

**Untersuchungen
zur Funktion von Stat5 in der Regulation der
Proliferation, Differenzierung und Transformation von
Brustepithelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 15 -Biologie und Informatik-
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Dipl.-Biol. Frauke Döll
aus Jugenheim

Frankfurt am Main 2003
(D F 1)

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. B. Streit

Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

PD Dr. B. Schnierle

Datum der Disputation:

Vorwort

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Edith Pfitzner für die Anregung zu dieser Arbeit, die gewährte Selbständigkeit bei deren Durchführung und die hilfreichen Hinweise.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse und die Übernahme des Gutachtens. Des Weiteren danke ich Frau PD Dr. Barbara Schnierle für die Übernahme des Korreferats.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pfitzner, insbesondere Claudia, Dominique, Stefanie, Daniela, Marco und Claudia, danke ich für die stets gewährte fachliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Nicht vergessen möchte ich hierbei Anne Gaußmann, Huajiang Xiong und Sandra Bender, die mich im Rahmen ihres Praktikums bzw. Diplomarbeit in meiner Arbeit unterstützt haben.

Ein Teil der Arbeit wäre ohne die Unterstützung von Dr. Boris Brill nicht möglich gewesen. Für die geduldige Einweisung und die gewährte Unterstützung bei den Mausversuchen möchte ich mich nochmals herzlich bedanken.

Unseren „Nachbarn“ aus der Arbeitsgruppe Schnierle und allen anderen Kollegen des Georg-Speyer-Hauses danke ich für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft, wenn es darum ging, neue Methoden zu erlernen.

Der Tierversuchsanstalt der Uni-Klinik Frankfurt, insbesondere Frau Hanagart, danke ich für die stets rasche Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen und die gewährten Hilfestellungen bei den Analysen.

Herrn Dr. T. Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo, danke ich für die Bereitstellung der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante als hilfreiches Konstrukt zur Aufklärung der gefundenen Funktionen von Stat5.

Zwingenberg, im Januar 2003

Frauke Döll

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Brustdrüsenentwicklung	3
2.2	Die Entstehung von Krebs	4
2.3	Prolaktin	6
2.3.1	Einfluss von Prolaktin auf die Brustdrüsenentwicklung	6
2.3.2	Prolaktin und Brustkrebs	7
2.4	Der JAK/Stat-Signaltransduktionsweg	10
2.5	Die Stat-Proteine	12
2.5.1	Einfluss von Stat-Transkriptionsfaktoren auf die Brustdrüsenentwicklung und Tumorentstehung	15
2.6	Negative Regulatoren des Signaltransduktionswegs	17
3	Zielsetzung	21
4	Material	22
4.1	Verbrauchsmaterialien	22
4.2	Chemikalien	22
4.3	Kits und Standards	23
4.4	Zellkulturreagenzien	23
4.5	Antikörper	24
4.6	Zellen	24
4.7	Bakterienstämme und Kulturbedingungen	25
4.8	Plasmide	25
4.9	Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	25
4.9.1	Oligonukleotide für DNA-Bindungsversuche	25
4.9.2	Primer für die PCR	25
5	Methoden	26
5.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	26
5.1.1	Steriltest auf Mykoplasmen	26
5.1.2	Beschichten von Kulturgefäßen	26
5.1.3	Lebendzellzahlbestimmung mit Hilfe des COULTER COUNTERS	26
5.1.4	Subkultivierung adhärent wachsender Zellen	27
5.1.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	27

5.1.6	Herstellung von steroid- und thyroidhormonfreiem Medium	27
5.2	Kultivierung von Zellen	28
5.2.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	28
5.2.2	Transfektion von 293 GPG und Gewinnung von virushaltigem Überstand	29
5.2.3	Transduktion von Säugerzellen	29
5.3	Bestimmung zellulärer Parameter	30
5.3.1	Zellzyklusbestimmung	30
5.3.2	Nachweis der Apoptose durch Bestimmung der subG ₁ -Phase	31
5.3.3	Nachweis der Apoptose durch TUNEL	31
5.3.4	Nachweis der Migrationsfähigkeit von Säugerzellen mit Hilfe des Transwell-Tests	32
5.4	Transiente Transfektion von Säugerzellen	33
5.4.1	Kalziumphosphat-Präzipitation	33
5.4.2	Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE™6	33
5.5	Luziferase- und Galaktosidase-Test	34
5.6	Herstellung von Proteinextrakten	35
5.6.1	RIPA-Extrakte	35
5.6.2	Gesamtzellextrakte (WCE)	35
5.6.3	Zytoplasma- und Kernextrakte	36
5.7	Proteinchemische Methoden	37
5.7.1	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	37
5.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	37
5.7.3	Elektrotransfer	38
5.7.4	Immunchemischer Nachweis von Proteinen	39
5.7.5	Entfernen der gebundenen Antikörper von Blotmembranen mittels β -Mercaptoethanol	39
5.7.8	Gelretardierungsexperimente (EMSA)	40
5.8	Gentechnische Methoden	41
5.8.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
5.8.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	42
5.8.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
5.8.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	43
5.8.5	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	43
5.8.6	Ligation von DNA-Fragmenten	43
5.8.7	Agarosegelelektrophorese	44

5.9	Analyse von Nukleinsäuren	44
5.9.1	RNA-Präparation	44
5.9.2	RNase Protection Test (RPA)	45
5.9.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
5.9.4	Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)	47
5.9.5	Quantitativer Expressionsnachweis mit Hilfe der Echt-Zeit-PCR	47
5.9.5.1	Auswertung der Echt-Zeit-PCR	48
5.10	Transplantation von Stat5A 1*6 transduzierten HC11 Zellen <i>in vivo</i>	48
5.10.1	Immunhistochemie	48
6	Ergebnisse	49
6.1	Charakterisierung verschiedener Brustepithelzelllinien	49
6.1.1	Nachweis prolaktinaktivierbarer Stats	49
6.2	Einfluss von Prolaktin auf die Proliferationsrate von Brustepithelzellen	55
6.2.1	Dominant negative Mutanten zur Untersuchung der Funktion von Stat5 in der prolaktininduzierten Proliferation	57
6.2.2	Regulation der Genexpression durch Prolaktin und Stat5	61
6.3	Die Funktion von Stat5 in Brustepithelzellen – Untersuchungen mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Mutante	63
6.3.1	Charakterisierung der konstitutiv aktiven Mutante	63
6.3.2	Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Proliferationsrate verschiedener Brustepithelzelllinien	66
6.3.3	Analyse des Einflusses der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Expression von endogenen Stat5-Zielgenen	71
6.4	Einfluss von Stat5 auf das Migrationsverhalten von Brusttumorzellen	73
6.5	Einfluss von Stat5 auf nicht transformierte Brustepithelzellen – die Funktion von Stat5 in der Differenzierung	75
6.6	Einfluss von Stat5 in Brustepithelzellen <i>in vivo</i>	79
6.7	Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Apoptose von HC11 Zellen	83
6.7.1	Stat5A 1*6 inhibiert die Expression von Bcl-X _L	84
6.7.2	Funktion von SOCS1 und SOCS3 bei der Regulation der Apoptose in HC11 Zellen	85

6.7.3	Einfluss des JAK-Inhibitors AG490 auf die Apoptose von Brustepithelzellen	87
6.7.3.1	Nachweis der Spezifität des JAK-Inhibitors	88
6.7.4	Veränderung des Apoptoseverhaltens durch Transduktion einer konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante und SOCS1- und SOCS3- Überexpression	89
6.7.5	Einfluss von Prolaktin auf das Apoptoseverhalten von HC11 Zellen	91
6.7.6	Einfluss von AG490 auf die Stat3-DNA-Bindung	92
6.7.7	Änderung der Bcl-X _L -Expression in Abhängigkeit von AG490 und konstitutiv aktivem Stat5A	93
7	Diskussion	95
7.1	Prolaktin erhöht die Proliferation von Brusttumorzellen, nicht aber die Proliferation von Brustepithelzellen	96
7.2	Die konstitutive Aktivierung von Stat5 erhöht die Proliferationsrate von Tumorzellen, aber nicht von nicht-transformierten Brustepithelzellen	100
7.3	Brustepithelzellen mit konstitutiv aktivem Stat5A zeigen ein erhöhtes Potential zur Invasivität	103
7.4	Konstitutiv aktives Stat5A führt zur Differenzierung von Brustepithelzellen	104
7.5	Stat5A kontrolliert <i>in vivo</i> die Alveolarentwicklung des Brustepithels	105
7.6	Stat5-abhängige Sensitivierung von HC11 Zellen für Apoptose durch Induktion von SOCS1 und SOCS3	107
8	Ausblick	112
9	Literaturverzeichnis	113
9.1	Eigene Veröffentlichungen	126

Abkürzungen

Abb	Abbildung	IL	Interleukin
AK	Antikörper	JAK	Janus-Kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	kb	Kilobasen
ATP	Adenosintriphosphat	kDa	Kilodalton
bp	Basenpaar	LB	<i>Luria broth</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
		MOPS	Morpholin-propan-sulfonsäure
CSS	hormonbefreites FCS	NC	Nitrocellulose
D	Dexamethason	NO	Stickstoffmonoxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	Nr.	Nummer
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	OD	Optische Dichte
		P	Prolaktin
DMSO	Dimethylsulfoxid	p.A.	Analysequalität (<i>per analysis</i>)
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (<i>phosphate buffered saline</i>)
ECL	Verstärkende Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)	PCR	Polymerasenkettenreaktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	PRL	Prolaktin
		PVDF	Polyvinylidendifluorid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	R	Rezeptor
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>	RE	<i>response element</i>
		RT	Raumtemperatur
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	RTK	Rezeptortyrosinkinase
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
			(<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
GAS	γ -interferon <i>activated sequence</i>	SIE	<i>sis-inducible element</i>
GBP	Guanylat-Bindungsprotein	SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>	Stat	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
GH	<i>growth hormone</i>	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
		Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
HRP	Meerrettichperoxidase	Tween [®] -20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat
I	Insulin		
IFN	Interferon	WCE	<i>whole cell extract</i>
Ig	Immunglobulin	WT	Wildtyp

Formelzeichen und Einheiten

°C	Grad Celsius	mM	Millimolar
cm	Zentimeter	μ g	Mikrogramm
E	Enzymeinheiten	ng	Nanogramm
g	Gramm	nm	Nanometer
h	Stunde	s	Sekunden
l	Liter	rpm	Umdrehungen pro Minute
m	Meter	v	Volumen (<i>volume</i>)
M	Molarität	% (v/v)	Volumenprozent
mA	Milliampere	w	Gewicht (<i>weight</i>)
mg	Milligramm	% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
min	Minuten	μ l	Mikroliter
ml	Milliliter		

1 Zusammenfassung

Die Stat-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) bilden eine Familie von 7 verschiedenen Signaltranskriptionsfaktoren, die latent im Zytoplasma vorliegen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von zytokin- und wachstumsfaktorvermittelten Signalen von der Zellmembran in den Nukleus. Die Aktivierung der Stat-Proteine ist ein transienter und streng regulierter Signaltransduktionsprozess, dessen Deregulation eine Rolle bei der Krebsentstehung spielt. In verschiedenen Tumorarten werden vor allem konstitutiv aktive Stat3- und Stat5-Proteine gefunden.

Stat5 ist das Hauptsignalprotein bei der prolaktinvermittelten Signaltransduktion im Brustgewebe. Neben Stat3 und Stat1 ist vor allem Stat5A maßgeblich an der Entwicklung und Differenzierung (Laktation) des Brustgewebes beteiligt. Bei der Entstehung von Brusttumoren scheint der Prolaktin/JAK/Stat5-Signalweg ebenfalls involviert zu sein. Die Funktion, die Stat5 dabei hat, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Eine gezielte, nur Stat5-abhängige Regulation des Zellsystems ist nur schwer zu untersuchen, da Prolaktin noch eine Reihe weiterer Signalkaskaden aktiviert.

In dieser Arbeit wird daher mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Mutante die Funktion von Stat5A in der Regulation der Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose, deren Fehlregulation die Transformation zu Tumorzellen bestimmt, untersucht. Es kann gezeigt werden, dass Stat5 multiple Aufgaben in Brustkrebs- und -epithelzellen übernimmt. Einige dieser Funktionen lassen sich mit der Wirkungsweise von Prolaktin korrelieren. In Tumorzellen hat nicht nur Prolaktin, sondern auch die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus. Die Überexpression dieser Mutante führt, ebenso wie die Prolaktinstimulation, zu einer Erhöhung der Proliferationsrate, die im Falle von Prolaktin Cyclin D1 vermittelt ist. Für die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante kann keine Regulation einiger am Zellzyklus beteiligter Proteine festgestellt werden.

Die Untersuchungen der Zellmobilität dienen als Marker für das Metastasierungspotential. Sowohl in Brusttumor- als auch in -epithelzellen ist die Fähigkeit zur Migration in Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A, oder nach Prolaktinstimulation erhöht.

Für die Tumorentstehung zeichnet sich demnach folgendes Bild: Prolaktin und konstitutiv aktives Stat5A erhöhen sowohl die Proliferations- als auch die Migrationsrate von Brustkrebszellen.

In der nicht transformierten Brustepithelzelllinie HC11 hat die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante eine andere Funktion. Sie wirkt nicht als Mitogen, wie in Tumorzelllinien, sondern ist in Differenzierungsvorgänge involviert. Die konstitutiv aktive Mutante ist in der Lage, die Signaltransduktion *in vitro* durch Prolaktin und Dexamethason zu ersetzen und unabhängig davon, die β -Kaseinbildung zu induzieren. *In vivo* zeigt sich, dass konstitutiv aktives Stat5A in die Kontrolle der Differenzierung des alveolaren Brustepithels involviert ist. Die alveolaren Strukturen bilden sich schon im jungfräulichen Gewebe und nicht erst in trächtigen Mäusen aus.

Eine Überexpression der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante führt in HC11 Zellen jedoch nicht nur zu einer Differenzierung der Zellen, sondern ebenfalls zu einem Anstieg der Apoptoserate. Die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante induziert die Expression der negativen Regulatoren des JAK/Stat-Signalweges SOCS1 und SOCS3. Diese blockieren die Janus-Kinase 2, welches wiederum eine Deaktivierung von Stat3 zu Folge hat. Als potentieller molekularer Mechanismus für die Förderung der Apoptose kann eine Inhibierung der Bcl-X_L-Expression gezeigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Stat5 unterschiedliche Funktionen sowohl bei der Proliferation und Apoptose als auch bei der Differenzierung von Brustepithelzellen hat. Die Funktion von Stat5 auf das Zellgeschehen scheint vom zellulären Kontext und bereits aktivierten Signalwegen abzuhängen.

2 Einleitung

2.1 Die Brustdrüsenentwicklung

Die Brustdrüsenentwicklung wird durch den Hormonstatus des Organismus reguliert. Bei der Geburt sind nur wenige rudimentäre Milchgänge um die Brustwarze herum angelegt (Neo natal). Das Wachstum dieser Milchgänge in das Fettgewebe der Brust ist bis zur Pubertät nur dem allgemeinen Körperwachstum angepasst. Das verstärkte Auswachsen und Verzweigen der Milchgänge findet während der Pubertät statt. Die sogenannten terminalen Endknospen (*terminal end buds, TEB*), ein hoch teilungsfähiges Gewebe am Ende der Milchgänge, sind für diese Vorgänge verantwortlich (*Pubertal*). Die Ausbildung der Milchdrüsen wird erst während der Schwangerschaft eingeleitet (*Pregnancy*). Die endgültige Ausdifferenzierung des lobulo-alveolaren Gewebes und die Bildung der Milchproteine setzt hingegen erst mit der Geburt ein. Die Epithelzellen werden über die gesamte Stillzeit hinweg durch den Saugreflex des Kindes zur Milchbildung angeregt (*Lactation*). Nach der Stillzeit wird das alveolare Gewebe zurückgebildet (*Involution*) und befindet sich im gleichen Status wie vor der Schwangerschaft. Mit jeder weiteren Schwangerschaft beginnt erneut der Kreislauf des Brustgewebeauf- bzw. -abbaus (Hennighausen and Robinson, 1998) (Abbildung 2.1-1).

Die Mammopoese und Laktogenese ist schon während der letzten 100 Jahre Gegenstand intensiver Forschungen gewesen. Schon 1900 konnte Halban zeigen, dass die Brustentwicklung durch den Einfluss der Eierstöcke kontrolliert wird (Halban, 1900). 33 Jahre später zeigte die Entdeckung des Hormons Prolaktin, dass ein weiterer Bereich des Organismus, die Hirnanhangsdrüse, ebenfalls für die Brustentwicklung und Milchbildung verantwortlich ist (Riddle *et al.*, 1933). Durch die Generierung von *knockout*-Mäusen konnte eine Reihe von Genen entdeckt werden, deren Eliminierung zu einer unvollständigen Ausbildung der Brustdrüsen führt. In Abbildung 2.1-1 sind diese Gene zusammengefasst.

Die Entwicklung der Brustdrüse ist also durch ein Zusammenspiel verschiedener Hormone und Signalmoleküle charakterisiert, so dass die Enddifferenzierung der Brustdrüse erst zum Ende der Schwangerschaft erreicht wird (Hennighausen and Robinson, 1998).

Eine Änderung dieser Homöostase kann unter Umständen zu einer Veränderung der Signalkaskaden und zu einer Tumorentstehung führen. Die häufigste Tumorart aller Brustkrebsvarianten ist der Milchgangkrebs, gefolgt von Karzinomen des lobulo-alveolaren Gewebes.

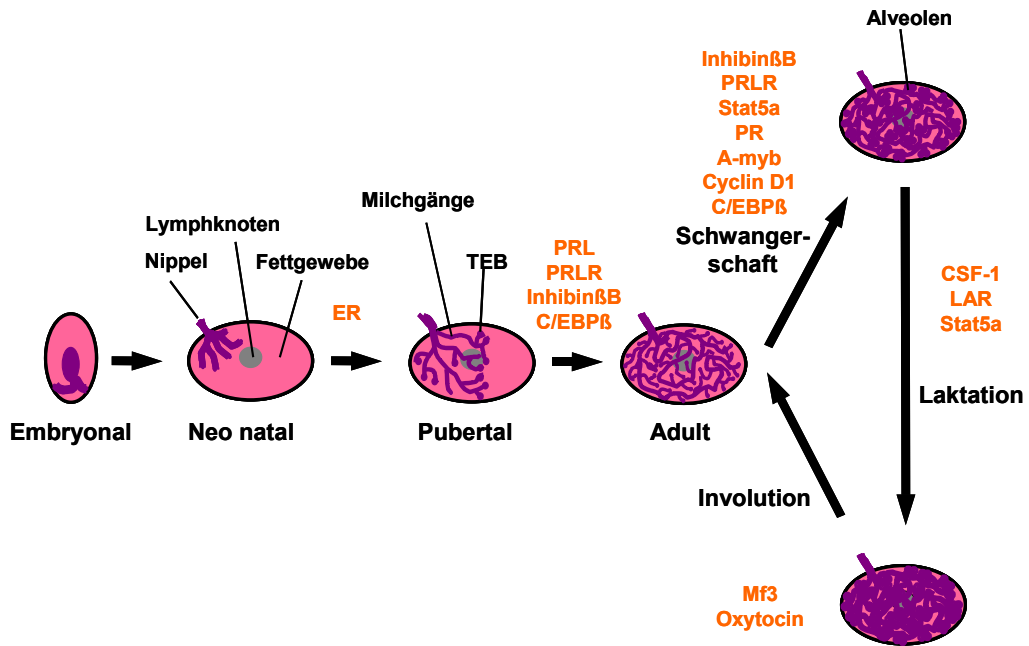


Abbildung 2.1-1: Die verschiedenen Stadien der Brustdrüsenentwicklung und die darin involvierten Genprodukte. Das Brustepithel wächst in das Fettgewebe ein und bildet ein verzweigtes Netz von Milchgängen. Nach der Geburt wächst das Epithel im Einklang mit dem Körperwachstum und beginnt erst nach der Freisetzung von Hormonen der Eierstöcke zu Beginn der Pubertät mit der Ausbreitung im Fettgewebe. Am verzweigten und ausgebreiteten Baum aus Milchgängen bilden sich dann alveolare Strukturen aus, die in lobuläre Alveolen differenzieren. Zum Zeitpunkt des Stillens differenzieren die lobulären Alveolen in ihre endgültige Form und das Epithel wird sekretorisch. In diesem Stadium füllt das Epithel die ganze Brust aus, das Fettgewebe hat sich zurückgebildet. Nach dem Abstillen bildet sich das sekretorische Epithel durch Apoptose zurück und das Fettgewebe baut sich wieder auf. In Gelb sind die durch *knockout*-Experimente gefundenen Genprodukte der Brustdrüsenentwicklung dargestellt. ER: Östrogenrezeptor, PRL: Prolaktin, PRLR: Prolaktinrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, LAR: Leukozyten-Antigenrezeptor, Stat5a: *Signal transducer and activator of transcription*, CSF-1: Makrophagen spezifischer koloniestimulierender Faktor 1 (modifiziert nach Wiseman and Werb, 2002 und Hennighausen and Robinson, 1998).

2.2 Die Entstehung von Krebs

Die Entwicklung und Organisation eines Organismus erfordert eine streng geregelte und kontrollierte Koordination verschiedener aktiver Vorgänge in der Zelle und in den einzelnen Zellverbänden. Nur so ist ein ungestörtes Zusammenspiel von Proliferation, Differenzierung und Apoptose im Organismus möglich. Den einzelnen Zellen stehen hierfür verschiedene Kommunikationswege zur Verfügung. Durch direkte Zellkontakte oder durch Sekretion von Botenstoffen (Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren), die endo-, para- oder autokrin wirken, kann sich im Organismus ein Kommunikationsnetzwerk aufbauen. Die Signalweiterleitung in den Zellen geschieht durch sogenannte Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression der einzelnen Zellen regulieren. Durch die transiente Aktivierung einzelner Signalwege im gesunden Organismus ist die Zelle in der Lage auf äußere Einflüsse mit einer geänderten Genexpression zu reagieren.

Ist diese Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen gestört, kommt es zur Aufhebung der Homöostase von Proliferation, Differenzierung und Apoptose und es kann zu vermehrten Zellteilungsprozessen und letztendlich zur Entstehung eines Tumors kommen.

Die Ursache für eine solche Transformation der Zellen liegt in der Veränderung des Genoms z.B. durch Mutationen. In der Literatur herrscht die Annahme, dass mindestens 4-6 genetische Veränderungen in einer Zelle vorliegen müssen, um diese entarten zu lassen (Vogelstein, 1993, Hanahan and Weinberg, 2000).

Brustkrebs ist einer der häufigsten Krebsarten bei Frauen in den westlichen Ländern mit ca. 111 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen pro Jahr und einer Sterberate von 24 Frauen pro 100.000 (Howe *et al.*, 2001). Weltweit, so schätzt man, kommen ca. 1.000.000 Neuerkrankungen pro Jahr hinzu (Probst-Hensch *et al.*, 2000).

Brustkrebs ist eine Krankheit, deren Ursache vielfältige Auslöser haben kann. Es können genetische Abnormalitäten (z.B. Mutationen in den BRCA1/2 Genen), äußere Einflüsse, aber auch der Hormonstatus bei der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sein, wie unzählige epidemiologische Studien beweisen (Harris, *et al.*, 1992). Etablierte Risiken, welche zu einer Brustkrebserkrankung führen können, sind (Baselga and Norton, 2002):

- das Alter: das Brustkrebsrisiko steigt um das Doppelte pro Lebensjahrzehnt.
- der Hormonhaushalt: ein früher Eintritt in die Pubertät, eine spät beginnende Menopause, Alkoholmissbrauch und eine Hormonersatztherapie erhöhen das Brustkrebsrisiko (Feigelson and Henderson, 2001).
- familiär bedingtes Risiko: das Erkrankungsrisiko steigt bei Frauen in deren Familien Brustkrebserkrankungen bei Verwandten ersten Grades vorliegen.

Einige Gene und Signalwege sind bekannt, die bei der Pathogenese von Brustkrebs involviert sind. Hierzu gehören genetische Veränderungen in den BRCA1, BRCA2, p53, PTEN und anderen Genen, die vor allem bei der familiär vererbten Form von Brustkrebs eine wichtige Rolle spielen (Nathanson *et al.*, 2001). Die BRCA-Gene scheinen in die Zellzykluskontrollmechanismen involviert zu sein, welche für den reibungslosen Ablauf der Zellteilung verantwortlich sind. Der Zellzyklus lässt sich in verschiedene Phasen einteilen (Abbildung 2.2-1).

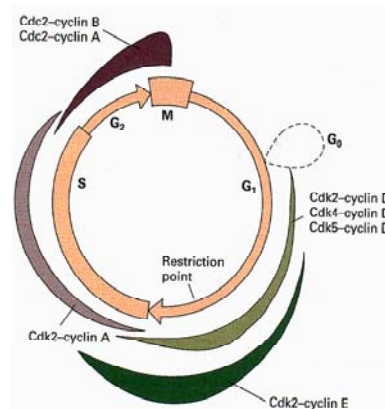


Abbildung 2.2-1: Die einzelnen Phasen des Zellzyklus (Lodish *et al.*, 1995).

Die eigentliche Zytokinese erfolgt in der M-Phase (Mitose). Hier werden die Chromosomen dupliziert und anschließend auf zwei Tochterzellen verteilt. Nach Abschluss von Karyo- und Zytokinese wird die RNA- und Proteinsynthese, die während der Kernteilung sistiert sind, sofort wieder aufgenommen. Dagegen findet zunächst in den meisten Fällen keine DNA-Replikation statt (G_1 -Phase). Diese G_1 -Phase entspricht oft der eigentlichen Wachstumsphase der Zelle.

Es folgt die Replikationsphase des Chromatins (S-Phase), in der die Synthese der Kern-DNA stattfindet. Nach Abschluss der DNA-Replikation, also nach dem Ende der S-Phase, verbleiben die Zellen noch einen Weile in einer Ruhephase (G_2 -Phase), bevor sie wieder in die M-Phase eintreten. Der Zellzyklus wird an verschiedenen Punkten durch periodisches Auftreten bestimmter Proteine, den Zyklinen, kontrolliert. Diese wiederum aktivieren zyclinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinase = CDK), die wiederum durch Inhibitoren, wie p21, p27 oder p53, reguliert werden. Die Gene für die Zellzyklusregulation sind in vielen Tumorarten dereguliert oder mutiert, so dass sich die Zelle ungehindert teilen kann (Lodish *et al.*, 1995).

2.3 Prolaktin

2.3.1 Einfluss von Prolaktin auf die Brustdrüsenentwicklung

Das Wachstum und die Differenzierung der Brustdrüse wird, wie in Abbildung 2.1-1 ersichtlich, durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Hormonen reguliert. Beispielsweise wird das Auswachsen der Milchgänge und zum Teil auch die Entwicklung des lobulo-alveolaren Gewebes von den Steroidhormonen der Eierstöcke, Östrogen und Progesteron, kontrolliert. Das Peptidhormon Prolaktin, welches in der Hirnanhangsdrüse gebildet wird, ist ein weiteres Hauptsignalmolekül

(Vonderhaar, 1987). Es ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung der lobulo-alveolaren Brustdrüsenstrukturen während der Schwangerschaft (Topper and Freeman, 1980) und für das extensive Wachstum der Alveolaren bei der Laktation (Vonderhaar, 1984). Prolaktin ist außerdem das hauptverantwortliche Hormon für die Synthese von Milchproteinen, Laktose und Lipiden als Bestandteile der Milch (Hennighausen and Robinson, 1998). Die Entwicklung der Alveolaren wird also nicht, wie lange Zeit postuliert, nur von den Hormonen Östrogen und Progesteron, sondern auch durch Prolaktin gesteuert (Goffin *et al.*, 1999). *In vitro* zeigt Prolaktin eine mitogene Aktivität bei nicht transformierten murinen Brustepithelzellen. *In vivo* scheint Prolaktin ebenfalls in proliferative Vorgänge involviert zu sein, wenngleich es schwieriger ist, seinen Einfluss unabhängig vom hormonellen Milieu zu untersuchen (Das and Vonderhaar, 1997). Die physiologische Funktion, die Prolaktin bei der Alveolarenbildung besitzt, wird durch Studien mit Prolaktin-*knockout*-Mäusen noch unterstützt (Ormandy *et al.*, 1997). Mäuse, die heterozygot in der Prolaktinrezeptor-expression sind, zeigen eine unvollständige Brustentwicklung und sind zur Laktation während der ersten Schwangerschaft nicht fähig. Anhand dieses Maus-Modells lässt sich eine enge Verknüpfung von Brustentwicklung und Laktation, sowie der Wirkungsweise von Prolaktin und dessen Rezeptor bei der Differenzierung und Milchproteinsynthese herstellen. Das Prolaktinhormon ist sowohl in der Proliferation als auch der Differenzierung in der Brustdrüse involviert.

2.3.2 Prolaktin und Brustkrebs

Der Einfluss von Prolaktin auf die Brustkebsentstehung und -entwicklung ist immer noch nicht eindeutig aufgeklärt worden. Zweifelsohne spielt Prolaktin eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüse. Bei Nagern konnte Prolaktin eine Schlüsselrolle für die Entstehung von Brustkrebs nachgewiesen werden (Welsch and Nagasawa, 1977). In Ratten wurde u.a. eine direkte Korrelation zwischen der Prolaktinkonzentration im Blut und der Wahrscheinlichkeit Brusttumore zu bilden, festgestellt (Boyns *et al.*, 1973). Im Gegensatz zu dem Nager-Modellsystem ist die Funktion von Prolaktin in der Ätiologie und Entwicklung von humanen Brustkrebsarten noch nicht eindeutig geklärt. Die Entdeckung, dass Prolaktin nicht nur von der Hirnanhangsdrüse, sondern auch von anderen Geweben und Tumoren gebildet werden kann, lässt den Schluss zu, dass Prolaktin nicht nur bei der Entwicklung des Brustgewebes eine Rolle spielt. Eine Reihe von Studien zeigen einen engen Zusammenhang zwischen Prolaktin und der Entwicklung von Brusttumoren: 44% aller Brustkrebspatienten zeigen verstärkt eine Hyperprolaktinemie während des

Krankheitsverlaufes (Holtkamp *et al.*, 1984) und sogar 95% aller untersuchten Brustkrebsbiopsien exprimieren den Prolaktinrezeptor unabhängig vom Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (Reynols *et al.*, 1997). Das Prolaktin selbst ist in 60-85% aller Biopsien im Tumor nachweisbar (Purnell *et al.*, 1982). Trotz dieser vielen Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Prolaktin und Brustkrebsentstehung fehlt der endgültige Beweis der ursächlichen Funktion von Prolaktin in der Ätiologie von Brustkrebs.

Die Hemmung der Prolaktinsekretion in der Hirnanhangsdrüse führt zu keinem klaren klinischen Befund, wie zahlreiche klinische Studien beweisen (Hennson *et al.*, 1972, Pearson and Manni, 1978). Dies mag unter Umständen daran liegen, dass viele andere Zellen und Gewebe (z.B. Tumore und Brustepithelzellen) in der Lage sind, Prolaktin (*extrapituitary* PRL) zu synthetisieren und zu sezernieren. Eine Prolaktinhemmung in der Hirnanhangsdrüse hat demnach keine Auswirkung auf die Prolaktinkonzentration im Tumorgewebe und somit auch keinen Einfluss auf die Tumorentstehung. Das *extrapituitary* Prolaktin vermag sowohl über den endokrinen Weg als auch über den autokrinen/parakrinen Weg die Funktionen des Prolaktins aus der Hirnanhangsdrüse zu übernehmen (Abbildung 2.3-1). In Brusttumorzellen wurde schon gezeigt, dass eine autokrine Prolaktinsekretion das Zellwachstum konstitutiv stimulieren kann. Die Erhöhung der Proliferation erfolgt durch Stimulation von JAK2, welches wiederum den ErbB-2-Rezeptor und andere nachgeschaltete Signalwege aktiviert (Yamauchi *et al.*, 2000).

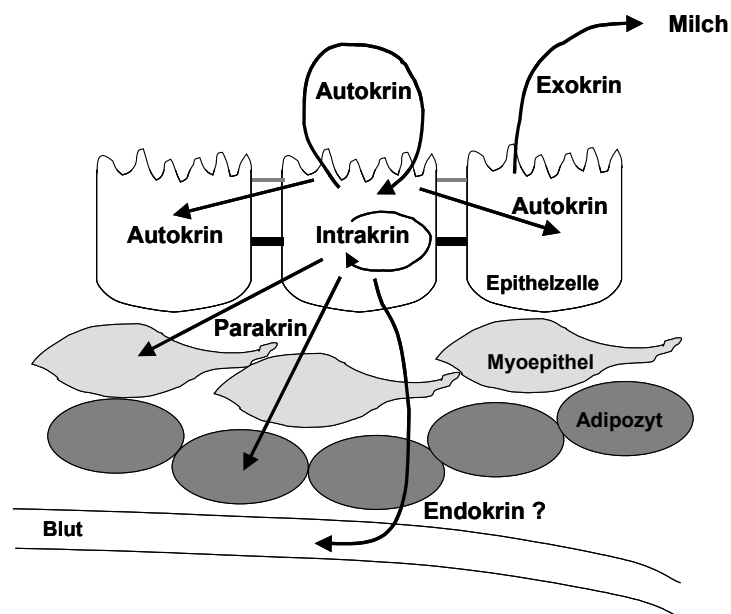


Abbildung 2.3-1: Die autokrine/parakrine Stimulation der Brustdrüse durch Prolaktin (modifiziert nach Vonderhaar, 1999).

Die Prolaktinsekretion der Hirnanhangsdrüse ist sowohl positiv, als auch negativ reguliert. Der Hauptkontrollmechanismus wird durch den Hypothalamus gesteuert, der den inhibitorischen Faktor Dopamin bildet. Das *extrapituitary* Prolaktin reagiert, im Gegensatz zum Prolaktin der Hirnanhangsdrüse, nicht auf die inhibitorische Wirkungsweise des Antagonisten Dopamin. Dies mag ein Grund für die fehlgeschlagenen klinischen Studien mit dem Prolaktinantagonisten Dopamin sein. Es zeigte sich, dass der Einsatz von Dopamin keine Reduktion der Tumorgröße zur Folge hatte. Somit wurde die Inhibierung von Prolaktin aus der Hirnanhangsdrüse als nicht anwendbar für die Tumorthherapie angesehen (Vonderhaar, 1998).

Der verantwortliche Mechanismus, welcher die Regulation der Prolaktinsynthese in Brusttumoren kontrolliert, ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Heutzutage werden verschiedene Möglichkeiten der Prolaktinregulation diskutiert. Das Prolaktin kann sowohl in Tumoren von dem gleichen Promotor wie in der Hirnanhangsdrüse (LeProvost *et al.*, 1994), als auch von einem eigenen Promotor abgelesen werden (Shaw-Bruha *et al.*, 1997). Auch das Hormon selbst wird als potentieller Regulator diskutiert. In einer autoregulatorischen Rückkopplungshemmung ist Prolaktin in der Lage, sich selbst zu regulieren (Vonderhaar, 1999).

Die Fähigkeit von Prolaktin, die Proliferation von Brusttumorzellen *in vitro* zu stimulieren, sowie das Vorkommen von aktiven Prolaktinrezeptoren auf über 95% aller Brustkebsarten, impliziert, dass dieses Peptidhormon ein wichtiger Regulator bei der Brustkrebsentstehung ist. Die Tatsache, dass auch andere Gewebe Prolaktin in signifikanten Konzentrationen synthetisieren und sezernieren, erschwert die Untersuchung der klinischen Relevanz von Prolaktin. Der klinische Einsatz von Prolaktinhemmstoffen müsste auf der Ebene des Zielgewebes wirken, um wirksam gegen Brustkrebs zu sein.

Es zeigt sich also, dass die sich entwickelnde Brustdrüse einige Eigenschaften, die mit einer Tumorentstehung assoziiert werden können, besitzt. Brustepithelzellen haben zur Bildung der Brustdrüse die Fähigkeit zur Invasion, Proliferation, Apoptoseresistenz und Angiogenese. Alle diese Eigenschaften charakterisieren auch Tumorzellen (Abbildung 2.3-2). Außerdem sind einige der Faktoren, die essentiell für die Brustentwicklung sind, auch in die Tumorentstehung involviert (Wiseman and Werb, 2002). Die Signalübertragung z.B. von Prolaktin geschieht hauptsächlich über die JAK/Stat-Kaskade, die in verschiedenen Brusttumoren konstitutiv aktiviert vorliegt.

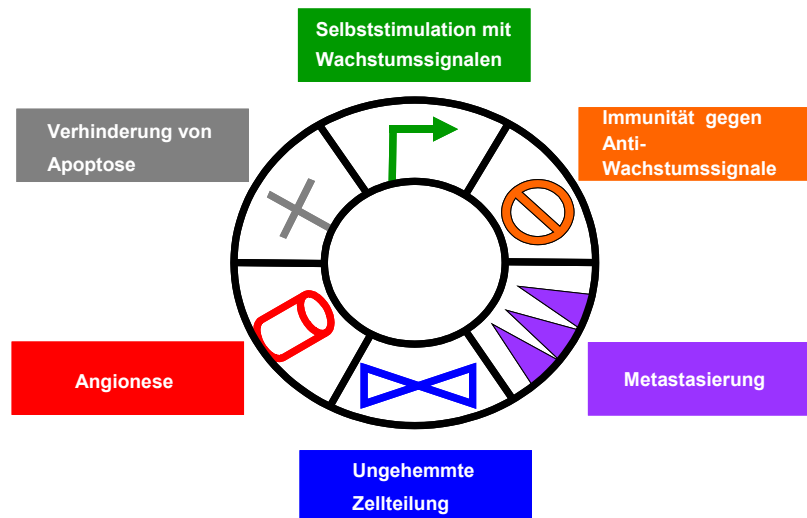


Abbildung 2.3-2: Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen (modifiziert nach Hanahan and Weinberg, 2000).

2.4 Der JAK/Stat-Signaltransduktionsweg

Das Peptidhormon Prolaktin, welches zur Klasse der Zytokine gehört, kann eine Reihe von Signalproteinen aktivieren; *in vivo* Studien zeigen jedoch, dass der Hauptsignalweg die JAK/Stat-Kaskade ist (Liu *et al.*, 1997). Dieser Signalweg ist ein einfacher und direkter, sogenannter Membran-zu-Kern-Signalweg, der von einer Reihe von JAKs und Stats genutzt wird (O'Shea *et al.*, 2002).

Nachdem die Zytokine an ihre spezifischen Rezeptoren gebunden haben, gelangen die mit dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziierten JAKs in unmittelbare Nachbarschaft. Diese phosphorylieren sich gegenseitig und die Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, welche die Bindungsstellen für die Stat-Proteine darstellen. Die Stat-Proteine werden aus dem Zytoplasma an den Rezeptor rekrutiert und gelangen somit in die Nähe der JAKs. Durch diese werden die Stat-Proteine an spezifischen Tyrosinresten (Aminosäure ~700) am C-Terminus phosphoryliert und können anschließend über eine reziproke Interaktion der SH2-Domäne (*src-homology domain 2*) des einen Stat-Proteins und dem Phosphotyrosin des anderen Stat-Proteins dimerisieren. Als Dimer sind die Stat-Proteine in der Lage, in den Kern zu wandern und an spezifische Promotorelemente, den GAS-Sequenzen (*γ-interferon activation sequence*), zu binden. Dadurch können die Stat-Proteine zusammen mit anderen Faktoren (z.B. Koaktivatoren) die Transkription ihrer Zielgene regulieren (O'Shea *et al.*, 2002, Horvath, 2000, Aaronson and Horvath, 2002). In Abbildung 2.4-1 ist exemplarisch der durch Prolaktin aktivierte JAK/Stat-Signalweg dargestellt und in

Tabelle 2.4-1 ist ein Überblick über die zytokinstimulierte Aktivierung der JAKs und Stats gegeben.

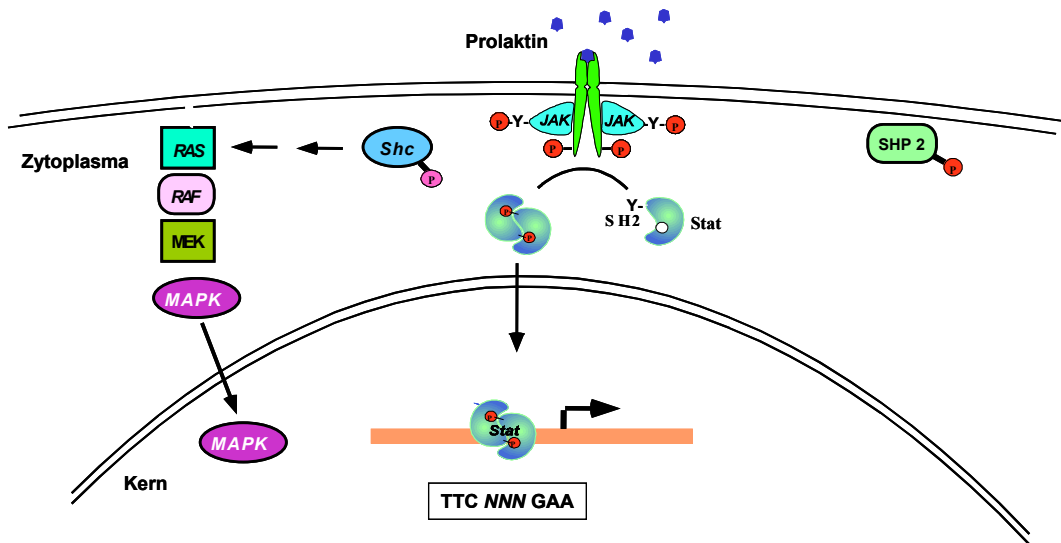


Abbildung 2.4-1: Die prolaktininduzierte Signaltransduktion. Die Bindung von Prolaktin an die extrazelluläre Domäne des Prolaktinrezeptors bewirkt dessen Dimerisierung und Aktivierung der mit dem Rezeptor assoziierten Tyrosinkinase JAK2. Einige der JAK2 Substrate sind in diesem Diagramm dargestellt. Zu ihnen gehören: der Prolaktinrezeptor, Stat5, Shc und SHP-2. Die Tyrosinphosphorylierung von Stat5, einem zytosolischen Transkriptionsfaktor, bewirkt dessen Dimerisierung, Kerntranslokation und Aktivierung bestimmter Zielgene durch Bindung an spezielle Promotorstrukturen (GAS-Elemente). Das tyrosinphosphorylierte Shc verbindet den Prolaktinrezeptor mit dem MAP-Kinase-Signalweg durch Assoziation an den Grb-2/SOS-Komplex. Dieser Komplex wiederum aktiviert Ras und die nachgeschalteten Raf, MEK und MAPK-Moleküle. SHP-2 hat durch seine spezifische Tyrosinphosphataseaktivität einen positiven Effekt auf die β -Kaseingentranskription (Hynes *et al.*, 1997).

Zytokine/Wachstumsfaktoren/ Rezeptortyrosinkinasen	Aktivierte JAKs	Aktivierte Stats
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	JAK1, JAK3	Stat5, Stat3
IL-4	JAK1, JAK3	Stat6
IL-13, IL-14	JAK1, JAK2, Tyk2	Stat6
IL-3, IL-5, GM-CSF	JAK2	Stat5
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	JAK1, JAK2	Stat3, Stat1
IL-12	Tyk2, JAK2	Stat4
Leptin	JAK2	Stat3
Wachstumshormon	JAK2	Stat5, Stat3
Prolaktin	JAK2	Stat1, Stat3, Stat5
Erythropoetin, Thrombopoetin	JAK2	Stat5
EGF	JAK2	Stat1, Stat3, Stat5
IFN α/β	JAK1, Tyk2	Stat1, Stat2
INF γ	JAK1, JAK2	Stat1
c/v-Eyk		Stat1, Stat3
c/v-Src		Stat3
v-Abl		Stat3, Stat5
TEL-JAK		Stat3

Tabelle 2.4-1: Zytokin-, Wachstumsfaktor- oder Onkogen-stimulierte Aktivierung von Janus-Kinasen und Stat-Proteinen. IFN: Interferon, IL: Interleukin, EGF: *epidermal growth factor*. (modifiziert nach Schindler, 2002 und Bromberg, 2000).

Drei Mitglieder der Stat-Familie wurden als Signaltransduktionsmoleküle von Prolaktin identifiziert: Stat1, Stat3 und Stat5 (Freeman *et al.*, 2000). Das Hauptsignalmolekül des prolaktinaktivierten JAK/Stat-Weges ist jedoch Stat5 (Schmitt-Ney *et al.*, 1991).

Die Spezifität der Stat-Moleküle für ihre Rezeptoren scheint zellabhängig zu sein, da immer eine bestimmte Gruppe an Stat-Proteinen als Antwort auf verschiedene Zytokine aktiviert wird (Taniguchi, 1995, Bromberg, 2000, Leonard, 2001). Es hat sich jedoch gezeigt, dass nicht nur Rezeptortyrosinkinasen Stat-Proteine aktivieren können, sondern auch zytoplasmatische Kinasen, wie src und Abl.

Der durch Prolaktin aktivierte Hauptsignalweg ist der JAK/Stat-Signalweg. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch Prolaktin in verschiedenen zellulären Systemen beschrieben. Die Signalweiterleitung erfolgt hierbei über die Shc/SOS/Grb2/Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Inwieweit der JAK/Stat- und der MAPK-Signalweg unabhängig voneinander reguliert und aktiviert werden oder ob eine Verbindung zwischen den beiden Wegen besteht, ist noch nicht gesichert.

Eine Aktivierung von Fyn und Src, beides Mitglieder der Src-Kinase-Familie, durch Prolaktin, wurde ebenfalls beobachtet. Die Bedeutung dieser Aktivierung ist jedoch noch nicht geklärt (Bole-Feysot *et al.*, 1998) (Abbildung 2.4-1).

2.5 Die Stat-Proteine

Die Stat-Familie umfasst 7 verschiedene Stat-Mitglieder (Stat1-6): Stat5A und Stat5B weisen eine große Homologie (96%) auf (Liu *et al.*, 1995), so dass man annehmen kann, dass diese beiden Proteine durch eine Genduplikation entstanden sind. In der Evolution scheint Stat5 das älteste Gen der Stat-Familie zu sein. Homologe Proteine werden sowohl in *Drosophila*, als auch in *Dictyostelium* gefunden (Hoey and Schindler, 1998). Alle Stat-Familienmitglieder weisen eine ähnliche Struktur und einen ähnlichen Mechanismus der Aktivierung und Signalweiterleitung auf.

Die Stat-Proteine können in fünf strukturell und funktionell verschiedene Domänen eingeteilt werden (Abbildung 2.5-1):

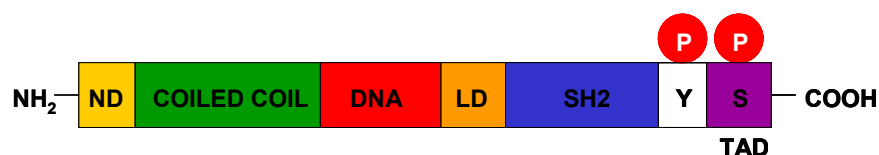


Abbildung 2.5-1: Die strukturellen und funktionellen Domänen der Stat-Proteine: ND: N-terminale Domäne für Dimer-Dimer-Interaktionen; COILED-COIL: Coiled-Coil Domäne für Proteininteraktionen; DNA: DNA-Bindedomäne; LD: Linker Domäne; SH2: src-homology 2-Domäne für die Bindung an den Rezeptor und die Dimerisierung; TAD: Transaktivierungsdomäne. Alle Stats werden durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert (Y). Zusätzlich werden verschiedene Stats in der TAD serinphosphoryliert (S) (modifiziert nach Horvath, 2000).

Die aminoterminalen ~125 Aminosäuren (ND-Domäne) sind sehr konserviert bei den einzelnen Stat-Proteinen und vermitteln die Dimer-Dimer Interaktion zur Bildung von tetrameren Stat-Molekülen. Diese Tetramerisierung führt zu einer stabileren Stat-DNA-Bindung an schwachen Promotoren. Außerdem ist die ND für die Regulation der Kerntranslokation verantwortlich (Kisseleva *et al.*, 2002, Vinkemeier *et al.*, 1998). Die Coiled-coil-Domäne (Aminosäure ~135 bis ~315) ist an der Protein-Protein-Interaktion mit z.B. Transkriptionsfaktoren oder anderen regulatorischen Proteinen beteiligt. Außerdem scheint diese Domäne für den nuklearen Export der Stat-Proteine wichtig zu sein (Schindler, 2002).

Die Domänen, die den C-Terminus bilden, sind besser untersucht als die N-terminalen Domänen. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD, Aminosäure ~320 bis ~480) ist für die spezifische DNA-Bindung der Stats verantwortlich. Die benachbarte Linker-Domäne ist für die ordentliche Faltung der DNA-Bindungsdomäne verantwortlich und stellt die Verbindung zur SH2-Domäne dar. Die DBD und die Linker-Domäne scheinen ebenfalls am nuklearen Export beteiligt zu sein (Schindler, 2002).

Die SH2-Domäne (Aminosäure ~575 bis ~680) ist das am meisten konservierte Motiv und vermittelt sowohl die spezifische Interaktion mit dem Rezeptor als auch die Stat-Dimerisierung. Am C-Terminus des Stat-Proteins liegt die Transaktivierungsdomäne (TAD), welche für die Kommunikation mit dem Transkriptionsapparat zuständig ist. Sie variiert in Länge und Sequenz zwischen den einzelnen Stat-Proteinen (Schindler, 2002).

Stat5 wurde zuerst in den Brustdrüsen laktierender Ratten und Rinder identifiziert und als MGF (*mammary gland factor*) bezeichnet (Schmitt-Ney *et al.*, 1992, Wakao *et al.*, 1992). Das MGF wurde erstmals aus dem Schaf kloniert und dessen Funktion als Regulator der prolaktinvermittelten β -Kaseingenaktivierung in Brustdrüsenzellen beschrieben. Anhand der Sequenzhomologie wurde MGF der Stat-Familie zugeordnet und in Stat5 umbenannt (Wakao *et al.*, 1994). Die Hauptunterschiede der beiden Stat5-Proteine liegen im Bereich der Transaktivierungsdomäne, wobei Stat5A (794 AS) und Stat5B (783 AS) sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. In welchen Funktionen sie sich jedoch gegenseitig kompensieren können ist noch nicht bekannt. Im Brustgewebe bilden Stat5A und Stat5B-Proteine auch Heterodimere, um so gemeinsam z.B. die Milchproteinexpression zu steuern (Philp *et al.*, 1996).

Stat5 wird in fast allen Organen und Geweben exprimiert und durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert (Tabelle 2.4-1). Trotz der Vielzahl an aktivierenden Zytokinen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nur einige wenige Zielgene von Stat5 bekannt (Tabelle 2.5-1).

Stat	Zielgene	Referenzen
Stat5	β -Kasein	Gouilleux <i>et al.</i> , 1995
	IL-2 α -Rezeptor	Lecine <i>et al.</i> , 1996
	CIS	Matsumoto <i>et al.</i> , 1997
	osm	Yoshimura and Arai, 1996
	pim1	
	p21	Matsumura <i>et al.</i> , 1997
	Cyclin D1	Matsumura <i>et al.</i> , 1999
	Bcl-X _L	Dumont <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 2.5-1: Stat5-Zielgene (Ward *et al.*, 2000).

Durch den Einsatz von *knockout*-Mäusen wurde die Funktion von Stat5A und Stat5B *in vivo* untersucht. Die gefundenen Auswirkungen der Deletionen waren jedoch nicht so gravierend, wie man aufgrund der omnipotenten Expression und der Vielzahl an aktivierenden Zytokinen hätte erwarten können. Die Stat5A^{-/-}-Mäuse zeigen vor allem einen Defekt in der Brustdrüsenentwicklung und sind nicht in der Lage, die Milchproteine zu sekretieren (Liu *et al.*, 1997). Stat5B spielt eher eine untergeordnete Rolle bei der Prolaktinsignaltransduktion. Stat5B kann die Wirkungsweise von Stat5A nicht kompensieren, da es andere Funktionen ausübt und in geringeren Mengen als Stat5A gebildet wird. Die Defekte bei den Stat5B^{-/-}-Mäusen weisen auf eine Einflussnahme von Stat5B auf das Wachstum hin. Die Deletion von Stat5B führt zu einem Verlust des sexuellen, dimorphen Wachstums und zu einem Verlust der Wachstumshormonabhängigen Regulation der Genexpression in der Leber (Gadina *et al.*, 2001).

Die Stat5A und Stat5B doppel-*knockout*-Mäuse weisen eine größere Einschränkung im Wachstum und in der Entwicklung im Vergleich zu Stat5A^{-/-}- oder Stat5B^{-/-}-Mäusen auf. Außerdem wurde zum einen eine fötale Anämie bei Stat5A^{-/-}- und Stat5B^{-/-}-Mäusen und zum anderen eine direkte Einflussnahme von Stat5A und Stat5B in die Bcl-X_L-Induktion beobachtet (Socolovsky *et al.*, 1999). Andere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass beide Stat5-Proteine zwar auch durch Erythropoetin und Thrombopoetin, sowie durch weitere Zytokine aktiviert werden, besitzen hier aber nur redundante Funktionen (Teglund *et al.*, 1998). Die genaue Aufgabe, die Stat5 im Organismus spielt, konnte bis jetzt auch nicht mit Hilfe von *knockout*-Mäusen geklärt werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Untersuchung der Stat5-Wirkungsweise ist der Einsatz von konstitutiv aktiven Mutanten. Um die Funktion von Stat5 genauer im hämatopoetischen System zu untersuchen und um das Problem der kontroversen Diskussion des Phänotyps der Stat5-*knockout*-Mäuse zu umgehen, wurde eine

konstitutiv aktive Stat5A Mutante, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, mittels zufälliger Mutagenese hergestellt. Diese Mutante ist ohne Zytokinstimulation transkriptionell aktiv und vermittelt in einer IL-3 abhängigen hämatopoetischen Zelllinie zytokinunabhängiges Wachstum (Onishi *et al.*, 1998). Diese Mutante scheint jedoch nicht nur die Proliferation zu stimulieren, sondern im gleichen Zellsystem auch für apoptotische- und Differenzierungsvorgänge zuständig zu sein. Durch zusätzliche Zytokinstimulation besitzt die Mutante nicht mehr das Potential zur Proliferationsinduktion, sondern induziert Apoptose und Differenzierung (Nosaka *et al.*, 1999). Es hat sich gezeigt, dass eine künstlich hergestellte konstitutiv aktive Stat5A-Mutante ein nützliches Werkzeug zur Aufklärung der Stat5A-Funktion im Organismus ist.

2.5.1 Einfluss von Stat-Transkriptionsfaktoren auf die Brustdrüsenentwicklung und Tumorentstehung

Verschiedene Stat-Proteine werden während der Brustentwicklung exprimiert und aktiviert, wie Northern-Blot-Untersuchungen unterschiedlicher Brustentwicklungsstadien zeigen (Tabelle 2.5-2).

Stat-Faktor	Entwicklungsstadium					
	Expression:Aktivierung Jungfrau	frühe Schwangerschaft	späte Schwangerschaft	Laktation	frühe Involution	späte Involution
Stat1	+++	+++	+-	+-	+-	+++
Stat3	+++	+++	+-	+-	+++	+++
Stat4	+ : n.u.	+ : n.u.	- :-	- :-	n.u. : n.u.	n.u. : n.u.
Stat5A/B	+ :-	+ :-	+++	+++	+++	+ :-
Stat6	n.u. : n.u.	n.u. : n.u.	n.u. : n.u.	- : n.u.	+ : n.u.	n.u. : n.u.

Tabelle 2.5-2: Regulation der Stat-Expression und Aktivität der Stat-Proteine während der Brustdrüsenentwicklung. Die Daten zeigen die mRNA Expression [(+) nachweisbar; (-) nicht nachweisbar] und die DNA-Bindungsaktivität [(+) nachweisbar; (-) nicht nachweisbar, n.u. = nicht untersucht] (Watson, 2001).

Die Stat1- und Stat3-Proteine werden konstitutiv in mehr oder weniger gleichen Konzentrationen während des gesamten Brustentwicklungszyklusses exprimiert. Die Stat4- und Stat5-Expression hingegen ist durch die einzelnen Phasen des Zyklusses reguliert (Philp *et al.*, 1996). Das Stat5-Protein wird während der Schwangerschaft aktiviert, was eine mögliche Einflussnahme von Stat5 auf die Differenzierung von Brustepithelzellen noch unterstützt (Liu *et al.*, 1996).

Die Hauptsignal-moleküle bei der Brustentwicklung sind Stat5A und Stat3. Die Analysen des Phosphorylierungsgrades und der Aktivität der Stat-Proteine zeigen, dass Stat5

und Stat3 reziproke Aktivierungsmuster aufweisen (Philp *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1996). Die Stat3-Aktivierung nimmt mit dem Anstieg von aktivem Stat5 bei der Schwangerschaft ab und nimmt beim Übergang zur Regression der Brustdrüse, wenn die Stat5-Aktivität abnimmt, wieder zu. Ob diese Vorgänge in einer Zelle gleichzeitig ablaufen, oder aber verschiedene Zellen dafür zuständig sind, ist noch nicht geklärt.

Stat3 und Stat5 haben nicht nur unterschiedliche Aktivierungsmuster, sondern besitzen auch gegenteilige Funktionen bei der Brustentwicklung: Die Stat5-Aktivierung ist eng verknüpft mit der alveolaren Proliferation und Milchproteinbildung, d. h. mit der Enddifferenzierung der sekretorischen Epithelzellen. Die Stat3-Aktivierung geht mit einem Verlust der alveolaren Funktion der Milchbildung, apoptotischen Vorgängen, sowie der Initiation der Wiederherstellung des Brustgewebezustands vor der Schwangerschaft einher (Hennighausen *et al.* 1997).

Bei dieser großen Einflussnahme eines Signalweges auf die Brustentstehung war die Entdeckung von konstitutiv aktiven Stat-Proteinen in Brusttumoren nicht überraschend und es wurden weitere konstitutiv aktive Stat-Proteine in anderen Tumorarten entdeckt. In Tabelle 2.5-3 sind einige Tumorarten und die gefundenen konstitutiv aktivierten Stat-Proteine aufgelistet.

Primärtumor/Zelllinien	Aktivierte Stats
Brustkrebs	Stat1, Stat3, Stat5
Verschiedene Myeloma	Stat1, Stat3
Hals- und Nackenkrebs	Stat1, Stat3
Leukämien:	
HTLV-1 abhängig	Stat3, Stat5
Erythroleukämie	Stat1, Stat5
Akute lymphozytische Leukämie (ALL)	Stat1, Stat5
Chronische lymphozytische Leukämie (CLL)	Stat1, Stat3
Akute myelogene Leukämie (AML)	Stat1, Stat3, Stat5
Chronische myelogene Leukämie (CML)	Stat5
Megakaryozytische Leukämie	Stat5
Lymphome:	
EBV-related/Burkitt's	Stat3
Lungenkrebs	Stat1, Stat3
Melanoma	Stat3

Tabelle 2.5-3: Konstitutiv aktivierte Stats in humanen Primärtumoren und Zelllinien (Bromberg, 2001).

Die Aktivierung von Stats ist normalerweise ein transients und streng regulierter Prozess. In vielen humanen Tumorzelllinien und Primärtumoren ist diese Regulation nicht mehr gegeben. Vor allem Stat3 und Stat5 findet man konstitutiv aktiviert in Primärtumoren und daraus abgeleiteten Zelllinien (Bromberg, 2000). Diese ständige Signaltransduktion führt durch Stimulation der Proliferation und Verhinderung der

Apoptose direkt zur Onkogenese (Buettner *et al.*, 2002, O'Shea *et al.*, 2002). Einige Gene, die durch Stat3 und Stat5 reguliert werden, sind ebenfalls bei der Tumorentstehung beteiligt oder werden für die Prognose des Krebsverlaufes herangezogen: Cyclin D1, als ein Regulator des Zellzyklusses, ist in einigen Brustkrebsarten überexprimiert (Weinstat-Saslow *et al.*, 1995). In transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin D1 zu einer übermäßigen Proliferation des Brustgewebes und zur Tumorentstehung führt (Wang *et al.*, 1994). Schnell proliferierende Brusttumore zeigen häufig eine vermehrte *c-myc* Expression, was als ein Zielgen besonders von Stat3 beschrieben ist (Bromberg, 2000). Das Bcl-X_L-Protein, ein Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie, wird ebenfalls durch Stat3 und Stat5 reguliert und ist in vielen Brusttumoren gefunden worden (Liu *et al.*, 1998, Vakkala *et al.*, 1999).

Außerdem scheinen konstitutiv aktivierte Stat-Proteine in Tumoren andere Signalwege anzuschalten als im normalen, induzierbaren Zustand. Ein Beispiel hierfür ist die Wirkungsweise von Stat3. Wie schon beschrieben scheint Stat3 im normalen Brustgewebe für die Induktion der Apoptose während der Brustregression nach dem Stillen verantwortlich zu sein (Buettner *et al.*, 2002). In Tumorzellen findet man jedoch verstärkt konstitutiv aktives Stat3, dessen Hemmung zu einer Erhöhung der Apoptoserate in diesen Zellen führt (Burke *et al.*, 2001, Garcia *et al.*, 2001). Eine Aktivierung von Stat3 scheint also unterschiedliche Funktionen im normalen Brustgewebe und in Brusttumoren zu haben. Der Mechanismus der konstitutiven Stat-Aktivierung ist noch nicht besonders gut erforscht. In vielen Fällen ist eine konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase für eine ständige Stat-Phosphorylierung verantwortlich. Mutationen im Stat-Gen selbst wurden bis heute noch nicht gefunden.

Neueste Forschungen zeigen, dass nicht nur die Stat-Proteine, sondern auch Proteine, die an der Regulation des JAK/Stat-Signalweges involviert sind, in Tumoren verändert vorliegen.

2.6 Negative Regulatoren des Signaltransduktionsweges

Die Stat-Aktivität wird sowohl in der Zeitspanne als auch in der Signalintensität durch verschiedene Proteinfamilien reguliert. Dazu gehören die SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*) (Starr *et al.*, 1997), die PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated Stat*) (Shuai, 2000) und Proteintyrosinphosphatasen (Neel and Tonks, 1997). Diese regulatorischen Proteine scheinen zum Teil auch für die konstitutive Aktivierung einiger Stat-Proteine in Tumoren verantwortlich zu sein.

Die Proteintyrosinphosphatasen (PTP) sind die enzymatischen Gegenspieler der Proteintyrosinkinase. Durch Interaktion mit der Coiled-Coil-Domäne der Stat-Proteine sind sie in der Lage, diese zu dephosphorylieren (Shuai *et al.*, 1998). Bis heute wurden etwa 500 PTPs entdeckt, fünf dieser PTPs spielen eine Rolle bei der Stat-Dephosphorylierung: CD45, PTPeC, PTP1B und die beiden Phosphatasen SHP-1 (*SH2-domaine phosphatase-1*) und SHP-2 (*SH2-domain phosphatase-2*). Die PTPs können in den JAK/Stat-Signalweg auf verschiedenen Ebenen eingreifen:

(A) Durch Assoziation mit dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, (B) durch Bindung an die Janus-Kinasen, oder (C) durch Assoziation mit phosphorylierten Stat-Proteinen. Eine Dephosphorylierung der Stats findet auch nach der Translokation im Kern statt. Es wurden bis jetzt jedoch keine nuklearen Stat-Phosphatasen identifiziert.

Eine Familie spezifisch zytokininduzierbarer Inhibitoren wurde in den letzten fünf Jahren identifiziert. Diese inhibitorischen Proteine wurden unabhängig von drei verschiedenen Forschergruppen entdeckt und als SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) (Starr *et al.*, 1997), JAB (*JAK Binding*) (Endo *et al.*, 1997) oder SSI (*Stat-induced Stat Inhibitor*) (Naka *et al.*, 1997) bezeichnet (Abbildung 2.6-1).

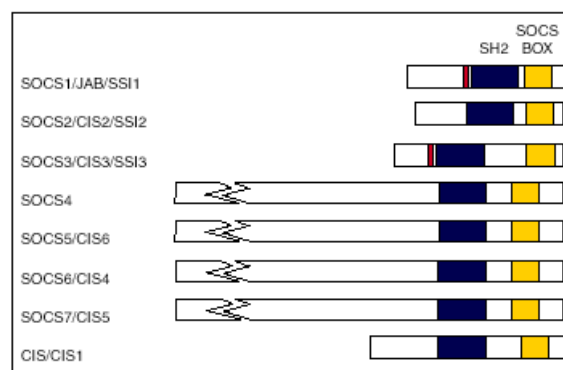


Abbildung 2.6-1: Struktur der SOCS-Proteinfamilienmitglieder. Die kinaseinhibierende Region von SOCS1 und SOCS3 ist rot dargestellt (Krebs and Hilton, 2001).

Zur SOCS-Familie gehören 8 Mitglieder, wozu auch das schon länger bekannte Cis-Protein (*cytokine-inducible SH2-containing protein*) zählt (Yoschimura *et al.*, 1995). Die Mitglieder dieser Familie lassen sich durch gemeinsame Strukturmerkmale charakterisieren, wobei alle eine zentrale SH2-Domäne und ein C-terminales SOCS-Box-Motiv besitzen (Abbildung 2.6-1).

Die SOCS-Box ist eine konservierte Sequenz von 40 Aminosäuren, welche höchstwahrscheinlich eine Funktion beim proteosomalen Abbau von JAKs und den Rezeptoren hat. Sie wirkt als Adaptor für die Initiierung der Ubiquitinierung und dient

somit der Kennzeichnung von Proteinen für den proteosomalen Abbau (Starr and Hilton, 1999, Krebs and Hilton, 2001, O'Shea *et al.*, 2002).

Die SOCS-Gene sind normalerweise nur in einer sehr geringen Konzentration exprimiert, können aber durch eine Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen schnell induziert werden (Tabelle 2.6-1).

Name	Inhibition der Signalkaskade von
CIS / CIS1	IL-2, IL-3, GH, Prolaktin, EPO
SOCS1 / JAB / SSI1	IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GH, Prolaktin, EPO, LIF, IFN- α/β , IFN- γ , OSM, TSLP, Tpo
SOCS2 / CIS2 / SSI2	GH, IL-6, LIF
SOCS3 / CIS3 / SSI3	IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, GH, Prolaktin, Epo, LIF, IFN- α/β , IFN- γ , CNTF, Leptin, OSM
SOCS4	nicht untersucht
SOCS5 / CIS6	IL-6
SOCS6 / CIS4	Scheint nicht zu inhibieren
SOCS7 / CIS5	nicht untersucht

Tabelle 2.6-1: Negative Regulation der Zytokinsignalwege durch SOCS-Familienmitglieder (Watson, 2001).

Der Regulationsmechanismus der SOCS-Promotoren ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unzureichend untersucht. Nur 4 Familienmitglieder (CIS, SOCS1, SOCS2 und SOCS3) sind bis jetzt charakterisiert. Obwohl die SOCS-Proteine eine große Strukturähnlichkeit aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrer inhibitorischen Wirkungsweise erheblich voneinander. SOCS1 und SOCS3 können im Gegensatz zu CIS und SOCS2 direkt an die Janus-Kinasen binden und deren Kinaseaktivität inhibieren, indem sie wahrscheinlich als Pseudosubstrat dienen. Die beiden SOCS-Familienmitglieder besitzen als einzige eine kinaseinhibierende Domäne (KIR = *kinase inhibitory region*), die als Pseudosubstrat fungieren und an das katalytische Zentrum der JAKs binden kann. SOCS3 hat darüber hinaus noch die Fähigkeit, an den Zytokinrezeptor zu binden und dadurch die Funktion der JAKs zu inhibieren.

CIS bindet dagegen direkt an den Zytokinrezeptor und blockiert damit die Bindung der Stats an den Rezeptor. Weder CIS noch SOCS2 können an JAKs binden (O'Shea *et al.*, 2002).

Einen Einfluss von SOCS bei der Tumorentstehung konnte bis jetzt nur in Leberkarzinomen nachgewiesen werden. Es wurde eine verstärkte Methylierung der CpG-Inseln im Gen für SOCS1 gefunden, wodurch die Transkription dieses Genes gestört ist (Yoshikawa *et al.*, 2001).

Die PIAS-Proteine inhibieren den Signalweg, indem sie spezifisch aktivierte Stat-Dimere binden und so die DNA-Bindungsfähigkeit der Stats blockieren, so dass eine Transkription der Stat-Zielgene nicht mehr möglich ist. Eine weitere Funktion der PIAS-

Proteine ist die Ligasetätigkeit bei der Sumoylierung (Jackson, 2001). Die Frage, ob Stat-Proteine sumoyliert werden, konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

In Abbildung 2.6-2 ist die Zusammenfassung zwischen positiven und negativen Regulationsmechanismen der zytokininduzierten Signaltransduktion dargestellt.

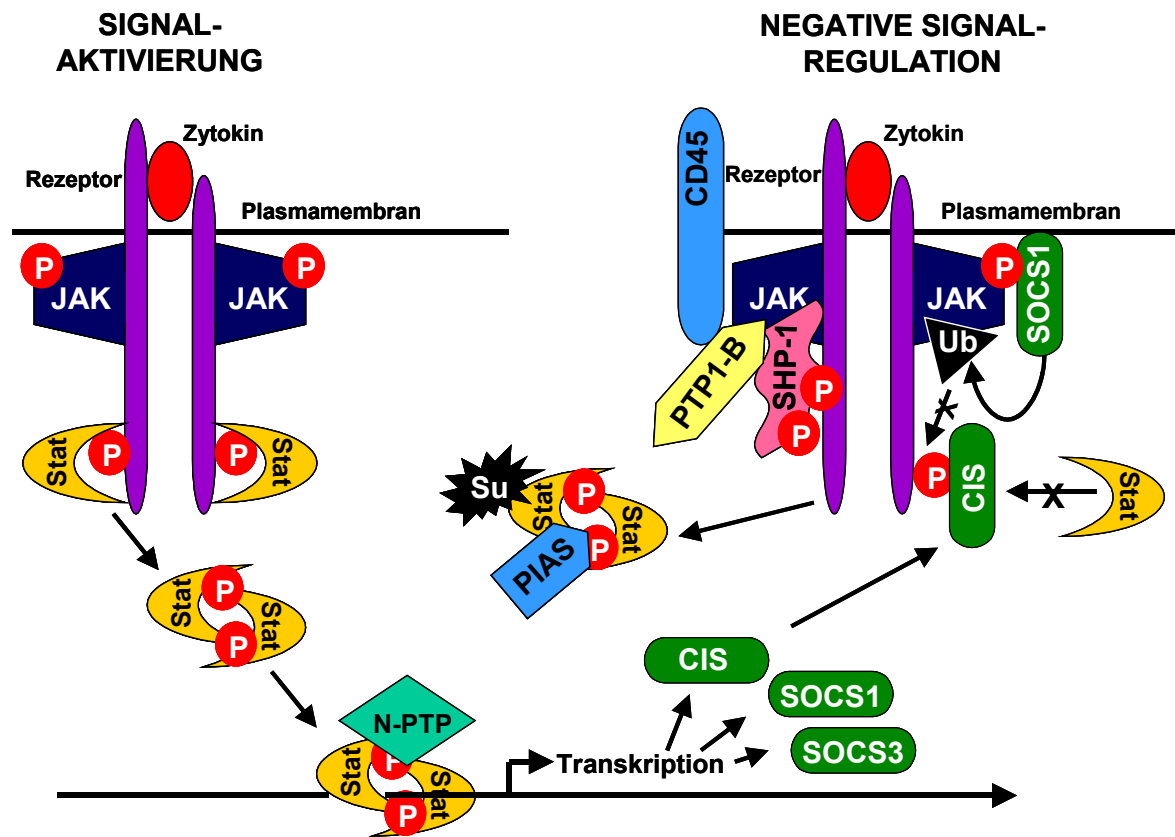


Abbildung 2.6-2: Überblick über die Zytokinsignaltransduktion: Positive und negative Regulation. Zytokine induzieren Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren, welche mit JAKs assoziiert vorliegen. JAKs werden durch Transphosphorylierung aktiviert und können dadurch den Rezeptor phosphorylieren. Stats können über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierten Rezeptorstellen binden und selbst phosphoryliert werden. Die so aktivierten Stats bilden Dimere und gelangen so in den Kern, wo sie an spezifische Promotorsequenzen binden können und die Transkription ihrer Zielgene steuern können. Dieser Prozess ist durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine gesteuert. Tyrosinphosphatasen (z.B. SHP-1, CD45 und PTP1B) regulieren den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors und der JAKs. Dimerisiertes Stat kann durch das PIAS-Protein gebunden und inaktiviert werden. Die PIAS-Proteine besitzen zusätzlich eine SUMO-E3-Ligasefunktion. Inwieweit Stat-Proteine allerdings sumoyliert werden, ist rein spekulativ. Zusätzlich induziert die Zytokinstimulation die Expression der SOCS-Proteine, die durch Bindung sowohl die JAKs als auch die Rezeptoren inaktivieren. Die SOCS-Proteine sind auch bei dem ubiquitinären Abbau der Stats beteiligt. Die Stat-Proteine können auch im Kern dephosphoryliert werden. Die Identität der verantwortlichen Phosphatase (N-PTP) ist jedoch noch nicht aufgeklärt (O’Shea *et al.*, 2002).

3 Zielsetzung

Stat5 spielt eine wesentliche Rolle in der prolaktininduzierten Signalübertragung von der Zellmembran in den Nukleus. Es gibt Hinweise, dass sowohl Prolaktin als auch Stat5 bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose Einfluss nehmen. Neben Stat3 und Stat1 ist vor allem Stat5A maßgeblich bei der Entwicklung von Brustgewebe sowie der Laktation beteiligt. Stat5A nimmt demnach Einfluss sowohl auf die Expansion als auch auf die Differenzierung von Brustepithelzellen zu Milchdrüsen. Es verstärken sich auch die Hinweise, dass diese drei Stat-Familienmitglieder an der Tumorbildung beteiligt sind. Eine konstitutive Aktivierung dieser Stat-Proteine wurde u.a. in Brusttumoren gefunden.

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von Stat5A in der prolaktinvermittelten Signaltransduktion in Brusttumor- und Brustepithelzelllinien aufzuklären. Hierzu wird mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante die Funktion von Stat5A bei der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Tumorentstehung in verschiedenen Brusttumor- und Brustepithelzelllinien untersucht.

4 Material

4.1 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier No. 3649	Schleicher & Schuell, Dassel
MicroSpin™ G-25 Säulen	Amersham/Pharmacia, Braunschweig
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Nitrocellulosemembran Protran® BA83, 0,22 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF-Membran "porablot", 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Röntgenfilm, Kodak BioMax Light	Kodak, Stuttgart
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen (8,7 bis 14,5 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
6- und 12-Loch-Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen

4.2 Chemikalien

Im Rahmen biochemischer Verfahren werden Chemikalien in reinster Qualität verwendet. Das Ansetzen von Lösungen erfolgt, falls nicht gesondert darauf hingewiesen wird, in bidestilliertem Wasser.

Acrylamid, 4 K, 29:1, 30% (w/v)	AppliChem, Darmstadt
AG490	Torcis, Bristol (UK)
ε-Aminocaprinsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs (Schweiz)
APS	Roth, Karlsruhe
BSA	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DAPI-2 HCl	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Dinatriumtartrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix, 10 mM	peqlab, Erlangen
DTT	AppliChem, Darmstadt
ECL-Chemilumineszenzsystem	Amersham/Pharmacia, Braunschweig
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Enzyme für die Molekularbiologie	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Formaldehyd, 35% (w/w)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
PMSF	Roth, Karlsruhe
Poly (dl:dC)	Amersham/Pharmacia, Braunschweig
Radiochemikalien	Amersham/Pharmacia, Braunschweig
RNase, DNase frei	Sigma, Deisenhofen
RNasin	Invitrogen, Eggenstein

SDS	Merck, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
SYBR green II	MoBiTec, Göttingen
Taq-Polymerase	Invitrogen, Eggenstein
TEMED	Sigma, Deisenhofen

4.3 Kits und Standards

Molekulargewichtsmarker für Proteine, Benchmark	Invitrogen, Eggenstein
Molekulargewichtsmarker für DNA, 1kb+	Invitrogen, Eggenstein
T4-Polynukleotidkinase + Puffersystem	New England Biolabs (NEB), Schwallbach
4 x Probenauftragspuffer, reduzierend	Roth, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protektion Assay System	Pharmingen, San Diego (USA)
<i>In situ</i> Cell Death detection Kit, TMR red	Roche Diagnostics, Mannheim

4.4 Zellkulturreagenzien

Alle Chemikalien werden in zellkulturgetesteter Qualität verwendet.

DMEM, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na-Pyruvat	Invitrogen, Eggenstein
RPMI, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na-Pyruvat	Invitrogen, Eggenstein
MEGM bullet kit	BD Clontech, Heidelberg
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Roche Diagnostics, Mannheim
G418	Sigma, Deisenhofen
Puromyzin	Sigma, Deisenhofen
Doxyzyklin	Sigma, Deisenhofen
Isoton II	Becton Dickinson, Heidelberg
PBS	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
Prolaktin	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Eggenstein
Gelatine, aus Schweinehaut	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Eggenstein

4.5 Antikörper

Folgende Antikörper werden in Western Blot Analysen (WB), Immunhistochemie (IH) und Gelretardierungsanalysen (EMSA) verwendet.

Spezifität	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
Stat1	EMSA 25ng/µl WB 1:1000	Monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
Stat3 (C-20)	EMSA 20ng/µl	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
Stat3	WB 1:2500	Monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
Stat5A	EMSA 20ng/µl WB 1:10000	Polyklonal, Kaninchen	Zymed Laboratories Inc.
Stat5B	EMSA 1µl WB 1:10000	Polyklonal, Kaninchen	N. Hynes, FMI Basel
Stat5A/B	WB 1:250	Monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
Cyclin A	WB 1:500	Monoklonal, Maus	Upstate
p21	WB 1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
p27	WB 1:1000	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2	WB 1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Calbiochem
Bcl-X _L	WB 1:1000	Monoklonal, Maus	Pharmingen
Phospho-Tyrosin	WB 1:1000	Monoklonal, Maus	NEB
EGF-Rezeptor (sc-03)	WB 1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
NKCC1	IH 1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Miyoshi <i>et al.</i> , 2001
Npt2b	IH 1:100	Polyklonal, Kaninchen	Miyoshi <i>et al.</i> , 2001
Anti-Kaninchen Ig-HRP	WB 1:10000	Polyklonal, Esel	Amersham/Pharmacia
Anti-Maus Ig-HRP	WB 1:10000	Polyklonal, Schaf	Amersham/Pharmacia
Anti-Ziege Ig-HRP	WB 1:30000	Polyklonal, Kaninchen	Jackson Immuno Research Lab.

4.6 Zellen

Zelllinie	Bezeichnung	Referenz / ATCC-Nr.
HC11	Murine Mammaepithelzelllinie	Ball <i>et al.</i> , 1988
MAXL 401 NL	Humane Mammakarzinomzelllinie	Roth <i>et al.</i> , 1999
MDAMB231	Humane Mammakarzinomzelllinie	HTB-26
MDAMB453	Humane Mammakarzinomzelllinie	HTB 131
MCF7	Humane Mammakarzinomzelllinie	HTB 22
T47D	Humane Mammakarzinomzelllinie	HTB-133
SKBR3	Humane Mammakarzinomzelllinie	HTB 30
MCF10A	Humane Mammaepithelzelllinie	CRL 10317
293 GPG	Verpackungszelllinie VSVG-Pseudotyp	Ory <i>et al.</i> , 1996

4.7 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
XL-1 blue	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi, relA1, lac ⁻ , F'(traD36, proAB ⁺ , lacI ^P , lacZΔM15	Hanahan <i>et al.</i> , 1983

Die Abkürzungen des Genotyps beziehen sich auf die Nomenklatur von B. Bachmann.

4.8 Plasmide

Name	Verwendungszweck	Referenz
pMX IRES GFP	Retroviraler Vektor mit GFP-Expressionskassette	Onishi <i>et al.</i> , 1996
pMX Stat5A IRES GFP	Stat5A aus Maus	Onishi <i>et al.</i> , 1996
pMX Stat5A 1*6 IRES GFP	Konstitutiv aktives Stat5A aus Maus	Onishi <i>et al.</i> , 1996
pMX dnStat5A IRES GFP	Dominant negatives Stat5A Y705P aus Maus	Döll, F. diese Arbeit
pMX Stat5Δ750 IRES GFP	Dominant negatives Stat5, ohne Transaktivierungsdomäne aus Maus	Döll, F. diese Arbeit
pMX SOCS1 IRES GFP	Humanes SOCS1	Bender, S. unveröffentlicht
pMX SOCS3 IRES GFP	Humanes SOCS3	Bender, S. unveröffentlicht
pcDNA3-PRLR	Expressionsvektor mit Prolaktinrezeptor	Gouilleux <i>et al.</i> , 1994
β-Cas-Luc	Luziferase-Reporterkonstrukt mit β-Kaseinpromotor	Gouilleux <i>et al.</i> , 1994
CMV β-Gal	Beta-Galactosidase-Expressionsvektor	Amersham/Pharmacia

4.9 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

4.9.1 Oligonukleotide für DNA-Bindungsversuche

Oligonukleotid	Sequenz	
β-Kasein, Rind	5'-aga ttt cta gga att caa atc-3'	Bindungselement für Stat5
SIEm67 aus c-fos-Promotor, Maus	5'-cat ttc ccg taa atc-3'	Bindungselement für Stat3
GBP, Maus	5'-aag tac tt cag tt cat att act cta aat c-3'	Bindungselement für Stat1

4.9.2 Primer für die PCR

Name	Spezifität	Sequenz 5' - 3'	PCR-Annealing-Temperatur, Zyklusanzahl
β-Kasein-For β-Kasein-Rev	Maus	act aca ttt act gta tcc tct ga gtg cta ctt gct gca gaa agt aca g	58°C, 38 Zyklen
cis-For cis-Rev	Human und Maus	ccc tgg tag tcc aga gac c tga ggg ctc tgt aca tga aag	62°C, 25 Zyklen
Cyclin D1-For Cyclin D1-Rev	Human	gaa caa aca gat cat ccg caa aca c tgc tcc tgg cag gcc cgg agg cag t	60°C, 25 Zyklen
GAPDH-For GAPDH-Rev	Human und Maus	gat gac atc aag aag gtg gtg gct gta gcc aaa ttc gtt gtc	58°C, 25 Zyklen
SOCS1-For SOCS1-Rev	Maus	cac ctt ctt ggt gcg cg aag cca tct tca cgc tga gc	60°C, 40 Zyklen
SOCS3-For SOCS3-Rev	Human und Maus	tca ccc aca gca agt ttc ccg c gtt gac ggt ctt ccg aca gag atg c	60°C, 25 Zyklen

5 Methoden

5.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Zellen werden im Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Der CO₂-Gehalt richtet sich nach dem verwendeten Medium und beträgt 5% (v/v) bei RPMI und 10% (v/v) bei DMEM.

5.1.1 Sterilttest auf Mycoplasmen (Russel *et al.*, 1975)

Lösungen:

- PBS
- Methanol, 4°C
- DAPI-Lösung
60 nM DAPI in Methanol, 4°C

Durchführung:

Die zu untersuchende Kultur wird für 15 min mit 0,2 ml/cm² Methanol fixiert. Der Zellrasen wird für 15 min mit 0,2 ml/cm² DAPI-Lösung gefärbt. Die mit PBS befeuchtete Kultur wird unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm untersucht.

5.1.2 Beschichtung von Kulturgefäßen

Lösungen (steril):

- Gelatinelösung, 10 g/l:
1 g Gelatine in 100 ml Milli-Q-Wasser suspendieren und durch Autoklavieren lösen. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.
- PBS

Materialien:

- Zellkulturgefäße

Durchführung:

Um ein Anheften adhärent wachsender 293 GPG Zellen an geeigneten Oberflächen zu ermöglichen, werden diese mit Gelatine beschichtet. Der Boden der Kulturgefäße wird mit 0,1 ml/cm² Gelatinelösung überschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS sind die Kulturgefäße gebrauchsfertig.

5.1.3 Lebendzellzahlbestimmung mit Hilfe des COULTER COUNTERS

Lösungen:

- Isoton II

Material:

- COULTER COUNTER Z1 (Becton Dickinson)

Durchführung:

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine 1:20 bis 1:100 Verdünnung der Zellsuspension in 10 ml Isoton II im Coulter Counter gemessen. Die Ausschlussgröße lebender Zellen beträgt 5 - 18 µm.

5.1.4 Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Lösungen:

- PBS
- Trypsin/EDTA-Lösung
0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA

Material:

- Beschichtete Kulturgefäße

Durchführung:

Das Kulturmedium wird entfernt und der Zellrasen einmal mit 0,2 ml/cm² PBS gewaschen. 0,04 ml/cm² der Trypsin/EDTA-Lösung wird auf der Zelloberfläche gleichmäßig verteilt. Die vollständig suspendierten Zellen werden in Kulturmedium aufgenommen. Mit einem Bruchteil dieser Zellsuspension erfolgt eine Neuaussaat oder Zellzahlbestimmung.

5.1.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen (Doyle & Morris, 1993)

Lösungen:

- Lagermedium
10% (v/v) DMSO in FCS, 4°C
- Kulturmedium, 37°C

Material:

- Beschichtete Kulturgefäße
- Kryoröhrchen (1,8 ml)

Durchführung:

A) Kryokonservierung:

Die nach der Trypsinierung erhaltene Zellsuspension wird auf einen Titer von 1×10^6 Zellen/ml in 10% DMSO in FCS eingestellt und zu je 1 ml in Kryoröhrchen portioniert. Die Kryoröhrchen werden über Nacht bei – 80°C eingefroren und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei – 120°C gelagert.

B) Auftauen:

Beim Auftauen von Zellen ist auf ein zügiges Entfernen des DMSO zu achten. Hierzu werden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C bis zum Verschwinden des letzten Eisrestes inkubiert und der Inhalt mit 1 ml vorgewärmten Kulturmedium versehen. Anschließend wird das Volumen in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit Medium auf 10 ml ergänzt. Die Zellen werden zentrifugiert (5 min, 110 x g), in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturgefäßen ausgesät.

5.1.6 Herstellung von steroid- und thyroidhormonfreiem Serum (CSS)

Lösungen:

- FCS
- Ionenaustauscherharz AG-1-X8
50 g in 50 ml Milli-Q-Wasser
- Aktivkohle-Dextran-Lösung
50 g Aktivkohle + 5 g Dextran T70 in 400 ml 10mM Tris,
pH 8.0

Material:

- 500 ml Zentrifugenbecher
- Flaschenfilter mit 0,22 µm Porengröße
- IKA-Laborrührer

A) Aktivkohle-Dextran-Lösung:

Durchführung:

Zur Herstellung der Aktivkohle-Dextran-Lösung werden 50 g Aktivkohle in 500 ml 10 mM Tris, pH 8,0 für 16 h bei 4°C unter Rühren inkubiert und anschließend bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wird drei bis viermal wiederholt. Nach diesen Waschschritten wird die Aktivkohle und 5 g Dextran T70 in 400 ml 10 mM Tris, pH 8,0 unter Rühren für 16 h gelöst.

B) Hormonfreies Serum

Durchführung:

Für die Herstellung der Anionenaustauschlösung werden 50 g des Ionenaustauscherharzes für 60 min bei 4°C in 50 ml Wasser unter ständigem Rühren gewaschen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

25 g des gewaschenen Ionenaustauscherharzes werden mit 500 ml FCS vermischt und bei 4°C für 5 h auf dem IKA-Laborrührer gerührt. Der Serumüberstand wird in einen neuen Zentrifugenbecher dekantiert und mit den restlichen 25 g des Ionenaustauscherharzes und 10 ml der Aktivkohle-Dextran-Lösung für 16 h bei 4°C gerührt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C wird der Überstand in einen neuen Zentrifugenbecher überführt und mit weiteren 10 ml der Aktivkohle-Dextran-Lösung bei 55°C im Wasserbad für 1 h geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand zweimal durch Filterpapier filtriert. Anschließend wird das Serum mit einem 0,22 µm Flaschenfilter sterilfiltriert, in Portionen zu jeweils 50 ml aufgeteilt und bis zum weiteren Gebrauch bei – 20°C gelagert.

5.2 Kultivierung von Zellen

5.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Lösungen:

- Kulturmedium, 37°C

Material:

- Beschichtete Zellkulturgefäße

Durchführung:

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgt in Zellkulturgefäßen mit 0,2 ml/cm² Kulturmedium. Alle drei bis vier Tage wird das Kulturmedium durch frisches ersetzt; bei Konfluenz werden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:5 bis 1:10 passagiert. Sämtliche Kulturmedien beinhalten, falls nicht gesondert darauf hingewiesen wird, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Weitere verwendete Medienzusätze sind in Tabelle 5.2-1 aufgelistet.

Zelllinie	Kulturmedium	Mediumzusatz
HC11	RPMI 1640	10 g/ml EGF 5 µg/ml Insulin
MAXL 401 NL	RPMI 1640	
MDAMB231	RPMI 1640	
MDAMB453	DMEM	
MCF7	RPMI 1640	
T47D	RPMI 1640	
SKBR3	DMEM	
MCF10A	MEGM (Clontech)	100 ng/ml Cholera toxin
293 GPG	RPMI 1640,	Kulturmedium I: Nicht essentielle Aminosäuren, 2 µg/ml Puromycin 300 µg/ml G418, 1 µg/ml Tetrazyklin Kulturmedium II: Nicht essentielle Aminosäuren

Tabelle 5.2-1: Verwendete Zelllinien und Kultivierungsbedingungen.

5.2.2 Transfektion von 293 GPG und Gewinnung von virushaltigem Kulturüberstand

Lösungen:

- Kulturmedium I, 37°C (siehe Tabelle 5.2-1)
- Kulturmedium II, 37°C (siehe Tabelle 5.2-1)

Material:

- Einmalspritzen
- Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm
- Gelatinierte Kulturgefäße

Durchführung:

Die Zellen werden, wie unter Punkt 5.4.1 beschrieben, transfiziert. Zur Gewinnung der Virusüberstände erfolgt nach der Transfektion ein Austausch von Kulturmedium I zu II und eine Kultivierung der Zellen für weitere 4 Tage. Dieses die Viruspartikel enthaltende Kulturmedium II wird abgezogen, filtriert und kann unmittelbar für die Kultivierung entsprechender Zielzellen verwendet werden. Alternativ wird der Kulturüberstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei – 80°C gelagert.

5.2.3 Transduktion von Säugerzellen

Lösungen:

- Kulturmedium, 37°C
- Virusüberstand + P:
4 mg/ml Polybrene in Virusüberstand, frisch angesetzt

Material:

- Transfizierte 293 GPG Zellen
- Brustepithelzellen
- Zellkulturgefäße

Durchführung:

Die zu transduzierenden Zellen werden in Kulturmedium mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausgesät und für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Das Kulturmedium wird durch 0,8 ml/ cm^2 Virusüberstand + P ersetzt, und die Zellen für 24 h inkubiert. Der verbrauchte Virusüberstand wird entfernt und frischer Virusüberstand + P aufgetragen. Dieser Wechsel erfolgt alle 24 h über einen Zeitraum von drei Tagen. Die Zugabe von 4 µg/ml Polybrene fördert die Anheftung der Viruspartikel an die Zelloberfläche.

5.3 Bestimmung zellulärer Parameter

5.3.1 Zellzyklusbestimmung

Lösungen:

- Kulturmedium, 37°C
- Serumfreies Kulturmedium, 37°C
- PBS
- Ethanol p.A., - 20°C
- 38 mM Natriumcitrat
- 10 x Propidiumjodidlösung
500 µg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 10 mg/ml DNase freie RNase A

Material:

- Kulturplatten
- FACS-Röhrchen
- 37°C Inkubator
- Labormischer „Vortex“
- FACS comp Gerät (Becton Dickinson)

A) Arretierung der Zellen in G₁-Phase des Zellzyklusses

Durchführung:

Es werden $2,5 \times 10^5$ Zellen/cm² unter Kulturbedingungen ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS werden die Zellen mit serumfreiem Medium für 3 Tage kultiviert. Durch diesen Serumentzug werden die meisten Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklusses arretiert. Durch erneute Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium für 16 h bis 48 h werden die Zellen zum Eintritt in die S-Phase angeregt.

B) Fixieren der Zellen

Durchführung:

Der Kulturüberstand der Zellen wird in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst (siehe 5.1.4), in Medium resuspendiert und in das FACS-Röhrchen überführt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2000 rpm für 10 min wird der Überstand verworfen und die Zellen durch tropfenweise Zugabe von 1 ml Ethanol (- 20°C) für mindestens 30 min bei 4°C fixiert.

C) Nachweis der einzelnen Zellzyklusphasen durch Propidiumjodidfärbung

Durchführung:

1×10^6 fixierte Zellen werden nach Zugabe von 1 ml 38 mM Natriumcitrat bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und in 400 µl 38 mM Natriumcitrat resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils 50 µl RNaseA und 10 x Propidiumjodidlösung werden die Zellen für 20 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert und anschließend im FACS comp Gerät analysiert.

5.3.2 Nachweis der Apoptose durch Bestimmung der subG₁-Phase

Die Bestimmung der Zellen in der subG₁-Phase dient als indirekter Nachweis für die Quantifizierung apoptotischer Zellen.

Drei voneinander unabhängige Experimente werden je Versuchsansatz durchgeführt.

Durchführung:

Zellen werden wie unter Kapitel 5.3.1 B) und C) beschrieben fixiert und gefärbt. Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen werden nur die Zellen ausgewertet, die als sogenannte „subG₁“-Spitze vor der eigentlichen G₁-Phasen-Spitze liegen.

5.3.3 Nachweis der Apoptose durch TUNEL (Sgonc *et al.*, 1994)

Lösungen:

- Fixierlösung
4% (v/v) Formaldehyd in PBS
- Permeabilisierungslösung
0,1% (v/v) Triton X-100 in 0,1% (w/v) Trinatriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0
- PBS
- Moviol-Einbettlösung
2,4 g Moviol mit 6,0 g Glycerol 1 h rühren. Zugabe von 6 ml Wasser, 2 h rühren. Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 2h bei 50°C im Wasserbad rühren. Zentrifugation 5000 g / 15 min, Lagerung bei -20°C.
- 50 mM AG490

Material:

- 6-Loch-Kulturplatten
- Deckgläschen, abgeflammt
- *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red
- Objektgläser

Durchführung:

1 x 10⁵ Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und für 48 h mit Inhibitor inkubiert. Nach 24 h werden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und für 30 min mit Fixierlösung bei Raumtemperatur behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zellen für 20 min auf Eis mit Permeabilisierungslösung behandelt und dann erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die TUNEL-Reaktion (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) wird mit Hilfe des *In Situ Cell Death Detection Kits* gemäß der Anweisung des Herstellers mit den darin enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Dabei erfolgt der Einbau fluoreszenzmarkierter Desoxyribonukleotide an Stellen mit DNA-Strangbrüchen durch Terminale Desoxynukleotidyltransferase. Nach Behandlung der Zellen mit dem Enzym-Substratgemisch in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h wird dreimal mit PBS gewaschen, die Deckgläschen im Dunkeln getrocknet, und mit Moviol-Einbettlösung auf Objektträgern verklebt. Das Ergebnis wird im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

5.3.4 Nachweis der Migrationsfähigkeit von Säugerzellen mit Hilfe des Transwell-Tests (Keely, P.J., 2001)

Zum Nachweis der Migrationsfähigkeit von Zellen werden spezielle Kulturplatten der Firma Clontech verwendet. Diese Transwellplatten bestehen aus zwei Kammersystemen, einer äußeren Kammer und einer inneren Kammer, die durch eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße von 8 µm getrennt sind. Die Porengröße der Membran erlaubt es den Zellen, von der inneren zur äußeren Kammer zu migrieren. Die Porengröße ist geringer als der Durchmesser einer Einzellzelle, womit ein passiver Durchtritt der Zellen durch die Membran verhindert wird. Zellen können nur durch aktive Veränderung ihrer Form die untere Kammer erreichen.

Lösungen:

- Serumfreies Kulturmedium, 37°C
- Kulturmedium, 37°C
- Prolaktin
5 mg/ml in PBS
- PBS
- Fixierlösung
4% (v/v) Formaldehyd in PBS
- Kristallviolettlösung
0,1% (w/v) in Wasser

Material:

- Transwellplatten
- Wattestäbchen

Durchführung:

16 h vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wird das Kulturmedium entfernt, und frisches, serumfreies Kulturmedium aufgetragen. Hierdurch wird gewährleistet, dass eine beobachtete Migration nicht durch unspezifische Serumbestandteile hervorgerufen wird. Die innere Kammer der Transwellplatte wird mit 500 µl PBS gewaschen. Die über Nacht „ausgehungerten“ Zellen werden geerntet, einmal mit PBS gewaschen und mit serumfreiem Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 600 µl Kulturmedium werden in die äußere Kammer vorgelegt und 100 µl der Zellsuspension mit oder ohne 5 µg/ml Prolaktin in die innere Kammer pipettiert. Die Zellen werden nun für 24 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Inkubationszeitraum werden nicht migrierte Zellen von der Membranoberfläche der inneren Kammer mit einem Wattestäbchen entfernt. Die innere Kammer wird einmal mit PBS gewaschen und in 550 µl Fixierlösung für 30 min fixiert. Anschließend wird die Kammer noch mit 500 µl Wasser gewaschen, bevor die migrierten Zellen in der Membran mit Kristallviolett färbelösung gefärbt werden. Nicht gebundenes Kristallviolett wird durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt. Nach Trocknen der Membran werden die angefärbten Zellen im Durchlichtmikroskop mit dem 10 x Objektiv ausgewertet. Hierzu werden mindestens 5 Gesichtsfelder ausgezählt und hiervon der Mittelwert bestimmt.

5.4 Transiente Transfektion von Säugerzellen

5.4.1 Kalziumphosphat-Präzipitation

Lösungen:

- Lösung A
0,5 M CaCl_2 , 100 mM HEPES in Milli-Q-Wasser, pH 6,95 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert
- Lösung B
50 mM HEPES, 0,29 mM NaCl, 0,75 mM NaH_2PO_4 , 0,75 mM Na_2HPO_4 in Milli-Q-Wasser, sterilfiltriert
- 5 μg Plasmid-DNA in 120 μl Wasser
- Kulturmedium II, 37°C, siehe Kapitel 5.4.2

Durchführung:

293 GPG Zellen werden 24 h vor der Transfektion in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ cm^2 ausgesät.

Pro 35 mm Kulturschale werden 5 μg Plasmid-DNA zur Transfektion eingesetzt. Der Transfektionsansatz entspricht einem Endvolumen von 480 μl und setzt sich zusammen aus 5 μg DNA in 120 μl Wasser, 120 μl Lösung A und 240 μl Lösung B. Nach Zugabe jeder Komponente wird der Ansatz gemischt und im Anschluss durch Luftblasenbildung (Luftleinleitung durch Pipette) ein Präzipitationskeim erzeugt. Die Präzipitation verläuft über 20 - 30 min bei Raumtemperatur.

Die Transfektionslösung wird aufgetragen und die Zellen für 5 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Die Lösung wird entfernt und die Zellen werden mit Kulturmedium für weitere vier Tage kultiviert.

5.4.2 Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE™6 (Roche)

Lösungen:

- FuGENE™6
- Serumfreies Kulturmedium, 37°C
- Kulturmedium, 37°C
- DNA-Lösung
2 μg Gesamt-DNA-Menge in 10-50 μl Wasser

Material:

- 1,5 ml Reaktionsgefäße

Durchführung:

Alle hier angegebenen Mengenangaben beziehen sich auf eine Transfektion in 6-Loch-Platten. 24 h vor dem Transfektionsbeginn werden $1,06 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 ausgesät und unter Kulturbedingungen inkubiert. Für den Transfektionsansatz werden 100 μl serumfreies Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 4 μl FuGENE™6 Reagenz hinzugegeben und vermischt. Nach der Zugabe der DNA-Lösung wird der Transfektionsansatz für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wird das alte Kulturmedium auf den Zellen entfernt und durch 2 ml neues Kulturmedium ersetzt. Der Transfektionsansatz wird tropfenweise auf die Zellen gegeben, durch Schwenken der Kulturplatte vermischt und bis zur weiteren Verarbeitung unter Kulturbedingungen inkubiert.

5.5 Luziferase- und β -Galaktosidase-Test

Im Luziferase-Test wird ein Reporterplasmid, das das Luziferasegen enthält, transfiziert, um so die Wirkung von Transkriptionsfaktoren zu testen.

Lösungen:

- PBS
- Luziferase-Lysispuffer
1% (v/v) Triton X-100, 25 mM Glycylglycin,
15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT
- Reaktionspuffer
0,1 M Na₃PO₄, pH 8,0, 1 x Galacton, 1 mM MgCl₂
- Amplifier-Lösung
0,2 M NaOH, 10% Emerald Tropix.
- Luziferase-Substrat
20 ml 0,2 M Tricine, 104 mg Mg(CO₃)₄xMg(OH)₂x
5 H₂O, 2 ml 10 mM EDTA pH 8,0, 1 g DTT ad 160 ml,
pH 7,8 + 212 μ l 0,5 M ATP, 40 mg Coenzym A, 26 mg
Luziferin ad 200 ml, sterilfiltrieren

Material:

- MicroLumat LB96P (EG & G Berthold, Bad Wildbad)

Durchführung:

Die Enzymaktivität wird ca. 40 Stunden nach der Transfektion analysiert. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, in 100 μ l Luziferase-Lysepuffer für 10 min auf Eis lysiert und das Lysat zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C). Für die Luziferase-Reaktion werden 10 μ l des Überstandes und für die β -Galaktosidase-Reaktion 3 μ l für den weiteren Test verwendet.

Für die β -Galaktosidase-Reaktion wird der Überstand für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 33 μ l Reaktionspuffer inkubiert und anschließend im Luminometer bei einer OD von 562 nm für 10 s gemessen. Das Luminometer fügt 60 μ l Luziferase-Substrat zu der Luziferase-Reaktion bzw. 60 μ l Amplifier-Lösung zu der β -Galaktosidase-Reaktion hinzu.

Die in beiden Tests erhaltenen Daten werden miteinander verglichen und ggf. nach folgender Formel gegeneinander abgeglichen:

$$\frac{\text{gemessener Luziferasewert}}{\text{gemessener } \beta - \text{Galaktosidasewert}} \cdot 10000 = \text{rel. Luziferasewert (RLU)}$$

5.6 Herstellung von Proteinextrakten

5.6.1 RIPA-Extrakte

Lösungen:

- RIPA-Puffer
120 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0, 1% Triton, 0,5% Desoxycholat, 0,1% SDS
- Phosphatase- und Proteinasecocktail als Zusatz zum RIPA-Puffer
NaP₂O₇ (PAO), 20 µM
O-Vanadat, 250 µM
Aprotinin, 10 µg/ml
Leupeptin, 10 µg/ml
Pefabloc, 5 mM
Pepstatin A, 1 µg/ml
Benzamidin, 100 µM
DTT, 1 µM
- PBS, 4°C

Material:

- Zellschaber
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Tischkühlzentrifuge

Durchführung:

Alle angegebenen Volumina beziehen sich auf eine 9,4 cm Gewebekulturschale. Alle Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C auf Eis.

Das Kulturmedium konfluenten Zellenkulturen wird entfernt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden nach Zugabe von 500 µl RIPA-Puffer inklusive des Phosphatase- und Proteinasecocktails für 15 min auf Eis inkubiert, mit dem Zellschaber vom Kulturschalenboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wird bei 10000 rpm, 4°C für 15 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand zu 50 µl portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgt bis zum weiteren Gebrauch bei – 80°C.

5.6.2 Gesamtzellextrakte (WCE)

Lösungen:

- WCE-Puffer
20 mM HEPES, 400 mM KCl, 20% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl₂
- Phosphatase- und Proteinasecocktail, siehe Kapitel 5.6.1
- PBS, 4°C
- Flüssiger Stickstoff

Material:

- Wasserbad, 37°C
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zellschaber
- Kühlzentrifuge

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, sämtliche Lösungen und Verbrauchsmaterialien werden vor Gebrauch auf 4°C temperiert.

Der Zellrasen wird zweimal mit PBS gewaschen, in 0,25 ml/cm² PBS mit dem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation

der Zellsuspension bei 2500 rpm, 4°C für 5 min, wird das Zellpellet nochmals mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das 5fache Volumen des Pellets an WCE-Puffer hinzugegeben. Durch dreimaliges Frieren und Tauen in flüssigem Stickstoff bzw. im 37°C warmen Wasserbad werden die Zellen aufgeschlossen und anschließend bei 12000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in 10 µl Portionen aliquotiert, im flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80°C gelagert.

5.6.3 Zytoplasma- und Kernextrakte

Lösungen:

- 2 x Hypotonischer Puffer
40 mM HEPES, pH 7,9, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, sterilfiltrieren, 4°C
- 2 x Hochsalzpuffer
840 mM NaCl, 40 mM HEPES pH 7,9, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40% Glycerol, sterilfiltrieren, 4°C
- Phosphatase- und Proteinasecocktail in
1 x Hypotonischem oder Hochsalzpuffer
20 mM NaF
1 mM Na₃VO₄
1 mM Na₄P₂O₇
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
5 mM Pefabloc
1 µg/ml Pepstatin A
0,1 mM Benzamidin
- 10% (v/v) NP40 in Wasser
- PBS, 4°C
- PBS-P, 4°C
1 mM Na₂VO₄, 5 mM NaF

Material:

- Zellschaber
- Tischkühlzentrifuge
- 15 ml Zentrifugenröhrchen
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Drehrad, 4°C

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, sämtliche Lösungen und Verbrauchsmaterialien werden vor Gebrauch auf 4°C temperiert. Alle angegebenen Mengenangaben beziehen sich auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 14,5 cm.

Die Zellen werden zweimal mit je 5 ml PBS, einmal mit PBS-P und einmal mit 2 ml 1 x hypotonischem Puffer gewaschen. In 750 µl 1 x hypotonischem Puffer mit 0,2% (v/v) NP40 werden die Zellen mit dem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei werden gleiche Zelllysate in ein Röhrchen überführt und für 20 sec bei 15000 rpm, 4°C pelletiert. Der Überstand wird in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C als zytoplasmatischer Extrakt gelagert.

Das Zellpellet wird in 50 – 100 µl 1 x Hochsalzpuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf dem Drehrad bei 4°C für 30 min inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 15000 rpm, 4°C für 20 min wird der Überstand als Kernextrakt portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert.

5.7 Proteinchemische Methoden

5.7.1 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Lösungen:

- BSA-Stammlösung, 10 mg/ml in NaP-Puffer
- BioRad-Farbkonzentrat
- Proteinextrakte

Material:

- 96-Loch-ELISA-Platten
- Schüttler
- ELISA-Reader

Durchführung:

In einer ELISA-Platte wird ein BSA-Standard in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 6 µg BSA in 150 µl Wasser vorgelegt. Die Proteinextrakte werden in einer 1:150 Verdünnung in 150 µl Wasser gemessen. Nach der Zugabe von 30 µl BioRad-Farbkonzentrat werden die Proben für 5 min unter Schütteln inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 595 nm. Hierbei wird mit Hilfe der erhaltenen Extinktionsmittelwerte der einzelnen Standardkonzentrationen eine Regressionsgerade ermittelt, anhand derer die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt wird.

5.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Lösungen:

- 30% (w/v) Acrylamid in wässriger Lösung, mit 29% Acrylamid und 1% Bisacrylamid, als gebrauchsfertige Lösung bezogen.
- 4 x Sammelgelpuffer
0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8, 4°C
- 4 x Trenngelpuffer
1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8, 4°C
- 100 g/l APS
Substanz in Wasser lösen und in Portionen zu je 1 ml bei -20°C lagern.
- TEMED
- 10 x Elektrophoresepuffer
1,92 M Glycin
0,248 M Tris
10 g/l SDS
Der 10fach Elektrophoresepuffer wird vor Gebrauch mit Wasser auf 1fach Puffer verdünnt und bei 4°C gelagert.
- 4 x Probenauftragspuffer, reduzierend
- Molmassenmarker, Benchmark™
- PBS

Gelzusammensetzung:

- Trenngel (12% T, 2,7% C)
6,00 ml 30% (w/v) Acrylamid
3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
5,25 ml Wasser
5 min unter Rühren im Vakuum entgasen,
10 µl TEMED
50 µl 100 g/l APS hinzufügen und vermischen.
- Trenngel (10% T, 2,7% C)
5,00 ml 30% (w/v) Acrylamid
3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
6,25 ml Wasser
5 min unter Rühren im Vakuum entgasen,
10 µl TEMED
50 µl 100 g/l APS hinzufügen und vermischen.
- Trenngel (7,5% T, 2,7% C)
3,75 ml 30% (w/v) Acrylamid
3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
7,50 ml Wasser
5 min unter Rühren im Vakuum entgasen,
10 µl TEMED
50 µl 100 g/l APS hinzufügen und vermischen.

- Sammelgel (4,0% T, 2,7% C)
0,65 ml 30% (w/v) Acrylamid
1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer
3,05 ml Wasser
5 min unter Rühren im Vakuum entgasen,
5 µl TEMED
25 µl 100 g/l APS hinzufügen und vermischen.

Material:

- Mini-Protean-II-Elektrophoreseapparatur (BioRad)
- Chromatographiepapier, Stärke = 0,5 mm
- Wasserbad

Durchführung:

Das Ansetzen der Proteinverdünnungen erfolgt mit dem entsprechenden Lysepuffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis. Nach dem Verdünnen der Proben wird eine entsprechende Menge mit $\frac{1}{3}$ ihres Volumens mit Probenauftragspuffer versehen, im Wasserbad bei 95°C für 5 min inkubiert (Maizel, 1969). Maximal 100 µl der Proteinprobe werden jeweils in die Geltaschen pipettiert. 10 µl des Proteinstandards wird in die äußerste Geltasche aufgetragen.

Die SDS-Polyacrylamidgele werden in einer Stärke von 1,5 mm für einen anschließenden Elektrotransfer hergestellt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromdichte von 40 mA/cm², bis das Bromphenolblau 0,5 cm vom unteren Gelende entfernt ist.

5.7.3 Elektrotransfer (Kyhse-Anderson, 1984)**Lösungen:**

- 25 mM Tris in Wasser
- 300 mM Tris in Wasser
- Anodenpuffer I, pH 10,4, 4°C
300 mM Tris + 10% (v/v) Methanol, p. A.
- Anodenpuffer II, pH 10,4, 4°C
25 mM Tris + 10% (v/v) Methanol, p. A.
- Kathodenpuffer, pH 9,4, 4°C
25 mM Tris + 10% (v/v) Methanol, p. A. +
40 mM ε-Aminocapronsäure

Material:

- Nitrocellulosemembran
„Protran BA83“, Porengröße = 0,2 µm
- Chromatographiepapier, Stärke = 0,5 mm
- Glasschalen mit Deckel (Ø 15 cm)
- Elektrotransferapparatur (peqlab)

Durchführung:

Eine Nitrocellulosemembran und neun Chromatographiepapiere werden auf Größe des Trenngeles zugeschnitten. Jeweils drei Chromatographiepapiere werden in Anodenpuffer I, II und Kathodenpuffer getränkt, die Nitrocellulosemembran zunächst in Wasser gleichmäßig benetzt und anschließend in Anodenpuffer II überführt. Der Blot wird folgendermaßen aufgebaut: 3 Chromatographiepapiere mit Anodenpuffer I, 3 Chromatographiepapiere mit Anodenpuffer II, Nitrocellulosemembran, Trenngel, 3 kathodenpuffergetränkte Papiere. Nach Auflegen der Edelstahlkathode erfolgt der Elektrotransfer bei zwei Trenngelen der Mini-Protean-II-Apparatur für 2 h bei einer Stromdichte von 3 mA/cm².

5.7.4 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Die Proteinlösungen werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, durch Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen überführt und bestimmte Antigene spezifisch durch immunchemischen Nachweis detektiert.

Lösungen:

- TBS
10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,9% NaCl
- TBST
TBS + 0,05% (v/v) Tween-20
- Blockierlösung
TBST + 5,0% (w/v) Magermilchpulver
- ECL-Chemilumineszenzsystem
Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1

Material:

- Kippschüttler
- Rollentaumelschüttler
- Kodak-Entwicklermaschine
- Fotokopierfolien
- Glaspetrischale mit Deckel ($\varnothing = 15$ cm)
- Kodak Biomax Röntgenfilm
- Chromatographiepapier, Stärke = 0,5 mm
- Kodak-Fotokassette

Proteine:

- Primärantikörper
- Sekundärantikörper

Durchführung:

Sämtliche Arbeitsschritte des Immunnachweises werden bei Raumtemperatur in Glaspetrischalen auf dem Kippschüttler (Stufe 4) durchgeführt. Einzige Ausnahme ist die Inkubation mit dem 1. Antikörper, die für 16 h in einem 50 ml Röhrchen bei 4°C auf dem Rollentaumelschüttler erfolgt. Die Membranen werden aus der Elektrotransferapparatur entnommen. Nach einer Inkubation von 1 h in Blockierlösung wird zweimal 5 min mit TBST gewaschen, 16 h in Primärantikörperlösung inkubiert und dreimal 10 min in TBST gewaschen. Die Nitrocellulosemembran wird für 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert und in gleicher Weise wiederum gewaschen.

Zur Detektion wird die Membran mit 0,2 ml/cm² ECL-Lösung für 1 min gleichmäßig benetzt, zwischen zwei Lagen Fotokopierfolie eingeschlagen und in die Filmkassette eingelegt. Der belichtete Film wird in der Entwicklermaschine automatisch entwickelt.

5.7.5 Entfernen der gebundenen Antikörper von Blotmembranen mittels β -Mercaptoethanol

Lösungen:

- „Stripping“ Puffer
62,5 mM Tris pH 6,7, 2% SDS,
1,8% β -Mercaptoethanol
- destilliertes Wasser
- TBST

Material:

- Rollentaumelschüttler
- 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Chromatographiepapier, Stärke = 0,5 mm

Durchführung:

Die Blotmembran wird mit 2 ml/cm² „Stripping“ Puffer in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für eine Stunde bei RT auf dem Rollentaumelschüttler inkubiert. Die Membran wird je

dreimal für jeweils 10 min in destilliertem Wasser und TBST gewaschen und kann für einen weiteren immunchemischen Nachweis verwendet werden.

5.7.6 Gel-Retardierungsexperimente (EMSA)

Der DNA-Bindungstest kombiniert mit einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine einfache, schnelle und sensitive Methode, um sequenzspezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen.

Lösungen:

- [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, 10mCi/ml
- T4-Polynukleotidkinase und Puffer
- Bindungspuffer
0,25 x TBE-Puffer, 22,5 mM Tris-Borat, pH 8,0, 0,5 mM EDTA
- 10 x TBE
- 0,25 x TBE-Laufpuffer
- 5% (v/v) Polyacrylamidgel
52 ml Wasser, 1,63 ml 10 x TBE, 3,25 ml 50% Glycerin, 8,13 ml 40% (39:1) Acrylamidlösung, 162,5 μl 30% APS, 37,4 μl TEMED
- Bindungslösung pro Reaktion
10 mM HEPES, pH 7,9, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ poly(dI:dC), 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 4000 cpm/ μl radioaktiv markierte Sonde, ad 10 μl mit Wasser
- Antikörper

- Fixierlösung
10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Methanol
- TE-Puffer
10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Material:

- Elektrophoresekammer V17, Invitrogen
- Heizblock
- Chromatographiepapier, Stärke = 0,5 mm
- MicroSpin G-25 Säulen

A) ATP-Markierung der Sonde

Durchführung:

Zum Zusammenlagern von synthetischen Oligonukleotiden werden gleiche molare Mengen der komplementären Oligonukleotide in 10 μl TE-Puffer auf 70°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die nun zusammengelagerten Oligonukleotide werden bei – 20°C gelagert.

Zur Endmarkierung der doppelsträngigen DNA-Fragmente wird die Polynukleotidkinase verwendet. Hierzu werden folgende Reagenzien auf Eis pipettiert:

- 200 ng Oligonukleotide
- 3 μl 10 x Kinase-Puffer
- 7,5 μl $\gamma^{32}\text{P}$ ATP
- 4 μl T4 Polynukleotidkinase

und mit Wasser auf 30 μl ergänzen. Die Kinasereaktion erfolgt bei 37°C für 1 Stunde, wird durch 1 μl 0,5 M EDTA abgestoppt und 20 μl Wasser werden hinzugegeben.

Zur Abtrennung nicht gebundenen ATPs von der markierten Sonde werden Micro-Spin Säulen nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Reinigung wird die Sondenlösung auf ein Endvolumen von 200 μl mit Wasser eingestellt. Hiervon werden zur

Analyse im Szintillationsanalysierer 1 µl mit 4 ml Szintillationscocktail vermischt und gemessen. Typischerweise werden Werte von 10000 cpm pro 0,05 ng Probe erwartet.

B. Herstellung des nativen 5% (v/v) Polyacrylamidgels

Durchführung:

Eine der beiden Glasplatten wird mit Anti-Haft-Mittel behandelt. Die Polyacrylamid-Gele werden in einer Stärke von 0,8 mm hergestellt. Nach der Polymerisation werden die Geltaschen auf der Glasplatte markiert, der Gelkamm entfernt, das Gel in die Kammer eingebaut und die Geltaschen zweimal mit 0,25 x TBE-Laufpuffer gespült. Bei 100 V erfolgt ein Vorlauf des unbeladenen Gels für 30 – 60 min.

C. Bindungsreaktion

Durchführung:

5-8 µg der Kernextrakte oder WCE-Extrakte werden mit 1 µl 10 x Inkubationspuffer versetzt. Die Spezifität der DNA-Bindung wird durch Zugabe von 100 x molaren Überschusses an nicht markiertem homologen bzw. heterologen Oligonukleotid überprüft (Carthew et al., 1985; Singh et al., 1986). Um die Spezifität der DNA-Protein-Komplexe nachzuweisen, werden die Proteinproben 20 min mit 1 µl spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend dem Bindungsansatz zugegeben (Kristie and Roizman, 1986). Das Envolumen von 10 µl wird durch Zugabe von Wasser erzielt.

Nach Zugabe von 10 µl Bindungslösung pro Reaktion, werden die Proben für weitere 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. In die letzte Geltasche werden 5 µl DNA-Probenpuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol aufgetragen, um den Gelverlauf besser verfolgen zu können.

Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V, solange bis das Bromphenolblau 3/4 des Geles durchlaufen hat (ca. 2,5 –3 h).

5.8 Gentechnische Methoden

5.8.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Lösungen:

- LB-Medium
10 g/l Casein (enzymatisch hydrolysiert), 10 g/l NaCl und 5 g/l Hefeextrakt in Wasser lösen und autoklavieren.
- Lösung 1, 4°C
150 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CoAc,
10 mM CaCl₂, 13% Glycerin, pH5,8, sterilfiltriert
- Lösung 2, 4°C
10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂,
13% Glycerin, pH 7,0, sterilfiltriert

Material:

- Zentrifuge, Beckmann mit JA-10 Rotor

Durchführung:

500 ml der Bakterienkultur werden in LB-Medium bis zu einer OD_{595} von 0,48 - 0,5 angezogen und anschließend bei 4°C für 10 min bei 2200 rpm zentrifugiert. Die Bakterien werden in 17 ml Lösung 1 resuspendiert und für 50 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 10 min, 2200 rpm) wird das Zellpellet in 12,5 ml Lösung 2 resuspendiert und in Portionen zu jeweils 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei – 80°C.

5.8.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Lösungen:

- LB-Medium
10 g/l Casein (enzymatisch hydrolysiert), 10 g/l NaCl und 5 g/l Hefeextrakt in Wasser lösen und autoklavieren.
- LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin
- Plasmid-DNA oder Ligationsansatz

Material:

- Chemokompetente *E. coli*
- Wasserbad, 42°C
- Heizblock mit Schüttler, 37°C
- Inkubator, 37°C

Durchführung:

Chemokompetente *E. coli* werden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension werden mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nacheinander folgen eine Inkubation von 2 min bei 42°C, eine Inkubation von 2 min auf Eis und 60 min Inkubation bei 37°C, 220 rpm in 500 µl LB-Medium. Die Bakterien werden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C kultiviert.

5.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung und Reinigung von Plamid-DNA aus transformierten Bakterien wird der DNA-Maxi-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Durchführung:

Die Isolierung und Reinigung der DNA erfolgt gemäß der Anleitung des Herstellers. Nach alkalischer Lyse der Zellen und RNase A-Behandlung des Lysats wird dieses zunächst mit Natriumacetat neutralisiert und zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird bei geringer Salzkonzentration an eine säulengepackte Silikatmatrix adsorbiert. Auf einen Waschschrift bei mittlerer Salzkonzentration zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen folgt die Elution der DNA, sowie die Präzipitation mit Isopropanol zur Konzentrierung und Entsalzung.

5.8.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung von DNA-Proben unbekannter Konzentration erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Hierbei entspricht 1 OD₂₆₀ = 50 µg DNA / ml Probe und der Gesamtgehalt an DNA errechnet sich wie folgt:

$$\text{Gemessene OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \mu\text{g DNA/ml}$$

Die Proben werden vor einer Messung 1:200 in Wasser verdünnt.

5.8.5 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Lösungen:

- Restriktionsendonukleasen + Puffer
- 10 x DNA-Auftragspuffer
30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxyanol

Durchführung:

Zur Spaltung von Plasmid-DNA werden 5 E/µg DNA des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Zur Vermeidung unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym wird darauf geachtet, dass der Restriktionsansatz maximal 5% Glycerin enthält. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 1 - 3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Reaktion wird durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgt wie unter Kapitel 5.8.7 beschrieben.

5.8.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Lösungen:

- T4-Ligase + Ligasepuffer

Material:

- Wasserbad, 15°C

Durchführung:

Zur Ligation wird Vektor-DNA und DNA-Insert in einem molaren Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Die Ligation erfolgt bei 15°C über Nacht in einem Volumen von 10 µl im vom Hersteller gelieferten Ligasepuffer und einer Weiss-Einheit an T4-Ligase. Die Ligationsansätze werden zur Transformation von chemokompetenten *E. coli*, wie in Kapitel 5.8.1 beschrieben, verwendet.

5.8.7 Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

- 50 x TAE-Laufpuffer pH 8,3
25 mM Tris, 30 mM Eisessig, 25 mM EDTA, pH 8,0
- 0,8 – 2% TAE-gepufferte Agarosegele
+ 0,02% Ethidiumbromid
- 1 kb + DNA-Marker, Invitrogen

Material:

- Vertikale Elektroresekammer
- „Qiaquick“ Gelextraktionskit, Qiagen
- UV-Transiluminator

Durchführung:

DNA-Restriktionsfragmente und PCR-Produkte werden elektrophoretisch je nach DNA-Größe in 0,8 – 2%-igen TAE-gepufferten Agarosegelen aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im Gel mit einer Geschwindigkeit zur Anode, die dem Logarithmus ihres Molekulargewichts umgekehrt proportional ist. Die Elektrophorese erfolgt bei 8 V/cm Gellänge in 1 x TAE-Laufpuffer. Zur Visualisierung der DNA-Produkte wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt, welches in die DNA interkaliert und bei 366 nm auf dem UV-Transiluminator angeregt wird. Die Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt durch Vergleich mit dem 1 kb + Marker.

Zur Elution der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wird der „Qiaquick“ Gelextraktionskit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

5.9 Analyse von Nukleinsäuren

5.9.1 RNA-Präparation

Die Präparation erfolgt mit Hilfe des RNeasy-Kits der Firma Qiagen.

Durchführung:

1×10^6 Zellen des betreffenden Zellsystems werden durch Zentrifugation (10 min bei 1200 rpm) geerntet, dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und in 350 μ l Lyse-Puffer RTL durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Nach Zufügen von jeweils 350 μ l 70% (v/v) Ethanol werden die Proben auf RNeasy Säulen aufgetragen und diese für 15 s bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säulen mit je 700 μ l Waschpuffer RW gewaschen. Zwei weitere Waschschriffe mit je 500 μ l Waschpuffer RPE (Zentrifugation nach 1. Schritt: 15 s bei 10000 rpm, nach 2. Schritt: 2 min bei 12000 rpm) folgen. Die Säulen werden in neue Reaktionsgefäße eingesetzt und die RNA mit 30 μ l Wasser eluiert.

5.9.2 Rnase-Protection-Test (RPA)

Zur Durchführung des RNase-protection-Tests wird das RiboQuant™ System der Firma PharMingen verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgen anhand der Angaben des Herstellers. Zur Auftrennung der geschützten Proben wird das QuickPoint™ Rapid Nucleic Acid Separation System von Novex verwendet.

A) Herstellung der Probe

Durchführung:

[α -³²P]UTP, GACU Nukleotidpool, DTT, 5 x Transkriptionspuffer und RPA Template Kit aus dem *In Vitro* Transcription Kit werden auf Raumtemperatur angewärmt. Für jede Reaktion werden folgende Komponenten in einem Ansatz pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert

1 μ l RNasin
1 μ l GACU Pool
2 μ l DTT
4 μ l 5 x Transkriptionspuffer
1 μ l RPA template Set
10 μ l [α -³²P]UTP
1 μ l T7 RNA Polymerase

Durch Zugabe von 2 μ l DNase für 30 min bei 37°C wird die Reaktion beendet. Die Aufreinigung der Probe erfolgt durch Zugabe von:

26 μ l 20 mM EDTA
25 μ l Tris-gesättigtes Phenol
25 μ l Chloroform:Isoamylalkohol
2 μ l Hefe-tRNA

Nachdem die Lösung vermischt und für 5 min zentrifugiert wird, wird die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 50 μ l Chloroform:Isoamylalkohol gewaschen, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der Probe erfolgt durch Zugabe von 50 μ l 4 M Ammoniumacetat und 250 ml Ethanol (-20°C) für 30 min bei -70°C. Nach 15 min Zentrifugation bei 4°C wird der Überstand verworfen und das Pellet nochmals mit 100 μ l 90% Ethanol (-20°C) gewaschen und anschließend für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird für 10 min an der Luft getrocknet, bevor es in 50 ml Hybridisationspuffer resuspendiert wird und bei -20°C gelagert werden kann.

B) RNA Präparation und Hybridisierung

Durchführung:

10 μ g der RNA, 10 μ g von Hefe-tRNA als Hintergrundkontrolle und 2 μ g der PharMingen Kontroll-RNA werden wie unter A) beschrieben präzipitiert und in 8 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die RNA-Probe wird auf 1×10^5 cpm/ μ l eingestellt

und jeweils 2 µl der Probe zu jedem Ansatz hinzupipettiert. Die Hybridisierung findet über Nacht im Thermocycler mit folgendem Temperaturschema statt. Der Thermocycler wird auf 90°C geheizt und nachdem die Proben hineingestellt wurden, wird die Temperatur auf 56°C langsam abgekühlt. Nach 12 – 16 h bei 56°C werden die Proben nochmals 15 min bei 37°C inkubiert, bevor der RNase-Verdau stattfindet.

C) RNase Verdau

Durchführung:

Für 20 Proben wird folgender RNase Cocktail pipettiert:

2,5 ml RNase Puffer

6 µl RNase A + T1 Mix

Die RNA-Proben werden aus dem Thermocycler entnommen, 100 µl des Cocktails hinzupipettiert und für 45 min bei 30°C inkubiert. Bevor der RNase-Verdau beendet ist, wird der Proteinase K-Cocktail vorbereitet:

390 µl Proteinase K Puffer

30 µl Proteinase K

30 µl Hefe-tRNA

18 µl des Cocktails werden zu dem RNase Verdauansatz hinzugegeben und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der Probe erfolgt mit 65 µl Tris-Phenol und 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 120 µl 4M Ammoniumacetat und 650 µl Ethanol (-20°C) präzipitiert. Nach nochmaligem Waschen mit 100 µl 90% Ethanol wird das Pellet an der Luft getrocknet und in 2 µl QuickPoint Ladepuffer aufgenommen

D) Gellauf

Durchführung:

Der Gellauf erfolgt anhand der Angaben des Herstellers.

5.9.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Bedingungen sind abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments, der Länge der verwendeten Primer und deren Homologie zur verwendeten Matritzen-DNA.

Lösungen:

- 10 x PCR-Puffer
- Taq-Polymerase
- MgCl₂, 50 mM
- dNTP-Lösung, 10 mM

PCR-Standardansatz:

- 1 x PCR Puffer
- 0,2 mM dNTP
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,5 µM Strang-Primer
- 0,5 µM Antistrang-Primer
- 2,5 E Taq-Polymerase
- 200 ng Matritzen-DNA

Material:

- Thermocycler, Biometra
- 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße

Durchführung:

Der PCR-Standardansatz wird in einem Endvolumen von 50 µl auf Eis pipettiert. Die Amplifikation des PCR-Produktes erfolgt in drei Schritten unter folgenden Bedingungen:

Initiationsschritt:	3 min bei 94°C
1. Schritt:	45 s bei 94°C (Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs)
2. Schritt:	30 s bei X°C (Primerbindung)
3. Schritt:	1 min bei 72°C (Elongation)

Die Zahl der Amplifikationszyklen wird so gewählt, dass gerade ein Produkt entsteht. Sie ist abhängig von der gewählten Primerpaarung (siehe Kapitel 4.9.2).

Nach einem Elongationsschritt für 10 min werden die Ansätze bei 4°C gekühlt.

Die Temperatur für die Primerbindung richtet sich nach deren Schmelztemperatur und wird ca. 5°C niedriger gewählt. Nähere Angaben dazu sind in Kapitel 4.9.2.

5.9.4 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Die RT-PCR wird in einem Zweischritt-Ansatz durchgeführt. Zunächst wird nach der Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe des Omniscript™ Reverse Transcriptase Kits der Firma Qiagen ein Umschreiben der RNA in ein doppelsträngiges RNA-DNA-Hybrid vorgenommen. Der DNA-Einzelstrang dient dann als Vorlage für die eigentliche Polymerasekettenreaktion mit spezifischen Primerpaaren.

1 – 5 µl dieses RT-Ansatzes werden in die spezifische PCR Reaktion eingesetzt (siehe Kapitel 5.9.3).

5.9.5 Quantitativer Expressionsnachweis mit Hilfe der Echt-Zeit-PCR

Lösungen:

- Standard-PCR-Ansatz, 50 µl Gesamtvolumen
- SYBR green II,
Stammlösung 1:10000 in DMSO
- 10 x „well factor“ Lösung

Material:

- i-Cycler, BioRad
- spezielle 96-Loch-PCR-Platten, BioRad

Durchführung:

Sämtliche Pipettierschritte werden auf Eis ausgeführt. Um eventuelle Pipettierschwankungen ausschließen zu können, werden zum einen immer Triplikate eines Ansatzes pipettiert, zum anderen Mastermixe verwendet.

Die SYBR green Stammlösung wird vor Gebrauch 1:1000 in Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Eine 96-Loch-PCR-Platte wird mit je 50 µl einer 1 x „well factor“ Lösung in Wasser als Kalibrierungsplatte versehen.

1 – 5 µl des RT-Ansatzes aus Kapitel 5.9.4 werden in dem PCR-Standardansatz, der zusätzlich 5 µl der 1:1000 SYBR green Lösung enthält, pipettiert und auf die PCR-Platte aufgetragen.

Bevor der eigentliche PCR-Lauf durchgeführt wird, muss das Gerät mit der „well factor“ Platte kalibriert werden. Die PCR Bedingungen sind analog den Standard-PCR Bedingungen aus Kapitel 5.9.3. Die Zyklenzahl erhöht sich generell auf 40 Zyklen. Am Ende des PCR-Laufs wird ein Schmelzkurven-Diagramm erstellt, um eventuelle unspezifische Banden oder Primerdimere identifizieren zu können.

5.9.5.1 Auswertung der Echt-Zeit-PCR

Die erhaltenen Daten der Echt-Zeit-PCR werden mit Hilfe der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierfür wird der erhaltene C_T -Wert des regulierten Genes (GOI) mit dem C_T Wert eines unregulierten Genes (HKG) (z.B. GAPDH) nach folgender Formel berechnet, um die relative Expressionsregulation zu erhalten:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(\Delta C_T - C_{\Delta C_T})}$$

ΔC_T : Differenz der C_T Werte von reguliertem Gen (GOI) zu unreguliertem Gen (HKG). $(GOI C_T) - (HKG C_T)$

$S\Delta C_T - C_{\Delta C_T}$: Differenz zwischen den regulierten Proben ΔC_T ($S\Delta C_T$) und der Kontrolle ΔC_T ($C_{\Delta C_T}$)

5.10 Transplantation von Stat5A 1*6 transduzierten HC11 Zellen *in vivo* (Humphreys and Rosen, 1997)

Durchführung:

HC11 Zellen, transduziert mit Stat5A 1*6 oder EGFP werden nach Trypsinbehandlung in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/10 µl in PBS aufgenommen und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Endogenes Brustepithelium wird nach der Methode von DeOme *et al.*, 1958, entfernt und die HC11 Zellen in das gereinigte Fettgewebe von 3 Wochen alten BALB/c- Mäusen implantiert. Die Transplantate werden nach 3 Monaten entfernt und mit immunhistochemischen Methoden analysiert.

5.10.1 Immunhistochemie

Alle Immunhistochemischen Färbungen werden in der Tierversuchsanstalt der Uniklinik Frankfurt am Main nach der Methode von Miyoshi *et al.*, 2001, durchgeführt. Die Antikörperkonzentrationen sind in Kapitel 4.5 angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung verschiedener Brustepithelzelllinien

Intensive Forschungen der letzten Jahre konnten verdeutlichen, dass Stat-Proteine nicht nur bei der Brustentwicklung eine große Rolle spielen, sondern auch in soliden Tumoren verstärkt mutiert vorliegen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vor allem Brusttumore verstärkt Prolaktin sekretieren, was zu einer konstitutiven Aktivierung von Stat-Proteinen führen kann. In diesem Zusammenhang spielen die Stat-Familienmitglieder Stat1, Stat3 und Stat5 eine besondere Rolle. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwieweit Stat5 an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung von Brustepithelzellen beteiligt ist. Die Untersuchungen werden hierbei an verschiedenen malignen und nicht malignen Brustepithelzelllinien mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Stat5-Mutante durchgeführt.

6.1.1 Nachweis prolaktinaktivierbarer Stats

Durch Prolaktin werden vor allem Stat5A, Stat5B, Stat3 und Stat1 aktiviert (Goffin *et al.*, 1998, Jabbour *et al.*, 1998). Zum Nachweis dieser Stat-Proteine, werden von verschiedenen Brusttumorzelllinien sowie zwei nicht Tumorzelllinien (HC11 und MCF10A) Gesamtzellextrakte hergestellt und in der SDS-Gelelektrophorese und anschließend Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die erhaltenen Immunfärbungen der Stat-Proteine sind in Abbildung 6.1-1 dargestellt. In den Spuren (1) und (8) sind jeweils die nichtmalignen Brustepithelzelllinien aufgetragen, in den Spuren (2)–(7) die Tumorzelllinien.

Alle vier Stat-Proteine können unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Stat5B, Stat3 und Stat1, die in allen Zelllinien endogen nachweisbar sind, wird Stat5A nur in HC11, MDAMB 231 und T47D detektiert. In dieser Reihenfolge der genannten Zelllinien nimmt auch die Menge an detektierbarem Stat5A ab.

Stat5B hingegen ist in allen betrachteten Zelllinien nachweisbar und in vergleichbaren Mengen vorhanden.

Stat3 läuft unter reduzierenden Bedingungen immer etwas unterhalb seines Molekulargewichts von 92 kDa. Es wird in allen Zelllinien exprimiert, verstärkt jedoch in T47D und SKBR3 Zellen [Spuren (6) und (7)]. Bei der Proteinbande unterhalb der Stat3-Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um die β -Form des Stat3-Proteins, einer endogenen Mutante, welcher ein Teil der Transaktivierungsdomäne fehlt. Sie wird jedoch in allen Zelllinien schwächer als der Wildtyp exprimiert.

Stat1-Protein ist in allen Zelllinien in vergleichbaren Mengen vorhanden.

Stat5A scheint eine besondere Rolle einzunehmen, da es als einziges Protein in unterschiedlichen Mengen in den verschiedenen Zelllinien vorhanden ist.

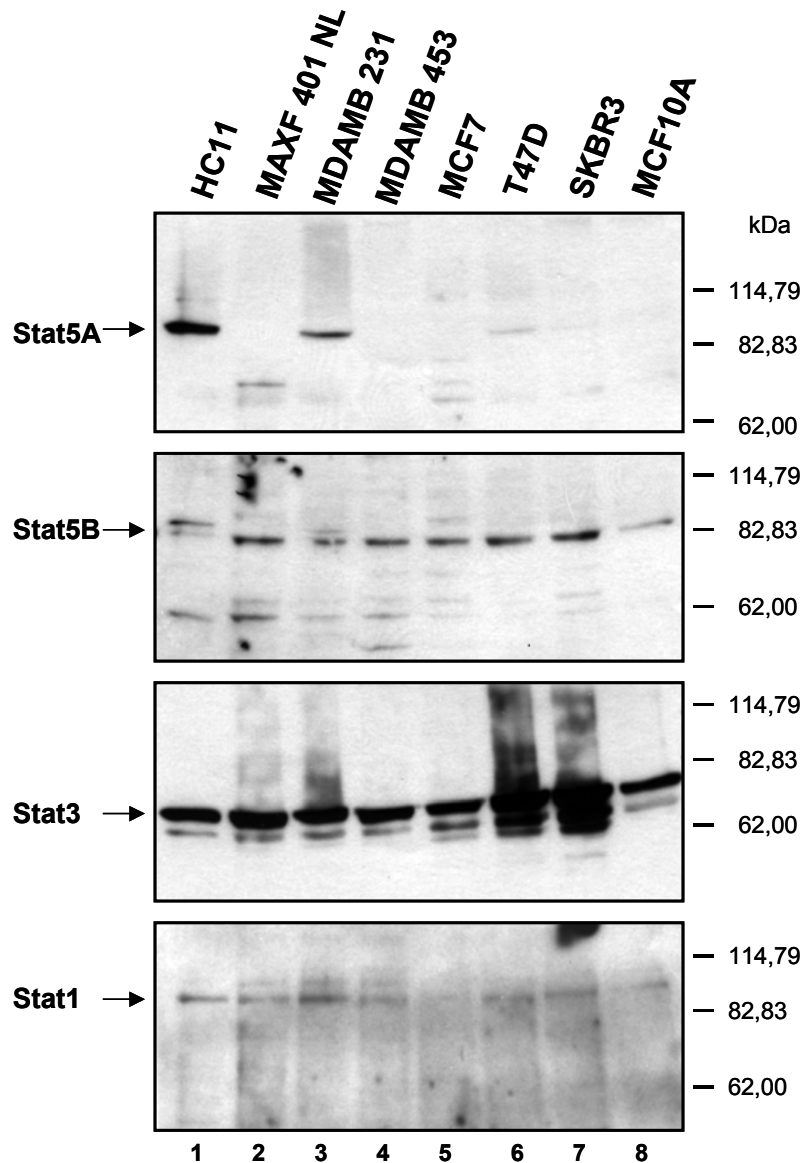


Abbildung 6.1-1: Nachweis von endogenem Stat5A, Stat5B, Stat3 und Stat1 durch Western Blot Analyse in verschiedenen Brustepithelzelllinien. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 100 µg je Spur des 10% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) und (8) nicht transformierte Brustepithelzellen; (2) bis (7) Brusttumorzelllinien [Der Pfeil markiert jeweils die spezifische Stat-Bande].

An vier Zelllinien, zwei nicht maligne Brustepithelzelllinien (MCF10A, HC11) und zwei Tumorzelllinien (MCF7, SKBR3), wird die DNA-Bindung von Stat1-, 3- und 5-Proteinen in Gelretardierungsexperimenten untersucht. Hierzu werden die Eigenschaften der Stat-Proteine untersucht, an spezifische Promotorsequenzen, sogenannte DNA-RE (*response elements*), mit oder ohne vorherigen Stimulus, zu binden. Es werden jeweils ein Stat5 spezifisches RE aus dem β -Kaseinpromotor (Abbildung 6.1-2), ein Stat3-RE aus dem c-fos-Promotor (Abbildung 6.1-3) und ein Stat1-RE aus dem GBP-Promotor

(Abbildung 6.1-4) radioaktiv mit γ -³²P ATP markiert. Die Spezifität des Protein-DNA Komplexes wird durch Zugabe von 100-fachem Überschuss des nicht markierten Oligomers kompetitiv verdrängt und durch Zugabe von 100-fache molarer Menge von unspezifischem Oligomer überprüft. Die Identität des Protein-DNA-Komplexes wird durch Antikörper gegen die verschiedenen Stat-Proteine bestimmt.

Alle vier Zelllinien besitzen kein konstitutiv aktives Stat5 (Abbildung 6.1-2). SKBR3 und MCF7 Zellen besitzen durch Prolaktin aktivierbares Stat5B, was die Versuche mit spezifischen Antikörpern zeigen. Durch Zugabe von unmarkiertem β -Kasein-Oligomer lässt sich der Protein-DNA-Komplex verdrängen, wohingegen dieser bei Zugabe von unspezifischem Oligomer erhalten bleibt. Die Menge an aktivierbarem Stat5B ist jedoch in SKBR3 höher als in MCF7. Die nicht transformierten HC11 Zellen besitzen Stat5A und Stat5B, welches sich durch Prolaktin aktivieren lässt. In MCF10A Zellen ist keine durch Prolaktin aktivierbare Stat5-Aktivität zu detektieren.

Stat3 hingegen ist sowohl in SKBR3 als auch in HC11 Zellen konstitutiv aktiv (Abbildung 6.1-3). Die Menge an aktiviertem Stat3 ist in HC11 Zellen deutlich höher als in SKBR3 Zellen. MCF7 und MCF10A Zellen zeigen kein durch Prolaktin aktivierbares Stat3. Die endogenen Mengen an Stat3 sind jedoch vergleichbar in den vier Zelllinien, wie die Western Blot Analyse in Abbildung 6.1-1 zeigt.

Stat1 liegt im Gegensatz zu Stat5 und Stat3 in allen vier getesteten Zelllinien konstitutiv aktiv vor (Abbildung 6.1-4). Durch Zugabe von unmarkiertem GBP-Oligomer lässt sich der Protein-DNA-Komplex verdrängen. Bei Zugabe von unspezifischem Oligomer bleibt er erhalten. Stat1 kann nicht in dem Komplex nachgewiesen werden, da der verwendete Stat1-Antikörper das native Protein nicht erkennt. Die Spezifität des Komplexes wird aber durch Competition mit dem GBP-Bindungselement überprüft.

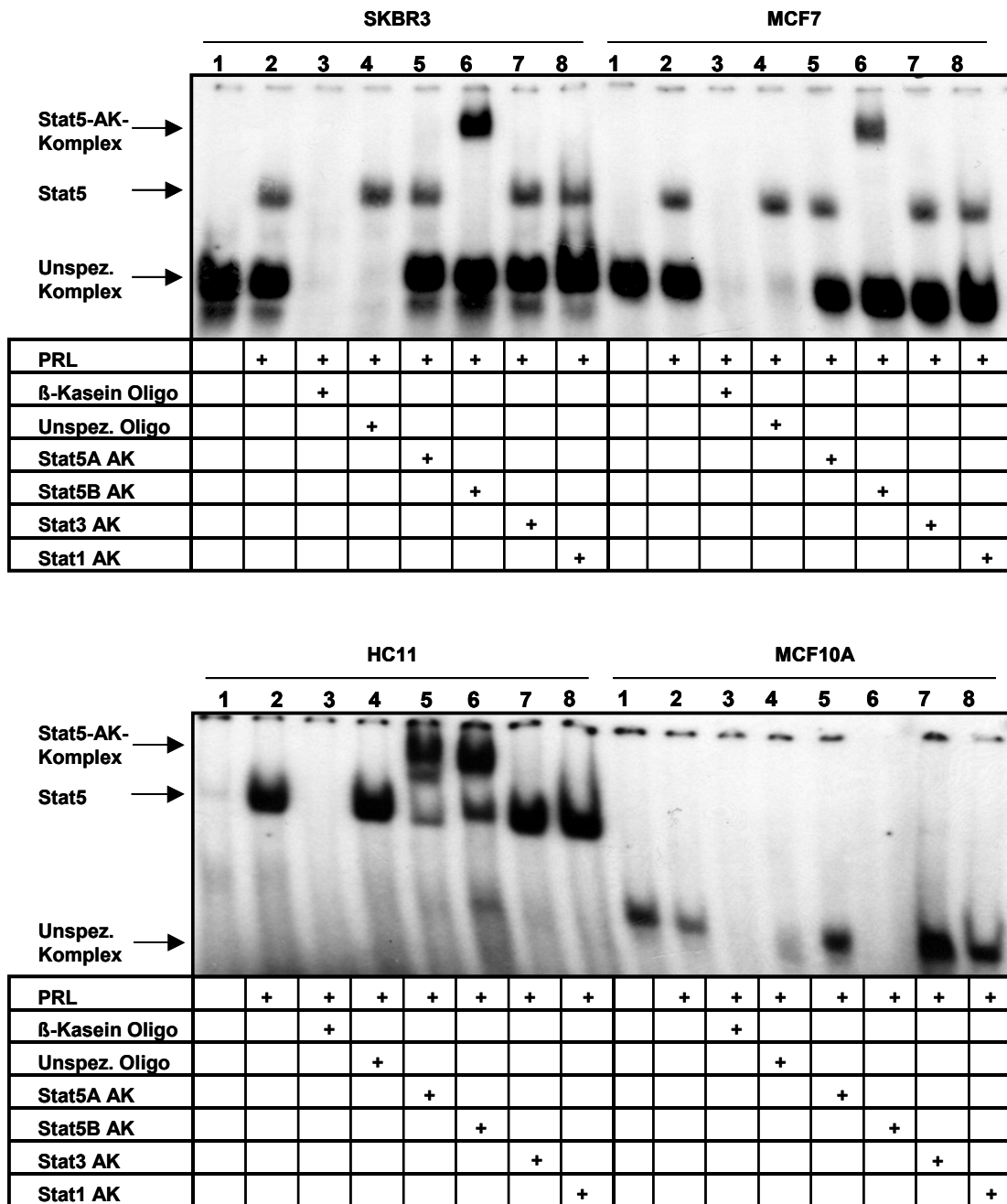


Abbildung 6.1-2: Nachweis der Stat5-DNA-Bindung in SKBR3, MCF7, HC11 und MCF10A Zellen durch Gelretardierungsuntersuchung. Der aufgetragene Kernextrakt beträgt 8 μ g je Spur des nativen 4% TBE-Polyacrylamidgels. Die Gelretardierungsexperimente werden mit γ - 32 P markiertem Stat5-Bindungselement des β -Kaseinpromotors durchgeführt und die Identität der Proteine im Komplex werden mit spezifischen Antikörpern überprüft. In den einzelnen Spuren sind folgende Proteinlösungen aufgetragen: (1) Kernextrakte ohne Prolaktinstimulation; (2) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin, (3) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem β -Kasein Oligo; (4) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem unspezifischem Oligo; (5) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin mit Stat5-Antikörper vorinkubiert; (6) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin mit Stat3-Antikörper vorinkubiert und (7) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 μ g/ml Prolaktin mit Stat1-Antikörper vorinkubiert.

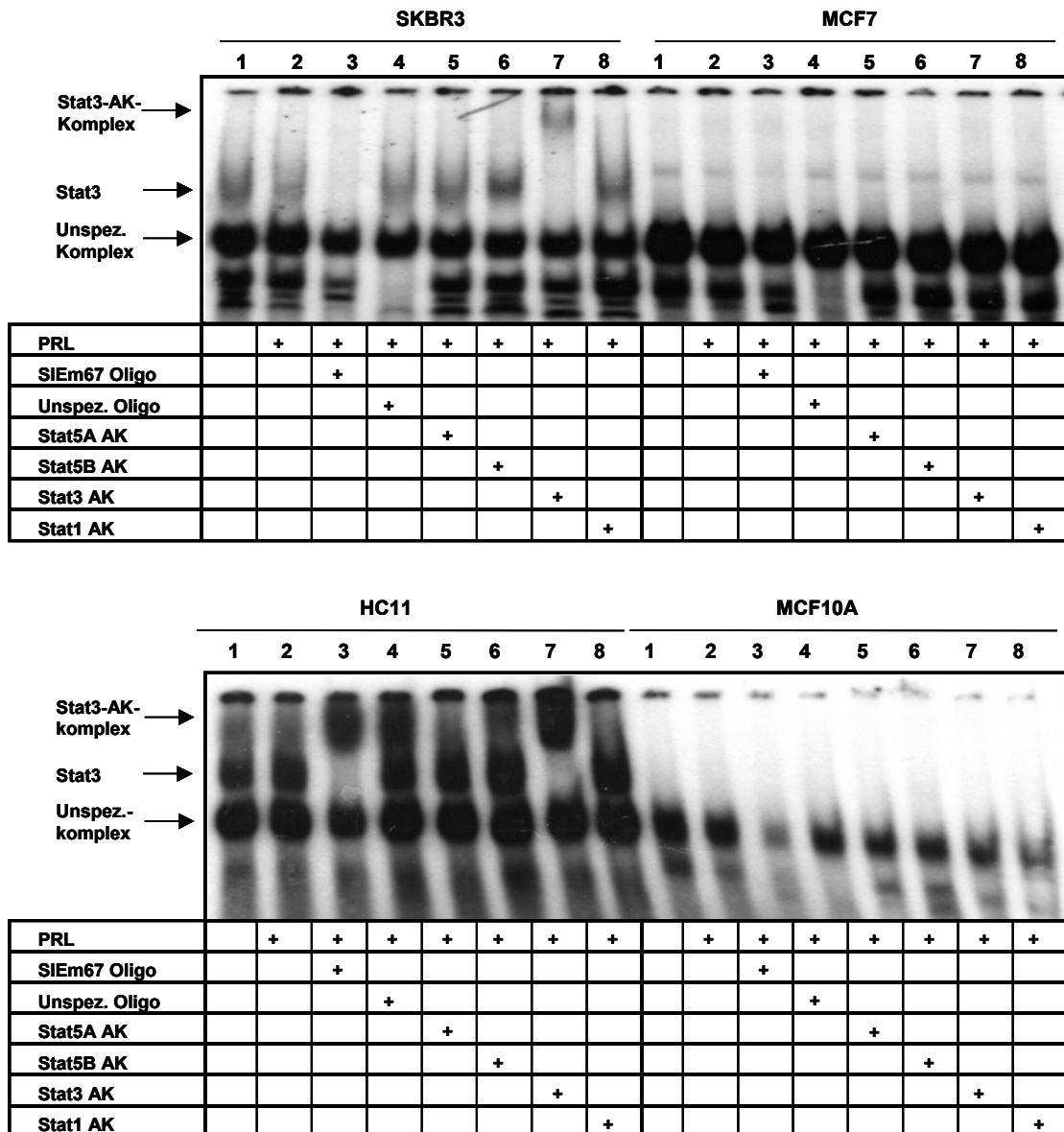


Abbildung 6.1-3: Nachweis der Stat3-DNA-Bindung in SKBR3, MCF7, HC11 und MCF10A Zellen durch Gelretardierungsuntersuchung. Der aufgetragene Kernextrakt beträgt 8 µg je Spur des nativen 4% TBE-Polyacrylamidgels. Die Gelretardierungsexperimente werden mit γ -³²P markiertem Stat3-Bindungsselement des c-fos-Promotors durchgeführt und die Identität der Proteine im Komplex werden mit spezifischen Antikörpern überprüft. In den einzelnen Spuren sind folgende Proteinlösungen aufgetragen: (1) Kernextrakte ohne Prolaktinstimulation; (2) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg Prolaktin /ml, (3) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem c-fos Oligo; (4) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem unspezifischen Oligo; (5) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat5-Antikörper vorinkubiert; (6) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat3-Antikörper vorinkubiert und (7) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat1-Antikörper vorinkubiert.

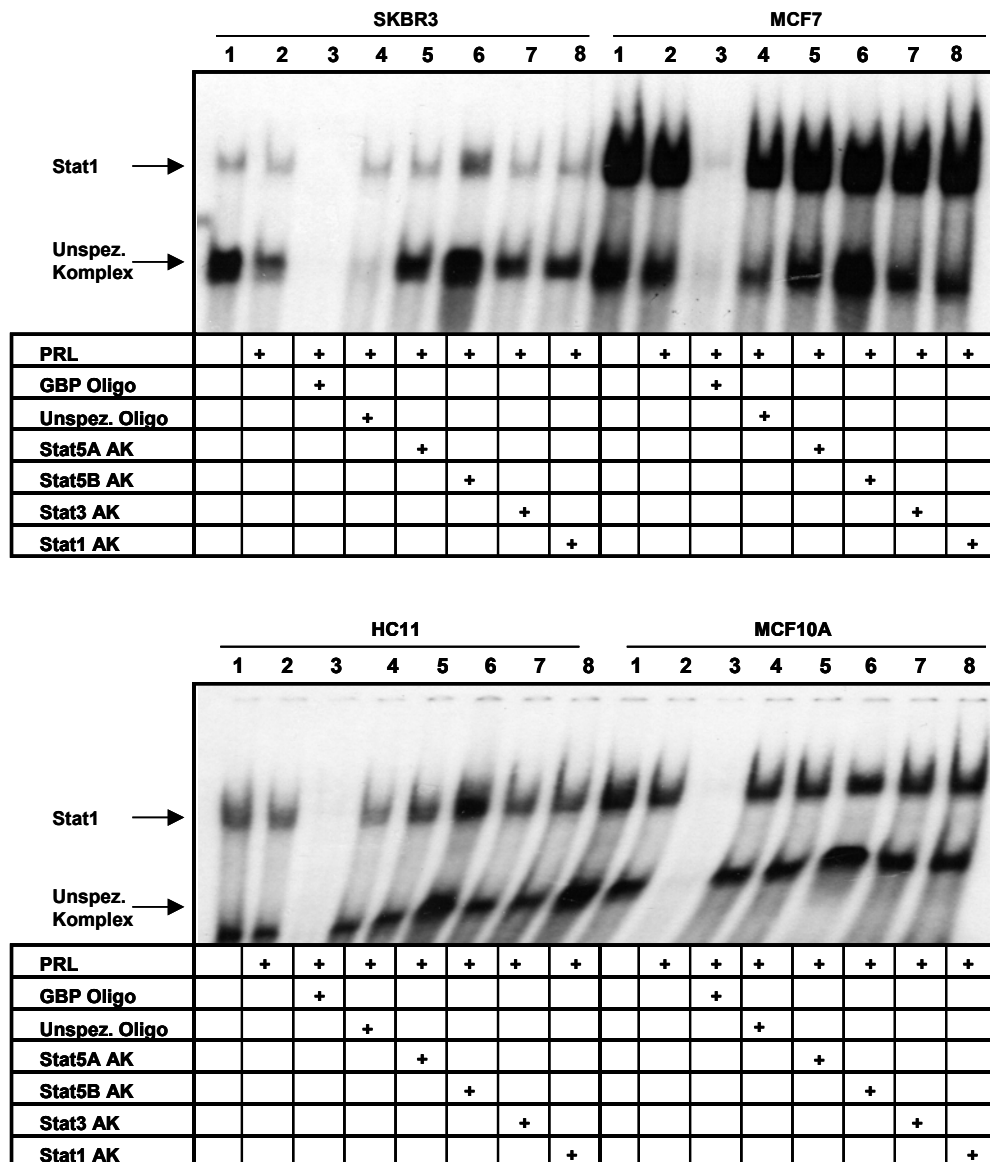


Abbildung 6.1-4: Nachweis der Stat1-DNA-Bindung in SKBR3, MCF7, HC11 und MCF10A Zellen durch Gelretardierungsuntersuchung. Der aufgetragene Kernextrakt beträgt 8 µg je Spur des nativen 4% TBE-Polyacrylamidgels. Die Gelretardierungsexperimente werden mit γ -³²P markiertem Stat1-Bindungsselement des GBP-Promotors durchgeführt und die Identität der Proteine im Komplex werden mit spezifischen Antikörpern überprüft. In den einzelnen Spuren sind folgende Proteinlösungen aufgetragen: (1) Kernextrakte ohne Prolaktinstimulation; (2) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin, (3) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem β -Kasein Oligo; (4) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin +100fachen Überschusses an unmarkiertem unspezifischen Oligo; (5) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat5-Antikörper vorinkubiert; (6) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat3-Antikörper vorinkubiert und (7) Kernextrakte nach 10 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat1-Antikörper vorinkubiert.

Die Western Blot Analyse und die Gelretardierungsexperimente zeigen, dass die Ausstattung mit Stat-Proteinen und deren Aktivierungsstatus von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich ist. Nicht alle Tumorzelllinien zeigen das gleiche Stat-Aktivierungsmuster und auch die nicht transformierten Zelllinien HC11 und MCF10A besitzen unterschiedliche Ausstattungen von Stat-Proteinen. Nur Stat5 ist als einziges Stat-Protein in diesen Zelllinien durch Prolaktin aktivierbar. Weder Stat1 noch Stat3

lassen sich durch Prolaktin aktivieren, da sie entweder schon aktiviert in der Zelle vorliegen, oder aber nicht auf Prolaktinstimulation reagieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Prolaktin und Stat5 auf die Proliferation an den charakterisierten Zelllinien durchgeführt.

6.2 Einfluss von Prolaktin auf die Proliferationsrate von Brustepithelzellen

Das und Vonderhaar konnten 1997 bereits für MCF7 Zellen zeigen, dass eine Konzentration von 100 ng/ml Prolaktin die Proliferation der Zellen anregt. Um zu überprüfen, ob Prolaktin auch in den hier verwendeten Brustepithelzellen MCF7, SKBR3 und MCF10A die Proliferation beeinflusst, werden die Zellen am Tag 1 und am Tag 4 nach Stimulation mit Prolaktin gezählt. Verglichen werden hierbei Zellen, welche mit 100 ng/ml Prolaktin über 4 Tage stimuliert werden, mit unstimulierten Zellen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.2-1 dargestellt.

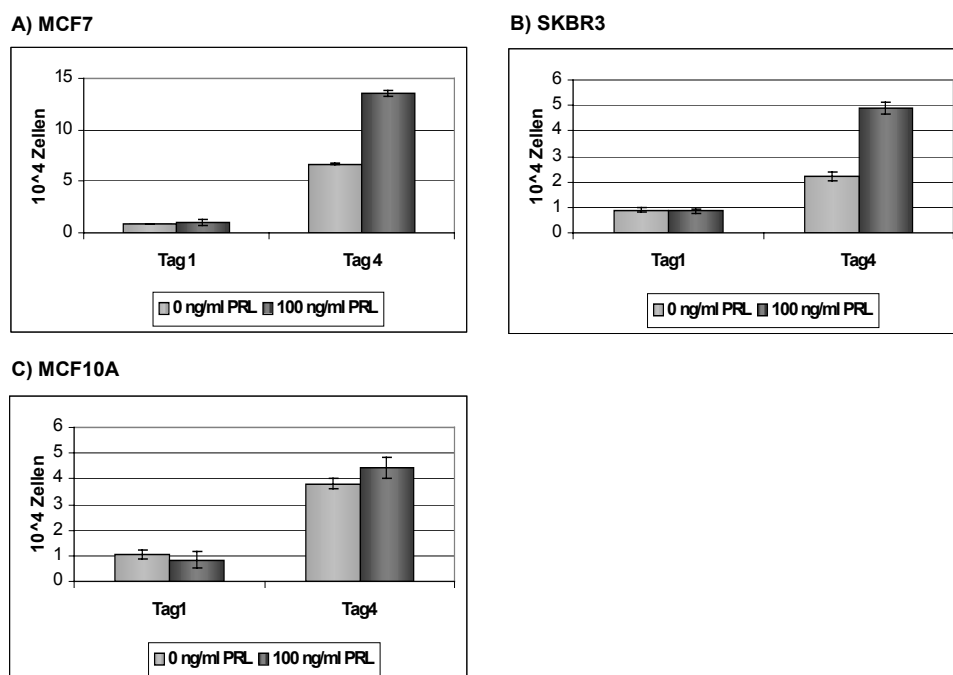


Abbildung 6.2-1: Einfluss von Prolaktin auf das Wachstum von MCF7, SKBR3 und MCF10A Zellen. 45×10^3 Zellen werden in phenolrotfreiem RPMI Medium (MCF7) oder DMEM Medium (SKBR3) mit 5% CSS oder in MEGM Komplettmedium (MCF10A) ausgesät und mit 100 ng/ml Prolaktin stimuliert. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Die Zellen werden an den Tagen 1 und 4 nach Prolaktinstimulation geerntet und die Zellzahl im COULTER COUNTER bestimmt.

Wie in Abbildung 6.2-1 (A) deutlich zu erkennen ist, lassen sich die Ergebnisse von Das und Vonderhaar bestätigen.

Um zu untersuchen, inwieweit die prolaktininduzierte Stimulation der Zellproliferation von der endogenen Stat5-Konzentration abhängt, werden SKBR3 Zellen verwendet,

die eine erhöhte Konzentration von Stat5 im Vergleich zu MCF7 Zellen zeigen. Auch hier ist eine deutliche Zunahme der Zellzahl um das 1,5-fache, ähnlich wie bei den MCF7 Zellen mit Prolaktinstimulation zu verzeichnen (Abbildung 6.2-1 (B)).

Für die Untersuchung, ob Prolaktin auch in nicht transformierten Zellen (MCF10A) als Mitogen wirkt, werden - wie bereits beschrieben - Zellen ausgesät, stimuliert und die Zellzahl bestimmt (Abbildung 6.2-1 (C)).

Es zeigt sich, dass Prolaktin auf das Zellwachstum nicht transformierter humaner Brustepithelzellen keinen Einfluss hat. Unter stimulierten und unstimulierten Bedingungen werden vergleichbare Zellzahlen erhalten. Jedoch ist in den MCF10A Zellen, wie die Gelretardierungsuntersuchungen zeigen, keine Aktivierung von Stat5 in diesen Zellen nachweisbar. Des Weiteren ist zu klären, ob der Prolaktinrezeptorsignalweg in diesen Zellen gestört ist. Es scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen der Stat5-Aktivierung durch Prolaktin und einer Erhöhung der Proliferationsrate zu bestehen.

Wie in Abbildung 6.2-1 verdeutlicht, erhöht Prolaktin die Proliferationsrate von Tumorzellen. Es ist somit von besonderem Interesse, welche Gene hierfür verantwortlich sind. Ein potentiell Zielgen für eine erhöhte Zellteilungsrate ist Cyclin D1. Es spielt bei der Regulation des Zellzyklusses eine wesentliche Rolle, indem es den Eintritt der Zellen von der G₁- (Ruhephase) in die S-Phase (Synthesephase) reguliert.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Proliferation auf eine prolaktininduzierte Steigerung der Cyclin D1-Expression zurückzuführen ist, werden subkonfluente MCF10A, MCF7 und SKBR3 Zellen für 48 h mit 1 µM Tamoxifen in phenolrot- und hormonfreiem Medium kultiviert. Tamoxifen inhibiert den Östrogenrezeptor, der Cyclin D1 aktiviert (Sutherland *et al.*, 1993). Durch Zugabe von 5 µg/ml Prolaktin werden die Zellen stimuliert und die Gesamt-RNA isoliert. Um den Effekt von Östrogen zu überprüfen, werden MCF7 Zellen ebenfalls für eine Stunde mit 10⁻⁸ M Östrogen behandelt. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA, wird eine PCR mit spezifischen Cyclin D1 Primern durchgeführt und das PCR-Produkt, wie in Abbildung 6.2-2 ersichtlich, im 2% Agarosegel analysiert. Als Referenz für die semiquantitative Analyse dient die Menge an GAPDH in den einzelnen Versuchsansätzen.

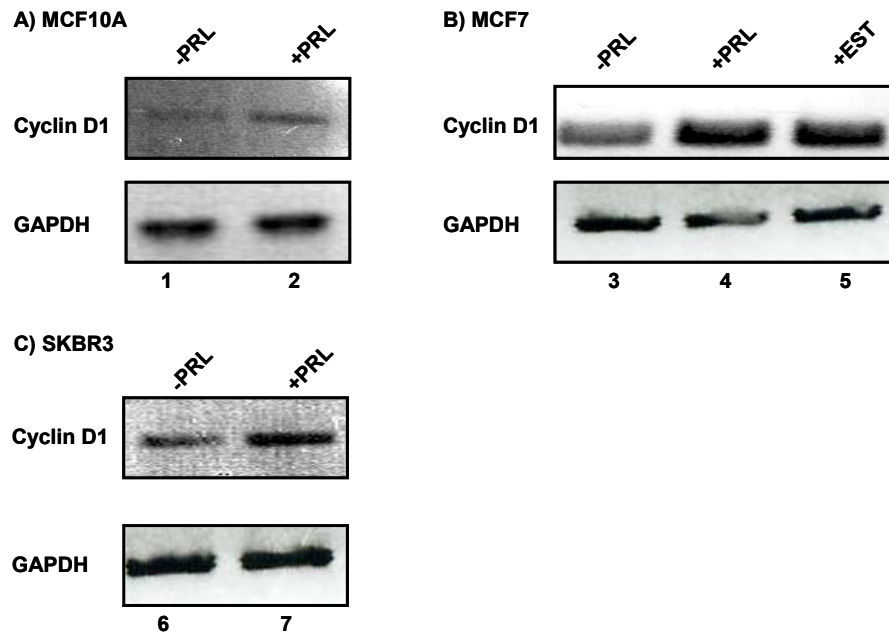


Abbildung 6.2-2: Nachweis des Zellzyklusregulators Cyclin D1. MCF10A, MCF7 und SKBR3 Zellen werden in phenolrotfreiem Kulturmedium und 5% CSS mit 1 μ M Tamoxifen für 48 h kultiviert. Nach Stimulation für 1 h mit 5 μ g/ml Prolaktin werden die Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert. 2 μ g der RNA werden für die Reverse Transkriptase Reaktion verwendet. Pro PCR-Ansatz werden im Falle des Cyclin D1 200 ng der cDNA bzw. 100 ng cDNA des GAPDH-Nachweises verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert.

Durch Zugabe von Östrogen wird die Cyclin D1 RNA-Menge in MCF7 Zellen wie erwartet erhöht. Die Stimulation mit Prolaktin induziert ebenfalls die Expression von Cyclin D1 (Abbildung 6.2-2 (B)). Diese Induktion ist in MCF7 im Vergleich zu SKBR3 Zellen stärker ausgeprägt. In SKBR3 Zellen ist nur eine leichte Induktion von Cyclin D1 feststellbar (Abbildung 6.2-2 (C)). In MCF10A Zellen, die keine verstärkte Proliferation durch Prolaktin zeigen, ist nur eine leichte Erhöhung von Cyclin D1 zu beobachten (Abbildung 6.2-2 (A)). Die Erhöhung der Proliferationsrate durch Prolaktin korreliert mit der Induktion von Cyclin D1. Cyclin D1 scheint daher an der Steigerung der Proliferation durch Prolaktin beteiligt zu sein. Inwieweit die Proliferationserhöhung durch Stat5 vermittelt wird, soll in den anschließenden Kapiteln mit Hilfe von dominant negativen Mutanten analysiert werden.

6.2.1 Dominant negative Mutanten zur Untersuchung der Funktion von Stat5 in der prolaktininduzierten Proliferation

Um die Funktion von Stat5 in der Proliferationserhöhung zu untersuchen, werden sogenannte dominant negative Stat5-Proteine verwendet. Auf diese Weise wird das endogene Stat gehemmt. Zwei Mutanten stehen für die Hemmung zur Verfügung. Wie in Abbildung 6.2-3 (B) schematisch dargestellt, ist bei der Stat5A Δ 750-Mutante die Transaktivierungsdomäne deletiert, so dass diese Mutante DNA binden, jedoch die

Transkription nicht mehr aktivieren kann. Bei der zweiten Mutante ist das Tyrosin 705, welches für die Dimerisierung zweier Stat-Proteine verantwortlich ist, zu Phenylalanin mutiert (Abbildung 6.2-3 (C)). Diese Mutante blockiert die Rezeptorbindungsstellen.

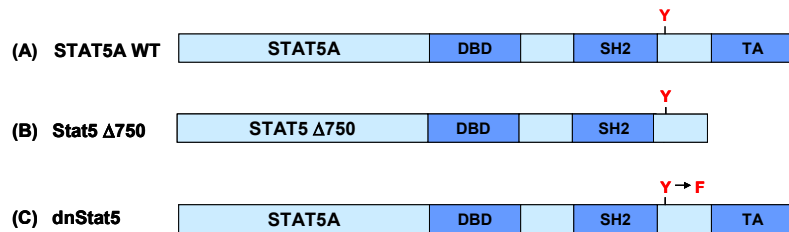


Abbildung 6.2-3: Schematische Darstellung von Wildtyp-Stat5A und den zwei verschiedenen dominant negativen Stat5-Konstrukten. (A) Die funktionellen Domänen von Stat5A sind dargestellt. Dazu gehören die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die hochkonservierte SH2-Domäne (*src homology domain 2*), der für die Phosphorylierung wichtige Tyrosinrest (Y) und die Carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne (TA). (B) Stat5 Δ750 fehlt die Transaktivierungsdomäne. (C) Bei dnStat5A ist der Tyrosinrest, der durch Phosphorylierung für die Dimerisierung von Stat-Proteinen verantwortlich ist, zu Phenylalanin mutiert. Diese Mutante kann nicht mehr phosphoryliert werden.

Die verschiedenen Stat5-Mutanten werden in einen retroviralen Vektor kloniert, der zusätzlich noch die GFP-Sequenz, verbunden über ein IRES-Element zur Quantifizierung, enthält. Die IRES-Sequenz beinhaltet eine zweite, interne ribosomale Bindungsstelle. Beide Gene werden dadurch von dem gleichen Promotor abgelesen, es entstehen aber zwei getrennte Proteine. Als Kontrollansätze werden Zellen mit dem Vektor, der nur die IRES-GFP-Sequenz enthält, transduziert. Dieser enthält kein zusätzliches Gen vor der IRES-Sequenz. Die Vektoren werden in Verpackungszellen transfiziert, um die Zielzellen (SKBR3) mit dem produzierten Virusüberstand zu transduzieren.

Die Transduktionseffizienz wird im FACS anhand der GFP-Konzentration bestimmt. In Abbildung 6.2-4 ist exemplarisch für sämtliche weitere Transduktionen die Effizienz dargestellt. Für alle Versuche mit transduzierten Zellen werden nur solche verwendet, deren Transduktionseffizienzen > 80% sind.

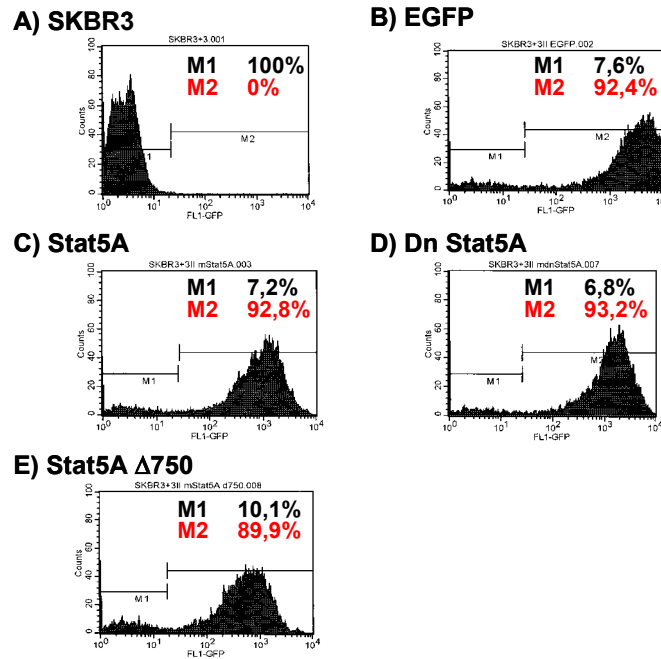


Abbildung 6.2-4: Transduktionseffizienz von SKBR3 Zellen nach dreimaliger Viruszugabe. 1 ml der mit Stat5A, dnStat5A, Stat5A Δ 750 oder GFP alleine transduzierten Zellen einer konfluenten Gewebekulturschale werden im FACS auf EGFP-Expression untersucht. Aufgetragen ist die GFP-Fluoreszenz (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse).

Zum Nachweis der Expression der Mutanten werden Zellen mit den rekombinanten Retroviren transduziert und die Expression der Mutanten im Western Blot nachgewiesen. Die erhaltene Immunfärbung ist in Abbildung 6.2-5 dargestellt. In Spur (1) sind die mit leerem Vektor transduzierten Kontrollzellen, in Spur (2) mit der Tyrosinmutante dnStat5 und in Spur (3) mit Stat5 Δ 750 transduzierte Zellen aufgetragen.

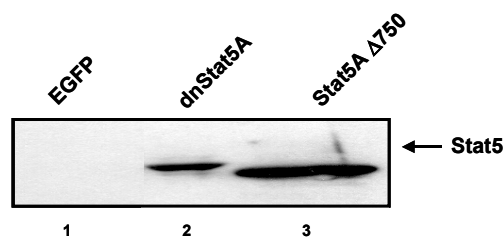


Abbildung 6.2-5: Nachweis der dominant negativen Stat5A-Mutanten durch Western Blot Analyse in transduzierten MCF7 Zellen. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 60 μ g je Spur des 10% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende Proteinlösungen aufgetragen: (1) Kontrollzellen, mit leerem Vektor transduziert; (2) mit der Tyrosinmutante dnStat5A transduzierte Zellen; (3) Zellextrakte der Stat5A Δ 750-Mutante [Der Pfeil kennzeichnet die Stat5-Bande, MW = 95 kDa].

Sowohl die Tyrosin- als auch die Deletionsmutante werden deutlich überexprimiert im Vergleich zum endogenen Stat5, dessen geringe endogene Menge in Spur (1) nicht sichtbar ist. Durch ihr, aufgrund der Deletion der Transaktivierungsdomäne, kleineres

Molekulargewicht läuft die Stat5 $\Delta 750$ -Mutante etwas unterhalb der von nativen Stat5-Proteine.

Um die Funktionalität der Stat5-Mutanten zu testen, wird deren Transaktivierungspotential auf dem β -Kasein-Promotor im Luziferase-Test gemessen. Hierzu werden Zellen mit Wildtyp-Stat5A, mit den Stat5A-Mutanten oder aber mit beiden Konstrukten transfiziert und mit Prolaktin aktiviert. Die Normalisierung der Luziferasewerte erfolgt über ein kotransfiziertes β -Galaktosidaseexpressionsplasmid. In Abbildung 6.2-6 sind die resultierenden normalisierten Luziferasewerte dargestellt.

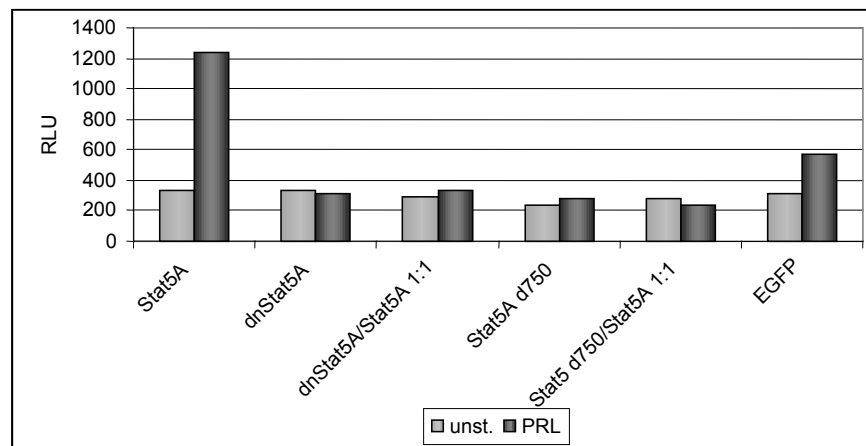


Abbildung 6.2-6: Nachweis der Transkriptionsaktivität der dominant negativen Stat5A-Mutanten. MCF7 Zellen werden transient mit Stat5A-Wildtyp oder mit einem der beiden dominant negativen Mutanten, dem β -Kasein-Reporterplasmid, dem Prolaktinrezeptor und dem β -Galactosidase-Plasmid kotransfiziert. Nach 48 h erfolgt die Stimulation mit Prolaktin für 16 h. Nach der Zellyse wird die transkriptionelle Aktivierung des Luziferase-Reporterkonstrukts gemessen.

Die Prolaktinstimulation von Zellen, welche mit Wildtyp-Stat5A-Plasmid transfiziert sind, resultiert in einer 3fachen Induktion des Luziferasegens gegenüber nicht stimulierten Zellen. Dagegen zeigen die beiden dominant negativen Mutanten keine Transaktivierung. Durch Kotransfektion der beiden Mutanten mit Wildtyp-Stat5A im molaren Verhältnis von 1:1 kann die Transkriptionsaktivierung des Wildtyp-Stat5A-Proteins unterdrückt werden.

Die beiden dominant negativen Stat5A-Mutanten werden in den Zellen überexprimiert und sind somit in der Lage, auf dem β -Kasein-Promotor die Transaktivierung zu hemmen.

Im Verlauf der Experimente werden diese Mutanten verwendet, um den Einfluss von Stat5 auf die Proliferation von Brustepithelzelllinien weiter zu untersuchen.

6.2.2 Regulation der Genexpression durch Prolaktin und Stat5

Mit Hilfe der dominant negativen Mutanten ist ein Einfluss von Stat5 auf die Proliferation nicht feststellbar. Zellen, in denen Stat5 durch die Mutanten gehemmt wird, verändern ihr Proliferationsverhalten im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht (Abbildung 6.2-7). Auch kann keine Inhibierung der Cyclin D1-Expression durch dominant negatives Stat5A festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

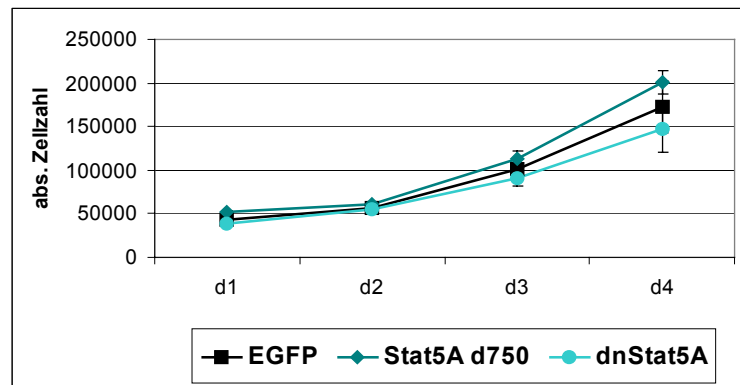


Abbildung 6.2-7: Einfluss von dominant negativen Stat5A-Mutanten auf das Wachstum von MCF7 Zellen. 45×10^3 der mit den dominant negativen Stat5A-Mutanten transduzierten Zellen werden in phenolrotfreiem RPMI, 5% CSS und 100 ng/ml Prolaktin ausgesät. Als Kontrolle werden EGFP transduzierte Zellen analysiert. Die Zellen werden von Tag 1 bis Tag 4 nach Zellaussaat geerntet und die absoluten Zellzahlen im COULTER COUNTER bestimmt. (—■—) GFP transduzierte Zellen, (—◆—) Stat5A Δ 750 transduzierte Zellen, (—●—) dnStat5A transduzierte Zellen.

Zur Analyse, ob die dominant negativen Stat5-Mutanten überhaupt endogene prolaktininduzierte Gene reprimieren können, wird die Expression des Stat5-Negativregulators *cis* untersucht. *Cis* wird ebenso als prolaktininduziertes Gen, wie auch als ein direktes Stat5-Zielgen beschrieben.

Zuerst werden die verwendeten MCF7 und SKBR3 Zellen für eine Stunde mit 10 mM Cyclohexamid zur Unterdrückung der Proteinbiosynthese und 5 μ g/ml Prolaktin stimuliert, um die Induktion des endogenen Stat5-Zielgenes durch Prolaktin zu analysieren. Die Zellen werden zu Gesamt-RNA aufgearbeitet und mit Hilfe von „*random hexamer*“-Primern zu cDNA umgeschrieben. Mit *cis*-spezifischen Primern wird eine RT-PCR durchgeführt und das PCR-Produkt auf einem 2% Agarosegel analysiert. In Abbildung 6.2-8 ist das Ergebnis der RT-PCR dargestellt. Für die semiquantitative Analyse der vorhandenen *cis* cDNA wird GAPDH in einer gesonderten RT-PCR-Reaktion detektiert. Dieses Gen sollte im Gegensatz zu *cis* nicht durch Prolaktin reguliert werden und dient somit als interner Standard. In allen drei Zelllinien (MCF10A, MCF7, SKBR3) ist *cis* auch ohne Prolaktinstimulation vorhanden. Durch Prolaktinzugabe wird die Menge an *cis* RNA erhöht. Das *cis*-Gen lässt sich durch Prolaktinstimulation der Zellen induzieren.

Da diese Methode der RT-PCR nur eine semiquantitative Aussage über die Regulation von Genen treffen kann, wird zur besseren Quantifizierung der Regulation durch die dominant negativen Stat5-Mutanten eine „Echt-Zeit“-PCR mit Hilfe von *SYBR green II* durchgeführt. Mit Hilfe der „delta C_T“-Methode wird die relative Expression des Gens, bezogen auf unstimulierte SKBR3 Zellen, errechnet. Als Referenz dienen hierzu wieder die GAPDH-C_T-Werte. Die relative Expression des cis-Gens in SKBR3 Zellen ist in Abbildung 6.2-9 graphisch aufgetragen.

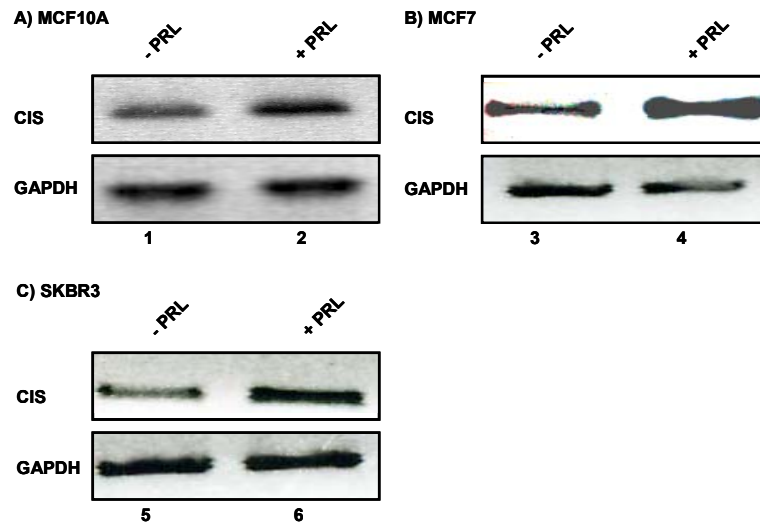


Abbildung 6.2-8: Nachweis der mRNA des Stat5-Negativregulators cis mittels RT-PCR. MCF10A, MCF7 und SKBR3 Zellen werden in Kulturmedium mit 10% FCS für 24 h kultiviert und anschließend für 16 h unter serumfreien Bedingungen weiterkultiviert. Nach Stimulation für 1 h mit 10 mM Cyclohexamid und 5 µg/ml Prolaktin werden die Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert. 2 µg der RNA werden für die Reverse Transkriptase-Reaktion verwendet. Pro PCR-Ansatz werden im Falle des cis-200 ng der cDNA bzw. 100 ng cDNA des GAPDH-Nachweises verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert.

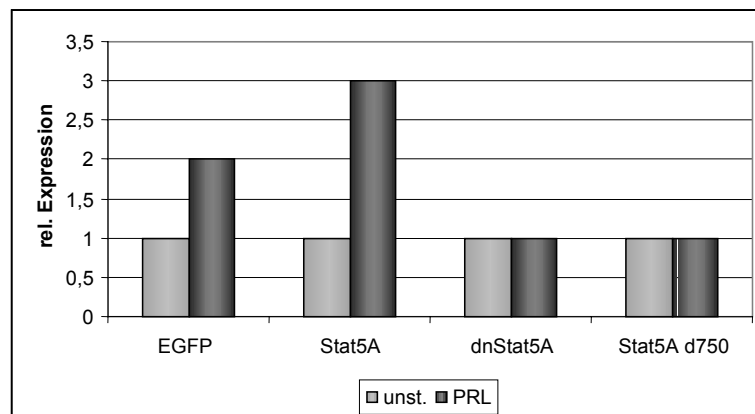


Abbildung 6.2-9: Quantitativer cis-Expressionsnachweis mit Hilfe der „Echt-Zeit“-PCR in SKBR3 Zellen. SKBR3 Zellen werden mit Stat5A-Wildtyp, Stat5A Δ 750 (dominant negativ durch Fehlen der Transaktivierungsdomäne), dnStat5A (dominant negativ durch Mutation des für die Dimerisierung wichtigen Tyrosinrestes zu Phenylalanin) oder mit EGFP als Kontrolle transduziert. Die Zellen werden anschließend für 24 h in Kulturmedium ausgesät und danach für 16 h serumfrei gehalten. Nach 1 h Stimulation mit 10 mM Cyclohexamid und 5 µg/ml Prolaktin werden die Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert und 2 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 200 ng der cDNA werden als Matritze in der „Echt-Zeit“-PCR mit spezifischen cis- bzw. GAPDH-Primern eingesetzt. Die relative Expression wird mit Hilfe der Δ C_T-Methode, bezogen auf unstimulierte SKBR3 Zellen, errechnet.

Auch die quantitative Bestimmung der cis-RNA zeigt deutlich eine zweifache Induktion des Gens durch Prolaktin. Die Überexpression von Stat5A mittels retroviraler Transduktion führt sogar zu einer Verdreifachung des Gens. Die dominant negativen Stat5A-Mutanten inhibieren die prolaktininduzierte Expression.

cis kann sowohl in MCF7, als auch in SKBR3 Zellen durch Prolaktin reguliert werden. Diese Regulation ist zweifelsfrei Stat5A-abhängig. Die Versuche mit den dominant negativen Mutanten zeigen, dass diese Regulation Stat5A-abhängig erfolgt.

Die dominant negativen Stat5A-Mutanten können das Stat5-abhängige Gen cis inhibieren. Sie zeigen jedoch keinen Einfluss auf die prolaktinvermittelte Induktion der Proliferation und der Cyclin D1-Genexpression. Da Prolaktin auch andere Signalwege, wie z.B. den MAPK-Weg anschaltet, ist nicht auszuschließen, dass sich diese Wege bei der Proliferationsinduktion überlagern und so der Einfluss von Stat5 durch dominant negative Mutanten nicht nachweisbar ist. Für nachfolgende Untersuchungen in Brustepithelzellen wird nun eine konstitutiv aktive Stat5A-Mutante verwendet, um den Einfluss von Stat5 in diesem Zellsystem näher zu untersuchen.

6.3 Die Funktion von Stat5 in Brustepithelzellen – Untersuchungen mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Mutante

6.3.1 Charakterisierung der konstitutiv aktiven Stat5-Mutante

Die konstitutiv aktive Stat5-Mutante Stat5A 1*6 wurde von Onishi und Mitarbeitern durch zufällige Mutagenese in dem Stat5-Gen mittels PCR kreiert, um die biologische Konsequenzen der Stat5-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen (Onishi et al., 1998). Zwei Mutationen (Aminosäure 299 Histidin → Arginin und Aminosäure 711 Serin → Phenylalanin) bewirken die konstitutive Aktivierung von Stat5, wobei der eigentliche Aktivierungsmechanismus noch nicht aufgeklärt ist (Abbildung 6.3-1).

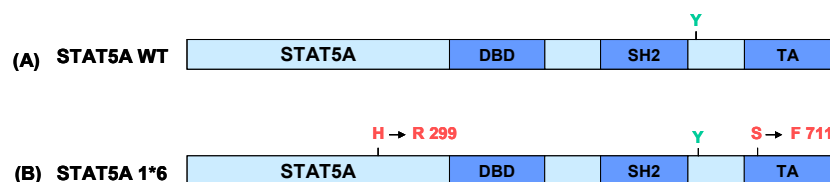


Abbildung 6.3-1: Schematische Darstellung von Wildtyp-Stat5A und der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante. (A) Die funktionellen Domänen von Stat5A sind dargestellt. Dazu gehören die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die hochkonservierte SH2-Domäne (*src homology domain 2*), der für die Phosphorylierung wichtige Tyrosinrest (Y) und die carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne (TA). (B) Die Stat5A 1*6-Mutante enthält zwei Aminosäureaustausche, einen oberhalb der DNA-Bindungsdomäne (H299R) und einen in der Transaktivierungsdomäne (S711F) (Onishi et al., 1998).

Da die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante in einer hämatopoetischen Zelllinie selektioniert und charakterisiert wurde, wird zunächst die Fähigkeit an DNA zu binden und das Transaktivierungspotential dieser Mutante in Brustepithelzellen getestet. Alle Versuche werden in SKBR3, MCF7 und HC11 durchgeführt. MCF10A Zellen, als weitere nicht transformierte Zelllinie, werden nicht weiter untersucht, da die Transduktionseffizienz mit dem hier verwendeten viralen System zu gering ist.

SKBR3, MCF7 und HC11 Zellen werden mit dem pMX Stat5A 1*6 IRES GFP-Vektor oder mit dem leeren pMX IRES GFP-Vektor als Kontrolle transduziert und nach drei Tagen die Transduktionseffizienz mittels FACS-GFP-Nachweis kontrolliert. Die Expression der konstitutiv aktiven Mutante wird mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert (Abbildung 6.3-2).

Konstitutiv aktives Stat5A 1*6 wird in allen Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen gebildet. Unter denaturierenden Bedingungen ist es bei ca. 95 kDa, wie auch der Stat5A-Wildtyp, detektierbar.

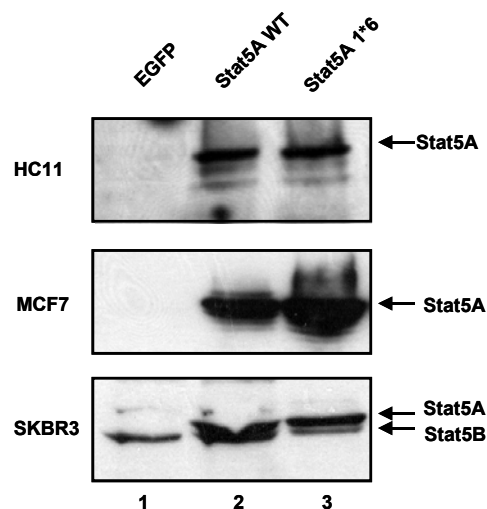


Abbildung 6.3-2: Nachweis der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante durch Western Blot Analyse in HC11, MCF7 und SKBR3 Zellen. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 100 µg je Spur des 10% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende Proben aufgetragen: (1) Kontrollzellen mit leerem Vektor transduziert; (2) Überexpression von Wildtyp-Stat5A; (3) Überexpression der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante [Der Pfeil kennzeichnet die Stat5A-Bande, MW = 95 kDa].

Die DNA-Bindung der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante wird mit dem Wildtyp-Stat5A-Konstrukt verglichen. Hierfür werden MCF7 und SKBR3 Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transduziert. Die DNA-Bindung wird in Gesamtzellextrakten mittels Gelretardierungsexperiment analysiert. Der Wildtyp-Stat5-Protein-DNA-Komplex ist in den transduzierten Zellen nur nach vorheriger Prolaktinstimulation zu erkennen (Abbildung 6.3-3 Spuren (2A), (2B)). Demgegenüber ist bei Zellen, die eine konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante enthalten, ein Komplex auch ohne vorherige Prolaktinstimulation nachweisbar (Abbildung 6.3-3, Spuren (4A), (4B)). Durch

Prolaktinergabe lässt sich die Komplexbildung noch verstärken. Keine Komplexbildung ist in den Kontrollzellextrakten zu detektieren (Abbildung 6.3-3, Spuren (1A), (1B)). Dies liegt höchstwahrscheinlich an der Proteinaufarbeitungsmethode. Im Gegensatz zu den unter Kapitel 6.1 beschriebenen Experimenten werden hier keine Kernextrakte, sondern Gesamtzellextrakte verwendet. Die Konzentration an aktiviertem Stat5A ist somit geringer und liegt unter der Nachweisgrenze.

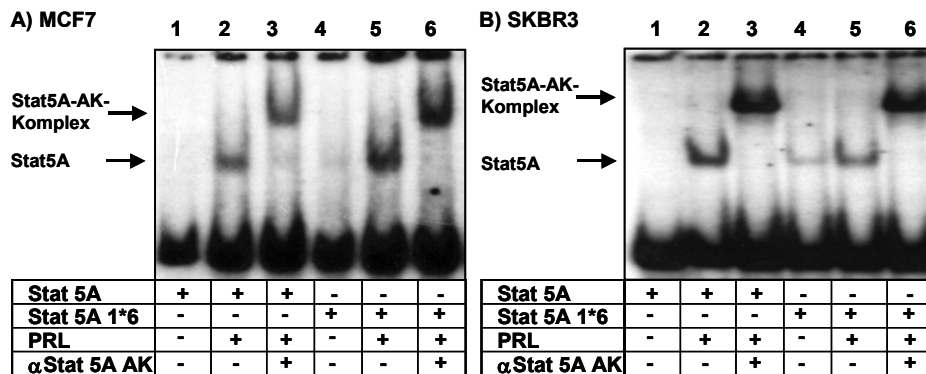


Abbildung 6.3-3: Nachweis der Stat5 1*6-DNA-Bindung in MCF7 und SKBR3 Zellen durch Gelretardierungsuntersuchung. Die Zellen werden jeweils mit Stat5A-Wildtyp ((1) – (3)) oder konstitutiv aktivem Stat5A ((4) – (6)) transduziert. Der aufgetragene Gesamtzellextrakt beträgt 8 µg je Spur des nativen 4% TBE-Polyacrylamidgels. Die Gelretardierungsexperimente werden mit γ -³²P markiertem Stat5-Bindungselement des β -Kaseinpromotors durchgeführt. Die Supershiftuntersuchungen werden mit einem Stat5-spezifischen Antikörper durchgeführt. In den einzelnen Spuren sind folgende Proteinlösungen aufgetragen: (1); (4) WCE-Extrakte ohne Prolaktinstimulation; (2); (5) WCE-Extrakte nach 5 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin und (3); (6) WCE-Extrakte nach 5 min Stimulation mit 5 µg/ml Prolaktin mit Stat5-Antikörper vorinkubiert.

Die Funktionalität der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante in der Transkriptionsaktivierung soll im Vergleich zu Wildtyp-Stat5A in Brusttumorzellen untersucht werden. Hierfür werden MCF7 Zellen jeweils mit Expressionsvektoren für das Wildtyp-Stat5A oder der Stat5A 1*6-Mutante zusammen mit Expressionsvektoren für den Prolaktinrezeptor, einem Luziferasereporterplasmid und einem β -Galaktosidasekontrollplasmid kotransfiziert. Das Luziferasegen steht unter der Kontrolle des β -Kaseinpromotors und kann somit spezifisch von Stat5A aktiviert werden. Es werden jeweils Doppelansätze transfiziert und die eine Hälfte mit Prolaktin stimuliert. Die gemessene Luziferaseaktivität korreliert mit der Transaktivierung des β -Kaseinpromotors (Abbildung 6.3-4). Die Normalisierung der Luziferasewerte erfolgt durch Verrechnung mit der β -Galaktosidaseaktivität des Kontrollplasmids.

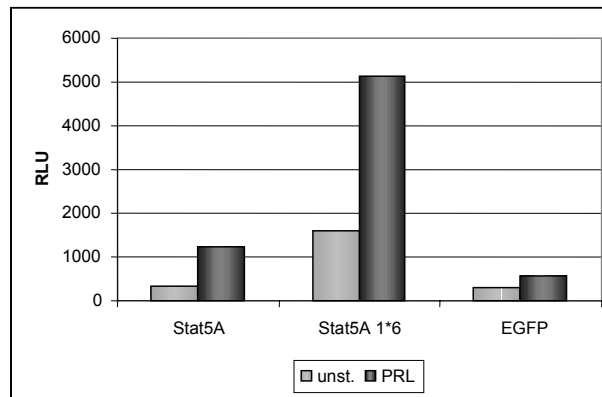


Abbildung 6.3-4: Nachweis des Transkriptionsaktivierungspotentials der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante. MCF7 Zellen werden transient mit Stat5A-Wildtyp oder der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante, dem β -Kasein-Reporterplasmid, dem Prolaktinrezeptor und dem β -Galactosidase-Plasmid kotransfiziert. Nach 48 h erfolgt die Stimulation mit Prolaktin für 16 h. Nach der Zellyse wird die Luciferaseaktivität bestimmt.

Die Stimulation der Stat5A-Wildtyp Zellen mit Prolaktin resultiert in einer 3,5fachen Induktion der Transaktivierung des β -Kasein-Luziferasereporter gens gegenüber nicht stimulierten Zellen. Das Transaktivierungspotential der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante ist ohne Prolaktinstimulation vergleichbar mit dem von Stat5A-Wildtyp nach Prolaktinstimulation. Durch Prolaktin gabe kann die Transaktivierung noch um das Dreifache gesteigert werden. Zellen ohne exogenes Stat5A zeigen nur eine leichte Transaktivierung nach Prolaktinstimulation. Das endogene Stat5 reicht anscheinend für eine starke Transaktivierung des Luziferasereporter gens nicht aus.

In diesen Experimenten kann gezeigt werden, dass die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante auch in Brustepithelzellen in der Lage ist, ohne vorherige Aktivierung durch Prolaktin DNA zu binden und die Transkription eines Stat5-abhängigen Reporter gens zu aktivieren. Durch Stimulation mit Prolaktin lassen sich sowohl die DNA-Bindung als auch das Transaktivierungspotential noch verstärken.

6.3.2 Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Proliferationsrate verschiedener Brustepithelzelllinien

Nachdem in Kapitel 6.2 gezeigt wird, dass Prolaktin die Proliferationsrate von Brustepithelzellen erhöht, soll nun untersucht werden, ob die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante einen Einfluss auf die Proliferationsrate zeigt.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate werden MCF7, SKBR3 und HC11 Zellen mit der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante transduziert. Die mit pMX EGFP transduzierten Zellen dienen als Kontrolle. Zur Analyse der Proliferation werden die absoluten Zellzahlen an vier nacheinander folgenden Tagen mit Hilfe des COULTER COUNTERS bestimmt. Verglichen werden hierbei das Proliferationsverhalten von zwei Brusttumorzelllinien mit unterschiedlichen Stat-Proteinausstattungen (vgl. Kapitel 6.1)

mit einer nicht transformierten Brustepithelzelllinie. Die Zellaussaat erfolgt in phenolrotfreiem Medium mit 5% hormonbefreitem Serum, um eventuelle Serum- und Östrogeneinflüsse auszuschließen. In diesem Medium zeigen die Zellen eine verringerte Proliferation (Abbildung 6.3-5).

Einen Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Proliferation lässt sich in den beiden Brustkrebszelllinien eindeutig nachweisen (Abbildung 6.3-5 (B) und (C)). Im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor transduzierten Zellen lässt sich die Zellzahl vier Tage nach Aussaat um das ca. 1,5fache steigern.

In den nicht transformierten Brustepithelzellen HC11 ist kein Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Proliferationsrate feststellbar (Abbildung 6.3-5 (A)). Sowohl Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A als auch die kontrolltransduzierten Zellen zeigen gleiches Proliferationsverhalten.

Stat5A stimuliert demzufolge nur die Proliferation in Tumorzelllinien, in nicht transformierten Zellen scheint es zumindest auf die Zellteilungsrate keinen Einfluss zu nehmen.

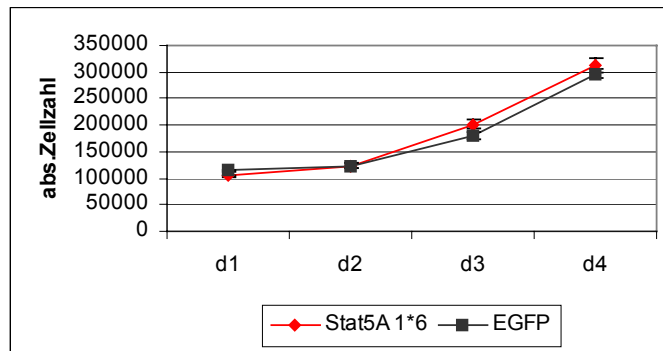
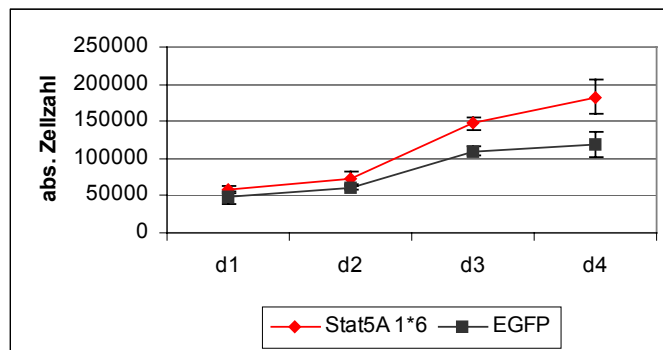
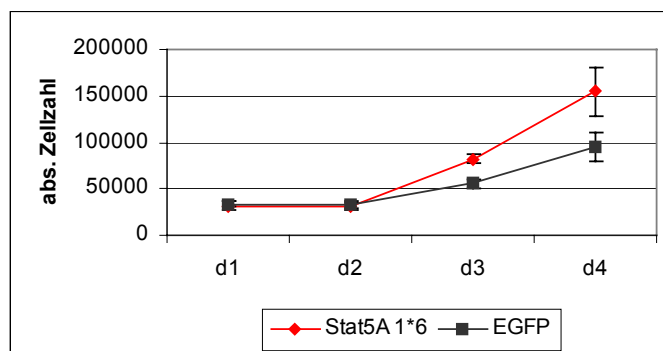
A) HC11**B) MCF7****C) SKBR3**

Abbildung 6.3-5: Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf das Wachstum von HC11, MCF7 und SKBR3 Zellen. 45×10^3 der mit Stat5A 1*6 transduzierten Zellen werden in phenolrotfreiem RPMI (HC11, MCF7) oder DMEM Medium (SKBR3) mit 5% CSS ausgesät. Als Kontrolle werden EGFP-transduzierte Zellen analysiert. Zellen werden von Tag 1 bis Tag 4 nach Zellaussaat geerntet und die absoluten Zellzahlen im COULTER COUNTER bestimmt. (A) Wachstumskurve HC11 Zellen; (B) Wachstumskurve MCF7 Zellen; (C) Wachstumskurve SKBR3 Zellen. Schwarze Quadrate (-■-) zeigen den Wachstumsverlauf der EGFP-transduzierten Zellen; rote Rauten (-◆-) zeigen den Wachstumsverlauf der Stat5A 1*6 transduzierten Zellen.

Ein verändertes Proliferationsverhalten geht immer auch mit einer Änderung des Zellzyklusprofils einher. Die einzelnen Phasen des Zellzyklusses müssen im Falle einer verstärkten Zellteilung schneller durchschritten werden. Um dieses Phänomen zu untersuchen, sollen die Zellen synchronisiert werden. Hierzu werden sie zuerst in ihrem Zellzyklus angehalten (G_1 -Phasen Arretierung) und durch erneute Stimulation wieder in den normalen Zyklus entlassen. Die G_1 -Arretierung geschieht durch Serumentzug der Zellen, der Wiedereintritt durch Zugabe von 10% Serum in das

Medium für einen definierten Zeitraum. Dieser richtet sich nach der individuellen Teilungsrate der Zellen und der Ruhephase nach der Serumzugabe, so dass der G_1 -Arrest aufgehoben, die Zellen aber noch nicht einmal komplett den Zyklus durchschritten haben. Zur Messung der einzelnen Zellzyklusstadien werden die Zellen fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und die Menge an gefärbter DNA im Durchflusszytometer gemessen. Das Zellzyklusprofil setzt sich aus vier Stadien zusammen. In der G_1 -Phase besitzen die Zellen den einfachen Chromosomensatz. Es schließt sich die Synthesephase (S-Phase) an, in der die DNA verdoppelt wird. In der G_2 -Phase liegt der doppelte Chromosomensatz vor und in der M-Phase wird dieser Chromosomensatz auf zwei Tochterzellen verteilt. In der Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid kann zwischen M- und G_2 -Phase nicht unterschieden werden. Apoptotische Zellen besitzen keinen vollständigen Chromosomensatz, sondern nur noch DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe. Dieses Stadium wird $subG_1$ genannt und befindet sich im Zellzyklusprofil vor der eigentlichen G_1 -Phase.

In Abbildung 6.3-6 sind die Zellzyklusprofile von HC11, MCF7 und SKBR3 Zellen dargestellt. Auf der y-Achse ist der DNA-Gehalt der Zellen aufgetragen. Die G_1 -Phase (Hauptphase der Zellen) befindet sich bei 100 bzw. 200 Einheiten. Die G_2 /M-Phase befindet sich bei 200 bzw. 400 Einheiten. Dazwischen befindet sich die S-Phase. Unter 100 bzw. 200 Einheiten werden die apoptotischen Zellen dargestellt.

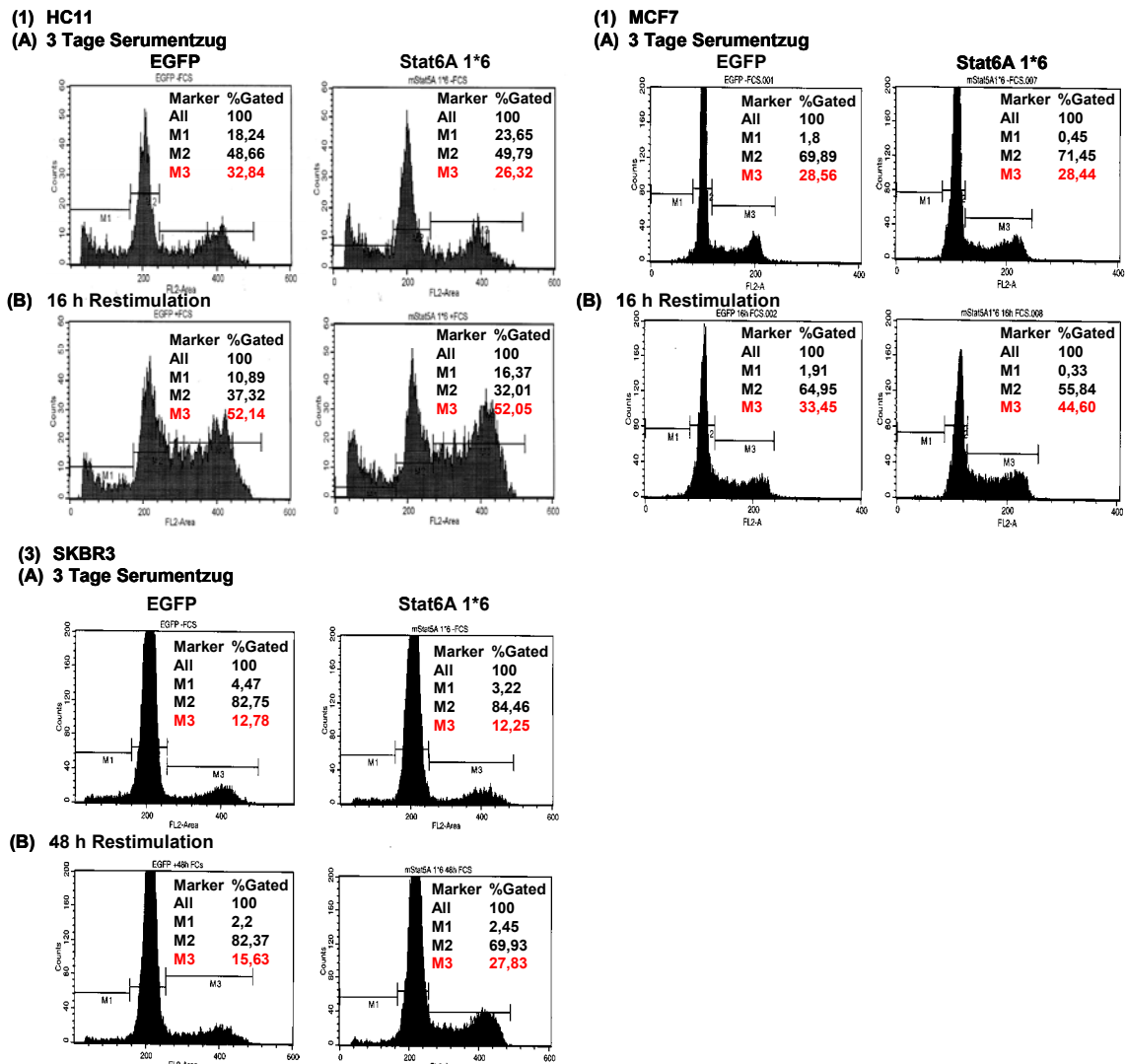


Abbildung 6.3-6: Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf den Zellzyklus von HC11, MCF7 und SKBR3 Zellen. Die verschiedenen Zelllinien, die mit Stat5A 1*6 oder EGFP-transduziert sind, werden für drei Tage ohne Serum kultiviert und anschließend für 16 h (HC11, MCF7) oder 48 h (SKBR3) mit 10% Serum im Kulturmedium weiterkultiviert. Nach Ethanolfixierung und Propidiumiodidfärbung der DNA werden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. (A) Zellen nach drei Tagen Serumentzug; (B) Zellen nach Restimulation mit 10% Serum. M1: subG₁-Phase; M2: G₁-Phase; M3: S/M/G₂-Phase.

In Abbildung 6.3-6 (A) sind die durch Serumentzug arretierten Zellen abgebildet. 70-80% der MCF7 und SKBR3-Zellen befinden sich in der G₁-Phase. Die HC11 Zellen lassen sich im Gegensatz zu den Tumorzellen nur zu 50% in der G₁-Phase arretieren. Nach Zugabe von 10% Serum für 16 h im Falle von MCF7 Zellen erkennt man eine deutliche Zunahme der S/M-Phase von 12% bei Stat5A 1*6-Zellen im Vergleich zu EGFP-Zellen (45% zu 33%). Gleichzeitig ist die Zellzahl in der G₁-Phase verringert (56% zu 65%).

Das gleiche Ergebnis ergibt sich auch bei SKBR3 Zellen. Nach Zugabe von 10% Serum für diesmal 48 h, erhöht sich in Zellen, die das konstitutiv aktive Stat5A tragen, im Vergleich zu den Kontrollzellen die Anzahl in S/M-Phase um ca. 12%. Für die nicht transformierte HC11 Zelllinie lässt sich keine Verschiebung des Zellzyklusses bei

Transduktion mit der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante erkennen. Als Kontrollzellen werden auch hier Zellen verwendet, die nur mit EGFP transduziert sind. Allerdings sind die prozentualen Zellzahlen in der subG₁-Phase deutlich gegenüber den Tumorzellen erhöht. Durch die Serumzugabe verringert sich nur der prozentuale Anteil der apoptotischen Kontrollzellen. Die Serumzugabe verhindert aber das vermehrte Auftreten von apoptotischen Zellen in Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht (Abbildung 6.3-6 (1)).

Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, erhöht eine konstitutiv aktive Stat5A-Mutante die Proliferation und fördert den Eintritt in den Zellzyklus in Brustkrebszelllinien. In der nicht transformierten Brustepithelzelllinie HC11 ist dieser Einfluss nicht nachweisbar. Konstitutives Stat5A zeigt demnach in Abhängigkeit vom Zelltyp (transformiert, nicht transformiert) unterschiedliche Effekte auf die Proliferation und den Zellzyklus.

6.3.3 Analyse des Einflusses der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Expression von endogenen Stat5-Zielgenen

In der Literatur sind einige Stat5-regulierte Gene beschrieben. Unter ihnen befinden sich auch zellzyklusregulierende Gene, wie p21^{WAF/CIP1} (Matsumura, *et. al.*, 1997) oder auch Cyclin D1 (Matsumura, *et. al.*, 1999). Auf der anderen Seite ist ebenfalls bekannt, dass gerade Brusttumorzellen den Zellzyklus zu ihren Gunsten verändern, indem sie z.B. die Menge an CKIs (*Cdk Inhibitor*) verändern (Lane, *et. al.*, 2000).

Auch apoptoseregulierende Proteine, wie Bcl-2 oder Bcl-X_L, sind als Zielgene für Stat5 beschrieben (Dumont *et. al.*, 1999). Viele dieser Untersuchungen erfolgten jedoch an Zelllinien des hämatopoetischen Systems.

In Gesamtzellextrakten von Zellen, die mit konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 transduziert worden sind, wird die Expression der beschriebenen Stat5-Zielgene p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP} und Bcl-2 mittels Western Blot analysiert (Abbildung 6.3-7). Als Kontrolle werden mit EGFP-transduzierte Zellen verwendet. Die Western Blot Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF/CIP1} zeigt in allen Spuren eine Bande vom erwarteten Molekulargewicht von 21 kDa. Es ist jedoch keine Regulation des Proteins feststellbar. Auch ist p27^{KIP} durch Stat5A nicht reguliert. Nach Detektion mit einem spezifischen p27^{KIP}-Antikörper ist in allen Spuren die gleiche Proteinmenge detektierbar.

Die Western Blot Analyse der Bcl-2-Expression zeigt sowohl in den Kontrollzellen (Spur (1)) als auch in den Stat5A 1*6-Zellen (Spur (3)) eine Bande vom erwarteten

Molekulargewicht von 26 kDa. Eine Überexpression von Wildtyp oder konstitutiv aktivem Stat5A hat keinen Einfluss auf die Expression von Bcl-2.

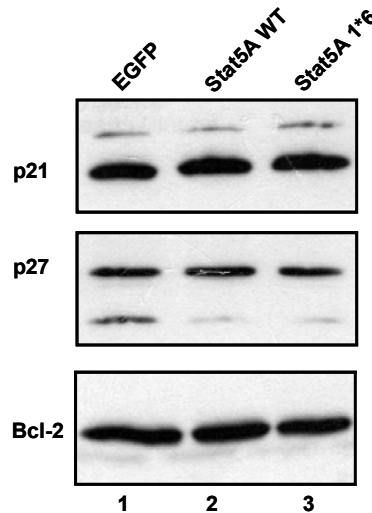


Abbildung 6.3-7: Nachweis von endogenem p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1} und Bcl-2 durch Western Blot Analyse bei MCF7 Zellen. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 60 µg je Spur des 14% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte; (2) Stat5A-Wildtyp transduzierte Zellen; (3) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen.

Da ein Unterschied in der Expression von p21^{WAF/CIP1} und p27^{KIP1} durch Überexpression von Wildtyp-Stat5A oder der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante nicht gezeigt werden kann, scheint Stat5A in Brusttumorzelllinien die Proliferation nicht durch Regulation der CKI-Expression zu verstärken.

Zur Untersuchung, ob die verschiedenen Zykline an der Regulation beteiligt sind, werden mit Stat5A 1*6 transduzierte und EGFP-transduzierte Kontrollzellen ausgesät und zu Gesamt-RNA aufgearbeitet. Für die quantitative Analyse der RNA-Mengen wird ein *RNase Protection Assay* (RPA) durchgeführt, bei dem eine spezifische, radioaktiv markierte Probe durch Hybridisierung mit der RNA vor enzymatischem Abbau geschützt ist. Nach Auftrennung der RNA-Hybride durch eine denaturierende Gelelektrophorese kann durch Autoradiographie die geschützte markierte Probe detektiert werden. Die Menge der geschützten Probe ist proportional zu der im Ansatz vorhandenen spezifischen RNA.

Indem mehrere spezifische Proben in einem Ansatz verwendet werden, lässt sich die Expression verschiedener Gene gleichzeitig quantitativ analysieren. In diesem Ansatz wird eine ganze Gruppe von Zyklinen, Cyclin A, D1 und B, untersucht. Als interner Standard wird das GAPDH-Gen mitgeführt, welches unter diesen Umständen nicht reguliert wird. Wie sich in Abbildung 6.3-8 (A) zeigt, ist nur bei der Cyclin A-Expression eine leichte Veränderung durch Überexpression von Wildtyp-Stat5A und konstitutiv aktivem Stat5A feststellbar. Daher wird die Expression auf Proteinebene im Western Blot überprüft (Abbildung 6.3-8 (B)).

In Spur (1) sind Zellextrakte aus EGFP-Kontrollzellen aufgetragen und in Spur (3) Zellextrakte von Stat5A 1*6 transduzierten Zellen. Es zeigt sich kein Unterschied in der Expressionsmenge von Cyclin A in Kontroll- und konstitutiv aktiven Stat5A überexprimierenden Zellen. Eine eventuelle Regulation von Cyclin A lässt sich auf Proteinebene nicht bestätigen.

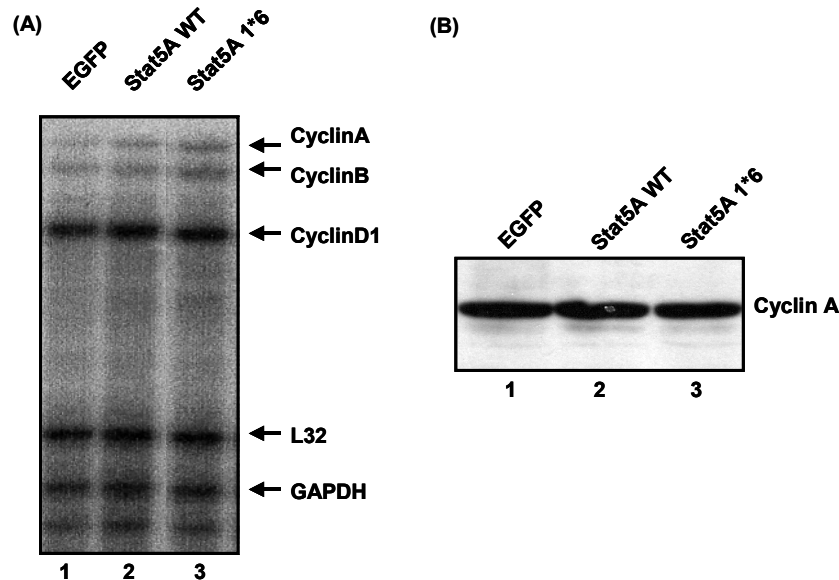


Abbildung 6.3-8: (A) Nachweis der Regulation verschiedener Zyklone durch einen „RNase protection assay“ (RPA). MCF7 Zellen werden mit Stat5A-Wildtyp, konstitutiv aktivem Stat5A oder EGFP transduziert und zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert. 10 µg der RNA werden im RPA-Kit hcyc-1 eingesetzt. In den einzelnen Spuren sind folgende RNA-Proben aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte; (2) Stat5A-Wildtyp transduzierte Zellen; (3) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen [Die Pfeile markieren jeweils die Cyclin Bande].

(B) Nachweis von endogenem Cyclin A durch Western Blot Analyse bei MCF7 Zellen. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 60 µg je Spur des 14% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte; (2) Stat5A-Wildtyp transduzierte Zellen; (3) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen (MW = 58 kDa).

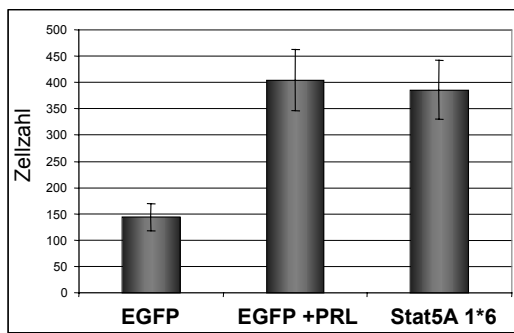
Es kann keine Aktivierung der in der Literatur beschriebenen Stat5 regulierten Gene durch Überexpression von Wildtyp oder konstitutiv aktiver Stat5A-Mutante gezeigt werden. Dies ist eventuell auf die zelltypspezifischen Unterschiede im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren, die die Regulation der Transkription dieser Gene steuern, zurückzuführen.

6.4 Einfluss von Stat5 auf das Migrationsverhalten von Brusttumorzellen

Tumorzellen unterscheiden sich durch eine Reihe unterschiedlicher Eigenschaften von nicht entarteten Zellen. Dies ist zum einen wie in Kapitel 6.2 untersucht, die Fähigkeit zu rascher und ungehemmter Proliferation, zum anderen zeichnen sich Tumorzellen durch die Fähigkeit aus, Metastasen zu bilden. Tumorzellen besitzen die Eigenschaft,

Zellverbände aktiv zu verlassen und an anderer Stelle wieder neue Verbände zu bilden. Ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung dieser speziellen Eigenschaft ist der Migrationsassay. Die Zellen werden auf einer Matrix mit definierter Porengröße ausgesät, die bedingt durch ihren Durchmesser nur einen aktiven Durchtritt der Zellen erlaubt. Die Zellen werden in serumfreiem Medium in die innere Kammer einer Transwellkammer ausgesät, um äußere Einflüsse des Serums zu unterdrücken, und eventuell mit Prolaktin (5 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h werden nicht aktiv in die Matrix migrierte Zellen entfernt und die in der Matrix enthaltenen Zellen fixiert und gefärbt. Für die Auswertung werden jeweils fünf Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ausgezählt. Die erhaltenen Zellzahlen sind im Diagramm in Abbildung 6.4-1 dargestellt.

A) HC11



B) SKBR3

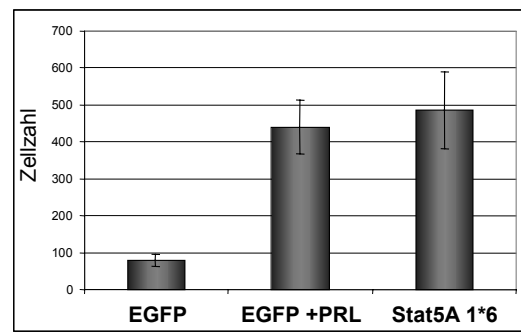


Abbildung 6.4-1: Veränderung der Migration durch Stat5A. Mit konstitutiv aktivem Stat5A transduzierte HC11 und SKBR3 Zellen und EGFP-Kontrollzellen werden nach 16 h Kultivierung in serumfreiem Kulturmedium in der inneren Transwell Kammer serumfrei ausgesät. Die äußere Kammer enthält Kulturmedium mit 10% FCS. Nach 24 h Inkubation werden nicht migrierte Zellen entfernt und die migrierten Zellen in der Matrix fixiert. Nach dem Färben der Zellen in der Matrix mit 0,1% Kristallvioletell, werden fünf Gesichtsfelder unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert errechnet. (A) Migration von HC11 Zellen; (B) Migration von SKBR3 Zellen.

Wie sich in der Abbildung erkennen lässt, führt die Stimulation mit Prolaktin zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit der Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Der gleiche Effekt lässt sich mit der Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A erzielen. Sowohl in Tumorzellen als auch in nicht transformierten Zellen erhöht die konstitutive Aktivierung von Stat5A die Migrationsrate. Konstitutiv aktiviertes Stat5A könnte somit eine wichtige Funktion bei der Metastasierung von Tumorzellen haben. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Mechanismus sind notwendig.

6.5 Einfluss von Stat5 auf nicht transformierte Brustepithelzellen – die Funktion von Stat5 in der Differenzierung

Stat5A ist für die Brustentwicklung und Laktation notwendig. Es reguliert die Differenzierung der Epithelzellen zu sekretorischen Zellen. Um den Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Differenzierung zu untersuchen, wird die nicht transformierte HC11 Zelllinie verwendet, welche nach Induktion mit den laktogenen Hormonen Prolaktin, Insulin und Glukokortikoid zur Expression des endogenen Differenzierungsmarkers der Laktation, β -Kasein, fähig ist (Ball *et al.*, 1988). Die Transaktivierung der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf dem β -Kaseinpromotor in Abhängigkeit der drei verschiedenen laktogenen Hormone wird mit Hilfe des Luziferasetests untersucht. Die Funktionalität der Stat5A 1*6-Mutante in der Transkriptionsaktivierung in nicht transformierten Brustepithelzellen soll im Vergleich mit Wildtyp-Stat5A untersucht werden. Hierfür werden HC11 Zellen jeweils mit Wildtyp-Stat5A oder der Stat5A 1*6-Mutante zusammen mit dem Prolaktinrezeptor, dem Luziferasegen und einem β -Galaktosidase-Expressionsvektor kotransfiziert. Das Luziferasegen steht unter der Kontrolle des β -Kaseinpromotors und kann spezifisch durch Stat5A aktiviert werden. Als Kontrolle werden Zellen ohne Stat5A-Plasmid, jedoch mit allen anderen Plasmiden kotransfiziert. Pro Transfektionsansatz werden vierfach Ansätze transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit Prolaktin, Dexamethason oder mit beiden Hormonen stimuliert. Als Referenz für die Transaktivierung dienen unstimulierte Zellen. Die Transaktivierung des β -Kaseinpromotors wird im Luziferaseassay gemessen und die erhaltenen Werte mit denen im β -Galaktosidaseassay erhaltenen normalisiert (Abbildung 6.5-1).

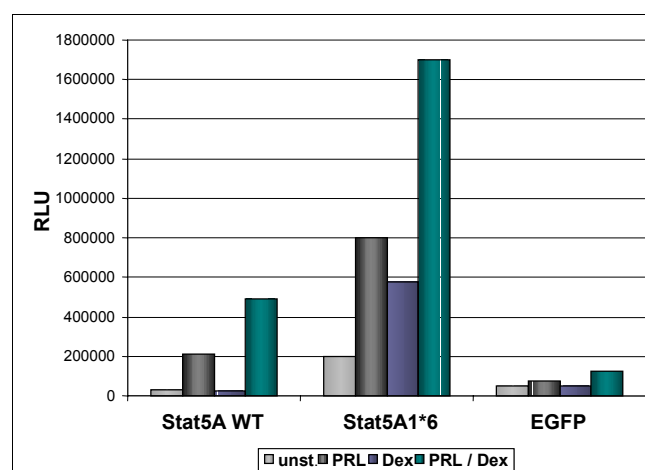


Abbildung 6.5-1: Untersuchung des Einflusses der laktogenen Hormone auf die Transkriptionsaktivität der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante. HC11 Zellen werden transient mit Stat5A-Wildtyp oder der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante, dem β -Kasein-Reporterplasmid, dem Prolaktinrezeptor und dem β -Galaktosidase-Plasmid kotransfiziert. Nach 48 h erfolgt die Stimulation mit Prolaktin, Dexamethason oder Prolaktin und Dexamethason für 16 h. Nach der Zellyse wird die transkriptionelle Aktivierung des Luziferasereporterkonstrukts gemessen.

Die Stimulation des Stat5A-Wildtyps mit Prolaktin resultiert in einer 4fachen Induktion der Transaktivierung des Luziferasegens gegenüber nichtstimulierten Zellen. Dexamethason alleine nimmt keinen Einfluss auf die Transaktivierung. Eine Kombination aus Prolaktin und Dexamethason wirkt jedoch synergistisch auf die Transaktivierung. Sie wird um etwa das 10fache gesteigert im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante ist auch, wie schon gezeigt, ohne Stimulus transkriptionell aktiv. Die Transaktivierung entspricht etwa dem Transaktivierungspotential von Stat5A-Wildtyp nach Prolaktinangabe. Durch Prolaktin lässt sich die Transaktivierung noch um das 4fache steigern. Im Gegensatz zu Stat5A-Wildtyp erhöht Dexamethason das Transaktivierungspotential der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante. Der synergistische Effekt von Prolaktin und Dexamethason auf die Transkriptionsaktivierung ist auch bei der Stat5A 1*6-Mutante sichtbar.

Zum Nachweis des Einflusses der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Differenzierung wird in diesem Zellsystem die Expression von endogenen Milchproteinen verwendet. In diesem Versuchsaufbau soll jedoch nur β -Kasein exemplarisch als ein Bestandteil der Milch, der durch Stat5A-Aktivierung exprimiert wird, nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit Prolaktin, Insulin und Dexamethason sind HC11 Zellen in der Lage, endogene Milchproteine zu synthetisieren. Die immunchemische Detektion erfolgt mit einem Polyserum gegen Milchproteine (Abbildung 6.5-2).

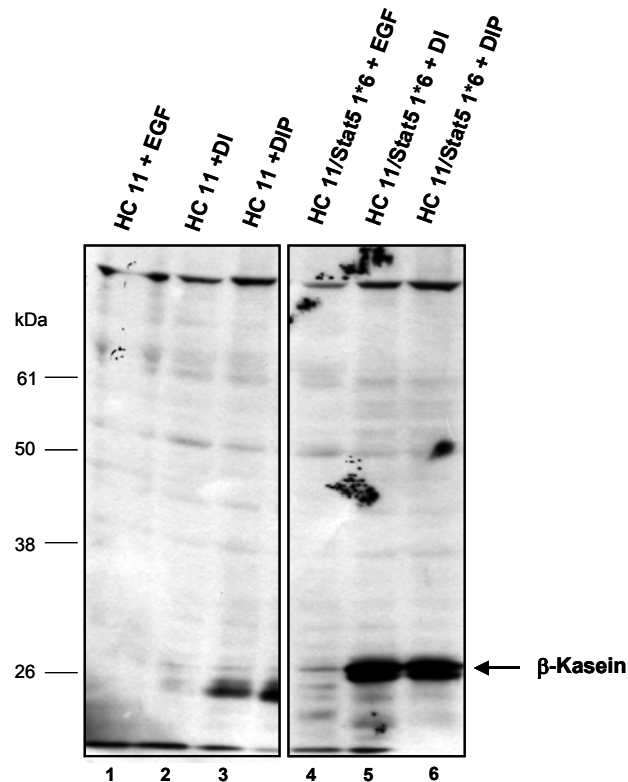


Abbildung 6.5-2: Nachweis des endogenen Milchproteins β -Kasein durch Western Blot Analyse bei HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit EGFP oder dem Stat5A 1*6 retroviralen Expressionsplasmid transduziert. Vier Tage Postkonfluent werden die Zellen mit EGF (Spur (1) und (4)); mit Dexamethason und Insulin (Spur (2) und (5)) oder mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin (Spur (3) und (6)) stimuliert. Vier Tage nach β -Kaseininduktion werden Gesamtzelllysate mit RIPA angefertigt. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 100 μ g je Spur des 12% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) bis (3) EGFP-Kontrollzellextrakte; (4) bis (6) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen [Der Pfeil markiert die β -Kasein Bande (MW = 25,3 kDa)].

Die Western Blot Analyse zeigt verschiedene Bandenmuster im Bereich von ca. 26 kDa. Dies entspricht auch den erwarteten Molekulargewichten der verschiedenen Milchproteine, die sich im Bereich von 14 - 36 kDa befinden. Das Molekulargewicht von β -Kasein entspricht 25,3 kDa (Pfeil in Abbildung 6.5-2). Die für β -Kasein typische Doppelbande istverstarkt in Zellen nachweisbar, die konstitutiv aktives Stat5A enthalten (Spuren (4) bis (6)). In den Kontrollzellen wirdverstarkt ein Protein mit niedrigerem Molekulargewicht exprimiert (Spuren (1) bis (3)). Dieses Protein ist durch Dexamethason und Insulin bereits leicht induzierbar (Spur (2)), wird jedoch durch Kostimulation mit Prolaktin deutlich verstärkt (Spur (3)). Es könnte sich hierbei um das 21,1 kDa große γ -Kasein oder das 20,0 kDa große κ -Kasein handeln. Die Expression von β -Kasein ist nur sehr schwach in den Kontrollzellen und auch in nicht induzierten Zellen nachweisbar. Durch Zugabe von DIP wird die Induktion noch gesteigert. Im Falle der konstitutiv aktiven Mutante lässt sich auch ohne Induktion eine schwache Bande feststellen (Spur (4)). Durch Zugabe von Dexamethason, Insulin und Prolaktin lässt

sich deutlich die charakteristische β -Kasein-Doppelbande nachweisen (Spur (6)). Eine Stimulation nur mit Dexamethason und Insulin ist ausreichend, um β -Kasein zu induzieren. Die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante kann den Prolaktinsignalweg hierbei ersetzen (Spur (5)).

Da der hier verwendete Antikörper ein Polyserum gegen Milchproteine ist, wird zur weiteren Charakterisierung der β -Kaseininduktion durch die Stat5A 1*6-Mutante β -Kasein mRNA mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen. Die hierfür verwendeten Primer binden spezifisch an die mRNA von β -Kasein, so dass andere Milchproteine nicht detektiert werden. Der Versuchsaufbau ist ähnlich zu dem des Proteinnachweises. Stabil mit Stat5A-Wildtyp und der konstitutiv aktiven Mutante transduzierte HC11 Zellen werden durch Stimulation mit laktogenen Hormonen differenziert. Bei diesem Versuchsansatz werden die Zellen mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin in jeweiliger Zweierkombination für 3 h stimuliert, die RNA isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch anschließende PCR wird das β -Kasein nachgewiesen. Abbildung 6.5-3 zeigt die erhaltenen Ergebnisse:

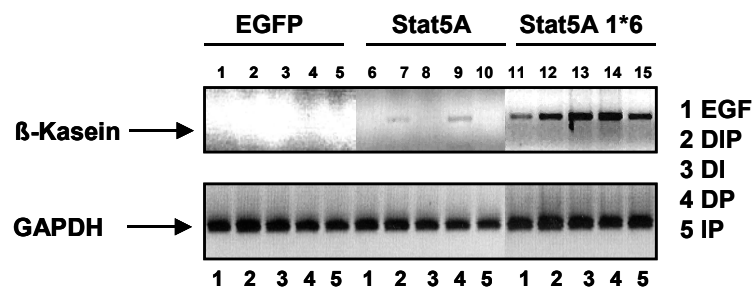


Abbildung 6.5-3: Nachweis des Milchproteins β -Kasein in HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit EGFP, Stat5A-Wildtyp oder dem Stat5A 1*6 retroviralen Expressionsplasmid transduziert. Vier Tage postkonfluent werden die Zellen mit EGF (1); mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin (2); mit Dexamethason und Insulin (3); mit Dexamethason und Prolaktin (4) und mit Insulin und Prolaktin (4) stimuliert. Nach Stimulation für 3 h werden die Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert. 2 μ g der RNA werden für die reverse Transkriptase-Reaktion verwendet. Pro PCR-Ansatz werden im Falle des β -Kaseins 200 ng der cDNA bzw. 100 ng cDNA des GAPDH-Nachweises verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert.

In den Spuren (1) bis (5) ist die β -Kaseinexpression in Kontrollzellen dargestellt, in den Spuren (6) bis (10) die Expression in Zellen mit Wildtyp-Stat5A und in den Spuren (11) bis (15) die Expression in Zellen mit Stat5A 1*6. β -Kasein ist in Zellen mit endogenem Stat5A nicht nachweisbar. Eventuell ist die Stimulation für 3 h zu kurz gewählt, um effizient β -Kasein exprimieren zu können. In Zellen, die mit Stat5A-Wildtyp transduziert wurden, lässt sich β -Kasein-RNA nach Stimulation mit DIP und DP nachweisen. Für eine β -Kaseinexpression ist eine Dexamethason- und Prolaktinstimulation ausreichend. In Zellen, die konstitutiv aktives Stat5A enthalten, ist β -Kasein auch ohne Stimulation nachweisbar. Die Expression wird jedoch durch Zugabe von DIP, DI und

DP in gleichem Maße erhöht. Eine Stimulation nur mit IP induziert zwar auch β -Kasein, jedoch nicht in dem Maße, wie zuvor beschrieben.

Es hat sich gezeigt, dass die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante endogene Gene, die als Marker der Brustgewebsdifferenzierung angesehen werden, anschalten kann. Daher ist diese Mutante auch für *in vivo* Versuche geeignet.

6.6 Einfluss von Stat5 auf Brustepithelzellen *in vivo*

Die Epithelzelllinie HC11 ist aus dem Brustgewebe von BALB/c-Mäusen abgeleitet und besitzt stammzellähnlichen Charakter. Sie ist in der Lage, Brustgewebe *in vivo* nachzubilden. Hierzu werden BALB/c-Mäusen die eigenen Brustdrüsen entfernt und durch Injektion von HC11 Zellen in das Fettgewebe ersetzt. Nach einer Zeitspanne von mindestens 3 Wochen lässt sich das rekonstituierte Brustgewebe im Fettgewebe nachweisen.

In dem hier verwendeten Versuchsaufbau werden HC11 Zellen stabil mit Hilfe von Retroviren mit der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante und dem leeren Vektor als Kontrolle transduziert. Als Marker für die Transduktion wird ein Vektor mit einem IRES GFP-Element verwendet. Die Transduktionseffizienz wird mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt und beträgt für die Mutante ca. 81% und für die Kontrollzellen ca. 95%. Den drei Wochen alten BALB/c-Mäusen wird jeweils links und rechts die vierte Brustdrüsenanlage entnommen und durch transduzierte HC11 Zellen ersetzt. Es werden zwei Versuchsansätze mit je vier Mäusen (= 8 Brustdrüsen) pro Konstrukt verwendet. In dem ersten Versuchsansatz werden die Mäuse in einem jungfräulichen Zustand belassen, um den Einfluss von Stat5A auf das nicht differenzierte Gewebe zu untersuchen. Im zweiten Versuchsansatz werden die Mäuse zweimal innerhalb von vier Monaten trächtig, damit das Brustgewebe zu milchproduzierenden Zellen differenziert. Das rekonstituierte Brustgewebe wird anschließend sowohl kryo- als auch praffinfixiert, bzw. als gesamtes Gewebe auf Objektträger aufgezogen und fixiert (*whole mounts*).

Die Analyse des gesamten Gewebes einschließlich der Brustdrüsen wird vier Monate nach Injektion der HC11 Zellen vorgenommen. Hierbei werden sowohl jungfräuliche, als auch enddifferenzierte HC11-Stat5A 1*6-Brustdrüsen mit den Kontrollzellen verglichen (Abbildung 6.6-1).

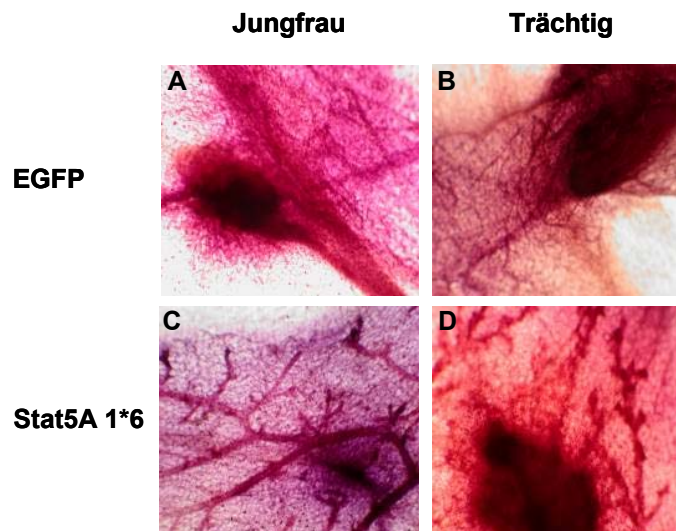


Abbildung 6.6-1: Gesamtansicht der murinen Brustdrüsen. Die pMX Stat5A 1*6 IRES GFP-transduzierten HC11 Zellen (c, d) oder pMX IRES GFP-kontrolltransduzierten HC11 Zellen (a, b) werden in das von der Brustdrüse gereinigte Fettgewebe von 3 Wochen alten BALB/c Mäusen injiziert. Die eine Hälfte der transplantierten Mäuse wird innerhalb von 4 Monaten zweimal trächtig, während die andere Hälfte jungfräulich bleibt. Nach 4 Monaten werden die Brustdrüsen aus den Mäusen entfernt, auf Objektträgern fixiert und mit Karminrot gefärbt [4 x Objektiv].

Die Rekonstitution des Brustgewebes durch HC11 Zellen ist nicht vollständig. Wie schon einige andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, bilden HC11 Zellen einige normale epitheliale Strukturen aus. Sie sind jedoch nicht in der Lage, das komplette Fettgewebe auszufüllen (Humphreys and Rosen, 1997, Brandt *et al.*, 2001). Die hier vorliegenden Ergebnisse ähneln den schon gezeigten Analysen: Die HC11-EGFP und die HC11-Stat5A 1*6 Zellen entwickeln nur kleine Wachstumsbereiche, die nicht das gesamte Fettgewebe durchdringen.

In Brustgewebe aus HC11-Stat5A 1*6 Zellen wird zudem die Entstehung eines Tumors beobachtet. Aufgrund des geringen Versuchsumfangs (ein Tumor in zwei Brustdrüsen), ist jedoch keine signifikante Aussage zu treffen (Abbildung 6.6-2).

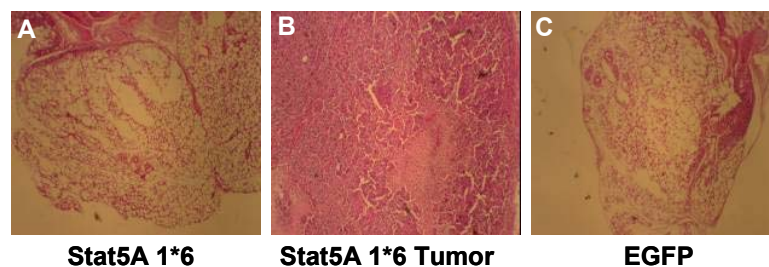


Abbildung 6.6-2: H&E-Färbung des Brustdrüsengewebes aus HC11-EGFP und HC11-Stat5A 1*6 Zellen, sowie des daraus resultierenden Tumors. (A) Histologischer Gewebeschnitt aus HC11-Stat5A 1*6 Zellen, (B) Histologischer Gewebeschnitt des HC11-Stat5A 1*6 induzierten Tumors, und (C) Histologischer Gewebeschnitt aus HC11-EGFP Zellen [10 x Objektiv].

Die Analyse des gesamten Gewebes sowie der histologischen Schnitte ergeben keine gravierenden Unterschiede in der Ausbildung des Brustepithels zwischen Stat5A 1*6

und EGFP-transduzierten Zellen. Diese Art der Analyse lässt jedoch keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Epithelzelltypen zu.

Das Brustgewebe besteht aus zwei Arten von Epithelzellen: den Epithelzellen der Milchgänge und denen der sekretorischen Drüsen (Alveolaren). Um die histologische Identität der Epithelzellen zu bestimmen, wird die Expression bestimmter Markerproteine - sowohl für die Milchgänge (NKCC1) als auch für die Alveolaren (Npt2b) - mit Hilfe immunhistologischer Methoden bestimmt. Die Identifizierung der HC11 Zellen *in vivo* erfolgt mit Hilfe des internen Markerproteins GFP an Kryoschnitten, da durch die Paraffinfixierung die Proteine denaturieren und GFP nicht mehr mit Hilfe seiner Fluoreszenz nachgewiesen werden kann (Abbildung 6.6-3).

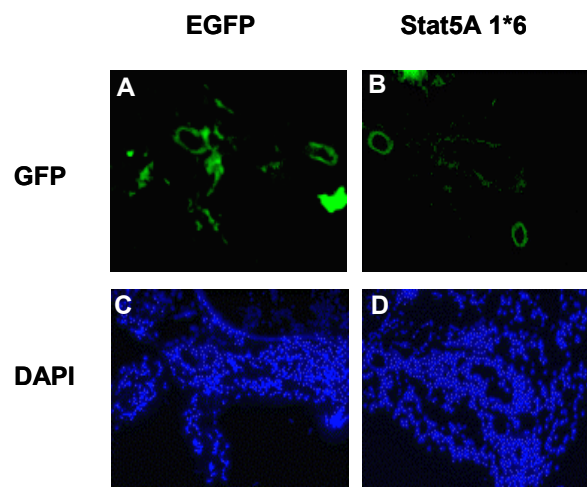


Abbildung 6.6-3: GFP-Expression in der murinen Brustdrüse. (A, C) Brustdrüse aus HC11-EGFP Zellen, (B, D) Brustdrüse aus HC11-Stat5A 1*6 Zellen. (A, B) GFP-Expression, (C, D) Kernfärbung mit DAPI [10 x Objektiv].

Sowohl in Brustdrüsen aus HC11-EGFP (Abbildung 6.6-3 (A)), als auch in HC11-Stat5A 1*6 Brustdrüsen (Abbildung 6.5-3 (B)) lässt sich das GFP-Protein detektieren. Besonders gut ist die Expression in den Epithelzellen der Milchgänge zu erkennen. Die markierten HC11 Zellen exprimieren auch *in vivo* GFP und lassen sich in Gewebeschnitten nachweisen.

Der Na-K-Cl-Cotransporter (NKCC1) wird vor allem in Epithelzellen der Milchgänge exprimiert und ist somit ein guter Marker für die Identifizierung epithelialer Strukturen der Milchgänge. Auch exprimieren HC11 Zellen *in vitro* den Na-K-Cl-Cotransporter (Selvaraj *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Expression von NKCC1 in HC11-Stat5A 1*6 und HC11-EGFP-Epithelium in jungfräulichem und enddifferenziertem Gewebe mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen (Abbildung 6.6-4).

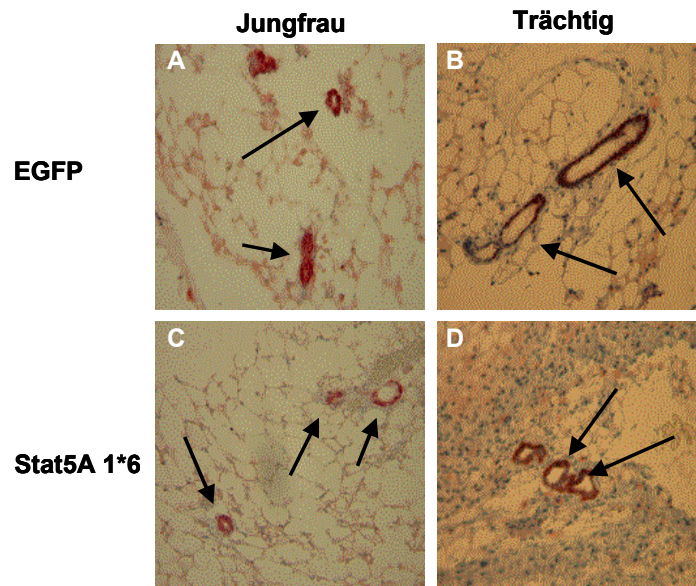


Abbildung 6.6-4: NKCC1 Expression in Stat5A 1*6- und EGFP-Brustgewebe von jungfräulichen und trächtigen Mäusen. Immunhistologische Färbung von NKCC1 im Brustepithel von jungfräulichen (A, C) und trächtigen Mäusen (B, D). NKCC1 ist sowohl in den Milchgängen der Kontrollmäuse (A, B), als auch in den Milchgängen der Stat5A 1*6 Mäuse (C, D) zu beobachten. Das Stat5A 1*6 Epithelium zeigt jedoch im Vergleich zum Kontrollgewebe vermehrt alveoläre Strukturen auf [20 x Objektiv].

In jungfräulichen Mäusen ist NKCC1 sowohl in den EGFP-Transplantaten als auch in den Stat5A 1*6-Transplantaten nachweisbar (Abbildung 6.6-4 (A) und (C)). Auch nach zwei Geburten ist der Kotransporter in beiden Transplantaten nachweisbar (Abbildung 6.6-4 (B) und (D)). Das Stat5A 1*6-Epithelium zeigt jedoch im trächtigen Zustand im Vergleich zum EGFP-Epithelium vermehrt alveolare Strukturen auf. Die Milchgänge sind im Durchschnitt kleiner und runder und das Lumen ist nicht so stark ausgeprägt wie in den Kontrollschnitten.

Die Na-P-Cotransporterisofom Npt2b ist vor allem in laktierendem Gewebe, nicht aber in jungfräulichem nachweisbar (Miyoshi *et al.*, 2001) und dient als potentieller Marker für sekretorische Drüsen (Alveolaren). Die Expression von Npt2b wird sowohl im jungfräulichen als auch in differenziertem Gewebe untersucht und die zelluläre Lokalisation des Npt2b-Proteins durch Immunhistochemie nachgewiesen (Abbildung 6.6-5).

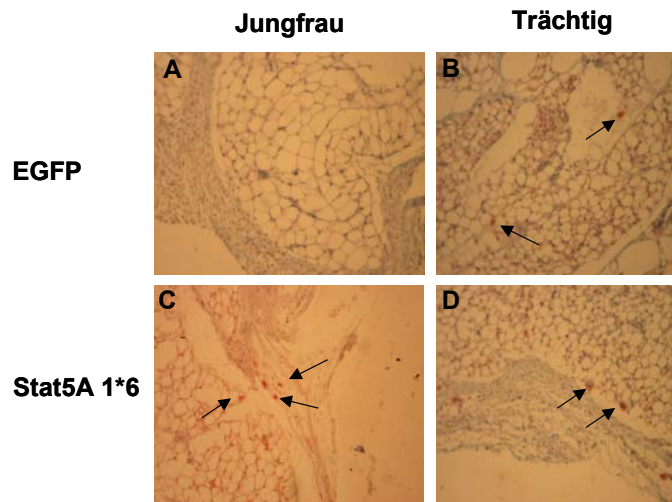


Abbildung 6.6-5: Nachweis der Expression des Alveolarenmarkers Npt2b in jungfräulichem Stat5A 1*6-Gewebe, nicht aber im Kontrollgewebe. Immunhistologische Färbung von Npt2b im Brustepithel von jungfräulichen (A, C) und trächtigen Mäusen (B, D). Npt2b ist sowohl in den Alveolen der trächtigen Kontrollmäuse (B), als auch in den Alveolen der trächtigen Stat5A 1*6-Mäuse (D) zu beobachten. Das Stat5A 1*6-Epithelium zeigt schon Alveolarenbildung im jungfräulichen Stadium (C) im Vergleich zum Kontrollgewebe (A). Die Pfeile markieren jeweils die Alveolaren [10 x Objektiv].

Im HC11-EGFP-Brustgewebe ist Npt2b nur in differenziertem Gewebe nach einer Schwangerschaft nicht aber in jungfräulichem Gewebe nachweisbar (Abbildung 6.6-5 (A) und (B)). Interessanterweise ist der Marker für sekretorische Alveolaren im jungfräulichen HC11-Stat5A 1*6-Gewebe nachweisbar (Abbildung 6.6-5 (C)).

Brustgewebe aus Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A bilden auch vermehrt sekretorische Alveolaren ohne äußeren Stimulus zur Milchproteinbildung, so dass differenzierte Alveolaren schon im jungfräulichen Stadium detektierbar sind.

6.7 Einfluss der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf die Apoptose von HC11 Zellen

In Kapitel 6.5 wird der Einfluss von konstitutiv aktivem Stat5A auf die Differenzierung von Brustepithelzellen untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die konstitutiv aktivierte Stat5A-Mutante eine frühe Epithelzellendifferenzierung induziert. In der Literatur wird noch ein dritter möglicher Einfluss von Stat5A auf das Zellverhalten diskutiert. Socolovsky und Mitarbeiter zeigten eine direkte Einflussnahme von Stat5A auf das Apoptoseverhalten von Erythrozytenvorläuferzellen (Socolovsky *et al.*, 1999). Auch im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass sich in nicht transformierten Brustepithelzellen, die konstitutiv aktives Stat5A enthalten, bei Serumentzug eine erhöhte Anzahl an Zellen in der subG₁-Phase befinden (siehe Abbildung 6.3.6). In den

in diesem Kapitel vorgestellten Versuchen, wird nun die Einflussnahme von Stat5A auf die Apoptose von Brustepithelzellen näher untersucht.

Zur Untersuchung, inwieweit Stat5A Einfluss auf die Apoptose nimmt, werden nicht transformierte Brustepithelzellen HC11 stabil mit Hilfe von Retroviren transduziert und der prozentuale Anteil der Zellen in der subG₁-Phase bestimmt. In diesem Versuchsansatz werden Zellen mit konstitutiv aktiver Stat5A 1*6-Mutante mit Stat5A-Wildtyp Zellen verglichen. Als Kontrolle dienen wiederum Zellen, die nur mit pMX IRES GFP-Vektor transduziert sind. In Abbildung 6.7-1 sind die prozentualen Zellzahlen in der subG₁-Phase graphisch aufgetragen.

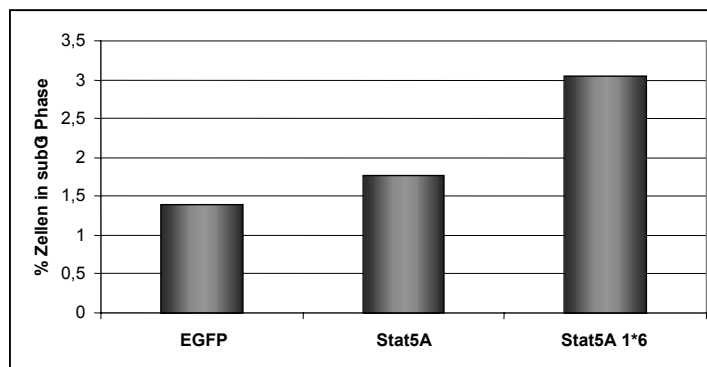


Abbildung 6.7-1: Einfluss von Stat5 auf die Apoptoserate von HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit Stat5A-Wildtyp, Stat5A 1*6-Mutanten oder EGFP transduziert und $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach Zellaussaat werden die Zellen fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und die jeweilige Phase des Zellzyklusses im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden die Zellen in der subG₁-Phase aufgetragen.

Unter normalen Kulturbedingungen in Wachstumsmedium und 10% FCS befinden sich ca. 1,5% der HC11 Zellen in der subG₁-Phase. Zellen, die Stat5A-Wildtyp überexprimieren, zeigen etwa den gleichen prozentualen Anteil apoptotischer Zellen, wie die Kontrollzellen. Enthalten Zellen hingegen die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante, verdoppelt sich der Anteil an Zellen in der subG₁-Phase auf ca. 3%.

6.7.1 Stat5A 1*6 inhibiert die Expression von Bcl-X_L

Bcl-X_L gehört zu den antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Es ist darüber hinaus als direktes Zielgen von Stat5A in erythropoetischen Zellen beschrieben worden (Socolovsky *et al.*, 1999). Die Frage schließt sich an, ob konstitutiv aktives Stat5A über die Regulation der Bcl-X_L-Expression die Apoptose beeinflusst. Für den Nachweis werden mit Stat5A 1*6 transduzierte Zellen ausgesät und für 48 h inkubiert. Nach einer Gesamtzelllyse mit RIPA-Puffer werden die Zellextrakte elektrophoretisch aufgetrennt und Bcl-X_L mit Hilfe der Western Blot Analyse immunchemisch detektiert. In Abbildung 6.7-2 ist die Western Blot Analyse dargestellt.

In Spur (1) sind Kontrollzellextrakte und in Spur (2) Zellextrakte, die konstitutiv aktives Stat5A 1*6 enthalten, aufgetragen.

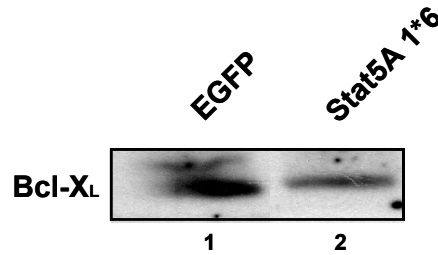


Abbildung 6.7-2: Nachweis von Bcl-X_L durch Western Blot Analyse in HC11 Zellen. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 100 µg je Spur des 14% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte; (2) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen (MW = 26 kDa).

Bei der Bande handelt es sich um das unter reduzierenden Bedingungen 26 kDa große Bcl-X_L-Protein, welches in beiden Proben vorhanden ist. Es liegt jedoch in der Stat5A 1*6 Probe in verringerter Menge vor. Demzufolge könnte eine Reduktion des Anteils an Bcl-X_L-Protein in Zellen mit konstitutiv aktiven Stat5A die Sensitivität für Apoptose erhöhen. Die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante inhibiert die Bcl-X_L-Expression jedoch nicht vollständig.

6.7.2 Funktion von SOCS1 und SOCS3 bei der Regulation der Apoptose von HC11 Zellen

SOCS-Gene werden durch eine negative Rückkopplungsschleife Stat-abhängig induziert. SOCS1- und 3-Proteine können an Tyrosinkinaserzeptoren oder an JAKs binden und so den JAK/Stat-Signaltransduktionsweg inhibieren. Zur Überprüfung, ob SOCS-Proteine durch Inhibierung des JAK/Stat-Weges an der Erhöhung der Apoptoserate beteiligt sind, werden zuerst die endogene SOCS-Konzentrationen in Abhängigkeit von konstitutiv aktivem Stat5A analysiert. Aus transduzierten HC11 Zellen wird 48 h nach der Transduktion die RNA extrahiert und die SOCS1- und SOCS3-RNA-Menge mit Hilfe der RT-PCR-Methode bestimmt (Abbildung 6.7-3).

Die Expression von SOCS1 wird mittels Echt-Zeit-PCR quantitativ bestimmt. Die erhaltenen PCR-Werte werden nach der „ ΔC_T “-Methode mit den PCR-Werten des GAPDH-Gens verrechnet.

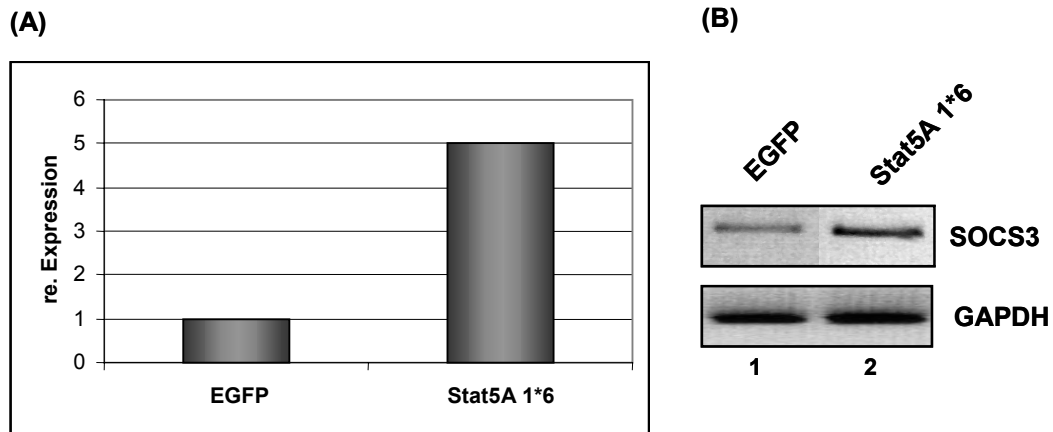


Abbildung 6.7-3: (A) Quantitativer SOCS1-Expressionsnachweis mit Hilfe der „Echt-Zeit-PCR“ in HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 oder mit EGFP als Kontrolle transduziert. Die Zellen werden ausgesät, für 24 h in Kulturmedium inkubiert und für 16 h serumfrei kultiviert. Die Zellen werden zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert und 2 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 200 ng der cDNA wird als Matrize in der „Echt-Zeit-PCR“ mit spezifischen SOCS1- bzw. GAPDH-Primern eingesetzt. Die relative Expression wird mit Hilfe der ΔC_T -Methode, bezogen auf Kontrollzellen, errechnet.
 (B) Nachweis von SOCS3. HC11 Zellen werden mit konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 oder mit EGFP als Kontrolle transduziert. Die Zellen werden ausgesät, für 24 h in Kulturmedium inkubiert und für 16 h serumfrei kultiviert. Die Zellen werden zur Gewinnung von Gesamt-RNA lysiert. 2 µg der RNA wird für die reverse Transkriptase-Reaktion verwendet. Pro PCR-Ansatz werden im Falle von SOCS3 200 ng der cDNA bzw. 100 ng cDNA für den GAPDH-Nachweis verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert.

Sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Stat5A 1*6 transduzierten Zellen ist SOCS1 vorhanden. Durch Überexpression der Stat5A 1*6-Mutante lässt sich die SOCS1-Expression noch um ca. das 5fache steigern.

In Abbildung 6.7-3 (B) ist die RT-PCR-Analyse der gleichen Proben mit SOCS3-Primern abgebildet. Als Referenzwert dient die Expression von GAPDH. Auch die SOCS3-Expression wird durch konstitutiv aktives Stat5A signifikant erhöht. Die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante ist im Vergleich zu den Kontrollzellen in der Lage, die negativen Regulatoren des JAK/Stat-Signaltransduktionsweges, SOCS1 und SOCS3, zu induzieren.

Da die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante die Expression der beiden SOCS-Gene induzieren kann, wird untersucht, ob diese Erhöhung in Zusammenhang mit der Erhöhung der Apoptoserate steht. Hierfür werden SOCS1 und SOCS3 in HC11 Zellen mit Hilfe von Retroviren überexprimiert. Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen wird die subG₁-Phase analysiert und in Abbildung 6.7-4 graphisch aufgetragen. Als Kontrolle dienen mit pMX IRES GFP transduzierte Zellen.

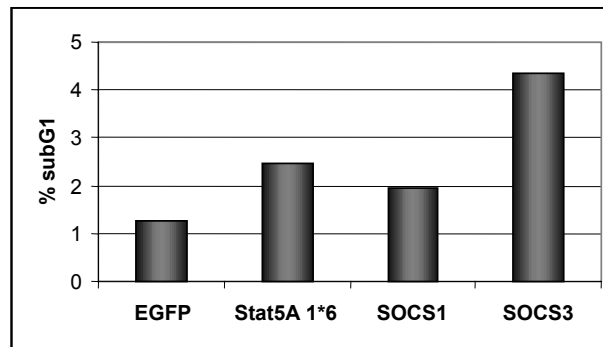


Abbildung 6.7-4: Einfluss von SOCS1 und SOCS3 auf die Apoptoserate von HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit SOCS1, SOCS3, Stat5A 1*6 Mutante oder EGFP alleine transduziert und $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach Zellaussaat werden die Zellen fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Zellzyklus im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden Zellen in der subG₁-Phase verwendet.

Es zeigt sich, dass durch Überexpression von SOCS1 die Apoptoserate um das Doppelte gesteigert werden kann. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem durch das konstitutiv aktive Stat5A ausgelösten Effekt. Bei einer Überexpression von SOCS3 lässt sich der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen sogar um das 3,5fache steigern. Die Überexpression der SOCS-Proteine führt zu einer Erhöhung der Apoptoserate in HC11 Zellen.

6.7.3 Einfluss des JAK-Inhibitors AG490 auf die Apoptose von Brustepithelzellen

Zum jetzigen Zeitpunkt zeigt sich folgender Zusammenhang zwischen konstitutiv aktivem Stat5A, SOCS1 und SOCS3: In nicht transformierten Brustepithelzellen erhöht konstitutiv aktives Stat5A die Apoptoserate und die Expression der Negativ-Regulatoren des JAK/Stat-Signalweges, SOCS1 und SOCS3. Die Überexpression der beiden SOCS-Proteine führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Apoptoserate. SOCS-Proteine regulieren den Signaltransduktionsweg, indem sie die Janus-Kinasen inhibieren. Inwieweit das Blockieren der Janus-Kinasen Apoptose in nicht transformierten Brustepithelzellen fördert, soll in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

Der Einfluss des JAK-Inhibitors AG490 (Torcic) auf die Apoptoseinduktion von Brustepithelzelllinien wird exemplarisch an zwei Tumorzelllinien (MCF7, SKBR3) und einer nicht transformierten Brustepithelzelllinie (HC11) untersucht. Die Zellen werden mit gleicher Zellzahl ausgesät und 48 h im Inkubator kultiviert. Nach Zugabe von 50 µM AG490 für drei Tage werden die Zellen geerntet, fixiert und für die Messung des Zellzyklusses im FACS mit Propidiumiodid gefärbt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden jeweils die Zellen in der subG₁-Phase ausgewertet. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen (Abbildung 6.7-5)

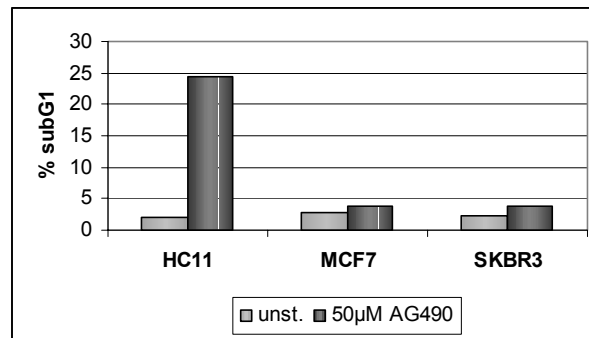


Abbildung 6.7-5: Einfluss des JAK-Inhibitors AG490 auf die Apoptoserate von HC11, MCF7 und SKBR3 Zellen. Es werden $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach Zellaussaat werden die Zellen für drei Tage mit 50 μM AG490 stimuliert, fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Zellzyklus im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden Zellen in der subG₁-Phase verwendet.

Werden HC11 Zellen mit dem JAK-Inhibitor für drei Tage stimuliert, erhöht sich die Anzahl der Zellen in der subG₁-Phase um das 10fache. Bei Inhibition der Janus-Kinase durch AG490 reagieren nicht transformierte Zellen mit einer Erhöhung der Apoptose, während die Tumorzellen kaum ihr Apoptoseverhalten ändern. Es zeigt sich, dass bei MCF7 Zellen drei Tage nach Zugabe von AG490 keine Erhöhung der Apoptose zu beobachten ist. Auch SKBR3 Zellen zeigen nur eine leichte Erhöhung der Apoptose nach AG490-Zugabe.

6.7.3.1 Nachweis der Spezifität des JAK-Inhibitors

Das AG490 wird in der Literatur als spezifischer Janus-Kinasen-Inhibitor beschrieben. Laut Produktbeschreibung inhibiert AG490 aber nicht nur JAKs, sondern auch den EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor* = EGFR). Es wird daher der Einfluss von AG490 auf den EGF-Rezeptor in HC11 Zellen näher untersucht.

Mit Stat5A 1*6 oder pMX IRES GFP transduzierte HC11 Zellen werden mit AG490 stimuliert. Nach der Zellyse mit RIPA-Puffer wird die Phosphorylierung des EGFR mit einem Antikörper, der unspezifisch phosphorylierte Tyrosinreste erkennt, analysiert (Abbildung 6.7-6). Nach Entfernen des Antikörpers durch „strippen“ der Blotmembran, wird mit einem Antikörper, der spezifisch gegen den EGFR gerichtet ist, die gleiche Membran nochmals inkubiert. Die Pfeile markieren jeweils den EGFR mit einem Molekulargewicht von 170 kDa.

Die Phosphorylierung des EGFR wird durch AG490 nicht beeinflusst. In HC11 Zellen inhibiert AG490 nicht den EGF-Rezeptor. Der Effekt von AG490 kann somit nicht auf eine Inhibierung der Phosphorylierung des EGFR zurückgeführt werden.

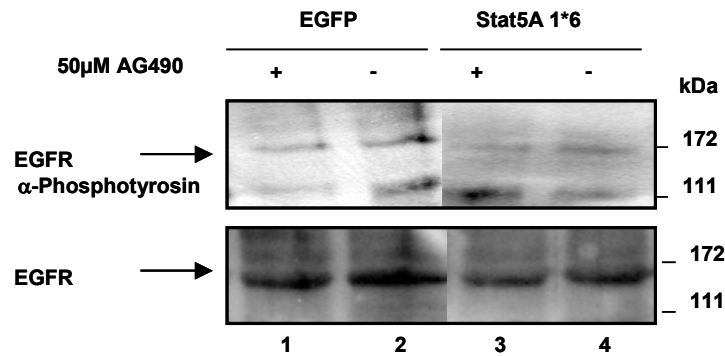


Abbildung 6.7-6: Nachweis von phosphoryliertem EGF-Rezeptor nach AG490-Stimulation durch Western Blot Analyse. Der aufgetragene HC11 Gesamtproteingehalt beträgt 100 µg je Spur des 14% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte; (2) EGFP-Kontrollzellextrakte nach AG490 Stimulation; (3) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen und (4) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen nach AG490 Stimulation [Der Pfeil markiert jeweils die spezifische EGFR-Bande (MW = 170 kDa)].

6.7.4 Veränderung des Apoptoseverhaltens durch Transduktion einer konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante und SOCS1- und SOCS3-Überexpression

Untersuchungen mit dem JAK-Inhibitor zeigen, dass in HC11 verstärkt Apoptose induziert werden kann, wenn die Janus-Kinase nicht mehr funktionell ist. In der Literatur wird dieses Phänomen mit einer Inhibition der Phosphorylierung eines konstitutiv aktivem Stat3 beschrieben (Burke *et. al.*, 2001). Nachfolgende Untersuchungen sollen klären, ob ein Zusammenhang zwischen konstitutiv aktivem Stat5, der Hochregulation von SOCS-Proteinen und der Dephosphorylierung von Stat3 existiert.

Für den Nachweis, inwieweit konstitutiv aktives Stat5A HC11 Zellen für die AG490 vermittelte Apoptose sensibilisiert, werden transduzierte Zellen mit AG490 für unterschiedliche Zeiträume stimuliert (Abbildung 6.7-7 (A)). Um den Einfluss von SOCS-Proteinen auf die Erhöhung der Apoptoserate zu untersuchen, werden in HC11 Zellen SOCS1- und SOCS3-Proteine überexprimiert und für 48 h mit AG490 inkubiert (Abbildung 6.7-7 (B)).

Als Kontrolle dienen wiederum mit leerem pMX IRES GFP transduzierte Zellen. Die quantitative Auswertung der apoptotischen Zellen erfolgt mit Hilfe der Zellzyklusanalyse von propidiumiodidgefärbten Zellen. Zum spezifischen Nachweis der Apoptose wird der TUNEL-Assay verwendet (Abbildung 6.7-8).

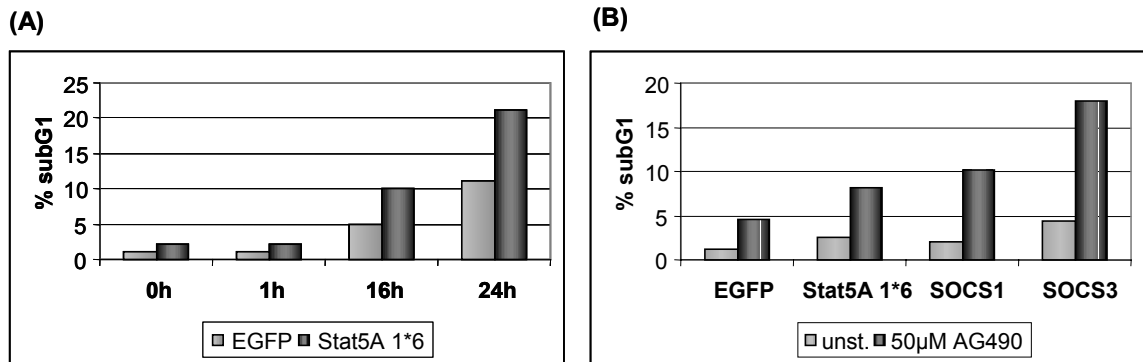


Abbildung 6.7-7: (A) Einfluss des JAK-Inhibitors AG490 auf die Apoptoserate von HC11 Zellen. HC11 Zellen werden mit der Stat5A 1*6-Mutante oder EGFP alleine transduziert und in einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach Zellaussaat werden die Zellen mit 50 μM AG490 für 0, 1, 16 und 24 h stimuliert, fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Zellzyklus im FACS bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden Zellen in der subG₁-Phase verwendet. (B) Einfluss von SOCS1 und SOCS3 auf die Apoptoserate von HC11 Zellen nach Inhibition der Janus-Kinase durch AG490. HC11 Zellen werden mit SOCS1, SOCS3, Stat5A 1*6-Mutante oder EGFP alleine transduziert und mit einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach der Zellaussaat werden die Zellen für 24 h mit 50 μM AG490 stimuliert, fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Zellzyklus im FACS bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden Zellen in der subG₁-Phase verwendet.

Es zeigt sich, wie bereits in Abbildung 6.7-1 gezeigt, eine Verdopplung apoptotischer Zellen bei Stat5A 1*6 transduzierten Zellen, sowohl mit als auch ohne AG490-Stimulation.

Eine Stunde Inkubation der Zellen mit dem JAK-Inhibitor zeigt noch keinen Einfluss auf die Apoptoserate von HC11 Zellen. Erst nach 16 h Inkubation erhöht sich die Anzahl der Zellen in der subG₁-Phase auf 5% und nach 24 h wird sogar ein Wert von etwa 11% apoptotischer Zellen erreicht. Der gleichen Zeitkinetik unterliegen auch die mit konstitutiv aktivem Stat5A-transduzierten Zellen. Jedoch verdoppeln sich die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen. So liegen schon im unstimulierten Ansatz doppelt so viele apoptotische Zellen vor wie in den Kontrollen. Nach 1 h Inkubation mit AG490 ändert sich die Apoptoserate nicht. Während der 16 h Stimulation erhöht sich die Apoptoserate auf 10%, doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen und nach 24 h Stimulation befinden sich etwa 20% der Zellen in der subG₁-Phase. In Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A sind im Vergleich zu den Kontrollzellen, zu jedem Zeitpunkt der Kinetik ungefähr doppelt so viele Zellen in der subG₁-Phase vorhanden.

Durch Überexpression von SOCS1 und SOCS3 wird ebenfalls die Apoptoserate erhöht. Bei Überexpression von SOCS3 in HC11 Zellen wird eine Vervielfachung der apoptotischen Zellen beobachtet.

Durch Stat5A wird in HC11 Zellen SOCS3 induziert (vgl. Abbildung 6.7-3). Konstitutiv aktives Stat5 1*6 fördert in HC11 Zellen die Apoptose durch Induktion von SOCS1 und SOCS3. Die synergistische Erhöhung der SOCS3-Expression korreliert mit der

synergistischen Erhöhung der Apoptose. Die SOCS-Proteine sind somit wichtige Regulatoren der Apoptose in HC11 Zellen.

Mit Hilfe des TUNEL-Assays wird der Anteil apoptotischer Zellen verifiziert. Der TUNEL-Assay bestätigt das Ergebnis der FACS-Analyse. Durch Expression einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante werden HC11 Zellen für die Induktion von Apoptose durch AG490 sensibilisiert.

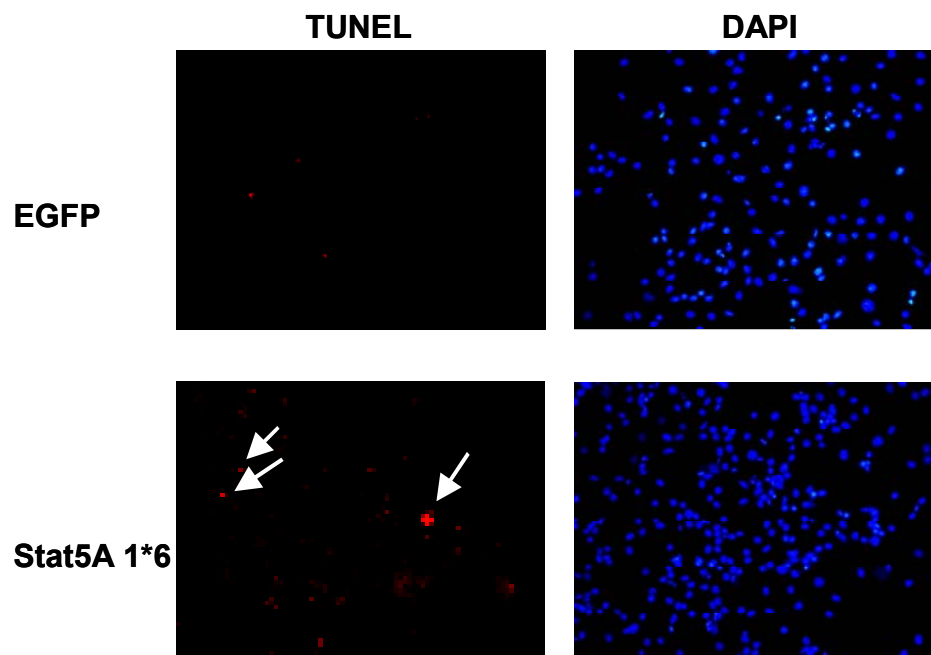


Abbildung 6.7-8: Bestimmung der apoptotischen Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays. HC11 Zellen werden mit Stat5A 1*6-Mutante oder EGFP alleine transduziert und in einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² auf Deckgläsern ausgesät. 48 h nach Zellausaat werden die Zellen für 24 h mit 50 μ M AG490 stimuliert, fixiert und mit Hilfe des TUNEL-Assays gefärbt. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop mit einem 20 x Objektiv.

6.7.5 Einfluss von Prolaktin auf das Apoptoseverhalten von HC11 Zellen

Durch Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A wird in HC11 Zellen die Apoptose durch AG490 verstärkt. HC11 Zellen besitzen jedoch kein endogen konstitutiv aktives Stat5A. Wie bereits in Kapitel 6.2.5 beschrieben, kann durch Prolaktinstimulation endogenes Stat5A aktiviert werden und an sein RE (*response element*) im β -Kaseinpromotor binden. Um zu untersuchen, welchen Effekt Prolaktin auf die AG490 vermittelte Apoptose ausübt, werden HC11 Zellen zwei Stunden vor der AG490 Stimulation für 24 h mit Prolaktin vorinkubiert. Zur Analyse apoptotischer Zellen werden wiederum die Zellen in der subG₁-Phase ermittelt und das erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 6.7-9 dargestellt. Untersucht werden zwei verschiedene Konzentrationen an Prolaktin: Zum einen eine sehr hohe Konzentration von 5 μ g/ml, wie sie auch für die Reportergentest verwendet werden. Zum anderen eine

physiologische Konzentration von 100 ng/ml Prolaktin, wie sie für die Proliferationsstudien eingesetzt werden.

Die normale Aktivierung von Stat5 durch Prolaktin, wobei auch andere Signalwege angeschaltet werden, führt nicht zu einer erhöhten Apoptose. Im Gegenteil, Prolaktin reduziert die Anzahl apoptotischer Zellen. Nur wenn Stat5 konstitutiv aktiviert vorliegt, kommt es zu einer erhöhten Apoptose.

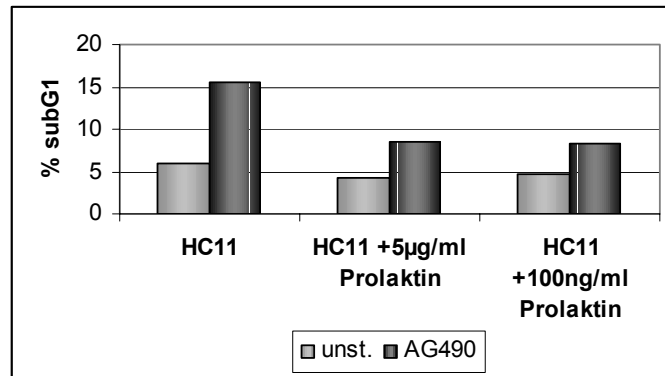


Abbildung 6.7-9: Einfluss von Prolaktin auf die Apoptoserate von HC11. Zellen werden mit einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. 48 h nach Zellaussaat werden die Zellen für 2 h mit Prolaktin vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 50 µM AG490 stimuliert, fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Zellzyklus im FACS bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate werden Zellen in der subG₁-Phase verwendet.

6.7.6 Einfluss von AG490 auf die Stat3-DNA-Bindung

Im folgenden wird untersucht, ob ein verändertes Apoptoseverhalten mit einer Änderung der Stat3-Aktivität, wie von Burke *et. al.* postuliert, einhergeht. Dazu werden HC11 Zellen mit oder ohne konstitutiv aktiver Stat5A 1*6-Mutante nach AG490-Stimulation mit WCE-Puffer lysiert. Im Gelretardierungsexperiment wird die DNA-Bindung und somit die Funktionalität von Stat3 untersucht.

Zuerst werden untransduzierte HC11 Zellen für 1, 16, 24, 48 und 72 h mit AG490 stimuliert (siehe Abbildung 6.7-10 (A)). Mit einem DNA-Oligomer, das die Stat3-spezifische Bindungssequenz enthält (vgl. Kapitel 6.1), wird eine eventuelle Änderung der Stat3–DNA-Bindung nachgewiesen. Des Weiteren wird untersucht, ob die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante sowie SOCS1 und SOCS3 ebenfalls Einfluss auf die DNA-Bindung von Stat3 nehmen (Abbildung 6.7-10 (B)).

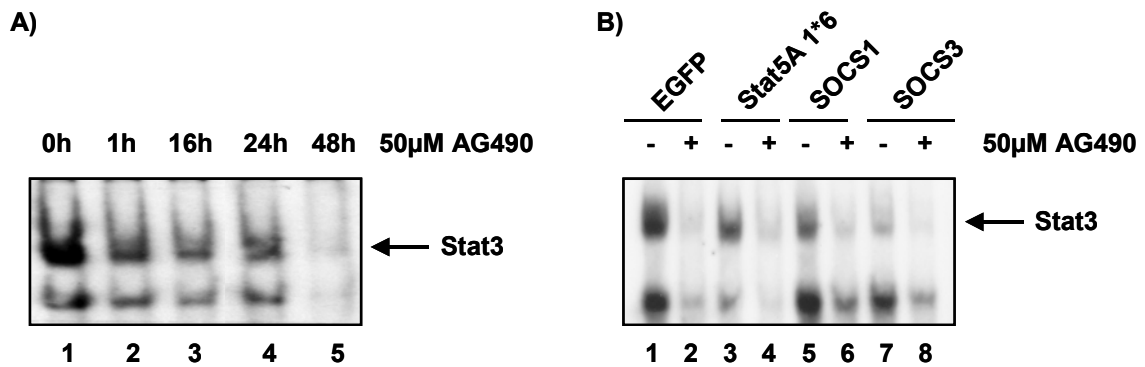


Abbildung 6.7-10: Nachweis der Stat3-Aktivität in HC11 Zellen durch Gelretardierungsuntersuchung. (A) Die Zellen werden jeweils 1, 16, 24 oder 48 h mit 50 µM AG490 stimuliert, als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. (B) HC11 Zellen werden mit EGFP alleine, Stat5A 1*6, SOCS1 oder SOCS3 transduziert und anschließend für 24 h mit 50 µM AG490 inkubiert. Der aufgetragene Gesamtzellextrakt beträgt 8 µg je Spur des nativen 4% TBE-Polyacrylamidgels. Die Gelretardierungsexperimente werden mit γ - 32 P markiertem Stat3-Bindungsselement des c-fos-Promotors durchgeführt.

Die Inhibition der Janus-Kinase durch AG490 hat eine Inhibierung der DNA-Bindung von Stat3 zur Folge. Schon nach einer Stunde ist die Menge an aktivem Stat3 reduziert und nach 24 – 48 h ist sie nur noch schwach detektierbar. Eine Inhibition der Janus-Kinase hat zur Folge, dass Stat3 nicht mehr aktiv in der Zelle vorliegt. Der zeitliche Verlauf der Hemmung der Stat3-DNA-Bindung korreliert mit dem Anstieg der Apoptose nach der AG490 Inkubation.

Eine Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 inhibiert ebenfalls die Stat3-DNA-Bindung. Durch Inkubation mit dem JAK Inhibitor lässt sich der Effekt noch verstärken. Die Inhibierung scheint über die JAK/Stat-negativ-Regulatoren SOCS1 und SOCS3 zu verlaufen, da eine Überexpression der beiden Proteine ebenfalls zu einer Dephosphorylierung von Stat3 führt. Durch Zugabe von AG490 lässt sich der Effekt noch verstärken.

6.7.7 Änderung der Bcl-X_L-Expression in Abhängigkeit von AG490 und konstitutiv aktivem Stat5A

Ein Zusammenhang zwischen Stat3-Dephosphorylierung durch AG490 und der Inhibierung der Bcl-X_L Expression wurde schon von Burke und Mitarbeitern in Brusttumor- und Ovarienkarzinomzelllinien beschrieben (Burke *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A in HC11 Zellen eine Inhibierung von Bcl-X_L und eine Reduktion der Stat3-DNA-Bindung zur Folge hat. Im folgenden Versuchsaufbau soll nun die Änderung der Bcl-X_L Expression in Abhängigkeit von AG490 und konstitutiv aktivem Stat5A untersucht werden.

Stat5A 1*6 transduzierte HC11 Zellen und die entsprechenden Kontrollzellen werden mit AG490 behandelt. Nach der Zellyse mit RIPA-Puffer werden die Gesamtzellysate

in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch anschließenden Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. In Abbildung 6.6-14 ist die Detektion von Bcl-X_L im Immunoblot zu erkennen.

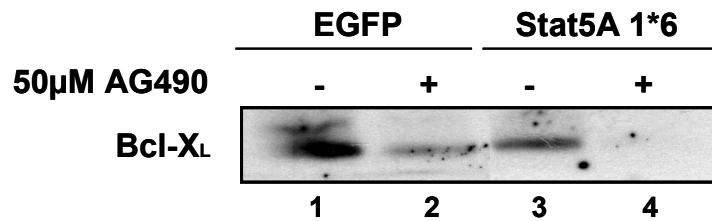


Abbildung 6.7-11: Nachweis von Bcl-X_L durch Western Blot Analyse bei HC11 Zellen nach AG490 Stimulation. Der aufgetragene Gesamtproteingehalt beträgt 100 µg je Spur des 14% SDS-Polyacrylamidgels. In den einzelnen Spuren sind folgende RIPA-Gesamtzelllysate aufgetragen: (1) EGFP-Kontrollzellextrakte, unstimuliert; (2) EGFP-Kontrollzellextrakte nach 24 h AG490 Stimulation; (3) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen, unstimuliert, und (4) Stat5A 1*6 transduzierte Zellen nach 24 h AG490 Stimulation (MW = 26 kDa).

Durch Stimulation der Zellen mit dem JAK-Inhibitor AG490 wird die Bildung des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L sowohl in den Kontrollzellen (Spur (2)) als auch in den Stat5A 1*6 enthaltenen Zellen verhindert (Spur (4)). Konstitutiv aktives Stat5A führt zu einer wesentlich stärkeren Reduktion von Bcl-X_L. AG490 und konstitutiv aktives Stat5A inhibieren die Bcl-X_L-Expression synergistisch.

Durch diese Untersuchungen zeigt sich folgender Zusammenhang: Konstitutiv aktives Stat3 in HC11 Zellen ist eng mit funktionellen Janus-Kinasen verknüpft, deren Inhibierung über Dephosphorylierung zu einer Inhibierung der DNA-Bindung und einem Anstieg der Apoptose führt. Der Anstieg der Apoptose kann auch durch konstitutiv aktives Stat5A 1*6 oder durch Überexpression von SOCS1 und SOCS3 erreicht werden und geht mit einer Inhibierung von Bcl-X_L einher. Die Überexpression der SOCS-Gene führt zu einer Hemmung der Stat3-DNA-Bindung in HC11 Zellen und somit zu einer Steigerung der Apoptose. Primärer Auslöser dieser Apoptosesteigerung scheint die Inhibierung von konstitutiv aktivem Stat3 zu sein.

7. Diskussion

In dieser Arbeit wird die Funktion von Stat5 mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante auf das Zellwachstum in Brusttumor- und nicht transformierten Brustepithelzellen untersucht. Des Weiteren werden die Auswirkungen eines konstitutiv aktiven Stat5A auf die Differenzierung von Brustepithelzellen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* näher analysiert. Diese Informationen sind wichtig, da die genauen Funktionen von Stat5, als wichtiger Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden für die Differenzierung und Tumorentstehung, noch nicht eindeutig ermittelt wurden.

Stat5 ist maßgeblich an der Entwicklung von Brustgewebe, sowie bei der Laktation beteiligt. Letzteres konnte von Liu und Mitarbeitern in *knockout*-Experimenten gezeigt werden (Liu *et al.*, 1997). Bei Abwesenheit von Stat5A findet weder eine geregelte Proliferation der Alveolaren, noch deren Differenzierung zu Milchdrüsen statt (Liu *et al.*, 1998). Des Weiteren wird die Brustentwicklung durch verschiedene Hormone kontrolliert, wobei Östrogen, Progesteron, Prolaktin und EGF besonders wichtig sind. *In vitro* Studien zeigten, dass vor allem Prolaktin Stat5A in primären Brustepithelzellen aktivieren kann (Tourkine *et al.*, 1995). Demzufolge liegt ein enger Zusammenhang zwischen einer prolaktinvermittelten Stat5A-Aktivierung und der Brustentwicklung vor.

Inwieweit Stat-Proteine eine ursächliche Bedeutung bei der Brustkrebsentstehung haben, ist noch nicht hinlänglich bekannt. Es hat sich gezeigt, dass vor allem Stat5, Stat3 und Stat1 konstitutiv aktiv in primären Brusttumoren und Brusttumorzelllinien vorliegen (Garcia and Jove, 1998; Watson and Miller, 1995). Der zugrundeliegende Mechanismus, welcher zu einer konstitutiven Aktivierung der Stat-Proteine führt, ist noch nicht aufgeklärt.

Die Wirkungsweise von Prolaktin und seinem Rezeptor bei der Entwicklung von Brustkrebs ist hingegen schon seit längerer Zeit Diskussionspunkt in der Literatur. Einige der Arbeiten mit transgenen Mäusen konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Prolaktinmenge und einer spontanen Entstehung von Brusttumoren zeigen (Wennbo *et al.*, 1997). In Prolaktin *knockout*-Mäusen ist eine verringerte Brusttumorentstehung zu beobachten (Vomachka *et al.*, 2000). Diese Beobachtung korreliert auch mit epidemiologischen Studien, in denen das Brustkrebsrisiko unmittelbar mit einem hohen Prolaktinspiegel im Serum verknüpft ist (Hankinson *et al.*, 1999). Es hat sich also gezeigt, dass sowohl Prolaktin als auch Stat5 in die Tumorentstehung involviert sind. Inwieweit Stat5A ursächlich an der Transformation und Tumorgenese im Brustgewebe beteiligt ist, soll im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe

einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante, welche prolaktinunabhängig aktiviert ist, aufgeklärt werden.

7.1 Prolaktin erhöht die Proliferation von Brusttumorzellen, nicht aber die Proliferation von Brustepithelzellen

Brustkrebs ist eine heterogene Krankheit, deren Ausbruch verschiedene Ursachen haben kann. Neuere Untersuchungen zeigen, dass nicht nur der Hormon- und ErbB2-Rezeptor-Status Einfluss auf die Tumorbildung haben, sondern auch der JAK/Stat-Signalweg an derartigen Veränderungen der Zellen beteiligt ist. Eine konstitutive Aktivierung von Stat5, Stat3 und Stat1 beeinflusst die Tumorentstehung und das Wachstum (Turkson and Jove, 2000; Garcia and Jove, 1998, Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2000). Darüber hinaus synthetisieren und sezernieren einige der Brusttumore Prolaktin und können durch eine autokrine/parakrine Schleife den JAK/Stat-Signalweg anschalten (Ginsburg and Vonderhaar, 1995; Clevenger and Plank, 1997).

Um die essentiellen Funktionen von Stat5 in Brusttumorzellen zu untersuchen, werden zuerst die verwendeten Zelllinien auf ihren Stat-Aktivierungsstatus untersucht. Hierbei wird die Menge an endogenem Stat5A/B-, Stat3- und Stat1-Protein sowie deren Funktionalität auf spezifischen Promotorsequenzen bestimmt.

Eine Expression von Stat5B, Stat3 und Stat1 ist in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen worden. Stat5A ist als einziges Stat-Protein reguliert und kann nur in zwei Tumorzelllinien und einer Brustepithelzelllinie nachgewiesen werden. Konstitutiv aktives Stat5 kann in keiner der Zelllinien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Watson und Mitarbeitern, bei welchen konstitutiv aktiviertes Stat5 vor allem in Extrakten invasiver Tumoren gefunden wurde (Watson and Miller, 1995). Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von konstitutiv aktivem Stat5 in den untersuchten Zellen ist, dass zum einem in diesem Versuchsansatz mit Zelllinien und nicht mit Primärextrakten gearbeitet wurde. Zum anderen könnte es gut möglich sein, dass die Zelllinien durch die lange Kultivierungsdauer zusätzliche Mechanismen entwickelt haben, so dass eine konstitutive Aktivierung von Stat5 nicht mehr benötigt wird. Diese konstitutive Aktivierung der Zellen kann unterschiedliche Ursachen haben: Eine Möglichkeit, die auch bereits in der Literatur diskutiert wird, ist die Tatsache, dass Brusttumore Prolaktin produzieren und somit den JAK/Stat-Signalweg anschalten können. Bei den hier verwendeten Zelllinien spielt die endogene Prolaktinsekretion für die Aktivierung

von Stat5-Proteinen jedoch keine nachweisbare Rolle. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Menge an endogenem Prolaktin zu gering ist, um einen Effekt auf die Stat5-DNA-Bindung zu haben, zum anderen kann das Fehlen eines Proteins in der Signaltransduktionskette dazu führen, dass keine Aktivierung erfolgen kann.

Es wurde daher überprüft, ob der Stat-Signalweg durch Prolaktin aktiviert werden kann. Vier verschiedene Zelllinien werden exemplarisch durch eine exogene Prolaktinabgabe stimuliert. Es handelt sich hierbei um zwei Tumorzelllinien und um zwei nicht transformierte Brustepithelzelllinien, welche sich hinsichtlich ihrer Abstammung und Rezeptorverteilung unterscheiden. Für alle drei hier untersuchten Stat-Proteine wurde schon gezeigt, dass sie durch Prolaktin induzierbar (Bole-Feysot *et al.*, 1998; DaSilva *et al.*, 1996) und maßgeblich an der Brustentwicklung beteiligt sind.

Die SKBR3 Zelllinie ist eine Brustkrebszelllinie, die aus einem humanen Adenokarzinom stammt und deren Stat5 mit Prolaktin induzierbar ist (Widschwendter *et al.*, 1999). Von MCF7 Zellen ist bekannt, dass sie auf eine laktogene Hormonstimulation mit vermehrter Proliferation reagieren (Biwas and Vonderhaar, 1987). HC11 Zellen wurden als Subklon einer murinen Brustepithelzelllinie kloniert, die endogenes Milchprotein nach Induktion mit laktogenen Hormonen bildet (Ball *et al.*, 1988) und somit als *in vitro* Modell für Differenzierungsvorgänge dienen kann. Bei der MCF10A Zelllinie handelt es sich um eine humane nicht transformierte Brustepithelzelllinie, die als Modellsystem einer nicht tumorigenen Zelllinie in der Literatur verwendet wird (Burke *et al.*, 2001).

In SKBR3 und MCF7 Zellen lässt sich ausschließlich Stat5B durch Prolaktin aktivieren, wobei in SKBR3 Zellen größere Mengen an Stat5B vorliegen, als in MCF7 Zellen. Bei den nicht transformierten Zelllinien besitzen MCF10A Zellen keine detektierbaren Mengen an aktivierbarem Stat5, wohingegen in HC11 Zellen durch Prolaktin sowohl Stat5A als auch Stat5B aktiviert werden.

Hinsichtlich der Stat3-Aktivierung unterscheiden sich die vier Zelllinien gravierend. In MCF7 und MCF10A Zellen sind keine detektierbaren Mengen an aktiviertem Stat3 vorhanden, was auch Garcia *et al.* schon zeigen konnten (Garcia and Jove, 1998). Durch Prolaktinstimulation lässt sich Stat3 in den Zellen auch nicht mehr aktivieren. SKBR3 Zellen hingegen enthalten geringe Mengen an konstitutiv aktivem Stat3. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Garcia beschrieben (Garcia and Jove, 1998). HC11, als eine nicht transformierte Zelllinie, besitzt unerwarteter Weise die größte Menge an konstitutiv aktivem Stat3. Dieses hier gefundene Ergebnis steht im Gegensatz zu der in der Literatur postulierten These, dass eine konstitutive Stat3-Aktivierung mit einer Transformation der Zellen korreliert (Garcia *et al.*, 1997).

Stat1 liegt in allen vier untersuchten Zelllinien konstitutiv aktiv, mit variierenden Mengenverhältnissen, vor. Die Gesamtproteinmenge an Stat1 ist jedoch in allen Zelllinien vergleichbar, wie die Western Blot Analyse zeigt. Die konstitutive Aktivierung von Stat1 in Brusttumorzellen korreliert auch mit Angaben in der Literatur (Buettner *et al.*, 2002). MCF7 Zellen besitzen die größte Menge an konstitutiv aktivem Stat1, gefolgt von MCF10A und HC11. SKBR3 Zellen zeigen nur eine geringe Menge an konstitutiv aktivem Stat1.

Stat5 ist somit das einzige der hier untersuchten Stat-Proteine, das sich durch Prolaktin aktivieren lässt.

Die Ausstattung der vier Zelllinien an Stat-Proteinen variiert sowohl in der Menge als auch im Aktivierungsstatus und zeigt keine direkte Korrelation mit einer Transformation. Jedoch ist die untersuchte Anzahl an Zelllinien nicht repräsentativ.

Für Prolaktin ist ebenfalls eine Rolle bei der Krebsentstehung beschrieben: *In vivo* Studien mit Prolaktinantagonisten zeigen eine Inhibierung der Proliferation von Brustkrebszellen sowie eine Inhibierung des Tumorwachstums (Chen *et al.*, 2002). Der Einfluss von Prolaktin als Aktivator von Stat-Proteinen und als Mitwirkender bei der Entstehung von Brusttumoren wird bei den verschiedenen Brustepithelzelllinien untersucht. Wie schon Das und Vonderhaar zeigen konnten, erhöht die Prolaktinmenge im Medium der Zellen die Proliferation von MCF7 Zellen um das Zweifache (Das and Vonderhaar, 1997). Dieses Ergebnis wird in dieser Arbeit bestätigt. Prolaktin fördert nicht nur die Proliferation von MCF7, sondern auch die von SKBR3 Brusttumorzellen.

Prolaktin hat hingegen keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum der nicht transformierten MCF10A Zelllinie. Dies könnte daran liegen, dass unterschiedliche Signalwege in den Zellen angeschaltet werden, so dass in den Tumorzellen verstärkt die Proliferation gefördert wird, hingegen in nicht transformierten Zellen andere Signalwege, wie beispielsweise Differenzierungswege, angeschaltet werden. In der Literatur sind über 300 verschiedene Funktionen von Prolaktin nachgewiesen worden (zusammengefasst in: Goffin *et al.*, 2002). Es zeigt sich, dass Prolaktin und sein Rezeptor in unterschiedlichen Zellarten auch unterschiedliche Signalwege aktivieren können. So wäre es denkbar, dass Prolaktin in Tumorzellen eine andere Funktion übernimmt als in normalen nicht transformierten Brustepithelzellen.

So aktiviert Prolaktin nicht nur den JAK/Stat-Signalweg, sondern z. B. auch den MAPK-Weg (Erwin *et al.*, 1995). Es könnte jedoch auch sein, dass in Tumorzellen Signalwege, die synergistisch die Proliferation aktivieren, bereits angeschaltet vorliegen. Mit einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante wurde schon gezeigt, dass Stat5

synergistisch mit dem Raf-MAPK-Signalweg Proliferation induziert (Onishi *et al.*, 1998). Auch wurde eine enge Vernetzung des PI3K-Signalwegs mit Stat5 in einer hämatopoetischen Zelllinie gefunden (Santos *et al.*, 2000). Weiterhin wäre es möglich, dass die Zellen den Prolaktinrezeptor im Vergleich zu den Tumorzellen nur in geringem Maß oder überhaupt nicht exprimieren. Dagegen spricht, dass in allen untersuchten Zelllinien, also auch in den nicht transformierten MCF10A Zellen, die Induktion des Stat5-Negativregulators *cis* prolaktinabhängig induziert wird. In verschiedenen unabhängigen Studien, sowohl mit dominant negativen Stat5-Mutanten (Mui *et al.*, 1996), als auch in Stat5A/B-*knockout*-Mäusen (Teglund *et al.*, 1998) wurde *cis* als direktes Zielgen von Stat5 entdeckt.

Das Cyclin D1-Protein wird im Rahmen dieser Arbeit als möglicher Vermittler der prolaktininduzierten Proliferation ermittelt.

Die Eingriffe in die Zellproliferation sind eng mit den Regulatoren des Zellzyklusses, den Zyklinen, verknüpft. Ein Mitglied dieser Zyklin-Familie, Cyclin D1, ist bei der Regulation der G₁-Phase des Zellzyklusses beteiligt und reguliert somit die Zellteilungsgeschwindigkeit (Baldin *et al.*, 1993; Quelle *et al.*, 1993; Arber *et al.*, 1996). In vielen Brusttumoren wurde zudem eine Überexpression von Cyclin D1 gefunden (Yu *et al.*, 2001).

In SKBR3 und MCF7 Brusttumorzellen wird durch Prolaktinstimulation die Cyclin D1-Expression hochreguliert. In MCF10A Zellen hingegen, ist keine Regulation feststellbar. Dies korreliert mit den ermittelten Proliferationsdaten.

In der Promotorsequenz von Cyclin D1 wurden zwei Konsensussequenzen (GAS) für die Stat-Bindung gefunden. Es hat sich gezeigt, dass über den prolaktinaktivierten JAK2/Stat5-Signalweg die Cyclin D1-Transkriptionsrate gesteigert wird (Brockman *et al.*, 2002). Cyclin D1 ist somit nicht nur als Regulator des Zellzyklusses, sondern auch als direktes Zielgen von Stat5 und Prolaktin identifiziert worden (Matsumura *et al.*, 1999).

Die hier gefundene Proliferationserhöhung in Brusttumorzellen könnte über die Prolaktin-JAK2/Stat5-Signalkaskade zur Induktion von Cyclin D1 führen. In verschiedenen Studien, unter anderem auch in der vorliegenden Arbeit, hat sich gezeigt, dass der Stat5-Aktivatoren Prolaktin als Mitogen wirken kann. Stat5A/B-*knockout*-Mäuse zeigen den gleichen Phänotyp wie prolaktinrezeptordefiziente Mäuse, so dass die Annahme konsistent ist, dass alle physiologischen Funktionen, die durch Prolaktin vermittelt werden, Stat5A/B abhängig sind (Ihle, 2001).

Für die Untersuchung des Stat5-Einflusses auf die Proliferation stehen keine Zelllinien mit konstitutiv aktiviertem Stat5A zur Verfügung, so dass auf eine exogene Expression der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6-Mutante zurückgegriffen wird.

7.2 Die konstitutive Aktivierung von Stat5 erhöht die Proliferationsrate von Tumorzellen, aber nicht von nicht transformierten Brustepithelzellen

Um die Funktion von Stat5 in der Proliferation in Brusttumorzellen näher zu untersuchen, wird eine durch zufällige Mutagenese kreierte und auf IL-3 unabhängiges Wachstum in Ba/F3 Zellen selektionierte konstitutiv aktive Stat5A-Mutante verwendet. Diese Mutante besitzt zwei Aminosäureaustausche, eine oberhalb der DNA-Bindungsdomäne und eine in der Transaktivierungsdomäne. Beide Mutationen sind für eine effiziente Kernlokalisation und transkriptionelle Aktivität notwendig. Die molekulare Basis der konstitutiven Aktivierung der Stat5A-Mutante ist die erhöhte Stabilität der an sich schon phosphorylierten Form der Mutante (Onishi *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Mutationen im Stat5-Gen auch die Interaktion mit dem Co-Repressor SMRT blockiert. Es kann keine negative Regulation der Stat5 abhängigen Transkription mehr stattfinden und der Signalweg verbleibt im aktivierten Zustand (Nakajima *et al.*, 2001).

Die Stat5A 1*6 Mutante wird mit Hilfe von retroviraler Transduktion stabil in zwei Tumorzelllinien, MCF7 und SKBR3, und einer nicht transformierten Zelllinie HC11 exprimiert. Die Charakterisierung dieser Mutante im Rahmen dieser Arbeit zeigt eine gute Expression in Brustepithelzellen und eine konstitutive Aktivierung des β -Kasein-Promotors. Dies konnte durch Luziferase- und Gelretardierungsuntersuchungen gezeigt werden. Durch die Prolaktinstimulation lässt sich das Transaktivierungspotential noch steigern, was möglicherweise durch die extreme Stabilität der phosphorylierten Stat5A 1*6 Mutante zu erklären ist. Die Stat5A Mutante ist auch in Brustepithelzellen funktionell. Sie ist demnach ein nützliches Werkzeug, um die Wirkung von Stat5 ohne externen Stimulus in Brusttumor- und nicht transformierten Zellen zu untersuchen.

Es kann gezeigt werden, dass die stabile Expression der konstitutiv aktiven Stat5-Mutante den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil verschafft. Genau wie bei der Prolaktinstimulation kann dieser Effekt nur in Tumor-, nicht aber in normalen Brustepithelzellen beobachtet werden. Brustepithelzellen wachsen ohne besondere Mediumzusätze und unterscheiden sich so von Ba/F3 Zellen, die ein Zellwachstum nur

nach Zugabe von IL-3 aufweisen. Ein Wachstumstest in Hinblick auf die Untersuchung einer faktorunabhängigen Proliferation steht in diesem Zellsystem nicht zur Verfügung. Die prolaktinabhängige Steigerung der Proliferation wird wahrscheinlich durch Stat5 vermittelt, da beide Proteine in Tumorzellen mitogene Aktivität besitzen und Prolaktin Stat5 aktiviert. Über die mechanistischen Hintergründe kann allerdings nur spekuliert werden, da der Einsatz von dominant negativen Stat5-Mutanten keinen Einfluss auf die Proliferation zeigt. Eine direkte Korrelation von Stat5 und Prolaktin bei der Proliferationserhöhung kann nicht gezeigt werden. Dies kann u. U. daran liegen, dass Prolaktin noch andere Signalwege aktiviert und in Brustepithelzellen die Hemmung von Stat5 keinen nachweisbaren Einfluss auf die Proliferation zeigt. Genauere Untersuchungen zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Stat5 und Proliferation stehen noch aus.

Studien über zytokinrezeptorvermittelte Signalwege konnten zwei Hauptsignalwege, die die Proliferation regulieren, identifizieren: der JAK/Stat-Signalweg und der Raf-MAPK-Signalweg (Kinoshita *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1993). Eine Kollaboration zwischen der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6 Mutante mit dem MAPK-Signalweg zur Proliferationsförderung wäre vorstellbar und ist in Ba/F3 Zellen untersucht und bestätigt worden (Onishi *et al.*, 1998). In Tumorzellen liegen häufig mehrere Signalwege verändert vor, die gemeinsam ein gesteigertes Proliferationsverhalten bewirken. Die SOS-Ras-Raf-MAPK-Kaskade spielt hierbei eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zu normalen Zellen, sind Tumorzellen in der Lage, Wachstumsfaktoren selbst zu synthetisieren und somit unabhängig von äußeren Einflüssen zu sein (Hanahan and Weinberg, 2000). In einem Großteil aller Tumoren liegt das Ras-Protein in veränderter Form vor, so dass mitotische Signale in der Zelle ohne Mitwirkung von Ras-modulierenden Signalen angeschaltet werden können (Medema and Bos, 1993). Dies würde auch erklären, warum Stat5 in Tumorzellen eine mitotische Wirkung hat, nicht aber in untransformierten Zellen. Ohne einen schon aktivierten MAPK-Weg ist der mitogene Effekt von Stat5 auf die Zellen nicht vorhanden. Die konstitutiv aktive Stat5A 1*6 Mutante könnte in Tumoren im Zusammenspiel mit dem MAPK-Signalweg wirken. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste der Phosphorylierungsstatus der MAPK-Signalkaskade näher untersucht werden.

Im hämatopoetischen System besitzt die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante multiple Funktionen. Die konstitutive Stat5-Aktivierung führt entweder zu einem IL-3-unabhängigem Wachstum durch die Induktion von pim-1, oder aber nach IL-3-Stimulation zu vermehrten Differenzierungs- und Apoptosevorgängen. Hierbei sind vor allem p21, cis und JAB (SOCS1) involviert (Nosaka *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob

die konstitutiv aktive Stat5A-Mutante in Brustepithelzellen ebenfalls multiple Funktionen besitzt, wird die Expression von verschiedenen Differenzierungs-, Proliferations- und Apoptosemarkern in Abhängigkeit von Prolaktin untersucht. Es ist nicht eindeutig zu klären, ob Prolaktinstimulation den proliferativen Effekt von Stat5A umkehrt oder negiert, wie dies für IL-3 beschrieben ist (Daten nicht gezeigt). In Brustkrebszellen können weder die Regulierung der Differenzierungsmarker p21^{WAF/CIP1} und p27^{KIP1}, noch die Regulierung antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-2, nachgewiesen werden. Eine Induktion des Zellzyklusregulators Cyclin D1, wie nach Prolaktinstimulation, kann ebenfalls durch Überexpression der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante nicht nachgewiesen werden.

Untersuchungen des Zellzyklusprofils zeigen jedoch einen beschleunigenden Einfluss von Stat5A 1*6 auf das Durchschreiten des Zellzyklusses. In Tumorzellen ist bekannt, dass sie ihren Zellwachstumsrhythmus verändern können (Hanahan and Weinberg, 2000). Der Einfluss, den Stat5 auf die Proliferation ausübt, ist jedoch, verglichen mit anderen mitogenen Faktoren, nicht so stark ausgeprägt, so dass ein Nachweis der zellzyklusregulierenden Proteine nur schwer möglich ist.

Die Untersuchungen an Brusttumorzellen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die konstitutiv aktive Stat5-Mutante Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus nimmt. Ähnlich wie in T-Zellen untersucht, induziert Stat5A ein gesteigertes Durchlaufen des Zellzyklusses (Moriggi *et al.*, 1999). Eine Regulation zellzyklusregulierender Gene kann jedoch in diesem Zellsystem und mit diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit kann zum ersten Mal eine Einflussnahme von Stat5, genauso wie von Prolaktin, auf die Proliferation und den Zellzyklus nachgewiesen werden. Demgegenüber stehen Versuche mit transgenen Mäusen, die einen Zusammenhang zwischen Stat5A und der Entstehung von Brusttumoren zeigen, ohne jedoch die Proliferationsrate oder das Differenzierungspotential zu verändern. In dem WAP-TGF α -transgenen Mausmodell induziert TGF α die Entwicklung von Tumoren nur, wenn Stat5A vorhanden ist. Eine Deletion von Stat5 führt zu einer verspäteten Tumorbildung (Humphreys and Hennighausen, 1999). In einem anderen verwendeten WAP-TAg-Maustumormodell besitzen 86% der sich entwickelnden Adenokarzinome aktiviertes Stat5A. Hemizygoter Verlust eines Stat5A-Allels führt zu einer Reduktion der Tumoranzahl und -größe. Außerdem ist das Auftreten der ersten Tumore verzögert. Die Teilungsrate und der Differenzierungsstatus bleiben jedoch unverändert (Ren *et al.*, 2002).

Es ist zu beachten, dass die Eigenschaften der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6 Mutante nicht unbedingt der von Stat5A-Wildtyp entsprechen müssen. Der physiologische Einfluss von Stat5 auf das Zellgeschehen ist immer noch eine offene Frage.

7.3 Brustepithelzellen mit konstitutiv aktivem Stat5A zeigen ein erhöhtes Potential zur Invasivität

Krebszellen zeichnen sich durch eine Reihe von Charakteristika aus. Neben einer verstärkten Proliferation spielt auch die Möglichkeit zur Invasivität und Metastasenbildung eine Rolle (Hanahan and Weinberg, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit soll nicht nur der Einfluss von Stat5 auf die Proliferation, sondern auch auf die Migrationsfähigkeit von Brustepithelzellen untersucht werden. Verglichen wird die Migrationsfähigkeit von Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 mit dem Einfluss, den Prolaktin auf die Migration ausübt.

Im Rahmen dieser Arbeit kann eine Erhöhung der Migrationsrate in SKBR3 Brusttumorzellen und in der nicht transformierten Brustepithelzelllinie HC11 durch Prolaktinstimulation nachgewiesen werden.

Prolaktin, dessen Einfluss bei der Pathogenese und Entwicklung von Tumoren diskutiert wird, induziert Änderungen im Zytoskelett und verstärkt die Migration von Brusttumorzellen (Maus *et al.*, 1999). In T47D, MCF7 und MDA231 Brusttumorzelllinien wurde eine klare Erhöhung der Migrationrate durch Prolaktin festgestellt. Prolaktin nimmt also Einfluss auf die Invasivität der Zellen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass konstitutiv aktiviertes Stat5A das gleiche Potential wie Prolaktin besitzt, die Migrationrate der Zellen zu erhöhen. Die hier gezeigte Förderung der Zellmigration durch Prolaktin und konstitutiv aktiviertes Stat5A ist bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Auch sind die mechanistischen Hintergründe, die zu einer verstärkten Migration bzw. Änderung des Zytoskeletts führen, noch nicht aufgeklärt.

In der Literatur wird eine Aktivierung der GTP-Bindungsproteine Ras und Rac in Zusammenhang mit der Zellmobilität von Brusttumorzellen diskutiert (Keely *et al.*, 1997, Keely *et al.*, 1999). Diese Proteine sind wohl auch bei der prolaktinvermittelten Signalkaskade zur Erhöhung der Migration involviert (Maus *et al.*, 1999). Ein zweiter Signalweg, der die Zellmigration fördert und eine mögliche Verbindung mit Stat5 herstellen könnte, ist der IL-6-vermittelte MAPK/PI3K-Signalweg (Badache and Hynes, 2001). Durch ein Zusammenspiel von IL-6 und autokrin stimuliertem EGF-Rezeptor wird der MAPK/PI3K-Signalweg aktiviert, der wiederum für die Zellbeweglichkeit

verantwortlich ist. Vermittelt wird dieser Synergismus zwischen dem EGF-Rezeptor und IL-6 durch die Phosphatase SHP-2 und dem Multisubstratverbindungsprotein Gab1.

Ob eine Verbindung zwischen Prolaktin, Stat5, src oder dem MAPK/PI3K-Signalweg in Bezug auf die Erhöhung der Zellmobilität besteht, ist noch nicht näher untersucht worden. Theoretisch lassen sich aber die einzelnen Signalwege miteinander verknüpfen, so dass es möglich wäre, dass die durch Prolaktin oder konstitutiv aktives Stat5A induzierte Migration über einen der beiden Signalwege aktiviert wird.

Der MAP-Kinase-Signalweg ist z.B. über das Shc-Adaptorprotein mit dem Prolaktinrezeptor/JAK2-Komplex verbunden. Shc wird durch Prolaktinstimulation phosphoryliert (Erwin *et al.*, 1995) und kann dann GTP-Bindungsproteine, wie Ras, binden und aktivieren (Hynes *et al.*, 1997).

Die Tyrosinphosphatase SHP-2 ist bei der Termination verschiedener Signalwege beteiligt. SHP-2 ist, genau wie JAK2, auch ohne Ligandenbindung mit dem Prolaktinrezeptor assoziiert (Ali *et al.*, 1996). Studien mit verschiedenen Mutanten haben gezeigt, dass SHP-2 einen positiven Effekt auf prolaktinvermittelte Signalkaskaden hat. Eine prolaktininduzierte Assoziation von SHP-2 mit Stat5 wurde auch schon in Brustepithelzellen nachgewiesen. Prolaktinstimulation führt zur Kerntranslokation des Komplexes aus SHP-2 und Stat5A (Chughtai *et al.*, 2002).

Neueste Untersuchungen in Neutrophilen verdeutlichen, dass die Familie der src-Tyrosinkinase ebenfalls in die Modulation der Zellmigration involviert ist (Nijhuis, *et al.*, 2002). Von den src-Kinasen ist bekannt, dass sie an einer zytokininduzierten Stat-Aktivierung beteiligt sind. Sowohl bei der IL-3/Stat5-induzierten Proliferation von myeloiden Zellen (Smithgall *et al.*, 2000; Chaturverdi *et al.*, 1998), als auch bei der EPO-Rezeptor/Stat5-Signaltransduktion (Chin *et al.*, 1998) sind src-Kinasen beteiligt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Prolaktin und src-Kinasen verschiedene Einflüsse auf die Stat5A/B-Signaltransduktion haben können (Kazansky *et al.*, 1999).

Es existieren also viele Hinweise in der Literatur, dass Stat-aktivierende Signalmoleküle Einfluss auf die Migration von Zellen nehmen können.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass ein konstitutiv aktives Stat5A-Protein die Migrationfähigkeit von Brustepithelzellen fördert. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass Stat5 z. B. über Änderungen des Zytoskeletts die prolaktininduzierte Migration vermittelt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, durch Prolaktin aktivierte Signalwege wie die MAPK-Signalkaskade oder SHP-2 in die Zellmigration involviert sind.

7.4 Konstitutiv aktives Stat5A führt zur Differenzierung von Brustepithelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Untersuchung der Stat5-vermittelten Differenzierung HC11 Zellen verwendet. HC11 Zellen sind ein geeignetes Modellsystem für Untersuchungen zu Differenzierungsprozessen von Brustepithelzellen. Nach Stimulation mit den laktogenen Hormonen Glukokortikoid, Insulin und Prolaktin sind diese Zellen in der Lage, Milchproteine, als ein Marker differenzierter Brustepithelzellen, zu synthetisieren (Ball *et al.*, 1988; Doppler *et al.*, 1989). Außerdem können sie nach Implantation in die Maus brustdrüsenähnliche Strukturen ausbilden (Humphreys and Rosen, 1997).

Stat5, welches ursprünglich als Mediator der prolaktininduzierten β -Kaseinexpression beschrieben wurde, erhöht, wie erwartet, die Transkription des β -Kaseingens nach Prolaktinstimulation in HC11 Zellen. Die prolaktinvermittelte β -Kaseinexpression wird durch Glukokortikoid Kostimulation noch weiter verstärkt. In HC11 Zellen wurde schon die synergistische Wirkungsweise von Glukokortikoid und Stat5 beschrieben (Doppler *et al.*, 1989). Der Glukokortikoidrezeptor wirkt durch eine direkte Interaktion mit Stat5 als Koaktivator und erhöht die Stat5-abhängige Transkription des β -Kaseingens (Stoeklin *et al.*, 1996). Die kooperative Interaktion verschiedener Faktoren zur Genregulation wurde auch schon für die Expression eines anderen Milchproteins, des sogenannten WAP (*whey acidic protein*) untersucht (Mikhopadhyay *et al.*, 2001). Nur ein Zusammenspiel von Glukokortikoid, Stat5 und dem Kernfaktor I (NFI) führte zur WAP-Genexpression.

Konstitutiv aktives Stat5A ist in nicht transformierten Brustepithelzellen ebenfalls, wie in Brusttumorzellen ohne Prolaktinstimulation, transkriptionell aktiv. Es zeigt sich in Bezug auf die Transkriptionsaktivierung auf dem β -Kaseinpromotor, dass die Mutante gleiche Eigenschaften wie das Wildtyp Stat5A besitzt.

In Bezug auf die Regulation des endogenen β -Kaseins führt eine Substitution des Prolaktinsignalweges durch die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante zur β -Kaseinbildung.

Zur Induktion von endogenem β -Kasein wird die Stimulation mit Glukokortikoid und Prolaktin benötigt. Die konstitutiv aktive Stat5A 1*6-Mutante kann jedoch sowohl Glukokortikoid als auch Prolaktin ersetzen.

7.5 Stat5A kontrolliert *in vivo* die Alveolarentwicklung des Brustepitheliums

Im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass Stat5A nicht nur *in vitro* Einfluss auf die Differenzierung von Brustepithelzellen nimmt, sondern auch *in vivo* in Differenzierungsvorgängen in der murinen Brustdrüse involviert ist. Stat5A kontrolliert die Ausbildung von funktionell differenzierten Alveolaren, wie der Vergleich der Brustdrüsen von jungfräulichen und trächtigen Mäusen zeigt.

Um die Funktion von konstitutiv aktiviertem Stat5A schon vor Auftreten einer Schwangerschaft zu untersuchen, werden HC11 Zellen mit der konstitutiv aktiven Stat5A Mutante transduziert und in das gereinigte Fettgewebe von Mäusen transplantiert. Für diese Zelllinie konnte schon in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, das Brustepithel in Mäusen zu rekonstituieren (Humphreys and Rosen, 1997). Sie ist jedoch nicht in der Lage, das gesamte Fettgewebe in der Brustdrüse auszufüllen. Diese Beobachtung lässt sich auch mittels der hier vorliegenden Ergebnisse verifizieren: Wie die Gesamtanalyse des Brustgewebes zeigt, bilden die HC11 Zellen nur kleine Wachstumsbereiche aus. Sie zeigen jedoch die charakteristischen Merkmale von Brustdrüsen, wie die Übersichtsfärbungen und die Färbungen mit spezifischen Markern zeigen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien wird in diesem Versuchsansatz mit GFP-markierten HC11 Zellen gearbeitet, die sich auch *in vivo* nachweisen lassen.

Das Brustdrüsenepithel besteht aus zwei verschiedenen Epithelarten, dem Epithel der Milchgänge und dem Epithel der sekretorischen Drüsen (Alveolaren) (Kordon and Smith, 1998, Smith, 1996). Zur Unterscheidung der beiden Arten werden charakteristische Marker verwendet, wie schon von Miyoshi *et al.* beschrieben (Miyoshi *et al.*, 2001). Die sekretorischen Drüsen differenzieren sich zum Ende einer Schwangerschaft zu Milchdrüsen aus, so dass der Marker für diese Art nur bei trächtigen und laktierenden Mäusen zu finden ist. Demgegenüber wird der Marker nicht in jungfräulichen Mäusen exprimiert. Im rekonstituierten Brustgewebe aus HC11 Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A findet sich der Marker auch schon im jungfräulichen Gewebe, aber nicht im Kontrollbrustgewebe. Diese Mäuse bilden früher als die Kontrollmäuse sekretorische Drüsen aus, was eine Einflussnahme von Stat5 auf die Differenzierung von Epithelzellen zeigt. Diese Beobachtung korreliert mit Untersuchungen an transplantierten Brustdrüsen von Stat5-*knockout*-Mäusen. Diese bilden nach einer Schwangerschaft keine Alveolaren aus (Miyoshi *et al.*, 2001). Die Differenzierung der Epithelzellen zu sekretorischen Drüsen ist durch eine Deregulation von Stat5 gestört, was sowohl die Deletion, als auch die Überexpression von konstitutiv

aktivem Stat5A zeigt. Eine Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A 1*6 führt nicht nur zu einer früheren Differenzierung der sekretorischen Epithelzellen, sondern beeinflusst auch die Ausbildung des Epithels der Milchgänge, wie hier anhand der immunhistochemischen Analysen gezeigt werden kann. Die konstitutive Stat5-Aktivierung führt zu kleinen, alveolenähnlichen Ausbildungen der Milchgänge mit verkleinertem Lumen. Auch nach mehreren Schwangerschaften vergrößert sich das Lumen der Milchgänge nicht.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Ausbildung der Alveolaren durch eine Vielzahl von Signalwegen bestimmt wird. So wurde u.a. die Einflussnahme von ErbB2 (Jones and Stern, 1999), ErbB4 (Jones *et al.*, 1999), Cyclin D1 (Fantl *et al.*, 1995, Sicinski *et al.*, 1995), C/EBP β (Robinson *et al.*, 1998, Seagroves *et al.*, 1998), der Osteoklasten Differenzierungsfaktor RANKL und dessen Rezeptor RANK (Fata *et al.*, 2000) und das Helix-Loop-Helix-Protein Id2 (Mori *et al.*, 2000) auf die Ausbildung der Alveolaren gezeigt. Diese Daten zeigen, dass die Ausbildung der Alveolaren einen komplexen Signalweg darstellt, der die funktionelle Kooperation verschiedener Moleküle benötigt.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit kann zum ersten Mal mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante, die unabhängig von äußerer Aktivierung ist, gezeigt werden, dass Stat5 maßgeblich an der Differenzierung und Ausbildung der Alveolaren beteiligt ist.

7.6 Stat5-abhängige Sensitivierung von HC11 Zellen für Apoptose durch Induktion von SOCS1 und SOCS3

Die Regulation der Apoptose ist sowohl bei der Tumorentstehung als auch bei der Brustentwicklung ein wichtiger Mechanismus. Die Art der Beteiligung von Stat5 an dieser Regulation wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Stat5A eine nicht transformierte Brustepithelzelle für apoptotische Vorgänge sensibilisiert. Ein externer, apoptoseauslösender Stimulus (Serumentzug) verstärkt die apoptotischen Vorgänge in Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A im Vergleich zu Kontrollzellen.

In Brustepithelzellen bewirkt ein Serumentzug eine Induktion der Apoptose, durch erneute Serumzugabe wird die Anzahl apoptotischer Zellen reduziert (Merlo *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch, dass sich im Gegensatz zu Zellen ohne konstitutiv aktives Stat5A durch Serumzugabe die Anzahl apoptotischer Zellen nicht in dem Maße, wie bei den Kontrollzellen, reduzieren lässt.

Die Apoptoserate wird in HC11 Zellen durch Expression einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante verdoppelt. Die absoluten apoptotischen Zellzahlen sind jedoch eher gering. Eine Erklärung hierfür wäre, dass HC11 Zellen eine gemischte Zellpopulation darstellen und nur eine Zellart durch konstitutiv aktives Stat5A für Apoptose sensibilisiert wird. Für diese Annahme, dass HC11 Zellen stammzellähnlichen Charakter besitzen spricht zum Einen, dass sich HC11 Zellen zu β -Kasein-produzierende Zellen differenzieren lassen (Ball *et al.*, 1998) und aus dieser Population wiederum undifferenzierte Zellen gewonnen werden können. Zum Anderen lässt sich aus den HC11 Zellen in Mäusen wiederum Brustepithel, das aus zwei verschiedenen Epithelarten besteht, rekonstituieren (Humphreys and Rosen, 1997).

Auf molekularer Ebene kann eine Inhibierung der Bcl-X_L-Expression für den Anstieg der Apoptose verantwortlich gemacht werden. Bcl-X_L ist ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie. Bcl-X_L ist auch eines der Hauptproteine, die im Zusammenhang mit Stat5-regulierter Apoptose diskutiert wird. Es wurde eine Stat5-Bindungssequenz im Bcl-X_L-Promotor gefunden (Socolovsky *et al.*, 1999). Die Orientierung dieser Bindungsstelle auf dem Bcl-X_L-Promotor ist aber Stat5 untypisch. Für kein anderes Stat5-Zielgen ist diese Art der Orientierung beschrieben worden (Ihle, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit kann jedoch ein anderes Bild im Zusammenhang von Apoptose und Stat5 verdeutlicht werden. In Brustepithelzellen spielt Stat5A wahrscheinlich eine indirekte Rolle bei der Regulation der Apoptose. Durch Induktion von SOCS1 und SOCS3 beeinflusst Stat5 die DNA-Bindung von Stat3 und das inaktivierte Stat3-Protein ist nicht mehr in der Lage, die Bcl-X_L-Expression zu induzieren.

Die Einflussnahme von Stat3 auf apoptotische Vorgänge ist in der Literatur gut dokumentiert. Eine Reihe von Studien mit konditionellen *knockout*-Mäusen zeigen, dass Stat3-Inaktivierung in T-Zellen zu einem Anstieg der Apoptose führt (Takeda, *et al.*, 1998). Aktiviertes Stat3 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Inhibierung der Apoptose in Tumorzellen. Eine Inhibierung der Phosphorylierung geht mit einem Anstieg der Apoptose und einer Verringerung von Bcl-X_L einher (Burke *et al.*, 2001). Wird die Stat3-Signalkaskade beispielsweise durch dominant negative Stat3-Mutanten inhibiert, so führt dies wiederum zu einer Wachstumsinhibierung und Induktion der Apoptose in Brusttumorzellen (Garcia *et al.*, 2001).

Eine schematische Darstellung des postulierten Regulationsmechanismus ist in Abbildung 7.5-1 dargestellt:

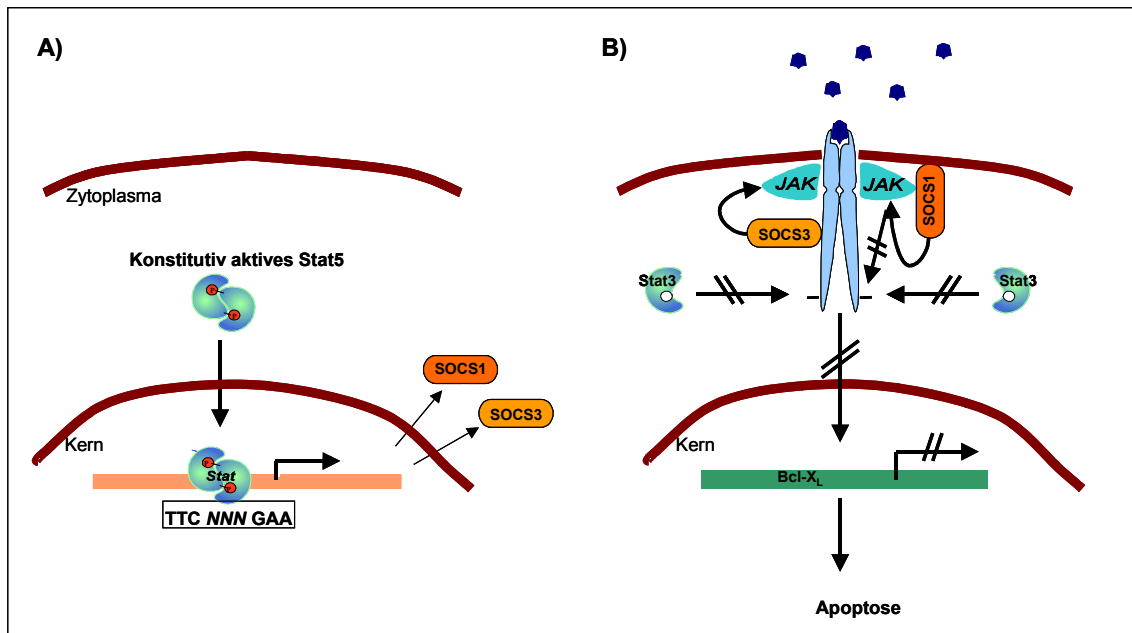


Abbildung 7.6-1: Mechanismus der Stat5-geförderten Apoptose in Brustepithelzellen. (A) Konstitutiv aktives Stat5A induziert die JAK/Stat-negativ-Regulatoren SOCS1 und SOCS3. (B) SOCS1 bindet an die SH2-Domäne der Janus-Kinase2 und inhibiert diese. SOCS3 inhibiert den Prolaktinrezeptor durch Bindung, wodurch Stat3 nicht mehr phosphoryliert werden kann und somit nicht mehr konstitutiv aktiv in Brustepithelzellen vorliegt. Die Expression des antiapoptischen Proteins Bcl-X_L wird inhibiert und die Apoptose in diesen Zellen induziert.

In der vorliegenden Arbeit kann eindeutig eine Induktion von SOCS1 und SOCS3 durch konstitutiv aktives Stat5A nachgewiesen werden. Die Überexpression der beiden Stat-Regulationsproteine führt ebenfalls, wie die Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5A, zu einem Anstieg der apoptotischen Zellzahlen. Des Weiteren kann ein Zusammenhang zwischen SOCS1 und 3-Überexpression und der Hemmung der Stat3-Aktivierung gezeigt werden. Sowohl die Überexpression von konstitutiv aktivem Stat5, als auch die direkte Überexpression von SOCS führt zu einer Inhibierung der Stat3-DNA-Bindung. Dies kann in Gelretardierungsexperimenten klar gezeigt werden.

Die SOCS1 und SOCS3 Expression wird durch Prolaktin reguliert (Petet *et al.*, 1999). Untersuchungen hinsichtlich der Expression von cis und SOCS3 in Brustgewebe und Brustepithelzellen zeigen eine negative Regulation der Prolaktin/Stat5-Signalkaskade durch SOCS3 (Tonko-Geymayer *et al.*, 2002). Des Weiteren deckten die Forschungen an Stat5B-*knockout*-Mäusen einen Defekt bei der SOCS3-Regulation auf (Davey *et al.*, 1999).

Der Mechanismus der JAK/Stat-Regulation durch SOCS-Proteine ist bekannt. SOCS-Proteine inhibieren durch Bindung an Janus-Kinasen oder Tyrosinkinase Rezeptoren den JAK/Stat-Signaltransduktionsweg. Durch eine negative Rückkopplungsschleife hemmen SOCS-Proteine den aktivierten Jak/Stat-Weg, der die Transkription ihrer eigenen Gene aktiviert (Krebs and Hilton, 2001). SOCS1 blockiert durch Bindung an

JAK2 und SOCS3 durch Bindung an den Prolaktinrezeptor die Signalkaskade (Dif *et al.*, 2001). Neueste Ergebnisse zeigen, dass SOCS-Proteine nicht nur die Rezeptoren und Kinasen blockieren, sondern auch durch ihre SOCS-Box-Domäne an dem proteosomalen Abbau von Signaltransduktionsmolekülen beteiligt sind. Die SOCS-Proteine initiieren die Ubiquitinierung dieser Moleküle und markieren sie somit für den weiteren Abbau (Starr and Hilton, 1999, Krebs and Hilton, 2001, O'Shea *et al.*, 2002).

Durch den Einsatz eines spezifischen JAK-Inhibitors, der vergleichbar wie die SOCS-Proteine Janus-Kinasen inhibiert, lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse verifizieren.

Durch Behandlung mit dem JAK-Inhibitor verringert sich der Grad an Stat3-Aktivierung, während gleichzeitig die Apoptose zeitabhängig verstärkt wird. Die Expression der konstitutiv aktiven Stat5A 1*6 Mutante verdoppelt den JAK-Inhibitor induzierten apoptotischen Effekt. Auch eine Überexpression von SOCS1 und SOCS3 verstärkt die Apoptoserate noch. Ein Rückgang der Bcl-X_L-Expression wird auch bei dem Einsatz des JAK-Inhibitors beobachtet.

In anderen Zellsystemen ist ebenfalls schon ein Zusammenhang von JAK-Inhibitor und Apoptoseinduktion beobachtet worden. Die Blockierung der Janus-Kinase durch den Inhibitor führt in Ovar- und Brusttumorzellen zur Dephosphorylierung von Stat3 und Induktion der Apoptose in diesen Zellen. Außerdem wird die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L verringert (Burke *et al.*, 2001). Gleiche Ergebnisse legt auch eine Studie in Myelomazellen dar (Oshiro *et al.*, 2001). Eine Verringerung der Bcl-X_L-Expression und eine Erhöhung der Apoptose durch Inhibierung des JAK/Stat3-Signalweges durch einen JAK-Inhibitor oder dominant negative Stat3-Mutanten, führt zu einer Verringerung der Resistenzen von Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin) in Brusttumorzelllinien (Dole *et al.*, 1995; Minn *et al.*, 1995). Eine andere Studie zeigt jedoch gegenteilige Ergebnisse in Brustepithelzelllinien: Die Inhibierung von JAK2 durch antisense- oder dominant negative JAK2-Mutanten führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Stat3 und einem hyperproliferativen Phänotyp, der durch eine Erhöhung der Mitose und einer Inhibierung der Apoptose charakterisiert ist (Xie *et al.*, 2002).

In der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinie (HC11) kann eindeutig gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Janus-Kinase einen Anstieg der Apoptose zur Folge hat. Primärer Auslöser ist wahrscheinlich die Inaktivierung von Stat3-Proteinen, die dadurch nicht mehr in der Lage sind, die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L zu induzieren.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann, reduziert eine Prolaktinstimulation die Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit dem JAK-Inhibitor. Prolaktin wirkt als Überlebensfaktor. Es kann jedoch sein, dass die Prolaktinstimulation die Anschaltung antiapoptotischer Signalkaskaden bewirkt, so dass sich unter Umständen einzelne Signalwege überlagern bzw. ausschalten. Durch den Einsatz einer konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante wird speziell nur der Stat5-Signalweg eingeschaltet, so dass der Einfluss von Stat5 auf die Apoptose von Brustepithelzellen nicht durch andere Signalwege, die z.B. durch Prolaktin ebenfalls induziert werden, überlagert wird.

8 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen verschiedenen Funktionen der konstitutiv aktiven Stat5A-Mutante in Brusttumor- und Brustepithelzellen ergeben eine Vielzahl interessanter Aspekte für nachfolgende Studien.

Der Mechanismus der Einflussnahme von Stat5 auf die Proliferation konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Eine neue Ansatzmöglichkeit wäre die Herstellung von stabilen Einzelklonen bzw. eines induzierbaren Systems, so dass gezielt hyperproliferative Zellklone selektioniert und untersucht werden können. Dabei könnte man auch die Einflussnahme von Stat5 auf die Regulation bestimmter brusttumortypischer Marker untersuchen. In einem Chip-Assay könnten induzierte Gene, die für die gesteigerte Proliferation verantwortlich sind, identifiziert werden.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Stat5 und dem Zytoskelett, die bei der Migration eine Rolle spielen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die GTP-bindenden Proteine Ras und Rac nicht nur bei prolaktininduzierter Migration eine Rolle spielen, sondern auch durch Stat5 aktiviert werden. Denkbar wäre auch eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Genauere Untersuchungen der beiden Signalwege wären nötig, um den Einfluss von Stat5 auf die Migration besser zu verstehen.

Des Weiteren stellt die Aufklärung der früheren Brustdrüsendifferenzierung in transplantierten Zellen mit konstitutiv aktivem Stat5A einen der interessantesten Themenkomplexe dar. Dies ist ein geeignetes System, um zum ersten Mal den Mechanismus aufzuklären, wie Stat5A die Differenzierung des Brustepithels induziert und welche Gene bei der Regulation beteiligt sind. Der Einfluss von Stat5 auf die unterschiedlichen Stadien der Brustentwicklung würde sicherlich auch Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Stat5 an der Tumorentstehung geben.

Genauere Untersuchungen der Stat5- und Stat3-Verknüpfungen in Brusttumor- und Brustepithelzellen, besonders im Hinblick auf die Apoptose, ist ein weiterer Themenschwerpunkt. Zu klären wäre, inwieweit die Regulation des einen Stat-Proteins Auswirkungen auf andere Proteine der Stat-Familie hat, und wie diese Stat-Proteine miteinander in Wechselwirkung stehen.

9 Literaturverzeichnis

AARONSON, D.S., AND HORVATH, C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-1655.

ABER, N., SUTTER, N.T., MIYAKE, M., KAHN, S.M., VENKATRAJ, V.S., SOBRINO, A., WABURTON, D., HOLT, P.R., AND WEINSTEIN, I.B. (1996). Increased expression of cyclin D1 and the RB tumor suppressor gene in c-K-ras transformed rat enterocytes. *Oncogene* **12**, 1903-1908.

ALI, S., CHEN, Z., LEBRUN, J.-J., VOGEL, W., KHARITONENKOV, A., KELLY, P.A., AND ULLRICH, A. (1996). PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to β -casein promoter activation. *EMBO J.* **15**, 135-142.

BADACHE, A., AND HYNES, N.E. (2001). Interleukin-6 Inhibits Proliferation and, in Cooperation with an Epidermal growth Factor Receptor Autocrine Loop, Increases Migration of T47D Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **61**, 383-391.

BALDIN, V., LUKAS, J., MARCOTE, M.J., PAGANO, M., AND DRAETTA, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G₁. *Genes. Dev.* **7**, 812-821.

BALL, R.K., FRIIS, R., SCHOENENBERGER, C.A., DOPPLER, W., AND GRONER, B. (1988). Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* **7**, 2089-2095.

BASELGA, J., AND NORTON, L. (2002). Focus on breast cancer. *Cancer Cell* **1**, 319-322.

BISWAS, R., AND VONDERHAAR, B.K. (1987). Role of serum in the prolactin responsiveness of MCF-7 human breast cancer cells in long term tissue culture. *Cancer Res.* **47**, 3509-3514.

BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N., AND KELLY, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr. Rev.* **19**, 225-268.

BOWMAN, T., GARCIA, R., TURKSON, J., AND JOVE, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.

BOYNES, A.R., BUCHAN, R., COLE, E.N., FORREST, A.P.M., AND GRIFFITH, K. (1973). Basal prolactin blood levels in three strains of rat with differing incidence of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in rats. *Europ. J. Cancer* **9**, 169-171.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- BRANDT, R., WONG, A.M.-L., AND HYNES, N.E. (2001). Mammary glands reconstituted with Neu/ErbB2 transformed HC11 cells provide a novel tumor model for testing anti-cancer agents. *Oncogene* **20**, 5459-5465.
- BROCKMAN, J.L., SCHROEDER, M.D., AND SCHULER, L.A. (2002). PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Mol. Endocrinol.* **16**, 774-784.
- BROMBERG, J. (2000). Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Research* **2**, 86-90.
- BROMBERG, J.F. (2001). Activation of STAT proteins and growth control. *BioEssay* **23**, 161-169.
- BUETTNER, R., MORA, L., AND JOVE, R. (2002). Activated STAT Signaling in human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Clinical Cancer Research* **8**, 945-954.
- BURKE, W.M., JIN, X., LIN, H., HUANG, M., LIU, R., REYNOLDS, R.K., AND LIN, J. (2001). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 7925-7934.
- CATLETT-FALCONE, R., DALTON, W.S., AND JOVE, R. (1999). STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr. Opin. Oncol.* **11**, 490-496.
- CHATURVEDI, P., REDDY, M.V., AND REDDY, E.P. (1998). Src kinases and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene* **16**, 1749-1758.
- CHEN, N.Y., HOLLE, L., LI, W., PIERCE, S.K., BECK, M.T., AND CHEN, W.Y. (2002). In vivo studies of the anti-tumor effects of a human prolactin antagonist, hPRL-G129R. *Int. J. Oncol.* **20**, 813-818.
- CHIN, H., ARAI, A., WAKAO, H., KAMIYAMA, R., MIYASAKA, N., AND MIURA, O. (1998). Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* **91**, 3734-3745.
- CHUGHTAI, N., SCHIMCHOWITSCH, S., LEBRUN, J.-J., AND ALI, S. (2002). Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the β -casein gene promoter in mammary cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 31107-31114.
- CLEVENGER, C.V., AND PLANK, T.L. (1997). Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast cancer. *J. Mammary Gland. Biol. Neopl.* **2**, 59-68.
- DAS, R., AND VONDERHAAR, B.K. (1997). Prolaktin as a Mitogen in Mammary Cells. *J. Mamm. Gland. Biol. Neopl.* **2**, 29-39.

- DASILVA, L., RUI, H., ERWIN, R.A., HOWARD, O.M.Z., KIRKREN, R.A., MALABARBA, M.G., HACKETT, R.H., LARNER, A., AND FARRER, W.L. (1996). Prolactin recruits STAT1, STAT3, and STAT5 independent of conserved receptor tyrosine TYR402, TYR479, TYR515, and TYR580. *Mol. Cell. Endocrinol.* **117**, 131-140.
- DAVEY, H.W., MCLACHLAN, M.J., WILKINS, R.J., HILTON, D.J, AND ADAMS, T.E. (1999). STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol* **158**, 111-116.
- DEOME, K.B., FAULKIN, L.J., BERN, H.A., AND BLAIR, P.B. (1958). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary pads of female C3H mice. *Cancer Res.* **19**, 515-519.
- DIF, F., SAUNIER, E., DEMENEIX, B., KELLY, P.A., AND EDERY, M. (2001). Cytokine-inducible SH2-containing protein suppresses PRL signalling by binding the PRL receptor. *Endocrinology* **142**, 5286-5293.
- DOLE, M.G., JASTY, R., COOPER, M.J., THOMPSON, C.B., NUNEZ, G., AND CASTLE, V.P. (1995). Bcl-x_L is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy- induced apoptosis. *Cancer Res.* **55**, 2576-2582.
- DOPPLER, W., GRONER, B., AND BALL, R.K. (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 104-108.
- DOYLE, A. AND MORRIS, C.B. (1993). Mechanical freezing and two-stage freezing: In: Doyle, A., Griffiths, J.B., and Newell, D.C. (Eds.), *Cell & Tissue Culture: Laboratory Protocols*, John Wiley & Sons, Chichester, 4C: 1,5 – 4C: 1,7.
- DUMON, S., CONSTANTINO ROSA SANTOS, S., DEBIERRE-GROCKIEGO, F., GOUILLEUX-GRUART, V., COCAULT, L., BOUCHERON, C., MOLLAT, P., GISSELBRECHT, S., AND DOUILLEUX, F. (1999). IL-3 dependent regulation of Bcl-X_L gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* **18**, 4191-4199.
- EMANUELLI, B., PERALDI, P., FILLOUX, C., SAWA-VERHELLE, D., HILTON, D., AND VAN OBBERGHEN, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15985-15991.
- ENDO, T.A., MASUHARA, M., YOKOUCHI, M., SUZUKI, R., SAKAMOTO, H., MITSUI, K., MATSUMOTO, A., TANIMURA, S., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAZAKI, T., LEONOR, N., TANIGUCHI, T., FUJITA, T., KANAKURA, Y., KOMIYA, S., AND YOSHIMURA, A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-924.
- ERWIN, R.A., KIRKEN, R.A., MALABARBA, M.G., FARRAR, W.L., AND RUI, H. (1995). Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. *Endocrinology* **136**, 3512-3518.
- FANTL, V., STAMP, G., ANDREWS, A., ROSEWELL, I., AND DICKSON, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Gene dev.* **9**, 2364-2372.

FATA, J.E., KONG, Y.Y., LI, J., SASAKI, T., IRIE-SASAKI, J., MOOREHEAD, R.A., ELLIOTT, R., SCULLY, S., VOURA, E.B., LACEY, D.L., BOYLE, W.J., KHOKHA, R., AND PENNINGER, J.M. (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50.

FEIGELSON, H.S., AND HENDERSON, B.E. (2001). The epidemiology of breast cancer. In: Bonnadona, G., Hortobagyi, G.N., and Gianni, A.M. (Eds.), *Breast cancer: A clinical guide to therapy*, Martin Dunitz LTD, London.

FREEMAN, M.E., KANYICKA, B., LERANT, A., AND NAGY, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol. Reviews* **80**, 1523-1631.

GADINA, M., HILTON, D., JOHNSTON, J.A., MORINOBU, A., LIGHVANI, A., ZHOU, Y.J., VISCONTI, R., AND O'SHEA, J.J. (2001). Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 363-373.

GARCIA, R., YU, C-L., HUDNALL, A., CATLETT, R., NELSON, K.L., SMITHGALL, T., FUJITA, D.J., ETHIER, S.P., AND JOVE, R. (1997). Constitutive activation of Stat3 in Fibroblasts Transformed by Diverse Oncoproteins and in Breast Carcinoma Cells. *Cell Growth & Differentiation* **8**, 1267-1276.

GARCIA, R AND JOVE, R (1998). Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.* **5**, 79-85.

GARCIA, R., BOWMAN, T.L., NIU, G., YU, H., MINTON, S., A MURO-CACHO, C., COX, C.E., FALCONE, R., FAIRCLOUGH, R., PARSON, S., LAUDANO, A., GAZIT, A., LEVITZKIL, A., KRAKER, A., AND JOVE, R. (2001). Constitutive activation of Stat3 by Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogen* **20**, 2499-2513.

GINSBURG, E., AND VONDERHAAR, B.K. (1995). Prolactin Synthesis and Secretion by Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **55**, 2591-2595.

GOFFIN, V., BOUCHARD, B., ORMANDY, C .J., WEIMANN, E., FERRAG, F., TOURRAIN, P., BOLE-FEYSOT, C., MAASKANT, R.A., CLEMENT-LACROIX, P., EDERY, M., BINART, N., AND KELLY, P.A. (1998). Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann. NY. Acad. Sci.* **840**, 498-509.

GOFFIN, V., TOURAINE, P., PICHARD, C., BERNICHTEIN, S., AND KELLY, P.A. (1999). Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol. Cell. Endocrinology* **151**, 79-87.

GOFFIN, V., BINART, N., TOURAINE, P., AND KELLY, P.A. (2002). PROLACTIN: The New Biology of an Old Hormone. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 47-67.

HALBAN, J. (1900). Die innere Sekretion von Ovarium und Plazenta und ihre Bedeutung für die Funktion der Milchdrüse. *M Schr. Geburtsh. Gynaek.* **12**, 496-503.

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

- HANAHAN, D., AND WEINBERG, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- HANKINSON, S.E., WILLETT, W.C., MICHAUD, D.S., MANSON, J.E., COLDITZ, G.A., LONGCOPE, C., ROSNER, B., AND SPEIZER, F.E. (1999). Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal woman. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 629-634.
- HARRIS, J.R., LIPPMAN, M.E., VERONESI, U., AND WILLETT, W. (1992). Breast cancer (1). *New Engl. J. Med.* **327**, 319-328.
- HENNIGHAUSEN, L., ROBINSON, G.W., WAGNER, K.U., AND LIU, X. (1997). Developing a mammary gland is a stat affair. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2**, 365-372.
- HENNIGHAUSEN, L., AND ROBINSON, G.W. (1998). Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes. Dev.* **12**, 449-455.
- HENNSON, J.C., COUNE, A., AND STARQUET, M. (1972). Clinical trial of 2-Br-a-ergocryptine (CB154) in advanced breast cancer. *Europ. J. Cancer* **8**, 155-156.
- HOEY, T., AND SCHINDLER, U. (1998). STAT structure and function in signalling. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **8**, 582-587.
- HOLTkamp, W., NAGEL, G.A., WANDER, H.E., RAUSCHECKER, H.F., AND VONHEYDEN, D. (1984). Hyperprolaktinemia is an indicator of progressive disease and poor prognosis in advanced breast cancer. *Int. J. Cancer* **34**, 323-328.
- HORVATH, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extra cellular signals. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 496-502.
- HOWE, H.L., WINGO, P.A., THUN, M.J., RIES, L.A.G., ROSENBERG, H.M., FEIGAL, E.G., AND EDWARDS, B.K. (2001). Annual report to the nation on status of cancer (1972 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 824-842.
- HUMPHREYS, R.C., AND ROSEN, J.M. (1997). Stably transfected HC11 cells provide an in Vitro and in Vivo model system for studying Wnt gene function. *Cell Growth & Differentiation* **8**, 839-849.
- HUMPHREYS, R.C., AND HENNIGHAUSEN, L. (1999). Signal Transducer and Activator of Transcription 5a Influences Mammary Epithelial Cell survival and Tumorigenesis. *Cell growth & Differentiation* **10**, 685-694.
- HYNES, N.E., CELLA, N., AND WARTMANN, M. (1997). Prolactin mediated intracellular signaling in mammary epithelial cells. *J. Mammary gland Neoplasia* **2**, 19-27.
- IHLE, J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 211-217.

- JABBOUR, H.N., CRITCHLEY, H.O., AND BODDY, S.C. (1998). Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2545-2553.
- JACKSON, P.K. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* **15**, 3053-3058.
- JONES, F.E., AND STERN, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene.* **18**, 3481-3490.
- JONES, F.E., WELTE, T., FU, X.Y., AND STERN, D.F. (1999). ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J. Cell. Biol.* **147**, 77-88.
- KAZANSKY, A.V., KABOTYANSKI, E.B., WYSZOMIERSKI, S.L., MANCINI, M.A., AND ROSEN, J.M. (1999). Differential effects of prolactin and src/abl kinases on the nuclear translocation of STAT5B and STAT5A. *J. Biol. Chem.* **274**, 22484-22492.
- KEELY, P.,J., WESTWICK, J.K., WHITEHEAD, I.P., DER, C.J., AND PARISE, L.V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**, 632-636.
- KEELY, P.J., RUSYN, E.V., COX, A.D., AND PARISE, L.V. (1999). R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **145**, 1077-1088.
- KEELY, P.J. (2001). Ras and Rho protein induction of motility and invasion in T47D breast adenocarcinoma cells. *Methods in Enzymology* **333**, 256-266.
- KINOSHITA, T., YOKOTA, T., ARAI, K., AND MIYAJIMA, A. (1995). Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *EMBO J.* **14**, 266-275.
- KISSELEVA, T., BHATTACHATYA, S., SCHROEDER-BRAUNSTEIN, J., AND SCHINDLER, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.
- KORDON, E.C., AND SMITH, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development.* **125**, 1921-1930.
- KREBS, D.L., HILTON, D.J. (2001). SOCS Proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-387.
- KRISTIE, T.M., AND ROIZMAN, B. (1986). DNA-binding site of major regulatory protein alpha 4 specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes in herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4700-4704.

- KYHSE-ANDERSON, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANE, H.A., BEUVINK, I., MOTOYAMA, A.B., DALY, J.M., NERVE, R.M., AND HYNES, N.E. (2000). ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27^{KIP1}-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3210-3223.
- LEONARD, W.J. (2001). Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int. J. Hematol.* **73**, 271-277.
- LEPROVOST, F., LEROUX, C., MARTIN, P., GAYE, P., AND DJIANE, J. (1994). Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology* **60**, 305-313.
- LIU, J.R., FLETCHER, B., PAGE, C., HU, C., NUNEZ, G., AND BAKER, V. (1998). Bcl-x_L is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecologic Oncology* **70**, 398-403.
- LIU, X., ROBINSON, G.W., GOUILLEUX, F., GRONER, B., AND HENNIGHAUSEN, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8831-8835.
- LIU, X., ROBINSON, G.W., AND HENNIGHAUSEN, L. (1996). Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1496-1506.
- LIU, X., ROBINSON, G.W., WAGNER, K-U., GARRETT, L., WYNshaw-BORIS, A., AND HENNIGHAUSEN, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* **11**, 179-186.
- LIU, X., GALLEGRO, M.I., SMITH, G.H., ROBINSON, G.W., AND HENNIGHAUSEN, L. (1998). Functional release of Stat5a-null mammary tissue through the activation of compensating signals including Stat5b. *Cell Growth Differ.* **9**, 795-803.
- LODISCH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., AND DARNELL, J. (1995). Molecular cell biology 3rd edition, Scientific American books, New York.
- MAIZEL, J.V. (1969). Acrylamide gel electrophoresis of proteins and nucleic acids. In: Habel, K., Salzman, N.P. (Hrsg.). *Fundamental Techniques in Virology*, Academic Press, New York, 334-362.
- MATSUMOTO, A., MASUHARA, M., MITSUI, K., YOKOUCHI, M., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAJIMA, A., AND YOSHIMURA, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* **89**, 3148-3154.

- MATSUMURA, I., ISHIKAWA, J., NAKAJIMA, K., ORITANI, K., TOMIYAMA, Y., MIYAGAWA, J., KATO, T., MIYAZAKI, H., MATSUZAWA, Y., AND KANAKURA, Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukaemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21 (WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2933-2943.
- MATSUMURA, I., KITAMURA, T., WAKAO, H., TANAKA, H., HASHIMOTO, K., ALBANESE, C., DOWNWARD, J., PESTELL, R.G., AND KANAKURA, Y. (1999). Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of haematopoietic cells. *EMBO J.* **18**, 1367-1377.
- MAUS, M.V., REILLY, S.C., AND CLEVENGER, C.V. (1999). Prolactin as a Chemoattractant for Human Breast Carcinoma. *Endocrinology* **140**, 5447-5450.
- MEDEMA, R.H., AND BOS, J.L. (1993). The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Crit. Rev. Oncog.* **4**, 615-661.
- MERLO, G.R., CELLA, N., AND HYNES, N.E. (1997). Apoptosis is accompanied by changes in Bcl-2 and Bax expression, induced by loss of attachment, and inhibited by specific extracellular matrix proteins in mammary epithelial cells. *Cell Growth Diff.* **8**, 251-260.
- MIKHOPADHYAY, S.S., WYSZOMIERSKI, S.L., GRONOSTAJSKI, R.M., AND ROSEN, J.M. (2001). Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6859-6869.
- MINN, A.J., RUDIN, C.M., BOISE, L.H., AND THOMPSON, C.B. (1995). Expression of bcl-x_L can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* **86**, 1903-1910.
- MIYOSHI, K., SHILLINGFORD, J.M., SMITH, G.H., GRIMM, S.L., WAGNER, K.-U., OKA, T., ROSEN, J.M., ROBINSON, G.W., AND HENNIGHAUSEN, L. (2001). Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *JCB* **155**, 531-542.
- MORI, S., NISHIKAWA, S.I., AND YOKOTA, Y. (2000). Lactation defect in mice lacking the helix-loop-helix inhibitor Id2. *EMBO J.* **19**, 5772-5781.
- MORIGGL, R., TOPHAM, D.J., TEGLUND, S., SEXL, V., MCKAY, C., WANG, D., HOFFMEYER, A., VAN DEURSEN, J., SANGSTER, M.J., BUNTING, K.D., GROSVELD, G.C., AND IHLE, J.N. (1999). Stat5 Is Required for IL-2-Induced Cell Cycle Progression of Peripheral T Cells. *Immunity* **10**, 249-259.
- MUI, A.L., WAKAO, H., KINOSHITA, T., KITAMURA, T., AND MIYAJIMA, A. (1996). Suppression of interleukin-3-induced gene expression by C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J.* **15**, 2424-2433.
- NAKA, T., NARAZAKI, M., HIRATA, M., MATSUMOTO, T., MINAMOTO, S., AONO, A., NISHIMOTO, N., KAJITA, T., TAGA, T., YOSHIZAKI, K., AKIRA, S., AND KISHIMOTO, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929.

- NAKAJIMA, H., BRINDLE, P.K., HANDA, M., AND IHLE, J.N. (2001). Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *EMBO J.* **20**, 6836-6844.
- NATHANSON, K.L., WOOSTER, R., AND WEBBER, B.L. (2001). Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat. Med.* **7**, 552-556.
- NEEL, B.G., AND TONKS, N.K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Current Opin. Cell Biol.* **9**, 193-204.
- NIJHUIS, E., LAMMERS, J.-W.J., KOENDERMAN, L., AND COFFER, P.J. (2002). Src kinases regulate PKB activation and modulate cytokine and chemoattractant-controlled neutrophil functioning. *J Leuk. Biol.* **71**, 115-124.
- NOSAKA, T., KAWASHIMA, T., MISAWA, K., IKUTA, K., MUI, A.L.-M., AND KITAMURA, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* **18**, 4754-4765.
- ONISHI, M., NOSAKA, T., MISAWA, K., MUI, A.L.-F., GORMAN, D., MCMAHON, M., MIYAJIMA, A., AND KITAMURA, T. (1998). Identification and Characterization of a Constitutively Active STAT5 Mutant That Promotes Cell Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3871-3879.
- ORMANDY, C.J., CAMUS, A., BARRA, J., DAMOTTE, D., LUCAS, B.K., BUTEAU, H., EDERY, M., BROUSSE, N., BABINET, C., BINART, N., AND KELLY, P.A. (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* **11**, 167-178.
- ORY, D.S., NEUGEBOREN, B.A., AND MULLIGAN, R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11400-11406.
- O'SHEA, J.J., GADINA, M., AND SCHREIBER, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: New surprises in the JAK/STAT Pathway. *Cell* **109**, 121-131.
- OSHIRO, M.M., LANDOWSKI, T.H., CATLETT-FALCONE, R., HAZLEHURST, L.A., HUANG, M., JOVE, R., AND DALTON, W.S. (2001). Inhibition of JAK kinase activity enhances Fas-mediated apoptosis but reduces cytotoxic activity of topoisomerase II inhibitors in U266 myeloma cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4262-4271.
- PROBST-HENSCH, N.M., PIKE, M.C., MCKEAN-CORDIN, R., STANCZYK, F.Z., KOLONEL, L.N., AND HENDERSON, B.E. (2000). Ethnic differences in post-menopausal plasma estrogen levels: high estrogen levels in Japanese-American women despite low weight. *Br. J. Cancer* **82**, 1867-1870.
- PEARSON, O.H., AND MANNI, A. (1978). Hormonal control of breast cancer growth of woman and rats. In: Martini, L., and James, V.H.T. (Eds), *Current Topics in Experimental Endocrinology*, Academic Press, New York, 75-92.

- PETET, A., FAVRE, H., KELLY, P.A., AND EDERY, M. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signalling. *J. Biol. Chem.* **274**, 24497-24502.
- PHILP, J.A.C., BURTON, T.G., AND WATSON, C.J. (1996). Differential activation of Stat3 and 5 during mammary gland development. *FEBS lett.* **396**, 77-80.
- PURNELL, D.M., HILLMAN, E.A., HEATFIELD, B.M., AND TRUMP, B.F. (1982). Immunoreactive prolactin in epithelial cells of normal and cancerous human breast and prostate detected by the unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase method. *Cancer Research* **42**, 2317-2324.
- QUELLE, D.E., ASHUMAN, R.A., SHURTLIFF, S.A., KATO, J., BAR-SAGI, D., ROUSSEL, M.F., AND SHERR, C.J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes. Dev.* **7**, 1559-1571.
- REN, S., CAI, H.R., AND FURTH, P.A. (2002). Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model. *Oncogene* **21**, 4335-4339.
- REYNOLS, C., MONTONE, K.T., POWELL, C.M., TOMASZEWSKI, J.E., AND CLEVINGER, C.V. (1997). Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology* **138**, 5555-5560.
- RIDDLE, O., BATES, R.W., AND DYKSHORN, S.W. (1933). The preparation, identification and assay of prolactin-a hormone of the anterior pituitary. *Am. J. Physiol.* **105**, 191-216.
- ROBINSON, G.W., JOHNSON, P.F., HENNIGHAUSEN, L., AND STERNECK, E. (1998). The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev.* **12**, 1907-1916.
- ROTH, T., BURGER, A.M., DENGLER, W., WILLMANN, H., AND FIEBIG, H.H. (1999). Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. *Contrib. Oncol.* **54**, 145-156.
- RUSSEL, W. C., NEWMAN, C. AND WILLIAMSON, D. H. (1975) A simple cytochemical technique or demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses, *Nature* **253**, 61-62.
- SANTOS, S.C.R., DUMON, S., MAYEUX, P., GISSELBRECHT, S., AND GOUILLEUX, F. (2000). Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derives cell line. *Oncogene* **19**, 1164-1172.
- SATO, N., SAKAMAKI, K., TERADA, N., ARAI, K., AND MIYAJIMA, A. (1993). Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signalling. *EMBO J.* **12**, 4181-4189.
- SCHINDLER, C.W. (2002). JAK-STAT signaling in human disease. *J. Clin. Invest.* **109**, 1133-1137.

- SCHMITT-NEY, M., DOPPLER, W., BALL, R.K., AND GRONER, B. (1991). Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone mediated relief of transcriptional repression and a mammary-specific nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3745-3755.
- SCHMITT-NEY, M., HAPP, B., HOFER, P., HYNES, N.E., AND GRONER, B. (1992). Mammary gland-specific nuclear factor activity is positively regulated by lactogenic hormones and negatively by milk stasis. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1988-1997.
- SCHORR, K., AND FURTH, P.A. (2000). Induction of bcl-x_L expression in mammary epithelial cells is glucocorticoid-dependent but not signal transducer and activator of transcription 5-dependent. *Cancer Res.* **60**, 5950-5953.
- SEAGROVES, T.N., KRNACIK, S., RAUGHT, B., GAY, J., BURGESS-BEUSSE, B., DARLINGTON, G.J., AND ROSEN, J.M. (1998). C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev.* **12**, 1917-1928.
- Selvaraj, N.G., Omi, E., Gibori, G., and Rao, M.C. (2000). Janus kinase 2 (JAK2) regulates prolactin-mediated chloride transport in mouse mammary epithelial cells through tyrosine phosphorylation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Mol. Endocrinol.* **14**, 2054-2065.
- SGONC, R., BOECK, G., DIETRICH, H., GRUBER, J., RECHEIS, AND H., WICK, G. (1994). Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genetics* **10**, 41-42.
- SHAW-BRUHA, C.M., PIRRUCCELLO, S.J., AND SHULL, J.D. (1997). Expression of the prolactin gene in normal and neoplastic human breast tissues and human mammary cell lines: promoter usage and alternative mRNA splicing. *Breast Cancer Research and Treatment* **4**, 243-253.
- SHUAI, K., LIAO, J., AND SONG, M.M. (1998). Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4932-4941.
- SHUAI, K. (2000). Modulation of Stat signalling by Stat-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-2644.
- SICINSKI, P., DONAHER, J.L., PARKER, S.B., LI, T., FAZELI, A., GARDNER, H., HASLAM, S.Z., BRONSON, R.T., ELLEDGE, SW.J., AND WEINBERG, R.A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**, 621-630.
- SMITH, G.H. (1996). Experimental mammary morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.* **39**, 21-31.
- SMITHGALL, T.E., BRIGGS, S.D., SCHREINER, S., LERNER, E.C., CHENG, H., AND WILSON, M.B. (2000). Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* **19**, 2612-2618.
- SOCOLOVSKY, M., FALLON, A.E.J., WANG, S., BRUGNARA, C., AND LODISH, H.F. (1999). Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-X_L Induction. *Cell* **98**, 181-191.

- STARR, R., WILLSON, T.A., VINEY, E.M., MURRAY, L.J., RAYNER, J.R., JENKINS, B.J., GONDA, T.J., ALEXANDER, W.S., METCALF, D., NICOLA, N.A. AND HILTON, D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921.
- STARR, R., AND HILTON, D.J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *BioEssays* **21**, 47-52.
- STOECKLIN, E., WISSLER, M., GOUILLEUX, F., AND GRONER, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**, 726-728.
- TAKEDA, K., KAISHO, T., YOSHIDA, N., TAKEDA, J., KISHIMOTO, T., AND AKIRA, S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterisation of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* **161**, 4652-4660.
- TANIGUCHI, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**, 251-255.
- TEGLUND, S., MCKAY, C., SCHUETZ, E., VAN DEURSEN, J.M., STRAVOPODIS, D., WANG, D., BROWN, M., BODNER, S., GROSVELD, G., AND IHLE, J.N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* **93**, 841-850.
- TONKO-GEYMAYER, S., GOUPILLE, O., TONKO, M., SORATROI, C., YOSHIMURA, A., STREULI, C., ZIEMIECKI, A., KOFLER, R., AND DOPPLER, W. (2002). Regulation and function of the cytokine-inducible SH-2 domain proteins, CIS and SOCS3, in mammary epithelial cells. *Mol. Endocrinol* **16**, 1680-1695.
- TOPPER, Y.J., AND FREEMAN, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* **60**, 1049-1056.
- TOURKINE, N., SCHINDLER, C., LAROSE, M., AND HOUDEBINE, L.M. (1995). Activation of STAT factors by prolactin, interferon-gamma, growth hormones, and tyrosine phosphatase inhibitor in rabbit primary mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 20952-20961.
- TURKSON, J., AND JOVE, R. (2000). STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* **19**, 2532-2547.
- VAKKALA, M., LAHTENMAKI, K., RAUNIO, H., PAAKKO, P., AND SOINI, Y. (1999). Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin. Cancer. Res.* **5**, 319-324.
- VINKEMEIER, U., MOAREFI, I., DARNELL, J.E., JR., AND KURIYAN, J. (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* **279**, 1048-1052.
- VOGELSTEIN, B. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138-141.
- VOMACHKA, A.J., PRATT, S.L., LOCKEFEEER, J.A., AND HORSEMAN, N.D. (2000). Prolactin gene-disruption arrests mammary gland development and retards T-antigene-induced tumor growth. *Oncogene* **19**, 2077-1084.

- VONDERHAAR, B.K. (1984). Hormones and growth factors in mammary gland development. In: Veneziale, C.M. (Ed), *Control of Cell Growth and Proliferation*, Van Nostrand, Reinhold and Co., Inc., New York, 11-33.
- VONDERHAAR, B.K. (1987). Prolactin: transport, function, and receptors in mammary gland development and differentiation. In: Neville, M.C., and Daniel, C.W. (Eds), *The Mammary Gland*, Plenum Publishing Corporation, New York, 383-438.
- VONDERHAAR, B.K. (1998). Prolactin: the forgotten hormone of human breast cancer. *Pharmacol. Ther.* **79**, 169-178.
- VONDERHAAR, B.K. (1999). Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **6**, 389-404.
- WAKAO, H., SCHMITT-NEY, M., AND GRONER, B. (1992). Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *J. Biol. Chem.* **267**, 16365-16370.
- WAKAO, H., GOUILLEUX, F., AND GRONER, B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.* **13**, 2182-2191.
- WANG, T.C., CARDIFF, R.D., ZUKERBER, L., LEE, E., ARNOLD, A., AND SCHMIDT, E.V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* **369**, 669-671.
- WARD, A.C., TOUW, I., AND YOSHIMURA, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* **95**, 19-29.
- WATSON, C.J., AND MILLER, W.R. (1995). Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* **71**, 840-844.
- WATSON, C.J. (2001). Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neopl.* **6**, 115-127.
- WEINSTAT-SASLOW, D., MERINO, M.J., MANROW, R.E., LAWRENCE, J.A., BLUTH, R.F., WITTENBEL, K.D., SIMPSON, J.F., PAGE, D.L., AND STEEG, P.S. (1995). Overexpression of cyclin D1 mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nature Med.* **1**, 1257-1260.
- WELSCH, C., AND NAGASAWA, H. (1977). Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Research* **37**, 951-963.
- WENNBO, H., GEBRE-MEDHIN, M., GRITLI-LINDE, A., OHSSON, C., ISAKSSON, O.G., AND TORNELL, J. (1997). Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **100**, 2744-2751.

WIDSCHWENDTER, M., WIDSCHWENDTER, A., WELTE, T., DAXENBICHLER, G., ZEIMET, A.G., BERGANT, A., BERGER, J., PEYRAT, J.P., MICHEL, S., DOPPLER, W., AND MARTH, C. (1999). Retinoic acid modulates prolactin receptor expression and prolactin-induced STAT-5 activation in breast cancer cells *in vitro*. *Br. J. Cancer* **79**, 204-210.

WISEMAN, B.S., AND WERB, Z. (2002). Development and breast cancer. *Science* **296**, 1046-1049.

XIE, J., LEBARON, M.J., NEVALAINEN, M.T., AND RUI, H. (2002). Role of tyrosine kinase Jak2 in Prolactin-induced differentiation and growth of mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 14020-14030.

YAMAUCHI, T., YAMAUCHI, N., UEKI, K., SUGIYAMA, T., WAKI, H., MIKI, H., TOBE, K., MATSUDA, S., TSUSHIMA, T., YAMAMOTO, T., FUJITA, T., TAKETANI, Y., FUKUYAMA, M., KIMURA, S., YAZARI, Y., NAGAI, R., AND KADOWAKI, T. (2000). Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J. Biol. Chem.* **275**, 33937-33944.

YOSHIKAWA, H., MATSUBARA, K., QIAN, G.S., JACKSON, P., GROOPMAN, J.D., MANNING, J.E., HARRIS, C.C., AND HERMAN, J.G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genetics* **28**, 29-35.

YOSHIMURA, A., OHKUBO, T., KIGUCHI, T., JENKINS, N.A., GILBERT, D.J., COPELAND, N.G., HARA, T., MIYAJIMA, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* **14**, 2.

YU, Q., GENG, Y., AND SICINSKI, P. (2001). Specific protection against breast cancer by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021.

9.1 Eigene Veröffentlichungen

ROBITZKI, A., DÖLL, F., RICHTER-LANDSBERG, C., AND LAYER, P.G. (2000). Regulation of the rat oligodendroglia cell line OLN-93 by antisense transfection of butyrylcholinesterase. *Glia* **31**, 195-205.

DÖLL, F., KITAMURA, T., AND PFITZNER, E.. Constitutive activation of the JAK/Stat-signalling pathway is necessary for the survival of mammary epithelial cells. *In Vorbereitung*.

DÖLL, F., BRILL, B., KITAMURA, T., GRONER, B., AND PFITZNER, E.. Constitutively active Stat5A induces a premature differentiation of the mammary gland. *In Vorbereitung*.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Frauke Döll
Anschrift Lange Hart 16
 64673 Zwingenberg
Geburtsdatum 21. November 1972
Geburtsort Jugenheim
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig, keine Kinder

Schulischer Werdegang

08/79 bis 06/83	Melibokusschule, Zwingenberg	Grundschule
08/83 bis 05/92	Liebfauschule, Bensheim	Gymnasium Abschluss: Abitur

Studium

10/92 bis 07/98 Technische Universität Darmstadt Diplom-Studiengang Biologie
Diplomarbeit am Institut für Zoologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P.G. Layer
Thema: „Untersuchung der Acetylcholin- und Butyrylcholinesterase bei OLN-93-Zellen durch Transfektion mit sense-AChE_{Huhn}-, antisense-AChE- und antisense-BChE-Expressionsvektoren“.
Abschluss: Diplom

Dissertation

Seit 10/98 Georg-Speyer-Haus, Frankfurt Dissertation
Anfertigung der Dissertationsarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. E. Pfitzner unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
Thema: „Untersuchungen zur Funktion von Stat5 in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Transformation von Brustepithelzellen“.

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Zwingenberg, den 20. Januar 2003

(Frauke Döll)