsentative Western Blot Analyse von Hop 62 Zellen; die Zellyse erfolgte 72 Stunden nach Transfektion. Tubulin diente als Ladekontrolle.

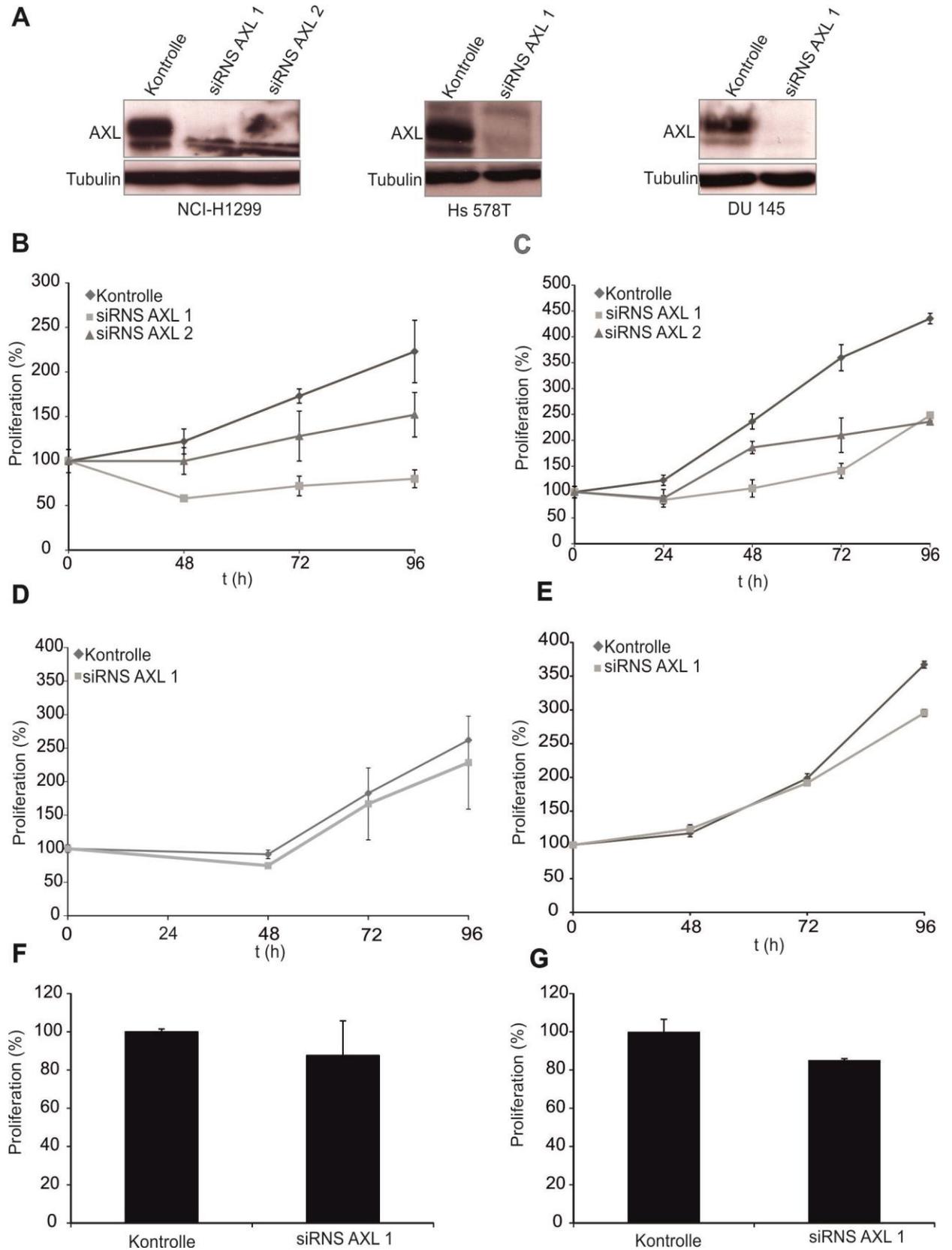


Abbildung 19: Proliferation von Krebszelllinien nach siRNS induziertem AXL Knock-down

A: repräsentative Western Blot Analyse der Zelllinien NCI-H1299, Hs 578T und DU 145; die Zellyse erfolgte 72 Stunden nach Transfektion. Tubulin diente als Ladekontrolle.

B: ATP Assay von NCI-H1993 Zellen nach Behandlung mit 2 gegen AXL gerichteten siRNS. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=3.

C: ATP Assay von NCI-H1299 Zellen nach Behandlung mit 2 gegen AXL gerichteten siRNS. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=3.

D: ATP Assay von Hs 578T Zellen nach Behandlung mit 1 gegen AXL gerichteten siRNS. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen Die Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=2.

E: ATP Assay von MDA-MB-231 Zellen nach Behandlung mit 1 gegen AXL gerichteten siRNS. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Resultate sind Mittelwerte +/- Standardabweichung; n=2.

F: ATP Assay mit einer gegen AXL gerichteten siRNS in PC3. Die Resultate sind Mittelwerte nach 96 Stunden Wachstum +/- Standardabweichung; n=2.

G: ATP Assay mit einer gegen AXL gerichteten siRNS in DU 145. Die Resultate sind Mittelwerte nach 96 Stunden Wachstum +/- Standardabweichung; n=2.

5.2.4.1. Vergleichenden Untersuchungen zum proliferationshemmenden Effekt zwischen den im Haus entwickelten SMI's und zwei Kontroll-Inhibitoren

Um den Einfluss synthetischer Inhibitoren auf die Proliferation zu prüfen, wurden vier Inhibitoren in verschiedenen Zelllinien im ATP-Assay untersucht. (siehe Abbildung 20).

Die Lungenkrebszelllinie NCI-H1993, welche nach dem AXL Knock-down kaum mehr Proliferation zeigt, wird auch von den fünf Inhibitoren zuverlässig in Ihrem Wachstum gehemmt. Hop 62, die nach AXL Knock-down immerhin eine Proliferationsinhibition von 50 % zeigt, zeigt eine über 10% Proliferationsinhibition bei den Kontrollinhibitoren AMG und BMS (Abbildung 20 A und B) erst ab einer Konzentration von 0,781 μM , während bei den im Haus entwickelten Inhibitoren 84111, 84578 und 93230 (Abbildung 20 C, D und E) in diesem Konzentrationsbereich eine Proliferationshemmung von 50 % erreicht wird. Weiterhin konnte gezeigt werden das auch die proliferationshemmenden Effekte in den beiden verwendeten Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und Hs 578T mit unseren Inhibitoren stärker ausgeprägt ist (siehe Abbildung 20) eine Proliferationsreduktion um 50 % wird bei Inhibitorkonzentrationen deutlich unter 10 μM erreicht. Die untersuchten Inhibitoren hemmen die Proliferation – wobei die MET-Inhibitoren BMS und AMG in den beiden untersuchten Brustkrebszelllinien ihren IC_{50} nur in einer Konzentration von über 10 μM erreichen. Auch die zweite verwendete Lungenkrebszelllinie (Hop 62) ist im Gegensatz zur Zelllinie NCI-H1993 eher insensitiv gegenüber den MET-Inhibitoren. Die im Haus entwickelten Inhibitoren hemmen die Proliferation deutlich früher, auch hier erreichen die Lungenkrebszelllinien Hop 62 und NCI-H1993 eine Proliferationsreduktion um 50 % bei Inhibitorkonzentrationen deutlich unter 10 μM .

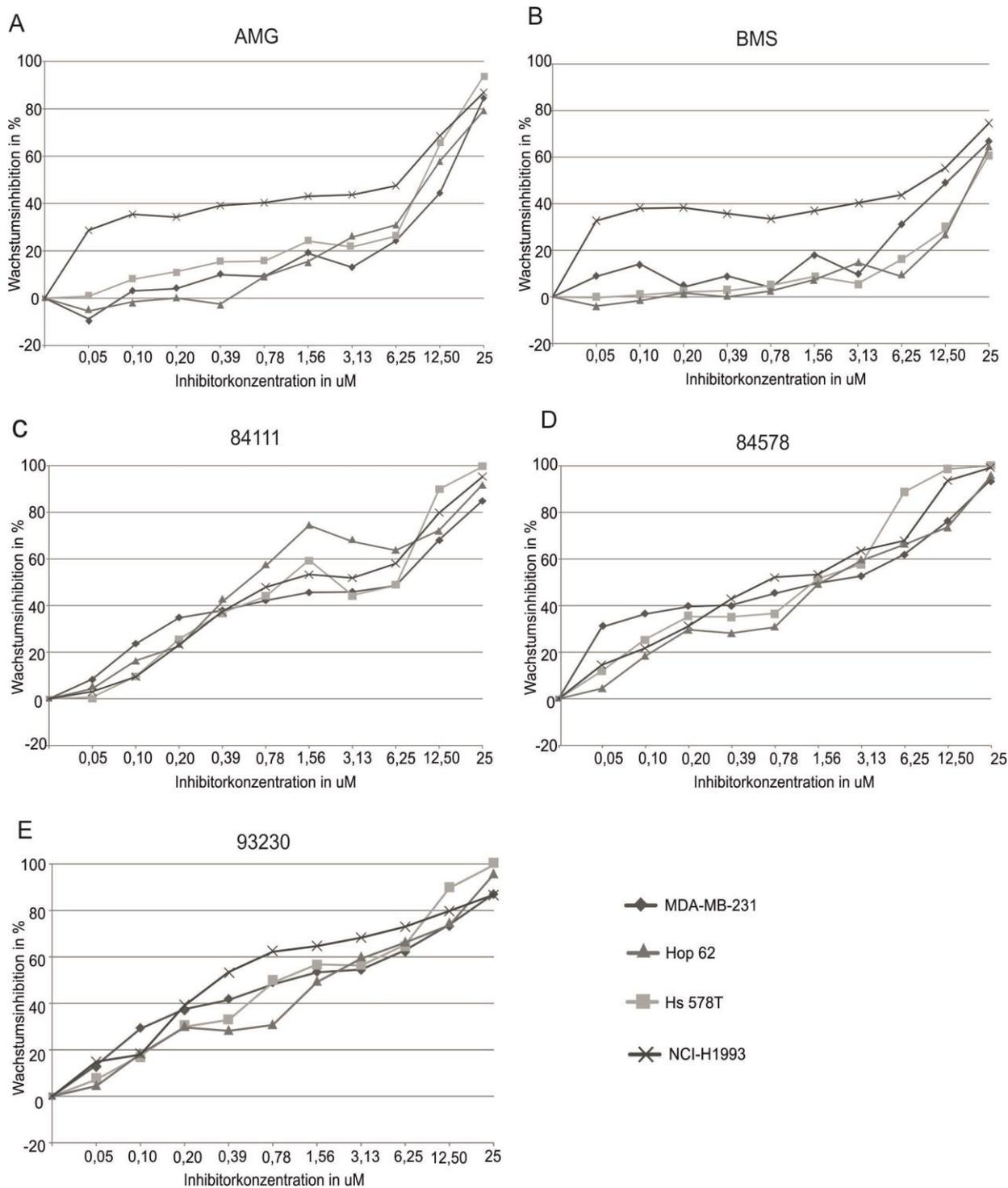


Abbildung 20: Proliferation von Krebszelllinien nach Inhibitorbehandlung ATP Assay von NCI-H1993, Hop 62, Hs 578T und MDA-MB-231 Zellen. Die Aussaat erfolgte in Triplikaten. 16 Stunden nach der Aussaat wurde das Medium gegen Medium mit in DMSO gelöstem Inhibitor ausgetauscht und der Assay nach weiteren 72 Stunden beendet. Die gezeigten Resultate sind Mittelwerte aus n=2. A: Inhibitor AMG B: Inhibitor BMS C: Inhibitor 84111 D: Inhibitor 84578 E: Inhibitor 93239

5.2.5 In den Lungenkrebszelllinien NCI-H1299 ist AXL am Migrationsprozess beteiligt

Unter Migration versteht man die aktive Lokomotion von Zellen, wobei diese Bewegung ungerichtet oder auch gerichtet, zum Beispiel in Richtung eines Chemoattraktanten, erfolgen kann. In einem mehrzelligen Organismus migrieren nur bestimmte Zelltypen. Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten oder Bindegewebszellen wie Fibroblasten, sind zur Migration fähig. Die Fähigkeit zur Migration fördert allerdings auch die Metastasierung von Tumorzellen. Die hier untersuchten Karzinomzelllinien sind epithelialen Ursprungs. Epitheliale Strukturen sind im gesunden Organismus invasions- und migrationsgehemmt. Die Entthemmung dieses Prozesses ist ein Charakteristikum vieler Karzinome, die einen Großteil solider Tumore in der Onkologie ausmachen.

Um den Einfluss von AXL auf die Migration zu untersuchen, wurden NCI-H1299 Zellen mit siRNS behandelt und 48 Stunden nach der Transfektion in Transwell Assay untersucht (siehe Abschnitt 4.3.14 Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach weiteren 16 Stunden. Die Migration erfolgte gegen 10% FCS haltiges Standardmedium. In Zellen mit reduzierten AXL Expression wurde eine Inhibition der gerichteten Zellmigration um 75 % beobachtet – verglichen mit unbehandelten beziehungsweise der mit Kontroll siRNS behandelten Zellen (siehe Abbildung 21 A und B).

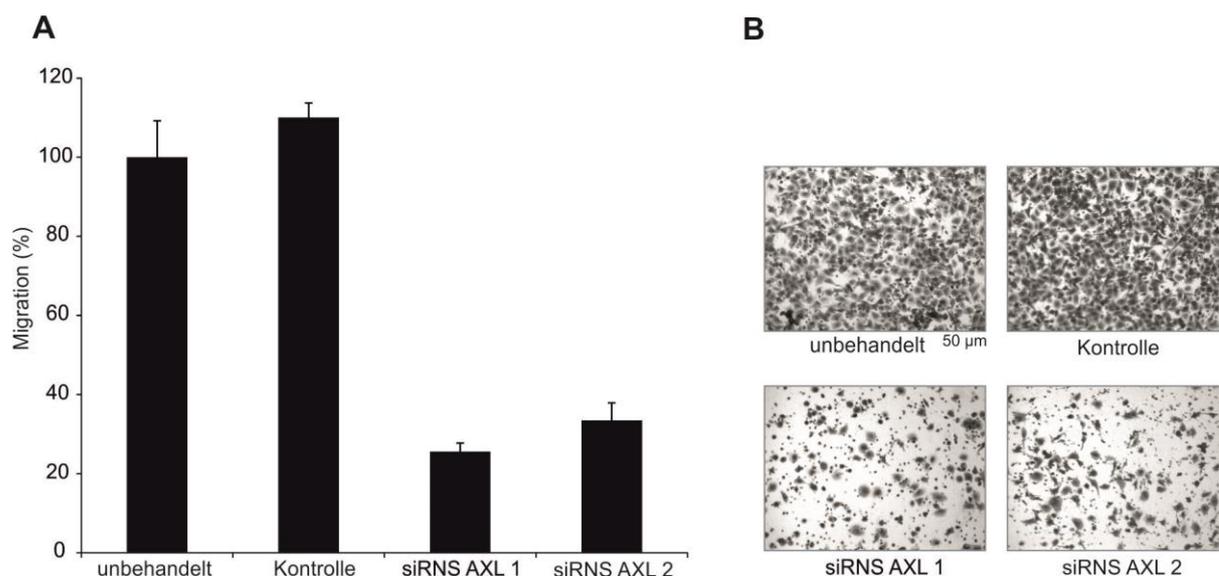


Abbildung 21: Je $6,5 \cdot 10^5$ NCI-H1299 Zellen wurden 48 Stunden nach Behandlung mit 2 gegen AXL gerichteten siRNS auf Polykarbonatmembranen in Zellkultureinsätzen (Falcon Cell Culture Inserts, Falcon, U.K.) in RPMI/0% FCS ausgesät. Als Kontrolle dienten mit Block-iT Alexa Flour Red siRNS transient transfizierte Zellen. Die Migration erfolgte innerhalb der folgenden 16 Stunden in Richtung von 10% FCS haltigem RPMI Medium welches sich in der unteren Kammer befand. Migrierte Zellen auf der Unterseite der Membran wurden mit Kristallviolett angefärbt und mikroskopisch begutachtet.

A: Densitometrische Auswertung des Transwell Assays; Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=3$ Experimenten bezogen auf den als 100% gesetzten Wert der unbehandelten Kontrolle.

B: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen aus dem Transwell Assay

5.2.5.1 AMG und BMS inhibieren das MET abhängige „Scattering“ effektiver als die untersuchten Sulfonamide

Neben der unter 5.2.5 untersuchten gerichteten Migration spielt auch die ungerichtete Migration im Metastasierungsprozess eine wichtige Rolle. Der Ligand des c-MET Rezeptors, welcher unter dem Begriff „Hepatocyte growth factor (HGF)“ beziehungsweise „scatter Faktor (SF)“ bekannt ist, wird überwiegend auf epithelialen Zellen exprimiert (K. Michael Weidner 1993) und gilt im Krebsystem als Regulationsmechanismus für den Metastasierungsprozess (Lesko E 2008). Die strukturelle Ähnlichkeit der ATP Bindungstaschen der AXL- und MET Rezeptortyrosinkinasen führt dazu, dass SMI gegen diese Rezeptortyrosinkinasen meistens in der Lage sind, die Phosphorylierung von AXL und MET zu hemmen. Um die untersuchten Inhibitoren auf ihr Potenzial in Bezug auf die Hemmung von AXL und MET hin zu charakterisieren, wurden sie in einem MET abhängigen Zellsystem verglichen.

Ein Beispiel für ungerichtete Migration ist „scattering“. Hierbei bewegen sich in epithelialen Zellen, welche unter Zellkulturbedingungen in Clustern wachsen, nach Stimulation mit HGF/SF ungerichtet voneinander weg. Die Stimulation von Zellen mit HGF/SF führt zu einer

Phosphorylierung von MET. Inhibiert man das MET Protein über einen siRNS induzierten Knock-down wird auch nach HGF Stimulation der Phänotyp des „scatterings“ nicht mehr ausgelöst, während nach AXL Knock-down die Zellen diese Fähigkeit nicht verlieren (Abbildung 23 G).

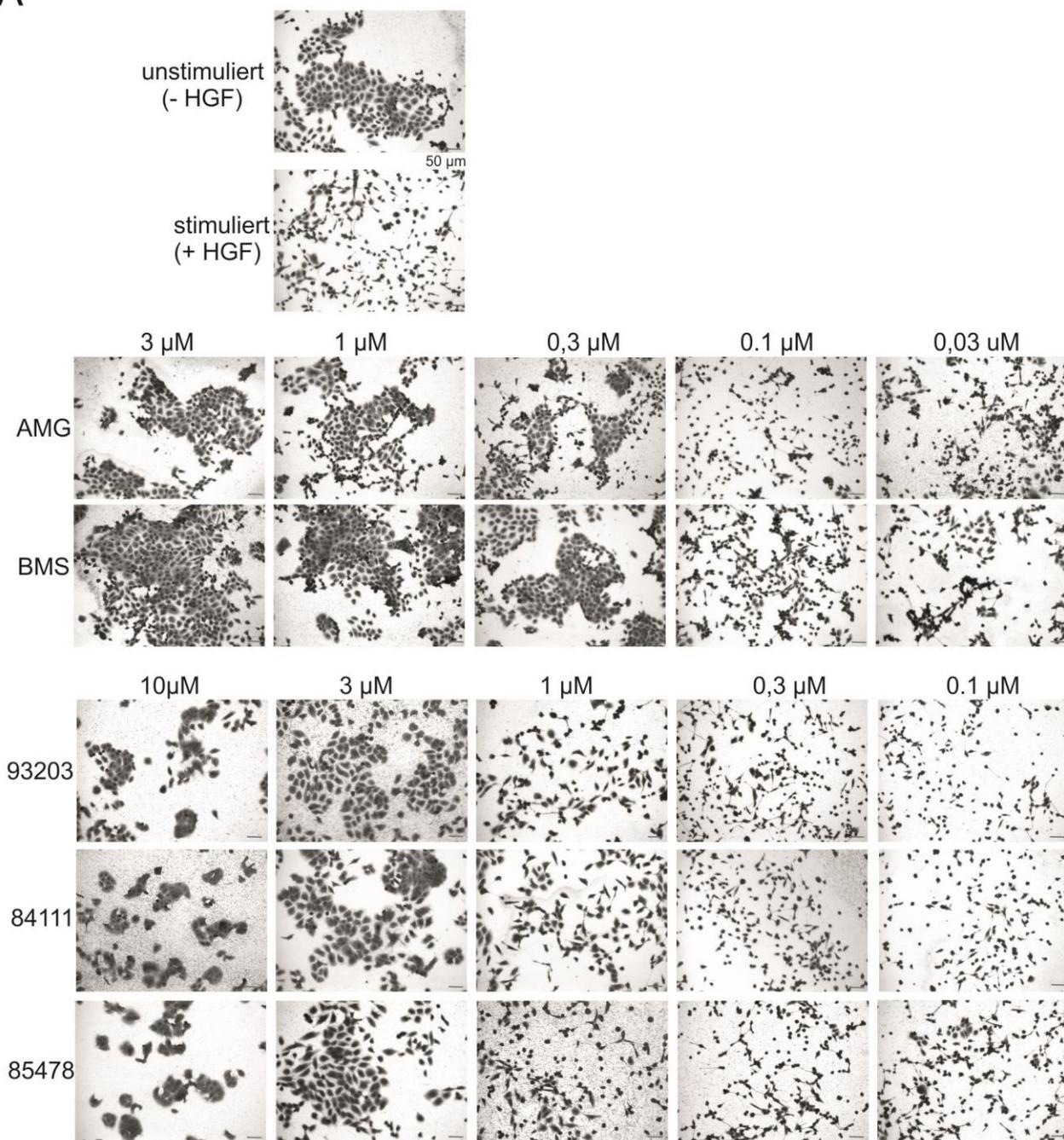
Um das Potenzial der Inhibitoren, den MET abhängigen Phänotyps des Scatterings zu hemmen untersuchen zu können, wurden die Prostatakrebszelllinien DU 145 und PC3 verwendet. Lungenkrebszelllinien haben die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) schon durchlaufen, und wachsen in losen Zellverbänden. Um den Einfluss der Inhibitoren auf den Scatteringphänotyp darstellen zu können, musste auf Zellen ausgewichen werden welche die Eigenschaften von Epithelzellen, in den für sie typischen Clustern zu wachsen, zeigen. DU 145 und PC3 Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Parallel dazu sind die Zellen mit 50 nM pro ml HGF stimuliert worden, um das Scattering auszulösen.

In der Prostatakrebszelllinie DU 145 konnte das Scattering bei Konzentration von 300 nM pro Milliliter AMG und BMS vollständig unterbunden werden. Die Sulfonamide benötigten zum Erzielen desselben Effektes Inhibitorkonzentration von 3 µM pro Milliliter, wobei festzuhalten ist das sich die Morphologie der DU 145 Zellen verändert, sie erscheinen Größer und die Zellränder verlieren ihre glatte Textur (Abbildung 22 A). Die PC3 sind insensitiver in Bezug auf die Inhibition des scatterings durch die SMI's, allerdings sind auch hier die Sulfonamide um den Faktor zehn schlechter als die als MET Inhibitoren publizierten AMG und BMS (siehe Abbildung 21 A und B).

Vergleicht man anschließend den Phosphorylierungsstatus des zellulären MET Signals nach SMI Behandlung und HGF Stimulation kann man erkennen, dass für eine Blockierung der MET Phosphorylierung in den PC3 Zellen höhere SMI Konzentrationen benötigt werden als in den DU 145 Zellen (siehe Abbildung 23 A-E). Die Blockierung der MET Phosphorylierung korreliert mit der Blockierung des „scatterings“.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die untersuchten SMI in PC3 Zellen in der Lage sind, die Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur HGF stimulierten Kontrolle anzuregen (siehe Abbildung 23 C). In den DU 145 Zellen wird mit Gabe von AMG und BMS auch die AKT Phosphorylierung inhibiert, wohingegen die Sulfonamide 84111 und 93230 eher stimulierend wirken (Abbildung 23 B und D). Hierbei ist festzuhalten dass der Phänotyp des „Scatterings“ in den untersuchten Zelllinien unabhängig vom p-AKT Status ist.

A



B

DU 145	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	PC 3	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM
AMG	blockiert	blockiert	blockiert	blockiert	scattering	AMG	blockiert	blockiert	blockiert	scattering	scattering
BMS	blockiert	blockiert	blockiert	blockiert	scattering	BMS	blockiert	blockiert	blockiert	scattering	scattering
93230	blockiert	blockiert	scattering	scattering	scattering	93230	blockiert	scattering	scattering	scattering	scattering
84111	blockiert	blockiert	scattering	scattering	scattering	84111	blockiert	scattering	scattering	scattering	scattering
84578	blockiert	blockiert	scattering	scattering	scattering	84578	blockiert	scattering	scattering	scattering	scattering

Abbildung 22: Scatteringassay nach Inhibitorbehandlung

A: Mikroskopische Darstellung von DU 145 nach der Behandlung mit SMI's. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit den angegebenen Konzentrationen an Inhibitor behandelt und nach weiteren 12 h mit 50 nM rekombinanten HGF inkubiert um das scattering auszulösen. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten weitere 12 h später.

B: Tabellarische Zusammenfassung der „Scattering“ Inhibition durch verschiedene SMI's.

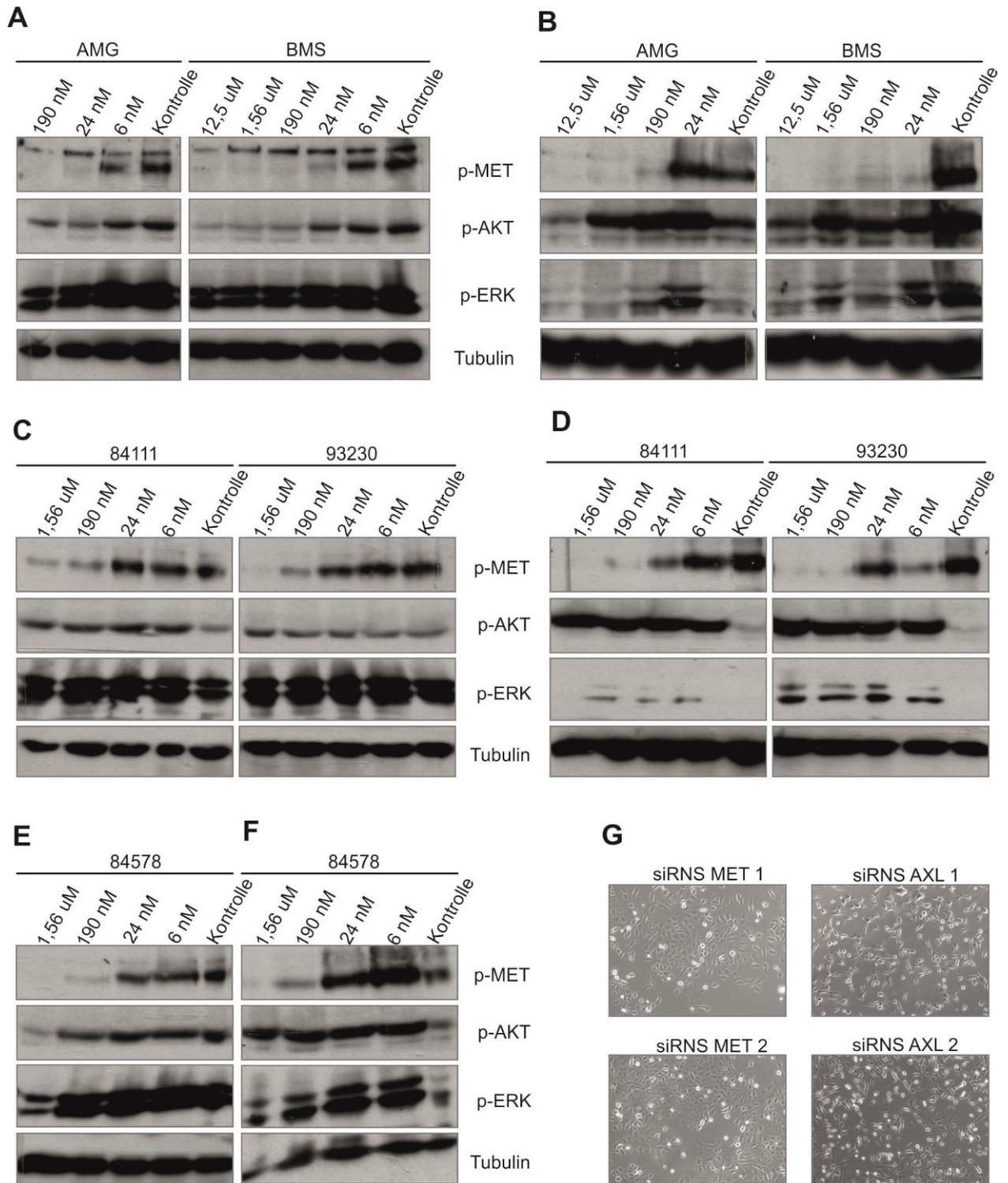


Abbildung 23 : Analyse des Phosphorylierungsstatus zweier Prostatakrebszelllinien nach Behandlung mit verschiedenen SMI's.

Die Prostatakrebszelllinien DU 145 (abgebildet in A, C und E) und PC3 (gezeigt in B, D und F) wurden 24 Stunden nach Aussaat 1 h mit den angezeigten Konzentrationen an SMI's behandelt, als Kontrolle diente DMSO, anschließend wurden die Zellen 20 Minuten mit 50 nM rekombinanten HGF und 10% FCS stimuliert um die Phosphorylierung zu induzieren. Nach der Zellyse erfolgte eine Westernblot Analyse. G: DU 145 Zellen wurden 24 h nach siRNS Behandlung 12 Stunden mit 50 nm HGF behandelt um das „Scattering“ auszulösen, repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

6. Diskussion

Im Jahr 2013 erkrankten in den USA 0,52 Prozent der Einwohner an Krebs; 0,18 Prozent der Amerikaner sind 2013 an Krebs gestorben (American-Cancer-Society 2013). In Deutschland gab es 2013 490000 (0,61 Prozent der Gesamtbevölkerung) Krebsneuerkrankungen und 221000 krankheitsbedingte Todesfälle (Deutsche-Krebshilfe 2013) – das heißt, dass 25 Prozent der jährlichen Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland auf Krebserkrankungen zurückzuführen sind.

Durchschnittlich stirbt jeder dritte Patient an den Folgen seiner Krebserkrankung. Doch die Behandlungsmethoden entwickeln sich stetig weiter, sodass für einige Krebserkrankungen bei früher Diagnose die Heilungschancen bis zu 80 Prozent betragen. Mit dem Wissensfortschritt im Bereich der Grundlagenforschung steigen so auch die Möglichkeiten, schwere Erkrankungen zu behandeln. Die moderne Molekularbiologie leistet ihren Beitrag, in dem sie über die zugrunde liegenden Mechanismen der Krebsentstehung und die zellulären Prozesse in Krebszellen aufklärt. Als Teil dieser Forschung werden neue molekulare Angriffspunkte identifiziert, durch deren Manipulation versucht wird, Krebszellen gezielt zu schädigen.

6.1 DYRK2 spielt eine Rolle in der Krebsentwicklung

Um die Rolle von DYRK2 in der Krebsentstehung und -entwicklung zu validieren, wurde deren Expression und die Funktion dieser dualen Kinase im Mausmodell und in Krebszelllinien näher untersucht.

6.1.1 Unterschiede in der DYRK2 Expressionen fördern maligne Entwicklungen

Die Entwicklung einer Zelle vom normalen zum malignen Zustand ist ein mehrstufiger Prozess, an dem Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind (Hanahan and Weinberg 2000). Die Therapie dieser neoplastischen Veränderungen basiert oftmals auf chemotherapeutischen Agenzien, welche zur Schädigung aller schnellproliferierenden Zellen eines Organismus führen und daher schwere Nebenwirkungen mit sich bringen. Trotz dieser unspezifischen Wirkungsweise der Chemotherapie entstehen resistente Tumoren, deren Behandlung sich weiter verkompliziert. Erhöhte Genexpression aufgrund von

Genamplifikationen oder erhöhter transkriptioneller Aktivität spielen in der Resistenzausbildung wie in der Tumorgenese eine bedeutende Rolle. Durch Genexpressionsvergleich von sensitiven und resistenten Tumoren konnten Gencluster identifizieren werden, die wichtig für die Ausbildung der Resistenzen sind (Oshita, Ikehara et al. 2004, Jazaeri, Awtrey et al. 2005).

In einem, dieser Arbeit vorausgegangenem Projekt wurden durch die Behandlung von Blasenkrebszelllinien (T-24, HT-1197 und HT-1376) mit dem Chemotherapeutika Gemcitabine chemoresistente Zellpopulationen geschaffen. Die Erzeugung von sensitiven oder resistenten Zelllinien und deren Analyse führte auch in anderen Arbeitsgruppen zur Identifikation von Resistenz-relevanten Genen (Kang, Kim et al. 2004, Tan, Yang et al. 2004, Zhao, Chen et al. 2007, Xia, Zhang et al. 2008). Nach einer anschließend RNS-Extraktion und der Transkription dieser Proben in cDNA erfolgte eine Expressionsanalyse mithilfe der Affimetrix Microarray-Technik. Hierbei wurde eine verstärkte Expression von DYRK2 in den Gemcitabine-resistenten Zellen detektiert (R. Abraham, persönliche Kommunikation).

Um die Funktion von DYRK2 in Krebs zu untersuchen, musste zuerst ein geeignetes Zellsystem gefunden werden. Ein in Krebs weit verbreiteter Mechanismus, der die maligne Potenz von Krebszellen weiter vorantreibt, ist die Amplifikation von Genen (Slamon, Clark et al. 1987). Genamplifikation spielt bei der Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen eine Rolle (Riordan, Deuchars et al. 1985) und ist auch im Zusammenhang von Lungen- und Speiseröhrentumoren für DYRK2 beschrieben (Miller, Aggarwal et al. 2003). Um das Vorhandensein von DYRK2-Genamplifikationen in Brustkrebszelllinien zu untersuchen, wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich signifikant stärkere Signale in den Zelllinien ZR-75-1 und HS-578T. Die Zelllinie MDA-MB-435S, die das geringste Signal erzeugt, hat nach neueren Veröffentlichungen ihren Ursprung im Melanom (Rae, Creighton et al. 2007). Die Southern-Blot-Analyse von Krebszellen hat allerdings methodische Schwächen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine semiquantitative Analyse in einem Zellsystem, das bedingt durch den Krebsursprung hochgradig unnormale Chromosomensätze aufweist. Somit ist eine Normalisierung auf das Haushaltsgen Aktin B nicht zwingend fehlerfrei. Nicht nur die Anzahl der jeweiligen Gene gibt Hinweise auf die Genexpression und damit das Muster funktionsfähiger Proteine in einer Zelle: Ebenso kann die Expression zu einem gegebenen Zeitpunkt auf verschiedenen Stufen der Expressionskaskade reguliert werden. Dabei spielen transkriptionale (z.B. Aktivierung und Assemblierung von

Transkriptionsfaktoren), post-transkriptionale (z.B. alternatives Spleißen, mRNA-Stabilität), translationale (Aktivierung und Assemblierung von Translationsfaktoren) und post-translationale (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, limitierte Proteolyse u.a.) Regulationsmechanismen eine wesentliche Rolle.

Somit ist es auch notwendig, die Expression von *DYRK2* darzustellen. Es wurden 21 Brustkrebszelllinien und 3 Kontrollzelllinien mittels RT-PCR untersucht.

Bei der RT-PCR (Kleppe, Ohtsuka et al. 1971) werden zunächst alle in einer Zelle befindlichen mRNA-Spezies durch eine reverse Transkription in die entsprechenden cDNAs umgewandelt. Danach kann durch Auswahl spezifischer Primer gezielt eine cDNA amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese quantifiziert werden. Dazu wurden die Elektropherogramme densitometrisch ausgewertet und die Intensitäten der Bande des relevanten Gens zur Bandenintensität des Bezugsgens Tubulin ins Verhältnis gesetzt. Diese Art der Quantifizierung ist jedoch nicht sehr genau (halbquantitative Aussage), da die Bandenintensität nicht streng exponentiell mit der Templatekonzentration ansteigt. Um eine exakte Quantifizierung zu erreichen, muss die PCR folglich so gestaltet werden, dass sich die Amplifizierungsraten des relevanten Gens und des Kontrollgens im exponentiellen Bereich bewegen. Dazu ist es nötig, den Amplifizierungsprozess kinetisch verfolgen zu können. Dies ist mit der quantitativen Real-Time-PCR möglich. Hierbei erfolgt die Messung der Amplifizierungskinetik durch den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in die amplifizierte cDNA (nur eingebauter Farbstoff fluoresziert), sodass die Fluoreszenzintensität der Menge an amplifizierter cDNA entspricht. Diese Amplifizierungskinetiken werden sowohl für das ausgewählte Genprodukt als auch für das Kontrollgen GAPDH aufgezeichnet, um anschließend normiert werden zu können.

In einer Expressionsanalyse in Brust-, Lungen- und Melanomzelllinien, die mittels quantitativer Real-Time-PCR durchgeführt wurde, zeigt die Brustkrebszelllinie MCF 7 eine 5-fach höhere *DYRK2* Expression als die Kontrollzelllinie (MCF 10A) und befindet sich somit im Mittelfeld der getesteten Brustkrebszelllinien. Die auch in den Southern-Blot-Analysen aufgefallene ZR-75-1 Zelllinie hat auch in der Expressionsanalyse den höchsten Wert. Die als besonders invasiv geltende Zelllinie MDA-MB-435S zeigt in der semiquantitativen RT-PCR und der quantitativen Real-Time-PCR eine der höchsten *DYRK2*-Expressionen. Die Unterschiede in der Expression von *DYRK2* in MCF 7 und MDA-MB 231 Zellen konnten auch in einer anderen Studie nachgewiesen werden (Mimoto, Taira et al. 2013). Allerdings kann es trotz sorgfältiger Auswahl der Amplifizierungsprimer vor allem bei niedrig

exprimierten Genen dazu kommen, dass Fremd-cDNAs mit amplifiziert werden. Sollte dies der Fall sein, kann an Hand des Fluoreszenzsignals nicht entschieden werden, welcher Anteil des Signals auf die Amplifizierung des Zielgens und welcher auf die des Fremdgens zurückzuführen ist. Dementsprechend kann es zu falschen positiven Ergebnissen kommen.

In immunhistologisch untersuchten Gewebeschnitten konnte nachgewiesen werden, dass die DYRK2-Expression in tumorigem Gewebe reduziert ist (Taira, Mimoto et al. 2012). In den hier untersuchten Brustkrebszelllinien (Abbildung 13) zeigen acht Zelllinien (BT 20, MDA-MB-361, BT 474, MDA-MB-415, MDA-MB-175VII, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT 483) eine geringere Expression als die nicht maligne Kontrollzelllinie (MCF 10A). Von diesen acht Zelllinien verursachen sechs Tumore im Xenograftmodell (Fogh, Fogh et al. 1977, Lasfargues, Coutinho et al. 1979, Geiger, Muller et al. 1998). Neben der Kontrollzelllinie MCF 10A erzeugt nur die Zelllinie MDA-MB-436 und MDA-MB-415 keine Tumore (Cailleau, Olive et al. 1978, Soule, Maloney et al. 1990). Von zehn Brustkrebszelllinien (BT 549, Hs 578T, ZR-75-30, ZR-75-1, MDA-MB-468, MDA-MB-453, T47D, MCF 7, MDA-MB-157, SK-BR-3), die DYRK2 höher exprimieren als die Kontrollzelllinie, erzeugen nur drei ohne zusätzliche Stimulation Tumore in Mäusen (ATCC).

6.1.2 DYRK2 besitzt transformierendes Potenzial im Mausmodell

Gesteigerte Proliferation ist ein Merkmal von Krebszellen: um dieses näher zu untersuchen, wurden Mausfibroblastenzellen (NIH/3T3) transient mit Überexpressionsplasmiden transfiziert und anschließend unter FCS-Mangelbedingungen kultiviert. Der Ursprung der NIH3T3-Zellen sind primäre Fibroblasten, die aus Mausembryonen isoliert wurden. Diese Fibroblasten wurden in einem speziellen Verfahren kultiviert, wobei sie spontan immortalisierten. NIH3T3-Zellen lassen, abgesehen von einem meist diploiden Chromosomensatz (30 Prozent Hypertriploid), keine Merkmale von transformierten Zellen erkennen (Todaro and Green 1963). Als Folge der transienten Überexpression beider DYRK2-Isoformen schließt sich ein bis zu 30 Prozent gesteigertes Wachstum unter FCS-Mangel an, während die Überexpression der kinaseinaktiven Varianten 20 Prozent Wachstumsinhibition zeigen (Abbildung 11). Die Überexpression eines Gens ist eine oft gewählte Methode, um dessen Funktion näher untersuchen zu können. Allerdings kann eben diese Überexpression zu Ergebnissen führen, die dem in der Natur vorkommenden Zustand nur unzureichend nachahmen, des Weiteren werden für Xenograftversuche stabil exprimierende Zellen benötigt. So haben wir schließlich ein pLXSN-Plasmidsystem gewählt. Dieses trägt einen Simian-Virus-

40-Promotor (SV40), der nicht so stark ist wie der im pcDNA3 verwendete Cytomegalovirus-Promoter (CMV) (Zarrin, Malkin et al. 1999). Die stabilen Zelllinien, die mit dem pLXSN-Konstrukt erzeugt wurden, steigern die Proliferation unter dem Mangel an FCS um bis zu 100 Prozent. Beim Proliferationspotenzial ist kein Unterschied zwischen der kurzen und der langen DYRK2-Isoform zu erkennen. Die kurze Isoform allerdings ist in der Lage, die Kontaktinhibition im Focus Formation Assay aufzuheben und somit das dreidimensionale Wachstum zu induzieren. Vergleicht man die Proteinlevel der beiden Isoformen, ist die Expression der langen Isoform sogar höher als die der kurzen (Abbildung 12). Die vorhandene Menge an Protein spielt in der Zellregulation eine große Rolle. So könnte im Falle der langen Isoform der proapoptotische Effekt von DYRK2 ausgelöst worden sein, der bereits im Zusammenhang mit p53 beschrieben wurde: Die Autoren konnten hier zeigen, dass DYRK2 bei künstlich herbeigeführten DNS-Doppelstrangbrüchen p53 phosphoryliert und damit eine p53-induzierte Apoptose eingeleitet wird (Taira, Nihira et al. 2007). Im Maus-Xenograftmodell indes sind schon geringe Zellkonzentration (4×10^4) ausreichend, um Tumore zu induzieren, was auf die höhere Stresstoleranz von DYRK2 überexprimierenden Zellen zu führen sein kann. Hier sind diese Zelllinien sogar potenter als die HER2-exprimierende Kontrollzelllinie. DYRK2 erfüllt dementsprechend im Mausmodell die Merkmale eines Onkogens: Es führt zu einer erhöhten Proliferation, welches unter der vorherrschenden Nahrungsmangelsituation in einem Tumor ein echter Selektionsvorteil ist. DYRK2 transformiert NIH/3T3, sodass diese Zellen Kontaktinhibition verlieren. Zelllinien, die genetisch verändert wurden, damit sie DYRK2 überexprimieren, erzeugen Tumore in Mäusen (Abbildung 13). In einer Studie wurde beobachtet das ein shRNS induzierter DYRK2 Knock-down in Zelllinien epithelialen Ursprungs das Tumorwachstum im Xenograftmodell fördert (Taira, Mimoto et al. 2012). Augenscheinlich widersprechen diese Ergebnisse den hier gezeigten Experimenten, allerdings wurde die Überexpression von DYRK2 im Bezug auf das Tumorwachstum im Mausmodell nicht untersucht, weiterhin ist nicht mit Fibroblasten gearbeitet worden. Die abnorme DYRK2 Proteinmenge könnte eine andere Signalkaskade begünstigen als im Falle eines Knock-down.

6.1.3 Die Überproduktion einer kinase-inaktiven DYRK2 Mutante erhöht das maligne Potenzial einer Brustkrebszelllinie

Nachdem ein siRNS induzierter Knock-down von DYRK2 unter wachstumsreduzierten Bedingungen in MCF 7-Zellen zu einer Reduktion der Proliferation um bis zu 30 Prozent

geführt hat, sollte nun der Effekt von DYRK2 in verschiedenen zellulären Assays untersucht werden. Als Ausgangspunkt dienten monoklonale MCF 7-Zelllinien, welche entweder einen pcDNA3-Vektor ohne DYRK2 enthielten, oder die kurze und lange DYRK2-Isoform, beziehungsweise deren kinase-inaktiven Mutanten exprimierten. Bei der Herstellung der Zelllinien wurde die Vektor-DNS zufällig integriert. Um klonale Effekte auszuschließen, wurden je drei Klone pro Konstrukt untersucht und die Untersuchungsergebnisse anschließend zusammengefasst.

Da die Funktionslosigkeit der KR-Mutanten direkt nur schwer zu untersuchen ist, wurde die Wirkung von DYRK2 auf eines ihrer Zielmoleküle untersucht. NFAT ist ein Zielprotein der DYRK2-Kinase. DYRK2 phosphoryliert NFAT und fördert damit die Lokalisation von NFAT im Zytoplasma. Da NFAT als Transkriptionsfaktor den Interleukin-2-Promotor aktiviert, kann somit eine Interleukin-2-Produktion nur stattfinden, wenn DYRK2 nicht in der Lage ist, NFAT zu phosphorylieren (Gwack, Sharma et al. 2006). Die Überexpression der kurzen und langen DYRK2-Isoform führt zu einer Reduktion der Promotoraktivität um bis zu 40 Prozent, während die Überexpression der KR-Mutante diesen Effekt wieder aufhebt.

Bei der Metastasierung von Tumoren kommt es zu einem Phänotypwechsel, bei dem die Tumorzellen ihre zellspezifischen Eigenschaften verändern oder verlieren und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen. Dieser Vorgang wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Im gesunden Organismus können Epithelzellen während der Embryonalentwicklung ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie ihre Zellkontakte auflösen und Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunterregulieren. Dadurch können die Zellen migrieren und die Basalmembran passieren. In ihrem Zielgebiet angekommen, ist es möglich, dass sie sich in verschiedene Zellen oder wieder zu Epithelzellen differenzieren. Ein Repressor der E-Cadherintranskription ist der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor SNAIL.

Im normalen duktalem Brustgewebe wird DYRK2 exprimiert und phosphoryliert SNAIL am Ser104, wobei diese Markierung zur normalen Funktion von SNAIL beiträgt. Im duktalem Mammakarzinom ist die DYRK2-Expression inhibiert, aufgrund dessen wird SNAIL akkumuliert und EMT gefördert (Mimoto, Taira et al. 2013). Dieser Effekt lässt sich auch künstlich herbeiführen, indem DYRK2 durch Gabe einer gegen DYRK2 gerichteten shRNS inhibiert wird. MCF 7-Zellen, die mit gegen DYRK2 gerichteten shRNS behandelt wurden, verlieren ihr kopfsteinpflasterartiges Aussehen, verlassen die Cluster, indem sie unter Zellkulturbedingungen wachsen und zeigen die für EMT typische spindelartig fibroblastische

Morphologie (Mimoto, Taira et al. 2013). Die Expression einer kinase-inaktiven DYRK2 Variante führt in MCF 7 sowie in A549 zu dem eben beschriebenen Phänotyp (siehe Abbildung 15). Die Überexpression eines in der Kinasefunktion gestörten Proteins blockiert die Bindungsstellen für das endogen vorhandene intakte Protein, sodass auch dieses in seiner Funktion gestört wird. Hier zeigt sich – vorausgesetzt der untersuchte Phänotyp ist abhängig von der Kinasefunktion des untersuchten Proteins – ein ähnlicher Phänotyp wie der Knock-down desselben Proteins. Somit konnte dargestellt werden, dass die gezeigten Veränderungen abhängig von der Kinasefunktion des DYRK2-Proteins sind. EMT wird derzeit im Zusammenhang mit der Entstehung von Chemotherapieresistenzen untersucht (Yin, Castagnino et al. 2008, Saxena, Stephens et al. 2011, Oliveras-Ferraros, Corominas-Faja et al. 2012, Mallini, Lennard et al. 2013). Das könnte ein Hinweis auf den Zusammenhang von DYRK2-Expression und Gemcitabine-Resistenz sein, welcher der Startpunkt zur Untersuchung von DYRK2 im Rahmen dieser Arbeit war.

Ein weites Verfahren, um Zellmigration experimentell zu zeigen, ist der Wundheilungs-Assay. Dieses einfache und kostengünstige Experiment simuliert die Zellmigration während der Wundheilung und macht es möglich, gerichtete Zellmigration *in vitro* zu studieren (Rodriguez, Wu et al. 2005). MCF 7-Zellen, welche die KR-Mutanten von DYRK2 exprimieren, weisen eine starke gerichtete Zellmigration auf. Sie schließen isoformunabhängig die zugefügte Wunde in weniger als 24 Stunden und damit mehr als doppelt so schnell wie Zellen, die des intakte DYRK2 Protein überexprimieren (siehe Abbildung 14).

Eine weiterer bedeutender Schritt, um das neoplastische Potenzial von Zellen zu erhöhen, ist die Fähigkeit zum ankerunabhängigen Wachstum. Die Überexpression der kinaseinaktiven DYRK2 Variante führt zu einer 500 prozentigen Erhöhung des ankerunabhängigen Wachstums in MCF 7 Zellen (Abbildung 14). In der Literatur ist beschrieben, dass ein shRNS induzierter Knock-down von DYRK2 in Zellen epithelialen Ursprungs (Hela, U2OS, Hek293 und MCF 7) zu einer gesteigerten Proliferation führt, das Wachstum im Focus-Formation Assay fördert und im Xenograftmodell das Tumorstadium begünstigt. C-Jun und c-Myc, zwei für die Regulation des Zellzyklus bedeutende Proteine, werden in einem DYRK2-Knock-down nicht mehr phosphoryliert und führen zu den beschriebenen Phänotypen (Taira, Mimoto et al. 2012).

6.1.4 DYRK2 moduliert neben der Zellantwort für genotoxische und hypertoxische Bedingungen auch die Zellantwort unter Wachstumsfaktorenentzug

Neben dem soeben beschriebenen antiproliferativen Effekt von DYRK2, der über eine Zellzykluskontrolle durch die Phosphorylierung und daraus resultierender Markierung zur Degradation von c-Jun und c-Myc erreicht wird, ist für DYRK2 auch ein proapoptotischer Effekt beschrieben.

DYRK2 ist im Zytoplasma lokalisiert (Becker, Weber et al. 1998) und wandert in den Zellkern als Antwort auf genotoxischen Stress. Kommt es zu DNS Schäden wird p53 am Serin 10 und Serin 15 phosphoryliert und entgeht somit der MDM2 gesteuerten Markierung dessen Folge die Ubiquitinulierung und Degradierung von p53 ist. Diese führt zur Akkumulierung von p53 worauf die Zelle in einen Zellzyklusarrest übergeht und zusätzliche DNS Reparaturmechanismen induziert werden. Kommt es allerdings zu tiefgreifenden, irreparablen DNS Schäden wandert DYRK2 in den Zellkern und phosphoryliert p53 überdies am Serin 46. Diese Markierung stabilisiert p53 zusätzlich und erhöht die Bindungsaffinität zu Promotoren von proapoptotischen Genen, wie p53AIP1 welche Signalkaskaden in Gang setzen die zum programmierten Zelltod der betroffenen Zelle führen (Taira, Nihira et al. 2007, Yoshida 2008, Yoshida 2008, Taira, Yamamoto et al. 2010). Außer der proapoptotischen DYRK2 induzierten Antwort auf genotoxischen Stress moduliert DYRK2 auch die Reaktion auf hypotoxische Bedingungen. Unter Sauerstoffmangel kommt es zu einer E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (SIAH2) abhängigen Polyubiquitinierung von DYRK2 und dessen Abbau durch das proteasomalen Systems. Zudem phosphoryliert DYRK2 seinerseits SIAH2 an fünf Stellen, trägt so zur Sauerstoffmangel bedingten Stressantwort bei und fördert die Expression des für die Angiogenese wichtigen Transkriptionsfaktor HIP-1 α (House, Moller et al. 2009, Moller, House et al. 2009, Perez, Garcia-Limones et al. 2012). Die DNS-Schäden induzierte DYRK2 abhängige p53 Ser46-Phosphorylierung ist unter hypoxischen Bedingungen stark verringert (Calzado, de la Vega et al. 2009, Perez, Garcia-Limones et al. 2012). Dieser Mechanismus hat klinische Relevanz in soliden Tumoren. Die zentralen Tumorregionen sind in der Regel hypoxische, zeigen eine verminderte p53-Phosphorylierung und sind zusätzlich für chemotherapeutische Medikamente schwer zugänglich, weiterhin ist der SIAH2 Spiegel erhöht was die Angiogenese fördert (Calzado, De La Vega et al. 2009). So würde einerseits, ein Erhöhung des DYRK2 Spiegels die Sensibilität der Zelle auf DNS-Schäden-induzierte Apoptose fördern, aber andererseits dass Fortschreiten der Angiogenese begünstigen.

Die transiente Überexpression von DYRK2 in NIH3T3 Zellen führt unter FCS Mangel unabhängig von der Isoform zu einer erhöhten Proliferation um 30%, wobei dieser Effekt mit einer stabilen polyklonalen Expression (Abbildung 11 C) noch gesteigert werden kann. Die transiente Überexpression der kinase-inaktiven Mutanten senkt die Proliferationsrate um 20% (Abbildung 11). Weiterhin sinkt in MCF 7 Zellen die Proliferation nach einem siRNS induzierten DYRK2 Knock-down und FCS Mangel um 30% (Abbildung 14 C), auch konnten in der Lungenkrebszelllinie A-549 und der Blasenkrebszelllinie T24 ein Proliferationsrückgang nach DYRK2 Knock-down und unter FCS Mangel beobachtet werden (Ringbergsymposium 2009 Reimar Abraham). Diese Ergebnisse weisen darauf hin das es einen weiteren, derzeit unbekanntes Mechanismus gibt, welcher Abhängig von der Kinasefunktion des DYRK2 Proteins, die Reaktion der Zelle auf eine Unterversorgung mit FCS und den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren kontrolliert.

6.1.5 DYRK2 als Target für eine inhibitorische Krebstherapie?

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen ob sich DYRK2 als Zielmolekül für eine SMI basierte Krebstherapie eignet. DYRK2 spielt, unabhängig von der Isoform, eine Rolle in der Entwicklung von Krebs. Allerdings ist die Wirkungsweise von DYRK2 nach heutigem Stand der Wissenschaft vielschichtig und nicht vollständig verstanden. Der proliferationshemmende Phänotyp, der unter FCS Mangel mittels eines DYRK2 Knock-down erzeugt werden kann, scheint abhängig von der Kinasefunktion zu sein. Somit würde sich DYRK2 für eine Hemmung durch „small molecule inhibitors“ empfehlen. Dieser Phänotyp zeigt sich nur unter FCS-Mangelbedingungen und könnte auch im Tumor selbst zum Tragen kommen, da die Versorgung und Abhängigkeit des Tumors mit Wachstumsfaktoren nicht vollständig verstanden ist. Es ist schwer die Wirkung eines SMI lokal auf den Tumor zu begrenzen auf Grund dessen birgt die Hemmung von DYRK2 auch Gefahren. So könnten ohne Wachstumsfaktormangel im komplexen Organismus auch die anderen von DYRK2 induzierten Phänotypen zum tragen kommen. Mit einem SMI würde man auch diese positiven Funktionen hemmen. Die Proapoptotische Wirkung nach irreparablen DNS Schäden über die Modellierung der p53 Antwort ist für die Bekämpfung von Krebs durchaus von Vorteil. Auch wird das Tumorwachstum im Xenograft-Mausmodell durch einen stabilen DYRK2 Knock-down in Krebszellen epithelialen Ursprungs gefördert. Da auch eine Herabregulation von DYRK2 in verschiedenen humanen Tumorgeweben gezeigt wurden konnte (Taira, Mimoto et al. 2012), sollte eher darüber nachgedacht werden ob es einen Vorteil bringen könnte die

Expression von DYRK2 zu erhöhen. Es besteht ein Zusammenhang von DYRK2 Expression und EMT. EMT hat eine Bedeutung in der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen, Gemcitabinresistente Blasenkrebszellen steigern die Expression von DYRK2 (Reimar Abraham) und DYRK2 spielt eine Rolle in vielfältigen Stressreaktion. Somit könnte DYRK2 die zelluläre Antwort auf Chemotherapien beeinflussen und sollte in der Kombination mit der Behandlung von chemotherapieresistenten Tumoren näher untersucht werden.

6.2 Der Einfluss von AXL und c-MET auf den Phänotyp von Krebszellen

Das Studium zellulärer Prozesse – wie der Zellproliferation, -migration oder -invasion – kann einen Einblick in die Funktionsweise eines einzelnen Proteins geben. So lassen sich Erkenntnisse über tumorprogressives oder auch tumorsuppressives Potenzial des Proteins gewinnen. Ein Großteil der Krebspatienten stirbt nicht am Primärtumor, sondern an den sich bildenden Metastasen. Hierbei wandern Tumorzellen in entferntere Körperregionen ab, setzen sich dort fest und bilden so den Startpunkt für eine neue maligne Wucherung. Um diese Wanderung zu vollführen, müssen normalerweise unbewegliche Zellen invasives Potenzial erlangen. Diese Zellen entwickeln die Fähigkeit, die Basalmembran, welche Gewebe gegeneinander abgrenzt, zu durchbrechen und durch die entstandene Lücke in das benachbarte Gewebe einzuwandern. Sie durchbrechen die Wände von Adern oder Lymphgefäßen und gelangen so in Blut- oder Lymphbahnen (Friedl and Wolf 2003).

Die Zellmigration/-invasion setzt sich im Wesentlichen aus folgenden Schritten zusammen: Durch die Assoziation wachsender Aktinfilamente an membrannahe Adapterproteine wird die Zellmembran nach außen gedrückt und eine Verlängerung von Filopodien eingeleitet (Rohatgi, Ma et al. 1999). Integrine treten mit Liganden der extrazellulären Matrix in Kontakt und interagieren direkt mit diversen Adhäsionsmolekülen. Anschließend wird eine zielgerichtete Proteolyse eingeleitet (Ohuchi, Imai et al. 1997, Sameni, Moin et al. 2000, Friedl and Wolf 2003), Aktin-Myosin-Komplexe induzieren im Anschluss daran die Zellkontraktion (Verkhovskiy, Svitkina et al. 1995, Cramer 1999, Katoh, Kano et al. 2001). Im letzten Schritt löst sich die Zelle von der extrazellulären Matrix.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von den Rezeptortyrosinkinasen AXL und MET auf die Proliferation und die Zellmigration/-invasion von Tumorzellen, deren Ursprung in verschiedenen Geweben lag, untersucht. Weiterhin wurden SMI's verwendet, um diese AXL/MET abhängigen Phänotypen zu blockieren.

6.2.1 AXL und MET haben proliferationsmodulierende Wirkung in Lungenkrebszelllinien

Ungehemmte Proliferation ist ein Charakteristikum von Krebszellen. Der siRNS induzierte Knock-down von AXL führt in vier von fünf Lungenkrebszelllinien zu einer Inhibition der Proliferation, während der siRNS-Knock-down in den getesteten Brust- und in zwei Prostatakrebszelllinien keine signifikante Proliferationsreduktion hervorruft (siehe Kapitel 5.2.4 und Abbildung 18 A bzw 19 C und D). Ein siRNS vermittelter AXL Knock-down führt in mesotheliomalen Zelllinien ebenfalls zu einer Proliferationsinhibition, wobei gezeigt werden konnte, dass ein Zellzyklusarrest in der G1 Phase erfolgt (Ou, Corson et al. 2011).

Der siRNS induzierte Knock-down von *c-MET* führt auch in den Lungkrebszelllinien NCI-H1299 und NCI-H1993 (Abschnitt 5.2.4) zu einer, wenn auch schwächeren Reduktion der Proliferation. Der proliferationsfördernde Effekt von c-MET ist häufig in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht wurden (K. Michael Weidner 1993, Takebayashi, Iwamoto et al. 1995, Trusolino, Bertotti et al. 2010, Gelsomino, Facchinetti et al. 2014). Da der Knock-down beider RTK's zu einer Verringerung der Proliferation führt, wurde mittels eines siRNS geführten Doppelknock-down von AXL und MET der synergetische Effekt auf die Proliferation untersucht. Allerdings führt dieser nicht zu einer Erhöhung des antiproliferativen Effektes unter das Inhibitionsvermögen des AXL-Knock-down (Abschnitt 5.2.4 und Abbildung 18). Im Western-Blot waren beide RTK's auch im Doppelknock-down nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 18 B). Eine Inhibition von AXL kann zur Hemmung des in NCSLC relevanten PI3K/Akt-Signalweges führen (Xu, Jia et al. 2013), ebenso wie Signalwege der c-MET-Kaskade über den PI3K/Akt-Signalweg wirken (Trusolino, Bertotti et al. 2010). Akt phosphoryliert zum Beispiel ein Protein namens FOXO, diese Phosphorylierung resultiert in einem vermehrten Abbau von FOXO, welches normalerweise die Zellteilung hemmt. Somit entfällt die Hemmung der Proliferation, sie wird durch Akt also indirekt stimuliert. Außerdem wird die Kinase GSK3-beta gehemmt. Sie ist Teil eines Proteinkomplexes, der bewirkt, dass beta-Catenin abgebaut wird. Ist dieser Komplex gestört, akkumuliert beta-Catenin in der Zelle und induziert die Transkription von Genen, welche die Proliferation fördern (Heavey, O'Byrne et al. 2014). Somit könnte der proliferationshemmende Effekt von AXL und MET auf die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweg zurückzuführen sein und würden sich somit auch nicht addieren können, wenn man die Menge von AXL und MET künstlich reduziert.

Die Lungenkrebszelllinien NCI-H1299 und NCI-H1993 haben ihren Ursprung in metastasierten Tumoren. NCI-H1299 stammt aus einem metastatischen Lymphknoten eines 43 Jahre alten Patienten, der zuvor Bestrahlungen erhalten hat und NCI-H1993 wurde aus der Metastase einer 47-jährigen Frau isoliert. Diese beiden Zelllinien zeigen sich gegenüber einer Veränderung der AXL-Funktion besonders sensitiv. Erhöhte AXL-Expression korreliert mit dem Befall der Lymphknoten in Lungenkrebspatienten (Yu, Dong et al. 2014), dies könnte ein Hinweis sein das eine erhöhte AXL Expressions ein Selektionsvorteil für die Krebszelle darstellt. Der proliferationshemmende Effekt eines *MET*-Knock-downs in NCI-H1993 kann auf die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade zurückzuführen sein (Lutterbach, Zeng et al. 2007). Eine Möglichkeit, den Einfluss von AXL auf die Proliferation in den Lungenkrebszelllinien zu untersuchen, wäre eine Proteom- und Phosphorylierungsanalyse beider Zelllinien unter den Bedingungen, unter der die Zellen den proliferationsgehemmten Phänotyp im Vergleich zur Kontrolle zeigen. In einer breiten Untersuchung könnte man eventuell Gemeinsamkeiten in den Signalkaskaden finden und hätte mit zwei Zelllinien welche zwar die gleiche Reaktion auf einen Knock-down zeigen aber unterschiedlichen Ursprungs sind.

6.2.2 AXL, aber nicht MET modulierenden die Invasivität in Brust- und Lungenkrebszelllinien

Die Veränderung von Zellen im Matrigel kann Auskunft über die Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasierung geben. Die von c-MET/HGF veränderten Signalwege sind in Krebs oft beschrieben, fördern das invasive Potenzial von Zellen und steigern bei Fehlfunktion die Metastasierungsrate (Birchmeier, Brinkmann et al. 1997, Yi and Tsao 2000, Masuya, Huang et al. 2004, Cecchi, Rabe et al. 2010). Weithin inhibiert zum Beispiel der MET-Inhibitor BMS-777607 die Zellinvasion im Transwell-Assay in PC-3 Zellen, wobei HGF als Chemoattraktanz dient (Dai and Siemann 2010). Um den Einfluss von AXL und MET näher zu untersuchen, wurde ein Matrigel Outgrowth Assay nach siRNA induzierten Knock-down beider RTK durchgeführt. Hierfür wurde zum einen die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 verwendet, da sie aufgrund ihrer Invasivität Ausläufer in einer Matrigelmatrix bildet (Zajchowski, Bartholdi et al. 2001). Die ausgewählten Zelllinien zeigten den Phänotyp des Branchings unabhängig von der zuvor untersuchten AXL-Expression (Abbildung 16). Allerdings lässt sich der Branchingphänotyp in Zelllinien mit höherer AXL-Expression durch einen siRNA induzierten Knock-down gut unterdrücken (Abbildung 18). Neben der invasiven Brustkrebszelllinie

MDA-MB 231 ließ sich die Bildung von Zellausläufern auch in den Lungenkrebszelllinie Hop 62, Lou NH 91 und Colo699 durch einen AXL-Knock-down reduzieren, während ein siRNS induzierter MET Knock-down die Fähigkeit zum filopodienbildenden Wachstum in der Matrigelmatrix nicht reduziert. Die Lungenkrebszelllinie NCI-H1299, die einen proliferationsreduzierten Phänotyp nach AXL-Knock-down aufweist, zeigt den Branchingphänotyp im Matrigel – dieser lässt sich allerdings durch einen AXL-Knock-down nicht reduzieren (Abbildung 17 A).

Ein weiterer Hinweis auf die Fähigkeit eines Proteins, die Malignität einer Zelllinie zu regulieren, gibt der Transwellassay. Dieser experimentelle Ansatz zeigt das gerichtete Migrationsvermögen von Zellen. Ein AXL-Knock-down inhibiert diesen Phänotyp in der Lungenkrebszelllinie NCI-H1299 um 70% (Abbildung 21). So lassen sich in NCI-H1992 zwei krebsrelevante Phänotypen (Proliferation und gerichtete Migration) durch einen Knock-down von AXL hemmen, während der Branchingphänotyp in dieser Zelllinie AXL und Met unabhängig zu sein scheint.

Diese Untersuchungen geben deutliche Hinweise auf den verstärkenden Einfluss von AXL auf die Invasivität und die Migrationfähigkeit von Lungenkrebszelllinien. Allerdings konnte der Mechanismus im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Das Vermögen der RTK AXL Invasivität, gerichtete Migration und Proliferation zu fördern, ist nicht nur abhängig von der Höhe der AXL-Expression, sondern auch vom genetischen Hintergrund der untersuchten Zelllinie.

Weitere Untersuchungen sollten der Aufklärung dienen, an welcher Stelle des Invasionsmechanismus AXL seine Funktion ausübt. Mögliche Ansatzpunkte für diese Studien wären die Fortbewegung der Zellen in der Matrix über Aktinfilamente, die Kontaktaufnahme der Zelle zur extrazellulären Matrix über Integrine, die Aktivierung von Proteasen zum Verdau der extrazellulären Netzwerke und die verschiedenen Proteinkomplexe, die diese Prozesse regulieren.

Ein Effekt, der häufig in Zusammenhang mit dem MET-Rezeptor steht und in Verbindung mit der Invasivität von Krebszellen beschrieben ist, wird als „Scattering“ bezeichnet (Bottaro, Rubin et al. 1991, Naran, Zhang et al. 2009, Belalcazar, Azana et al. 2012). „Scattering“ betrifft nur Epithelzellen. Gesteuert durch den MET-Rezeptor und dessen Phosphorylierung nach Bindung mit seinem Liganden HGF/SF, kommt es zu einer Erhöhung der lokalen Motilität bedingt durch eine Unterbrechung von Zell-Zell-Verbindungen und eine Streuung von benachbarten Zellen, die auch im Rahmen einer epithelialen-mesenchymalen Transition beobachtet werden (Stoker, Gherardi et al. 1987, Weidner, Behrens et al. 1990). Dieser

Phänotyp lässt sich mit gegen MET gerichtete siRNS blockieren. Die getesteten Prostatakrebszelllinien (DU 145 und PC 3) sind nach Stimulation durch HGF nicht mehr in der Lage, zu „scattern“, während eine Inhibition von AXL die Zellen nach Stimulation weiterhin streuen lässt. Das „Scattering“ ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des MET-Rezeptors (Naldini, Weidner et al. 1991, Brinkmann, Foroutan et al. 1995), somit eignet sich dieser Phänotyp, um die Wirksamkeit von Inhibitoren zu untersuchen, welche die Phosphorylierung des MET-Rezeptors stören.

6.2.3 Niedrig molekulare Inhibitoren sind geeignet AXL und MET abhängige Phänotypen zu blockieren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die aus einer Kollaboration unserer Arbeitsgruppe mit Vichem Chemie Research Ltd. hervorgegangenen Quinolinyloxy-Phenyl-Sulfonamiden einen positiven Beitrag zur Bekämpfung von hyperproliferativen Erkrankungen wie Krebs, Tumoren und insbesondere von Krebsmetastasen leisten. Weiterhin soll erforscht werden, ob eine synchrone Hemmung der beiden Rezeptortyrosinkinasen AXL und MET Vorteile bietet und unsere Substanzen vergleichbare Effekte erzeugen wie die bereits publizierten MET und AXL Inhibitoren AMG, und BMS sowie R428. Ein Multikinasehemmer, der als Referenz diente, SKI oder auch Bosutinib genannt, hemmt beim Menschen verschiedene Tyrosinkinasen, und wurde zur Behandlung von Patienten mit chronischer myeloische Leukämie (CML) zugelassen (Rusconi, Piazza et al. 2014). Die Eigenschaft als Src-Kinase-Inhibitor macht Bosutinib zu einem potenziellen Therapeutikum für die Behandlung von Brustkrebs und kolorektalen Karzinomen (Coluccia, Benati et al. 2006, Vultur, Buettner et al. 2008). AMG-458 hemmt das Tumorwachstum in c-MET abhängigen Xenograftmodellen (Liu, Siegmund et al. 2008), wobei Zellen mit erhöhter c-MET-Expression deutlich sensitiver gegenüber AMG erzeugten Apoptosephänotypen sind (Li, Torossian et al. 2012). Der zweite c-MET-Inhibitor BMS inhibiert HGF gesteuerte Zellstreuung, Proliferation und Zellmotilität in Prostatakrebszellen (Dai and Siemann 2010). R428 ist als selektiver niedermolekularer Inhibitor der Axl-Kinase publiziert, blockt AXL induzierte Signalwege und die Invasion von Krebszellen *in vitro*. Darüber hinaus blockiert dieser Inhibitor AXL *in vivo* und verringert die Metastasierung in einem Brustkrebsmodelsystem (Holland, Pan et al. 2010).

Zellstreuung als c-MET abhängiger Phänotyp eignet sich, um die Funktionsfähigkeit der untersuchten Inhibitoren zu validieren. AMG und BMS hemmen die MET-Phosphorylierung

im niedrigen nanomolaren Bereich (siehe Abbildung 23), wobei die Prostatakrebszelllinie PC 3 weniger sensitiv gegenüber beiden Inhibitoren ist. Die Inhibition des „scatterings“ erfolgt bei einer Konzentration von 1 bis 0,3 μM in DU 145 Zellen, diese Inhibitorkonzentrationen konnten auch von Dai et al. Gezeigt werden, in dieser Veröffentlichung erfolgte die Hemmung des „scatterings“ durch BMS in einem vergleichbaren Experiment im Bereich zwischen 0,1 bis 0,5 μM (Dai and Siemann 2010). Die im Haus entwickelten Inhibitoren unterdrücken die Zellstreuung um den Faktor 10 schlechter als die beiden getesteten MET-Inhibitoren, wobei auch hier die PC 3 insensitiver gegenüber der Hemmung reagiert (Abbildung 22 B). Dieses Bild setzt sich auch in der Analyse der Phosphorylierung und der Aktivierung der MET-abhängigen Signalwege fort (Abbildung 23 A-F). Abschließend weisen die als selektive MET-Inhibitoren beschriebenen Substanzen ein höheres Potenzial auf, MET-Phosphorylierung zu hemmen und den Phänotyp des „scatterings“ zu unterbinden als die im Haus entwickelten Inhibitoren – wenngleich diese auch noch in Konzentrationen von 3 μM bei DU 145 und 10 μM bei PC 3 die Zellstreuung vollständig blockieren.

Nachdem keine ersichtliche Korrelation zwischen der Fähigkeit zum Bilden von Ausläufern im Matrigel und der Höhe der Expression des AXL-Rezeptors festgestellt werden konnten, zeigten drei AXL-exprimierende Lungenkrebszelllinien und eine Brustkrebszelllinie eine starke Reaktion auf einen siRNS induzierten Knock-down von AXL. Der Effekt eines MET-Knock-downs auf den Branchingphänotyp war nur minimal. Da sich aufgrund der schweren Quantifizierbarkeit dieses Phänotyps nur vollkommene Hemmung als Ausleseergebnis eignet, konnte die gekoppelte Inhibition beider RTK nicht untersucht werden. „Branching“ ist ein komplexer zellulärer Vorgang, an dem mehrere Signalwege beteiligt sind und der in der Krebsentwicklung eine Rolle spielt (Lu, Takai et al. 2011, Zegers 2014). Die Hemmung des Branchingphänotyps ist ein weit verbreitetes Modell, um die Wirksamkeit von Substanzen als Therapeutikum zur Bekämpfung neoplastischer Krankheiten zu untersuchen (Harma, Virtanen et al. 2010). NCI-H522, eine mit der Fähigkeit zur Bildung von Ausläufern im Matrigel ausgestattete Lungenkrebszelllinie, bei der im Western Blot nur eine geringe Menge an AXL-Protein nachweisbar war, und die keine Änderung des Phänotyps nach AXL und MET Knock-down aufweist, zeigt keine Reduktion des „branching“ nach Behandlung mit den publizierten MET Inhibitoren und den untersuchten Sulfonamiden.

Zelllinien, welche auf die siRNS induzierte Herabregulation der AXL mRNA mit der Blockierung des Branchingphänotyps reagieren, weisen auch bei niedriger Konzentration der im Haus untersuchten Sulfonamide eine komplette Hemmung der Zellausläuferbildung auf –

während die MET-Inhibitoren diesen Effekt erst bei höheren Konzentrationen auslösen. In den Untersuchungen zeigte sich auch SKI potent das „Branching“ zu unterbinden, dies konnte im Rahmen einer anderen Studie, in NCSLC Zellen, ebenfalls gezeigt werden. Zurückführen lässt sich das zum Beispiel auf das größere Zielmolekülspektrum des Multikinasehemmers (Tan, Haaland et al. 2014). Ein unter dem Namen NPS-1034 publizierter „small molecule inhibitor“ hemmt die Zellproliferation und fördert den induzierten Zelltod in, gegen die EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib resistenten, Lungenkrebszelllinien. Die untersuchten Zelllinien leiten ihre durch EGFR-Blockierung veränderten Signalwege über die Aktivierung von AXL und c-MET um. NPS-1034 reduziert nun wiederum in diesen chemotherapieresistenten Zelllinien die Proliferation über die kombinierte Blockade der AXL und c-Met gesteuerte Signalkaskade (Rho, Choi et al. 2014). LDC1267 ein weiteres SMI hemmt in der Brustkrebszelllinie Hs 578T AXL und c-MET im nanomolaren Bereich und inhibiert die Proliferation in der Lungenkrebszelllinie NCI-H1993 mit einem IC_{50} von deutlich unter 10 μ M (Paolino, Choidas et al. 2014). Die untersuchten Inhibitoren hemmen die Proliferation – wobei die MET-Inhibitoren BMS und AMG in den beiden untersuchten Brustkrebszelllinien ihren IC_{50} nur in einer Konzentration von über 10 μ M erreichen. Auch die Lungenkrebszelllinie Hop 62 ist im Gegensatz zur Zelllinie NCI-H1993 eher insensitive gegenüber den MET-Inhibitoren. Die im Haus entwickelten Inhibitoren hemmen die Proliferation deutlich früher, auch hier erreicht die Lungenkrebszelllinie mit einer Proliferationsreduktion um 50 % deutlich unter 10 μ M Inhibitorkonzentration.

Inhibitoren die sowohl AXL als auch MET hemmen, können einen positiven Beitrag für die Bekämpfung von Krebs leisten. Beide RTK spielen in der Entstehung von Krebs eine Rolle und können durch die untersuchten Inhibitoren gehemmt werden. Weiterhin limitiert der AXL-Rezeptor die Signalkaskaden welche als Antwort auf EGFR-Inhibitoren aktiviert werden. Ein AXL Knock-down beeinträchtigt EGFR abhängige Signalkaskaden, zusätzlich reagieren MDA-MB-231 Brustkrebszellen auf die Stimulation mit EGF (dem Liganden von EGFR) mit einer Phosphorylierung von AXL und MET (Meyer, Miller et al. 2013). Es findet eine Transkriptionsaktivierung von AXL durch c-MET in Blasenkrebs statt, die simultane Expression dieser RTK korreliert mit einer verminderten Überlebenserwartung für den betroffenen Patienten (Yeh, Shin et al. 2011). AXL wird in Lapatinib resistenten HER2 positiven Brustkrebszellen aktiviert (Liu, Greger et al. 2009), und führt zu einer Resistenz gegen EGFR-Therapeutika in Lungenkrebs (Zhang, Lee et al. 2012).

Abschließend konnte gezeigt werden, dass sich Phänotypen, die sich auch durch einen AXL-Knock-down erzeugen lassen, mit den im Haus entwickelten Inhibitoren deutlich besser

herbeiführen lassen als mit den anderen untersuchten Kinasehemmern. Der genetische Hintergrund (und aufgrund dessen die aktiven und aktivierten Signalwege) spielen eine bedeutende Rolle bei dem durch die Inhibitoren hervorgerufenen Hemmpotenzial. „Small molecule inhibitors“ welche AXL und c-MET hemmen bergen großes Potenzial im Hinblick auf die Bekämpfung von Krebs und durch die Krebstherapie induzierte Resistenzen: Allerdings ist es notwendig, die Signalwege, welche durch diese Substanzen kontrolliert werden, zu entschlüsseln, da sie die gewünschte Wirkung dank ihrer höheren Spezifität (im Vergleich zur klassischen Chemotherapie) nur in bestimmten genetischen Hintergründen entfalten.

7. Zusammenfassung

Jeder Organismus unterliegt den Gesetzen der Evolution. Wandlungsprozesse fördern lebenswichtige Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen, allerdings generiert dieser Selektionsdruck auch entartete Zellen, die hervorragend an die Verhältnisse im Körper angepasst sind und den Wirtsorganismus schädigen. Die Charakteristika dieser entarteten Zellen im Vergleich zu den meisten somatischen Zellen sind: unbegrenztes Reproduktionspotenzial, ein autarke Versorgung mit Wachstumsfaktoren sowie eine Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und eine daraus resultierende erhöhte Proliferation, Widerstand gegen Apoptosesignale sowie eine gesteigerte Migration- und Invasionsaktivität, welche als Voraussetzung für Metastasierungsprozesse zu sehen ist. Die Veränderungen in den zellulären Phänotypen sind in den meisten Fällen auf Fehlfunktionen in den verantwortlichen Signalprozessketten zurückzuführen. Die Hauptakteure dieser Signalkaskaden sind Kinasen, deren Funktion sich über eine Blockierung der für die Katalyse notwendigen ATP-Bindungsstelle modellieren lässt.

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des möglichen Zielmoleküls DYRK2 im Hinblick auf die Bekämpfung von Krebs näher zu untersuchen. Die Funktion und die Wirkweise der DYRK2 Kinase gibt weiterhin Rätsel auf. So fördert auf der einen Seite die Überexpression einer Kinase inaktiven Mutante unabhängig von der gewählten Isoform das maligne Potenzial in der Krebszelllinie MCF 7; auf der anderen Seite erzeugt die Überexpression der intakten langen Isoform in Mausfibroblasten das Wachstum von Tumoren im Xenograftmodell. In Kombination mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen konnte dargestellt werden, dass die untersuchten Effekte auf die Kinasefunktion des DYRK2-Proteins zurückzuführen ist. Die durch Knock-down beziehungsweise durch die Überexpression eines Kinase inaktiven DYRK2-Proteins induzierte Hemmung der normalen Proteinfunktion in einem Krebszellhintergrund führten zur Erhöhung des neoplastischen Potenzials. Somit eignet sich diese Kinase auf den ersten Blick nicht für die Entwicklung eines gegen die Kinasefunktion von DYRK2 gerichteten Inhibitors. Allerdings zeigte sich eine proproliferative Funktion von DYRK2-Überexpressionmutanten unter Wachstumsangelbedingungen sowie ein antiproliferativer Effekt des Knock-downs beziehungsweise der Expression der Kinase inaktiven Mutante unter den gleichen Bedingungen. In einigen Tumoren herrscht im Vergleich

zum normalen Gewebe oftmals ein Mangel an Wachstumsfaktoren – somit könnte der proliferationsinhibierende Effekt einer lokal begrenzten DYRK2-Hemmung in Kombination mit anderen Therapieansätzen durchaus zur Gesundung des Patienten beitragen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, bereits entwickelte, gegen die Rezeptortyrosinkinase AXL gerichtete „small molecule inhibitors“ in verschiedenen geeigneten Zellsystemen zu untersuchen und zu validieren, ob eine doppelte Inhibition von AXL und c-MET von Vorteil ist. Die Wirkung von AXL ist vielseitig und war in unseren Untersuchungen stark abhängig vom genetischen Hintergrund der untersuchten Zelle. Es konnten Zelllinien, wie zum Beispiel die Lungenkrebszelllinie NCI-H1993, identifiziert werden, die sehr sensibel auf einen Knock-down von AXL reagieren. Eine simultane doppelte Inhibition von AXL und c-Met brachte im Bezug auf die Proliferation keine erhöhte Proliferationsinhibition in den untersuchten Lungenkrebszelllinien. Die untersuchten AXL-Inhibitoren sind in der Lage, MET spezifische Effekte, wie den Phänotyp des „scatterings“, zu inhibieren – auch wenn die untersuchten publizierten MET-Inhibitoren diesen Effekt in niedrigeren Konzentrationen hervorrufen können. Das Wachstum von Zellausläufern in einer Matrigel-Matrix („branching“) oder eine Proliferationsinhibition in Zelllinien, die nach AXL-Knock-down eine Inhibition des untersuchten Phänotyps aufweisen, konnte durch die untersuchten AXL-Inhibitoren im niedrigen micromolaren Bereich gehemmt werden. Durch die simultane doppelte Inhibition beider Rezeptortyrosinkinasen lassen sich gleichzeitig mehrere maligne Prozesse hemmen: Das birgt entscheidende Vorteile für den Patienten, da Tumore heterogene Zellpopulationen sind und somit verschieden stark abhängig von den untersuchten Signalwegen sein können.

8. Summary

Every organism is subjected to the laws of evolution. Mutations represent life sustaining adaptations to changes of environmental conditions. These mutations, however, generate a selection pressure for degenerate cells, which are excellently adapted to the conditions of its host, and are damaging to the host itself.

The characteristics of these degenerate cells in comparison to most somatic cells are: unlimited reproduction potential, self-sufficiency to growth factors, resistance to growth inhibiting signals and the resulting increased proliferation, resistance to apoptotic signals and, increased migration and invasion activity which can be regarded as preconditions for the metastatic process. The changes in the cellular phenotypes are, in most cases, attributable to malfunctions in the related responsible signal processes. Important players within these signal cascades are kinase, whose function can be altered to achieve a blocking of ATP binding sites.

The aim of this study was amongst others to investigate the function of the possible target molecule DYRK2 with respect to the repression of cancer. The function and effects of the DYRK2 kinase continue to be puzzling. On the one hand, the over-expression of a kinase-inactive mutant, independent of the chosen isoform, elevated the neoplastic potential of cancer in the cell line MCF 7. On the other hand, the over-expression of the intact full-length DYRK2 isoform in mouse fibroblasts induced tumor growth in the xenograph model. In combination with published data of other working groups, it is shown that the investigated effects are attributable to the kinase function of DYRK2. The induced protein function inhibition caused by knock down or overexpression of an inactive DYRK in a cancer cell background, respectively leads to the increase of the neoplastic potential, and for this reason, this kinase does not appear to be appropriate for use in the development of an inhibitor which suppresses the kinase function of DYRK2. Paradoxically, there is shown to be a positive proliferative function of DYRK2 over-expression mutants under growth repressed conditions as well as an anti-proliferative effect of the knock down and the expression of the kinase inactive mutants under the same conditions. In some tumors there is often a deficit of growth factors. For this reason, a locally restricted DYRK2 therapy with its proliferation inhibition effect, in combination with other therapies, could most certainly contribute to a cancer patient's recovery.

A further goal of this investigation was to examine already developed small molecule inhibitors which function against the receptor kinase AXL in various appropriate cell systems, and to validate if a double inhibition of AXL and c-Met is advantageous. The effects of AXL are versatile, and in our investigations strongly dependent on the genetic background of the investigated cell. It was possible to identify cell lines, for example the lung cancer cell line NCI-H1993, which highly sensitive respond to the knock down of AXL. With respect to the proliferation, a simultaneous double inhibition of AXL and c-Met causes no additional increase in the proliferation inhibition in the investigated lung cancer cell lines. The investigated AXL inhibitors are also capable of inhibiting MET specific effects, such as the phenotype of scattering, even when the investigated published MET inhibitors can cause this effect in lower concentrations. Furthermore, it was shown that the reduction of the branching phenotypes in a matrigel matrix or a proliferation inhibition effect in cell lines after AXL knock down can be achieved through the investigated AXL inhibitors in low micro molar ratio. A simultaneous double inhibition of both receptor kinases is advantageous for the patient as well, as the tumors are heterogeneous cell populations and therefore can be variably dependent on the investigated signal pathways and several malignancy processes can be simultaneously inhibited.

9. Literaturverzeichnis

- Abounader, R., B. Lal, C. Luddy, G. Koe, B. Davidson, E. M. Rosen and J. Laterra (2002). **"In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis."** *FASEB J* **16**(1): 108-110.
- Adjei, A. A., B. Schwartz and E. Garmey (2011). **"Early clinical development of ARQ 197, a selective, non-ATP-competitive inhibitor targeting MET tyrosine kinase for the treatment of advanced cancers."** *Oncologist* **16**(6): 788-799.
- Aloy, I. and Y. Yarden (1997). **"The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions."** *FEBS Lett* **410**(1): 83-86.
- Altafaj, X., M. Dierssen, C. Baamonde, E. Marti, J. Visa, J. Guimera, M. Oset, J. R. Gonzalez, J. Florez, C. Fillat and X. Estivill (2001). **"Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome."** *Hum Mol Genet* **10**(18): 1915-1923.
- American-Cancer-Society (2013). Cancer Facts & Figures 2013. *Atlanta: American Cancer Society.*
- Angeloni, D., A. Danilkovitch-Miagkova, S. V. Ivanov, R. Breathnach, B. E. Johnson, E. J. Leonard and M. I. Lerman (2000). **"Gene structure of the human receptor tyrosine kinase RON and mutation analysis in lung cancer samples."** *Genes Chromosomes Cancer* **29**(2): 147-156.
- Aranda, S., A. Laguna and S. de la Luna (2011). **"DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles."** *FASEB J* **25**(2): 449-462.
- Arora, G., A. Sajid, M. D. Arulanandh, A. Singhal, A. R. Mattoo, A. P. Pomerantsev, S. H. Leppla, S. Maiti and Y. Singh (2012). **"Unveiling the Novel Dual Specificity Protein Kinases in Bacillus anthracis: IDENTIFICATION OF THE FIRST PROKARYOTIC DUAL SPECIFICITY TYROSINE PHOSPHORYLATION-REGULATED KINASE (DYRK)-LIKE KINASE."** *J Biol Chem* **287**(32): 26749-26763.
- Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro and S. Mizutani (1999). **"Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation."** *EMBO J* **18**(5): 1223-1234.
- Bahler, J. and P. Nurse (2001). **"Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division."** *EMBO J* **20**(5): 1064-1073.
- Bahler, J. and J. R. Pringle (1998). **"Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis."** *Genes Dev* **12**(9): 1356-1370.
- Becker, W., Y. Weber, K. Wetzels, K. Eirnbter, F. J. Tejedor and H. G. Joost (1998). **"Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases."** *J Biol Chem* **273**(40): 25893-25902.
- Belalcazar, A., D. Azana, C. A. Perez, L. E. Ruez and E. S. Santos (2012). **"Targeting the Met pathway in lung cancer."** *Expert Rev Anticancer Ther* **12**(4): 519-528.
- Bellosta, P., M. Costa, D. A. Lin and C. Basilico (1995). **"The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding."** *Mol Cell Biol* **15**(2): 614-625.
- Benight, N. M. and S. E. Waltz (2012). **"Ron receptor tyrosine kinase signaling as a therapeutic target."** *Expert Opin Ther Targets* **16**(9): 921-931.
- Bialy, H. (2001). **"Aneuploidy and cancer--the vintage wine revisited."** *Nat Biotechnol* **19**(1): 22-23.

- Birchmeier, W., V. Brinkmann, C. Niemann, S. Meiners, S. DiCesare, H. Naundorf and M. Sachs (1997). "**Role of HGF/SF and c-Met in morphogenesis and metastasis of epithelial cells.**" *Ciba Found Symp* **212**: 230-240; discussion 240-236.
- Bonine-Summers, A. R., M. E. Aakre, K. A. Brown, C. L. Arteaga, J. A. Pietenpol, H. L. Moses and N. Cheng (2007). "**Epidermal growth factor receptor plays a significant role in hepatocyte growth factor mediated biological responses in mammary epithelial cells.**" *Cancer Biol Ther* **6**(4): 561-570.
- Bottaro, D. P., J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. Vande Woude and S. A. Aaronson (1991). "**Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.**" *Science* **251**(4995): 802-804.
- Brandao, L., J. Migdall-Wilson, K. Eisenman and D. K. Graham (2011). "**TAM receptors in leukemia: expression, signaling, and therapeutic implications.**" *Crit Rev Oncog* **16**(1-2): 47-63.
- Brinkmann, V., H. Foroutan, M. Sachs, K. Weidner and W. Birchmeier (1995). "**Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue- specific morphogenic programs in epithelial cells.**" *J Cell Biol* **131**(6): 1573-1586.
- Bryan, T. M. and T. R. Cech (1999). "**Telomerase and the maintenance of chromosome ends.**" *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 318-324.
- Burstyn-Cohen, T., E. D. Lew, P. G. Traves, P. G. Burrola, J. C. Hash and G. Lemke (2012). "**Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis.**" *Neuron* **76**(6): 1123-1132.
- Cailleau, R., M. Olive and Q. V. Cruciger (1978). "**Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization.**" *In Vitro* **14**(11): 911-915.
- Calzado, M. A., L. de la Vega, E. Munoz and M. L. Schmitz (2009). "**Autoregulatory control of the p53 response by Siah-1L-mediated HIPK2 degradation.**" *Biol Chem* **390**(10): 1079-1083.
- Calzado, M. A., L. De La Vega, E. Munoz and M. L. Schmitz (2009). "**From top to bottom: the two faces of HIPK2 for regulation of the hypoxic response.**" *Cell Cycle* **8**(11): 1659-1664.
- Camp, R. L., E. B. Rimm and D. L. Rimm (1999). "**Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma.**" *Cancer* **86**(11): 2259-2265.
- Campbell, L. E. and C. G. Proud (2002). "**Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases.**" *FEBS Lett* **510**(1-2): 31-36.
- Canadas, I., F. Rojo, M. Arumi-Uria, A. Rovira, J. Albanell and E. Arriola (2010). "**C-MET as a new therapeutic target for the development of novel anticancer drugs.**" *Clin Transl Oncol* **12**(4): 253-260.
- Cecchi, F., D. C. Rabe and D. P. Bottaro (2010). "**Targeting the HGF/Met Signaling Pathway in Cancer.**" *Eur J Cancer* **46**(7): 1260-1270.
- Chabner, B. A. and T. G. Roberts, Jr. (2005). "**Timeline: Chemotherapy and the war on cancer.**" *Nat Rev Cancer* **5**(1): 65-72.
- Challier, C., C. C. Uphoff, J. W. Janssen and H. G. Drexler (1996). "**Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines.**" *Leukemia* **10**(5): 781-787.
- Chan, M. C., J. P. Mather, G. McCray and W. M. Lee (2000). "**Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas6 in testicular somatic cells.**" *J Androl* **21**(2): 291-302.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "**High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.**" *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-2752.

- Cheng, K. C., R. Klancer, A. Singson and G. Seydoux (2009). "**Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the oocyte-to-embryo transition.**" *Cell* **139**(3): 560-572.
- Choi, J. Y., H. J. Park, Y. J. Lee, J. Byun, Y. S. Youn, J. H. Choi, S. Y. Woo and J. L. Kang (2013). "**Upregulation of Mer receptor tyrosine kinase signaling attenuated lipopolysaccharide-induced lung inflammation.**" *J Pharmacol Exp Ther* **344**(2): 447-458.
- Chow, L. Q. and S. G. Eckhardt (2007). "**Sunitinib: from rational design to clinical efficacy.**" *J Clin Oncol* **25**(7): 884-896.
- Chung, C. T. and R. H. Miller (1988). "**A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells.**" *Nucleic Acids Res* **16**(8): 3580.
- Cole, A. R., F. Causeret, G. Yadirgi, C. J. Hastie, H. McLauchlan, E. J. McManus, F. Hernandez, B. J. Eickholt, M. Nikolic and C. Sutherland (2006). "**Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo.**" *J Biol Chem* **281**(24): 16591-16598.
- Collett, G., A. Wood, M. Y. Alexander, B. C. Varnum, R. P. Boot-Handford, V. Ohanian, J. Ohanian, Y. W. Fridell and A. E. Canfield (2003). "**Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes.**" *Circ Res* **92**(10): 1123-1129.
- Coluccia, A. M., D. Benati, H. Dekhil, A. De Filippo, C. Lan and C. Gambacorti-Passerini (2006). "**SKI-606 decreases growth and motility of colorectal cancer cells by preventing pp60(c-Src)-dependent tyrosine phosphorylation of beta-catenin and its nuclear signaling.**" *Cancer Res* **66**(4): 2279-2286.
- Comoglio, P. M. and C. Boccaccio (1996). "**The HGF receptor family: unconventional signal transducers for invasive cell growth.**" *Genes Cells* **1**(4): 347-354.
- Comoglio, P. M., S. Giordano and L. Trusolino (2008). "**Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience.**" *Nat Rev Drug Discov* **7**(6): 504-516.
- Cooper, C. S., M. Park, D. G. Blair, M. A. Tainsky, K. Huebner, C. M. Croce and G. F. Vande Woude (1984). "**Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line.**" *Nature* **311**(5981): 29-33.
- Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley and S. Bacchetti (1992). "**Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.**" *EMBO J* **11**(5): 1921-1929.
- Cox, A. D. and C. J. Der (1994). "**Biological assays for cellular transformation.**" *Methods Enzymol* **238**: 277-294.
- Cramer, L. P. (1999). "**Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility.**" *Biochem Soc Symp* **65**: 173-205.
- Craven, R. J., L. H. Xu, T. M. Weiner, Y. W. Fridell, G. A. Dent, S. Srivastava, B. Varnum, E. T. Liu and W. G. Cance (1995). "**Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer.**" *Int J Cancer* **60**(6): 791-797.
- Crosier, K. E., L. R. Hall, P. M. Lewis, C. M. Morris, C. R. Wood, J. C. Morris and P. S. Crosier (1994). "**Isolation and characterization of the human DTK receptor tyrosine kinase.**" *Growth Factors* **11**(2): 137-144.
- Czabanka, M., M. Vinci, F. Heppner, A. Ullrich and P. Vajkoczy (2009). "**Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy.**" *Int J Cancer* **124**(6): 1293-1300.

- Dai, W., H. Q. Pan, B. Ouyang, J. M. Greenberg, R. T. Means, Jr., B. Li and J. Cardie (1996). "**Expression of receptor protein tyrosine kinase tif is regulated during leukemia cell differentiation.**" Leukemia **10**(6): 978-983.
- Dai, Y. and D. W. Siemann (2010). "**BMS-777607, a small-molecule met kinase inhibitor, suppresses hepatocyte growth factor-stimulated prostate cancer metastatic phenotype in vitro.**" Mol Cancer Ther **9**(6): 1554-1561.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch and A. Ullrich (1996). "**Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors.**" Nature **379**(6565): 557-560.
- de Graaf, K., P. Hekerman, O. Spelten, A. Herrmann, L. C. Packman, K. Bussow, G. Muller-Newen and W. Becker (2004). "**Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors.**" J Biol Chem **279**(6): 4612-4624.
- Deininger, M., E. Buchdunger and B. J. Druker (2005). "**The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia.**" Blood **105**(7): 2640-2653.
- Deng, X., D. Z. Ewton, S. Li, A. Naqvi, S. E. Mercer, S. Landas and E. Friedman (2006). "**The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma.**" Cancer Res **66**(8): 4149-4158.
- Deutsche-Krebshilfe (2013). "**Krebszahlen**" <http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html> 26.11.2013.
- Dr. Peter Kaatsch, D. C. S., Prof. Dr. Alexander Katalinic, Dr. Stefan Hentschel (2012). **Krebs in Deutschland 2007/2008. Zentrum für Krebsregisterdaten Ausgabe 8.**
- Duffy, M. J., P. M. McGowan and W. M. Gallagher (2008). "**Cancer invasion and metastasis: changing views.**" J Pathol **214**(3): 283-293.
- Engelhardt, O. G., C. Boutell, A. Orr, E. Ullrich, O. Haller and R. D. Everett (2003). "**The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML.**" Exp Cell Res **283**(1): 36-50.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J. O. Park, N. Lindeman, C. M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A. J. Holmes, A. M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B. E. Johnson, L. C. Cantley and P. A. Janne (2007). "**MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.**" Science **316**(5827): 1039-1043.
- Ewton, D. Z., J. Hu, M. Vilenchik, X. Deng, K. C. Luk, A. Polonskaia, A. F. Hoffman, K. Zipf, J. F. Boylan and E. A. Friedman (2011). "**Inactivation of mirk/dyrk1b kinase targets quiescent pancreatic cancer cells.**" Mol Cancer Ther **10**(11): 2104-2114.
- Eyob, H., H. A. Ekiz, Y. S. Derose, S. E. Waltz, M. A. Williams and A. L. Welm (2013). "**Inhibition of Ron kinase blocks conversion of micrometastases to overt metastases by boosting anti-tumor immunity.**" Cancer Discov.
- Faust, M., C. Ebensperger, A. S. Schulz, L. Schleithoff, H. Hameister, C. R. Bartram and J. W. Janssen (1992). "**The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis.**" Oncogene **7**(7): 1287-1293.
- Feldman, D. R., L. H. Einhorn, D. I. Quinn, Y. Loriot, J. K. Joffe, D. J. Vaughn, A. Flechon, J. Hajdenberg, A. B. Halim, H. Zahir and R. J. Motzer (2013). "**A phase 2 multicenter study of tivantinib (ARQ 197) monotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors.**" Invest New Drugs **31**(4): 1016-1022.

- Fidler, I. J. and L. M. Ellis (1994). **"The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis."** Cell **79**(2): 185-188.
- Fidler, I. J. and I. R. Hart (1982). **"Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications."** Science **217**(4564): 998-1003.
- Fixman, E. D., T. M. Fournier, D. M. Kamikura, M. A. Naujokas and M. Park (1996). **"Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein."** J Biol Chem **271**(22): 13116-13122.
- Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). **"One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice."** J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-226.
- Fotaki, V., M. Dierssen, S. Alcantara, S. Martinez, E. Marti, C. Casas, J. Visa, E. Soriano, X. Estivill and M. L. Arbones (2002). **"Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice."** Mol Cell Biol **22**(18): 6636-6647.
- Fridell, Y. W., J. Villa, Jr., E. C. Attar and E. T. Liu (1998). **"GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells."** J Biol Chem **273**(12): 7123-7126.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). **"Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes."** Biochem Soc Symp(70): 277-285.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). **"Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms."** Nat Rev Cancer **3**(5): 362-374.
- Fujimoto, J. and T. Yamamoto (1994). **"brt, a mouse gene encoding a novel receptor-type protein-tyrosine kinase, is preferentially expressed in the brain."** Oncogene **9**(3): 693-698.
- Garrett, S. and J. Broach (1989). **"Loss of Ras activity in Saccharomyces cerevisiae is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAKI, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase."** Genes Dev **3**(9): 1336-1348.
- Gaudino, G., A. Follenzi, L. Naldini, C. Collesi, M. Santoro, K. A. Gallo, P. J. Godowski and P. M. Comoglio (1994). **"RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP."** EMBO J **13**(15): 3524-3532.
- Geiger, J. N., G. T. Knudsen, L. Panek, A. K. Pandit, M. D. Yoder, K. A. Lord, C. L. Creasy, B. M. Burns, P. Gaines, S. B. Dillon and D. M. Wojchowski (2001). **"mDYRK3 kinase is expressed selectively in late erythroid progenitor cells and attenuates colony-forming unit-erythroid development."** Blood **97**(4): 901-910.
- Geiger, T., M. Muller, N. M. Dean and D. Fabbro (1998). **"Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice."** Anticancer Drug Des **13**(1): 35-45.
- Gelsomino, F., F. Facchinetti, E. R. Haspinger, M. C. Garassino, L. Trusolino, F. De Braud and M. Tiseo (2014). **"Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer."** Crit Rev Oncol Hematol **89**(2): 284-299.
- Gentile, A., L. Lazzari, S. Benvenuti, L. Trusolino and P. M. Comoglio (2011). **"Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis."** Cancer Res **71**(8): 3132-3141.
- Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1982). **"Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter."** Anal Biochem **124**(2): 396-405.
- Gilman, A. (1963). **"The initial clinical trial of nitrogen mustard."** Am J Surg **105**: 574-578.

- Giordano, S., C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper and P. M. Comoglio (1989). "**Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein.**" *Nature* **339**(6220): 155-156.
- Gjerdrum, C., C. Tiron, T. Hoiby, I. Stefansson, H. Haugen, T. Sandal, K. Collett, S. Li, E. McCormack, B. T. Gjertsen, D. R. Micklem, L. A. Akslen, C. Glackin and J. B. Lorens (2010). "**Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(3): 1124-1129.
- Globocan (2008). "**Section of Cancer Information** (10/4/2012)." <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
- Golas, J. M., K. Arndt, C. Etienne, J. Lucas, D. Nardin, J. Gibbons, P. Frost, F. Ye, D. H. Boschelli and F. Boschelli (2003). "**SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice.**" *Cancer Res* **63**(2): 375-381.
- Gorringe, K. L., A. Boussioutas and D. D. Bowtell (2005). "**Novel regions of chromosomal amplification at 6p21, 5p13, and 12q14 in gastric cancer identified by array comparative genomic hybridization.**" *Genes Chromosomes Cancer* **42**(3): 247-259.
- Graham, D. K., G. W. Bowman, T. L. Dawson, W. L. Stanford, H. S. Earp and H. R. Snodgrass (1995). "**Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase.**" *Oncogene* **10**(12): 2349-2359.
- Graham, D. K., T. L. Dawson, D. L. Mullaney, H. R. Snodgrass and H. S. Earp (1994). "**Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer.**" *Cell Growth Differ* **5**(6): 647-657.
- Guimera, J., C. Casas, C. Pucharcos, A. Solans, A. Domenech, A. M. Planas, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill and M. A. Pritchard (1996). "**A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region.**" *Hum Mol Genet* **5**(9): 1305-1310.
- Gustafsson, A., A. K. Bostrom, B. Ljungberg, H. Axelson and B. Dahlback (2009). "**Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma.**" *PLoS One* **4**(10): e7575.
- Gwack, Y., S. Feske, S. Srikanth, P. G. Hogan and A. Rao (2007). "**Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes.**" *Cell Calcium* **42**(2): 145-156.
- Gwack, Y., S. Sharma, J. Nardone, B. Tanasa, A. Iuga, S. Srikanth, H. Okamura, D. Bolton, S. Feske, P. G. Hogan and A. Rao (2006). "**A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT.**" *Nature* **441**(7093): 646-650.
- Hafizi, S., F. Alindri, R. Karlsson and B. Dahlback (2002). "**Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin.**" *Biochem Biophys Res Commun* **299**(5): 793-800.
- Hafizi, S. and B. Dahlback (2006). "**Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases.**" *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(4): 295-304.
- Hage, C., V. Rausch, N. Giese, T. Giese, F. Schonsiegel, S. Labsch, C. Nwaeburu, J. Mattern, J. Gladkich and I. Herr (2013). "**The novel c-Met inhibitor cabozantinib overcomes gemcitabine resistance and stem cell signaling in pancreatic cancer.**" *Cell Death Dis* **4**: e627.
- Hall, R. R. (1980). "**Methotrexate treatment for advanced bladder cancer. A review after 6 years.**" *Br J Urol* **52**(5): 403.
- Han, J., D. Miranda-Saavedra, N. Luebbing, A. Singh, G. Sibbet, M. A. Ferguson and V. Cleghon (2012). "**Deep evolutionary conservation of an intramolecular protein kinase activation mechanism.**" *PLoS One* **7**(1): e29702.

- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "**The hallmarks of cancer.**" *Cell* **100**(1): 57-70.
- Handelsblatt (2011). "**Umsatzstärkste Krebsmittel.**" *Handelsblatt* Handelsblatt Nr.107, 03/04, Juni 2011, Seite 28(Nr 107): 28.
- Hara, T., A. Ooi, M. Kobayashi, M. Mai, K. Yanagihara and I. Nakanishi (1998). "**Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization.**" *Lab Invest* **78**(9): 1143-1153.
- Harma, V., J. Virtanen, R. Makela, A. Happonen, J. P. Mpindi, M. Knuutila, P. Kohonen, J. Lotjonen, O. Kallioniemi and M. Nees (2010). "**A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses.**" *PLoS One* **5**(5): e10431.
- Harvath, L., W. Falk and E. J. Leonard (1980). "**Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly.**" *J Immunol Methods* **37**(1): 39-45.
- Hayflick, L. (1997). "**Mortality and immortality at the cellular level. A review.**" *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1180-1190.
- Heavey, S., K. J. O'Byrne and K. Gately (2014). "**Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC.**" *Cancer Treat Rev* **40**(3): 445-456.
- Heiring, C., B. Dahlback and Y. A. Muller (2004). "**Ligand recognition and homophilic interactions in Tyro3: structural insights into the Axl/Tyro3 receptor tyrosine kinase family.**" *J Biol Chem* **279**(8): 6952-6958.
- Himpel, S., W. Tegge, R. Frank, S. Leder, H. G. Joost and W. Becker (2000). "**Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A.**" *J Biol Chem* **275**(4): 2431-2438.
- Hofheinz, R. D., F. Wenz, S. Post, A. Matzdorff, S. Laechelt, J. T. Hartmann, L. Muller, H. Link, M. Moehler, E. Kettner, E. Fritz, U. Hieber, H. W. Lindemann, M. Grunewald, S. Kremers, C. Constantin, M. Hipp, G. Hartung, D. Gencer, P. Kienle, I. Burkholder and A. Hochhaus (2012). "**Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial.**" *Lancet Oncol*.
- Holland, S. J., A. Pan, C. Franci, Y. Hu, B. Chang, W. Li, M. Duan, A. Torneros, J. Yu, T. J. Heckrodt, J. Zhang, P. Ding, A. Apatira, J. Chua, R. Brandt, P. Pine, D. Goff, R. Singh, D. G. Payan and Y. Hitoshi (2010). "**R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer.**" *Cancer Res* **70**(4): 1544-1554.
- Holland, S. J., M. J. Powell, C. Franci, E. W. Chan, A. M. Frieria, R. E. Atchison, J. McLaughlin, S. E. Swift, E. S. Pali, G. Yam, S. Wong, J. Lasaga, M. R. Shen, S. Yu, W. Xu, Y. Hitoshi, J. Bogenberger, J. E. Nor, D. G. Payan and J. B. Lorens (2005). "**Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation.**" *Cancer Res* **65**(20): 9294-9303.
- Houldsworth, J., C. Cordon-Cardo, M. Ladanyi, D. P. Kelsen and R. S. Chaganti (1990). "**Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas.**" *Cancer Res* **50**(19): 6417-6422.
- House, C. M., A. Moller and D. D. Bowtell (2009). "**Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways.**" *Cancer Res* **69**(23): 8835-8838.
- Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "**Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling.**" *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 117-123.
- Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). "**Protein tyrosine kinase structure and function.**" *Annu Rev Biochem* **69**: 373-398.

- Hudziak, R. M., G. D. Lewis, M. Winget, B. M. Fendly, H. M. Shepard and A. Ullrich (1989). "**p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor.**" *Mol Cell Biol* **9**(3): 1165-1172.
- Huff, J. L., M. A. Jelinek, C. A. Borgman, T. J. Lansing and J. T. Parsons (1993). "**The protooncogene c-sea encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/scatter factor receptor.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6140-6144.
- Humphrey, P. A., X. Zhu, R. Zarnegar, P. E. Swanson, T. L. Ratliff, R. T. Vollmer and M. L. Day (1995). "**Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma.**" *Am J Pathol* **147**(2): 386-396.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "**Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.**" *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.
- Iwama, A., K. Okano, T. Sudo, Y. Matsuda and T. Suda (1994). "**Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase gene, STK, derived from enriched hematopoietic stem cells.**" *Blood* **83**(11): 3160-3169.
- Jacob, A. N., J. Kalapurakal, W. R. Davidson, G. Kandpal, N. Dunson, Y. Prashar and R. P. Kandpal (1999). "**A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145.**" *Cancer Detect Prev* **23**(4): 325-332.
- Jacobsen, K., A. Groth and B. M. Willumsen (2002). "**Ras-inducible immortalized fibroblasts: focus formation without cell cycle deregulation.**" *Oncogene* **21**(19): 3058-3067.
- Jahangiri, A., M. De Lay, L. M. Miller, W. S. Carbonell, Y. L. Hu, K. Lu, M. W. Tom, J. Paquette, T. A. Tokuyasu, S. Tsao, R. Marshall, A. Perry, K. M. Bjorgan, M. M. Chaumeil, S. M. Ronen, G. Bergers and M. K. Aghi (2013). "**Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance.**" *Clin Cancer Res* **19**(7): 1773-1783.
- Janssen, J. W., A. S. Schulz, A. C. Steenvoorden, M. Schmidberger, S. Strehl, P. F. Ambros and C. R. Bartram (1991). "**A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential.**" *Oncogene* **6**(11): 2113-2120.
- Jazaeri, A. A., C. S. Awtrey, G. V. Chandramouli, Y. E. Chuang, J. Khan, C. Sotiriou, O. Aprelikova, C. J. Yee, K. K. Zorn, M. J. Birrer, J. C. Barrett and J. Boyd (2005). "**Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers.**" *Clin Cancer Res* **11**(17): 6300-6310.
- Jeffers, M., L. Schmidt, N. Nakaigawa, C. P. Webb, G. Weirich, T. Kishida, B. Zbar and G. F. Vande Woude (1997). "**Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11445-11450.
- Jia, R. and H. Hanafusa (1994). "**The proto-oncogene of v-ryk (v-ryk) is a novel receptor-type protein tyrosine kinase with extracellular Ig/GN-III domains.**" *J Biol Chem* **269**(3): 1839-1844.
- Jin, H., R. Yang, Z. Zheng, M. Romero, J. Ross, H. Bou-Reslan, R. A. Carano, I. Kasman, E. Mai, J. Young, J. Zha, Z. Zhang, S. Ross, R. Schwall, G. Colbern and M. Merchant (2008). "**MetMAB, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival.**" *Cancer Res* **68**(11): 4360-4368.
- Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "**Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth.**" *Genes Dev* **23**(5): 537-548.
- K. Michael Weidner, M. S., and Walter Birchmeier (1993). "**The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells.**" *J Cell Biol* **121**(1): 145-154.

- Kang, H. C., I. J. Kim, J. H. Park, Y. Shin, J. L. Ku, M. S. Jung, B. C. Yoo, H. K. Kim and J. G. Park (2004). **"Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays."** *Clin Cancer Res* **10**(1 Pt 1): 272-284.
- Karhu, R., E. Mahlamaki and A. Kallioniemi (2006). **"Pancreatic adenocarcinoma -- genetic portrait from chromosomes to microarrays."** *Genes Chromosomes Cancer* **45**(8): 721-730.
- Kassis, S., T. Melhuish, R. S. Annan, S. L. Chen, J. C. Lee, G. P. Livi and C. L. Creasy (2000). **"Saccharomyces cerevisiae Yak1p protein kinase autophosphorylates on tyrosine residues and phosphorylates myelin basic protein on a C-terminal serine residue."** *Biochem J* **348 Pt 2**: 263-272.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi and K. Fujiwara (2001). **"Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers."** *J Cell Biol* **153**(3): 569-584.
- Kelly, P. A. and Z. Rahmani (2005). **"DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1."** *Mol Biol Cell* **16**(8): 3562-3573.
- Kentrup, H., W. Becker, J. Heukelbach, A. Wilmes, A. Schurmann, C. Huppertz, H. Kainulainen and H. G. Joost (1996). **"Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII."** *J Biol Chem* **271**(7): 3488-3495.
- Kinstrie, R., N. Luebbing, D. Miranda-Saavedra, G. Sibbet, J. Han, P. A. Lochhead and V. Cleghon (2010). **"Characterization of a domain that transiently converts class 2 DYRKs into intramolecular tyrosine kinases."** *Sci Signal* **3**(111): ra16.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux and H. G. Khorana (1971). **"Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases."** *J Mol Biol* **56**(2): 341-361.
- Kohn, E. C. and L. A. Liotta (1995). **"Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention."** *Cancer Res* **55**(9): 1856-1862.
- Komarova, E. A., C. R. Zelnick, D. Chin, M. Zeremski, A. S. Gleiberman, S. S. Bacus and A. V. Gudkov (1997). **"Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus."** *Cancer Res* **57**(23): 5217-5220.
- Koon, N., R. Schneider-Stock, M. Sarlomo-Rikala, J. Lasota, M. Smolkin, G. Petroni, A. Zaika, C. Boltze, F. Meyer, L. Andersson, S. Knuutila, M. Miettinen and W. El-Rifai (2004). **"Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours."** *Gut* **53**(2): 235-240.
- Korshunov, V. A. (2012). **"Axl-dependent signalling: a clinical update."** *Clin Sci (Lond)* **122**(8): 361-368.
- Korsmeyer, S. J. (1992). **"Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death."** *Blood* **80**(4): 879-886.
- Kostich, M., J. English, V. Madison, F. Gheyas, L. Wang, P. Qiu, J. Greene and T. M. Laz (2002). **"Human members of the eukaryotic protein kinase family."** *Genome Biol* **3**(9): RESEARCH0043.
- Koul, A., A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh and A. Ullrich (2000). **"Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of Mycobacterium tuberculosis."** *J Bacteriol* **182**(19): 5425-5432.
- Kubo, T., H. Yamamoto, W. W. Lockwood, I. Valencia, J. Soh, M. Peyton, M. Jida, H. Otani, T. Fujii, M. Ouchida, N. Takigawa, K. Kiura, K. Shimizu, H. Date, J. D. Minna, M. Varella-Garcia, W. L. Lam, A. F. Gazdar and S. Toyooka (2009). **"MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors."** *Int J Cancer* **124**(8): 1778-1784.
- Kuniyasu, H., W. Yasui, Y. Kitadai, H. Yokozaki, H. Ito and E. Tahara (1992). **"Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer."** *Biochem Biophys Res Commun* **189**(1): 227-232.

- Kwon, H. J., T. Owa, C. A. Hassig, J. Shimada and S. L. Schreiber (1998). "**Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase.**" Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3356-3361.
- Lan, Z., H. Wu, W. Li, S. Wu, L. Lu, M. Xu and W. Dai (2000). "**Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway.**" Blood **95**(2): 633-638.
- Lane, D. P. (1992). "**Cancer. p53, guardian of the genome.**" Nature **358**(6381): 15-16.
- Lasfargues, E. Y., W. G. Coutinho and A. S. Dion (1979). "**A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication.**" In Vitro **15**(9): 723-729.
- Lawrence, R. E. and R. Salgia (2010). "**MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer.**" Cell Adh Migr **4**(1): 146-152.
- Leder, S., H. Czajkowska, B. Maenz, K. De Graaf, A. Barthel, H. G. Joost and W. Becker (2003). "**Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties.**" Biochem J **372**(Pt 3): 881-888.
- Lee, K., X. Deng and E. Friedman (2000). "**Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells.**" Cancer Res **60**(13): 3631-3637.
- Lee, S. T., K. M. Strunk and R. A. Spritz (1993). "**A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes.**" Oncogene **8**(12): 3403-3410.
- Lemke, G. and C. V. Rothlin (2008). "**Immunobiology of the TAM receptors.**" Nat Rev Immunol **8**(5): 327-336.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (1994). "**Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization.**" Trends Biochem Sci **19**(11): 459-463.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "**Genetic instabilities in human cancers.**" Nature **396**(6712): 643-649.
- Lesko E, M. M. (2008). "**The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis.**" Front Biosci **13**: 1271-1280.
- Letai, A. G. (2008). "**Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis.**" Nat Rev Cancer **8**(2): 121-132.
- Levine, A. J. (1997). "**p53, the cellular gatekeeper for growth and division.**" Cell **88**(3): 323-331.
- Li, B., A. Torossian, Y. Sun, R. Du, A. P. Dicker and B. Lu (2012). "**Higher levels of c-Met expression and phosphorylation identify cell lines with increased sensitivity to AMG-458, a novel selective c-Met inhibitor with radiosensitizing effects.**" Int J Radiat Oncol Biol Phys **84**(4): e525-531.
- Li, M. Z. and S. J. Elledge (2007). "**Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC.**" Nat Methods **4**(3): 251-256.
- Li, Y., X. Ye, C. Tan, J. A. Hongo, J. Zha, J. Liu, D. Kallop, M. J. Ludlam and L. Pei (2009). "**Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis.**" Oncogene **28**(39): 3442-3455.
- Liotta, L. A. and W. G. Stetler-Stevenson (1991). "**Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation.**" Cancer Res **51**(18 Suppl): 5054s-5059s.

- Liu, L., A. Siegmund, N. Xi, P. Kaplan-Lefko, K. Rex, A. Chen, J. Lin, J. Moriguchi, L. Berry, L. Huang, Y. Teffera, Y. Yang, Y. Zhang, S. F. Bellon, M. Lee, R. Shimanovich, A. Bak, C. Dominguez, M. H. Norman, J. C. Harmange, I. Dussault and T. S. Kim (2008). "**Discovery of a potent, selective, and orally bioavailable c-Met inhibitor: 1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-N-(5-(7-methoxyquinolin-4-yloxy)pyridin-2-yl)-5-methyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazole-4-carboxamide (AMG 458).**" *J Med Chem* **51**(13): 3688-3691.
- Liu, L., J. Greger, H. Shi, Y. Liu, J. Greshock, R. Annan, W. Halsey, G. M. Sathe, A. M. Martin and T. M. Gilmer (2009). "**Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL.**" *Cancer Res* **69**(17): 6871-6878.
- Lochhead, P. A., G. Sibbet, R. Kinstrie, T. Cleghon, M. Rylatt, D. K. Morrison and V. Cleghon (2003). "**dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in Drosophila.**" *Biochem J* **374**(Pt 2): 381-391.
- Lochhead, P. A., G. Sibbet, N. Morrice and V. Cleghon (2005). "**Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs.**" *Cell* **121**(6): 925-936.
- Lord, K. A., C. L. Creasy, A. G. King, C. King, B. M. Burns, J. C. Lee and S. B. Dillon (2000). "**REDK, a novel human regulatory erythroid kinase.**" *Blood* **95**(9): 2838-2846.
- Lu, P., K. Takai, V. M. Weaver and Z. Werb (2011). "**Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease.**" *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(12).
- Lu, Y., H. P. Yao and M. H. Wang (2007). "**Multiple variants of the RON receptor tyrosine kinase: biochemical properties, tumorigenic activities, and potential drug targets.**" *Cancer Lett* **257**(2): 157-164.
- Lutterbach, B., Q. Zeng, L. J. Davis, H. Hatch, G. Hang, N. E. Kohl, J. B. Gibbs and B. S. Pan (2007). "**Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival.**" *Cancer Res* **67**(5): 2081-2088.
- Meyer, A. S., M. A. Miller, F. B. Gertler and D. A. Lauffenburger (2013). "**The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells.**" *Sci Signal* **6**(287): ra66.
- Mackiewicz, M., K. Huppi, J. J. Pitt, T. H. Dorsey, S. Ambs and N. J. Caplen (2011). "**Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA.**" *Breast Cancer Res Treat* **130**(2): 663-679.
- Maddika, S. and J. Chen (2009). "**Protein kinase DYRK2 is a scaffold that facilitates assembly of an E3 ligase.**" *Nat Cell Biol* **11**(4): 409-419.
- Maina, F., M. C. Hilton, R. Andres, S. Wyatt, R. Klein and A. M. Davies (1998). "**Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development.**" *Neuron* **20**(5): 835-846.
- Maina, F., M. C. Hilton, C. Ponzetto, A. M. Davies and R. Klein (1997). "**Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons.**" *Genes Dev* **11**(24): 3341-3350.
- Mallini, P., T. Lennard, J. Kirby and A. Meeson (2013). "**Epithelial-to-mesenchymal transition: What is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance.**" *Cancer Treat Rev*.
- Maniatis, J. S. E. F. T. (1989). "**Molecular cloning: a laboratory manual**" *New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory*(2 nd edn).
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "**The protein kinase complement of the human genome.**" *Science* **298**(5600): 1912-1934.

- Mark, M. R., D. T. Scadden, Z. Wang, Q. Gu, A. Goddard and P. J. Godowski (1994). "**rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain.**" J Biol Chem **269**(14): 10720-10728.
- Martin, D. E., A. Soulard and M. N. Hall (2004). "**TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1.**" Cell **119**(7): 969-979.
- Martin, S. G. and M. Berthelot-Grosjean (2009). "**Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle.**" Nature **459**(7248): 852-856.
- Masuya, D., C. Huang, D. Liu, T. Nakashima, K. Kameyama, R. Haba, M. Ueno and H. Yokomise (2004). "**The tumour-stromal interaction between intratumoral c-Met and stromal hepatocyte growth factor associated with tumour growth and prognosis in non-small-cell lung cancer patients.**" Br J Cancer **90**(8): 1555-1562
- Matsumoto, K. and T. Nakamura (2003). "**NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics.**" Cancer Sci **94**(4): 321-327.
- Matsuo, R., W. Ochiai, K. Nakashima and T. Taga (2001). "**A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody.**" J Immunol Methods **247**(1-2): 141-151.
- Mazmanian, G., M. Kovshilovsky, D. Yen, A. Mohanty, S. Mohanty, A. Nee and R. M. Nissen (2010). "**The zebrafish dyrk1b gene is important for endoderm formation.**" Genesis **48**(1): 20-30.
- McCloskey, P., Y. W. Fridell, E. Attar, J. Villa, Y. Jin, B. Varnum and E. T. Liu (1997). "**GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl.**" J Biol Chem **272**(37): 23285-23291.
- Medico, E., A. M. Mongiovi, J. Huff, M. A. Jelinek, A. Follenzi, G. Gaudino, J. T. Parsons and P. M. Comoglio (1996). "**The tyrosine kinase receptors Ron and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro.**" Mol Biol Cell **7**(4): 495-504.
- Mercer, S. E., D. Z. Ewton, X. Deng, S. Lim, T. R. Mazur and E. Friedman (2005). "**Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts.**" J Biol Chem **280**(27): 25788-25801.
- Meric, F., W. P. Lee, A. Sahin, H. Zhang, H. J. Kung and M. C. Hung (2002). "**Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer.**" Clin Cancer Res **8**(2): 361-367.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "**Liver regeneration.**" Science **276**(5309): 60-66.
- Miller, C. T., S. Aggarwal, T. K. Lin, S. L. Dagenais, J. I. Contreras, M. B. Orringer, T. W. Glover, D. G. Beer and L. Lin (2003). "**Amplification and overexpression of the dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2) gene in esophageal and lung adenocarcinomas.**" Cancer Res **63**(14): 4136-4143.
- Miller, C. T., J. R. Moy, L. Lin, M. Schipper, D. Normolle, D. E. Brenner, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer and D. G. Beer (2003). "**Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia.**" Clin Cancer Res **9**(13): 4819-4825.
- Mimoto, R., N. Taira, H. Takahashi, T. Yamaguchi, M. Okabe, K. Uchida, Y. Miki and K. Yoshida (2013). "**DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail.**" Cancer Lett **339**(2): 214-225.
- Miyata, Y. and E. Nishida (1999). "**Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions.**" Biochem Biophys Res Commun **266**(2): 291-295.
- Moller, A., C. M. House, C. S. Wong, D. B. Scanlon, M. C. Liu, Z. Ronai and D. D. Bowtell (2009). "**Inhibition of Siah ubiquitin ligase function.**" Oncogene **28**(2): 289-296.

- Moniaux, N., C. Nemos, B. M. Schmied, S. C. Chauhan, S. Deb, K. Morikane, A. Choudhury, M. Vanlith, M. Sutherlin, J. M. Sikela, M. A. Hollingsworth and S. K. Batra (2006). "**The human homologue of the RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1), localized on the 19q13 amplicon, is associated with tumorigenesis.**" *Oncogene* **25**(23): 3247-3257.
- Montminy, M. R., G. A. Gonzalez and K. K. Yamamoto (1990). "**Regulation of cAMP-inducible genes by CREB.**" *Trends Neurosci* **13**(5): 184-188.
- Moriya, H., Y. Shimizu-Yoshida, A. Omori, S. Iwashita, M. Katoh and A. Sakai (2001). "**Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal.**" *Genes Dev* **15**(10): 1217-1228.
- Moseley, J. B., A. Mayeux, A. Paoletti and P. Nurse (2009). "**A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast.**" *Nature* **459**(7248): 857-860.
- Mudduluru, G. and H. Allgayer (2008). "**The human receptor tyrosine kinase Axl gene--promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation.**" *Biosci Rep* **28**(3): 161-176.
- Mudduluru, G., P. Ceppi, R. Kumarswamy, G. V. Scagliotti, M. Papotti and H. Allgayer (2011). "**Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer.**" *Oncogene* **30**(25): 2888-2899.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "**Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.**" *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Muraoka, R. S., W. Y. Sun, M. C. Colbert, S. E. Waltz, D. P. Witte, J. L. Degen and S. J. Friezner Degen (1999). "**The Ron/STK receptor tyrosine kinase is essential for peri-implantation development in the mouse.**" *J Clin Invest* **103**(9): 1277-1285.
- Nagata, S. (1999). "**Fas ligand-induced apoptosis.**" *Annu Rev Genet* **33**: 29-55.
- Nakamura, T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro and S. Shimizu (1989). "**Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.**" *Nature* **342**(6248): 440-443.
- Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos and et al. (1991). "**Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor.**" *EMBO J* **10**(10): 2867-2878.
- Naran, S., X. Zhang and S. J. Hughes (2009). "**Inhibition of HGF/MET as therapy for malignancy.**" *Expert Opin Ther Targets* **13**(5): 569-581.
- Negami, A. I. and T. Tominaga (1989). "**Gland and epithelium formation in vitro from epithelial cells of the human endometrium.**" *Hum Reprod* **4**(6): 620-624.
- O'Bryan, J. P., R. A. Frye, P. C. Cogswell, A. Neubauer, B. Kitch, C. Prokop, R. Espinosa, 3rd, M. M. Le Beau, H. S. Earp and E. T. Liu (1991). "**axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase.**" *Mol Cell Biol* **11**(10): 5016-5031.
- O'Toole, J. M., K. E. Rabenau, K. Burns, D. Lu, V. Mangalampalli, P. Balderes, N. Covino, R. Bassi, M. Prewett, K. J. Gottfredsen, M. N. Thobe, Y. Cheng, Y. Li, D. J. Hicklin, Z. Zhu, S. E. Waltz, M. J. Hayman, D. L. Ludwig and D. S. Pereira (2006). "**Therapeutic implications of a human neutralizing antibody to the macrophage-stimulating protein receptor tyrosine kinase (RON), a c-MET family member.**" *Cancer Res* **66**(18): 9162-9170.
- Ohashi, K., K. Mizuno, K. Kuma, T. Miyata and T. Nakamura (1994). "**Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain.**" *Oncogene* **9**(3): 699-705.

- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki and Y. Okada (1997). "**Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.**" *J Biol Chem* **272**(4): 2446-2451.
- Oliveras-Ferraros, C., B. Corominas-Faja, S. Cufi, A. Vazquez-Martin, B. Martin-Castillo, J. M. Iglesias, E. Lopez-Bonet, A. G. Martin and J. A. Menendez (2012). "**Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin).**" *Cell Cycle* **11**(21): 4020-4032.
- Oshita, F., M. Ikehara, A. Sekiyama, N. Hamanaka, H. Saito, K. Yamada, K. Noda, Y. Kameda and Y. Miyagi (2004). "**Genomic-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profile with chemoresistance in patients with advanced lung cancer.**" *J Exp Ther Oncol* **4**(2): 155-160.
- Ou, W. B., J. M. Corson, D. L. Flynn, W. P. Lu, S. C. Wise, R. Bueno, D. J. Sugarbaker and J. A. Fletcher (2011). "**AXL regulates mesothelioma proliferation and invasiveness.**" *Oncogene* **30**(14): 1643-1652.
- P Fedi, S. R. T., S.A Aaronson (1997). "**Growth factors.**" *Cancer Medicine*(J.F Holland, R.C Bast, D.L Morton, E Frei, D.W Kufe, R.R Weichselbaum (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore,): 41-64.pp
- Pan, M. G., Y. Xiong and F. Chen (2012). "**NFAT Gene Family in Inflammation and Cancer.**" *Curr Mol Med*.
- Pang, K. M., T. Ishidate, K. Nakamura, M. Shirayama, C. Trzepacz, C. M. Schubert, J. R. Priess and C. C. Mello (2004). "**The minibrain kinase homolog, mbk-2, is required for spindle positioning and asymmetric cell division in early C. elegans embryos.**" *Dev Biol* **265**(1): 127-139.
- Paolino, M., A. Choidas, S. Wallner, B. Pranjic, I. Uribealago, S. Loeser, A. M. Jamieson, W. Y. Langdon, F. Ikeda, J. P. Fededa, S. J. Cronin, R. Nitsch, C. Schultz-Fademrecht, J. Eickhoff, S. Menninger, A. Unger, R. Torika, T. Gruber, R. Hinterleitner, G. Baier, D. Wolf, A. Ullrich, B. M. Klebl and J. M. Penninger (2014). "**The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells.**" *Nature*.
- Papadopoulos, C., K. Arato, E. Lilienthal, J. Zerweck, M. Schutkowski, N. Chatain, G. Muller-Newen, W. Becker and S. de la Luna (2011). "**Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity.**" *J Biol Chem* **286**(7): 5494-5505.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott and D. Baltimore (1993). "**Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-8396.
- Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A. E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, M. D. Waterfield, C. Ponzetto, P. G. Pelicci and et al. (1995). "**The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein.**" *Oncogene* **10**(8): 1631-1638.
- Perez, M., C. Garcia-Limones, I. Zapico, A. Marina, M. L. Schmitz, E. Munoz and M. A. Calzado (2012). "**Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways.**" *J Mol Cell Biol*.
- Perez, M., C. Garcia-Limones, I. Zapico, A. Marina, M. L. Schmitz, E. Munoz and M. A. Calzado (2012). "**Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways.**" *J Mol Cell Biol* **4**(5): 316-330.
- Pierce, A., B. Bliesner, M. Xu, S. Nielsen-Preiss, G. Lemke, S. Tobet and M. E. Wierman (2008). "**Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration.**" *Mol Endocrinol* **22**(11): 2481-2495.
- Pierce, A., M. Xu, B. Bliesner, Z. Liu, J. Richards, S. Tobet and M. E. Wierman (2011). "**Hypothalamic but not pituitary or ovarian defects underlie the reproductive abnormalities in Axl/Tyro3 null mice.**" *Mol Cell Endocrinol* **339**(1-2): 151-158.

- Plowman, G. D., S. Sudarsanam, J. Bingham, D. Whyte and T. Hunter (1999). "**The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms.**" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13603-13610.
- Plunkett, W., P. Huang and V. Gandhi (1995). "**Preclinical characteristics of gemcitabine.**" Anticancer Drugs **6 Suppl 6**: 7-13.
- Polvi, A., E. Armstrong, C. Lai, G. Lemke, K. Huebner, R. A. Spritz, L. C. Guida, R. D. Nicholls and K. Alitalo (1993). "**The human TYRO3 gene and pseudogene are located in chromosome 15q14-q25.**" Gene **134**(2): 289-293.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. dalla Zonca, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou and P. M. Comoglio (1994). "**A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family.**" Cell **77**(2): 261-271.
- Porter, A. C. and R. R. Vaillancourt (1998). "**Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis.**" Oncogene **17**(11 Reviews): 1343-1352.
- Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "**Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.**" Cell **141**(1): 39-51.
- Rae, J. M., C. J. Creighton, J. M. Meck, B. R. Haddad and M. D. Johnson (2007). "**MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research.**" Breast Cancer Res Treat **104**(1): 13-19.
- Raich, W. B., C. Moorman, C. O. Lacefield, J. Lehrer, D. Bartsch, R. H. Plasterk, E. R. Kandel and O. Hobert (2003). "**Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A.**" Genetics **163**(2): 571-580.
- Rankin, E. B., K. C. Fuh, T. E. Taylor, A. J. Krieg, M. Musser, J. Yuan, K. Wei, C. J. Kuo, T. A. Longacre and A. J. Giaccia (2010). "**AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer.**" Cancer Res **70**(19): 7570-7579.
- Reichert, J. M. (2013). "**Antibodies to watch in 2013: Mid-year update.**" MAbs **5**(4): 513-517.
- Rho, J. K., Y. J. Choi, S. Y. Kim, T. W. Kim, E. K. Choi, S. J. Yoon, B. M. Park, E. Park, J. H. Bae, C. M. Choi and J. C. Lee (2014). "**MET and AXL inhibitor NPS-1034 exerts efficacy against lung cancer cells resistant to EGFR kinase inhibitors because of MET or AXL activation.**" Cancer Res **74**(1): 253-262.
- Riedel, H., S. Massoglia, J. Schlessinger and A. Ullrich (1988). "**Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptors transforms NIH 3T3 mouse fibroblasts.**" Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1477-1481.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "**Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.**" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Rimassa, L., N. Personeni, M. Simonelli and A. Santoro (2013). "**Tivantinib: a new promising mesenchymal-epithelial transition factor inhibitor in the treatment of hepatocellular carcinoma.**" Future Oncol **9**(2): 153-165.
- Riordan, J. R., K. Deuchars, N. Kartner, N. Alon, J. Trent and V. Ling (1985). "**Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines.**" Nature **316**(6031): 817-819.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu and S. F. Lin (2000). "**The protein tyrosine kinase family of the human genome.**" Oncogene **19**(49): 5548-5557.
- Rodriguez, L. G., X. Wu and J. L. Guan (2005). "**Wound-healing assay.**" Methods Mol Biol **294**: 23-29.

- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa and M. W. Kirschner (1999). **"The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly."** *Cell* **97**(2): 221-231.
- Rong, S., S. Segal, M. Anver, J. H. Resau and G. F. Vande Woude (1994). **"Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4731-4735.
- Ronsin, C., F. Muscatelli, M. G. Mattei and R. Breathnach (1993). **"A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family."** *Oncogene* **8**(5): 1195-1202.
- Rusconi, F., R. Piazza, E. Vagge and C. Gambacorti-Passerini (2014). **"Bosutinib : a review of preclinical and clinical studies in chronic myelogenous leukemia."** *Expert Opin Pharmacother*.
- Sacher, F., C. Moller, W. Bone, U. Gottwald and M. Fritsch (2007). **"The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice."** *Mol Cell Endocrinol* **267**(1-2): 80-88.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). **"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia."** *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sameni, M., K. Moin and B. F. Sloane (2000). **"Imaging proteolysis by living human breast cancer cells."** *Neoplasia* **2**(6): 496-504.
- Santoro, A., L. Rimassa, I. Borbath, B. Daniele, S. Salvagni, J. L. Van Laethem, H. Van Vlierberghe, J. Trojan, F. T. Kolligs, A. Weiss, S. Miles, A. Gasbarrini, M. Lencioni, L. Cicalese, M. Sherman, C. Gridelli, P. Buggisch, G. Gerken, R. M. Schmid, C. Boni, N. Personeni, Z. Hassoun, G. Abbadessa, B. Schwartz, R. Von Roemeling, M. E. Lamar, Y. Chen and C. Porta (2013). **"Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study."** *Lancet Oncol* **14**(1): 55-63.
- Santoro, A., M. Simonelli, C. Rodriguez-Lope, P. Zucali, L. H. Camacho, A. Granito, N. Senzer, L. Rimassa, G. Abbadessa, B. Schwartz, M. Lamar, R. E. Savage and J. Bruix (2013). **"A Phase-1b study of tivantinib (ARQ 197) in adult patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis."** *Br J Cancer* **108**(1): 21-24.
- Sasaki, T., P. G. Knyazev, N. J. Clout, Y. Cheburkin, W. Gohring, A. Ullrich, R. Timpl and E. Hohenester (2006). **"Structural basis for Gas6-Axl signalling."** *EMBO J* **25**(1): 80-87.
- Saxena, M., M. A. Stephens, H. Pathak and A. Rangarajan (2011). **"Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters."** *Cell Death Dis* **2**: e179.
- Schmidt, C., F. Bladt, S. Goedecke, V. Brinkmann, W. Zschiesche, M. Sharpe, E. Gherardi and C. Birchmeier (1995). **"Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development."** *Nature* **373**(6516): 699-702.
- Schoffski, P., J. A. Garcia, W. M. Stadler, T. Gil, E. Jonasch, S. T. Tagawa, M. Smitt, X. Yang, K. S. Oliner, A. Anderson, M. Zhu and F. Kabbinavar (2011). **"A phase II study of the efficacy and safety of AMG 102 in patients with metastatic renal cell carcinoma."** *BJU Int* **108**(5): 679-686.
- Schulz, A. S., L. Schleithoff, M. Faust, C. R. Bartram and J. W. Janssen (1993). **"The genomic structure of the human UFO receptor."** *Oncogene* **8**(2): 509-513.
- Shankar, S. L., K. O'Guin, M. Kim, B. Varnum, G. Lemke, C. F. Brosnan and B. Shafit-Zagardo (2006). **"Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis."** *J Neurosci* **26**(21): 5638-5648.
- Shawver, L. K., D. Slamon and A. Ullrich (2002). **"Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy."** *Cancer Cell* **1**(2): 117-123.

- Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann and Y. Kawaoka (2006). "**Tyrosine-Mediated Cell Entry of Ebola and Marburg Viruses.**" *J Virol* **80**(20): 10109-10116.
- Shindoh, N., J. Kudoh, H. Maeda, A. Yamaki, S. Minoshima, Y. Shimizu and N. Shimizu (1996). "**Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21.**" *Biochem Biophys Res Commun* **225**(1): 92-99.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal "**Cancer statistics, 2012.**"
- Skurat, A. V. and A. D. Dietrich (2004). "**Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases.**" *J Biol Chem* **279**(4): 2490-2498.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "**Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.**" *Science* **235**(4785): 177-182.
- Smith, D. J., M. E. Stevens, S. P. Sudhanagunta, R. T. Bronson, M. Makhinson, A. M. Watabe, T. J. O'Dell, J. Fung, H. U. Weier, J. F. Cheng and E. M. Rubin (1997). "**Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome.**" *Nat Genet* **16**(1): 28-36.
- Song, W. J., L. R. Sternberg, C. Kasten-Sportes, M. L. Keuren, S. H. Chung, A. C. Slack, D. E. Miller, T. W. Glover, P. W. Chiang, L. Lou and D. M. Kurnit (1996). "**Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region".**" *Genomics* **38**(3): 331-339.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider and et al. (1993). "**SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences.**" *Cell* **72**(5): 767-778.
- Sonnenberg, E., D. Meyer, K. M. Weidner and C. Birchmeier (1993). "**Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development.**" *J Cell Biol* **123**(1): 223-235.
- Soule, H. D., T. M. Maloney, S. R. Wolman, W. D. Peterson, Jr., R. Brenz, C. M. McGrath, J. Russo, R. J. Pauley, R. F. Jones and S. C. Brooks (1990). "**Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10A.**" *Cancer Res* **50**(18): 6075-6086.
- Stabile, L. P., M. E. Rothstein, P. Keohavong, J. Jin, J. Yin, S. R. Land, S. Dacic, T. M. Luong, K. J. Kim, A. M. Dulak and J. M. Siegfried (2008). "**Therapeutic targeting of human hepatocyte growth factor with a single neutralizing monoclonal antibody reduces lung tumorigenesis.**" *Mol Cancer Ther* **7**(7): 1913-1922.
- Statista (2011). "**Destatis - Todesursachen in Deutschland 2010.**" Statistisches Bundesamt <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/158441/umfrage/Anzahl-der-Todesfaelle-nach-Todesursachen/Stand-11.04.2012>
- Statistisches Bundesamt, M. N. (2011). "**Krankheitskostenrechnung.**" https://www.gbe-bund.de/oowa921install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_n eu/&p_aid=3&p_aid=42245586&nummer=553&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=65027640 Stand13.04.2012
- Steeg, P. S. (2003). "**Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells.**" *Nat Rev Cancer* **3**(1): 55-63.
- Stoker, A. W. (2005). "**Protein tyrosine phosphatases and signalling.**" *J Endocrinol* **185**(1): 19-33.

- Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman and J. Gray (1987). "**Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility.**" Nature **327**(6119): 239-242.
- Sun, W., T. Ai, Y. Gao, Y. Zhang, J. Cui and L. Song (2013). "**Expression and prognostic relevance of MET and phospho-BAD in non-small cell lung cancer.**" Onco Targets Ther **6**: 1315-1323.
- Symonds, H., L. Krall, L. Remington, M. Saenz-Robles, S. Lowe, T. Jacks and T. Van Dyke (1994). "**p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo.**" Cell **78**(4): 703-711.
- Taira, N., R. Mimoto, M. Kurata, T. Yamaguchi, M. Kitagawa, Y. Miki and K. Yoshida (2012). "**DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells.**" J Clin Invest **122**(3): 859-872.
- Taira, N., K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki and K. Yoshida (2007). "**DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage.**" Mol Cell **25**(5): 725-738.
- Taira, N., H. Yamamoto, T. Yamaguchi, Y. Miki and K. Yoshida (2010). "**ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage.**" J Biol Chem **285**(7): 4909-4919.
- Takebayashi, T., M. Iwamoto, A. Jikko, T. Matsumura, M. Enomoto-Iwamoto, F. Myoukai, E. Koyama, T. Yamaai, K. Matsumoto, T. Nakamura and et al. (1995). "**Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes.**" J Cell Biol **129**(5): 1411-1419.
- Taminato, A., R. Bagattini, R. Gorjao, G. Chen, A. Kuspa and G. M. Souza (2002). "**Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of Dictyostelium discoideum cells.**" Mol Biol Cell **13**(7): 2266-2275.
- Tan, D. S., B. Haaland, J. M. Gan, S. C. Tham, I. Sinha, E. H. Tan, K. H. Lim, A. Takano, S. S. Krisna, M. M. Thu, H. P. Liew, A. Ullrich, W. T. Lim and B. T. Chua (2014). "**Bosutinib inhibits migration and invasion via ack1 in kras mutant non-small cell lung cancer.**" Mol Cancer **13**(1): 13.
- Tan, Y. H., C. Z. Yang, C. H. Zhao, J. Qi, H. Peng, J. X. Wang, Y. Zhou, Y. Xiao and L. Lan (2004). "**Identification of differentially expressed genes involved in multidrug resistance in K562/A02 by cDNA microarray.**" Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **26**(6): 328-332.
- Tatebe, H., K. Nakano, R. Maximo and K. Shiozaki (2008). "**Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast.**" Curr Biol **18**(5): 322-330.
- Tejedor, F., X. R. Zhu, E. Kaltenbach, A. Ackermann, A. Baumann, I. Canal, M. Heisenberg, K. F. Fischbach and O. Pongs (1995). "**minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila.**" Neuron **14**(2): 287-301.
- Teng, M. W., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber and M. J. Smyth (2008). "**Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer.**" J Leukoc Biol **84**(4): 988-993.
- Todaro, G. J. and H. Green (1963). "**Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.**" J Cell Biol **17**: 299-313.
- Tong, X., X. Zhang, J. Fan, Y. Tong, S. Li, J. Jin and H. Yao (2013). "**The RON receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in Burkitt lymphoma.**" Cancer Biol Ther **14**(4): 370-377.
- Tonks, N. K. (2009). "**Pseudophosphatases: grab and hold on.**" Cell **139**(3): 464-465.
- Trojan, J. and S. Zeuzem (2013). "**Tivantinib in hepatocellular carcinoma.**" Expert Opin Investig Drugs **22**(1): 141-147.

- Trusolino, L., A. Bertotti and P. M. Comoglio (2010). "**MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer.**" Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 834-848.
- Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda and N. Kitamura (1995). "**Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor.**" Nature **373**(6516): 702-705.
- Ullrich, A. D., R. D. Torika, Y. U. Zhang, G. H. Keri, L. H. Örfi and I. H. Szabadkai (2011). "**QUINOLINYLOXYPHENYLSULFONAMIDES (Patent) WO/2011/045084.**" <http://www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2011045084>
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. .
- Vajkoczy, P., P. Knyazev, A. Kunkel, H. H. Capelle, S. Behrndt, H. von Tengg-Kobligk, F. Kiessling, U. Eichelsbacher, M. Essig, T. A. Read, R. Erber and A. Ullrich (2006). "**Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival.**" Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5799-5804.
- Varjosalo, M., M. Bjorklund, F. Cheng, H. Syvanen, T. Kivioja, S. Kilpinen, Z. Sun, O. Kallioniemi, H. G. Stunnenberg, W. W. He, P. Ojala and J. Taipale (2008). "**Application of active and kinase-deficient kinome collection for identification of kinases regulating hedgehog signaling.**" Cell **133**(3): 537-548.
- Varnum, B. C., C. Young, G. Elliott, A. Garcia, T. D. Bartley, Y. W. Fridell, R. W. Hunt, G. Trail, C. Clogston, R. J. Toso and et al. (1995). "**Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6.**" Nature **373**(6515): 623-626.
- Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams (1988). "**Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.**" Nature **335**(6189): 440-442.
- Veikkola, T. and K. Alitalo (1999). "**VEGFs, receptors and angiogenesis.**" Semin Cancer Biol **9**(3): 211-220.
- Verkhovskiy, A. B., T. M. Svitkina and G. G. Borisy (1995). "**Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles.**" J Cell Biol **131**(4): 989-1002.
- Verma, A., S. L. Warner, H. Vankayalapati, D. J. Bearss and S. Sharma (2011). "**Targeting Axl and Mer kinases in cancer.**" Mol Cancer Ther **10**(10): 1763-1773.
- Vlaicu, P. (2011). "**Interaction pathways between breast cancer cells and macrophages.**" phD Thesis.
- Vultur, A., R. Buettner, C. Kowolik, W. Liang, D. Smith, F. Boschelli and R. Jove (2008). "**SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells.**" Mol Cancer Ther **7**(5): 1185-1194.
- Wagner, K. W., E. A. Punnoose, T. Januario, D. A. Lawrence, R. M. Pitti, K. Lancaster, D. Lee, M. von Goetz, S. F. Yee, K. Totpal, L. Huw, V. Katta, G. Cavet, S. G. Hymowitz, L. Amler and A. Ashkenazi (2007). "**Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL.**" Nat Med **13**(9): 1070-1077.
- Wallasch, C., F. U. Weiss, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing and A. Ullrich (1995). "**Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3.**" EMBO J **14**(17): 4267-4275.
- Wang, M. H., D. Wang and Y. Q. Chen (2003). "**Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase.**" Carcinogenesis **24**(8): 1291-1300.
- Wang, M. H., Y. Q. Zhou and Y. Q. Chen (2002). "**Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities.**" Scand J Immunol **56**(6): 545-553.

- Wang, Y., G. Moncayo, P. Morin, Jr., G. Xue, M. Grzmil, M. M. Lino, V. Clement-Schatlo, S. Frank, A. Merlo and B. A. Hemmings (2013). "**Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme.**" *Oncogene* **32**(7): 872-882.
- Wang, Z. X., B. B. Lu, J. S. Yang, K. M. Wang and W. De (2011). "**Adenovirus-mediated siRNA targeting c-Met inhibits proliferation and invasion of small-cell lung cancer (SCLC) cells.**" *J Surg Res* **171**(1): 127-135.
- Wegiel, J., I. Kuchna, K. Nowicki, J. Frackowiak, K. Dowjat, W. P. Silverman, B. Reisberg, M. DeLeon, T. Wisniewski, T. Adayev, M. C. Chen-Hwang and Y. W. Hwang (2004). "**Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain.**" *Brain Res* **1010**(1-2): 69-80.
- Weidner, K. M., J. Behrens, J. Vandekerckhove and W. Birchmeier (1990). "**Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells.**" *J Cell Biol* **111**(5 Pt 1): 2097-2108.
- Weidner, K. M., G. Hartmann, L. Naldini, P. M. Comoglio, M. Sachs, C. Fonatsch, H. Rieder and W. Birchmeier (1993). "**Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion.**" *EXS* **65**: 311-328.
- Weinberg, R. A. (1995). "**The retinoblastoma protein and cell cycle control.**" *Cell* **81**(3): 323-330.
- WHO, M. C. (2012). "**Cancer.**" <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/#11.04.2012>.
- Wilkins, B. J., Y. S. Dai, O. F. Bueno, S. A. Parsons, J. Xu, D. M. Plank, F. Jones, T. R. Kimball and J. D. Molkentin (2004). "**Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy.**" *Circ Res* **94**(1): 110-118.
- Wimmel, A., D. Glitz, A. Kraus, J. Roeder and M. Schuermann (2001). "**Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion.**" *Eur J Cancer* **37**(17): 2264-2274.
- Woods, Y. L., P. Cohen, W. Becker, R. Jakes, M. Goedert, X. Wang and C. G. Proud (2001). "**The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase.**" *Biochem J* **355**(Pt 3): 609-615.
- Xia, L., D. Zhang, R. Du, Y. Pan, L. Zhao, S. Sun, L. Hong, J. Liu and D. Fan (2008). "**miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells.**" *Int J Cancer* **123**(2): 372-379.
- Xu, J., L. Jia, H. Ma, Y. Li, Z. Ma and Y. Zhao (2013). "**Axl gene knockdown inhibits the metastasis properties of hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt-PAK1 signal pathway.**" *Tumour Biol*.
- Yamashita, S., M. Chujo, T. Moroga, K. Anami, K. Tokuishi, M. Miyawaki, Y. Kawano, S. Takeno, S. Yamamoto and K. Kawahara (2009). "**DYRK2 expression may be a predictive marker for chemotherapy in non-small cell lung cancer.**" *Anticancer Res* **29**(7): 2753-2757.
- Yamashita, S., M. Chujo, K. Tokuishi, K. Anami, M. Miyawaki, S. Yamamoto and K. Kawahara (2009). "**Expression of dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) can be a favorable prognostic marker in pulmonary adenocarcinoma.**" *J Thorac Cardiovasc Surg* **138**(6): 1303-1308.
- Yao, H. P., C. M. Zhuang, Y. Q. Zhou, J. Y. Zeng, R. W. Zhang and M. H. Wang (2013). "**Oncogenic Variant RON160 Expression in Breast Cancer and its Potential as a Therapeutic Target by Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitor.**" *Curr Cancer Drug Targets*.

- Ye, F., L. Han, Q. Lu, W. Dong, Z. Chen, H. Shao, H. J. Kaplan, Q. Li and Q. Lu (2011). "**Retinal self-antigen induces a predominantly Th1 effector response in Axl and Mertk double knockout mice**." *J Immunol* **187**(8): 4178-4186.
- Ye, F., Q. Li, Y. Ke, Q. Lu, L. Han, H. J. Kaplan, H. Shao and Q. Lu (2011). "**TAM receptor knockout mice are susceptible to retinal autoimmune induction.**" *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(7): 4239-4246.
- Ye, X., Y. Li, S. Stawicki, S. Couto, J. Eastham-Anderson, D. Kallop, R. Weimer, Y. Wu and L. Pei (2010). "**An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies.**" *Oncogene* **29**(38): 5254-5264.
- Yi, S. and M. S. Tsao (2000). "**Activation of Hepatocyte Growth Factor-Met Autocrine Loop Enhances Tumorigenicity in a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line**." *Neoplasia* **2**(3): 226-234.
- Yin, L., P. Castagnino and R. K. Assoian (2008). "**ABCG2 expression and side population abundance regulated by a transforming growth factor beta-directed epithelial-mesenchymal transition.**" *Cancer Res* **68**(3): 800-807.
- Yoshida, K. (2008). "**Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage.**" *Trends Mol Med* **14**(7): 305-313.
- Yoshida, K. (2008). "**Role for DYRK family kinases on regulation of apoptosis.**" *Biochem Pharmacol* **76**(11): 1389-1394.
- Yu, D. P., Y. J. Dong, H. Q. Zhang, J. H. Wang, Y. Qu, L. J. Zhou, D. Su, L. L. Zhang, D. Zhao and Y. R. Cai (2014). "**Differential expression of and genes in lung adenocarcinoma subtypes according to the epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase gene status.**" *Biomed Rep* **2**(4): 481-489.
- Zajchowski, D. A., M. F. Bartholdi, Y. Gong, L. Webster, H. L. Liu, A. Munishkin, C. Beauheim, S. Harvey, S. P. Ethier and P. H. Johnson (2001). "**Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells.**" *Cancer Res* **61**(13): 5168-5178.
- Zarnegar, R. and G. Michalopoulos (1989). "**Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes.**" *Cancer Res* **49**(12): 3314-3320.
- Zarrin, A. A., L. Malkin, I. Fong, K. D. Luk, A. Ghose and N. L. Berinstein (1999). "**Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and Vlambda1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines.**" *Biochim Biophys Acta* **1446**(1-2): 135-139.
- Zegers, M. M. (2014). "**3D in vitro cell culture models of tube formation.**" *Semin Cell Dev Biol*.
- Zhang, Y., P. J. Kaplan-Lefko, K. Rex, Y. Yang, J. Moriguchi, T. Osgood, B. Mattson, A. Coxon, M. Reese, T. S. Kim, J. Lin, A. Chen, T. L. Burgess and I. Dussault (2008). "**Identification of a novel recepteur d'origine nantais/c-met small-molecule kinase inhibitor with antitumor activity in vivo.**" *Cancer Res* **68**(16): 6680-6687.
- Zhang, Y. X., P. G. Knyazev, Y. V. Cheburkin, K. Sharma, Y. P. Knyazev, L. Orfi, I. Szabadkai, H. Daub, G. Keri and A. Ullrich (2008). "**AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression.**" *Cancer Res* **68**(6): 1905-1915.
- Zhang, Z., J. C. Lee, L. Lin, V. Olivas, V. Au, T. LaFramboise, M. Abdel-Rahman, X. Wang, A. D. Levine, J. K. Rho, Y. J. Choi, C. M. Choi, S. W. Kim, S. J. Jang, Y. S. Park, W. S. Kim, D. H. Lee, J. S. Lee, V. A. Miller, M. Arcila, M. Ladanyi, P. Moonsamy, C. Sawyers, T. J. Boggon, P. C. Ma, C. Costa, M. Taron, R. Rosell, B. Halmos and T. G. Bivona (2012). "**Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer.**" *Nat Genet* **44**(8): 852-860.
- Zhao, Q. M., L. M. Li, C. Zhang and R. Guo (2012). "**Expression and localization of receptor tyrosine kinase Tyro3 in rat brain.**" *Beijing Da Xue Xue Bao* **44**(6): 905-910.

Zhao, Y. P., G. Chen, B. Feng, T. P. Zhang, E. L. Ma and Y. D. Wu (2007). "**Microarray analysis of gene expression profile of multidrug resistance in pancreatic cancer.**" Chin Med J (Engl) **120**(20): 1743-1752.

Zheng, J., K. Machida, S. Antoku, K. Y. Ng, K. P. Claffey and B. J. Mayer (2010). "**Proteins that bind the Src homology 3 domain of Crkl have distinct roles in Crk transformation.**" Oncogene **29**(48): 6378-6389.

Zwick, E., J. Bange and A. Ullrich (2001). "**Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies.**" Endocr Relat Cancer **8**(3): 161-173.

10. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden mit dem Einbuchstabencode abgekürzt und Proteine in Großbuchstaben benannt. Genenamen wurden in *kursiven* Großbuchstaben nach Empfehlung des HUGO Gene Nomenclature Committee verwendet. Einheiten wurden nach dem SI-System dargestellt

Allgemeine Abkürzungen

α -	anti- (Antigen von Antikörpern)
AIDA	Advanced Image Data Analyzer
AK	Antikörper
AMG	AMG-485
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BMS	BMS-777606
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNs	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FCS	fetal <i>calf serum</i> ; fötales Kälberserum
GFP	green fluorescent protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KD	Knock-down
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RE	relative Einheiten
RNS	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SKI	Ski-606
siRNS	small interfering
SMI	small molecule inhibitor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine
ÜN	Über Nacht
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich möchte ich für die spannenden Themen und die für die Arbeit notwendige Finanzierung herzlich danken. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährt haben, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof Dr. Angelika E. Schnieke für die Übernahme der Begutachtung seitens der TU München.

Danken möchte ich auch Dr. Reimar Abraham für die Kooperation und Betreuung des DYRK2 Projekts und Anke Seydel von der „University of Padua Venetian Institute of Molecular Medicine“ für die Hilfe bei den Mausversuchen.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die tägliche Laborarbeit danke ich Dr. Pjotr und Tatjana Knyazev. Für ihre konstruktiven Ideen und viele ermutigenden Diskussionen gebührt ihnen ganz besonderer Dank. Mit großem Engagement haben sie mir jederzeit tatkräftig geholfen.

Dr. Robert Torka und Dr. Thomas Mayr möchte ich für die vielen Ideen und Hilfestellungen danken, für eure Freundschaft und für euren Trost wenn mal nicht alles so lief wie erhofft.

Ein ganz besonderer Dank geht an die beiden Renates, an Silvia, Simone, Verena, Pavlos, Philipp, Martin und alle anderen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Abteilung Ullrich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne eure Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will.

Danke Mama, danke Papa dass Ihr mir das Studium ermöglicht habt und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standet.

Danke Benjamin, dafür das Du immer für uns da bist.