

**Untersuchungen von EGF-Rezeptoren in Teleostern
und
Etablierung eines piscinen EGF-/Prolactin-Hybridrezeptors**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Diplom-Biologin Anne Stielow

Rostock, Januar 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0178-7

1. Gutachter: Prof. em. Dr. Edda Siegl

2. Gutachter: PD Dr. Tom Goldammer
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere,
Dummerstorf

3. Gutachter: Prof. Dr. Charli Kruse
Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie, Lübeck

Tag der Verteidigung: 20.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Forschung	2
2.1.	Rezeptortyrosinkinasen	2
2.1.1	Die EGFR-Familie im Säuger	3
2.1.2	EGF-induzierte Signaltransduktionswege im Säuger.....	4
2.1.3	Die EGFR-Familie der Fische	7
2.1.3.1	Funktionen von EGF und EGFR im Knochenfisch.....	8
2.2	Klasse-I-Cytokinrezeptoren.....	9
2.2.1	Der Prolactinrezeptor.....	11
2.2.1.1.	Der Prolactinrezeptor im Knochenfisch	11
2.2.2	Prolactin-induzierte Signaltransduktionswege	13
2.2.2.1	Der JAK- STAT- Signalweg in Säugern	14
2.2.2.2	Der Ras- Raf- MAP-Kinase- Signalweg in Säugern	17
2.2.2.3	Signaltransduktionswege in Fischzellen.....	19
2.3	Hybridrezeptoren	21
3	Zielstellung	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Material.....	24
4.1.1	Versuchstiere	24
4.1.2	Chemikalien.....	24
4.1.3	Molekularbiologische Produkte.....	24
4.1.4	Zellkulturprodukte	25
4.2	Methoden	26
4.2.1	Zellbiologische Methoden	26
4.2.1.1	Präparation und Kultivierung der Leukozyten aus Milz und Kopfniere der Regenbogenforelle.....	26
4.2.1.2	Zelllinien und Kultivierung	27
4.2.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	28
4.2.1.4	Transfektion.....	28
4.2.1.5	Fixierung der Zellen	29
4.2.1.6	Immunfluoreszenz	29

4.2.2	Proteinchemische Methoden.....	30
4.2.2.1	Proteinpräparation aus Zellkulturen	30
4.2.2.2	Western Blot-Analyse.....	30
4.2.2.3	Strippen und Rehybridisieren von Immunoblots.....	32
4.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
4.2.3.1	Isolation von RNA aus Zellen und Gewebe	33
4.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
4.2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
4.2.3.3.1	OneStep-RT-PCR	34
4.2.3.3.2	Expand Long Template-PCR	35
4.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	35
4.2.3.5	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
4.2.3.6	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	36
4.2.3.7	Restriktionsverdau	37
4.2.3.8	Dephosphorylierung von Plasmiden.....	37
4.2.3.9	Ligation.....	38
4.2.3.10	Herstellung kompetenter Zellen (nach Hanahan, 1983).....	38
4.2.3.11	Transformation kompetenter XL1-Blue-Zellen.....	38
4.2.3.12	Plasmid-Minipräparation	39
4.2.3.13	Plasmid-Maxipräparation	39
4.2.3.14	Sequenzierung	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Identifizierung des EGF-Rezeptors in <i>Oncorhynchus mykiss</i> und <i>Cyprinus carpio</i>	41
5.1.1	Der EGF-Rezeptor von <i>Oncorhynchus mykiss</i>	41
5.1.1.1	Expressionsanalyse eines EGFR-homologen ESTs aus <i>O. mykiss</i>	42
5.1.1.2	Isolation eines EGFR-Abschnittes aus <i>O. mykiss</i>	43
5.1.1.3	Klonierung der EGFR-cDNA aus <i>O. mykiss</i>	44
5.1.1.3.1	Konstruktion der Primer	44
5.1.1.3.2	Amplifikation der spezifischen Transkripte	45
5.1.1.4	Analyse der isolierten <i>O. mykiss</i> - Sequenz.....	47
5.1.1.5	Sequenzvergleiche mit weiteren EGF-Rezeptoren.....	48
5.1.2	Der EGF-Rezeptor von <i>Cyprinus carpio</i>	52

5.1.2.1	Amplifikation spezifischer Transkripte aus <i>C. carpio</i>	53
5.1.2.1.1	EGFR-Teilstück 1	54
5.1.2.1.2	EGFR-Teilstück 2.....	58
5.1.3	Gewebespezifische Expression des EGF-Rezeptors	63
5.1.4	Erste Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5.1.4.1	Der EGFR von <i>Oncorhynchus mykiss</i>	64
5.1.4.2	Der EGFR von <i>Cyprinus carpio</i>	65
5.2	Etablierung eines hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors in Zelllinien von <i>Cyprinus carpio</i> : Konstruktion der Hybridrezeptor-cDNA	66
5.2.1	Umklonierung des Hybridrezeptorkonstruktes in pGEM-T-Easy.....	67
5.2.2	Gewinnung der Transmembran- und intrazellulären Domäne des Prolactinrezeptors von <i>Cyprinus carpio</i>	67
5.2.2.1	Gewebespezifische Expression des Prolactinrezeptors	67
5.2.2.2	Amplifikation der cDNA der transmembranen und intrazellulären Domäne.....	68
5.2.3	Rekombination der Genabschnitte zur Synthese des hEGF-/ cPrl-Hybridrezeptors	70
5.2.3.1	Identifizierung der Domänen des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors.....	73
5.2.4	Transfektion der Karpfenzelllinien EPC und CLC mit der Hybridrezeptor-cDNA	75
5.2.4.1	Nachweis der mRNA des Hybridrezeptors in transfizierten Zellen.....	75
5.2.4.2	Nachweis und Lokalisierung des Hybridrezeptorproteins.....	76
5.3	Nachweis von Signaltransduktionswegen in den Karpfenzelllinien EPC und CLC	78
5.3.1	Expression von MAP-Kinasen	78
5.3.2	Expression von STAT1 und STAT3	79
6	Diskussion	80
6.1	Der EGF-Rezeptor von <i>Oncorhynchus mykiss</i>	80
6.1.1	Die Phylogenie der <i>egfr</i> Gene	83
6.1.2	EGFR-Duplikate auch in <i>Oncorhynchus mykiss</i> ?	85
6.2	Der EGF-Rezeptor von <i>Cyprinus carpio</i>	87
6.2.1	Die extrazelluläre EGFR-Domäne von <i>Cyprinus carpio</i>	88
6.2.2	Die Tyrosinkinasedomäne des <i>Cyprinus carpio</i> -EGFR	89
6.2.3	EGFR-Duplikate in <i>Cyprinus carpio</i> ?.....	90

6.3	Der Hybridrezeptor.....	92
6.3.1	Konstruktion des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors.....	93
6.3.2	Oberflächenexpression des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors.....	94
6.4	Prolactin-induzierte Signalkaskaden in <i>Cyprinus carpio</i> ?	96
7	Zusammenfassung	98
8	Literaturverzeichnis	100
9	Abkürzungsverzeichnis	115
10	Abbildungsverzeichnis	117
11	Tabellenverzeichnis	119
12	Anhang.....	120

1 Einleitung

Für die Kommunikation zwischen Zellen spielen extrazelluläre Signalmoleküle eine entscheidende Rolle. Sie lassen sich in die Gruppen Hormone und Cytokine einteilen und wirken über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren. Dies initiiert die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege in den Zielzellen, die zur Änderung von biochemischen und physiologischen Prozessen führen (van der Geer et al., 1994). So werden wichtige zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Metabolismus, Apoptose u. a. reguliert.

Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion erfolgten in der Vergangenheit vor allem mit Säugermodellen. Die Funktionsweise von piscinen Cytokinen und Cytokinrezeptoren wurde bislang wenig untersucht. Diese Analysen gewinnen im Rahmen evolutions- und entwicklungsbiologischer Fragestellungen an Bedeutung. Jedoch stellen der Mangel an geeigneten Zellmodellen und spezifischen Antikörpern nennenswerte Probleme dar.

Cytokinrezeptoren können in Rezeptoren mit und ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität unterteilt werden. Die Rezeptortyrosinkinasen, zu denen auch die Rezeptoren der EGF (*Epidermal Growth Factor*)-Familie zählen, bilden eine Hauptklasse der Zelloberflächenrezeptoren. Im Vergleich zum Säuger ist die Funktion und Struktur der EGF-Rezeptoren im Fisch weitgehend unerforscht. Mit Ausnahme von *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger), *Tetraodon nigroviridis* (Grüner Kugelfisch), *Takifugu rubripes* (Japanischer Kugelfisch) und *Danio rerio* (Zebraquappe) wurden bisher aus keiner weiteren Fischart EGF-Rezeptorgene isoliert. Nur wenige Analysen liefern Hinweise auf die Wirkung von heterologem EGF auf piscine Oozyten (u. a. Pati et al., 1996; Newsted et al., 2000; Pang et al., 2002). Die Existenz eines homologen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) wurde bisher nur in *Danio rerio* nachgewiesen (Wang et al., 2004).

Über die durch Prolactin verursachten intrazellulären Signalprozesse im Fisch ist ebenso wenig bekannt. Wenngleich die physiologischen Effekte des Cytokins bei Teleostern eingehender erforscht wurden, siehe Kap. 2.2.1, leitet sich das Wissen über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ebenso aus Untersuchungen an Säugern ab.

2 Stand der Forschung

2.1. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) umfassen eine Gruppe von strukturell verwandten Transmembranproteinen. Eine einzelne, hydrophobe Transmembran- α -helix verbindet die N-terminale extrazelluläre Domäne mit der cytoplasmatischen Region. Der extrazelluläre Teil ist meist glykosyliert und verantwortlich für die Ligandbindung. Intrazellulär setzen sich alle RTKs aus der Juxtamembrandomäne, der katalytischen Region mit der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität und dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Yarden et al., 1988a). Die Tyrosinkinasedomäne ist innerhalb dieser Rezeptoren hoch konserviert. Sie enthält sowohl eine Bindestelle für ATP als auch eine für Substrate. Damit katalysiert die Kinase die Autophosphorylierung des Rezeptors und die Tyrosinphosphorylierung der zellulären Proteine (Schlessinger, 1988; Hubbard et al., 1998). Der C-terminale Bereich ist weniger konserviert, besitzt jedoch mehrere Autophosphorylierungsstellen, die im aktivierten Zustand spezifische Proteinbindungsstellen darstellen und die Rezeptoraktivität modulieren (Ullrich et al., 1990).

Im Mensch sind bislang 58 Rezeptortyrosinkinasen beschrieben worden, die sich in der Struktur ihrer extrazellulären Domäne unterscheiden (Abb. 1) (Robinson et al., 2000). So besitzen die Klasse-I-Rezeptoren, welche auch als EGFR (*Epidermal growth Factor Receptor*)-Familie bezeichnet werden, in der extrazellulären Domäne zwei konservierte Cystein-reiche Regionen. Eine heterotetramere Struktur aus zwei extrazellulären α -Ketten, die über Disulfidbrücken mit zwei transmembranen β -Ketten verbunden sind, charakterisiert die Mitglieder der Insulin-Rezeptorfamilie. Immunglobulin-ähnliche Wiederholungen und ein Fehlen der Cystein-reichen Region in der extrazellulären Domäne kennzeichnen dagegen u. a. die Vertreter der PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*)-Familie (Abb. 1).

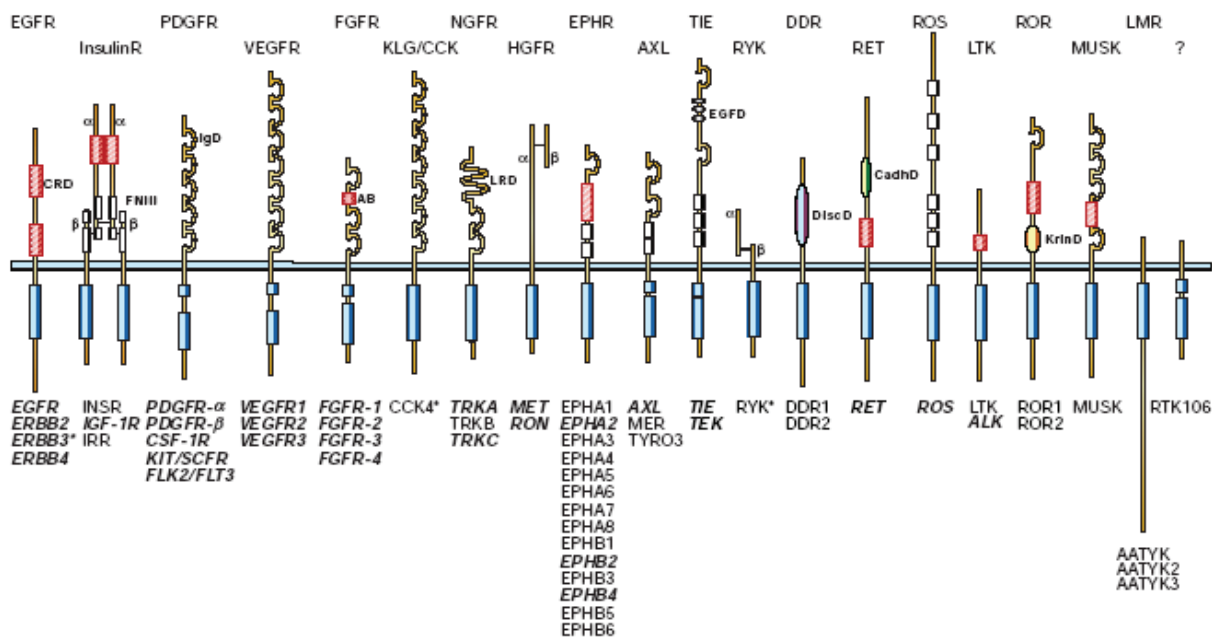


Abbildung 1: Humane Rezeptortyrosinkinase-Familien. Abgebildet sind die 20 RTK-Familien: EGFR – epidermal growth factor receptor; InsR – insulin receptor; PDGFR – platelet derived growth factor receptor; VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor; FGFR – fibroblast growth factor receptor; KLG/CCK – colon carcinoma kinase; NGFR – nerve growth factor receptor; HGFR – hepatocyte growth factor receptor; EphR – ephrin receptor; Axl – a Tyro3 PTK; TIE – tyrosine kinase receptor in endothelial cells; RYK – receptor related to tyrosine kinases; DDR – discoidin domain receptor; Ret – rearranged during transfection; ROS – RPTK expressed in some epithelial cell types; LTK – leukocyte tyrosine kinase; ROR – receptor orphan; MuSK – muscle specific kinase; LMR – Lemur. Weitere Abkürzungen: AB – acidic box; CadhD – cadherin like domain; CRD – cysteine rich domain; DiscD – discoidin like domain; EGFD – epidermal growth factor like domain; FNIII – fibronectin type III like domain; IgD – immunoglobulin like domain; EGFD – epidermal growth factor like domain; KrlnD – kringle like domain; LRD – leucine rich domain. (Blume-Jensen et al., 2001)

2.1.1 Die EGFR-Familie im Säuger

Die Rezeptoren der EGFR (*Epidermal growth Factor Receptor*)-Familie kontrollieren mit ihren Liganden eine Vielzahl essentieller physiologischer Zellprozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Reproduktion. Ebenso werden sie häufig im Zusammenhang mit der Entstehung und Entwicklung pathophysiologischer Prozesse beim Mensch genannt (Fischer et al., 2003). Vielen Krebsformen resultieren aus der Überexpression, Mutation oder Amplifikation der *egfr* Gene (Yarden et al., 2001). So wird zum Beispiel bei Brust-, Magen-, Lungen- und Darmkrebs häufig eine Amplifikation des *her2* Gens beobachtet (Blume-Jensen et al., 2001).

In Säugern erfolgten daher zahlreiche biochemische und molekularbiologische Analysen der EGFR-Familie. Sie besteht aus vier Mitgliedern. Der Rezeptor für den humanen epidermalen

Wachstumsfaktor (EGF) wurde bereits 1974 von O'Keefe et al. durch Bindungsstudien entdeckt. Ullrich et al. publizierten 1984 die komplette Aminosäuresequenz des Rezeptors, welcher auch als HER1 (humaner EGFR) oder ErbB1 (*erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene protein 1*) bezeichnet wird.

Der humane EGFR (HER1) kann auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen wie Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Wells, 1999). Das Protein hat mit einer Länge von 1186 Aminosäureresten eine molekulare Masse von 170 kDa, welche durch einen hohen Glykosylierungsgrad der extrazellulären Domäne verursacht wird (Ullrich et al., 1984). Diese Domäne (621 AS) wird in die Subdomänen I bis IV (Lax et al., 1988), die auch als L1, S1, L2 und S2 bezeichnet werden (Garrett et al, 2002), unterteilt. Die Domänen I und III sind die Ligandbindungsdomänen, wobei Domäne I eine geringere Affinität gegenüber Liganden aufzeigt, stattdessen aber eine wesentliche Rolle in der Rezeptordimerisierung einnimmt (Lemmon et al., 1997). Die Cystein-reichen Domänen II und IV flankieren die Hauptligandbindungsdomäne III (Lax et al., 1989). Die Anzahl und der Abstand zwischen den Cysteinen sind innerhalb der EGFR-Familie konserviert (Abe et al., 1998). Eine einzelne, hydrophobe Transmembrandomäne (23 AS) verkörpert die Verbindung zum intrazellulären Abschnitt des Rezeptors (542 AS), in welchem die typische Proteinkinasedomäne lokalisiert ist (Ullrich et al., 1984).

Die weiteren drei Mitglieder der EGFR-Familie HER2 (ErbB2) (Coussens et al., 1985), HER3 (ErbB3) (Kraus et al., 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman et al., 1993) wurden ebenso gut beschrieben. HER2 und HER3 nehmen eine Sonderstellung ein. Für HER2 wurde bis heute kein Ligand identifiziert und die katalytische Domäne von HER3 weist keine Kinaseaktivität auf (Schlessinger, 2000).

2.1.2 EGF-induzierte Signaltransduktionswege im Säuger

Eine Vielzahl an Liganden mit einem charakteristischen EGF-ähnlichem Motiv wie EGF, TGF- α und Amphiregulin können mit der Ligandbindungsdomäne des Rezeptors interagieren (David et al., 1996) und die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren bewirken. Derzeit werden zwei verschiedene Modelle der Rezeptordimerisierung diskutiert. Ein Modell beschreibt den Ligand-vermittelten Mechanismus, bei dem zwei EGF-Moleküle einen Komplex mit zwei Rezeptoren bilden, in dem jedes EGF-Molekül Kontakt mit beiden

Rezeptoren hat (Lemmon et al., 1997) (Abb. 2A). Gegen dieses Modell sprechen die, von Ogiso et al. (2002) und Garrett et al. (2002) unabhängig voneinander veröffentlichten Kristallstrukturen von EGF-EGFR- bzw. TGF α -EGFR-Komplexen, in denen jeder Ligand nur an ein EGFR-Molekül bindet. In der, in Abbildung 2B dargestellten, Rezeptor-vermittelten Dimerisierung bewirkt die Ligandbindung eine Konformationsänderung im Rezeptor, die eine Interaktionsstelle in der extrazellulären Domäne freilegt (Schlessinger, 2002).

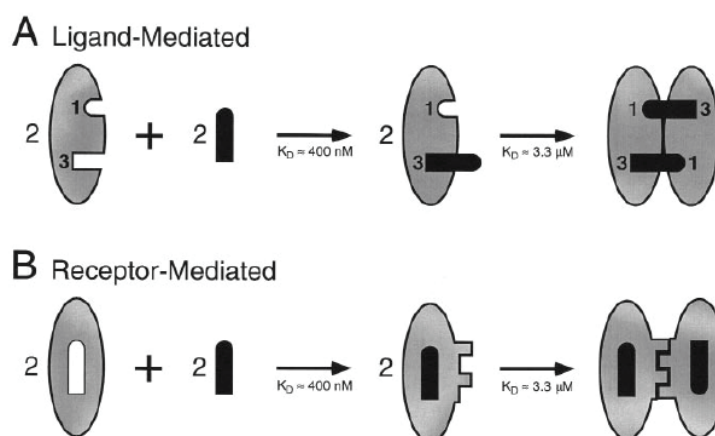


Abbildung 2: EGF- Rezeptordimerisierung. (A) Ligand-vermittelter Mechanismus; (B) Rezeptor-vermittelter Mechanismus. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Lemmon et al., 1997)

Die Bindung der Liganden kann neben der Bildung von Rezeptorhomodimeren auch die von Heterodimeren bewirken. Dabei ist eine Komplexbildung zwischen verschiedenen Rezeptoren einer RTK-Familie zu beobachten, so zum Beispiel zwischen EGF und ErbB2 (Heldin, 1995). In beiden Fällen führt die folgende Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste im C-terminalen Bereich des Rezeptors (Coffer et al., 1995). Die phosphorylierten Rezeptortyrosinreste dienen als potentielle Andockstellen für cytoplasmatische Proteine, die eine Reihe von Signalkaskaden induzieren können.

Die ersten Komponenten intrazellulären Signalkaskaden sind zumeist Proteine, die über ihre SH2 (*src homology 2*)- oder PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domänen von den Phosphotyrosinresten des EGF-Rezeptors rekrutiert werden (Blume-Jensen et al., 2001).

Eine der Kaskaden ist der JAK- STAT- Signalweg. Die STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Faktoren 1, 3 und 5 sind konstitutiv mit dem EGF-Rezeptor assoziiert (Leaman et al., 1996a). Die Rolle der Januskinasen im EGFR/ STAT- Signalweg ist

dagegen bisher noch nicht geklärt (Olayioye et al., 1999). Die Aktivierung der STAT-Proteine wird direkt durch den epidermalen Wachstumsfaktor reguliert (siehe Kap. 2.2.2.1).

Adaptorproteine wie Shc (*Src homology 2 domain containing transforming protein*), Grb2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) und Gab1 (*Grb2-associated binding protein 1*) sind der Ausgangspunkt weiterer EGF-induzierter Signaltransduktionswege (Abb. 3).

Der ubiquitär verbreitete Ras- Raf- MAP-Kinase- Weg ist einer der am umfassendsten untersuchten Signalwege (siehe Kap. 2.2.2.2).

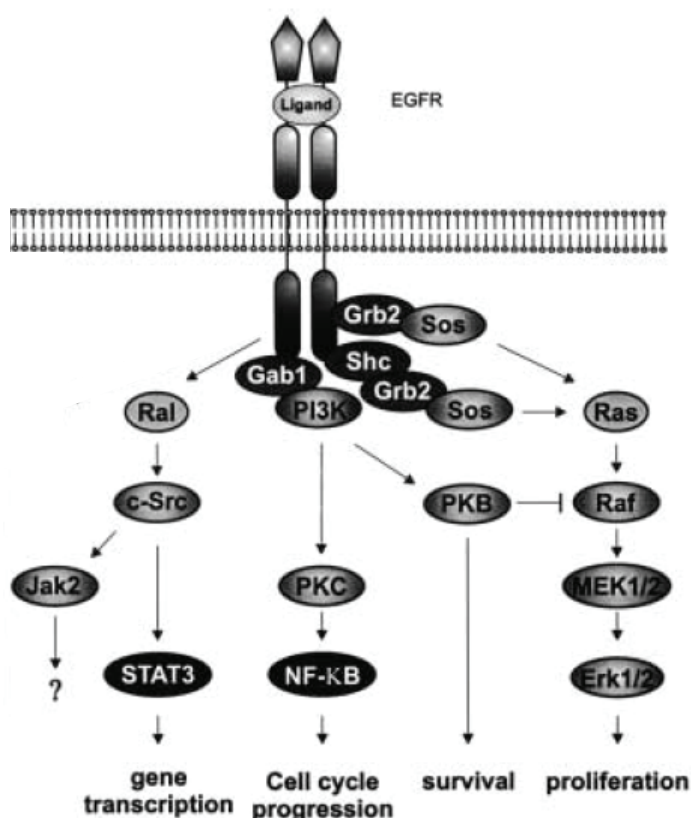


Abbildung 3: EGF-induzierte Signaltransduktionswege. Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung und die dadurch bedingte Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinreste schaffen Andockstellen für Adaptormoleküle mit SH2- oder PTB-Bindungsmotiven. Die ausgelösten Signalwege führen a. u. zur Gentranskription, Zellvermehrung und Proliferation. Weitere Erläuterungen siehe Text. (modifiziert nach Prenzel et al., 2001)

Ein weiterer, in Abbildung 3 dargestellter, durch den Wachstumsfaktor EGF beeinflusster Signaltransfer wird über die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) vermittelt. Da der EGFR im Gegensatz zu HER3 keine Bindungsstelle für PI3-K besitzt (Soltoff et al., 1994), vermittelt Gab1 die Aktivierung der Kinase durch den Rezeptor (Rodrigues et al., 2000). Im Verlauf der Kaskade phosphoryliert PI3-K sowohl die Proteinkinase B (PKB) als auch die Proteinkinase

C (PKC). In Folge wird unter anderem der Transkriptionsfaktor NF- κ B stimuliert, der im Zellkern eine Fülle an Gentranskriptionen reguliert (Prenzel et al., 2001). PKB fungiert außerdem als Schnittstelle zum zuvor erwähnten Raf- Ras- MAP-Kinase- Weg (Abb. 3). Die Phosphorylierung von Serinresten in der katalytischen Domäne von Raf führen zur Hemmung der Kinaseaktivität des Proteins (Zimmermann et al., 1999).

2.1.3 Die EGFR-Familie der Fische

Die Kenntnisse über die Klasse-I-Rezeptortyrosinkinase und die induzierten Signaltransduktionswege in Teleostern sind im Vergleich zum Mensch verhältnismäßig überschaubar. Rezeptoren der EGFR-Familie wurden bisher für die vier Fischarten *Danio rerio* (Zebraquappe), *Takifugu rubripes* (Japanischer Kugelfisch), *Tetraodon nigroviridis* (Grüner Kugelfisch) und *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger) beschrieben. Wittbrodt et al. (1989) isolierten aus Tumorzellen des Schwertträgers erstmals ein Onkogen, welches eine mit dem EGF-Rezeptor (HER1) eng verwandte Tyrosinkinase codiert. Für die Analyse der genetischen Grundlage und der physiologischen Funktion der RTKs in der Tumorbildung werden die *Xiphophorus*-Melanome als *in vivo*-Modelle herangezogen (Wittbrodt et al., 1992). Das Onkogen *xmrk* (*Xiphophorus melanoma receptor kinase*) wird ausschließlich in malignen Melanomen und daraus abgeleiteten Zelllinien überexprimiert. Die Menge des Proteins korreliert mit der Bösartigkeit solcher Tumore (Wellbrock et al., 1998; Baudler et al., 1999).

Der Xmrk-Rezeptor weist alle strukturellen Merkmale der Klasse-I-RTKs auf (Abb. 1). Wie beim humanen EGFR bilden phosphorylierte Tyrosinreste im C-Terminus des Rezeptors Andockstellen für Grb2 und Shc, die eine Aktivierung der MAP-Kinase vermitteln (Wellbrock et al., 1999). STAT-Faktoren, speziell STAT5 (Morcinek et al., 2002) wird von der Xmrk-Kinase ebenso als Substrat genutzt wie PI3-K (Wellbrock et al., 2000). Die verstärkte Aktivierung der Signaltransduktionswege, die u. a. zur Steigerung der Zellproliferation führen, wird durch die konstitutive Dimerisierung des Xmrk-Rezeptors, ausgelöst durch Mutationen in der extrazellulären Domäne, verursacht (Gomez et al., 2001).

Während in höheren Vertebraten bislang nur ein *egfr* Gen identifiziert wurde, konnten im Genom des Schwertträgers neben dem Onkogen *xmrk* zwei weitere *egfr* Gene isoliert werden. Beide Gene sind Co-Orthologe des *egfr* Gens der Säuger und aus einer fischspezifische

Genomduplikation vor ca. 90 Mio. Jahren hervorgegangen (Volff et al., 2003). Die von der *egfra* cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine Übereinstimmung zwischen 67 % und 69 % mit dem EGFR des Huhnes, einiger Säuger und dem Xmrk-Rezeptor (Gomez et al., 2004).

Wang et al. und Goishi et al. (2004, 2003) veröffentlichten fast zeitgleich die Sequenz des EGF-Rezeptors des Zebrafisches. Neben dem vollständigen EGFR, der eine Homologie von ca. 63 % mit dem des Menschen aufweist, konnte die Arbeitsgruppe um Wang (2004) noch 3 kürzere Formen des Rezeptors isolieren. Diese offensichtlichen Spleißvarianten bestehen nur aus der extrazellulären Domäne und wurden bisher schon für Huhn, Nager und Mensch beschrieben (Wang et al., 2004). Die Funktion der EGFR-Varianten ist unklar. Die Autoren konnten in dem Zusammenhang auch erstmals den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aus einem Fisch charakterisieren.

Darüber hinaus wurden die Sequenzen weiterer 3 Mitglieder der EGFR-Familie aus *Danio rerio* veröffentlicht. Das *erbB4* Gen aus dem Zebrafisch, dessen Genprodukt mit 73 % eine hohe Homologie zu ErbB4 der Ratte und des Menschen aufweist, klonierten Sussman et al. 2007. Die Sequenzen von ErbB2 und 3 sind von Lyons et al. (2005) in der NCBI-Genbank hinterlegt worden.

Für zwei weitere Teleostee wurden im Zuge von Genomforschungsprojekten u. a. Rezeptorsequenzen der EGFR-Familie in verschiedenen Genbanken wie NCBI und Ensembl hinterlegt (Stein et al., 2006). Sowohl von *Takifugu rubripes* als auch *Tetraodon nigroviridis* sind die Sequenzen von EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 bekannt. Infolge von Genduplikationen in der Evolution der Fische liegen im Genom dieser Spezies je zwei *egfr*, *erbB3* und *erbB4* Gene vor (Volff et al., 2003).

2.1.3.1 Funktionen von EGF und EGFR im Knochenfisch

Eine der vielen Wirkungen von EGF ist die Regulation der Gonadenfunktion in Wirbeltieren. Die biologische Aktivität von EGF in den Ovarien des Goldfisches (*Carassius auratus*) wurde von Pati et al. (1996) durch die Anwendung von Maus-EGF nachgewiesen. Der Wachstumsfaktor ist in der Lage, die Meiose der Eizellen des Goldfisches zu stimulieren. Im Zebrafisch *D. rerio* konnten Pang et al. (2002) die durch human rekombinantes EGF geförderte Oozytenreifung zeigen.

Die Rolle des EGFR in der kardiovaskulären Aktivität demonstrierten Goishi et al. (2003) in Embryonen des Zebrafisches. Die Inhibition des Rezeptors führte zu einer Herzmuskelschwäche und infolgedessen zu einer gestörten Blutzirkulation. Ähnliche Effekte konnten Chen et al. (2000) bereits in Mäuseembryonen zeigen.

Lyons et al. beschrieben 2005 die Funktion der ErbB2- und ErbB3-Rezeptoren für die Ausbildung des peripheren Nervensystems während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches. Sie sind im Fisch an der Migration Schwannscher Zellen und der Regulation der Myelinbildung beteiligt. Mutationen der Rezeptoren führten zu einer Störung der Differenzierung neuronaler Stammzellen und damit zu einer Fehlbildung der sympathischen Nerven im Rumpf (Honjo et al., 2008). Einen ähnlichen Phänotyp beschrieben Britsch et al. (1998) für Mäuse mit homozygot mutierten *erbB2* und *erbB3* Genen.

Die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an die Lebermembran der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) wurde 1991 von Newsted und Giesy charakterisiert. Sie zeigten, dass Maus-EGF spezifisch, reversibel und mit hoher Affinität an einen Rezeptor in der Lebermembran bindet. 2000 wiesen sie einen Zusammenhang zwischen EGF-Bindung und der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors nach. In einer weiteren Studie zur Aktivierung und Translokation von ERK konnten Ebner et al. (2007) die Wirkung von EGF auch auf eine Kiemenzelllinie der Forelle zeigen. Vermutlich besitzen Forellen ebenso wie die oben aufgeführten Teleosterezeptoren der EGFR-Familie.

2.2 Klasse-I-Cytokinrezeptoren

Eine weitere große Gruppe der Cytokinrezeptoren sind neben den Rezeptortyrosinkinasen die Rezeptoren ohne katalytische Kinasedomäne, die Klasse-I-Cytokinrezeptoren. Dazu gehört u. a. auch der Prolactinrezeptor.

Die Klasse-I- / Typ-I-Cytokinrezeptoren weisen eine strukturelle Gemeinsamkeit in einer 200- 240 Aminosäurereste umfassenden extrazellulären Ligandbindungsdomäne auf. Vier konservierte Cysteinreste und das für die Ligandbindung essentielle WS-Motiv (Trp-Ser-X-Trp-Ser) charakterisieren diese Region (Abb. 4) (Kaczmarek et al., 1991; Baumgartner et al., 1994).

Die kurze, hydrophobe Transmembrandomäne ist für die Verankerung in der Zellmembran verantwortlich und scheint außerdem eine Rolle bei der Rezeptordimerisierung zu spielen (Constantinescu et al., 2001).

Die cytoplasmatischen Domänen zeigen eine höhere Divergenz mit Ausnahme zweier membranproximal gelegenen Bereichen. Diese konservierten, prolinreichen Sequenzmotive werden als Box1 und Box2 bezeichnet (Abb. 4) (Freeman et al., 2000). Die Region ist entscheidend für die Assoziation mit cytosolischen Proteinkinasen, die durch Substratphosphorylierung nachgeschaltete Signalkaskaden in Gang setzen (DaSilva et al., 1994; Ihle et al., 1995a).

Anhand struktureller und funktioneller Unterschiede werden die Klasse-I-Cytokinrezeptoren in verschiedene Typen unterteilt.

Eine Einteilung erfolgt aufgrund der durch die Ligandbindung initiierten Komplexbildung zwischen Rezeptorketten (Abb. 4). Die Signaltransduktion durch die Bildung von Homodimeren wurde beispielsweise für den EPO-, Prolactin- und GH-Rezeptor beschrieben. Die aktivierten IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptorkomplexe bestehen aus zwei verschiedenen Polypeptidketten. IL-2-Rezeptoren bilden Heterotrimere (Moutoussamy et al., 1998).

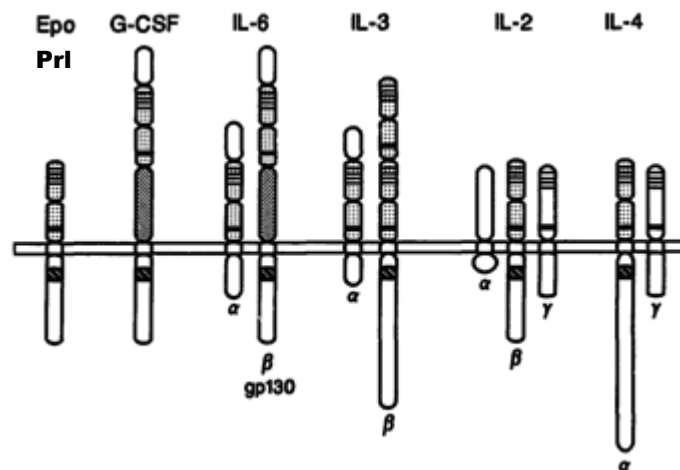


Abbildung 4: Cytokin-Klasse-I-Rezeptoren. Die konservierten Cysteinreste im extrazellulären Teil sind durch dünne, horizontale Linie gekennzeichnet. Eine dicke Linie markiert das WS-Motiv. Box1 und 2 in der intrazellulären Domäne sind dunkel gerahmt. Epo - Erythropoietin, Prl - Prolactin, G-CSF - *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, Il - Interleukin (modifiziert nach Ihle et al., 1995a).

2.2.1 Der Prolactinrezeptor

Das beim Säuger hauptsächlich in der Adenohypophyse produzierte Klasse-I-Cytokin Prolactin vermittelt seine mehr als 300 verschiedenen physiologischen Funktionen in Vertebraten über den Prolactinrezeptor (PrlR). Neben der Steuerung von Laktation und Reproduktion beeinflusst Prolactin die Immunregulation, die Differenzierung und Proliferation verschiedener Gewebe sowie die Osmoregulation in Fischen (Bole-Feysot et al., 1998).

Der Prolactinrezeptor wurde bislang bei vielen Säugern, Fischen und Vögeln gefunden. In Säugern sind drei Isoformen des Prl-Rezeptors beschrieben worden (Goffin et al., 1997). Diese Formen stimmen in ihren extrazellulären Domänen überein, unterscheiden sich jedoch in der Länge und Sequenz der cytoplasmatischen Domäne. Sie kommen durch drei verschiedene Promotorregionen des *prlR* Gens, die gewebespezifisch reguliert werden, und durch alternatives Spleißen der mRNAs zustande. Promotor I ist spezifisch für Gonadengewebe, Promotor II für Lebergewebe und Promotor II wurde in verschiedenen Gewebetypen nachgewiesen (Freeman et al., 2000).

Neben den membrangebundenen Isoformen wurde eine lösliche Variante des Prl-Rezeptors aus Blut und Milch von Säugern isoliert. Sowohl die Funktion als auch die Entstehung dieser sind noch unklar (Forsyth et al., 2002).

Die mRNA des Prolactinrezeptors wurde erstmals aus Rattenlebergewebe isoliert. Mit 291 Aminosäuren entspricht das Protein der kurzen Isoform. Die lange Rezeptorvariante der Säuger umfasst 591 Aminosäurereste (Goffin et al., 1997).

2.2.1.1. Der Prolactinrezeptor im Knochenfisch

Eine der wichtigsten Funktionen des Prolactins in Teleostern ist die Osmoregulation bei der Süßwasser-Adaptation der meisten euryhalinen Fische. Während dieses Prozesses steigt die Konzentration des Cytokins in der Hypophyse und im Blutplasma. Der Wasser- und Elektrolythaushalt wird durch die Regulation von Ionentransportmechanismen und der Permeabilität von osmoregulativen Epithelien wie Nieren, Haut, Kiemen und Darm ausgeglichen (Loretz et al., 1982). In diesen Organen ist somit auch die stärkste PrlR-Expression zu verzeichnen (Manzon 2002).

Die erste vollständige cDNA eines Prl-Rezeptors eines Teleosteers klonierten Sandra et al. 1995 aus der Tilapia-Art *Oreochromis niloticus*. Das ermöglichte erstmals gezielte Untersuchungen pisciner Prl-Rezeptoren und deren Funktionen. Für viele derartige Studien wurden die Tilapia-Arten *Oreochromis niloticus* und *Oreochromis mossambicus* aber auch die Forellen-Arten *Oncorhynchus mykiss* und *Oncorhynchus keta* herangezogen.

In den wichtigen osmoregulatorischen Organen Kiemen, Niere und Darm von *O. niloticus* und *O. mykiss* konnten Prunet et al. (2000) die höchsten PrlR-Transkriptmengen im Vergleich mit weiteren Organen feststellen. Neben der Osmoregulation ist der Prolactinrezeptor in Fischen wie auch im Säuger in die Reproduktion und Immunregulation involviert. In den Gonaden der Goldbrasse (*Sparus aurata*) konnten Cavaco et al. (2003) den Rezeptor mittels spezifischer polyclonaler Antikörper nachweisen. Die Expressionsstudie des *prlR* Gens in *O. niloticus* durch Sandra et al. 2000 zeigt, dass der Rezeptor auch in den beiden hämatopoietischen Organen Milz und Kopfniere sowie in zirkulierenden Lymphozyten gebildet wird. Der Einfluss von Prolactin auf die Immunität der Teleosteer wird durch den Nachweis der Modulation der Makrophagenaktivität in der Forelle (Sakai et al., 1996) belegt. Die genaue Funktion des Prl-Rezeptors und deren Ligand sind in diesem Zusammenhang noch unklar.

Neben der von *O. niloticus* wurden bislang die Rezeptorsequenzen folgender Fischarten veröffentlicht: *Carassius auratus* (Goldfisch; Tse et al., 2000), *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle; LeRouzic et al., 2001), *Sparus aurata* (Goldbrasse; Santos et al., 2001), *Paralichthys olivaceus* (Japanische Flunder; Higashimoto et al., 2001) und *Cyprinus carpio* (Karpfen; San Martin et al., 2004).

Alle bekannten PrlRs der Fische weisen eine Länge von ca. 600 Aminosäuren auf und sind der langen Isoform des Säuger- Prl-Rezeptors am ähnlichsten. Die Homologien zwischen den piscinen Rezeptoren betragen 34 % bis 64 % und die im Vergleich mit anderen Vertebraten 27- 36 % (Manzon, 2002).

Die Gegenüberstellung der Liganden aus Fischen und Säugern ergab mit ca. 31 % einen ähnlichen Wert, was eine Koevolution von Prolactin und seinem Rezeptor andeutet (Sandra et al., 1995).

Die extrazellulären Domänen, speziell die für die Ligandbindung relevanten Abschnitte, zeigen mit bis zu 75 % zwischen den Fischen die höchste Übereinstimmung. Zwischen Säugern und Teleosteen sind sie zu 42- 52 % identisch. Dagegen ist die intrazelluläre Domäne die Region des PrlR mit den geringsten Homologien mit Ausnahme der vollständig

konservierten Box1, die als Andockstelle für cytoplasmatische Kinasen dient. Dies lässt auch eine Konservierung der Signaltransduktionswege innerhalb der Vertebraten vermuten (Manzon, 2002).

2.2.2 Prolactin-induzierte Signaltransduktionswege

Eine wichtige Bedingung für die Induktion von Signaltransduktionswegen ist die Cytokinbindung und die daraus resultierende Rezeptoraktivierung. Zwei Regionen des Prolactins sind an der Assoziation mit dem Rezeptor beteiligt. Ein zunächst inaktiver Komplex wird durch die Interaktion der ersten Bindungssequenz mit einem Rezeptormolekül gebildet. Über die zweite Sequenz des Prolactins rekrutiert der 1:1-Komplex ein weiteres Rezeptormolekül. Im dem trimeren Prl-PrlR-Verbund sind die intrazellulären Rezeptordomänen und die mit ihnen assoziierten Tyrosinkinasen in räumliche Nähe zueinander gebracht. In Folge von Autophosphorylierung werden diese als Januskinasen (JAK) bezeichnete Enzyme aktiviert und phosphorylieren ihrerseits verschiedene Substrate, wie den Rezeptor selbst (Gertler et al., 1996; Goffin et al., 1997).

Eine ähnliche Stöchiometrie der Interaktion zwischen Prolactin und Rezeptor wie bei Säugern ergaben entsprechende Untersuchungen des Prolactinrezeptors von *O. mykiss* (LeRouzic et al., 2001).

Außerdem wurde festgestellt, dass sowohl bei Mäusen als auch bei der Forelle der aktive 1:2-Prl-PrlR-Komplex instabil ist und schnell in den 1:1-Komplex dissoziiert, wobei die Zeit für die Aktivierung der Signalkaskaden ausreichend zu sein scheint (Manzon, 2002). Heterologe Liganden, wie ovines placentares Lactogen (oPL) oder ovines Prolactin (oPrl) führten in beiden Spezies zu stabileren Ligand-Rezeptor-Interaktionen als bei Anwendung von homologen Liganden (Gertler et al., 1996; Sandowski et al., 2000; LeRouzic et al., 2001). Eine stabile Interaktion zwischen homologen Bindungspartnern beobachteten Prunet et al. (2000) in der Tilapia-Art *O. niloticus*. In dieser und einer weiteren Tilapia-Art (*O. mossambicus*) wurden jedoch auch zwei Prolactinformen mit unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit nachgewiesen (Specker et al., 1985, Auperin et al., 1994). Ob beide Formen die Aktivierung der gleichen Signalwege bewirken, ist bisher nicht geklärt.

Prolactin-induzierte Signaltransduktionswege sind bis heute fast ausschließlich für Säuger beschrieben worden. Die am besten charakterisierten intrazellulären Signalkaskaden sind der

JAK- STAT- Weg und der Ras- Raf- MAP-Kinase- Weg, die im Folgenden kurz dargestellt werden (Abb. 5).

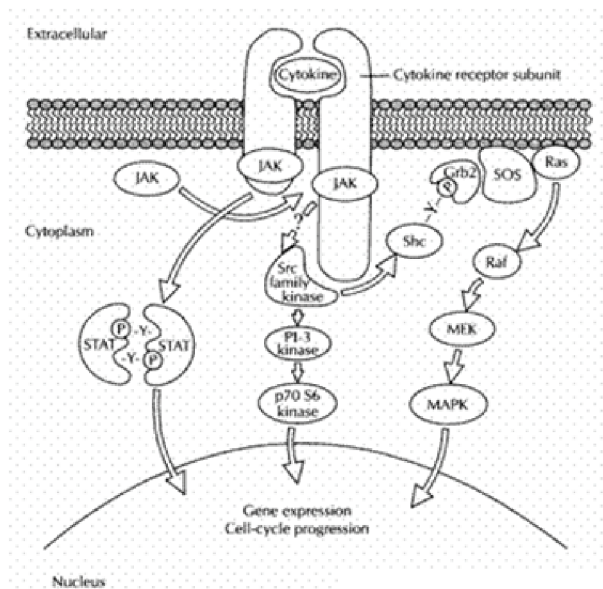


Abbildung 5: Cytokininduzierte Signaltransduktionswege. Schematische Darstellung nach Karnitz et al., 1995. Erläuterungen siehe Text.

2.2.2.1 Der JAK- STAT- Signalweg in Säugern

Der JAK- STAT- Weg ist eine ubiquitär verbreitete Form der intrazellulären Signalübertragung und wird durch viele Cytokine aktiviert.

Cytokinrezeptoren wie der Prolactinrezeptor müssen im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinasen (siehe Kap. 2.1.2), wie der EGF-Rezeptor, die Aktivierung von Signalkaskaden über Januskinasen (JAKs) vermitteln (Ihle et al., 1995a). Diese intrazellulären Enzyme sind entweder konstitutiv mit den konservierten, als Box1 und 2 bezeichneten Sequenzen der Cytokinrezeptoren assoziiert (Karnitz et al., 1995) oder werden nach Ligandbindung rekrutiert (Ihle et al., 1995b).

Im Säuger wurden bislang die vier Mitglieder der JAK-Familie JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2 identifiziert. Alle besitzen sieben hoch konservierte Domänen JH1- JH7 (Abb. 6). Die C-terminale JH1-Domäne verfügt über die katalytische Kinaseaktivität. Die Pseudokinasedomäne JH2 vermittelt die Bindung der *Signal Transducer and Activators of Transcription* (STATs). Die Domänen JH6 und JH7 interagieren mit den Rezeptoren (Wilks et al., 1994; Chilton et al., 2005).

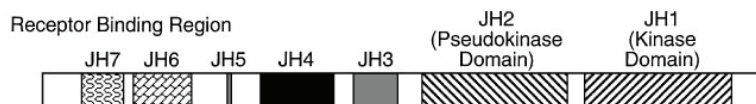


Abbildung 6: Die Struktur von Januskinasen (JAK). Schematische Darstellung nach Leonard et al., 1998. Erläuterungen siehe Text.

Mit dem Prolactinrezeptor scheint neben JAK1 hauptsächlich JAK2 assoziiert zu sein. Beide Kinasen werden durch die Bindung von Prolactin aktiviert, JAK1 jedoch mit geringerer Affinität und nur durch die lange Rezeptorisoform (DaSilva et al., 1994).

Die Substrate der Kinasen sind der Rezeptor selbst und cytosolische Proteine wie STAT-Faktoren. Aktivierte Januskinasen phosphorylieren zunächst Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Rezeptordomäne, die Teil der Bindungssequenz für STAT-Faktoren sind (Darnell, 1997).

Von der Familie der STAT-Faktoren sind aktuell acht Mitglieder STAT1 α , STAT1 β , STAT2 bis 4, STAT5a und b sowie STAT6 in Säugern bekannt (Shuai, 1999). Die etwa 90- 100 kDa schweren und 750- 850 Aminosäuren umfassenden Proteine besitzen gemeinsame, konservierte Strukturmerkmale (Abb. 7). Die Bindung von Phosphotyrosinresten anderer Proteine, einschließlich des Rezeptors, erfolgt durch die SH2-Domäne. Zusammen mit dem aminoterminalen Bereich zeigt diese Domäne innerhalb der STATs die höchste Homologie. Die im N-terminalen Abschnitt vorkommenden Phosphotyrosine dienen ebenfalls der Protein-Protein-Interaktion. In einem Bereich von ca. 320- 480 Aminosäuren liegt die DNA-bindende Domäne, ein weiteres charakteristisches Strukturmerkmal. Der C-Terminus, der wichtig für die Transkriptionsaktivierung ist, variiert in Länge und Sequenz deutlicher (Ihle, 2001; Kisseleva et al., 2002).

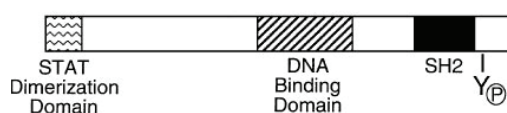


Abbildung 7: Die Struktur von STAT-Faktoren. Schematische Darstellung nach Leonard et al., 1998. Erläuterungen siehe Text.

Nachdem die aktivierte JAK2 Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Prl-Rezeptordomäne phosphoryliert hat, binden v. a. STAT5a und b aber auch STAT1 und STAT3 an diese (Lebrun et al., 1995; DaSilva et al., 1996) (Abb. 8). So zeigen STAT5-negative Mäuse den gleichen Phänotyp wie PrlR-negative. Das steht im Einklang mit der Auffassung, dass für alle physiologischen Funktionen des Prolactins STAT5 als Signalübermittler benötigt wird (Ihle, 2001). STAT1 ist dagegen nicht ausreichend für die Transkriptionsaktivierung von Prl-Zielgenen, scheint aber an der Regulation dieser beteiligt zu sein (Lebrun et al., 1995).

Welche STATs durch einen spezifischen Rezeptor aktiviert werden, wird durch die Interaktion zwischen SH2-Domäne und den konservierten Bindungsmotiven in der intrazellulären Rezeptordomäne bestimmt (Pellegrini et al., 1997).

STAT-Faktoren werden nach Rezeptorbindung durch die assoziierten Januskinasen phosphoryliert und bilden Homo- oder Heterodimere. Die Oligomerisierung von STAT-Faktoren erfolgt über die Interaktion der SH2-Domäne des einen Bindungspartners mit den N-terminalen Phosphotyrosinresten des anderen (Abb. 8).

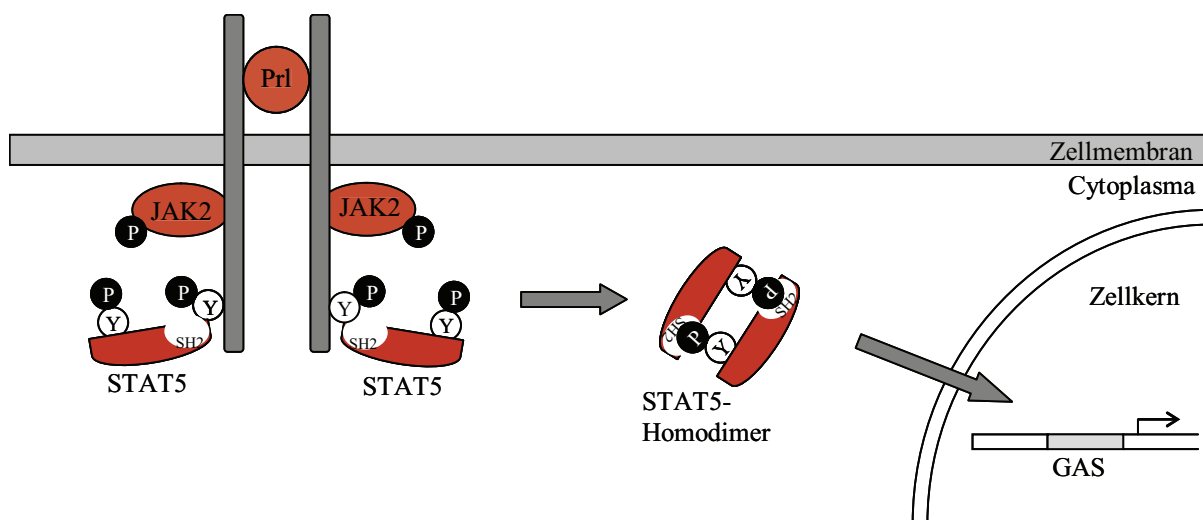


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prolactin-induzierten JAK2- STAT5- Signalweges. Erläuterungen siehe Text.

Nur die Dimere sind in der Lage nach Translokation in den Zellkern an spezifische DNA-Konsensussequenzen zu binden (Bromberg, 2001).

Zu diesen Bindungsorten gehören für STAT5-Homodimere beispielsweise das GAS- Element im Promotor des β -Casein Gens (Abb. 8). GAS besteht aus der palindromischen DNA-Sequenz TTCN₃GAA (Ali et al., 1998).

2.2.2.2 Der Ras- Raf- MAP-Kinase- Signalweg in Säugern

Obwohl der JAK- STAT- Weg die wichtigste Form der Prolactin-induzierten Signaltransduktion ist, wird auch in einer Reihe von Untersuchungen über die Aktivierung MAP (*Mitogen Activated Protein*)-Kinase-abhängiger Signalwege in Säugerzellen berichtet (Das et al., 1996; Hynes et al., 1997).

Der Ras- Raf- MAPK- Weg ist ebenso eine weit verbreitete Form des Signaltransfers in Eukaryoten. Zunächst kommt es nach Ligandbindung, wie auch beim JAK- STAT- Weg, zur Phosphorylierung von Tyrosinresten im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors durch Januskinasen. Neben STAT-Faktoren dienen diese ebenso anderen SH2-Domänen besitzenden Proteinen wie Grb2 (*Growth factor receptor binding 2*) oder Shc (*Src homology 2*) als Bindungsorte (Blenis, 1993).

Das Adaptorprotein Shc wird nach Rezeptorbindung ebenfalls phosphoryliert und kann so von Grb2 über dessen SH2-Domäne gebunden werden. Das Grb2-Protein ist gleichzeitig über seine SH3-Domäne mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*Son-of-Sevenless*) verknüpft. Der so durch Shc vermittelte, aktivierte Grb2-SOS-Komplex kann am membrangebundenen G-Protein Ras einen Austausch von GDP gegen GTP bewirken (Erwin et al., 1995). GTP-Ras aktiviert nun die Serin/Threonin-Kinase Raf1. Dieses Enzym phosphoryliert seinerseits die Tyrosin/Threonin-Kinasen MEK1 und MEK2 (*Mitogen Activated Extracellular Signal Related Kinase*) (Abb. 9) (Crews et al., 1992; Huang et al., 1993). Durch die Phosphorylierung von Tyrosin und Threonin aktivieren MEK1 und 2 MAP-Kinasen, die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (Davis, 1993; Zhang et al., 2002).

Am Prolactin-induzierten Signalweg sind unter anderem die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (*Extracellular Regulated Kinase*) beteiligt, die auch nach ihrem Molekulargewicht als p44^{MAPK} und p42^{MAPK} bezeichnet werden (Hynes et al., 1997; Goupille et al., 2000). Zu ihren Substraten im Zellkern zählen Proteine wie c-Myc, ELK-1 und c-Jun, die zum Beispiel über Bindung an das *Serum Response Element* (SRE) den *c-fos*-Promotor beeinflussen (Davis, 1993) (Abb. 9).

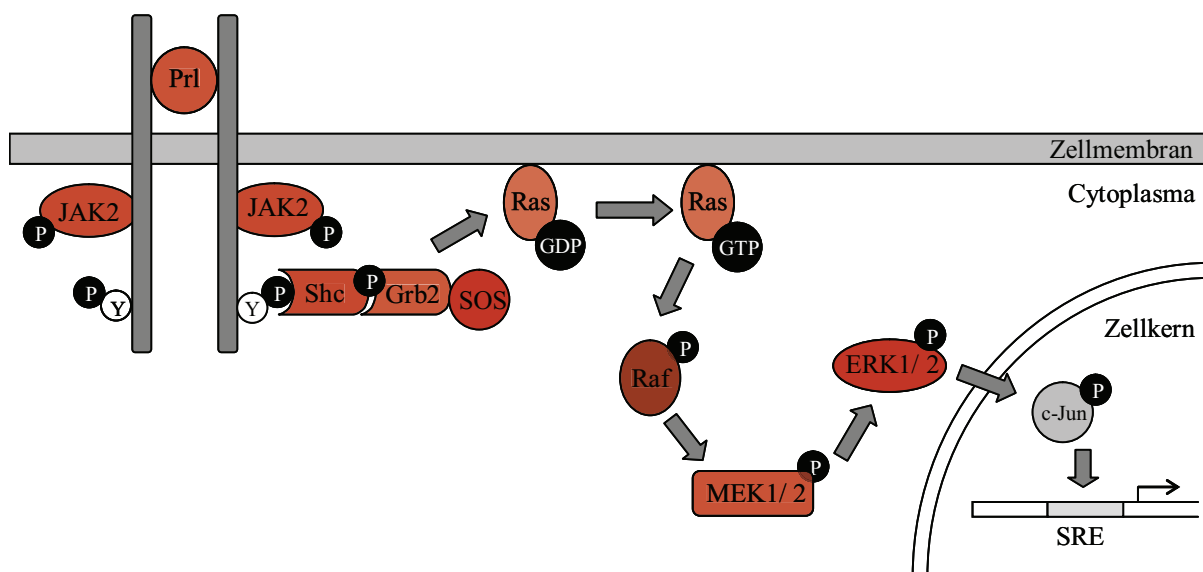


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prolactin-induzierten Ras- Raf- MAPK- Signalweges. Erläuterungen siehe Text.

Neben den klassischen MAP-Kinasen (ERK1, ERK2) wurden in Säugerzelle drei weitere mitogen-aktivierte Proteinkinasen charakterisiert. Während ERK1 und ERK2 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren induziert werden, werden die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie die p38-Kinase und ERK5 hauptsächlich nach zellulärem Stress aktiviert (Nishimoto et al., 2006).

Mit dem Cytokin-vermittelten intrazellulären Signaltransfer sind eine Reihe weiterer Proteine assoziiert, die sowohl regulatorisch auf die beschriebenen Signalkaskaden wirken als auch als Schnittstellen zu anderen Signalwegen fungieren. Im Zusammenhang mit Prolactin zählt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-vermittelte Wirkung zu den wichtigsten. Sie wird über die Src-Kinase Fyn in Gang gesetzt (Bole-Feysot et al., 1998) und kann zu einer alternativen Aktivierung von MAPK führen (Abb. 5) (Das et al., 1997).

Die MAP-Kinasen selbst beeinflussen ebenfalls andere Signalwege. So können sie durch Phosphorylierung von Serinresten STAT-Faktoren aktivieren (Leaman et al., 1996b). Pircher et al. (2005) detektierten einen STAT5a-ERK1/2-Komplex in Ovarienzellen des Hamsters und zeigten damit erstmals eine direkte physische Verbindung. Das Adaptorprotein Grb2 hat neben seiner aktivierenden Wirkung auch eine inhibierende im JAK- STAT- Signalweg. Grb2 dient hier zusammen mit der Tyrosinphosphatase SHP1 als Adaptor zwischen JAK2 und

SOCS-1 (*Suppressor of cytokine signaling*). SOCS-1 gehört zur Familie von Inhibitoren des Cytokin-induzierten Signaltransfers und verhindert die Phosphorylierung von STAT5 durch JAK2 (Minoo et al., 2004).

2.2.2.3 Signaltransduktionswege in Fischzellen

Die Verbindung von Prolactin-induzierter Transkriptionsaktivierung über JAK- STAT- und MAPK-abhängige Signalwege konnte bislang in Teleostern nicht nachgewiesen werden. Ein solcher Zusammenhang kann jedoch als sehr wahrscheinlich angenommen werden, da eine Reihe von Untersuchungen die Existenz einzelner Komponenten der Signalkaskaden in Fischen belegen.

Zu Januskinasen homologe Proteine wurden bereits in einigen Teleostern beschrieben. Rycyzyn et al. konnten 1998 ein JAK1-homologes Protein in einer Lymphozytenzelllinie des Gabelwels *Ictalurus punctatus* nachweisen. Eine gewebespezifische Expression zweier JAK2-Isoformen demonstrierten Oates et al. (1999a) im Zebraärbli *Danio rerio*. Der Sequenzvergleich mit dem Maus- Homolog ergab eine Übereinstimmung von ca. 65 %. Aus ConA-stimulierten Leukozyten der Kopfniere des Karpfens (*C. carpio*) isolierten Yin et al. (2000) ein JAK3-homologes Protein. In der Aminosäuresequenz ist es zu 50- 52 % identisch mit bekannten JAK3-Proteinen aus Säugern. Im gleichen Jahr wies die Arbeitsgruppe um Leu (2000) erstmals alle vier Mitglieder der JAK-Familie im Kugelfisch *Tetraodon fluviatilis* nach. Es zeigten sich relativ hohe Übereinstimmungen von 45,5 % (Tyk2) bis 66,8 % (JAK2) mit den orthologen Säugerproteinen. In der Leberzelllinie RTH-149 von *O. mykiss* gelang mittels spezifischer, gegen Säugerproteine gerichteter Antikörper die Detektion eines JAK2-homologen Proteins (Marchi et al., 2005).

Wie auch für JAK-Proteine sind für STAT-Faktoren codierende Gene nur von wenigen Teleostern kloniert worden. So wurde STAT1 und STAT3 im Zebraärbli (*D. rerio*) charakterisiert. Mit 63,9 % bzw. 86,5 % zeigen beide hohe Übereinstimmungen zu den entsprechenden Faktoren der Maus (Oates et al., 1999b). Die vollständige STAT1-mRNA aus dem Goldfisch (*C. auratus*) wurde von einer Arbeitsgruppe 2004 isoliert. Das Protein weist alle für STATs zuvor beschriebenen Domänen auf (Abb. 7) und ist mit 59 % homolog zum STAT1 der Ratte (Zhang et al., 2004). Aus dem Genom des Kugelfisches *T. fluviatilis* klonierten und charakterisierten Sung et al. (2003) das *stat5* Gen. Die Aminosäuresequenz des Genproduktes stimmt zu 76 % mit STAT5a und zu 78 % mit STAT5b der Maus überein.

Dennoch ist bislang kein kompletter JAK- STAT- Signaltransduktionsweg im Fisch beschrieben worden. Ebenso trifft dies auf den Ras- Raf- MAPK- Weg zu.

Die Beteiligung von MAP-Kinasen an Proliferations-, Differenzierungs- und Wachstumsprozesse bei Teleostern wurde in einigen Untersuchungen vor allem am Zebraäbrbling *D. rerio* demonstriert (Shinya et al., 2001; Pozios et al., 2001; Snaar-Jagalska et al., 2003).

Ergänzend klonierten Krens et al. 2006 eine Reihe von Genen der MAPK-Familie aus dem Zebraäbrbling- Genom. Sie hinterlegten die Sequenzen von ERK1 bis ERK7 in Genbanken. Vergleiche zeigten, dass z. B. ERK1 und 2 zu 80- 90 % identisch mit den homologen Proteinen aus Mensch, Ratte und Maus sind. Weiterhin wurden das JNK1-Protein und zwei Isoformen von p38 isoliert, die ähnliche hohe Übereinstimmungen zu Säuger- Orthologen aufweisen.

Aus *Cyprinus carpio* (Karpfen) isolierten Huang et al. (1994) und Hashimoto et al. (1998, 2000) ebenfalls mehrere Komponenten der MAP-Kinase- Signalwege. Eine Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase (MKK), auch bekannt als MEK, ist mit 78 % bzw. 80 % homolog zur MEK1 bzw. MEK2 der Ratte (Huang et al., 1994). Hashimoto et al. identifizierten 2000 eine zweite MEK, die zu 87 % mit MEK6 des Menschen übereinstimmt. MEK6 aktiviert die Kinase p38, von der zwei Formen im Karpfen charakterisiert werden konnten. Beide p38-Kinasen sind vermutlich durch die bereits erwähnten Genduplikationen entstanden und zeigen eine 86 %ige Identität mit der humanen p38-Kinase. Von den klassischen MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 wurden die Sequenzen aus den Ovarienzellen des Karpfens gewonnen. Mit den orthologen Proteinen des Menschen sind sie zu 86,5 % (ERK1) und 83,1 % (ERK2) homolog (Hashimoto et al., 1998).

In der Leberzelllinie RTH-149 der Regenbogenforelle *O. mykiss* konnten Burlando et al. (2003) mittels säuger-spezifischer Antikörper die Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch den Einfluss von Schwermetallen sowie die Phosphorylierung von p38 nach H₂O₂-Einwirkung nachweisen.

Die Funktion des Prolactins in der Osmoregulation und die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 infolge hypoosmotischen Stresses in Kiemenzellen des Blaubandkärpflings *Fundulus heteroclitus* (Kültz et al., 2001) lassen eine Assoziation des Cytokins mit dem Ras- Raf- MAPK- Weg vermuten.

2.3 Hybridrezeptoren

In Vertebraten wurde für Prolactin eine große Anzahl verschiedenster physiologischer Aktivitäten identifiziert. Die Hauptfunktion in Teleostern ist der Ausgleich des Wasser- und Elektrolythaushaltes in einem hypoosmotischem Milieu (Loretz et al., 1982). Aber auch eine Beteiligung an anderen Prozessen, wie die Reproduktion und Modulation des Immunsystems von Fischen, wird dem Cytokin zugesprochen (Sakai et al., 1996; Cavaco et al., 2003; Yada et al., 2004). Jedoch wurde bisher in keiner Studie die intrazelluläre Signaltransduktion nach Stimulation mit Prolactin untersucht. Das liegt zum einen an der unzureichenden Verfügbarkeit spezifischer Liganden und zum anderen an der teilweise geringen Affinität dieser gegenüber dem homologen Rezeptor. Als Äquivalent wurde ovines placentares Lactogen (oPL) oder ovines Prolactin (oPrl) für Bindungsstudien verwendet (Sandowski et al., 2000). Dennoch sind die molekularen Grundlagen der Prolactinwirkung bei Teleostern nur wenig untersucht worden.

Mit Hilfe von Hybridrezeptoren könnten diese Fragestellungen geklärt werden.

Die Klonierung von Cytokinrezeptor-cDNAs bietet die Möglichkeit durch Rekombination von extrazellulärer, Transmembran- und intrazellulärer Domäne chimere Rezeptoren zu konstruieren. Die Austauschbarkeit der Domänen zwischen Cytokinrezeptoren und die Funktionalität entsprechender Hybridrezeptoren wurden in verschiedenen Studien nachgewiesen. Neben Kombinationen von Domänen verschiedener Klasse-I-Cytokinrezeptoren wie PrlR und EPOR (Dusanter-Fourt et al., 1994; Constantinescu et al., 2001; Brisken et al., 2002) wurde auch die Funktion von Hybriden aus nicht verwandten Rezeptoren wie EGFR und EPOR demonstriert (Ohashi et al., 1994; Pacifici et al., 1994; Büchse et al., 2006).

Andere Untersuchungen mit artifiziellen Cytokinrezeptoren hatten die Funktionsanalyse der Rezeptordomänen zum Ziel. Lax et al. konstruierten zu diesem Zweck bereits 1989 mehrere chimere EGF-Rezeptoren, um die Ligandbindungsdomäne zu determinieren und zu analysieren. Die für die Aktivierung von Signalkaskaden wichtigen Tyrosinreste im C-Terminus des Rezeptors wurden mit Hilfe von Hybriden aus der extrazellulären Domäne des GM-CSF-Rezeptors und der intrazellulären PrlR-Domäne entdeckt (Chang et al., 1998).

Zur Analyse der bis dato unbekanntenen Funktion der ErbB2-Tyrosinkinase nutzten Lehvälaiho et al. (1990) aufgrund unbekannter Liganden ebenfalls ein Rezeptorhybrid, bestehend aus der extrazellulären EGFR-Domäne und der Tyrosinkinasedomäne von ErbB2.

Einen fischspezifischen Hybridrezeptor konstruierte Stigge (2005) zur Untersuchung cytokin-induzierter Signalprozesse in Fischzellen. Hierbei wurde die extrazelluläre Domäne des humanen EGF-Rezeptors mit der intrazellulären Domäne des Prolactinrezeptors der Forelle verbunden.

Dies macht deutlich, dass bei der Auswahl einer geeigneten extrazellulären Domäne das Problem der fehlenden oder nicht verfügbaren Liganden umgangen werden kann. Die Konstruktion artifizierlicher Cytokinrezeptoren bietet darüber hinaus ein Mittel, Modellsysteme zu entwickeln, in denen spezifische Signaltransduktionswege durch extrazelluläre Signalmoleküle gesteuert werden, die nicht auf die Effektorzelle wirken. Eine gezielte Veränderung der intrazellulären Domäne des Rezeptors erlaubt weiterhin die Untersuchung des Aktivierungsmechanismus einer spezifischen Signalkaskade.

Hybridrezeptoren ermöglichen somit die gezielte Analyse von Signaltransduktionsprozessen in faktorunabhängig wachsenden Fischzellen.

3 Zielstellung

Die molekularen Mechanismen von Cytokinwirkungen sind bei Säugern im Vergleich zum Fisch ausführlich erforscht. So sind auch die, zu den Cytokinen gehörenden Wachstumsfaktoren intensiv untersucht worden. Der epidermale Wachstumsfaktor EGF und dessen Rezeptor beeinflusst wichtige Zellprozesse wie Proliferation und Differenzierung. Seine Bedeutung bei der Entwicklung humaner Krebsformen ist seit einigen Jahren bekannt. In dem Zusammenhang erfolgte gleichermaßen die Aufklärung der, durch EGF ausgelösten, Signaltransduktionswege.

Die Kenntnisse über EGF, seinen Rezeptor und die EGFR-Signalkaskaden in Teleostern sind gering. Lediglich aus vier Fischarten wurden bislang EGF-Rezeptoren beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Rezeptor in zwei weiteren Fischarten identifiziert werden. Ausgehend von bekannten Rezeptormolekülen aus Säugern und Fischen sollten EGFR-homologe Nukleotidsequenzen aus *Oncorhynchus mykiss* und *Cyprinus carpio* isoliert und eingehend untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen nach Behandlung von Fischzellen mit Prolactin. Das ist hauptsächlich durch die unzureichende Verfügbarkeit geeigneter pisciner Zellmodelle nur schwer möglich. Außerdem sind die Analysen mangels vorhandener Fisch-Cytokine mit hohem experimentellem Aufwand verbunden. Infolgedessen sind die Prolactin-induzierten Signaltransduktionswege bis heute in erster Linie für Säuger beschrieben worden.

Es war daher die Konstruktion eines Hybridrezeptors vorgesehen, dessen extrazellulärer Teil vom humanen EGF-Rezeptor und dessen intrazellulärer Teil vom Prolactinrezeptor des Karpfens (*Cyprinus carpio*) stammen. Nach Transfektion in permanente Zelllinien, die aus *C. carpio* etabliert wurden, sollte er durch rekombinantes humanes EGF stimuliert werden, um so Prolactin-spezifische Signalkaskaden in induzierbarer Form untersuchen zu können.

Durch die Charakterisierung dieser Signaltransduktionswege sollte die Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung entsprechender Rezeptorsysteme im Fisch leisten.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Die Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit einem Gewicht von 80 bis 100 g wurden von der Uckermark-Fisch GmbH, Filiale Küstrinchen bezogen. Die Hälterung erfolgt in 800 l-Tonnen bei 18 bis 20°C mit zusätzlicher Sauerstoffversorgung und natürlicher Photoperiode. Gefüttert wurden sie täglich mit speziellen Futterpellets, die ebenfalls von dem Fischereibetrieb bezogen wurden.

Die ca. 1 kg schweren Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurden von einem örtlichen Fischereibetrieb bezogen.

4.1.2 Chemikalien

Die Grundchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Sämtliche Lösungen, Puffer und Medien wurden mit Reinstwasser hergestellt. Die Rezepte sind im Anhang aufgelistet.

4.1.3 Molekularbiologische Produkte

Kits:

Fugene HD Transfection Reagent	Roche, Mannheim
OneStep-RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Expand-Long-Template-PCR-System	Roche, Mannheim
pGEM®-T Easy Vektor Systems I	Promega, Heidelberg
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin®RNAII- Kit	Macherey-Nagel, Düren
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin

DNA Clean & Concentrator TM	ZymoResearch, Freiburg
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham, Freiburg

Enzyme:

T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
CIAP	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
rRNasin	Promega, Heidelberg

Größenstandards:

1 kbp DNA Leiter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
peqGOLD Protein-Marker II	PeqLab, Erlangen

Vektoren:

pGEM [®] -T-Easy	Promega, Heidelberg
pcDNA3.1(-)	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA6/V5-His A	Invitrogen, Heidelberg

4.1.4 Zellkulturprodukte

DMEM mit 4,5 g/l D(+)-Glucose, mit L-Glutamin, mit Natriumpyruvat, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
Ham's F12 mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
Iscove's DMEM mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
Leibovitz L-15 mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
MEM mit Earle's Salzen mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
MEM mit Hank's Salzen mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt

RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin 10 mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Penicillin- Streptomycin 10000 µg/ml	Biochrom AG, Berlin
100x non-essential Aminoacids	Biochrom AG, Berlin
10x Trypsin/ EDTA	Biochrom AG, Berlin
10x Cell Lysis buffer	Cell Signaling, Frankfurt am Main

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Präparation und Kultivierung der Leukozyten aus Milz und Kopfniere der Regenbogenforelle

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Nach der fachgerechten Tötung der Tiere erfolgte die Präparation der Milz und Kopfniere. Zur Zellgewinnung wurden beide Organe mit Hilfe eines Edelstahlsiebes homogenisiert. Die Homogenisate wurden in gekühltem Leibovitz-Kulturmedium gewaschen (150 x g, 5 min, 4°C). Für die anschließende Dichtegradientenzentrifugation wurden 2 ml Percoll (Dichte: 1,095 g/cm³) mit 1 ml Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Durch die Zentrifugation (125 x g, 20 min, 4°C) wurden die Leukozyten von den Erythrozyten getrennt. Die Leukozyten, die sich jetzt an der Trennschicht zwischen Blutplasma und Percoll befinden, wurden in Leibovitz-Kulturmedium überführt und 2-mal gewaschen (150 x g, 5 min, 4°C).

Die Zellzahl wurde in einer Bürker-Zählkammer ermittelt. Mit der Trypanausschlussmethode konnten lebende von toten Zellen unterschieden werden.

Durch diese Präparation können 1- 2 x 10⁷ Leukozyten pro Organ gewonnen werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO₂-Brutschrank (ThermoForma, Marietta, USA) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 19°C und 5 % (v/v) CO₂-Gehalt. Die Kulturdauer variierte je nach Versuchsansatz zwischen einer und mehreren Wochen.

4.2.1.2 Zelllinien und Kultivierung

Alle aufgeführten Zelllinien wurden in CO₂-Brutschränken (ThermoForma oder Heraeus) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei angegebener Wachstumstemperatur kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung der Zellen bei 2,5 % (v/v) CO₂ in der Umgebung.

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert, um sie in logarithmischer Wachstumsphase zu halten. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte mit 1x Trypsin/EDTA (Biochrom AG).

RTG-2 ist eine aus den Gonaden der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) isolierte adhären Fibroblastenzelllinie (Wolf et al., 1962). Die Zellen wurden in Mischmedium mit 10 % (v/v) FKS bei 20°C kultiviert.

Die **EPC**-Zelllinie wurde aus einer Herpesviren-induzierten Hyperplasie auf der Haut des Karpfens (*Cyprinus carpio*) gewonnen. Die Zellen wachsen als adhären Kultur in einem breiten Temperaturbereich von 15- 33°C (Fijan et al., 1983). Die Kultivierung erfolgte in Medium 5 mit 10 % (v/v) FKS bei 24°C.

CLC (Faisal et al., 1990) ist eine adhären Zelllinie aus nicht-leukämischen Leukozyten des Karpfens (*Cyprinus carpio*). Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % (v/v) FKS bei 24°C kultiviert.

Die Zelllinien EPC und CLC wurden freundlicherweise von der Zellbank am Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (Greifswald- Insel Riems) durch Herrn Dr. Riebe bereitgestellt.

Die humane Zelllinie **A431** (Giard, 1973) ist aus einem epidermalen Karzinom etabliert worden. Die Zellen weisen eine starke Expression des EGF-Rezeptors auf und wurden als Positivkontrolle genutzt. Die Kultivierung der adhären Zelllinie erfolgt in Medium 5 mit 10 % (v/v) FKS bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂-Gehalt.

Die Zellen wurden freundlicherweise durch Herrn Dr. Büchse (Inst. für Medizin. Biochemie und Molekularbiologie, Uni Rostock) bereitgestellt.

4.2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für die Zellkonservierung wurden ca. 2×10^6 Zellen in 1,5 ml FKS mit 10 % DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen (Greiner) überführt. Nach einer schrittweisen Abkühlung auf -70°C erfolgte eine Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C).

Das Auftauen der Zellen sollte schnell erfolgen. Die Röhrchen wurden direkt aus dem Stickstoff in ein entsprechend temperiertes Wasserbad gegeben. Die aufgetauten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium gewaschen. Die Kultivierung erfolgte unter den oben genannten Bedingungen.

4.2.1.4 Transfektion

Zur Anwendung kam das lipidbasierte Transfektionsreagenz Fugene HD der Firma Roche. Zunächst wurden die Zellen einen Tag vor dem Experiment in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/well in eine 6-well-Zellkulturplatte ausgesät. Für die Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 70- 80 % aufweisen.

Für den Transfektionsansatz wurden 100 μl serumfreies Zellkulturmedium mit 1,2 μg Plasmid-DNA und 4 μl Fugene HD gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 μl des Ansatzes wurden pro Well in das Zellkulturmedium pipettiert. Die Inkubation erfolgte anschließend bei den entsprechenden Kultivierungsbedingungen der eingesetzten Zelllinien (siehe Kap. 4.2.1.2).

24 bis 48 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Proteinexpression oder die Selektion transfizierter Zellen. Die Selektion ermöglichten das Neomycin-Resistenzgen des verwendeten Expressionsvektors pcDNA3.1(-) (Invitrogen, Abb. 10) bzw. das Blasticidin-Resistenzgen des Vektors pcDNA6/V5-His A (Invitrogen, Abb. 11). Hierzu wurde 48 h nach Transfektion der Zellen das entsprechende Antibiotikum dem Kulturmedium zugegeben. Das Gentamycin-Derivat Genitacin (G418, Applichem) wurde mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml nach Transfektion mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(-) eingesetzt. Zu Zellen, die DNA kloniert in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A enthielten, wurde das Nukleosid-Antibiotikum Blasticidin (Applichem) in einer Endkonzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gegeben.

Die Abnahme der nicht resistenten Zellen wurde unter dem Mikroskop überwacht.

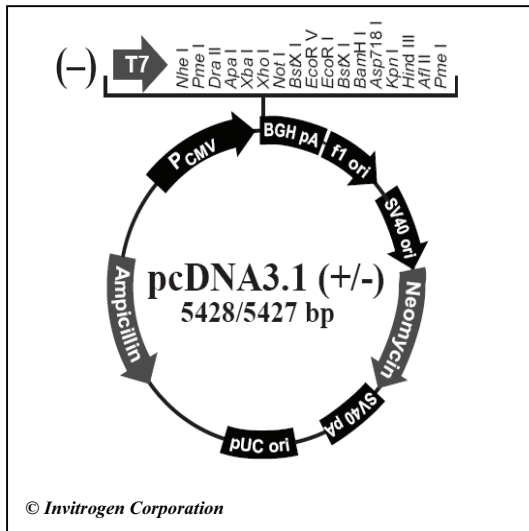


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1 (Invitrogen)

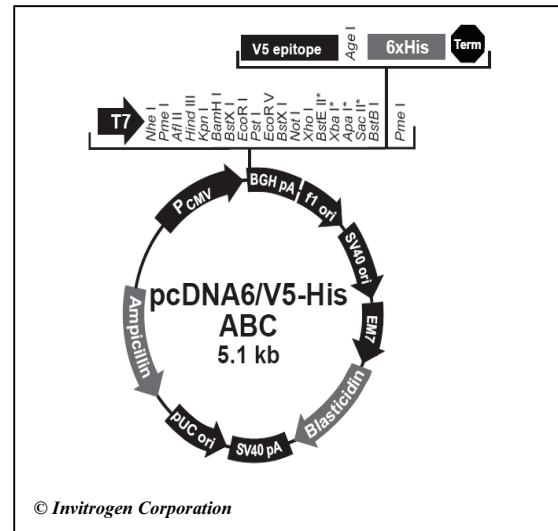


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA6/V5-His (Invitrogen)

4.2.1.5 Fixierung der Zellen

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf gereinigten, sterilisierten Deckgläschen in 6-well-Zellkulturplatten kultiviert. Um die Zellen für nachfolgende Markierungen zu stabilisieren, erfolgte eine Fixierung mit Methanol-Aceton oder Paraformaldehyd.

Die Fixierung mit Methanol-Aceton führt durch das Auflösen von Membranlipiden zur Permeabilisierung der Zellmembran. Nach dem Entfernen des Zellkulturmediums wurde die eiskalte Fixierlösung auf die Zellen pipettiert und für 10 min bei 6°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet.

Paraformaldehyd (PFA, Applichem) führt zur strukturellen Stabilisierung der Zellen ohne die Zellmembran zu permeabilisieren. Die adhären Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4 % PFA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur.

4.2.1.6 Immunfluoreszenz

Nach der Fixierung der Zellen wurden diese zunächst mehrmals in PBS gewaschen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Mit dem primären Antikörper (anti-EGFR, Biomol) in einer 1:50 Verdünnung wurden die Zellen über Nacht bei 6°C

inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:80, FITC-konjugiertes Anti-Maus-IgG, Sigma) erfolgte im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dem erneuten Waschen wurden die Zellen mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop IX70 (Olympus, Hamburg) analysiert.

4.2.2 Proteinchemische Methoden

4.2.2.1 Proteinpräparation aus Zellkulturen

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysaten wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das durch Zentrifugation entstandene Pellet wurde 2-mal mit PBS gewaschen und in 200- 400 µl Lysepuffer aufgenommen. Einer 10-minütigen Inkubation auf Eis schloss sich eine kurze Behandlung mit Ultraschall (Sonopuls HD2070, Bandelin, Berlin) an. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 min wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (12500 x g; 4°C; 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Zelllysaten mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bindet dabei an Arginin- und Lysin-Reste von Proteinen. Durch Mitführen einer BSA-Eichreihe konnte die Gesamtproteinkonzentration in den betreffenden Proben ermittelt werden.

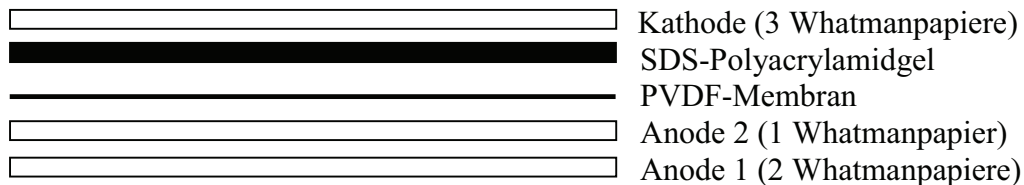
Im Anschluss wurden zwei Teile Zelllysate mit einem Teil 3x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

4.2.2.2 Western Blot-Analyse

Je 10- 20 µg Protein des Gesamtzelllysates wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (peqGOLD Protein-Marker II, PeqLab) auf ein 10 %iges (v/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Unter Verwendung des PerfectBlue™ Doppelgelsystems Twin M (PeqLab) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung entsprechend der Proteingrößen.

Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des PerfectBlue™ Semi-Dry-Blotter Sedec™ M (PeqLab) auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. Zuvor musste diese durch Hydratisierung aktiviert (15 min in Methanol, 5 min in A. dest.) werden. Danach wurden

Membran, Gel und ein Whatmanpapier für 5 min in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Zwei Whatmanpapiere wurden mit Anodenpuffer 1 und drei weitere mit Kathodenpuffer behandelt. Der Semidry-Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:



Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 min bei 2 mA/cm^2 PVDF-Membran.

Nach dem Transfervorgang wurde die Membran vollständig getrocknet und anschließend erneut unter den oben genannten Bedingungen hydratisiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung der PVDF-Membran mit Ponceau-S-Färbelösung, um die Effizienz des Proteintransfers zu kontrollieren und den Molekulargewichtsstandard zu kennzeichnen.

Nach dem Entfärben mit 1 N NaOH wurde die Membran in Blockierlösung für mindestens 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der jeweilige primäre Antikörper (Tab. 1) wurde in Blockierlösung auf die optimierte Konzentration verdünnt. Darin erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung wurde die Membran 3-mal für 10 min in PBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 2) für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Membran erneut 3-mal für 10 min gewaschen.

Die an den Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Die dabei entstehende Chemilumineszenz diente der abschließenden Detektion der spezifischen Proteine auf der Membran. Diese Reaktion wird als *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) bezeichnet.

Die ECL-Lösung wurde aus 4000 μl Solution A, 400 μl Solution B und 1,2 μl H_2O_2 (30 %) angefertigt (www.laborjournal.de, Tipp 81). Die Membran wurde darin für 2 min inkubiert und die entstehende Lumineszenz auf Röntgenfilm (Curix HT1000, Agfa, Köln) festgehalten. Die Zeit der Exposition des Films richtete sich nach der Stärke des Signals.

Tabelle 1 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
EGFR Ab-5 (H11)	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
EGFR Ab-11 (199.12)	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
EGFR Ab-12 (Cocktail)	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
EGFR Ab-13 (Cocktail)	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
anti-EGFR	Biomol (Hamburg)
p44/42 MAP-Kinase Antibody	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
STAT1 p84/p91 (M-22)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
STAT3 (H-190)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Tabelle 2 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-mouse-IgG, HRP-linked	KPL (Gaithersburg, USA)
Anti-rabbit-IgG, HRP-linked	Cell Signaling (Frankfurt am Main)

4.2.2.3 Strippen und Rehybridisieren von Immunoblots

Die Primär- und Sekundärantikörper des ersten Immunoblots mussten entfernt werden (Strippen), um weitere Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht auf derselben PVDF-Membran nachweisen zu können.

Die Membran wurde zunächst 3-mal für 5 min in PBS-T-Puffer gewaschen. Die 15-minütige Inkubation in Stripping-Puffer, der zuvor auf 50°C erhitzt wurde, sollte die Antikörper ablösen. Nach dem anschließenden, mehrmaligen Waschen in PBS-T-Puffer erfolgen das erneute Blockieren der PVDF-Membran und die Rehybridisierung mit Antikörpern.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Isolation von RNA aus Zellen und Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen oder Organen erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II-Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die RNA bindet, wie auch die DNA, unter Hochsalzbedingungen an eine Silikagel-Membran. Der Abbau der DNA wurde durch eine, im Kit enthaltene, DNase I realisiert. Die Elution der RNA erfolgte mit Diethylpyrokarbonat (DEPC) behandeltem Wasser.

DEPC inaktiviert RNasen. Zur Herstellung von DEPC-H₂O wurde 1 l A. dest. mit 1 ml DEPC versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren wurde das verbleibende DEPC inaktiviert.

Für die RNA-Isolation aus Organen der Regenbogenforelle und des Karpfen wurden ca. 30 mg des Gewebes unmittelbar nach der Entnahme in Flüssig-N₂ gefroren und in einem gekühlten Mörser zerrieben. Die anschließende Präparation der RNA erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

Für die RNA-Präparation aus Zellkulturen wurden diese nach dem Ablösen zunächst mit PBS gewaschen und entsprechend der Anleitung des NucleoSpin®RNAII- Kits weiter bearbeitet.

Für eine Langzeitlagerung wurden die Proben bei -70°C aufbewahrt.

4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Photometers BioMate3 der Firma ThermoSpectronic (Rochester, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Um die Qualität der präparierten RNA oder DNA zu beurteilen, wurde eine weitere Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Optimal sollte das Verhältnis A_{260} / A_{280} einen Wert von 2,0 aufweisen.

4.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Variationen eingesetzt. Als Ausgangsmaterial diente dabei sowohl RNA als auch cDNA. Die Reaktionen erfolgten im Mastercycler® Gradient

(Eppendorf, Hamburg). Die verwendeten Primer wurden von bekannten cDNA-Sequenzen abgeleitet und von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert. Sie sind, wenn nicht anders angegeben, im Anhang aufgelistet. Die Schmelztemperatur T_m der Primer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Die Produkte der jeweiligen PCR wurden in Agarosegelen aufgetrennt (siehe Kap. 4.2.3.4), die amplifizierte DNA-Fragmente isoliert (siehe Kap. 4.2.3.5) und anschließend in einen Vektor kloniert (siehe Kap. 4.2.3.6).

4.2.3.3.1 *OneStep-RT-PCR*

Der zur Anwendung gekommene OneStep-RT-PCR Kit (Qiagen) ermöglichte reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion in einem Reaktionsgefäß. Der Kit enthält eine spezielle Enzymmischung aus OmniscriptTM-, SensiscriptTM-Reverse-Transcriptase und HotStarTaqTM-DNA-Polymerase. Dies erlaubte das Umschreiben der RNA in cDNA und die Amplifikation dieser in aufeinanderfolgenden Reaktionen.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt auf Eis zusammengestellt:

5x OneStep PCR-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,0 µl
Sense-Primer (25 µM)	2,5 µl
Antisense-Primer (25 µM)	2,5 µl
Enzymmix	1,0 µl
RNasin (40 U/µl, Promega)	1,0 µl
Template-RNA	1 pg- 2 µg
RNase-freies Wasser	ad 25 µl

Die Amplifikation erfolgte mit diesem Programm:

reverse Transkription	30 min	50°C	} 35x
Aktivierung der DNA-Polymerase	15 min	95°C	
Denaturierung	30 s	94°C	
Annealing	30 s	$T_m - 5^\circ\text{C}$	
Elongation	1 min	72°C	
Abschluss-Elongation	10 min	72°C	
Abkühlen		6°C	

4.2.3.3.2 *Expand Long Template-PCR*

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von > 2 kB wurde das Expand High Fidelity PCR-System (Roche) genutzt. Das Kit enthielt einen Mix aus Taq-Polymerase und Proofreading-Polymerase. Als Ausgangsmaterial diente cDNA.

Es wurde ein Reaktionsansatz aus

10x Expand High Fidelity Buffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2,0 µl
Sense-Primer (100 µM)	0,5 µl
Antisense-Primer (100 µM)	0,5 µl
Enzymmix (5 U/µl)	0,2 µl
Template-cDNA	0,25 µg
A. bidest.	ad 25 µl

auf Eis zusammengestellt. Nach dem Mischen folgte eine Touchdown-PCR. Mit dieser PCR-Variante konnte eine erhöhte Spezifität erreicht werden, indem die Annealing-Temperatur zyklusweise gesenkt wurde. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	4 min	94°C	
Denaturierung	1 min	95°C	} 11x
Annealing	1 min	69°C	
Temperaturinkrement		-1°C	
Elongation	4 min	72°C	} 30x
Denaturierung	1 min	95°C	
Annealing	1 min	58°C	
Elongation	4 min	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C	
Abkühlen		6°C	

4.2.3.4 *Agarose-Gelelektrophorese*

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8- 2 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Für DNA-Moleküle mit einer Größe von wenigen Hundert Basenpaaren wurden Gele mit 2 % (w/v) Agarose verwendet. Bei größeren Fragmenten wurde der Agaroseanteil reduziert. Um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml zugesetzt. Das Gießen der Gele und die Elektrophorese erfolgten in der Elektrophoresekammer

PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (PeqLab). Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80- 100 V je nach Gelgröße in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator visualisiert und über eine angeschlossene Kamera (Camedia C-3040 Zoom, Olympus) dokumentiert.

Durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard (Roth) konnte das Molekulargewicht der aufgetrennten DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

4.2.3.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten spezifischer Größe aus Agarosegelen wurde das Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek) eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolation erfolgte entsprechend der Angabe des Herstellers. Nach dem Auflösen des Gels wurde die DNA an eine Silikagel-Membran gebunden, gewaschen und mit A. bidest. eluiert.

4.2.3.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für das Klonieren von PCR-Produkten (siehe Kap. 4.2.3.3) wurden diese unter Verwendung des pGEM®-T-Easy Vector System I (Promega) in den Shuttle-Vektor pGEM®-T-Easy (Abb. 12) ligiert. Das Prinzip beruht auf der Ausnutzung der 3'-endständigen Adeninreste, die durch Taq-Polymerasen an das PCR-Produkt angefügt werden. Der Vektor pGEM®-T-Easy liegt in linearisierter Form vor, besitzt 3'-Thymidin-Überhänge und eine mit dem 3'-Ende kovalent verbundene Topoisomerase. Mit Hilfe dieses Enzyms erfolgte der Einbau des PCR-Produktes in das Plasmid. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Umklonierung in die Expressionsvektoren pcDNA3.1(-) (Abb. 10, Invitrogen) und pcDNA6/V5-His A (Abb. 11, Invitrogen) erfolgte spezifisch gerichtet mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen (siehe Kap. 4.2.3.9).

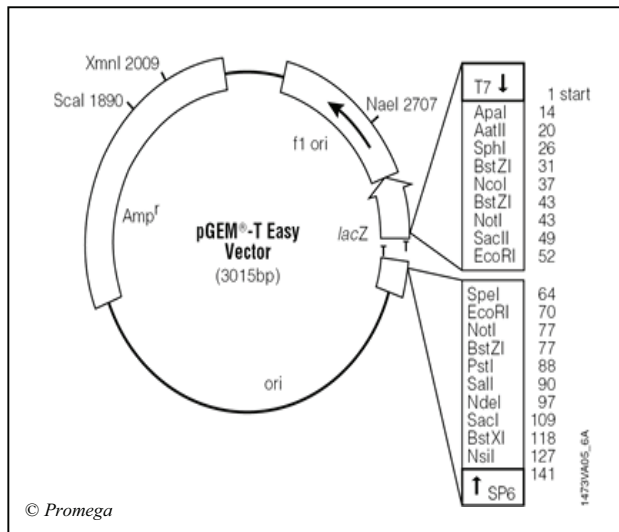


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pGEM®-T-Easy (Promega)

4.2.3.7 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA an definierten Stellen wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden den Herstellerangaben entnommen.

Für den analytischen Verdau wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 5 U der entsprechende Endonuklease 90 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 4.2.3.4).

Im Rahmen der Klonierung wurden für einen präparativen Ansatz 10 µg Plasmid-DNA mit 15 U der entsprechenden Restriktionsenzyme in einem Endvolumen von 45 µl für 1- 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die entsprechende Bande wie unter 4.2.3.5 beschrieben isoliert.

4.2.3.8 Dephosphorylierung von Plasmiden

Um die Re-Ligation eines mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dessen 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde die *Calf Intestinal Phosphatase*, CIAP (Fermentas) verwendet.

In den Restriktionsansatz wurden 1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase bei 85°C für 20 min und die

Reinigung des Plasmids von dem Enzym. Dazu wurde das DNA Clean & Concentrator™ Kit (ZymoResearch) nach Vorschrift des Herstellers angewandt.

4.2.3.9 Ligation

Die Ligation eines Vektors mit einem Insert erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas). Das zu klonierende DNA-Fragment (Insert) und der Vektor sind zuvor mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe Kap. 4.2.3.7) worden, um kompatible Enden zu erhalten. Fragment-DNA und Vektor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. In dem Ligationsansatz (10 µl) wurden die zu ligierenden Fragmente mit 5 U T4-DNA-Ligase im Reaktionspuffer gemischt und über Nacht bei 6°C inkubiert. Anschließend wurden die Ligationsansätze in *E. coli* transformiert (siehe Kap. 4.2.3.11).

4.2.3.10 Herstellung kompetenter Zellen (nach Hanahan, 1983)

Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurden über Nacht auf tetracylinhaltigen TY-Agar bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie erfolgte das Animpfen von 5 ml SOB-Medium. Nach der Inkubation über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C wurde die Bakterienkultur in 50 ml PSI-Medium überführt und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD_{600nm} von 0,45 bis 0,55 kultiviert. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 3000 x g für 15 min. Das Pellet wurde in 16 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (3000 x g; 15 min). Nach der Resuspension in 4 ml eiskalter RF2-Lösung und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis konnten die Bakterien aliquotiert und sofort in Flüssig-N₂ eingefroren werden. Die Lagerung der kompetenten XL1-Blue-Zellen erfolgte bei -70°C.

4.2.3.11 Transformation kompetenter XL1-Blue-Zellen

Für die Transformation wurden 40 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5- 10 µl Ligationsansatz vermischt. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec. Durch diese Temperaturerhöhung wurde die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien induziert. Anschließend folgte die Abkühlung des Ansatzes auf Eis für ca. 2 min. Die Regeneration der Bakterien erfolgte in 160 µl SOC-Medium für mindestens 1 h bei 37°C unter Schütteln (250 U/min). Im Anschluss wurden die

transformierten Zellen auf ampicillinhaltige IPTG/X-GAL-Nähragarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3.12 Plasmid-Minipräparation

Die Minipräparation von Plasmid-DNA (modifiziert nach Boirnboim et al., 1979) wurde für die Analyse von Einzelkolonien verwendet, die nach Transformation eines Ligationsansatzes auf Agarplatten gewachsen waren. Diese Art der Aufreinigung liefert im Vergleich zur Maxipräparation in kurzer Zeit qualitativ minderwertige DNA, die aber zusammen mit einer Restriktionsanalyse eine schnelle Überprüfung des Vektor-Inserts erlaubt.

Nach der Anzucht der transformierten Bakterien auf Agarplatten wurden weiße Klone in je 1,5 ml ampicillinhaltigem TY-Flüssigmedium kultiviert. Nach der Über-Nacht-Inkubation wurde 1 ml der Bakteriensuspension durch eine kurze Zentrifugation bei 7000 x g pelletiert und in 100 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II erfolgte eine alkalische Lyse der Zellen. Die Neutralisation des pH-Wertes, die zum Ausfällen vieler Proteine führte, wurde durch das Zugeben von 150 µl Lösung III realisiert. Das gebildete Präzipitat konnte durch Zentrifugation bei 7000 x g für 5 min abgetrennt werden. Zum Fällern der DNA wurde der Überstand mit dem gleichem Volumen Isopropanol versetzt und 15 min bei 7000 x g erneut zentrifugiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol folgte das Trocknen der DNA und die Aufnahme in A. bidest.

Nach der Restriktionsanalyse wurde mit einem Klon, der das rekombinante Plasmid enthielt, eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt.

4.2.3.13 Plasmid-Maxipräparation

200 ml ampicillinhaltiges TY-Medium wurde mit der Vorkultur des gewünschten *E. coli*-Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (3000 x g, 30 min) der Kultur erfolgte die Lyse der Bakterien und die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem Nucleobond PC500 Kit (Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde an eine Anionen-Austausch-Säule gebunden, nach einem Waschschriff mit Hochsalz-Puffer eluiert und mittels Isopropanol gefällt. Nach der erneuten Zentrifugation (3000 x g, 60 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet

und in A. bidest. aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe Kap. 4.2.3.2). Zur Überprüfung der Plasmid-DNA erfolgte eine Restriktionsanalyse im analytischen Maßstab (siehe Kap. 4.2.3.7).

Die so isolierte Plasmid-DNA wies einen hohen Reinheitsgrad auf und wurde direkt zur Sequenzierung oder Transfektion (siehe Kap. 4.2.1.4) eingesetzt.

4.2.3.14 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise im Sequenzierungslabor des FBN Dummerstorf von Frau Deutscher durchgeführt.

Die in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T-Easy klonierte cDNA wurde unter Anwendung des DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits (Amersham) sequenziert. Das Verfahren beruht auf einer modifizierten Form der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977). Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit dem ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) und MegaBace-Sequencer (Amersham, Freiburg) detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe von Internet-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und verschiedenen frei zugänglichen Online-Tools (<http://www.expasy.ch/>).

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung des EGF-Rezeptors in *Oncorhynchus mykiss* und *Cyprinus carpio*

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist der EGF-Rezeptor in elementare zelluläre Prozesse wie Wachstum und Differenzierung involviert. Die Sequenz des Rezeptors in Teleostern wurde bisher für u. a. *Danio rerio* (Zebrafisch, Wang et al., 2004) und *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger, Gomez et al., 2004) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der EGF-Rezeptor in *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle) und *Cyprinus carpio* (Karpfen) charakterisiert werden.

Dafür sollten zunächst frei zugängliche Genbanken, wie des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) nach ESTs der Fische durchsucht werden, die eine hohe Homologie zu Abschnitten des EGFR aufweisen. Von diesen kurzen cDNA-Sequenzen sollten dann PCR-Primern abgeleitet werden, mit denen die cDNA des vollständigen Rezeptors amplifiziert werden könnte.

5.1.1 Der EGF-Rezeptor von *Oncorhynchus mykiss*

In der Genbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) sind derzeit mehrere cDNA-Bibliotheken der Regenbogenforelle hinterlegt und online verfügbar. Diese beinhalten unter anderem auch ESTs, kurze cDNA-Abschnitte, die noch keinem Gen bzw. Genprodukt zugeordnet worden sind.

Das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ermöglicht das Identifizieren kurzer cDNA-Sequenzen durch den Vergleich mit einer Referenzsequenz. Die cDNA-Sequenz des EGF-Rezeptors (EGFR) von *D. rerio* wurde als solche Referenz eingesetzt.

Auf diese Weise konnten ESTs aus *O. mykiss* ermittelt werden, die eine hohe Übereinstimmung mit Abschnitten des Zebrafisch-EGFR zeigen. Insgesamt 4 ESTs aus der Forelle wurden so dem EGF-Rezeptor zugeordnet. Diese sollten genutzt werden, um die vollständige Sequenz des Forellen-EGFR aufzuklären.

Zwei ESTs (Accession-Nummer der NCBI-Datenbank: CX151062, CX151061) sind zu 79 % homolog zum Zebrabärbling- EGF-Rezeptor zwischen Nucleotid 2125 und 2813 (Abb. 13). Sie sind die 3'-terminale bzw. 5'-terminale Sequenz des gleichen cDNA-Klons.

Die in der NCBI-Datenbank abgelegten ESTs mit den AC-Nummern BX910271 und BX859164 beinhalten 5'-terminale Sequenzen von verschiedenen Klonen. Sie zeigten eine Homologie von 78 % bzw. 75 % zu einem cDNA-Abschnitt des EGFR von *D. rerio*, der 5'-seitig des ersten ESTs liegt. Es handelt sich um einen Bereich zwischen Basenpaar 646 und 929 (Abb. 13).

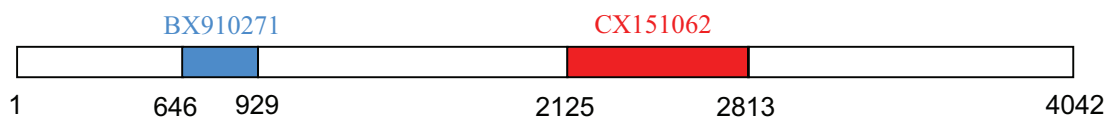


Abbildung 13: Schematische Darstellung der homologen Bereiche zwischen Zebrabärbling-EGFR und Forellen-ESTs BX910271 (blau) und CX151062 (rot). Die Zahlen sind bezogen auf Nucleotid-Positionen in der EGFR-cDNA des Zebrabärblings.

Begründet auf die Länge des Zebrabärbling- EGFR von 4042 bp (Wang et al., 2004), fehlt zwischen den Forellen-ESTs ein Rezeptor-cDNA-Stück von ca. 1200 bp. Zunächst sollte diese Sequenz isoliert werden. Anschließend sollten auch die fehlenden 5'- und 3'-terminalen Seiten sequenziert werden.

5.1.1.1 Expressionsanalyse eines EGFR-homologen ESTs aus *O. mykiss*

Das zwischen den identifizierten Forellen-ESTs fehlende cDNA-Stück sollte mittels Onestep-RT-PCR amplifiziert werden. Für diese Form der PCR musste zunächst RNA aus Geweben isoliert werden, in deren Zellen der EGF-Rezeptor exprimiert wird. Die Analyse dafür fand ebenfalls mittels Onestep-RT-PCR statt und die dafür verwendeten Primer 5' CTCTTTGGTCTCCTATGCGTTG 3' und 5' CACTGCTGGGCACAGTTCAG 3' wurden aus der Sequenz des Forellen- EST BX910271 generiert, welches zu 75 % homolog mit dem EGFR von *D. rerio* ist.

Die Qualität der mRNA wurde durch die Amplifikation eines 300 bp langen β -Actin-Fragmentes bestätigt. Die Primer wurden anhand der entsprechenden cDNA der Forelle abgeleitet.

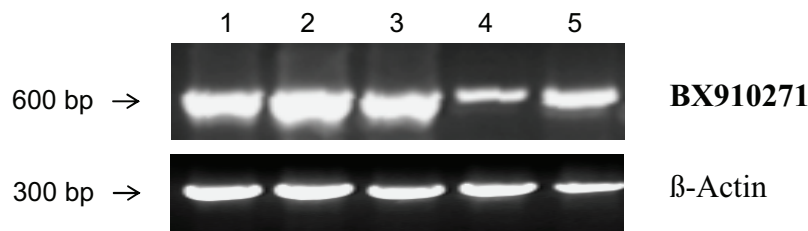


Abbildung 14: RT-PCR-Nachweis des EST BX910271 in verschiedenen Forellenorganen. Amplifikation eines spezifischen 603 bp-Fragmentes. Gelelektrophoretische Auftrennung. (1) Kiemen; (2) Niere; (3) Darm; (4) Haut; (5) Herz

In Kiemen, Niere, Darm, Haut und Herz der Forelle konnte, wie aus Abbildung 14 ersichtlich, ein für das EST spezifisches 603 bp langes Fragment detektiert werden. Aufgrund der zuvor erfolgten BLAST-Analyse, die eine hohe Homologie zwischen der kurzen cDNA-Sequenz aus der Forelle und dem Zebrafisch-EGFR ergab, scheint der Rezeptor in jedem getesteten Gewebe exprimiert zu werden. Daher wurde für die nachfolgenden Versuche willkürlich die RNA aus den Kiemen genutzt.

5.1.1.2 Isolation eines EGFR-Abschnittes aus *O. mykiss*

Die Amplifikation des cDNA-Stücks, welches das 3'-Ende des ESTs BX910271 mit dem 5'-Ende des ESTs CX151061 verbinden sollte, erfolgte wiederum durch Onestep-RT-PCR. Mit Hilfe von generierten Überlappungen sollten im Anschluss die Sequenzen verbunden werden.

Dazu wurden zunächst von dem Forellen-EST BX910271 die Sense-Primer EGFR_For_f1 und _f2 aus Sequenzabschnitten abgeleitet, die große Übereinstimmungen mit der EGFR-Sequenz des Zebrafisches aufweisen (Abb. 15). Zwei verschiedene Primer sollten die Aussicht auf eine erfolgreiche Amplifikation der cDNA erhöhen.

	706	776
<i>D. rerio</i>	TATGCGGAGCGGTGTTTCAGGGAGGTGTAAAGGACCCAGACCCATTGACTGCTGTAATGAACACTGTGCTGC	
Forelle	TGTGCCCAG CAGTGCTCTAAGAGGTGTAAGGG TCCGTCCCCATCGACTGCTGCAACGAACACTGTGCTGC	

Abbildung 15: cDNA-Sequenzvergleich zwischen *D. rerio*-EGFR und Forellen-EST (BX910271). Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI). Übereinstimmende Basen sind durch einen Balken verbunden. Die Nukleotid-Positionen beziehen sich auf die EGFR-cDNA von *D. rerio*.

Dargestellt ist der cDNA-Ausschnitt, aus dem die Sense-Primer EGFR_For_f1 (fett gedruckt) und EGFR_For_f2 (unterstrichen) abgeleitet wurden.

Von dem EST CX151061 wurde der Antisense-Primer EGFR_For_r1 ebenfalls aus einem mit dem Zebrafisch-EGF-Rezeptor homologen Abschnitt generiert (Abb. 16).

```

D. rerio 2185 CTCAAAGAGACGGAGTTCAAGAAGATCAAAGTGGCTCCGGGGCTTTCGGCACTGTG 2244
          ||||| ||||| ||| | ||||| | | ||| ||||| || || |||||
Forelle   CTCAAGGAGACCGAGCTAAAGAAGCTAAGAGTTCTGGGCTCAGGAGCCTTCGGCACTGTT

```

Abbildung 16: cDNA-Sequenzvergleich zwischen *D. rerio*-EGFR und Forellen-EST (CX151061). Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI). Übereinstimmende Basen sind durch einen Balken verbunden. Die Nukleotid-Positionen beziehen sich auf die EGFR-cDNA von *D. rerio*.

Dargestellt ist der cDNA-Ausschnitt, aus dem der Antisense-Primer EGFR_For_r1 abgeleitet wurde. Die Primersequenz ist unterstrichen.

In den folgenden PCRs konnte zunächst weder mit dem Primerpaar EGFR_For_f1 / _r1 noch mit dem Paar EGFR_For_f2 / _r1 ein spezifisches Oligonukleotid generiert werden. Daher wurden für Aufklärung der EGFR-Sequenz der Forelle neue Primer aus konservierten Regionen bereits publizierter pisciner EGF-Rezeptoren abgeleitet.

5.1.1.3 Klonierung der EGFR-cDNA aus *O. mykiss*

5.1.1.3.1 Konstruktion der Primer

Für die Herleitung dieser spezifischen Primer wurden die Sequenzen des EGF-Rezeptors der beiden Teleostee *Danio rerio* (Zebrafisch) und *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger) herangezogen. Zunächst sollten hoch homologe Abschnitte innerhalb der Rezeptorsequenzen identifiziert werden. In die Analyse wurden auch die entsprechenden Sequenzen aus *Homo sapiens* (Mensch) und *Mus musculus* (Maus) einbezogen. Alle Sequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen.

Das Programm BLAST2, welches die Gegenüberstellung zweier vorgegebener Sequenzen ermöglicht, ließ eine Homologie der Aminosäuresequenzen des EGF-Rezeptors vom Zebrafisch mit dem des Schwertträgers von 70 % erkennen. Mit dem humanen und murinen EGF-Rezeptor stimmt der Rezeptor aus *D. rerio* zu 63 % überein. Mit Hilfe des CLUSTAL- Programms des „Pôle BioInformatique Lyonnais“ (PBIL) konnten alle EGFR-Sequenzen detailliert miteinander verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass konservierte Regionen über die gesamte Sequenz verteilt sind. Unter Berücksichtigung dieser Bereiche

wurden von der Rezeptor-cDNA-Sequenz aus *Danio rerio* und *Xiphophorus xiphidium* mehrere spezifische Primerpaare abgeleitet. Die Sequenzen sämtlicher Primer sind im Anhang aufgelistet.

Wie schon zuvor erwähnt, umfasste die cDNA des Zebrafisch-EGF-Rezeptors 4042 bp (Wang et al., 2004) und die des Schwertträgers 3627 bp (Gomez et al., 2004). Dementsprechend gingen wir davon aus, dass die cDNA-Länge des EGFR der Regenbogenforelle ebenfalls zwischen 3500 und 4000 bp betragen wird. Der verwendete MegaBace-Sequencer ermöglicht aber nur eine genaue Sequenzierung von bis zu 1000 bp. Daher wurde die Möglichkeit der abschnittswisen Sequenzanalyse genutzt. Durch die gezielte Auswahl der Primer sollten ca. 800 bp lange Oligonukleotide mit überlappenden Regionen synthetisiert und die Teilsequenzen anschließend zusammengesetzt werden.

Die zu einem PCR-Produkt führenden Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Sequenz der Primer, die für die Identifizierung des EGF-Rezeptors in *O. mykiss* verwendet wurden und zu einem PCR-Produkte führten. Die Sense-Primer sind mit einem „f“ und die Antisense-Primer mit einem „r“ gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	hypothetische Größe des PCR- Produktes
EGFR_Danio_f3	CTCTGGAGAACCTGCGCATC	656 bp
EGFR_Danio_r4	GTGATCCGTCACCACATAGTTG	
EGFR_Xiph_f2	GTTGTTACAATGGTTCATGTTGG	800 bp
EGFR_Xiph_r2	GACCACGTCTCCGTCGCTG	

5.1.1.3.2 *Amplifikation der spezifischen Transkripte*

Unter Nutzung der Primer EGFR_Danio_f3 und EGFR_Danio_r4 konnte zunächst eine ca. 600 bp umfassende cDNA-Sequenz aus Kiemen-RNA der Regenbogenforelle mittels Onestep-RT-PCR gewonnen werden. Ein weiteres ebenfalls 600 bp langes Oligonukleotid wurde durch Anwendung des Primerpaares EGFR_Xiph_f2 / r2 synthetisiert.

Die Gegenüberstellung beider Sequenzen mit Hilfe von BLAST2 zeigte die gewünschte Überlappung. Das erste amplifizierte Oligonukleotid aus der Forelle ist zwischen Base 287

und 485 hoch homolog zu dem Abschnitt zwischen Position 57 und 255 der zweiten Sequenz. Im Ganzen umfasst der Bereich 199 bp (Abb. 17).

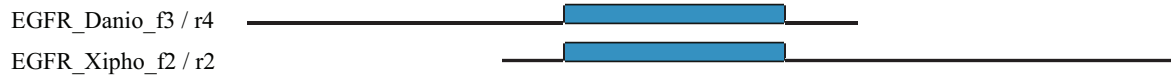


Abbildung 17: Schematische Darstellung der überlappenden Region der isolierten Oligonukleotide aus *O. mykiss*. Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI). Der homologe Bereich ist blau gekennzeichnet.

Mit Hilfe dieses sich überlagernden Bereichs konnten die beiden Teilsequenzen kombiniert werden. Daraus resultierte ein 831 bp cDNA-Sequenz. Nach Anwendung des „Translate Tool“ (Expasy) ergab sich eine 277 Aminosäurereste umfassende Proteinsequenz (Abb. 18). Die Sequenz wurde unter der AC-Nummer FM865854 in der NCBI-Genbank hinterlegt.

```

ctggagaacctgcgcatcatccgaggccacactctctatgacagtggctttgccctggct
L E N L R I I R G H T L Y D S G F A L A
gtggtgctgaactataacaagtcacatgagcaggcaccactgagctgacctgaccagc
V V L N Y N K S M R A G T T E L P L T S
ctcacagagatcctgaaaggaggagtgaagttctcagacaaccagctgtgtaacgtggag
L T E I L K G G V K F S D N Q L C N V E
accatccagtggttggacattgtaaacagtaaacagcaaacccaacatgcagttacctgaa
T I Q W L D I V N S N S K P N M Q L P E
cccagcaacaatcggctctgtaaaagatgtgatcctggatgcttcaatggttcatgttg
P S N N R L C K R C D P G C F N G S C W
gcgccccggcccagaacactgccagacattgacgaagctgaactgtgcccagcagtgctct
A P G P E H C Q T L T K L N C A Q Q C S
aagaggtgtaaggggtccgtctcccatcgactgctgcaacgaacactgtgctgcaggctgc
K R C K G P S P I D C C N E H C A A G C
actggaccacagacctacagactgtctggcctgccgggactttcaggatgacgggacgtgt
T G P R P T D C L A C R D F Q D D G T C
aaagactcgtgtccgcccctcctgctctacgaccgcaaccttcaccaactagtcaacaac
K D S C P R L L L Y D R N L H Q L V N N
ccagacgggaagtacaacttcggggccacctgcgtcaagacctgccctcataactatgtg
P D G K Y N F G A T C V K T C P H N Y V
gtgacagacctgagcgtgcttcggacatgcagtggtgacacgtacgaagtggacgag
V T D H G A C V R T C S G D T Y E V D E
ggaggagtccaggaagtgcaagaagtgtgatggactgtgccccaaagtttgcaatggactt
G G V R K C K K C D G L C P K V C N G L
ggaatggggaaacttgacaaaattctgtcaatcaacgccaccaacattgacacattcaaa
G M G K L D K I L S I N A T N I D T F K
aactgcacaaaatcaatgggaacattgctattatctacacgtctatccat
N C T K I N G N I A I I Y T S I H

```

Abbildung 18: EGFR-Teilsequenz aus *O. mykiss*. Aminosäuresequenz nach Translation mittels „Translate Tool“ (Expasy). Dargestellt sind die cDNA- (kleine Buchstaben) und Aminosäuresequenz (Großbuchstaben).

5.1.1.4 Analyse der isolierten *O. mykiss*- Sequenz

Um die aus der Forelle isolierte 831 bp lange cDNA-Sequenz eindeutig dem EGF-Rezeptor zu zuordnen, wurde eine Sequenzähnlichkeitssuche in der Sequenzdatenbank des NCBI durchgeführt. Dabei verglich das BLAST-Programm das Sequenzteilstück aus *O. mykiss* mit denen in der NCBI-Datenbank hinterlegten Gensequenzen. Hohe Übereinstimmungen zeigte das isolierte cDNA-Teilstück mit EGF-Rezeptorsequenzen mehrerer Spezies. Die größte Homologie bestand mit der EGFR-Sequenz von *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger). Die Abbildung 19 stellt einen Ausschnitt des Vergleiches dar.

```
Forelle          GAACCCAGCAACAATCGGCTCTGTAAAAGATGTGATCCTGGATGCTTCAATGGTTCATGT
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Schwertträger 708 GTGGCCGGAACAACCCACTCTGTAACAAATGCCACTCAAGTTGTTACAATGGTTCATGT 767

Forelle          TGGGCGCCCGGCCAGAACACTGCCAGACATTGACGAAGCTGAACTGTGCCCAGCAGTGC
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Schwertträger 768 TGGGCACCTGGTGCAGAAAACCTGTCAGACCCTGACCAAGCTGAACTGTGCACAGCAGTGC 827

Forelle          TCTAAGAGGTGTAAGGGTCCGTCTCCCATCGACTGCTGCAACGAACACTGTGCTGCAGGC
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Schwertträger 828 TCAAAGAGGTGCAAAGGACCTTACCAAGCGACTGTTGCAATGAGCATTGTGCAGCAGGA 887
```

Abbildung 19: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich des cDNA-Teilstückes des EGF-Rezeptors von Forelle und Schwertträger. Erstellt mit dem Programm BLAST (NCBI). Übereinstimmende Basen sind durch einen Balken gekennzeichnet. Die DNA-Positionen beziehen sich auf die EGFR-cDNA des Schwertträgers.

Insgesamt sind 625 Nukleotide der 831 bp langen Forellen-EGFR-Teilsequenz identisch mit denen in den DNA-Positionen 469 bis 1301 des Schwertträger-EGFR. Das entspricht einer Homologie von 75 % für diesen Ausschnitt. Ähnlich hoch war die Übereinstimmung mit dem EGF-Rezeptor des Zebrafisches. Sie betrug 72 %. Mit dem humanen EGF-Rezeptor war die Forellen-Sequenz zu 67 % homolog. Damit scheint die isolierte Teilsequenz tatsächlich ein Abschnitt des EGF-Rezeptors aus der Forelle zu sein.

Für weitere Analysen wurde die, von dem cDNA-Abschnitt abgeleitete, Aminosäuresequenz herangezogen. Das Ergebnis nach dem Vergleich von Proteinsequenzen ist aufgrund des degenerierten genetischen Codes eindeutiger.

Zunächst erfolgte eine erneute BLAST-Suche. Der Proteinsequenzabschnitt aus *O. mykiss* konnte ebenfalls dem EGF-Rezeptor zugeordnet werden. Von den 277 Aminosäuren aus der Forellen stimmen 210 mit der EGFR-Sequenz des Schwertträgers überein. Das entspricht einer Homologie von 76 % (Abb. 20). Werden die 27 chemisch äquivalenten Aminosäuren

mit einbezogen, erhöht sich die Ähnlichkeit der EGFR-Abschnitte auf 85 %. In der Abbildung 20 sind diese mit einem Plus gekennzeichnet.

Forelle		LENLRIIRGHTLYDSGFALAVVLNKNYSMRAGTTELPLTSLTEILKGGVKFSDNQLCNVE	
		LENLRIIRGH+LY+ FAL+V+ N +K+ GTEEL LTSLTEIL+GGVKF +N+LCNVE	
Schwertträger	111	LENLRIIRGHSLYEEKFALSVLANIDKNTGQGTTELLLLTSLTEILRGGVKFLNNKLCNVE	170
Forelle		TIQWLDIVNSNSKPNMQLPEPSNNRLCKRCDPGCFNGSCWAPGPEHCQTLTKLNCAQQCS	
		TIQW DIVN+++KP+M+L NN LC +C C+NGSCWAPG E+CQTLTKLNCAQQCS	
Schwertträger	171	TIQWFDIVNADTKPSMELQVAGNNPLCNKCHSSCYNGSCWAPGAENCQTLTKLNCAQQCS	230
Forelle		KRCKGSPIDCCNEHCAAGCTGPRPTDCLACRDFQDDGTCKDSCPRLLLLYDRNLHQLVNN	
		KRCKGSP DCCNEHCAAGCTGP DCLACRDFQDDG CKDSCP L+ YD NLHQLV N	
Schwertträger	231	KRCKGSPSDCCNEHCAAGCTGPTAADCLACRDFQDDGVCKDSCPGLMRYDPNLHQLVNP	290
Forelle		PDGKYNFGATCVKTCPHNYVVTDHGACVRTCSGDTYEVDEGGVVKCKKCDGLCPKVCNGL	
		P GKYNFGATCVK+CPHNYVV DHGACVRTCSG+TYEV+EGG+RKC KC+GLCPKVCNGL	
Schwertträger	291	PQGKYNFGATCVKSCPHNYVVADHGACVRTCSGNTYEVVEEGGIRKCAKCNGLCPKVCNGL	350
Forelle		GMGKLDKILSINATNIDTFKNCTKINGNIAIIYTSIH	
		G G L ILS+NATNI +FKNCTKI G+I I+ TSIH	
Schwertträger	351	GYGDLTYILSVNATNIGSFKNCTKITGDITILRTSIH	387

Abbildung 20: Gegenüberstellung der EGFR-Abschnitte aus Forelle und Schwertträger. Ergebnis der BLAST-Suchanfrage. Identische Aminosäuren sind durch den Buchstaben und chemisch äquivalente durch ein „+“ zwischen den Sequenzen gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen beziehen sich auf die EGFR-Sequenz des Schwertträgers.

Die Übereinstimmung des EGFR-Teilstückes aus der Forelle mit dem des Schwertträgers umfasst einen Abschnitt zwischen den Positionen 111 bis 378 (Abb. 20). Gomez et al. (2004) ordnen die Aminosäuren 1 bis 519 des EGFR aus *X. xiphidium* (Schwertträger) der extrazellulären Domäne zu.

Die Ähnlichkeit zum EGF-Rezeptor des Zebrafisches ist 83 %. Die Homologie mit dem Zebrafisch-EGFR besteht ebenfalls zu einem Abschnitt (Position 98 bis 374) der nach Wang et al. (2004) der extrazellulären Domäne zugeordnet wird.

Die Vergleiche mit bekannten Rezeptorsequenzen bestätigen, dass die von uns isolierte Sequenz aus *O. mykiss* ein Abschnitt der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors ist.

5.1.1.5 Sequenzvergleiche mit weiteren EGF-Rezeptoren

Der Vergleich der aus der Regenbogenforelle isolierten Teilsequenz des EGF-Rezeptors mit bekannten EGFR-Sequenzen fand mit Hilfe der Programme CLUSTAL des PBIL und MEGA 4.0 statt. Dazu wurden derzeit bekannte EGFR-Proteinsequenzen verschiedener Spezies aus der Datenbank des NCBI ausgewählt. Basierend auf der unter 5.1.1.5 erfolgten Zuordnung

des Forellen- EGFR-Teilstückes wurden bei der Gegenüberstellung nur die extrazellulären Domänen herangezogen. Vorab sollte die Proteinteilsequenz aus *O. mykiss* eingehender analysiert und anschließend in ein phylogenetisches System eingefügt werden.

Zur genaueren Analyse wurde das, von uns isolierte Teilstück durch das CLUSTAL-Programm mit den entsprechenden EGFR-Abschnitten der extrazellulären Domäne aus dem Schwertträger, Zebraquärling, Mensch und Maus verglichen (Abb. 21). Der Aminosäuresequenzvergleich zeigt identische Aminosäurereste über den gesamten Abschnitt verteilt. Auffallend ist die Cystein-reiche Domäne S1, die in Abbildung 12 mit Pfeilen eingegrenzt wird. Sowohl in den piscinen als auch in den Säugersequenzen umfasst sie 143 Aminosäuren und schließt 22 stark konservierte Cysteinreste ein. Der Abstand zwischen diesen ist gleich.

	L1 Domäne
Forelle	LENLRIIRGHTLYDSGFALAVVLNYNKSMRAGTTELPPLTSLTEILKGGVKFS-DNQLCNV
Schwertträger	LENLRIIRGHSLYEKFFALSVLANIDKNTGQGTELLTSLTEILRGGVKFL-NNKLCNV
Zebraquärling	LENLRIIRGHSLYEDKFALAVLVNFNNSIEQGVKELPLTSLTEILKGGVKFCRNDYLCNV
Mensch	LENLQIIRGNMYEYSYALAVLSNYDAN-KTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNV
Maus	LENLQIIRGNALYENTYALAILSNYGTN-RTGLRELPMRNLQEILIGAVRFSNNPILCNM
→	
Forelle	ETIQWLDIVNSNSKPNMQLPESNNRLCKRCDPGCFNGSCWAPGPEHCQTLTKLNCQAQQC
Schwertträger	ETIQWFDIVNADTKPSMELQVAGNNPLCNKCHSSCYNGSCWAPGAENCQTLTKLNCQAQQC
Zebraquärling	GTEI EWADILNMKSLPTIVSHNISYGKNCGKCDPSCFNGSCWGTGPKDCQRM TKVI CAEQC
Mensch	ESIQRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQC
Maus	DTIQWRDIVQNVFMSNMSMDLQSHPSSCPCKCDPSCPNGSCWGGGEENCQKLTKIICAQQC
Cystein-reiche Domäne S1	
Forelle	SKRCKGSPSIDCCNEHCAAGCTGPRPTDCLACRDFQDDGTCKDSCPRLLLYDRNLHQLVN
Schwertträger	SKRCKGSPSPIDCCNEHCAAGCTGPTAADCLACRDFQDDGVCKDSCPGLMRYDPNLHQLVN
Zebraquärling	SGRCKGPRPIDCCNEHCAAGCTGPRPTDCLACKDFQDEGTCKDACPRMLLYDPNTHQLAP
Mensch	SGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPPTYQMDV
Maus	SHRCRGRSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCKQFQDEATCKDTCPPMLLYNPPTYQMDV
←	
Forelle	NPDGKYNFGATCVKTCPHNYVVTDHGACVRTCSGDTYEVDEGGVRKCKKCDGLCPKVCNG
Schwertträger	NPQGKYNFGATCVKSCPHNYVVDHGA CVRTC SGNTYEVDEGGIRKCAKNGLCPKVCNG
Zebraquärling	NPYGKYSFGATCIKTCPHNYVVTDHGACVRTCSPGTYEVDEGGVRKCKRCEGLCPKVCNG
Mensch	NPEGKYSFGATCVKCKPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCKVCNG
Maus	NPEGKYSFGATCVKCKPRNYVVTDHGSCVRACGPDYEVVEEDGIRKCKKCDGPKVCNG
L2 Domäne	
Forelle	LGMGKLDKILSINATNIDTFKNCTKINGNIAIIYTSIH
Schwertträger	LGYGDLTYILSVNATNIGSFKNCTKITGDITILRTSIH
Zebraquärling	LGMGPLANVLSINATNIDSFENCTKISGNVAIILSTTFR
Mensch	IGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSI SGLDHILPVAFR
Maus	IGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGLDHILPVAFK

Abbildung 21: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes aus der Forelle mit ausgewählten EGFR-Sequenzen. Erstellt mit dem Programm CLUSTAL (PBIL). Identische Aminosäuren sind rot und chemisch äquivalente blau gefärbt. Sequenzdeletionen sind mit einem „-“ markiert. Die Cystein-reiche Domäne S1 ist mit Pfeilen eingegrenzt. Die Cysteinreste (C) sind grau hinterlegt.

Folgende EGFR-Sequenzen wurden mit dem Forellen- EGFR-Teilstück verglichen: Schwertträger (*Xiphophorus xiphidium*, AA-Position: 111- 387); Zebraquarienfisch (*Danio rerio*, Position: 98- 374); Mensch (*Homo sapiens*, Position: 100- 377); Maus (*Mus musculus*, Position: 100- 377)

Auch in denen als L1 und L2 bezeichneten Domänen kommen in jeder Sequenz Cysteinreste vor. Die Abbildung 21 verdeutlicht, dass die aus der Forelle isolierte Sequenz sehr große Ähnlichkeit mit den dargestellten Ausschnitten des EGF-Rezeptors aus Schwertträger, Zebraquarienfisch, Mensch und Maus aufweist.

Für den phylogenetischen Vergleich wurden weitere bekannte Sequenzen des Rezeptors hinzugezogen. Auch die, im Kapitel 2.1.3 erwähnten, duplizierten EGF-Rezeptoren der Knochenfische wurden in die Analyse einbezogen. Diese Sequenzen wurden der „Ensembl“-Genbank entnommen. Wie in der zuvor durchgeführten Analyse wurden nur die extrazellulären Sequenzbereiche des Rezeptors berücksichtigt.

Das Dendrogramm in Abbildung 22 zeigt eine deutliche Gruppierung der EGFR-Aminosäurefolgen. In der oberen Hälfte sind ausschließlich die EGFR-Sequenzen der Säuger angeordnet, gefolgt von der Gruppe der niederen Vertebraten mit den Vögeln und Fischen. Den Abschluss bilden die Avertebraten. Säuger, Fische und Insekten bilden jeweils monophyletische Gruppen. Innerhalb der Fische zeigt sich eine weitere Unterteilung. Die EGFR-Duplikate der Knochenfische bilden jeweils eine Gruppe. Das EGFR-Teilstück der Forelle gruppiert sich zu den EGFRa-Duplikaten.

Eine entfernte phylogenetische Beziehung besteht zu den orthologen Sequenzen der Insekten. Eine geringere Distanz liegt zwischen den Rezeptorproteinabschnitten aus den Fischen und den übrigen, in den Vergleich einbezogenen Vertebraten.

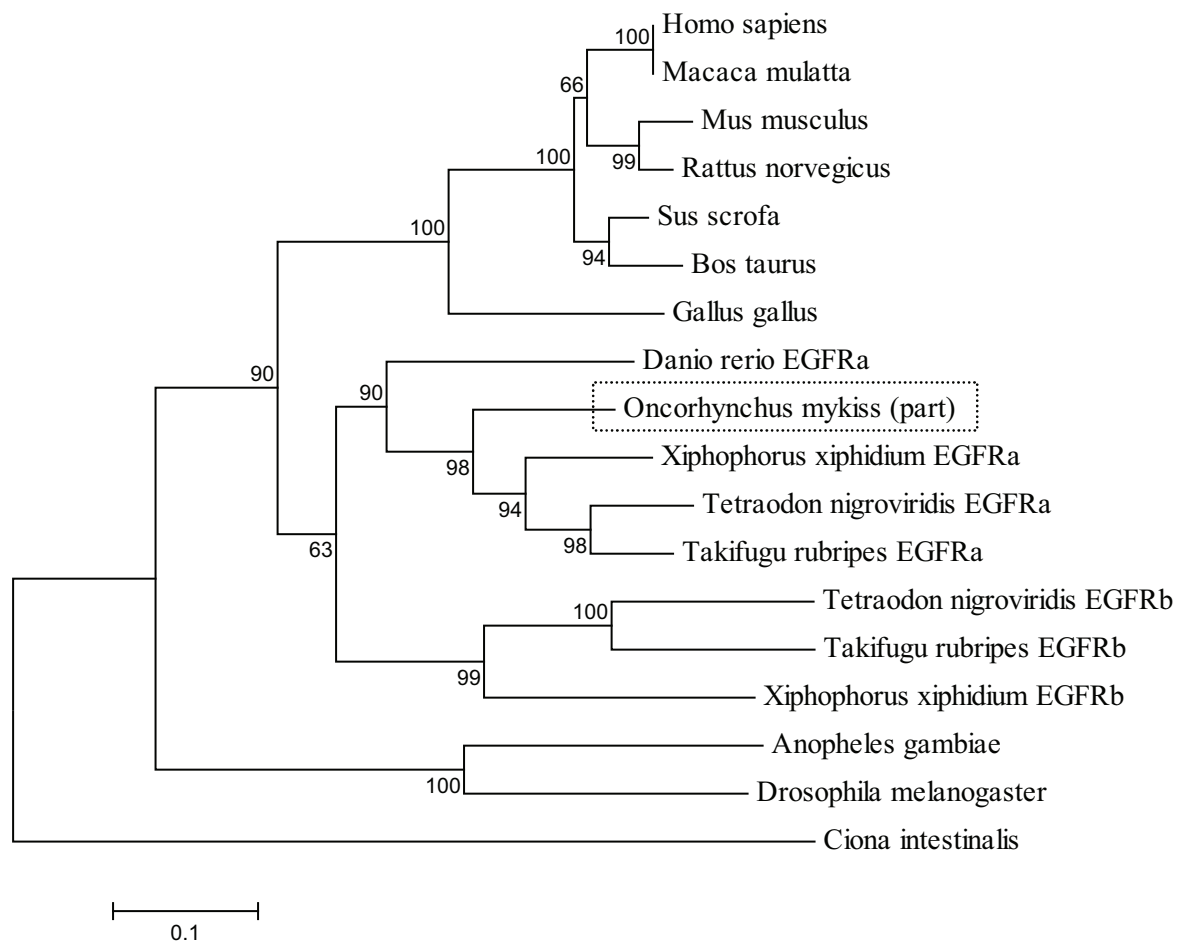


Abbildung 22: Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter, in der NCBI-Datenbank veröffentlichter EGFR-Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domäne. Erstellte mit MEGA 4.0 nach der Neighbour-Joining-Methode. Sequenzähnlichkeiten sind durch die Bootstrap-Werte [%] an den Dendrogrammknotenpunkten dargestellt.

Folgende Sequenzen wurden genutzt: *Anopheles gambiae* (Gambische Malaria­mücke), *Bos taurus* (Rind), *Canis familiaris* (Hund), *Ciona intestinalis* (Schlauchseescheide), *Danio rerio* (Zebra­bärbling), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Gallus gallus* (Huhn), *Homo sapiens* (Mensch), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Sus scrofa* (Schwein), *Takifugu rubripes* (Japanischer Kugelfisch), *Tetraodon nigroviridis* (grüner Kugelfisch), *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger)

Tabelle 4 veranschaulicht das Ergebnis der phylogenetischen Analyse noch einmal. Die Homologie der Forellen-Aminosäuresequenz zu den piscinen EGFRa-Kopien ist mit 76 % bzw. 72 % am höchsten. Deutlich geringer ist mit 61 % die Übereinstimmung mit dem b-Duplikat des Schwertträgers. Zu der orthologen Sequenz des Huhnes ist sie mit 62 % höher als zum humanen EGFR. Eine vergleichsweise große evolutionäre Distanz besteht zu dem EGFR-Protein der Schlauchseescheide. Die Sequenzübereinstimmung beträgt lediglich 32 %.

Tabelle 4: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR- Abschnittes aus *Oncorhynchus mykiss* mit ausgewählten EGFR- Sequenzen. Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI).

	<i>Oncorhynchus mykiss</i> – Forelle
<i>X. xiphidium</i> - Schwerträger EGFRa (AY230135)	76 %
<i>D. rerio</i> - Zebraquärling EGFRa (AY332223)	72 %
<i>X. xiphidium</i> - Schwerträger EGFRb (AAD10500)	61 %
<i>H. sapiens</i> - Mensch (NM_005228)	59 %
<i>G. gallus</i> - Huhn (NM_205497)	62 %
<i>D. melanogaster</i> - Fruchtfliege (NM_057410)	41 %
<i>C. intestinalis</i> - Schlauchseescheide (NM_001078516)	32 %

Accession Numbers der NCBI- Datenbank stehen in Klammer.

Somit ist das, von uns isolierte EGFR-Teilstück aus der Forelle ein Abschnitt der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die 277 Aminosäurereste umfassende Proteinsequenz ordnet sich in die Gruppe der EGFRa-Kopien der Knochenfische ein.

5.1.2 Der EGF-Rezeptor von *Cyprinus carpio*

Cyprinus carpio (Karpfen) und *Danio rerio* (Zebraquärling) sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. Beide werden zur Familie der Cyprinidae, den Karpfenfischen, gezählt. Es kann daher angenommen werden, dass der EGF-Rezeptor des Karpfens ähnliche Eigenschaften aufweist wie der des Zebraquärlings.

Ebenso wie zur Suche nach dem EGF-Rezeptor der Regenbogenforelle wurden zu Beginn verschiedenen Datenbanken nach bereits hinterlegten Sequenzen aus *C. carpio* durchsucht. Mit der cDNA vom *D. rerio*- EGFR als Vergleichssequenz sollten die gefundenen Karpfen-ESTs dem Rezeptor zugeordnet werden. Der Abgleich verlief jedoch negativ. Keine der hinterlegten cDNA-Sequenzen des Karpfens zeigte eine ausreichende Ähnlichkeit mit der EGFR-Sequenz des Zebraquärlings.

Die Länge der cDNA des gesamten Karpfen- EGFR sollte aufgrund der Verwandtschaft mit dem Zebraquärling auch ca. 4000 bp umfassen. Wie schon unter 5.1.1.3 beschrieben, sollten auch hier zunächst einzelne Teilsequenzen mit sich überlagernden Bereichen isoliert und zusammen gefügt werden. Die dafür benötigten Primer wurden von der cDNA des

Zebrabärbling- EGFR abgeleitet und sind im Anhang aufgelistet. In der Tabelle 5 sind nur die zu einem PCR-Produkt führenden Primerpaare angegeben.

Tabelle 5: Sequenz der Primer, die für die Identifizierung des EGF-Rezeptors in *C. carpio* verwendet wurden und zu einem PCR-Produkt führten. Die Sense-Primer sind mit einem „f“ und die Antisense-Primer mit einem „r“ gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	hypothetische Größe des PCR- Produktes
EGFR_Danio_f2	GAGCATCCAGGAAGTTGGTGG	511 bp
EGFR_Danio_r2	CAGACAGTCTGTAGGTCTGGG	
EGFR_Danio_f9	CCACGTCTCCCAAAGCTAAC	678 bp
EGFR_Danio_r9	GGTCTGCTCTCAGCATCAATC	

5.1.2.1 Amplifikation spezifischer Transkripte aus *C. carpio*

In gleicher Weise wie bei Regenbogenforelle wurden aus den Kiemen des Karpfens RNA isoliert. In der anschließenden Onestep-RT-PCR wurden spezifische cDNA-Stücke amplifiziert. PCR-Produkte konnten in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese nur nach Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Primerpaare detektiert werden.

Eine 366 bp umfassende cDNA-Sequenz wurde nach dem Einsatz der Primer EGFR_Danio_f2 und _r2 isoliert. Im Folgenden wird sie als Teilsequenz 1 bezeichnet. Die cDNA-Teilsequenz 2 ist 372 bp lang und wurde mittels Primerpaar EGFR_Danio_f9 und _r9 synthetisiert.

Die Primerpaare entstammen EGFR-Sequenzbereichen, die ca. 2000 bp voneinander entfernt liegen (Abb. 23). Folglich ist anzunehmen, dass die aus Karpfenkiemen isolierten Oligonukleotide keine Überlappungen aufweisen.

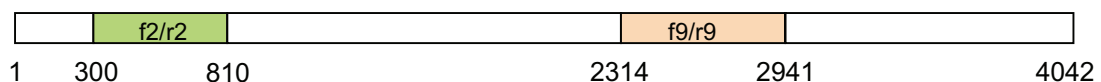


Abbildung 23: Schematische Darstellung der EGFR-Sequenzbereiche. Die cDNA aus dem grünen Bereich wurde mit Primerpaar f2/r2 amplifiziert werden. Die cDNA des roten Abschnittes wurde mit Primerpaar f9/r9 amplifiziert. Die Zahlen sind bezogen auf Nukleotid-Positionen in der EGFR-cDNA des Zebrabärblings.

Die Gegenüberstellung mittels BLAST2 zeigte, wie erwartet, keinen homologen Bereich zwischen beiden gewonnenen Sequenzen. Ein Zusammenfügen der cDNA-Stücke, wie bei der Forelle, war demzufolge nicht möglich. Deshalb werden bei den nachfolgenden Analysen die Teilstücke einzeln betrachtet.

5.1.2.1.1 *EGFR-Teilstück 1*

Wie schon im Kapitel 5.1.1.4 beschrieben, erfolgte zunächst die Suche nach homologen Gensequenzen, die in der NCBI-Datenbank abgelegt wurden. Die Sequenz des Karpfens zeigt, wie erwartet, eine hohe Übereinstimmung mit einem Abschnitt der cDNA-Sequenz des EGF-Rezeptors des Zebraärbings. Sie beträgt 79 %.

Aus der BLAST-Analyse geht hervor, dass Teilstück 1 homolog zu einem EGFR-Sequenzabschnitt zwischen den Basen 421 und 783 ist. Der Abschnitt liegt genau innerhalb der Sequenz, die mit Hilfe des Primerpaares f2/r2 amplifiziert werden sollte (Abb. 23).

Die Translation mittels „Translate-Tool“ (Expasy) ergab für die 366 bp umfassende cDNA-Sequenz 1 ein Protein von 122 Aminosäureresten (Abb. 24). Die Sequenz wurde in der NCBI-Genbank unter der AC-Nummer FM865855 hinterlegt.

```

ttgtcctcctgtaactacaacaacagcatcgggcaaggcgtgaaccagttgcttctgact
L S S C N Y N N S I G Q G V N Q L L L T
agcttaactgaaatactgaaggggtgggataatattttccagtaacaatcatttatgtaac
S L T E I L K G G I I F S S N N H L C N
gtggagtccatcctgtggagtgacattctgaacttgaagagccagcctaaaatcagagag
V E S I L W S D I L N L K S Q P K I R E
ccggaaccaagctcagcagaacactgtaagaagtgtgaccggagctgttacaatgggtcc
P E P S S A E H C K K C D R S C Y N G S
tgttggggccctagtccccaaaactgccaaaaaatgactaggggtgatctgtgctggagcag
C W G P S P Q N C Q K M T R V I C A E Q
tgttcggggaggtgtaaggggccccaaaccattgactgctgtaatgaacattgtgctgct
C S G R C K G P K P I D C C N E H C A A
ggctgc
G C

```

Abbildung 24: EGFR-Teilsequenz 1 aus *C. carpio*. Aminosäuresequenz nach Translation mittels „Translate-Tool“ (Expasy). Dargestellt sind die cDNA- (kleine Buchstaben) und Aminosäuresequenz (Großbuchstaben).

Für die weiteren Untersuchungen wurde aus den bereits genannten Grund des degenerierten genetischen Codes die Aminosäuresequenz des von uns isolierten EGFR-Teilstückes verwendet.

Erneut durchgeführte BLAST-Analysen in der NCBI-Genbank bestätigten, dass auch die Proteinsequenz 1 aus dem Karpfen ein Teil des EGF-Rezeptors ist. Das Teilstück stimmt in 81 Aminosäureresten mit dem Sequenzabschnitt von Position 121 bis 238 des Wachstumsrezeptors aus dem Zebrafisch überein. Dies kommt einer Homologie von 68 % gleich. Die Ähnlichkeit zwischen beiden piscinen Proteinsequenzen ist um 2 % höher aufgrund von zusätzlich 14 chemisch identischen Aminosäureresten, die in Abbildung 25 mit einem „+“ gekennzeichnet sind.

Karpfen		NYNNSIGQGVNQLLLTSLTEILKGGIIFSSNNHLCNVESILWSDILNLKSQPKIREPEPS	
		N+NNSI QGV +L LTSLTEILKGG+ F N++LCNV +I W+DILN+KS P I S	
Zebrafisch	121	NFNNSIEQGVKELPLTSLTEILKGGVKFCRNDYLCNVGTIEWADILNKMKSPLTIVSHNIS	180
Karpfen		SAEHCKKCDRSCYNGSCWGPSPQNCQKMTRVICAEQCSGRCKGPKPIDCCNEHCAAGC	
		++C KCD SC+NGSCWG P CQ+MT+VICAEQCSGRCKGP+PIDCCNEHCAAGC	
Zebrafisch	181	YGKNCGKCDPSCFNGSCWGTGPDKCQRMTKVICAEQCSGRCKGPRPIDCCNEHCAAGC	238

Abbildung 25: Vergleich des EGFR-Abschnittes 1 aus Karpfen und des EGF-Rezeptors des Zebrafisches. Ergebnis der BLAST-Suchanfrage. Identische Aminosäuren sind durch den Buchstaben und chemisch äquivalente durch ein „+“ zwischen den Sequenzen gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen beziehen sich auf die EGFR-Sequenz des Zebrafisches.

Wie schon in Kapitel 5.1.1.4 erwähnt, wird die Aminosäurefolge bis zu Position 644 zur extrazellulären Region des Rezeptors aus *D. rerio* gezählt (Wang et al., 2004). Die Homologie zum EGF-Rezeptor von *X. xiphidium* beträgt ebenfalls über 50 % (Tab. 6). Gleichermäßen besteht hier die Übereinstimmung mit einem Rezeptorabschnitt (Position 133 bis 250), der nach Gomez et al. (2004) zur extrazellulären Domäne gerechnet wird. Zur analogen Region des humanen EGFR zeigt das Karpfen-Rezeptorteilstück ebenfalls eine hohe Sequenzähnlichkeit von 50 %.

In diese Analyse wurde, wie schon bei der Forelle, die Sequenzen der duplizierten EGF-Rezeptoren aus *X. xiphidium* und *T. nigroviridis* hinzugezogen. Ein Vergleich zeigte nur geringe Sequenzunterschiede zwischen den EGFR-Kopien einer Spezies. Dennoch besteht zwischen den piscinen EGFR-Sequenzen und dem Karpfen-Teilstück eine gering höhere Ähnlichkeit (57 %) als zu den EGFRb (52- 56%).

Vom Zebrafisch liegt in den Genbanken keine Sequenz für ein EGFR-Duplikat vor.

Tabelle 6: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teil 1 aus *Cyprinus carpio* mit ausgewählten EGFR-Sequenzen. Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI).

	<i>Cyprinus carpio</i> - Karpfen Teil 1
<i>D. rerio</i> - Zebraquärling EGFRa (AY332223)	68 %
<i>X. xiphidium</i> - Schwerträger EGFRa (AY230135)	57 %
<i>T. nigroviridis</i> - Grüner Kugelfisch EGFRa	57 %
<i>X. xiphidium</i> - Schwerträger EGFRb (AAD10500)	56 %
<i>T. nigroviridis</i> - Grüner Kugelfisch EGFRb	52 %
<i>H. sapiens</i> - Mensch (NM_005228)	50 %
<i>G. gallus</i> - Huhn (NM_205497)	45 %
<i>D. melanogaster</i> - Fruchtfliege (NM_057410)	39 %
<i>C. intestinalis</i> - Schlauchseescheide (NM_001078516)	35 %

Accession Numbers der NCBI- Datenbank stehen in Klammer.

Für eine genauere Analyse des, aus Karpfen isolierten EGFR-Teilstückes wurden das Programm CLUSTAL des PBIL herangezogen. Die homologen EGFR-Abschnitte von Zebraquärling, Schwerträger, Mensch und Huhn wurden mit der Teilsequenz des Karpfens verglichen (Abb. 26). In vielen Aminosäurepositionen stimmen die Sequenzen überein. Die in Abbildung 26 mit L1 bezeichnete Domäne beinhaltet die für sie beschriebenen Cysteinreste. Ebenso unübersehbar treten die grau hinterlegten Cysteine in der S1-Domäne auf. Deren Anzahl und Position sind innerhalb der verglichenen EGF-Rezeptoren gleich (Abb. 26). In den Domäne L1 und S1 des EGFR-Teilstückes des Karpfens können 2 bzw. 11 Cysteine nachgewiesen werden anstelle von 4 und 22 Aminosäureresten (Gomez et al., 2004) aufgrund der unvollständigen Sequenz.

	L1 Domäne
Karpfen	LSS-CNYNNSIGQGVNQLLLTSLTEILKGGIIFSSNNHLCNVESILWSDIILNLKSQPKIR
Zebraquärling	LAVLVNFNNSIEQGVKELPLTSLTEILKGGVKFCRNDYLCNVGTIEWADILNMKSLPTIV
Schwerträger	LSVLANIDKNTGQGTTELLTSLTEILRGGVKFLNN-KLCNVETIQWFDIVNADTKPSME
Mensch	LAVLSNYDANKTG-LKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMS
Huhn	LAVLSNYHMNKTQGLRELPMKRLEIILNGGVKISNNPKLONMDTVLWNDIIDTSRKPLTV
	Cystein-reiche Domäne S1
Karpfen	EPEPSSAEHCCKKCDRSCYNGSCWGPSPQNCQKMTKVIKAEQCSGRCKGPKPIDCCNEHCA
Zebraquärling	SHNISYGKNCCKCDPSCFNCSWGTGPDKQCRMTKVIKAEQCSGRCKGPKPIDCCNEHCA
Schwerträger	LQVAGNNPLCNKCHSSCYNGSCWAPGAENCQTLTKLNCAEQCSGRCKGPKPIDCCNEHCA
Mensch	MDFQNLHGSCKCDPSCFNCSWAGAGEENCQKLTKIICAEQCSGRCKGPKPIDCCCHNQCA
Huhn	LDFASNLSSCPKCHPNCEDHCVWAGAGEQNCQTLTKVIKAEQCSGRCKGPKPIDCCCHNQCA

Karpfen	AGC
Zebrabärbling	AGC
Schwertträger	AGC
Mensch	AGC
Huhn	AGC

Abbildung 26: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes 1 aus Karpfen mit ausgewählten EGFR-Sequenzen. Erstellt mit dem Programm CLUSTAL (PBIL). Identische Aminosäuren sind rot und chemisch äquivalente blau gefärbt. Sequenzdeletionen sind mit einem „-“ markiert. Der Beginn der Cystein-reichen Domäne S1 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Cysteinreste (C) sind grau hinterlegt.

Folgende EGFR-Sequenzen wurden mit dem Karpfen- EGFR-Teilstück 1 verglichen: Zebrabärbling (*Danio rerio*, AA-Position: 116- 238); Schwertträger (*Xiphophorus xiphidium*, Position: 129- 250); Mensch (*Homo sapiens*, Position: 119- 240); Huhn (*Gallus gallus*, Position: 128- 251)

Für die Ableitung der phylogenetischen Verwandtschaft mit Hilfe des MEGA 4.0-Programms wurden weitere EGF-Rezeptorsequenzen aus der NCBI- und anderen Genbanken verwendet. In die Analyse wurden, wie schon in dem CLUSTAL-Vergleich, nur die mit dem Karpfen-EGFR-Abschnitt 1 homologen Sequenzbereiche des Rezeptors einbezogen.

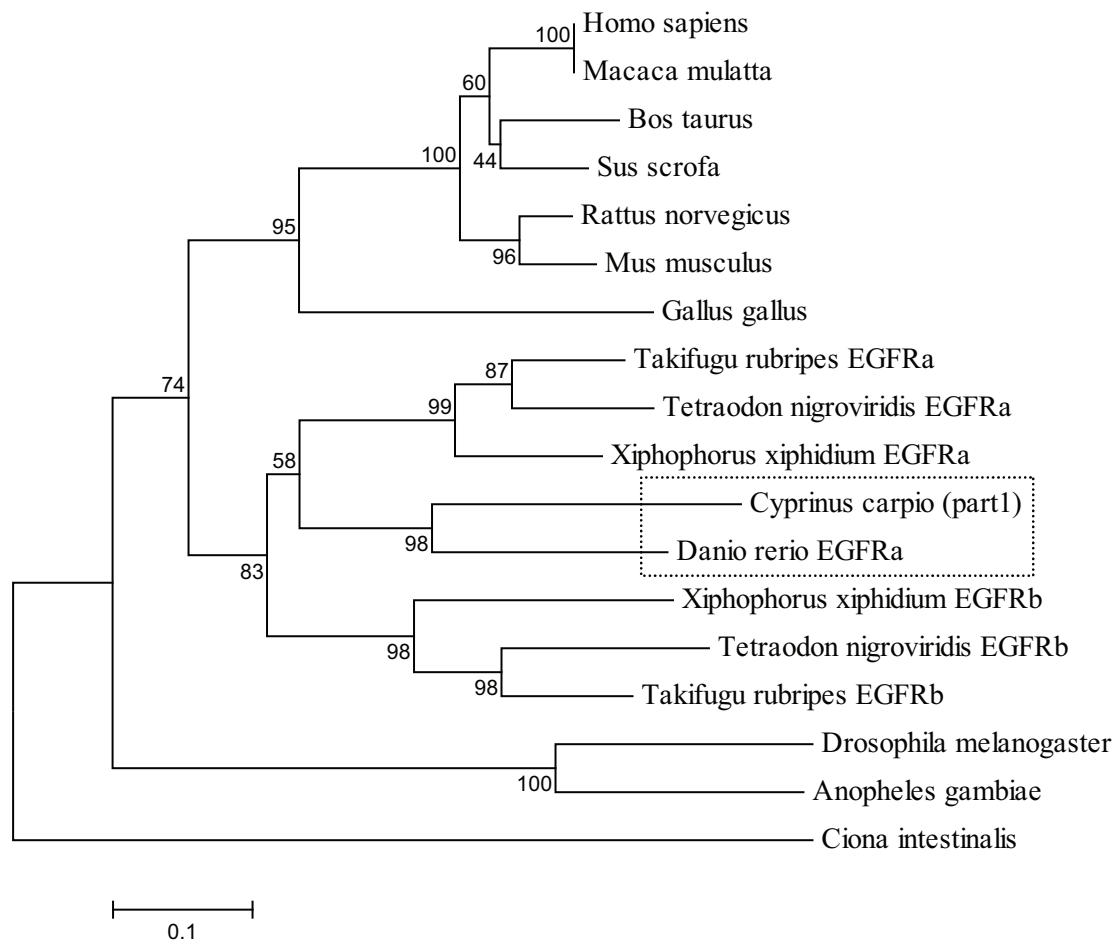


Abbildung 27: Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter in der NCBI-Datenbank veröffentlichter EGFR-Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domäne. Erstellte mit MEGA 4.0 nach der Neighbour-Joining-Methode. Sequenzähnlichkeiten sind durch die Bootstrap-Werte [%] an den Dendrogrammknotenpunkten dargestellt.

Folgende Sequenzen wurden genutzt: *Anopheles gambiae* (Gambische Malaria-Mücke), *Bos taurus* (Rind), *Canis familiaris* (Hund), *Ciona intestinalis* (Schlauchseescheide), *Cyprinus carpio* (Karpfen), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Gallus gallus* (Huhn), *Homo sapiens* (Mensch), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Sus scrofa* (Schwein), *Takifugu rubripes* (Japanischer Kugelfisch), *Tetraodon nigroviridis* (grüner Kugelfisch), *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger)

Ähnlich wie das Dendrogramm, welches die Einordnung des Forellen-EGFR-Abschnittes darstellt, zeigt auch der Stammbaum in Abbildung 27 eine deutliche Unterteilung in die Gruppen der Säuger-EGFR, die der niederen Vertebraten und der Avertebraten. Auch die Unterteilung innerhalb der piscinen Sequenzen in EGFRa und EGFRb erfolgte wie in dem zuvor erstellten Dendrogramm.

Wie zu erwarten, bilden Karpfen und Zebrafisch bezüglich der EGFR eine monophyletische Gruppe innerhalb der Fische. Damit wird das Teilstück aus dem Karpfen auch den EGFRa-Kopien zugeordnet.

Eine größere phylogenetische Distanz besteht zu den orthologen Sequenzen der Säuger und der Vögel. Die Ähnlichkeit zu dem Rezeptorprotein aus den Insekten ist mit 39 % (Tab. 6) vergleichsweise gering. Das zeigt sich auch in dem Stammbaum. Eine Randgruppe stellt offenbar der EGF-Rezeptor der Schlauchseescheide *C. intestinalis* dar. Deren Übereinstimmung mit dem Karpfen-Teilprotein 1 beträgt lediglich 35 % (Tab. 6).

Zusammenfassend betrachtet, ist die erste, aus dem Karpfen gewonnene Sequenz ein Teil der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors. Die 122 Aminosäurereste umfassende Proteinsequenz zeigt mit 68 % die höchste Homologie zum EGFR des Zebrafisches und ordnet sich auch in die Gruppe der EGFRa-Duplikate der Knochenfische ein.

5.1.2.1.2 EGFR-Teilstück 2

Wie schon mehrfach beschrieben, stand an erster Stelle die Suche nach homologen Gensequenzen, die in der NCBI-Datenbank abgelegt wurden. Mit Hilfe einer BLAST-Analyse konnte mit 88 % wieder die höchste Übereinstimmung mit der EGFR-cDNA-Sequenz des Zebrafisches gefunden werden. Aus der Suche geht weiterhin hervor, dass das

zweite Oligonukleotid homolog zu einem EGFR-Sequenzabschnitt zwischen der Rezeptorbasenfolge 2318 bis 2687 ist. Der Abschnitt liegt erwartungsgemäß innerhalb der EGFR-Sequenz, die mit Hilfe des Primerpaares f9/r9 amplifiziert werden sollte (Abb. 23).

Die cDNA ab Nukleotid 2010 codiert für den cytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors von *D. rerio* (Goishi et al., 2003). Beruhend auf einer Sequenzhomologie von 88 %, kann die 2. Teilsequenz dem intrazellulären Abschnitt des Karpfen- EGF-Rezeptors zugeordnet werden. Für die Bestätigung dieser Annahme wurden weitere Analysen mit der Aminosäuresequenz des kurzen Oligonukleotides durchgeführt. Die Translation der cDNA erfolgte wie zuvor mit dem „Translate-Tool“ (Expasy). Die Abbildung 28 zeigt die cDNA mit der zugehörigen Proteinsequenz des 2. EGFR-Teilstückes aus *C. carpio*. Die translatierte Sequenz umfasst 124 Aminosäurereste.

Die cDNA aus *C. carpio* wurde unter der AC-Nummer FM865856 in der NCBI-Genbank registriert.

```

cctccaccggtccagcttatacaccagtttgatgccctacggctgtttgctggactacgtc
P P P S S L S P S L M P Y G C L L D Y V
agagaaaacaaggacaacatcggctctcaacacctgctcaactgggtgtgtgcagattgct
R E N K D N I G S Q H L L N W C V Q I A
aagggtatgagttacctagaagagcgtcatcttgtgacagagacttggctgctcgtaat
K G M S Y L E E R H L V H R D L A A R N
gtggttgtaagaccctcagcatgtgaagatcactgattttggcttggccaagctggtg
V L V K T P Q H V K I T D F G L A K L L
aatgccgatgagaaggagtatcacgcagatggcggaaagggtgccaataaaatggatggca
N A D E K E Y H A D G G K V P I K W M A
ctggaatccatcctgcacagaacatacaccaccagagtgacgtctggagttatggtgtg
L E S I L H R T Y T H Q S D V W S Y G V
acagtctgggac
T V W D

```

Abbildung 28: EGFR-Teilsequenz 2 aus *C. carpio*. Aminosäuresequenz nach Translation mittels „Translate-Tool“ (Expasy). Dargestellt sind die cDNA- (kleine Buchstaben) und Aminosäuresequenz (Großbuchstaben).

Aus einer durchgeführten Sequenzähnlichkeitssuche mittels BLAST resultierte ebenfalls eine ausgeprägte Homologie der 2. Teilsequenz aus *C. carpio* mit dem EGFR aus *D. rerio*. Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass 111 Aminosäurereste des Proteins aus dem Karpfen mit dem Rezeptor des Zebrafisches im Abschnitt 791 bis 905 übereinstimmen. Diese Region wird der cytoplasmatischen Rezeptortyrosinkinase zugerechnet (Goishi et al., 2003). Die Homologie zu diesem Bereich beträgt 96 %. Werden die beiden chemisch äquivalenten

Aminosäuren hinzu gezählt, erhöht sich die Ähnlichkeit zwischen beiden Sequenzen auf 98 %. Diese sind in Abbildung 29 mit einem „+“ gekennzeichnet.

Karpfen		LMPYGCLLDYVRENKDNIGSQHLLNWCVQIAKGMSYLEERHLVHRDLAARNVLVKT	PQHV
		LMPYGCLLDYVRENKD	IGSQHLLNWCVQIAKGM+YLEERHLVHRDLAARNVLVKT
Zebrabärbling	791	LMPYGCLLDYVRENKDRIGSQHLLNWCVQIAKGMNYLEERHLVHRDLAARNVLVKT	PQHV 850
Karpfen		KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESILHRITYTHQSDVWSYGVTVWD	
		KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESI	HRTYTHQSDVWSYGVTVW+
Zebrabärbling	851	KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESIQHRTYTHQSDVWSYGVTVWE	905

Abbildung 29: Vergleich des EGFR-Abschnittes 2 aus Karpfen und des EGF-Rezeptors des Zebrabärblings. Ergebnis der BLAST-Suchanfrage. Identische Aminosäuren sind durch den Buchstaben und chemisch äquivalente durch ein „+“ zwischen den Sequenzen gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen beziehen sich auf die EGFR-Sequenz des Zebrabärblings.

Ähnlich hoch ist die Übereinstimmung der Teilsequenz mit dem orthologen Abschnitt des EGF-Rezeptors von Schwertträger (88 %) und Mensch (84 %).

Eine genauere Sequenzanalyse durch den CLUSTAL-Vergleich mit weiteren EGFR-Sequenzen in Abbildung 30 zeigt deutlich die hohe Homologie zwischen den gegenübergestellten Proteinteilstücken. Der von Zebrabärbling, Schwertträger, Mensch und Huhn verwendeten Sequenzausschnitte werden auch der cytoplasmatischen Rezeptor-tyrosinkinasedomäne zugerechnet. Diese Subdomäne ist innerhalb der EGF-Rezeptoren stark konserviert (Hanks et al., 1995).

Karpfen	LSPS	LMPYGCLLDYVRENKDNIGSQHLLNWCVQIAKGMSYLEERHLVHRDLAARNVLVKT
Zebrabärbling	LITQ	LMPYGCLLDYVRENKDRIGSQHLLNWCVQIAKGMNYLEERHLVHRDLAARNVLVKT
Schwertträger	LITQ	LMPYGCLLDYVKEKKNIGSQHLLNWCVQIAKGMNYLEERHLVHRDLAARNVLVKT
Mensch	LITQ	LMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKT
Huhn	LITQ	LMPYGCLLDYIREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEERRLVHRDLAARNVLVKT
Karpfen	PQHV	KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESILHRITYTHQSDVWSYGVTVWD
Zebrabärbling	PQHV	KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESIQHRTYTHQSDVWSYGVTVWE
Schwertträger	PHHV	KITDFGLAKLLNADEKEYHADGGKVPKWMMALESILNRTYTHQSDVWSYGVTVWE
Mensch	PQHV	KITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWE
Huhn	PQHV	KITDFGLAKLLGADEKEYHAEGGKVPKWMMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWE

Abbildung 30: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes 2 aus Karpfen mit ausgewählten EGFR-Sequenzen. Erstellt mit dem Programm CLUSTAL (PBIL). Identische Aminosäuren sind rot und chemisch äquivalente blau gefärbt.

Folgende EGFR-Sequenzen wurden mit dem Karpfen- EGFR-Teilstück 2 verglichen: Zebrabärbling (*Danio rerio*, AA-Position: 787- 905); Schwertträger (*Xiphophorus xiphidium*, Position: 798- 916); Mensch (*Homo sapiens*, Position: 788- 906); Huhn (*Gallus gallus*, Position: 800- 918)

In dem EGFR-Proteinteilstück des Karpfens können die konservierten Aminosäurereste, die in Abbildung 30 rot markiert sind, nachgewiesen werden. Diese große Übereinstimmung zwischen allen Sequenzen verdeutlicht noch einmal, dass der zweite aus den Karpfen-Kiemens isolierte Rezeptorabschnitt ein Teil der intrazellulär vorkommenden Proteinkinasedomäne ist. Der in Tabelle 7 zusammengestellte Vergleich bestätigt die sehr gute Konservierung dieses Bereiches mit Sequenzübereinstimmungen von bis zu 96 %. Hervorzuheben ist, dass die Homologie zur EGFR-Sequenz der Schlauchseescheide ebenfalls über 50 % beträgt.

Tabelle 7: Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teil 2 aus *Cyprinus carpio* mit ausgewählten EGFR-Sequenzen. Erstellt mit dem Programm BLAST2 (NCBI).

	<i>Cyprinus carpio</i> - Karpfen Teil 2
<i>D. rerio</i> - Zebrabärbling EGFRa (AY332223)	96 %
<i>X. xiphidium</i> - Schwertträger EGFRa (AY230135)	94 %
<i>T. nigroviridis</i> - Grüner Kugelfisch EGFRa	93 %
<i>H. sapiens</i> - Mensch (NM_005228)	90 %
<i>G. gallus</i> - Huhn (NM_205497)	92 %
<i>X. xiphidium</i> - Schwertträger EGFRb (AAD10500)	83 %
<i>T. nigroviridis</i> - Grüner Kugelfisch EGFRb	82 %
<i>D. melanogaster</i> - Fruchtfliege (NM_057410)	71 %
<i>C. intestinalis</i> - Schlauchseescheide (NM_001078516)	67 %

Accession Numbers der NCBI- Datenbank stehen in Klammer.

Das phylogenetische Dendrogramm in Abbildung 31 spiegelt ebenfalls die hohe Ähnlichkeit zwischen den Rezeptortyrosinkinasedomänen der Spezies wieder. Dennoch bilden, wie schon in den zuvor erstellten Stammbäumen, die EGFR-Sequenzen der Vertebraten und die der Avertebraten je eine Gruppe. Die Vertebraten sind wiederum unterteilt in die Fraktion der Säuger, Vögel und Fische.

Das EGFR-Teilprotein 2 des Karpfens ist, wie schon das 1. Teilstück, innerhalb der piscinen Gruppe eng mit dem orthologen Rezeptorabschnitt des Zebrabärblings verwandt und wie dieses in die Gruppe der a-Duplikate eingeordnet. Im Unterschied zu den zuvor dargestellten Dendrogrammen scheinen die Tyrosinkinasedomänen der EGFRa der Teleostee mit denen der Säugerrezeptoren enger verwandt zu sein. Sie bilden eine Gruppe und spalten sich von den EGFRb-Duplikaten der Fische deutlich ab.

Im Vergleich zu den in Abbildung 22 und 26 dargestellten Stammbäume bildet jedoch die Schlauchseescheide keine Randgruppe. Aufgrund der guten Konservierung dieser Subdomäne ordnet die phylogenetische Analyse den Vertreter der Tunicata der Gruppe der Insekten zu.

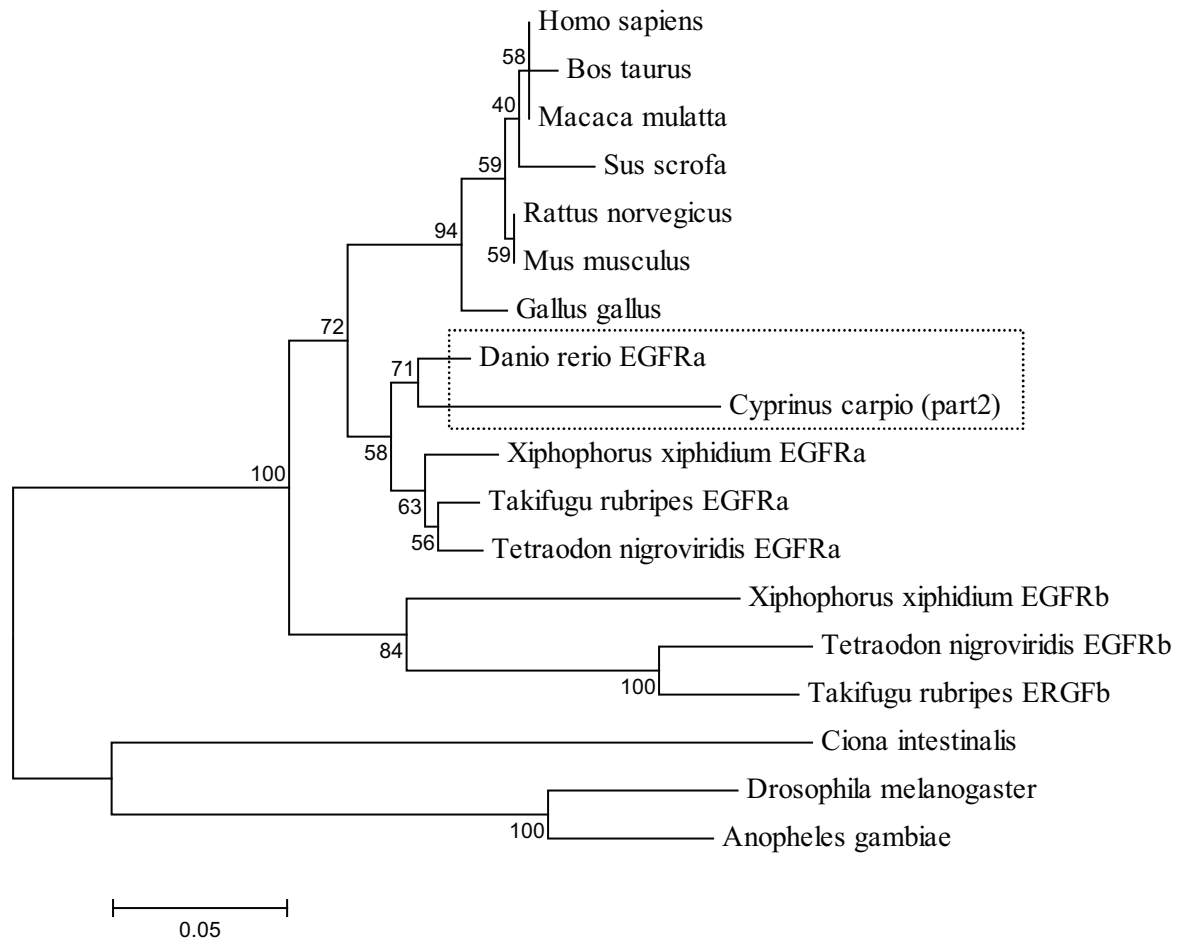


Abbildung 31: Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter in der NCBI-Datenbank veröffentlichter EGFR-Aminosäuresequenzen der Proteinkinasedomäne. Erstellt mit MEGA 4.0 nach der Neighbour-Joining-Methode. Sequenzähnlichkeiten sind durch die Bootstrap-Werte [%] an den Dendrogrammknotenpunkten dargestellt. Folgende Sequenzen wurden genutzt: *Anopheles gambiae* (Gambische Malaria mücke), *Bos taurus* (Rind), *Canis familiaris* (Hund), *Ciona intestinalis* (Schlauchseescheide), *Cyprinus carpio* (Karpfen), *Danio rerio* (Zebraquärling), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Gallus gallus* (Huhn), *Homo sapiens* (Mensch), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Sus scrofa* (Schwein), *Takifugu rubripes* (Japanischer Kugelfisch), *Tetraodon nigroviridis* (grüner Kugelfisch), *Xiphophorus xiphidium* (Schwertträger)

Zusammenfassend betrachtet, ist das zweite EGFR-Teilstück aus dem Karpfen ein Abschnitt der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors. Die 124 Aminosäurereste umfassende Proteinsequenz zeigt mit 96 % die höchste Homologie zum EGFR des

Zebrabärblings und ordnet sich wie die erste Teilsequenz in die Gruppe der EGFRa-Kopien der Knochenfische ein. Beide sind somit Abschnitte des gleichen EGF-Rezeptors.

5.1.3 Gewebespezifische Expression des EGF-Rezeptors

In den vorangegangenen Kapiteln wurde Abschnitten des EGF-Rezeptors aus der Regenbogenforelle und des Karpfens beschrieben. Nachfolgend sollte die Expression des Rezeptors in weiteren Organen beider Fischarten untersucht werden. Die Analyse erfolgte qualitativ mittels Onestep-RT-PCR. Die dafür verwendeten RNA-Isolate stammten aus Haut, Herz, Leber, Darm und Niere. Ferner wurden die Forellenzelllinie RTG-2 und die Karpfenzelllinien EPC und CLC getestet. Als Positivkontrolle sollte Kiemen-RNA dienen.

Der Nachweis der Rezeptorexpression in Organen der Forelle erfolgte mit dem Sense-Primer 5' CTCTGGAGAACCTGCGCATC 3' und dem Antisense-Primer 5' GTGATCCGTCACCACATAGTTG 3'. Ein für den EGFR spezifisches PCR-Produkt konnte in jedem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 32). Damit bestätigt sich die eingangs durchgeführte Expressionsanalyse eines EGFR-homologen ESTs der Forelle (Abb. 14). In der Forellenzelllinie RTG-2 wurde ebenfalls das, für den Rezeptor spezifische 616 bp lange Oligonukleotid detektiert.

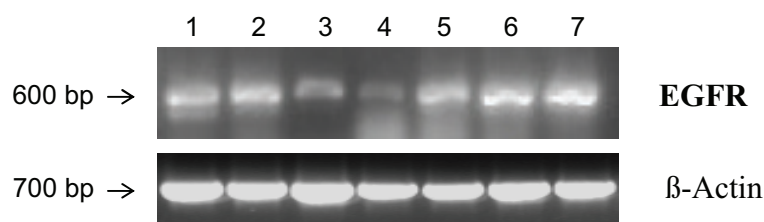


Abbildung 32: EGFR-Nachweis in Forellen-Organen. Amplifikation eines spezifischen 616 bp- Fragmentes. Gelelektrophoretische Auftrennung. (1) Kiemen, (2) Haut, (3) Herz, (4) Leber, (5) Darm, (6) Niere, (7) RTG-2

In allen ausgewählten Karpfenorganen verlief der Nachweis der EGFR-Expression ebenso positiv (Abb. 33). Für die Synthese der in Abbildung 32 gezeigten PCR-Produkte wurde folgendes Primerpaar verwendet: 5' GAGCATCCAGGAAGTTGGTGG 3' und 5' CAGACAGTCTGTAGGTCTGGG 3'.

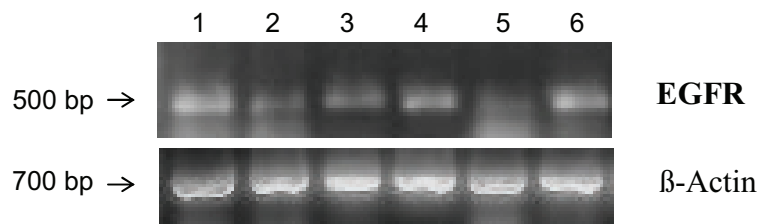


Abbildung 33: EGFR-Nachweis in Karpfen-Organen. Amplifikation eines spezifischen 500 bp- Fragmentes. Gelelektrophoretische Auftrennung.

(1) Kiemen, (2) Darm, (3) Haut, (4) Herz, (5) Leber, (6) Niere

In den Zelllinie des Karpfens CLC und EPC konnte dagegen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Aufgrund der qualitativen Analyse kann keine Aussage über die Expressionsstärke des Wachstumsrezeptors in den verschiedenen Geweben getroffen werden.

Ein anschließender Nachweis des Rezeptorproteins mittels Western Blot verlief erfolglos. Mangels geeigneter fischspezifischer Antikörper wurden säugerspezifische EGFR-Antikörper verwendet, mit denen in den Lysaten der piscinen Gewebe kein Protein detektiert werden konnte.

5.1.4 Erste Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufklärung der EGF-Rezeptorsequenz aus der Regenbogenforelle und dem Karpfen angestrebt. Unter Verwendung des jeweiligen RNA-Isolates aus Kiemen als Matrize konnten mittels Onestep-RT-PCR spezifische Sequenzen amplifiziert werden. Die dafür benötigten Primer wurden aus den cDNA-Sequenzen des EGF-Rezeptors von *D. rerio* (Zebrafisch) und *X. xiphidium* (Schwertträger) abgeleitet.

5.1.4.1 Der EGFR von *Oncorhynchus mykiss*

Es gelang uns, aus der Forelle zwei ca. 600 bp lange cDNA-Sequenzen zu isolieren. Zwischen beiden besteht in einem kurzen Bereich eine fast 100 % Homologie, die ein Zusammensetzen der Teilsequenzen ermöglichte. Die gewonnene 831 bp umfassende Sequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung zum EGFR des Schwertträgers. Die Proteinsequenz (277 Aminosäurereste)

bestätigt dieses Ergebnis mit einer 76 %igen Homologie zu einem extrazellulär liegenden Abschnitt des Wachstumsrezeptors.

Der Vergleich mit den Sequenzen duplizierter EGF-Rezeptoren verschiedener Knochenfische ergab eine Zuordnung des Proteins aus der Forelle zu den EGFRa-Duplikaten. Die phylogenetische Analyse bestätigte dies noch einmal.

Der Nachweis dieser Teilsequenzen aus Forelle gelang mittels RT-PCR in Gewebe von Kiemen, Haut, Herz, Leber, Darm, Nieren und in der Zelllinien RTG-2. Die Bestätigung der Proteinexpression durch Western Blot-Analysen führte dagegen zu keinem Resultat.

5.1.4.2 Der EGFR von *Cyprinus carpio*

Aus dem Karpfen konnten von uns zwei Abschnitte des EGF-Rezeptors gewonnen werden.

Eine der Sequenzen umfasst 122 Aminosäurereste und ist ebenfalls ein Teilstück der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Übereinstimmung mit der entsprechenden Proteinfole aus *D. rerio* von 68 % und aus *X. xiphidium* von 57 % belegen dies.

Zwischen der zweiten aus den Karpfen-Kiemen isolierten Sequenz und dem Zebraabärbling-EGFR besteht eine Homologie von 96 %. Der hoch konservierte Bereich wird zur cytoplasmatischen Rezeptortyrosinkinasedomäne gezählt.

Auch bei diesen Rezeptorsequenzen ergaben der Vergleich und die phylogenetische Analyse eine engere Verwandtschaft mit den EGFRa-Kopien, die in den Fischen exprimiert werden. Offenbar sind beide Sequenzen aus dem Karpfen Abschnitt des gleichen EGFR-Duplikats.

Der Nachweis des EGFR gelang auch hier mittels RT-PCR in Kiemen, Haut, Herz, Leber, Darm und Nieren. In den Zelllinien des Karpfens EPC und CLC konnte die Expression des Rezeptors nicht gezeigt werden. Die Bestätigung der Proteinexpression durch Western Blot-Analysen führte auch hier zu keinem Resultat.

5.2 Etablierung eines hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors in Zelllinien von *Cyprinus carpio*: Konstruktion der Hybridrezeptor-cDNA

Mit dem Vorhaben, zelluläre Modelle zu etablieren, in denen die Prolactin-abhängige Signalübertragung durch humanes rekombinantes EGF aktiviert werden kann, wurde ein Hybridrezeptor konstruiert. Dieser sollte aus der extrazellulären Domäne des humanen EGF-Rezeptors (hEGFR) und der Transmembran- und intrazellulären Domäne des Prolactinrezeptors von *Cyprinus carpio* (cPrlR) bestehen.

Die stabile Transfektion der Hybridrezeptor-cDNA in die Karpfenzelllinien EPC und CLC, der anschließende Nachweis des Proteins und die Stimulation transfizierter Zellen war die Zielsetzung des Vorhabens. Eine Wirkung von humanem rekombinanten EGF auf die beiden Zelllinien des Karpfens EPC und CLC konnte in vorab durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Ebenso verlief, wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben, der Nachweis der Expression des piscinen EGF-Rezeptors in diesen Zelllinien negativ. Somit scheinen sich die Karpfenzelllinien EPC und CLC für die Etablierung des human-piscinen Hybridrezeptors gut zu eignen.

Als Grundlage diente ein Hybridrezeptor aus der humanen, extrazellulären EGFR-Domäne und der Transmembran- und cytosolischen Domäne des Prl-Rezeptors der Forelle (hEGF-/fPrl-Hybridrezeptor) (Stigge, 2005). Damit war lediglich der Austausch der piscinen Rezeptordomänen erforderlich.

Letztendlich sollte ein Rezeptor vorliegen, der aus der extrazellulären Domäne des humanen EGF-Rezeptors (hEGFR), der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne des Prolactinrezeptors von *Cyprinus carpio* (cPrlR) zusammengesetzt ist.

Die cDNA des als Ansatzpunkt dienenden hEGF-/fPrl-Hybridrezeptors lag in dem Vektor pcDNA3.1(-) vor und wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. G. Stigge zur Verfügung gestellt. Unter Ausnutzung einer EcoRV-Schnittstelle, die exakt im Übergang zwischen extrazellulärer und Transmembrandomäne liegt, sollte der Austausch der fPrlR-cDNA gegen die homologe PrlR-Sequenz des Karpfens erfolgen.

Die Domänentopologie des hEGF-/fPrl-Hybridrezeptors wurde der Dissertation von G. Stigge (2005) entnommen.

5.2.1 Umklonierung des Hybridrezeptorkonstruktes in pGEM-T-Easy

Vor dem Austausch der PrlR-Domänen erfolgte der Einbau der Forellen-spezifischen hEGF-/fPrl-Hybridrezeptor-cDNA in den Klonierungsvektor pGEM-T-Easy.

Dazu wurde die cDNA des Hybridrezeptors in einer Expand Long Template-PCR amplifiziert und zusätzlich am 5'-Ende mit einer NotI-Schnittstelle (unterstrichen) versehen. Die für die PCR benötigten Primer 5' AGGCGGCCGCTTATGCGACCCTCC 3' und 5' CTAGAAGGTGGGCATCGTGG 3' wurden von der Sequenz des Rezeptorkonstruktes, die in der Dissertation von G. Stigge (2005) vorlag, abgeleitet und entsprechend modifiziert. Nach der Amplifikation wurde die veränderte Hybridrezeptor-cDNA in pGEM-T-Easy ligiert (Abb. 34). Die Eigenschaften des Vektors erlaubten eine Selektion der rekombinanten Plasmide und eine Konzentrierung der cDNA durch hohe Replikationsraten in Bakterien.

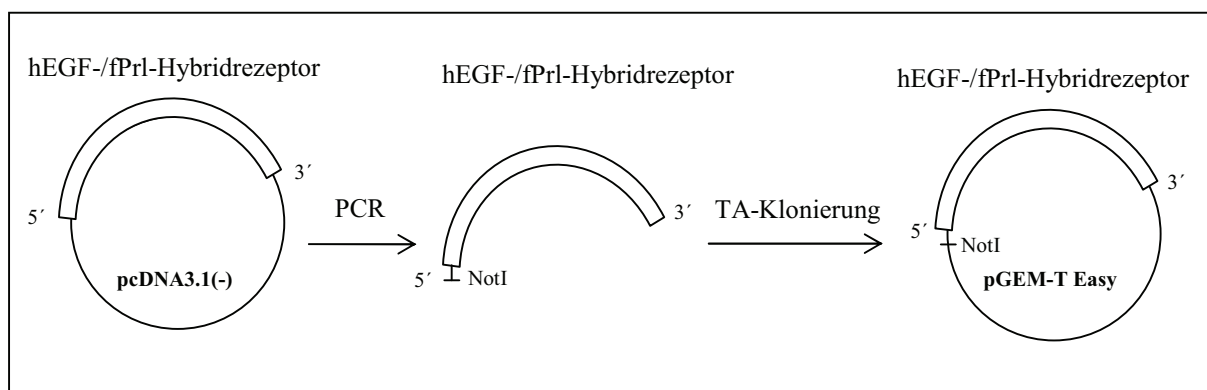


Abbildung 34: Umklonierung des Hybridrezeptorkonstruktes. Schematische Darstellung. Erläuterungen im Text.

5.2.2 Gewinnung der Transmembran- und intrazellulären Domäne des Prolactinrezeptors von *Cyprinus carpio*

5.2.2.1 Gewebespezifische Expression des Prolactinrezeptors

Bevor die für die Konstruktion des Hybridrezeptors benötigte PrlR- cDNA gewonnen werden konnte, erfolgte die Suche nach einem, den Prolactinrezeptor exprimierenden Gewebe.

Für den Nachweis mittels RT-PCR wurden RNA-Isolate aus Kiemen, Niere, Darm, Haut und Herz des Karpfens gewonnen.

Das benötigte Primerpaar 5' CAAGCAGCAGGTGTCAGTGC 3' und 5' GTAGACTGAACACATTGTAGTACT 3' wurde aus der von San Martin et al. (2004) veröffentlichten Sequenz des Karpfen- PrlR abgeleitet.

In jedem der untersuchten Gewebetypen konnte ein 525 bp großes cPrlR-spezifisches PCR-Produkt detektiert werden (Abb. 35). Die Qualität der mRNA wurde durch ein 300 bp langes β -Actin-Fragment bestätigt, welches mit Hilfe eines, von der entsprechenden cDNA des Karpfens generierten, Primerpaares amplifiziert wurde.

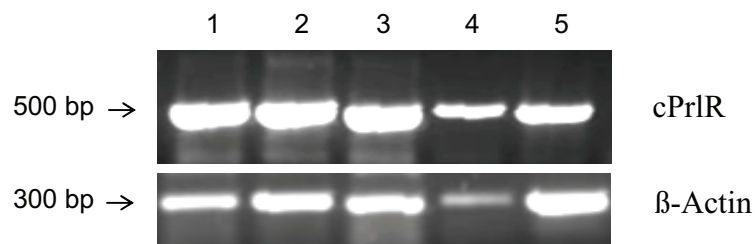


Abbildung 35: RT-PCR-Nachweis des Prolactinrezeptors in verschiedenen Karpfenorganen. Amplifikation eines spezifischen 525 bp- Fragmentes. Gelelektrophoretische Auftrennung (1) Kiemen; (2) Niere; (3) Darm; (4) Haut; (5) Herz

Aufgrund des Rezeptornachweises in jedem getestetem Organ wurde für die nachfolgende Isolation der für die transmembranen und cytosolischen Domäne codierenden cDNA willkürlich RNA aus den Kiemen des Karpfens eingesetzt.

5.2.2.2 Amplifikation der cDNA der transmembranen und intrazellulären Domäne

Anhand von Literaturrecherchen erfolgte die Identifizierung der Domänen des Prolactinrezeptors des Karpfens (San Martin et al., 2004) (Abb. 36). Mit diesen Angaben konnten die Sequenzbereiche für die Ableitung der PCR-Primer, die für die Synthese der cDNA des Karpfens benötigt wurden, bestimmt werden.

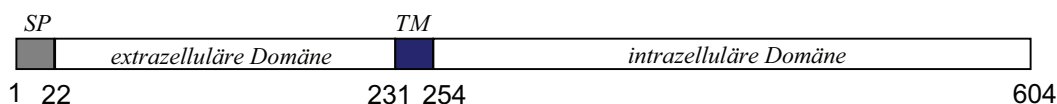


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Domänentopologie des Karpfen- Prolactinrezeptors. Erstellt nach San Martin et al., 2004. Der Rezeptor setzt sich aus 604 Aminosäureresten zusammen. Davon bilden 22 das Signalpeptid (SP) und 24 die Transmembrandomäne (TM).

Im Bereich der Aminosäureposition 231, das entspricht dem N-terminalen Ende der Transmembranregion des cPrlR, wurde aus der dazu gehörigen cDNA der Sense-Primer abgeleitet. Der für Amplifikation mittels PCR nötige Antisense-Primer ergab sich aus dem 3'-Ende der cDNA-Sequenz des Rezeptors. Das PCR-Produkt umfasst damit die kodierende Sequenz für die Transmembran- und die cytoplasmatische Region des Karpfen- PrlR.

Durch gerichtete Veränderung des Sense-Primers wurde das Amplifikat 5'-seitig zusätzlich mit einer EcoRV-Erkennungssequenz versehen, was die Fusion mit dem, für die extrazelluläre Domäne kodierenden cDNA-Fragment ermöglichen sollte. An den Antisense-Primer wurde die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI angefügt, um die spätere Klonierung in Expressionsvektoren zu erleichtern. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Sequenzen der Primer für die Synthese des cPrl-Rezeptor- Abschnittes. Die eingefügten Schnittstellen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
PrlR_Kar_EcoRVf	CAACTGATATCCTGTGGATCATAATCACGATATTC
PrlR_Kar_XhoI	TAGGACTCGAGCTAGTAGGATGGCATTAAAGACTG

Mit diesem Primerpaar wurde in einer Onestep-RT-PCR aus RNA die für die Transmembran- und intrazellulären Domäne kodierende cDNA gewonnen. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den pGEM-T-Easy Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

Im Vergleich zu der von San Martin et al. (2004) publizierten Sequenz wurden 3 Basensubstitutionen festgestellt, die zum Austausch von Aminosäuren führten (Abb. 37). Die Substitutionen befinden sich in der intrazellulären Domäne und sind in den nachfolgenden Sequenzausschnitten hervorgehoben dargestellt.

421	agccagcatgga	AAA	acgagctgggcttctactgaaagcagtg	aatgccaggg	tctcgaa	480
141	S Q H G	K	T S W A S T E S S E C Q G L E			160

661	caggacatcccacaacaggagggccgccacgg	taaaccagcc	TGG	cgacattcccaaagc	720
221	Q D I P Q Q E G R H G K P A	W	R H S Q S		240

901	gtcaaagaagtaacatcaacaatattctgcttctg	cgaggatacgtcccat	TAC	tgt	960
301	V K E V T S N N I L L L R R D T S H	Y	C		320

Abbildung 37: Sequenzausschnitte des isolierten Prl-Rezeptorabschnittes aus dem Karpfen. Durch Basensubstitutionen veränderte Tripletcodes sind in roten Großbuchstaben dargestellt. Resultierende Aminosäuresubstitutionen sind als fettgedruckte Großbuchstaben abgebildet.

Bei einer Gesamtlänge des Prolactinrezeptorabschnittes von 372 Aminosäuren befindet sich eine Substitution vom N-Terminus aus betrachtet in Position 145. Verursacht durch die Veränderung des Tripletcodes erfolgte der Austausch des Glutamatrestes (E) gegen einen Lysinrest (K). An Position 235 wurde Cystein (C) durch Tryptophan (W) ausgetauscht. Ein Tyrosinrest (Y) befindet sich anstelle von Histidin (H) an Position 319. Alle Veränderungen sind in keinen, der bisher als funktionell bedeutsam eingestuft, Sequenzmotiven lokalisiert.

5.2.3 Rekombination der Genabschnitte zur Synthese des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors

Aus der modifizierten hEGF-/fPrl-Rezeptor-cDNA, die nun in dem Vektor pGEM-T-Easy kloniert vorliegt, wurde durch Endonukleasespaltung mit EcoRV und XhoI das fPrlR-Fragment herausgetrennt. Die für den transmembranen und cytosolischen Teil des Prl-Rezeptors kodierende cDNA aus dem Karpfen wurde mit den gleichen Enzymen behandelt, um kompatible Enden zu erhalten. Nach der Fusion der Fragmente unter Verwendung der T4-DNA-Ligase lag die neu zusammengesetzte Hybridrezeptor-cDNA vor. Sie kodiert nun für die extrazelluläre Domäne des humanen EGF-Rezeptors (hEGFR), die Transmembran- und intrazelluläre Domäne des Prolactinrezeptors des Karpfens (cPrlR).

Das entstandene Konstrukt lag zunächst im Klonierungsvektor pGEM-T-Easy vor und wurde in *E. coli* amplifiziert.

Der vorliegende Vektor wurde erneut mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI gehandelt und die Hybridrezeptor-cDNA herausgetrennt. Nachfolgend wurde sie in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-) kloniert. Weitere Klonierungen erfolgten in den Vektor pcDNA6/V5-His A.

Die Abbildung 38 zeigt eine schematische Darstellung der erfolgten Arbeitsschritte.

Zur Überprüfung erfolgte eine abschnittsweise Sequenzierung der cDNA. Die vollständige Sequenz des konstruierten hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors ist im Anhang aufgeführt.

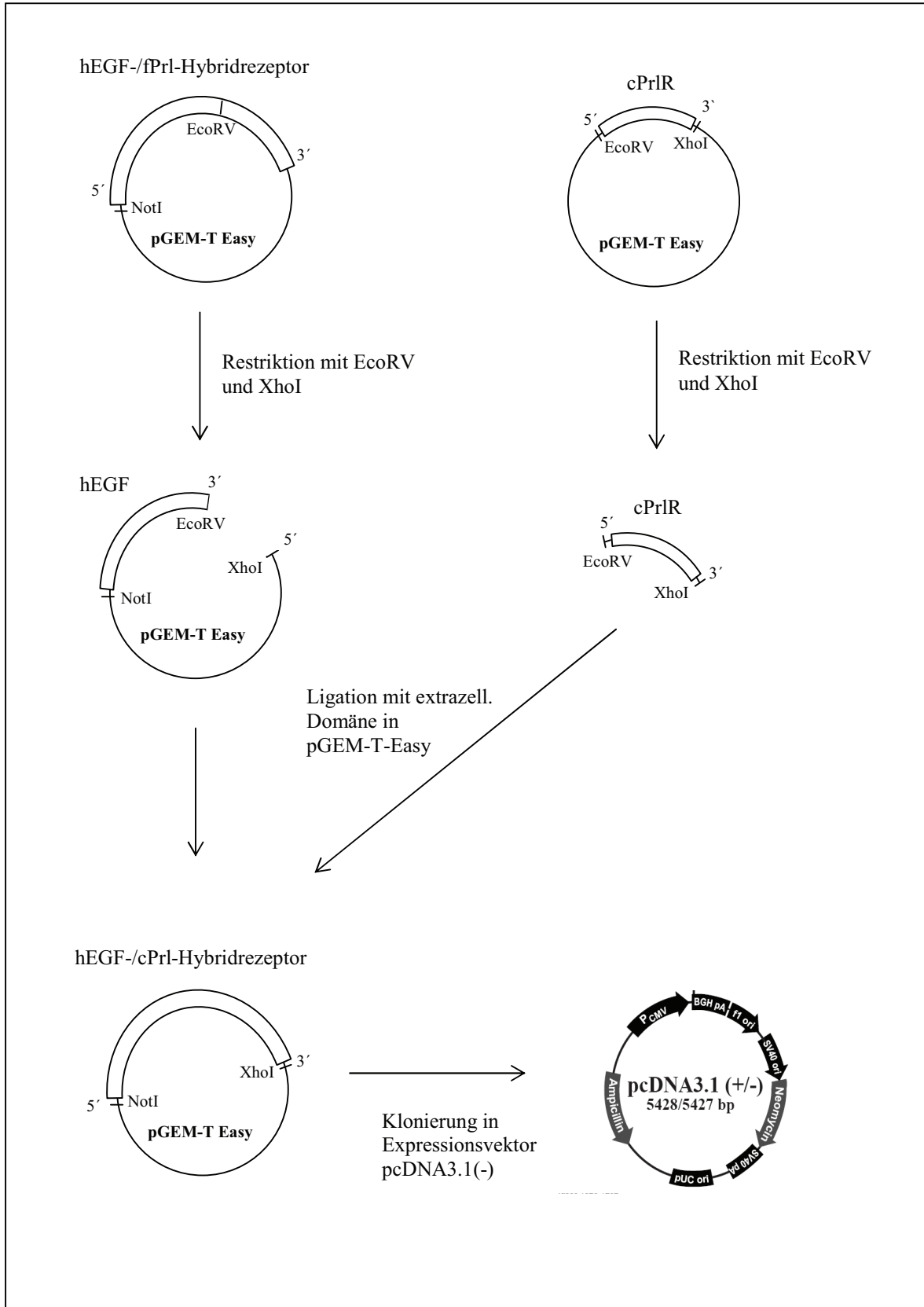


Abbildung 38: Konstruktion des hEGF-/cPrl-Hybridreceptors. Schematische Darstellung. Erläuterungen im Text.

5.2.3.1 Identifizierung der Domänen des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors

Zunächst erfolgte die Translation der Hybridrezeptor-cDNA mit Hilfe eines, unter der Internetadresse <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> zugänglichen Programms in die entsprechende Aminosäuresequenz. Mit Hilfe von Berechnungen anhand des Tied-Mixture-Hidden-Markov-Modells (TMHMM, Krogh et al., 2001) konnte die Topologie des Proteins vorausgesagt werden. Für jede Aminosäure wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, Teil der Transmembrandomäne zu sein. Die Analyse erfolgte durch das Computerprogramm TMHMM-2.0, welches im Internet unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> zugänglich ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 39 dargestellt.

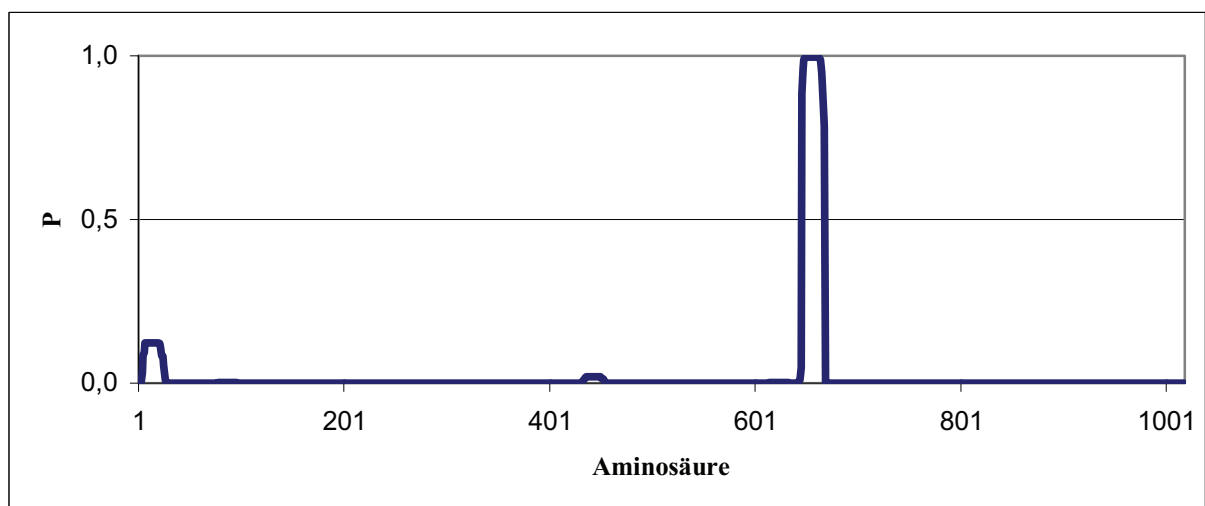


Abbildung 39: Berechnung der Transmembrandomäne des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors mit dem Programm TMHMM-2.0. Auf der Abszisse sind die Aminosäurereste aufgetragen. P gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der jede der 1018 Aminosäuren der Transmembrandomäne zugeordnet werden kann.

Der hEGF-/cPrl-Hybridrezeptor besteht aus 1018 Aminosäuren, von denen 23 in den Positionen 646 bis 668 die Transmembrandomäne bilden. San Martin et al. (2004) geben die Länge der entsprechenden Domäne des Wildtyp-Prolactinrezeptors mit 24 Aminosäuren an. Ein C-terminaler Argininrest (R, Position 231) der extrazellulären Domäne wurde dabei der Transmembrandomäne zugeordnet. Die Anwendung des TMHM-Modells, welches nach Moller et al. (2001) die sicherste Vorhersage transmembraner Bereiche liefert, widerlegt jedoch diese Annahme (siehe Tabelle 9a, Prl-Rezeptor *C. carpio*).

Tabelle 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen und Domänenzugehörigkeit im Übergang zwischen extrazellulärer und transmembraner Domäne des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors, des Prl-Rezeptors von *C. carpio* und des hEGF-Rezeptors. Aufgezeigt sind die, auf Grundlage des TMHM-Modells berechneten Wahrscheinlichkeiten P für jede Aminosäure Teil der extrazellulären und transmembranen Domäne zu sein. Die jeweils höchsten Wahrscheinlichkeiten sind dunkel unterlegt worden. Veränderungen in der Aminosäuresequenz sind fett hervorgehoben.

a) Vergleich zwischen hEGF/cPrl-Hybridrezeptor und Prl-Rezeptor von *C. carpio*

hEGF/cPrl-Rezeptor				Prl-Rezeptor <i>C. carpio</i>			
Pos.	AS	transm.	extrazell.	Pos.	AS	transm.	extrazell.
642	K	0,00029	0,82141	228	P	0.00031	0.92477
643	I	0,00345	0,81846	229	R	0.00080	0.92432
644	P	0,01070	0,81153	230	Q	0.01585	0.91227
645	D	0,04702	0,77727	231	R	0.06068	0.87070
646	I	0,88501	0,10337	232	S	0.87706	0.10466
647	L	0,96216	0,03664	233	L	0.98797	0.00842
648	W	0,98819	0,01161	234	W	0.99468	0.00384
649	I	0,99534	0,00464	235	I	0.99877	0.00065

b) Vergleich zwischen hEGF/cPrl-Hybridrezeptor und hEGF-Rezeptor

hEGF/cPrl-Rezeptor				hEGF-Rezeptor			
Pos.	AS	transm.	extrazell.	Pos.	AS	transm.	extrazell.
642	K	0,00029	0,82141	642	K	0.00025	0.9988
643	I	0,00345	0,81846	643	I	0.01347	0.98565
644	P	0,01070	0,81153	644	P	0.02836	0.97078
645	D	0,04702	0,77727	645	S	0.31783	0.68158
646	I	0,88501	0,10337	646	I	0.83489	0.16487
647	L	0,96216	0,03664	647	A	0.88680	0.11301
648	W	0,98819	0,01161	648	T	0.92422	0.07563
649	I	0,99534	0,00464	649	G	0.96070	0.03921

Aus den Tabellen 9a und 9b wird weiterhin ersichtlich, dass aufgrund von konstruktionsbedingten cDNA-Sequenzmodifikationen 2 Aminosäuresubstitutionen erfolgten. Im Bereich des Überganges zwischen extrazellulärer und Transmembrandomäne kam es an Position 645 zum Austausch von Serin (S) durch Aspartat (D), die bereits im Rezeptorhybrid aus dem humanen EGF-Rezeptor und dem Prolactinrezeptor der Regenbogenforelle nachgewiesen worden war (Stigge, 2005). Weiterhin wurde die N-terminale Aminosäure der Transmembrandomäne Serin (S) gegen Isoleucin (I) an Position 646 ersetzt.

5.2.4 Transfektion der Karpfenzelllinien EPC und CLC mit der Hybridrezeptor-cDNA

Für die Entwicklung eines Modellsystems zur Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen in Fischzellen musste der hEGF/cPrl-Hybridrezeptor zunächst in die Zellen transfiziert werden.

Lopez et al. (2001) verglichen mehrere Methoden zum Einbringen von Fremd-DNA in die Karpfenzelllinie EPC und erhielten die höchste Effizienz mit nahezu 37 % bei Anwendung des Transfektionsreagens Fugene der Firma Roche. Begründet auf diese Studie, wurde auch in den hier beschriebenen Versuchen Fugene eingesetzt. Für die Transfektionsexperimente standen neben EPC auch Zellen der Linie CLC zur Verfügung. Beide Permanentzelllinien von *Cyprinus carpio* wachsen faktorunabhängig. Daher war die Selektion von Klonen, die den Hybridrezeptor exprimierten, mit humanem rekombinanten EGF nicht gegeben. Die transfizierten Zellen wurden, wie unter 4.2.1.4 beschrieben, in entsprechenden Selektionsmedien kultiviert. Resistente Klone konnten bei EPC und auch bei CLC beobachtet werden.

5.2.4.1 Nachweis der mRNA des Hybridrezeptors in transfizierten Zellen

Die Detektion des Hybridrezeptortranskriptes erfolgte mittels Onestep-RT-PCR. Zunächst wurde die RNA aus den entsprechenden Zellklonen isoliert und ein für den hEGF-Rezeptor spezifisches 780 bp großes Fragment amplifiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse durch die Detektion der eingesetzten und im Zellkulturmedium noch vorhandenen Plasmide wurden die Analysen erst nach mehrfachem Passagieren der selektierten Zellklone durchgeführt.

Die Qualität der mRNA wurde durch die Amplifikation eines 700 bp langen β -Actin-Fragmentes bestätigt. Die Primer wurden anhand der entsprechenden cDNA des Karpfens generiert (Abb. 40).

Das Transkript des hEGF/cPrl-Rezeptorhybrides konnte sowohl in EPC als auch in CLC nachgewiesen werden (Abb. 40). Die Detektion des Konstruktes in selektierten und passagierten Zellen belegt, dass die Rezeptor-cDNA stabil in die Fischzelllinien transfiziert werden konnte (Abb. 40).

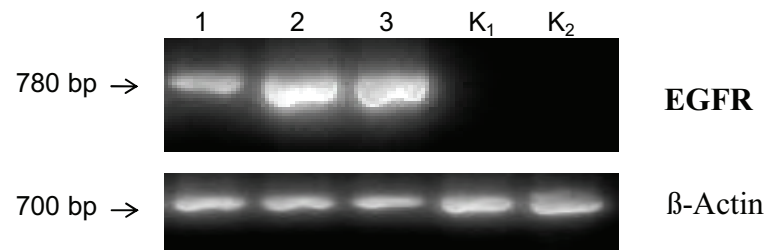


Abbildung 40: RT-PCR-Nachweis der Transfektion des hEGF-/cPrI-Hybridrezeptors. Amplifikation eines 780 bp- Fragmentes der extrazellulären Domäne. Gelelektrophoretische Auftrennung (1) EPC-hEGF/cPrIR, Passage 2; (2) CLC-hEGF/cPrIR, Passage 9; (3) CLC-hEGF/cPrIR, Passage 3; (K₁) EPC; (K₂) CLC

5.2.4.2 Nachweis und Lokalisierung des Hybridrezeptorproteins

Für die Funktionalität des hEGF/cPrI-Hybridrezeptors ist der korrekte Einbau in die Zellmembran erforderlich. Um die Lokalisierung in den Zellen zu analysieren, wurden diese 48 h nach der Transfektion fixiert. Die anschließende Immunfärbung erfolgte mit einem gegen die extrazelluläre hEGFR-Domäne gerichteten Antikörpers. Die Dokumentation der markierten Zellen fand mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop statt.

Nach Fixierung mit Paraformaldehyd und nachfolgender Immunfärbung konnte der Hybridrezeptor weder auf der Oberfläche von transfizierten EPC-Zellen noch auf der von CLC-Zellen nachgewiesen werden.

Eine Detektion des Proteins war erst nach Methanol-Aceton-Fixierung der Zellen möglich. Durch die, bei dieser Fixierung erfolgten, Permeabilisierung der Zellmembran konnte der anti-EGFR-Antikörper in die Zellen eindringen und an den Rezeptor binden. In transfizierten EPC wurde der Rezeptor im Zellkern (Abb. 41A) und in den transfizierten CLC im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 41B).

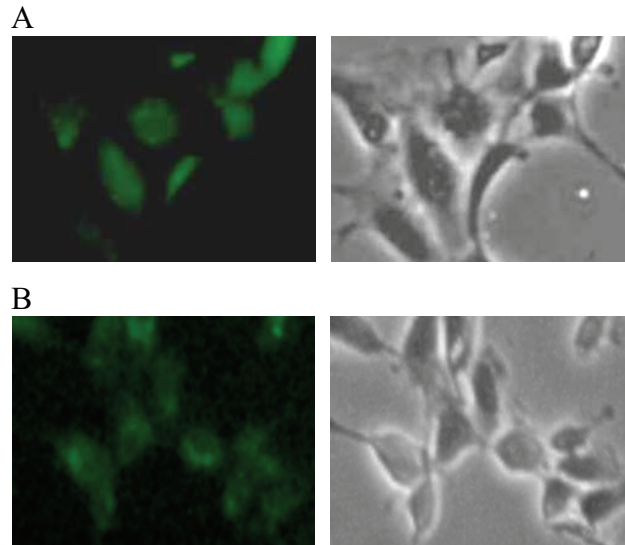


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung des hEGF/cPrl-Hybridrezeptors. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert. Die Immunfärbung erfolgte mit anti-EGFR-Antikörper. **(A)** EPC-hEGF/cPrlR, links: Fluoreszenz; rechts: Durchlicht. **(B)** CLC-hEGF/cPrlR, links: Fluoreszenz; rechts: Durchlicht.

Western Blot-Analysen bestätigten die Expression des Hybridrezeptors in transfizierten CLC-Zellen (Abb. 42). Infolge des Mangels fischspezifischer anti-PrlR-Antikörper wurde ebenfalls ein gegen die Domäne des humanen EGF-Rezeptors gerichteter Antikörper verwendet. Mit ca. 110 kDa entsprach das Molekulargewicht des detektierten Proteins dem erwarteten Wert.

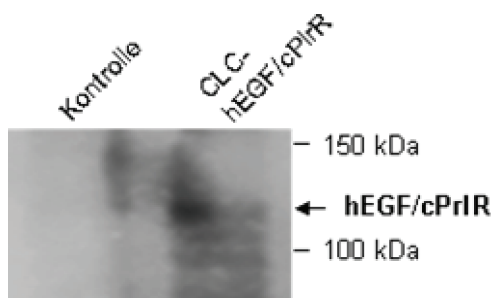


Abbildung 42: Western Blot zum Nachweis des hEGF/cPRL-Hybridrezeptors. Von transfizierten CLC in Passage 4 wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Als Primärantikörper wurde anti-EGFR (Ab-5) verwendet. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte CLC.

Der Nachweis des Hybridrezeptors mittels Western Blot in EPC verlief negativ. Eine Erklärung für dieses Ergebnis wäre eine zu geringe Proteinkonzentration verbunden mit einer geringen Sensitivität der Analyseverfahren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine stabile Transfektion der eingesetzten Zelllinien von *Cyprinus carpio* mit dem hEGF-/cPrl-Hybridrezeptor stattfand. Der Nachweis des Proteins verlief ebenfalls erfolgreich. Dagegen war eine Lokalisierung des Rezeptors auf

der Zelloberfläche nicht möglich. Eine Ursache dafür könnte das Signalpeptid des humanen EGF-Rezeptors sein, welches in den Fischzellen nicht also solches erkannt wurde.

Weiterführende Analysen von, durch den Hybridrezeptor, induzierten Signalkaskaden fanden aus diesem Grund nicht statt.

5.3 Nachweis von Signaltransduktionswegen in den Karpfenzelllinien EPC und CLC

Durch Cytokin-Stimulation werden in Zellen Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt. Die Komponenten dieser werden in vielen Zellen konstitutiv exprimiert (Davis, 1993; Bromberg et al., 2001).

Wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben, werden durch Prolactin der Ras- Raf- MAP-Kinase- und auch der JAK- STAT- Weg induziert. Um dieses in den Karpfenzelllinien zu untersuchen, ist zunächst der Nachweis spezifischer Proteine in den parentalen Fischzellen erforderlich. Deshalb sollten erstmals nicht-stimulierte EPC- und CLC-Zellen mit geeigneten Antikörpern analysiert werden.

5.3.1 Expression von MAP-Kinasen

Zelllysate von EPC- und CLC-Zellen wurden mit einem säuger-spezifischen Antikörpergemisch gegen p44/42 MAP-Kinasen analysiert. In einem Western Blot konnten in beiden Lysaten 3 Proteine detektiert werden (Abb.43).

Der Vergleich mit der humanen Zelllinie A431 zeigt, dass zwei das gleiche Molekulargewicht von 42 bzw. 44 kDa aufweisen wie die orthologen Säugerproteine. Dabei handelt es sich offensichtlich um ERK1 und ERK2, deren mRNA von Hashimoto et al. bereits 1998 aus Ovarienzellen des Karpfens isoliert wurde. Ein zusätzliches drittes Protein mit einem höheren Gewicht konnte nur in den Fischzellen detektiert werden.

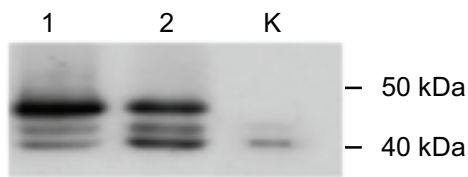


Abbildung 43: Western Blot zum Nachweis von MAP-Kinasen. Von EPC- und CLC- Zellen wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Als Primärantikörper wurde anti-p44/42 MAP-Kinase verwendet. (1) EPC, (2) CLC, (K) A431.

5.3.2 Expression von STAT1 und STAT3

Wie zuvor wurde auch zum Nachweis der Expression von STAT1 und STAT3 Zelllysate beider Karpfenzelllinien verwendet. Das Lysat der humanen A431-Zelllinie diente erneut als Vergleich.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zeigen erstmals die Expression von STAT1 (Abb. 44A) und STAT3 (Abb. 44B) in EPC- und CLC-Zellen. Mit mehr als 85 kDa besitzen die piscinen Proteine ein höheres Molekulargewicht als die entsprechenden Säugerhomologa.

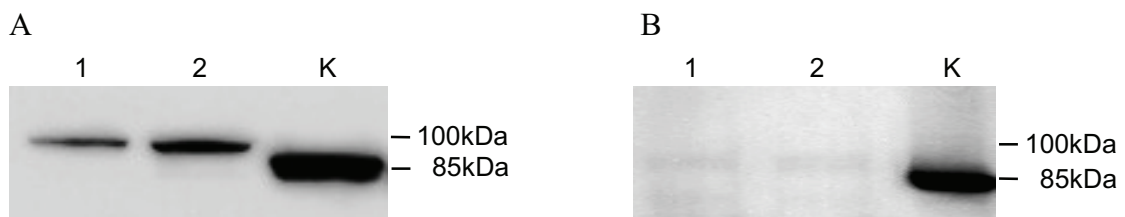


Abbildung 44: Western Blot zum Nachweis von STAT-Faktoren. Von EPC- und CLC-Zellen wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Als Primärantikörper wurden (A) anti-STAT1 (M-22) und (B) anti-STAT3 (H-190) verwendet. (1) EPC, (2) CLC, (K) A431.

Zusammenfassend betrachtet, konnten in den nicht-transfizierten EPC- und CLC-Zellen Komponenten der beiden wichtigsten Signalwege nachgewiesen werden. Neben den beiden ERK1 und ERK2 orthologen Proteinen wurde im Karpfen erstmals eine weitere MAP-Kinase mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa detektiert. Ebenso wurde von uns die Expression von STAT1 und STAT3 zum ersten Mal in Karpfenzellen gezeigt. Beide besitzen ein höheres Molekulargewicht als die entsprechenden Proteine der Säuger. Die Ergebnisse können für weitere Untersuchungen zur Aktivierung der Signalwege durch den hEGF-/cPrl-Hybridrezeptor in transfizierten EPC- und CLC-Zellen genutzt werden.

6 Diskussion

Cytokinrezeptoren spielen für die funktionelle Integrität eines vielzelligen Organismus eine entscheidende Rolle, in dem sie extrazelluläre Moleküle binden, Signaltransduktionswege aktivieren und eine Zahl von Reaktionen in den Zellen auslösen. Eine Schlüsselfunktion kommt dabei den Rezeptortyrosinkinasen zu, die verschiedene Zellreaktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern. Die zu den membranständigen Tyrosinkinasen zählenden Mitglieder der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Familie wurden in den letzten Jahren aufgrund ihrer Beteiligung an hyperproliferativen Zellprozessen in Säugern intensiv untersucht. Durch EGF ausgelöste Signalkaskaden in den Zellen wurden in diesem Zusammenhang ebenfalls eingehend analysiert. Vergleichbare Kenntnisse für Fische sind dagegen gering. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war aus diesem Grund die Charakterisierung EGFR-homologer Rezeptoren aus der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* und dem Karpfen *Cyprinus carpio*.

6.1 Der EGF-Rezeptor von *Oncorhynchus mykiss*

Verschiedene Fischarten wie Zebraquappe (*Danio rerio*), Schwerträger (*Xiphophorus xiphidium*) und Medaka (*Oryzias latipes*) werden aufgrund ihrer Biologie bereits seit langem als Modellorganismen bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen, sowie zur Erzeugung von Mutanten und transgenen Linien (Walter et al., 2001; Shima et al., 2004; Langenau et al., 2005) eingesetzt. Der im Salzwasser lebende Kugelfisch *Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis*, ein im Süßwasser vorkommender Kugelfisch, werden bevorzugt bei Genomstudien verwendet. Mit etwa der gleichen Anzahl an Genen beträgt ihre Genomgröße nur ein Zehntel des Menschen (Venkatesh et al., 2000; Jaillon et al., 2004; Froschauer et al., 2006). Salmoniden, wie *O. mykiss* (Regenbogenforelle) und *Salmon salar* (Atlantischer Lachs) waren dagegen kaum Gegenstand molekularbiologischer Untersuchungen.

So sollte im Verlauf der vorliegenden Arbeit erstmals die vollständige Sequenz des *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptors aus der Regenbogenforelle isoliert werden. Erste Hinweise auf das Vorkommen des Rezeptors in *O. mykiss* lieferten Untersuchungen von Newsted et al. (1991, 2000). Sie konnten, wie bereits im Abschnitt 2.1.3.1 beschrieben, die spezifische Bindung von murinem EGF an einen Rezeptor in den Leberzellmembran der Forelle und die

daraus resultierende Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase zeigen. Dieser Wachstumsfaktor interagiert nur mit Rezeptoren der EGFR-Familie (u. a. Jones et al., 1999; Harris et al., 2003; Stein et al., 2006). Das stützt die Indizien, dass in der Forelle ein EGF-Rezeptor gebildet wird.

Zunächst konnten durch BLAST-Analysen von uns insgesamt vier, der in der Genbank des NCBI hinterlegten ESTs aus der Forelle dem Rezeptor zugeordnet werden (siehe Kap. 5.1.1). Eine der kurzen Sequenzen wurde für die Auswahl geeigneten Gewebes, in dem die Expression des Rezeptors am wahrscheinlichsten ist, verwendet. Die Vervielfältigung dieses spezifischen Fragments zeigte die Bildung des EGF-Rezeptors in einer Reihe von Organen einschließlich der Kiemen. Die Verteilung des Rezeptors scheint ähnlich wie beim Zebraquärling und Schwertträger zu sein. Auch in diesen Fischen konnte in nahezu allen Organen die Rezeptorexpression demonstriert werden (Wang et al., 2004; Gomez et al., 2004).

Das Kiemengewebe der Forelle wurde daraufhin in der vorliegenden Arbeit für die Klonierung der cDNA des EGF-Rezeptors verwendet. Die vollständige EGFR-cDNA mit Hilfe der ESTs zu erhalten, stellte sich jedoch als problematisch dar.

So konnte von uns nur durch die Ableitung von PCR-Primern aus den bekannten EGFR-Sequenzen des Zebraquärlings und des Schwertträgers ein insgesamt 831 bp langes spezifisches cDNA-Stück aus der RNA der *O. mykiss* synthetisiert werden. Dieses zeigt die größte Homologie zu einem EGFR-Sequenzabschnitt, der einen Teil der extrazellulären Domäne codiert. Die hohe Homologie des cDNA-Transkripts der Forellen von bis zu 76 % mit piscinen EGFR-Proteinsequenzen verdeutlicht nochmals, dass es sich um ein EGF-Rezeptorteilstück aus *O. mykiss* handelt (siehe Tab. 4). Mit dem humanen EGFR stimmt es nur zu 59 % überein. Aber genauso hoch ist die Homologie zwischen dem piscinen EGFR des Zebraquärlings und Mensch (Goishi et al., 2003).

Die Sequenz wurde als EGFR-Abschnitt von *O. mykiss* in der NCBI-Genbank unter der Accession Nummer (AC-Nummer) FM865854 hinterlegt.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz aus der Forelle mit bekannten Sequenzen bestätigt das Ergebnis, dass dieser Bereich einen Teil der extrazellulären EGFR-Domäne umfasst.

Die Struktur dieser Domäne ist kennzeichnend für jede Rezeptortyrosinkinasefamilie (Robinson et al., 2000), zu denen auch die EGF-Rezeptoren gehören (siehe Abb. 1). Zwei homologe Cystein-reiche Regionen markieren u. a. deren extrazelluläre Domäne. Charakteristisch für diese Subdomänen sind 20 bis 25 Cysteinreste, deren Anzahl und

Positionen innerhalb der EGF-Rezeptoren konserviert sind (Bajaj et al., 1987; Abe et al., 1998). Die Cystein-reichen Regionen wurden bisher sowohl bei Rezeptoren von Vertebraten als auch von Invertebraten beschrieben (Yarden et al., 1988b; Gomez et al., 2004; Livneh et al., 1985; Aroian et al., 1990). Sie sind entscheidend für die Ausbildung von Disulfidbindungen im Molekül. Flankiert werden die Cystein-reichen Abschnitte von den Subdomänen L1 und L2, die eine Rolle bei der Ligandbindung und Rezeptordimerisierung spielen (Lemmon et al., 1997).

Das Forellen-Protein umfasst das Ende der Subdomäne L1, die gesamte Cystein-reiche Domäne S1 und die ersten 24 Aminosäuren von L2 (siehe Abb. 21). Die Subdomäne S1 des EGFR aus *O. mykiss* besteht, wie im humanen Rezeptor, aus 143 Aminosäuren, von denen 22 Cysteine sind (Abe et al., 1998). Gomez et al. (2004) demonstrierte in einem Sequenz-Alignment diese Merkmale auch in EGF-Rezeptoren zweier Knochenfische, *X. xiphidium* und *D. rerio*. Ausgehend von der großen Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen ist anzunehmen, dass die von Abe et al. (1998) identifizierten 11 Disulfidbindungen innerhalb der ersten Cystein-reichen Domäne auch bei Fischen vorkommen. In den S1-flankierenden Sequenzen L1 und L2 treten im humanen Rezeptor jeweils 4 konservierte Cysteinreste auf (Abe et al., 1998). In Folge der unvollständigen Sequenz können für den Forelle- EGFR in diesen Domänen nur je 2 Cysteine registriert werden. Das schließt nicht aus, dass in der kompletten Rezeptorsequenz von *O. mykiss* die gleichen konservierten Bereiche auftreten wie in den bereits bekannten Sequenzen. Die Ergebnisse deuten an, dass der EGF-Rezeptor auch innerhalb der Fische weit verbreitet und hoch konserviert ist.

Die EGFR-Familie besteht, wie im Abschnitt 2.1.1 bereits erläutert, in Vertebraten aus vier Rezeptoren mit den gleichen strukturellen Merkmalen. Die Unterschiede zwischen ihnen bestehen in der cDNA- und demzufolge auch in der Aminosäuresequenz. Die daraus resultierenden funktionellen Differenzen zeigen sich beispielsweise in der fehlenden katalytischen Aktivität eines Rezeptors (ErbB3) (Schlessinger, 2000). Auch innerhalb der Cystein-reichen Regionen gibt es Sequenzunterschiede. Derartige Untersuchungen wurden bisher hauptsächlich an den humanen Rezeptoren durchgeführt. Aufgrund der hohen Konservierung der EGFR-Familie sind diese Daten prinzipiell auch auf die Rezeptoren der Fische übertragbar. Die humanen EGF-Rezeptoren zeigen untereinander eine Homologie von ca. 50 % (Bogdan et al., 2001). Das Gleiche ergab ein von uns durchgeführter Vergleich der Aminosäuresequenzen von EGFR, ErbB2, 3 und 4 aus *Danio rerio*.

Aus den genannten Gründen kann trotz der teilweise hohen Konservierung das von uns generierte Transkript aus der Forelle eindeutig dem ErbB1-orthologen Rezeptor zugeordnet werden. Mit ErbB2-, 3- und 4- Rezeptoren weist das Protein eine weitaus geringere Ähnlichkeit (40 – 50 %) auf.

In der Literatur wird ErbB1 auch als der EGF-Rezeptor bezeichnet. Nachfolgend soll er ebenfalls so bezeichnet werden.

6.1.1 Die Phylogenie der *egfr* Gene

Wie mehrfach erwähnt, wurden in Säugern bisher die vier Mitglieder der EGFR-Familie EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 und ErbB4 beschrieben (Bogdan et al., 2001). Nur ein Rezeptor konnte in Invertebraten identifiziert werden. In *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) ist das der EGFR-orthologe Rezeptor DER (Livneh et al., 1985) und in *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) Let23 (Aroian et al., 1990). Die konservierten strukturellen Merkmale deuten auf einen gemeinsamen Ursprung hin. Viele Autoren gehen davon aus, dass Genomduplikationen während der Evolution der Vertebraten bei der Entstehung der vier *erbB* Gene eine Rolle spielten (u. a. Spring et al., 1997; Stein et al., 2000, Abbasi et al., 2007). Duplikationsereignisse werden als Ursache für die Erhöhung der biologischen Diversität diskutiert (Ohno, 1970; Spring, 1997). Der langfristige Erhalt von etwa 20- 50 % der entstandenen duplizierten Gene wird gewährleistet durch Mutationen, die zur Entstehung neuer Genfunktionen (Neofunktionalisierung) führen, oder durch die Übernahme bereits vorhandenen Funktionen (Subfunktionalisierung) (Force et al., 1999; Van de Peer et al., 2001). Letzteres scheint sich bei der evolutionären Entwicklung der EGFR-Familie ereignet zu haben.

Die Genomduplikationen werden auch im direkten Zusammenhang mit der rasanten Radiation der Teleostee auf fast 24.000 Arten, von denen über 99 % rezent sind, gesehen (Venkatesh, 2003; Crow et al., 2006).

Die durch Ohno (1970) aufgestellte 2R (2 Runden)-Hypothese, die von zwei zusammenhängenden Genomduplikationen ausgeht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Möglichkeiten lokaler Genduplikationen (Martin et al., 2001) sowie zweier unabhängiger Verdopplungen des Gesamtgenoms (Dehal et al., 2005) in der früher Vertebratenevolution werden ebenso in Betracht gezogen. Neuere Untersuchungen weisen ebenfalls darauf hin,

dass rezente Vertebratengenome in der Vergangenheit zwei vollständige Duplikationen durchliefen (Meyer et al., 2005; Roth et al., 2007) und daher als degenerierte polyploide Genome anzusehen sind.

Die ersten Hinweise für die Richtigkeit der 2R-Hypothese von Ohno (1970), die auch als „1-2-4“- Regel bezeichnet wird, lieferten Untersuchungen des *Hox*-Genclusters, das die Segmentausbildung während der Embryonalentwicklung steuert.

Wie bei den *erbB* Genen, kommt in Invertebraten wie *D. melanogaster* nur ein Cluster vor. In Vertebraten sind dagegen vier Cluster vorhanden (Meyer et al., 1999; Jaillon et al., 2004). Innerhalb der letzten Jahre brachten weitere Analysen von *Hox*-Gengruppen in piscinen Genomen Indizien für ein drittes, fischspezifisches Duplikationsereignis (3R) hervor. Dieses fand während der Trennung von Knorpel- und Knochenfischen vor ca. 300 bis 400 Mio. Jahren statt (Taylor et al., 2001; Christoffels et al., 2004; Hoegg et al., 2004). So werden bei allen Knochenfischen fünf bis sieben *Hox*-Cluster vorgefunden (Amores et al., 2004; Brunet et al., 2006).

Beispielsweise wurden bei Zebraquappe und Medaka sieben Cluster entdeckt (Van de Peer et al., 2002). In Lachs und Forelle konnten sogar 13 bzw. 14 *Hox*-Gen-Kopplungsgruppen nachgewiesen werden (Allendorf et al., 1984). Deshalb wird über eine vierte Duplikationsrunde vor ca. 25 bis 100 Mio. Jahren in Salomoniden diskutiert (Moghadam et al., 2005; Koop et al., 2008).

Neben den *Hox* Genen betrafen die Duplikationen viele weitere Genfamilien, so auch die EGFR-Familie. Die vier Gene der Familie liegen im Vertebratengenom gekoppelt mit *Hox*-Clustern vor und wurden daher vermutlich auch gemeinsam mit ihnen verdoppelt (Spring et al., 1997; Abbasi et al., 2007).

Ein erstes Duplikationsereignis ließ zwei *erbB* Gene entstehen. Auf einen frühen Zeitpunkt der Duplikation in der Vertebratenentwicklung weist das eine Rezeptorgen in Invertebraten hin (Meyer et al., 1999; Panopoulou et al., 2005). Die zweite Duplikationsrunde (2R) fand ebenfalls während der frühen Vertebratenevolution jedoch nach der Abspaltung der Agnatha (kieferlose Wirbeltiere) vor ca. 450 bis 500 Mio. Jahren statt (Panopoulou et al., 2005; Stein et al., 2006). Aus ihr gingen die vier *erbB* Gene des rezenten Vertebratengenoms hervor.

In vielen Teleostern müssten ausgehend von der 3R-Hypothese acht *erbB*-orthologe Gene auftreten. In Salmoniden könnte durch die vierte Duplikation sogar eine noch höhere Anzahl an Genen für Rezeptoren der EGFR-Familie vorkommen.

Im weiteren Evolutionsverlauf gingen einige Gene und Kopplungsgruppen durch Mutationen wieder verloren. So wird der Verlust von ca. 50 % der Gene während der Evolution der Lachsfische vermutet (Bailey et al., 1978; Meyer et al., 1999). Erwiesen ist, dass oft eines der duplizierten Gene in ein Pseudogen umgewandelt wurde und damit seine Funktion verloren ging (Volff, 2005). Bestehen beide Gene nebeneinander, kam es zur bereits erwähnten Neo- oder Subfunktionalisierung.

Den als Rediploidisierung bezeichneten Prozess des Genverlustes durchliefen viele Fischarten. Auch in der Familie der Salmoniden sind nur noch bestimmte Regionen des Genoms tetraploid organisiert (Shiina et al., 2005; Gharbi et al., 2006).

Die Rediploidisierung betraf, neben vielen weiteren Genen, auch die *Hox*-Cluster und die Gene für den EGF-Rezeptor. So büßten die Kugelfische ein *HoxC*-Cluster, der Zebraäbrbling ein *HoxD*- und der Lachs ein *HoxA*-Cluster ein (Amores et al., 2004; Brunet et al., 2006; Mungpakdee et al., 2008). Für EGF-Rezeptoren sind statt der vermuteten acht nur sieben Gene in den Kugelfischarten *Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* präsent (Volff, 2005).

In Folge der bereits erwähnten fischspezifischen Duplikation sind im Genom einiger Knochenfische Kopien einzelner *erbB* Gene nachgewiesen worden (Volff, 2005). In *T. rubripes* und *T. nigroviridis* beispielsweise liegen mit Ausnahme von *erbB2* für alle bekannten *erbB* Gene eine zusätzliche Kopie vor (Volff et al., 2003). In anderen Knochenfischen wie Schwertträger und Zebraäbrbling wurden bisher ebenfalls duplizierte *erbB*-orthologe Gene identifiziert (Gomez et al., 2004).

6.1.2 EGFR-Duplikate auch in *Oncorhynchus mykiss*?

Der EGFR-Abschnitt von *O. mykiss* umfasst, wie schon beschrieben, einen Teil der extrazellulären Domäne. Eine Homologie von 76 % mit dem EGFRa des Schwertträgers steht eine 61 %ige Übereinstimmung mit dem b-Duplikat dieser Spezies gegenüber (siehe Tab. 4). Das lässt erstmals vermuten, dass auch in der Forelle das *egfr* Gen dupliziert vorliegt.

Das EGFR-Stück der Forelle stimmt auch im Expressionsmuster besser mit der a-Kopie überein. Hauptbildungsorte des Forellen-Rezeptors scheinen Kiemen, Haut und Nieren zu sein (siehe Abb. 32). Während EGFRa vor allem in Nieren, Haut und Kiemen des Schwertträgers aber auch in geringerem Umfang in der Leber exprimiert wird, scheint EGFRb

in Nieren und Haut nicht gebildet zu werden (Gomez et al., 2004). Auch im Zebrabärbling wird EGFR überwiegend in diesen Geweben und mit nur sehr geringem Niveau in der Leber gebildet (Wang et al., 2004).

Neben dem Expressionsmuster bestehen zwischen den EGFR-Duplikaten hauptsächlich funktionelle Unterschiede. Das zeigt sich in der Bindung von Liganden und der intrazellulären Aktivierung von Signaltransduktionswegen (Gomez et al., 2004).

Aminosäuresubstitutionen führten zu verschiedenen Ligandbindungsaffinitäten. So ist der EGFRb des Schwertträgers im Gegensatz zu seiner Kopie nicht in der Lage humanes EGF zu binden (Gomez et al., 2004). In vielen strukturell wichtigen Merkmalen stimmt das Rezeptorpaar EGFRa und b aus dem Schwertträger dagegen überein und weist eine Sequenzhomologie zueinander von 69 % auf (Gomez et al., 2004).

Obwohl bislang keine zweite Kopie in *Danio rerio* identifiziert wurde, wird er aufgrund höherer Homologien phylogenetische in eine Gruppe mit EGFRa der Kugelfische *T. rubripes* und *T. nigroviridis* sowie des Schwertträgers *X. xiphidium* eingeordnet (Gomez et al., 2004). Phylogenetisch ist das Rezeptorteilstück aus der Forelle mit den EGFRa-Duplikaten ebenfalls enger verwandt als mit den b-Varianten (siehe Abb. 22).

Bei derartigen vergleichenden Interpretationen zwischen Fischarten ist jedoch Vorsicht geboten. Eine Reihe von Autoren weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass es sich bei den Teleostern um ein sehr diverses Taxon handelt (u. a. Zhou et al., 2001; Venkatesh, 2003). Alle bisher erwähnten Spezies nehmen unterschiedliche phylogenetische Positionen ein. *Oncorhynchus mykiss* (Forelle) und *Danio rerio* (Zebrabärbling) werden den Euteleostei zugeordnet. Die beiden Kugelfischarten *Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* sowie der Schwertträger *Xiphophorus xiphidium* sind dagegen den Neoteleostei zugehörig. Obwohl sie wiederum zu verschiedenen Ordnungen zählen, steht somit die Forelle dem Zebrabärbling näher als dem Schwertträger.

Weiterhin sind aufgrund bereits erläuterter Rediploidisierungsprozesse nur noch bestimmte Regionen des piscinen Genoms tetraploid organisiert. Oft verschwand im Evolutionsverlauf eines der duplizierten Gene (Volff, 2005). Beispielsweise ist bislang nur ein Gen für den EGF-Rezeptor des Zebrabärblings veröffentlicht worden, obgleich sein Genom fast vollständig sequenziert vorliegt (Volff, 2005).

Wie bereits erwähnt, wurde die DNA der Rezeptors von Wang et al. (2004) und Goishi et al. (2003) unabhängig voneinander isoliert. Beide Sequenzen zeigen nur einen geringen

Unterschied, der nicht zu vergleichen ist mit dem zwischen den EGFR-Kopien des Schwertträgers. Die Autoren gehen daher davon aus, dass es sich im Zebrabärbling um das gleiche Gen handelt und die Unterschiede methodisch verursacht wurden (Wang et al., 2004).

Anhand dieser Daten und der engeren phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Forelle und Zebrabärbling, kann deshalb ebenso vermutet werden, dass die Forelle keine zweite Genkopie für den EGF-Rezeptor besitzt. Zweifel an dieser Vermutung kommen jedoch bereits auf, wenn das Genom der beiden Fischarten betrachtet wird.

Der Zebrabärbling zählt zur Gruppe der Karpfenfische, die kein tetraploides Genom besitzen (Meyer et al., 1999). In den Salmoniden erfolgte jedoch die bereits mehrfach erwähnte vierte Genomduplikation (Allendorf et al., 1984; Shiina et al., 2005). Damit nimmt die Forelle gegenüber den, für die Analysen herangezogenen Fischarten eine Sonderstellung ein

Das duplizierte Genom und damit das Vorkommen von Genkopien ist ein typisches Merkmal von Knochenfischen. In den Salmoniden wurden bisher neben den *Hox* Genen weitere Duplikate von Genen mit verschiedenen Funktionen wie Immunabwehr und Wachstum identifiziert (Koop et al., 2008). Beispielsweise beschrieben bereits 1988 Agellon et al. zwei, durch Duplikation entstandene, Gene für das Wachstumshormon (*Growth hormone*, GH) in der Forelle. Durch interchromosomale Verdopplung entstanden in der Forelle zwei Gene für MHC Klasse I- Regionen, die dadurch auf getrennten Chromosomen zu finden sind (Shiina et al., 2005). Die ebenso an der innate Immunität beteiligte Komponente des Komplementsystems C7 konnte durch Papanastasiou et al. (2005) als Duplikat nachgewiesen und charakterisiert werden. Rebl (2007) zeigte in der Forelle die Existenz von zwei, an der Pathogenabwehr teilhabenden *Toll-Like*-Rezeptoren 22 (TLR22 und TLR22L).

Diese Fakten bestärken vielmehr die erste Vermutung, dass auch in der Forelle zwei verschiedene *egfr* Gene vorkommen und exprimiert werden.

6.2 Der EGF-Rezeptor von *Cyprinus carpio*

Der Karpfen (*Cyprinus carpio*) gehört, wie auch Forelle und Lachs, zu den ökonomisch wichtigen Fischarten. Weltweit steht er an 3. Stelle der am stärksten kultivierten Tierarten (David et al., 2003). Trotz seiner Bedeutung in der Aquakultur sind grundlegende Kenntnisse

zur Genetik und molekularbiologischen Mechanismen vergleichsweise begrenzt. So ist die Anzahl der Gensequenzen in frei zugänglichen Datenbanken gering.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolation der vollständigen Sequenz des EGF-Rezeptors aus dem Karpfen angestrebt. Zwei kurze DNA-Sequenzen aus Kiemengewebe konnten von uns gewonnen werden. Unter den AC-Nummern FM865855 und FM865856 wurden sie in der NCBI-Genbank hinterlegt. Die Art und Weise der Sequenzgewinnung ist vergleichbar mit der der Forelle.

Beide sind Abschnitte des EGF-Rezeptors. Der Vergleich mit gekannten Rezeptorsequenzen gestaltete sich in diesem Fall einfacher als bei der Forelle. Im Unterschied zu den Salmoniden war die Sequenz des EGFR von einem Cypriniden (Karpfenfische) bereits veröffentlicht worden. Goishi et al. (2003) und Wang et al. (2004) publizierten die vollständige Rezeptorsequenz des Zebraäbrblings (*Danio rerio*). Wie erwartet, zeigen die von uns isolierten Sequenzen aus dem Karpfen auch die höchste Homologie mit dem EGFR des Zebraäbrblings.

6.2.1 Die extrazelluläre EGFR-Domäne von *Cyprinus carpio*

Die erste Sequenz (siehe Abb. 24) umfasst 366 bp, die translatiert ein Protein mit 122 Aminosäureresten ergibt. Im Vergleich wurde erkennbar, dass es sich um einen Abschnitt der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors handelt. Mit 68 % ist die Homologie der Proteinsequenz zum Zebraäbrbling-EGFR am größten. Mit 57 % ist die Übereinstimmung mit dem orthologen Rezeptor des Schwertträgers und der Kugelfische *Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* noch relativ hoch (siehe Tab. 6).

Jede der bekannten piscinen EGF-Rezeptoren zeigt die gleiche Struktur wie die der Säuger. Das Bruchstück aus dem Karpfen fügt sich problemlos ein.

Wie schon im Kapitel 6.1 erläutert, ist ein typisches Merkmal von Rezeptoren die Unterteilung in Domänen und Subdomänen. Die extrazelluläre Domäne des humanen EGFR wird so von Abe et al. (1998) in die Unterdomänen L1, S1, L2 und S2 gegliedert. Die Sequenz der L-Abschnitte, die wie schon beschrieben, die S-Domänen flankieren, variiert stärker. Sie enthalten jedoch auch konservierte Cysteinreste. In den humanen und piscinen Rezeptorsequenzen sind es 4 pro L-Domäne (Ullrich et al., 1984; Goishi et al., 2003; Gomez et al., 2004). Die S-Domänen enthalten dagegen 22 bzw. 20 Cysteine und werden deshalb als Cystein-reich bezeichnet. Die Anzahl und Position dieser ist innerhalb der EGFR-Familie

konserviert (Bajaj et al., 1987). Das scheint sich nicht nur auf die Säuger-Rezeptoren zu beziehen. Auch bei den piscinen EGFRs ist die Anzahl der Cysteine und deren Position identisch mit der in Säugern (Gomez et al., 2004).

Die Proteinsequenz aus dem Karpfen umfasst einen Teil der L1- und S1-Domäne (siehe Abb. 26). Anstelle der 4 und 22 Cysteine sind jedoch nur 2 bzw. 11 Reste dieser Aminosäure zu finden. Die Positionen stimmen jedoch mit den Cysteinresten in den, zum Vergleich herangezogenen, EGFR-Sequenzen überein. Der Grund für die Differenz in der Anzahl ist in der unvollständigen Karpfen- EGFR-Sequenz zu sehen.

Wie schon mehrmals erwähnt, werden im Säugersystem unter dem Begriff EGFR-Familie vier miteinander eng verwandte Rezeptoren zusammengefasst. In Folge des Genomprojektes konnten auch bei *D. rerio* diese vier Rezeptoren identifiziert werden. Die Sequenzen sind in der NCBI-Genbank frei zugänglich. Der Vergleich mit diesen ergab die höchste Homologie zu dem ErbB1-orthologen Rezeptor des Zebrafischs. Deutlich geringer ist die Ähnlichkeit mit den ErbB2, 3 und 4-Orthologen (ca. 40 %). Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass im Karpfen der ErbB1 gebildet wird. Wie schon bei der Forelle, soll ErbB1 nachfolgend als EGFR bezeichnet werden.

Das Expressionsmuster weist darüber hinaus auf diesen Rezeptor hin. Es ähnelt dem des Zebrafisch- EGFR. Im Zebrafisch scheint der Rezeptor vorrangig in Kiemen und Niere gebildet zu werden (Wang et al., 2004). Im Karpfen konnten wir die EGFR- mRNA ebenfalls verstärkt in diesen beiden Organen nachweisen (siehe Abb. 33).

6.2.2 Die Tyrosinkinasedomäne des *Cyprinus carpio*-EGFR

Die zweite, von uns isolierte Sequenz ist auch ein Teil des ErbB1-orthologen Rezeptors. Die 372 bp umfassende cDNA wurde unter der AC-Nummer FM865856 in der NCBI-Genbank hinterlegt. Mit der EGFR-cDNA des Zebrafischs zeigt sie eine 88 %ige Homologie. Das Protein aus dem Karpfen stimmt sogar zu 96 % mit dem *D. rerio*- Rezeptor überein (siehe Tab. 7). Diese sehr hohe Übereinstimmung kommt durch die starke Konservierung der cytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne zustande. Die 124 Aminosäurereste umfassende Karpfen-Sequenz ist ein Teil dieser EGFR-Domäne.

Die vollständige Kinase-region des EGFR schließt ca. 250 Aminosäuren ein. Die Hälfte davon konnte somit von uns kloniert werden.

Mit Ausnahme von ErbB3, welche keine katalytische Aktivität aufweist, ist die Tyrosinkinasedomäne der Bereich mit den höchsten Homologie innerhalb der EGFR-Proteinfamilie (Bogdan et al., 2001). Selbst zwischen phylogenetisch distanzierten EGF-Rezeptoren, wie zwischen Fruchtfliege und Mensch, besteht in diesem Bereich eine Homologie von 71 % (siehe Tab. 7). Die vollständigen Rezeptoren beider Spezies weisen dagegen lediglich eine Übereinstimmung von 38 % auf (Bogdan et al., 2001). Die Homologie zwischen den Gesamtrezeptorproteinen vom Zebrafisch und Mensch beträgt 63 % und die zwischen den Tyrosinkinasedomänen 90 % (Goishi et al., 2003). Den gleichen Wert ergab der Vergleich der Kinasedomänen vom Karpfen-EGFR und humanem EGFR. Die Übereinstimmung des Karpfen-Domänenabschnittes mit ErbB2, 3 und 4 aus *D. rerio* von 88 %, 61 % bzw. 79 % überrascht nicht, wenn die hohe Konservierung der Region beachtet wird. Mit dem entsprechenden Bereich der humanen Rezeptoren ist das Karpfen-Protein ähnlich homolog. Dennoch kann der Abschnitt aufgrund der um 8 % höheren Identität eindeutig dem EGFR (ErbB1)-orthologen Rezeptor zugeordnet werden.

6.2.3 EGFR-Duplikate in *Cyprinus carpio*?

Im Kapitel 6.1.2 wurde das Vorhandensein von EGFR-Kopien in der Forelle diskutiert. Der gleiche Sachverhalt kann auch auf *Cyprinus carpio* angewendet werden.

Karpfen und Forelle gehören, wie auch die bisher besprochenen Fische, zur großen Gruppe der Knochenfische, deren Merkmal u. a. duplizierte Gene sind. In mehreren Teleostern wurden bereits, wie schon erläutert, duplizierte *egfr* und *erbB* Gene identifiziert. Beispielsweise existieren im Schwertträger zwei Gene für EGF-Rezeptoren (EGFRa und b) (Gomez et al., 2004). In Kugelfischn sind ebenfalls ErbB-Rezeptorpaare entdeckt worden (Volf et al., 2003).

Zebrafisch und Karpfen werden beide in die Ordnung der Cypriniformes eingegliedert (Meyer et al., 1993). Jedoch ergibt sich bei der Betrachtung der Chromosomenzahl eine Zweiteilung der Karpfenfische. Zu einer diploiden Gruppe mit 50 Chromosomen gehört u. a. der Zebrafisch. Der Karpfen und beispielsweise auch der Goldfisch (*Carassius auratus*) haben die doppelte Zahl Chromosomen und zählen zur tetraploiden Gruppe (Ohno et al., 1967; Aghasadeh et al., 1971). Sequenzvergleiche mit dem diploiden Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) ließen Larhammar et al. (1994) vermuten, dass sich die Tetraploidisierung in *C. carpio* vor ca. 16 Mio. Jahren ereignete.

Hinsichtlich seines Polyploidie-Types ähnelt der Karpfen der Forelle mehr als dem Zebraärbling. In der Forelle fand, wie bereits erläutert, auch eine vierte Genomduplikation statt, die zum tetraploiden Chromosomensatz führte. Rezent sind, wie bei der Forelle, nur noch Teile des Karpfengenoms tetraploid organisiert (Ferris et al., 1977; David et al., 2003).

Im Zusammenhang mit diesen Ereignissen existieren in größerem Umfang Angaben zum, mit dem Karpfen eng verwandten, Goldfisch. Die vierte Genomduplikation im Goldfisch wird auf den gleichen Zeitpunkt wie beim Karpfen datiert (Risinger et al., 1993; Luo et al., 2007). Der Vergleich zeigt, dass im Goldfisch von einigen Genen mehr Kopien vorhanden sind als im Zebraärbling. Luo et al. (2006) entdeckten zum Beispiel zwei Kopien von RAG1 (*Recombinase-Activating Gene*) in einer BAC-Bibliothek. Auch von denen, für diese Analysen oft herangezogenen *Hox* Genen existieren im Goldfisch mehr Kopien als im Zebraärbling (Luo et al., 2007).

Ob wie beim Zebraärbling alle vier Proteine der EGFR-Familie exprimiert werden, bedarf sowohl beim Karpfen als auch bei der Forelle weiterer Untersuchungen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass mehrere Genkopien ähnlich wie bei *Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* im Karpfengenom vorliegen. Aufgrund der teilweise noch bestehenden Polyploidie wäre dies nicht überraschend.

Phylogenetisch werden beide, von uns isolierten EGFR-Sequenzen aus dem Karpfen in die Gruppe der EGFRa-Duplikate einsortiert (siehe Abb. 27 und 31). Die phylogenetische Einordnung des zweiten EGFR-Abschnittes des Karpfens, der ein Teil der hoch konservierten Tyrosinkinasedomäne ist, deutet den gemeinsamen Ursprung der EGF-Rezeptoren von Fischen und Säugern an (siehe Abb. 31). Diese Domäne der piscinen EGFRa ordnet sich, im Gegensatz zur extrazellulären Rezeptorregion, in eine Gruppe mit den Säuger-EGF-Rezeptoren ein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben jedoch keinen Hinweis darauf, ob im Karpfen auch eine b-Kopie des EGFR existiert.

6.3 Der Hybridrezeptor

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse fischspezifischer Cytokin-Klasse-I-Rezeptoren und der von ihnen rekrutierten Signaltransduktionswege. Das Wissen hinsichtlich des Verlaufs dieser Signalwege in piscinen Zellen ist aufgrund fehlender homologer Fisch-Cytokine relativ beschränkt. So sind auch die molekularen Grundlagen der Prolactinwirkung im Fisch bislang wenig untersucht worden, da piscines Prolactin nicht zur Verfügung steht.

Physiologisch ist dieses Cytokin in Teleosteer gut charakterisiert und seine Beteiligung an vielen zellulären Prozessen bekannt. Jedoch sind die durch Prolactin ausgelösten Signalkaskaden in piscinen Zellen nur wenig untersucht worden. Wie eingangs erwähnt, bietet sich hier aus methodischen Gründen die Konstruktion eines Hybridrezeptors an, der mit kommerziell erhältlichen Cytokinen stimuliert werden kann.

Anhand von Säugermodellen konnte mehrfach die Eignung der extrazellulären Domäne des humanen EGF-Rezeptors für entsprechende Konstrukte demonstriert werden (Ohashi et al., 1994; Körbel, 2005; Büchse et al., 2006). Dass das Rezeptorfragment sich auch für piscine Zellmodelle eignet, zeigte Stigge 2005. Erstmals wurde dabei ein hybrider Rezeptor für die Etablierung fischspezifischer Zellmodelle konstruiert. Durch das Rezeptorkonstrukt, dessen Transmembran- und intrazelluläre Domäne vom Prolactinrezeptor (PrlR) der Forelle stammen, wurden in der Forellenzelllinie RTG-2 Signalkaskaden initiiert (Stigge, 2005). Die mit dem PrlR verknüpften Signalwege konnten so durch humanes rekombinantes EGF ausgelöst werden.

Basierend auf diesen Daten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein zweiter fischspezifischer Hybridrezeptor mit der extrazellulären EGFR-Domäne synthetisiert. Dieser sollte in den Karpfenzelllinien CLC und EPC exprimiert werden. Ein wichtiges Auswahlkriterium für die verwendeten Zellen war die fehlende Wirksamkeit des induzierenden Cytokins auf diese Zelllinien. Eine Wirkung von humanem rekombinanten EGF (hrEGF) auf parentale CLC- und EPC-Zellen konnte in zuvor durchgeführten Proliferationstests nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind, wie bereits erwähnt, EGF-Rezeptoren, die mit hrEGF interagieren können, in mehreren Teleosteen identifiziert worden (Wang et al., 2004; Gomez et al., 2004). Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verdeutlichen, dass auch im Karpfen ein EGF-Rezeptor exprimiert wird (siehe Kap. 6.2). Jedoch ergab eine Analyse, dass die Bildung anscheinend nicht in den Permanentzelllinie des Karpfens statt findet (siehe Kap. 5.1.3).

Somit scheinen sowohl CLC- als EPC-Zellen für die Untersuchungen EGF-induzierter Signalwege des Hybridrezeptors geeignet zu sein. Darüber hinaus ist ein weiterer Vorteil der Karpfenzelllinien ihre einfache Transfizierbarkeit im Vergleich zu Zelllinien der Forelle (Moav et al., 1992; Lopez et al., 2001; Rocha et al., 2005).

6.3.1 Konstruktion des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors

In der Literatur wurde bereits mehrfach über die Konstruktion von Hybridrezeptoren berichtet (z. B. Lax et al., 1989; Constantinescu et al., 2001). Zur Herstellung der beschriebenen Konstrukte wurden entweder natürliche oder künstlich eingebaute Restriktionsstellen an den gewünschten Domänenübergängen der entsprechenden Rezeptoren verwendet. In dieser Arbeit wurde auf letzteres zurückgegriffen. Der von Stigge (2005) konstruierte Hybridrezeptor, in dem die extrazelluläre Domäne des Forellen- PrlR gegen die des humanen EGF-Rezeptors getauscht wurde, diente dabei als Grundlage. Die Erkennungssequenz für die Endonuklease EcoRV am Übergang extrazellulärer und Transmembrandomäne wurde genutzt, um die EGFR-Domäne zu erhalten. Diese wurde mit der Transmembran- und intrazellulären Domäne des Karpfen- Prolactinrezeptors verbunden (siehe Abb. 38).

Für die N-terminale Grenze der membrandurchspannenden Region des Karpfen- PrlR wurden zunächst die Angaben aus der Literatur (San Martin et al., 2004) verwendet. Die Entscheidung über den Bereich, der zur Synthese des Hybridrezeptors verwendet werden sollte, ergab eine zusätzliche, von uns durchgeführte, Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz des Prolactinrezeptors. Die N-seitige Begrenzung der Transmembrandomäne bildet die Aminosäure an Position 232. Die Angaben zur C-seitigen Grenze der extrazellulären hEGFR-Domäne wurden der Arbeit von Stigge (2005) entnommen. Sie befindet sich an Aminosäureposition 621. Aufgrund dieser Daten wurde von uns ein Hybridrezeptor der Form hEGFR^(-24...621)/ cPrlR^(232...604) synthetisiert (siehe Kap. 5.2.2.4).

Die konstruktionsbedingten Modifikationen der cDNA-Sequenz im Übergangsbereich von extrazellulärer und Transmembrandomäne könnte zu funktionellen Abweichungen des Hybridrezeptors gegenüber dem Prolactinrezeptor des Karpfens führen. Der Einfluss entsprechender Sequenzveränderungen ist jedoch schwer zu beurteilen. Bei der Mehrzahl der bisher generierten Rezeptorkonstrukte wurden diese Modifikation vernachlässigt (u. a. Lax et al., 1989; Ohashi et al., 1994; Constantinescu et al., 2001). Die Sequenzierung des hEGF-

/cPrl-Hybridrezeptors ergab lediglich geringe Abweichungen gegenüber den ursprünglichen Rezeptorsequenzen. Funktionell wichtige Bereiche des Hybridrezeptors, wie die Ligandbindungsdomäne oder die für die Bindung cytosolischer Proteinkinasen essentiellen Boxen 1 und 2 sind von den Veränderungen nicht betroffen.

Für die Cytokin-induzierte Rezeptoraktivierung ist vor allem die Konformationsänderung innerhalb der Rezeptorketten und die damit verbundene Annäherung der cytoplasmatischen Domänen zweier Rezeptoren von Bedeutung (Heldin, 1995). Bei der Neukombination von Domänen verschiedener Rezeptorklassen ist auch bei exakter Übereinstimmung mit den ursprünglichen Rezeptorsequenzen nicht ausgeschlossen, dass eine Rezeptordimerisierung nicht statt findet. Mehrere Autoren zeigten jedoch anhand von hEGF-/Epo-Hybriden die Funktionalität derartiger Konstrukte im Säugermodell (Pacifci et al., 1994; Ohashi et al., 1994; Bückse et al., 2006). Darüber hinaus konnte Stigge (2005) die Funktion des bis dahin einzigen hEGF-/fPrl-Hybridrezeptors im Fischmodell durch die Aktivierung verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren demonstrieren. Daher ist anzunehmen, dass auch der von uns synthetisierte hEGF-/cPrl-Hybridrezeptor Signalkaskaden in Karpfenzelllinien aktivieren kann.

6.3.2 Oberflächenexpression des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors

Von großer Bedeutung für die Etablierung eines Modellsystems ist das Expressionsniveau bzw. die Oberflächenexpression des Hybridrezeptors.

Wie bereits erwähnt, wurde die cDNA des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors in zwei Karpfenzelllinien transfiziert (siehe Kap. 5.2.3). Das Transkript konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Als problematisch erwies sich jedoch der Nachweis des Rezeptorproteins. Der Mangel an fischspezifischen anti-PrlR-Antikörpern sollte durch den Einsatz von anti-hEGFR-Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne des Säuger-Rezeptors gerichtet sind, kompensiert werden. Im Zelllysate transfizierter CLC-Zellen konnte von uns so das hEGF-/cPrl-Hybridrezeptorprotein erfolgreich nachgewiesen werden.

Wichtiger für die Funktionalität eines Zellmodellsystems ist indessen der korrekte Einbau des Konstrukts in die Zellmembran. Der Versuch den Hybridrezeptor auf der Oberfläche der Zellen nachzuweisen, hatte keinen Erfolg. Stattdessen zeigte die fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung das Rezeptorprotein im Cytoplasma der CLC-Zellen bzw. im Zellkern der

EPC-Zellen (siehe Abb. 41). Letzteres ist anscheinend auch der Grund für die erfolglose Detektion im EPC-Cytosol durch Immunoblotting.

Erklärt werden könnte die nicht erfolgte Oberflächenexpression des Hybridrezeptors möglicherweise mit dem vorhandenen Signalpeptid, welches vom EGFR des Menschen stammt. Ein Grund für diese Annahme ist, dass ähnliche Rezeptorkonstrukte mit der gleichen extrazellulären Domäne auf der Zelloberfläche von Säugerzelllinien nachgewiesen werden konnten (Lax et al., 1989; Lehväslaiho et al., 1990; Böhse et al., 2006).

Signalpeptide sind verantwortlich für die Zielsteuerung des Proteins. Eine Modifikation oder ein vorzeitiges Abspalten kann zum Verbleib eines Rezeptors im Cytosol führen. Ebenso können Differenzen zwischen verschiedenen Organismen zu einer falschen Interpretation des Signals führen und damit eine fehlerhafte Translokation verursachen.

Die Signalpeptide von EGF-Rezeptoren gehören nicht zu den konservierten Regionen. Sie unterscheiden sich deutlich voneinander, wie ein Sequenzvergleich von Gomez et al. (2004) demonstriert. Beispielsweise ist die Signalsequenz des EGFR vom Schwertträger 10 Aminosäurereste länger als die vom orthologen Rezeptor des Menschen. Um 3 Aminosäuren kürzer als das humane EGFR-Signalpeptid ist das vom Zebrafisch, der wie der Karpfen den Cypriniden zugeordnet wird. Auch innerhalb der piscinen Rezeptoren unterscheiden sich die Signalpeptide in Länge und Sequenz. Die Variationen bestimmen die verschiedenen Wirkungsorte der Proteine (Martoglio et al., 1998).

Im Falle des von uns synthetisierten Hybridrezeptors stammt das Signalpeptid aus dem Säuger. Aufgrund der genannten Unterschiede kann die kurze Peptidsequenz die Ursache für den nicht erfolgten Einbau in die Zellmembran sein.

Essentiell für weiterführende Untersuchungen ist die Oberflächenexpression des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors in Karpfenzellen. Damit das gelingt, bestünde die Möglichkeit das humane Signalpeptid gegen ein fischspezifisches auszutauschen. Ideal wäre das vom EGFR des Karpfens nach einer vollständigen Sequenzierung der Rezeptor-DNA. Alternativ könnte dann aber auch die gesamte extrazelluläre Domäne des Hybridrezeptors mit der des piscinen EGF-Rezeptors ausgewechselt werden. Die vorhandene Restriktionsstelle im Übergang von extrazellulärer und Transmembrandomäne des Hybridkonstruktes würde dieses Vorhaben erleichtern.

Eine anschließende stabile Transfektion in die bereits verwendeten oder andere geeignete Zelllinien des Karpfens stellt ein lohnendes Ziel für künftige Untersuchungen Prolactin-induzierter Signaltransduktionswege im Fisch dar.

Die Stimulation von piscinen EGF-Rezeptoren mit humanem oder murinem EGF sollte kein Problem sein. In der Literatur wurde, wie bereits erläutert, mehrfach die erfolgreiche Stimulation von Rezeptoren verschiedener Fischart mit säugerspezifischem EGF dokumentiert (Gomez et al., 2004; Wang et al., 2004).

6.4 Prolactin-induzierte Signalkaskaden in *Cyprinus carpio*?

Der Prolactin-induzierte Signaltransfer wie im Säuger konnte erstmals mit Hilfe eines Hybridrezeptors in einer Forellenzelllinie gezeigt werden (Stigge, 2005). Sowohl MAPK-abhängige Transkriptionsfaktoren als auch STAT5 wurden aktiviert. Inwiefern dies auch in Karpfenzellen stattfindet, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

Jedoch konnten Komponenten des Ras- Raf- MAPK- und des JAK- STAT- Weges auch in den Karpfenzelllinien im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden. In EPC- und CLC-Zellen werden Orthologe zu säugerspezifischen ERK1 und ERK2 (*Extracellular Regulated Kinase*) gebildet (siehe Abb. 43). Hashimoto et al. isolierten und charakterisierten bereits 1998 beide MAP-Kinasen aus dem Karpfen. Mit Molekulargewichten von 44 bzw. 42 kDa stimmen sie in dieser Eigenschaft mit den Proteinen aus Säugern überein. In der vorliegenden Arbeit konnte von uns zusätzlich ein drittes ERK-orthologes Protein mit einem höheren Molekulargewicht gezeigt werden, welches für Säuger bisher noch nicht beschrieben wurde. Auch in anderen Teleostern wie dem Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) gibt es Anzeichen für das Auftreten einer ca. 48 kDa schweren MAP-Kinase (MacDougal et al., 1999).

Weiterhin konnten von uns erstmals orthologe Proteine zu STAT1 und STAT3 in den Karpfenzelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 44). Beide Transkriptionsfaktoren werden im Zusammenhang mit der Aktivierung durch Prolactin im Säuger genannt (Lebrun et al., 1995). Bisher sind diese Transkriptionsfaktoren nur aus anderen Knochenfischen bekannt. Aus dem mit dem Karpfen engverwandten Goldfisch wurde von Zhang et al. (2004) STAT1 charakterisiert. Von einem weiteren Cypriniden, dem Zebraquappe, sind die Eigenschaften von STAT1 und STAT3 eingehend untersucht worden (Oates et al., 1999b;

Park et al., 2008). Hinsichtlich der Größe und des Molekulargewichtes bestehen zwischen piscinen und humanen STAT-Faktoren nur geringe Unterschiede (Park et al., 2008). STAT3 vom Zebrafisch ist mit 806 Aminosäuren länger als das Protein aus dem Mensch. Damit ist auch das Molekulargewicht höher (Oates et al., 1999b). Auch die im Karpfen detektierten STAT1 und STAT3 zeigen im Vergleich mit den Proteinen einer Säugerzelllinie ein höheres Molekulargewicht.

Einen interessanten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen könnte hierzu die genaue Charakterisierung des JAK- STAT- Signalweges im Karpfen verbunden mit der Darstellung der einzelnen Komponenten sein. Die Analyse der Prolactin-induzierten Signalkaskaden, wie sie im Säuger vorliegen, würde sich durch die Nutzung der Proteinsequenzen vereinfachen.

Ebenso sind die Eigenschaften und Funktion der im Fisch vorkommenden dritten, 48 kDa schweren MAP-Kinase noch unbekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass sie in Prolactin-abhängigen aber auch in Signaltransduktionswegen, die durch andere Cytokine ausgelöst werden, eine entscheidende Rolle spielt.

7 Zusammenfassung

Über die Funktionsweise von Cytokin-Cytokinrezeptor-Komplexen bei Fischen und anderen niederen Vertebraten ist im Gegensatz zu Säugern wenig bekannt. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass bislang verhältnismäßig wenige, zum Säuger homologe Signalmoleküle im Fisch nachgewiesen wurden. Darüber hinaus werden entsprechende Arbeiten vor allem durch die mangelnde Verfügbarkeit geeigneter Antikörper, Cytokine und Zellmodelle erschwert.

So sind auch die Kenntnisse über piscine EGF-Rezeptoren dementsprechend gering. Erst seit kurzer Zeit sind im Zuge von Genomprojekten die EGFR-Sequenzen von vier Fischarten veröffentlicht worden. Die Funktionen der Rezeptoren wurden dagegen nur ansatzweise untersucht. Lediglich beim Zebraäbrbling *D. rerio* und vor allem beim Schwertträger *X. xiphidium* erfolgten derartige Analysen. Die Wirkung von säugerspezifischem EGF konnte in der Forelle *O. mykiss* (Newsted et al., 2000) und im Goldfisch *C. auratus* (Pati et al., 1996) gezeigt werden. Der direkte Nachweis eines EGFR-homologen Rezeptors in beiden Spezies fehlte bisher.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte von uns der EGF-Rezeptor in *Oncorhynchus mykiss* und in *Cyprinus carpio* erstmals nachgewiesen werden. Ein Abschnitt der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors wurde aus den Kiemen der Forelle kloniert. Er umfasst einen Teil der extrazellulären Domäne des Rezeptors.

Aus dem Karpfen *C. carpio*, der wie der Goldfisch zu den Cypriniden zählt, konnten erstmalig zwei Abschnitte des EGF-Rezeptors isoliert und beschrieben werden. Ein Teilstück der extrazellulären Domäne enthält, wie bei der Forelle, stark konservierte Cysteinreste. Der Abschnitt der cytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne ist ebenfalls hoch konserviert. Weitere, von uns durchgeführte Transkriptanalysen führten jedoch nicht zur angestrebten Aufklärung der vollständigen EGFR-Sequenz beider Spezies.

Dennoch sind die beschriebenen EGFR-Sequenzabschnitte ein Beleg für die weite Verbreitung und strukturelle Konservierung der EGF-Rezeptoren nicht nur innerhalb der Vertebraten sondern auch in der Klasse der Knochenfische.

Ein typisches Merkmal der Knochenfische ist das Vorkommen duplizierter Gene. Auch der EGF-Rezeptor ist bereits in mehrere Fischarten, wie den Kugelfischen und Schwertträger als Rezeptorpaar nachgewiesen worden (Volf, 2005). Die phylogenetische Einordnung der isolierten EGFR-Teilstücke aus Forelle und Karpfen zu den EGFRa-Duplikaten und das

tetraploide Genom sind unübersehbare Hinweise auf die Existenz zweier *egfr* Gene in diesen Fischen.

Bei der Regulation elementarer Zellfunktionen nimmt neben EGF auch das Klasse-I-Cytokin Prolactin eine Schlüsselrolle ein. Im Fisch werden durch dieses Cytokin vorrangig osmoregulatorische Prozesse beeinflusst (Loretz et al., 1982). Das Wissen über die zugrunde liegenden intrazellulären Signaltransduktionswege leitet sich bisher größtenteils von Untersuchungen an Säugern ab, bei denen Prolactin teilweise noch andere Funktionen ausübt. In der vorliegenden Arbeit sollte ein zelluläres Modell etabliert werden, in dem die Funktion des Prolactinrezeptors des Karpfens *C. carpio* durch rekombinantes humanes EGF aktiviert werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Hybridrezeptor auf der Basis eines bereits vorhandenen Forellen-spezifischen Hybridkonstruktes konstruiert. Er besteht aus der extrazellulären Domäne des humanen EGFR sowie der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne des Prolactinrezeptors des Karpfens.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte einmal mehr gezeigt werden, dass mit Hilfe von vorhandenen oder eingefügten Restriktionsstellen der Austausch der Domänen solcher Rezeptorkonstrukte möglich ist. Gleichzeitig bietet diese Methode eine Option zur Konstruktion einer Vielzahl an fischspezifischen Hybridrezeptoren.

Nach der Transfektion in geeignete Fischzelllinien sollte die molekulare Wirkung von Prolactin ohne hohen experimentellen Aufwand charakterisiert werden. Die für diese Analysen essentielle Oberflächenexpression des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors konnte nicht belegt werden. Dennoch würde der gewählte methodische Ansatzpunkt einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen liefern, wenn die Problematik der Oberflächenexpression gelöst ist.

Im Zusammenhang mit Cytokin-induzierten Signalkaskaden werden im Säugermodell der Ras- Raf- MAP-Kinase- und der JAK- STAT- Weg genannt. In verschiedenen Teleostern wurden Komponenten beider Signalwege mehrfach beschrieben. In Zelllinien des Karpfens konnten erstmals innerhalb dieser Arbeit STAT1- und STAT3-homologe Proteine nachgewiesen werden. Beide besitzen ein höheres Molekulargewicht als die entsprechenden säugerspezifischen Proteine. Eine ca. 48 kDa schwere MAP-Kinase, die von uns ebenfalls in den Karpfenzellen nachgewiesen wurde, ist für Säuger bisher nicht beschrieben worden.

8 Literaturverzeichnis

Abbasi AA; Grzeschik K (2007) An insight into the phylogenetic history of *HOX* linked gene families in vertebrates. *BMC Evol Biol* 7: 239

Abe Y; Odaka M; Inagaki F; Lax I; Schlessinger J; Kohda D (1998) Disulfide bond structure of human epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273 (18): 11150- 11157

Aghasadeh H; Ritter H (1971) Polyploidisierung in der Fischfamilie *Cyprinidae*, Ordnung Cypriniformes. *Humangenetik* 11: 91- 94

Agellon LB; Davies SL; Lin C; Chen TT; Powers DA (1988) Rainbow Trout Has Two Genes for Growth Hormone. *Mol. Reprod. Dev.* 1: 11- 17

Ali S; Ali S (1998) Prolactin Receptor Regulates Stat5 Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Translocation by Two Separate Pathways. *J. Biol. Chem.* 273 (13): 7709- 7716

Allendorf FW; Thorgaard GH (1984) Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: *Evolutionary Genetics of Fishes*, Ed.: Turner BJ, New York, Plenum Press: 1- 53

Amores A; Suzuki T; Yan Y; Pomeroy J; Singer A; Amemiya C; Postlethwait JH (2004) Developmental roles of pufferfish *Hox* clusters and genome evolution in ray-fin fish. *Genome Res* 14: 1- 10

Aroian RV; Koga M; Mendel JE; Ohshima Y; Sternberg PW (1990) The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* 348: 693- 699

Auperin B; Rentier-Delrue F; Martial JA; Prunet P (1994) Characterization of a single prolactin (PRL) receptor in tilapia (*Oreochromis niloticus*) which binds both PRLI and PRLII. *J Mol Endocrinol* 13 (3): 241- 251

Bailey GS; Poulter RTM; Stockwell PA (1978) Gene duplication in tetraploid fish: model for gene silencing at unlinked duplicated loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 (11): 5575- 5579

Bajaj M; Waterfield MD, Schlessinger J, Taylor WR, Blundell T (1987) On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim Biophys Acta* 916 (2):220- 226

Baudler M; Scharl M; Altschmied J (1999) Specific activation of a STAT family member in Xiphophorus melanoma cells. *Exp Cell Res* 249 (2): 212- 220

Baumgartner JW; Wells CA; Chen C; Waters MJ (1994) The Role of the WSXWS Equivalent Motif in Growth Hormone Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 269 (46): 29094- 29101

Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. PNAS 90: 5889- 5892

Blume-Jensen P; Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. Nature 411: 355- 365

Bogdan S; Klämbt C (2001) Epidermal growth factor receptor signaling. Curr Biol 10 (8): 292- 295

Boirnboim HC; Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7 (6): 1513- 1523

Bole-Feysot C; Goffin V; Edery M; Binart N; Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrine Rev 19 (3): 225- 268

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

Briskin S; Socolovsky M; Lodish HF; Weinberg R (2002) The signaling domain of the erythropoietin receptor rescues prolactin receptor-mutant mammary epithelium. PNAS 99 (22): 14241- 14245

Britsch S; Li L; Kirchhoff S; Theuring F; Brinkmann V; Birchmeier C; Riethmacher D (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. Genes Dev 12: 1825- 1836

Bromberg JF (2001) Activation of STAT proteins and growth control. BioEssays 23: 161- 169

Brunet FG; Crollius HR; Paris M; Aury J; Gibert P; Jaillon O; Laudet V; Robinson-Rechavi M (2006) Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. Mol Biol Evol 23 (9): 1808- 1816

Büchse T; Prietzsch H; Sasse T; Körbel S; Stigge G; Bogdanow S; Brock J; Bittorf T (2006) Profiling of Early Gene Expression Induced by Erythropoietin Receptor Structural Variants. J Biol. Chem. 281 (12): 7697- 7707

Burlando B; Magnelli V; Panfoli I; Berti E; Viarengo A (2003) Ligand-independent tyrosine kinase signalling in RTH 149 trout hepatoma cells: comparsion among heavy metals and pro-oxidants. Cell Physiol Biochem 13 (3): 147- 154

Cavaco JE; Santos CR; Ingleton PM; Canario AV; Power DM (2003) Quantification of prolactin (PRL) and PRL receptor messenger RNA in gilthead seabream (*Sparus aurata*) after treatment with estradiol-17beta. Biol Reprod 68 (2): 588- 594

Chang WP; Ye Y; Clevenger CV (1998) Stoichiometric Structure-Function Analysis of the Prolactin Receptor Signaling Domain by Receptor Chimeras. Mol. Cell. Biol. 18 (2): 896- 905

Chen B; Bronson RT; Klamann LD; Hampton TG; Wang JF; Green PJ; Magnuson T; Douglas PS; Morgan JP; Neel BG (2000) Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet.* 24: 296- 299

Chilton BS; Hewetson A (2005) Prolactin and growth hormone signaling. *Curr Top Dev Biol* 68: 1- 23

Christoffels A; Koh EGL; Chia J; Brenner S; Aparicio S; Venkatesh B (2004) Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol* 21 (6): 1146- 1151

Coffer PJ; Kruijjer W (1995) EGF Receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1): 74- 81

Constantinescu SN; Keren T; Socolovsky M; Nam H; Henis YI; Lodish HF (2001) Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (8): 4379- 4384

Coussens L; Yang-Feng TL; Liao YC; Chen E; Gray A; McGrath J; Seeburg PH; Libermann TA; Schlessinger J; Francke U (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 230: 1132- 1139

Crow KD; Stadler PF; Lynch VJ; Amemiya C; Wagner GP (2006) The “fish-specific” *Hox* cluster duplication is coincident with the origin of teleost. *Mol Biol Evol* 23 (1): 121- 136

Darnell JE (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277 (5332): 1630- 1635

DaSilva L; Howard OMZ; Rui H; Kirken RA; Farrar WL (1994) Growth Signaling and JAK2 Association mediated by Membrane-proximal Cytoplasmic Regions of Prolactin Receptors. *J. Biol. Chem.* 269 (28): 18267- 18270

DaSilva L; Hallgeir R; Erwin RA; Howard OMZ; Kirken RA; Malabarba MG; Hackett RH; Larner AC; Farrar WL (1996) Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580. *Mol Cell Endocrinol* 117 (2): 131- 140

David M; Wong L; Flavell R; Thompson SA; Wells A; Larner AC; Johnson GR (1996) STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. *J Biol Chem* 271 (16): 9185-9188

David L; Blum S; Feldman MW; Lavi U; Hillel J (2003) Recent Duplication of the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Genome as Revealed by Analyses of Microsatellite Loci. *Mol Biol Evol* 20 (9): 1425- 1435

Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268 (20): 14553- 14556

Dehal P; Boore JL (2005) Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. *PloS Biol* 3 (10): 1700- 1708

Dusanter-Fourt I; Muller O; Ziemiecki A; Mayeux P; Drucker B; Djiane J; Wilks A; Harpur AG; Fischer S; Gisselbrecht S (1994) Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin – erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *EMBO J.* 13 (11): 2583- 2591

Ebner HL; Blatzer M; Nawaz M; Krumschnabel G (2007) Activation and nuclear translocation of ERKs in response to ligand-dependent and –independent stimuli in liver and gill cells from rainbow trout. *J Exp Biol* 210: 1036- 1045

Eguchi S; Numaguchi K; Iwasaki H; Matsumoto T; Yamakawa T; Utsunomiya H; Motley ED; Kawakatsu H; Owada KM; Hirata Y; Marumo F; Inagami T (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273 (15): 8890- 8896

Faisal M; Ahne W (1990) A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp *Cyprinus carpio*. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 255- 260

Ferris SD; Whitt GS (1977) The evolution of duplicate gene expression in the carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Mol Life Sci (CMLS)* 33 (10): 1299- 1301

Fijan N; Sulimanovic D, Bearzotti M, Muzinc D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF, De Kinkelin P (1983) Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann Virol (Inst. Pasteur)* 134E: 207- 220

Fischer OM; Hart S; Gschwind A; Ullrich A (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Transact* 31 (6): 1203- 1208

Force A; Lynch M; Pickett FB; Amores A; Yan YI; Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531- 1545

Forsyth IA; Wallis M (2002) Growth Hormone and Prolactin - Molecular and Functional Evolution. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 7 (3): 291- 312

Freeman ME; Kanyicska B; Lerant A; Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80 (4): 1523- 1631

Froschauer A; Braasch I; Volff JN (2006) Fish genomes, comparative genomics and vertebrate evolution. *Curr Genom* 7 (1): 43- 57

Garrett TPJ; McKern NM; Lou M; Elleman TC; Adams TE; Lovrecz GO; Zhu H; Walker F; Frenkel MJ; Hoyne PA; Jorisson RN; Nice EC; Burgess AW; Ward CW (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . *Cell* 110: 763- 773

Gharbi K; Gautier A; Danzmann RG; Gharbi S; Sakamoto T; Hoyheim B; Taggart JB; Cairney M; Powell R; Krieg F; Okamoto N; Ferguson MM; Holm L; Guyomard R (2006) A Linkage Map for Brown Trout (*Salmo trutta*): Chromosome Homeologies and Comparative Genome Organization With Other Salmonid Fish. *Genetics* 172: 2405- 2419

Gertler A; Grosclaude J; Strasburger CJ; Nir S; Djiane J (1996) Real-time kinetic measurements of the interactions between lactogenic hormones and prolactin-receptor extracellular domains from several species support the model of hormone-induced transient receptor dimerization. *J Biol Chem* 271 (40): 24482- 24491

Giard DJ; Aaronson SA; Todaro GJ; Arnstein P; Kersey JH; Dosik H; Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 (5): 1417- 1423

Goffin V; Kelly PA (1997) The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family: Structure/Function Relationships. *J Mammary Gland Biol Neopl* 2 (1): 7- 17

Goishi K; Lee P; Davidson AJ; Nishi E; Zon LI; Klagsbrun M (2003) Inhibition of zebrafish epidermal growth factor receptor activity results in cardiovascular defects. *Mech Dev* 120: 811- 822

Gomez A; Wellbrock C; Gutbrod H; Dimitrijevic N; Scharl M (2001) Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 276 (5): 3333- 3340

Gomez A; Volff JN; Hornung U; Scharl M; Wellbrock C (2004) Identification of a second egfr gene in *Xiphophorus* uncovers an expansion of the epidermal growth factor receptor family in fish. *Mol Biol Evol* 21 (2): 266- 275

Goupille O; Barnier JV; Guibert B; Paly J; Djiane J (2000) Effect of PRL on MAPK activation: negative regulatory role of the C-terminal part of the PRL receptor. *Mol Cell Endocrinol* 159: 133- 146

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166: 557- 580

Hanks SK; Hunter T(1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576- 596

Harris RC; Chung E; Coffey RJ (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284: 2- 13

Hashimoto H; Yokoyama Y; Matsuo Y; Toyohara H; Kohno M; Sakaguchi M (1998) Existence of Two Isoforms of Extracellular Signal-Regulated Kinase in Fish. *J. Biochem.* 123 (6): 1031- 1035

Hashimoto H; Fukuda M; Matsuo Y; Yokoyama Y; Nishida E; Toyohara H; Sakaguchi M (2000) Identification of a nuclear export signal in MKK6, an activator of the carp p38 mitogen-activated protein kinases. *Eur. J. Biochem.* 267 (14): 4362- 4371

Heldin CH (1995) Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. *Cell* 80: 213- 223

Higashimoto Y; Nakao N; Ohkubo T; Tanaka M; Nakashima K (2001) Structure and tissue distribution of prolactin receptor mRNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*):

Conserved and preferential expression in osmoregulatory organs. *Gen Comp Endocrinol* 123: 170- 179

Hoegg S; Brinkmann H; Taylor JS; Meyer A (2004) Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol* 59: 190- 203

Honjo Y; Kniss J; Eisen JS (2008) Neuregulin-mediated ErbB3 signaling is required for formation of zebrafish dorsal root ganglion neurons. *Dev* 135: 2615- 2625

Huang C; Lee M; Chang G; Huang F; Lo T (1994) Molecular cloning and sequencing of a carp cDNA encoding mitogen-activated protein kinase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1220: 223- 225

Hubbard SR; Mohammadi M; Schlessinger J (1998) Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 273 (20): 11987- 11990

Hynes NE; Cella N; Wartmann M (1997) Prolactin mediated intracellular signaling in mammary epithelial cells. *J. Mammary Gl. Biol. Neopl.* 2 (1): 19- 27

Ihle JN; Kerr IM (1995a) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetic* 11 (2): 69- 74

Ihle JN; Witthuhn BA; Quelle FW; Yamamoto K; Silvennoinen O (1995b) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13: 369- 398

Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 211- 217

Jaillon O; Aury JM; Brunet F; Petit JL; Stange-Thomann N; Maucell E; et al. (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946- 956

Jones JT; Akita RW; Sliwkowski MX (1999) Binding specificities and affinities of *egf* domains for ErbB receptors. *FEBS Letters* 447: 227- 231

Kaczmarski RS; Mufti GJ (1991) The Cytokine Receptor Superfamily. *Blood* 5: 193- 203

Karnitz LM; Abraham RT (1995) Cytokine receptor signaling mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 320- 326

Kisseleva T; Bhattacharya S; Braunstein J; Schindler CW (2002) Signaling through JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1- 24

Koop BF; Davidson WS (2008) Genomics and the genome duplication in salmonids. In: *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress*, Ed.: Tsukamoto K; Kawamura T; Takeuchi T; Beard TD; Kaiser MJ, TERRAPUB: 77- 86

Körbel S (2005) Untersuchungen von Erythropoetinrezeptor-abhängigen Signalen durch funktionelle Proteomanalyse. Dissertation. Universität Rostock

Kraus MH; Issing W; Miki T; Popescu NC; Aaronson SA (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9193-9197

Krens GSF; He S, Spaink HP; Snaar-Jagalska BE (2006) Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish. *Gene Exp. Patterns* 6: 1019- 1026

Krogh A, Larsson B; von Heijne G; Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305 (3): 567- 580

Kültz D; Avila K (2001) Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129: 821- 829

Langenau DM; Zon LI (2005) The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nature Rev. Immunol.* 5: 307- 317

Larhammar D; Risinger C (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol* 3 (1): 59- 68

Lax I; Burgess WH; Bellot F; Ullrich A; Schlessinger J; Givol D (1988) Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Mol Cell Biol* 8 (4): 1831- 1834

Lax I; Bellot F; Howk R; Ullrich A; Givol D; Schlessinger J (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8 (2): 421- 427

LeRouzic P; Sandra O; Grosclaude J; Rentier-Delrue F; Jolois O; Tujague M; Pakdel F; Sandowski Y; Cohen Y; Gertler A; Prunet P (2001) Evidence of rainbow trout prolactin interaction with its receptor through unstable homodimerisation. *Mol Cell Endocrinol* 172: 105- 113

Leaman DW; Pisharody S; Flickinger TW; Commane MA; Schlessinger J; Kerr IM; Levy DE; Stark GR (1996a) Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of *c-fos* gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16 (1): 369- 375

Leaman DW; Leung S; Li X; Stark GR (1996b) Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J* 10: 1578- 1588

Lebrun JJ; Ali S; Ullrich A; Kelly PA (1995) Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J Biol Chem* 270 (18): 10664- 10670

Lehväslaiho H; Sistonen L; diRenzo F; Partanen J; Comoglio P; Hölttä E; Alitalo K (1990) Regulation by EGF is maintained in an overexpressed chimeric EGFR / *neu* Receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem* 42: 123- 133

- Lemmon MA**; Bu Z; Ladbury JE; Zhou M; Pinchasi D; Lax I; Engelman DM; Schlessinger J (1997) Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16 (2): 281- 294
- Leu J**; Yan S; Lee T; Chou C; Chen S; Hwang P; Chou C; Huang C (2000) Complete Genomic Organization and Promoter Analysis of the Round-Spotted Pufferfish *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, and *TYK2* Genes. *DNA Cell Biol.* 19 (7): 431- 446
- Livneh E**; Glazer L; Segal D; Schlessinger J; Shilo BZ (1985) The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* 40: 599- 607
- Lopez A**; Fernandez-Alonso M; Rocha A; Estepa A; Coll JM (2001) Transfection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnol Letters* 23: 481- 487
- Loretz CA**; Bern HA (1982) Prolactin and osmoregulation in vertebrates. *Neuroendocrinol* 35: 292- 304
- Luo J**; Lang M; Salzburger W; Siegel N; Stölting KN; Meyer A (2006) A BAC library for the goldfish *Carassius auratus auratus* (cyprinidae, cypriniformes). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306 (6): 567- 574
- Luo J**; Stadler PF; He S; Meyer A (2007) PCR survey of Hox genes in the goldfish *Carassius auratus auratus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308: 250- 258
- Lyons DA**; Pogoda H; Voas MG; Woods IG; Diamond B; Nix R; Arana N; Jacobs J; Talbot WW (2005) *erbb3* and *erbb2* are essential for Schwann cell migration and myelination in Zebrafish. *Curr Biol* 15: 513- 524
- MacDougall KC**; Mericko PA; Burnett KG (1999) Antigen receptor-mediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. *Dev Comp Immunol* 23 (3): 221- 230
- Manzon LA** (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol* 125 (2): 291- 310
- Marchi B**; Burlando B; Panfoli I; Donders F; Viarengo A; Gall G (2005) Heavy metal interference with growth hormone signalling in trout hepatoma cells RTH-149. *BioMetals* 18: 179- 190
- Martin A** (2001) Is tetralogy true? Lack of support for the “one-to-four rule”. *Mol Biol Evol* 18 (1): 89- 93
- Martoglio B**; Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8 (10): 410- 415
- Meyer A** ; Biermann CH; Orti G (1993) The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proceed Biol Sci* 252 (1335): 231- 236

- Meyer A;** Schartl M (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 11: 699-704
- Meyer A;** Van de Peer Y (2005) From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27 (9): 937- 945
- Minoo P;** Mohsen Zadeh M; Rottapel R; Lebrun J; Ali S (2004) A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood* 103 (4): 1398- 1407
- Moav B;** Liu Z; Groll Y; Hackett PB (1992) Selection of promoters for gene transfer into fish. *Mol Mar Tech Biotech* 1: 223- 245
- Moghadam HK;** Ferguson MM; Danzmann RG (2005) Evolution of Hox clusters in Salmonidae: a comparative analysis between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Mol Evol* 61 (5): 636- 649
- Moller S;** Croning MD; Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17 (7): 646- 653
- Morcinek JC;** Weisser C; Geissinger E; Schartl M; Wellbrock C (2002) Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene* 21 (11): 1668- 1678
- Moutoussamy S;** Kelly PA; Finidori J (1998) Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur J Biochem* 255: 1- 11
- Mungpakdee S;** Seo H; Angotzi AR; Dong X; Akalin A; Chourrout D (2008) Differential evolution of the 13 Atlantic Salmon Hox clusters. *Mol Biol Evol* 25 (7): 1333- 1343
- Newsted JL;** Giesy JP (1991) Characterization of epidermal growth factor binding to hepatic plasma membranes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 83 (3): 345- 353
- Newsted JL;** Giesy JP (2000) Epidermal growth factor receptor-protein kinase interactions in hepatic membranes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 22: 181-189
- Nishimoto S;** Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Reports* 7: 782- 786
- Oates AC;** Brownlie A; Pratt SJ; Irvine DV; Liao EC; Paw BH; Dorian KJ; Johnson SL; Postlethwait JH; Zon LI; Wilks AF (1999a) Gene duplication of zebrafish JAK2 homologs is accompanied by divergent embryonic expression patterns: only *jak2a* is expressed during erythropoiesis. *Blood* 94 (8): 2622- 2636

Oates AC; Wollberg P; Pratt SJ; Paw BH; Johnson SL; Ho RK; Postlethwait JH; Zon LI; Wilks AF (1999b) Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a *STAT1*-deficient human cell line. *Dev Dyn* 215: 352- 370

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim J, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775- 787

Ohashi H; Maruyama K; Liu Y; Yoshimura A (1994) Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1): 158- 162

Ohno S; Muramoto J; Christian L; Atkin NB (1967) Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family *Cyprinidae*. *Chromosoma* 23: 1- 9

Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York

O'Keefe E; Hollenberg MD; Cuatrecasas P (1974) Epidermal growth factor. Characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta, and other target tissues. *Arch Biochem Biophys* 164: 518- 526

Olayioye MA; Beuvink I; Horsch K; Daly JM; Hynes NE (1999) ErbB Receptor-induced activation of STAT transcription factors is mediated by Src Tyrosine kinases. *J Biol. Chem.* 274 (24): 17209-17218

Pacifici RE; Thomason AR (1994) Hybrid Tyrosine Kinase/Cytokine Receptors Transmit Mitogenic Signals in Response to Ligand. *J Biol Chem* 269 (3): 1571- 1574

Pang Y; Ge W (2002) Epidermal growth factor and TGF α promote zebrafish oocyte maturation in vitro: potential role of the ovarian activin regulatory system. *Endocrinology* 143 (1): 47- 54

Panopoulou G; Poustka AJ (2005) Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications – the adventure of a hypothesis. *Trends Genetics* 21 (10): 559- 567

Papanastasiou AD; Zarkadis IK (2005) Gene duplication of the seventh component of complement in rainbow trout. *Immunogenetics* 57 (9): 703- 708

Park E; Kang J; Seo J; Kim G; Chung J; Choi T (2008) Molecular cloning and expression analysis of the STAT1 gene from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *BMC Immunol* 9 (31): 1- 9

Pati D; Balshaw K; Grinwich DL; Hollenberg MD; Habibi HR (1996) Epidermal growth factor receptor binding and biological activity in the ovary of goldfish, *Carassius auratus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 270: 1062- 1072

Pellegrini S; Dusanter-Fourt I (1997) The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 248: 615- 633

Pircher TJ; Petersen H; Gustafsson JA; Haldosén LA (2005) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol. Endocrinol.* 13 (4): 555- 565

Plowman GD; Green JM; Culouscou JM; Carlton GW; Rothwell VM; Buckley S (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 366: 473- 475

Pozios K; Ding J; Degger B; Upton Z; Duan C (2001) IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280 (4): 1230- 1239

Prenzel N; Fischer OM; Streit S; Hart S; Ullrich A (2001) the epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11- 31

Prunet P; Sandra O; Le Rouzic P; Marchand O; Laudet V (2000) Molecular characterization of the prolactin receptor in two fish species, tilapia *Oreochromis niloticus* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: A comparative approach. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 1086- 1096

Rebl A (2007) Zur Pathogen-abhängigen Aktivierung der Immunantwort bei niederen Vertebraten: Struktur und Funktion von Faktoren der Toll-like-Rezeptor-Signalkaskade bei Samoniden. Dissertation. Universität Rostock

Risinger C; Larhammar D (1993) Multiple loci for synapse protein SNAP-25 in the tetraploid goldfish (evolucion/polymorphism/cyprinid/*Carassius auratus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10598- 10602

Robinson DR; Wu Y; Lin S (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548- 5557

Rocha A; Ruiz S; Coll JM (2005) Improvement of Transfection Efficiency of Epithelioma Papulosum Cyprini Carp Cells by Modification of Cell Cycle and Use of an Optimal Promoter. *Mar Biotechnol* 6: 401- 410

Rodrigues GA; Falasca M; Zhang Z; Ong SH; Schlessinger J (2000) A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 20: 1448- 1459

Roth C; Rastogi S; Arvestad L; Dittmar K; Light S; Ekman D; Liberles DA (2007) Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems, and organisms. *J Exp Zoo (Mol Dev Evol)* 308B: 58- 73

Rycyzyn MA; Wilson MR; Clem LW; Miller NW (1998) Evidence for Jak-STAT interaction in channel catfish lymphoid cells. *Dev Comp Immunol* 22 (4): 401- 406

Sakai M; Kobayashi M; Kawauchi H (1996) Mitogenic effect of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leukocytes in vitro. *Vet Immu Immunopatho* 53: 185- 189

San Martin R; Cáceres P; Azócar R; Alvarez M; Molina A; Vera MI; Krauskopf M (2004) Seasonal environmental changes modulate the prolactin receptor expression in an eurythermal fish. *J Cell Biochem* 92: 42- 52

Sadowski Y; Cohen Y; Le Rouzic P; Rentier-Delrue F; Djiane J; Prunet P; Gertler A (2000) Recombinant prolactin receptor extracellular domain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): subcloning, preparation, and characterization. *Gen Comp Endocrinol* 118: 302- 309

Sandra O; Sohm F; De Luze A; Prunet P; Edery M; Kelly PA (1995) Expression cloning of a cDNA encoding a fish prolactin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6037- 6041

Sandra O; LeRouzic P; Cauty C; Edery M; Prunet P (2000) Expression of the prolactin receptor (tiPRL-R) gene in tilapia *Oreochromis niloticus*: tissue distribution and cellular localization in osmoregulatory organs. *J Mol Endocrinol* 24: 215- 224

Santos CRA; Ingleton PM; Cavaco JEB; Kelly PA; Edery M; Power DM (2001) Cloning, characterization, and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* 121: 32- 47

Schlessinger J (1988) The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochem* 27: 3119- 3123

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211- 225

Schlessinger J (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110: 669- 672

Shiina T; Dijkstra JM; Shimizu S; Watanabe A; Yanagiya K; Kiryu I; Fujiwara A; et al. (2005) Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics* 56 (2): 878- 893

Shima A; Mitami H (2004) Medaka as a research organism: past, present and future. *Mechan. Dev* 121: 599- 604

Shinya M; Koshida S; Sawada A; Kuroiwa A; Takeda H (2001) Fgf signalling MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Dev* 128: 4153- 4164

Shuai K (1999) The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol* 71 (3-4): 405- 422

Snaar-Jagalska B; Krens SFG; Robina I; Wang L; Spaink HR (2003) Specific activation of ERK pathways by chitin oligosaccharides in embryonic zebrafish cell lines. *Glycobiol* 13 (10): 725- 732

Soltoff SP; Carraway KL; Prigent SA; Gullick WG; Cantley LC (1994) ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 14: 3550- 3558

Specker JL; King DS; Nishioka RS; Shirahata K; Yamaguchi K; Bern HA (1985) Isolation and partial characterization of a pair of prolactins released *in vitro* by the pituitary of a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7490- 7494

Spring J (1997) Vertebrate evolution by interspecific hybridisation – are we polyploid? FEBS Letters 400: 2- 8

Stein RA; Staros JV (2000) Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. J Mol Evol 50 (5):397- 412

Stein RA; Staros JV (2006) Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. BMC Evol Biol 6: 79

Stigge G (2005) Molekulare Mechanismen von Cytokinwirkungen bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*): Experimentelle Untersuchungen erythropoietin- und prolactininduzierter Signalprozesse. Dissertation. Universität Rostock

Sung SC; Fan TJ; Chou CM; Leu JH; Hsu YL; Chen ST; Hsieh YC; Huang CJ (2003) Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish (*Tetraodon fluviatilis*). Eur J Biochem 270 (2): 239- 252

Sussman CR; Plata C; Liang JO; Babcock GT (2007) Multiple roles of ErbB4, an epidermal growth factor receptor, in zebrafish embryonic development. FASEB J 21: 975.4

Taylor JS; Van de Peer Y; Meyer A (2001) Revisiting recent challenges to the ancient fish-specific genome duplication hypothesis. Curr Biol 11: 1005- 1007

Tse DLY; Chow BKC; Chan CB; Lee LTO; Cheng CHK (2000) Molecular cloning and expression studies of a prolactin receptor in goldfish (*Carassius auratus*). Life Sci 66: 593- 605

Ullrich A; Coussens L; Hayflick JS; Dull TJ; Gray A; Tam AW; Lee J; Yarden Y; Libermann TA; Schlessinger J; Downward J; Mayes ELV; Whittle N; Waterfield MD; Seeburg PH (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309: 418- 425

Ullrich A; Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61: 203- 212

Van der Geer P; Hunter T; Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Ann Rev Cell Biol 10: 251- 337

Van de Peer Y; Taylor JS; Braasch I; Meyer A (2001) The ghost of selection past: rates of evolution and functional divergence of anciently duplicated genes. J Mol Evol 53: 436- 446

Van de Peer Y; Taylor JS; Joseph J; Meyer A (2002) Wanda: a database of duplicated fish genes. Nucl Acids Res 30 (1): 109- 112

Venkatesh B; Gilligan P; Brenner S (2000) Fugu: a compact vertebrate reference genome. FEBS 476: 3- 7

Venkatesh B (2003) Evolution and diversity of fish genomes. Curr Opin Genetic Dev 13 (6): 588- 592

Volff JN; Schartl M (2003) Evolution of signal transduction by gene and genome duplication in fish. J Struct Funct Genomics 3: 139- 150

Volff JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity 94: 280- 294

Walter RB; Kazianis S (2001) *Xiphophorus* Interspecies Hybrids as Genetic Models of Induced Neoplasia. ILAR J 42 (4): 299- 321

Wang Y; Ge W (2004) Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells. Biol Reprod 71 (3): 749- 760

Wellbrock C; Geissinger E; Gomez A; Fischer P; Freidrich K; Schartl M (1998) Signalling by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk leads to activation of STAT5 in *Xiphophorus* melanoma. Oncogene 16: 3047- 3056

Wellbrock C; Schartl M (1999) Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59fyn, GRB2 and Shc. Eur J Biochem 260: 275- 283

Wellbrock C; Schartl M (2000) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59^{fyn} and the receptor tyrosine kinase Xmrk involved in malignant transformation of pigment cells. Eur J Biochem 267: 3513- 3522

Wells A (1999) Molecules in focus: EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol 31: 637- 643

Wilks AF; Harpur AG (1994) Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. Bioessays 16 (5): 313- 320

Wittbrodt J; Adam D; Malitschek B; Müller W; Raulf F; Telling A; Robertson SM; Schartl M (1989) Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphophorus*. Nature 341: 415- 421

Wittbrodt J; Lammers R; Malitschek B; Ullrich A; Schartl M (1992) the Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in *Xiphophorus* malignant melanoma. EMBO J 11 (11): 4239- 4246

Wolf K; Quimby MC (1962) Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science 135 (3508): 1065- 1066

Yada T; Misumi I; Muto K; Azuma T; Schreck CB (2004) Effects of prolactin and growth hormone on proliferation and survival of cultured trout leucocytes. Gen Comp Endocrinol 136 (2): 298- 306

Yarden Y; Ullrich A (1988a) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 57: 443- 478

Yarden Y; Ullrich A (1988b) Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochem* 27 (9): 3113-3119

Yarden Y; Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature Rev* 2: 127- 137

Yin Z; Kwang J (2000) Molecular cloning of a carp Jak3 from activated leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 74 (3- 4): 225- 236

Zhang Q; Raghunath PN; Xue L; Majewski M; Carpentieri DF; Odum N; Morris S; Skorski T; Wasik MA (2002) Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol* 168 (1): 466- 474

Zhang Y; Gui J (2004) Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection. - *Dev Comp Immunol* 28 (3): 211- 227

Zimmermann S; Moelling K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286: 1741- 1744

Zhou R; Cheng H; Tiersch TR (2001) Differential genome duplication and fish diversity. *Rev Fish Biol Fisheries* 11 (4): 331- 337

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC- Nr.	Accession Number (von DNA- Sequenzen aus Genbanken)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>copy</i> DNA
CIAP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
ConA	Concanavalin A
cPrIR	Prolactinrezeptor von <i>Cyprinus carpio</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene protein</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FBN	Forschungsinstitut für die Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
fPrIR	Prolactinrezeptor von <i>Oncorhynchus mykiss</i>
Gab	<i>Grb2-associated binding protein</i>
GAS	<i>IFNγ-activated-sites</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GH	<i>Growth Hormone</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
Grb	<i>Growth factor receptor binding protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
hEGFR	humaner EGF-Rezeptor
HEPES	N-2-Hydroethyl-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HR	Hybridrezeptor
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEK	<i>Mitogen Activated Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mRNA	Messenger RNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor -κB</i>
oPL	ovines placentares Lactogen
oPrl	ovines Prolactin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Prl	Prolactin
PrlR	Prolactinrezeptor
PTB	<i>Phosphotyrosine Binding</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rhEGF	humanes rekombinates EGF
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
Rnase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SH	<i>Src-Homology</i>
Shc	<i>Src homology 2</i>
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signaling</i>
SOS	<i>Son-of-Sevenless</i>
SRE	<i>Serum Response Element</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TMHMM	<i>Tied Mixture Hidden Markov Model</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid
Xmrk	<i>Xiphophorus melanoma receptor kinase</i>

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Humane Rezeptortyrosinkinase-Familien	3
Abbildung 2	EGF-Rezeptordimerisierung	5
Abbildung 3	EGF-induzierte Signaltransduktionswege	6
Abbildung 4	Cytokin-Klasse-1-Rezeptoren	10
Abbildung 5	Cytokininduzierte Signaltransduktionswege	14
Abbildung 6	Die Struktur von Januskinasen (JAK)	15
Abbildung 7	Die Struktur von STAT-Faktoren	15
Abbildung 8	Schematische Darstellung des Prolactin-induzierten JAK2- STAT5-Signalweges	16
Abbildung 9	Schematische Darstellung des Prolactin-induzierten Ras-Raf- MAPK- Signalweges	18
Abbildung 10	Schematische Darstellung des Expressionvektors pcDNA3.1	29
Abbildung 11	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA6/V5-His	29
Abbildung 12	Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pGEM [®] -T Easy	37
Abbildung 13	Schematische Darstellung der homologen Bereiche zwischen Zebrafisch-EGFR und Forellen-ESTs	42
Abbildung 14	RT-PCR-Nachweis des EST BX910271 in verschiedenen Forellenorganen	43
Abbildung 15	cDNA-Sequenzvergleich zwischen <i>D. rerio</i> -EGFR und Forellen-EST (BX910271)	43
Abbildung 16	cDNA-Sequenzvergleich zwischen <i>D. rerio</i> -EGFR und Forellen-EST (CX151061)	44
Abbildung 17	Schematische Darstellung der überlappenden Region der isolierten Oligonucleotide aus <i>O. mykiss</i>	46
Abbildung 18	EGFR-Teilsequenz aus <i>O. mykiss</i>	46
Abbildung 19	Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich des cDNA-Teilstückes des EGF-Rezeptors von Forelle und Schwertträger	47
Abbildung 20	Gegenüberstellung der EGFR-Abschnitte aus Forelle und Schwertträger	48
Abbildung 21	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes aus der Forelle mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	49
Abbildung 22	Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter EGFR-Sequenzen einschließlich <i>O. mykiss</i>	51

Abbildung 23	Schematische Darstellung der EGFR-Sequenzbereiche für die Primerauswahl	53
Abbildung 24	EGFR-Teilsequenz 1 aus <i>C. carpio</i>	54
Abbildung 25	Vergleich des EGFR-Abschnittes 1 aus Karpfen und des EGF-Rezeptors des Zebrabärblings	55
Abbildung 26	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes 1 aus Karpfen mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	57
Abbildung 27	Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter EGFR-Sequenzen einschließlich Teilsequenz 1 aus <i>C. carpio</i>	58
Abbildung 28	EGFR-Teilsequenz 2 aus <i>C. carpio</i>	59
Abbildung 29	Vergleich des EGFR-Abschnittes 2 aus Karpfen und des EGF-Rezeptors des Zebrabärblings	60
Abbildung 30	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teilstückes 2 aus Karpfen mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	60
Abbildung 31	Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter EGFR-Sequenzen einschließlich Teilsequenz 2 aus <i>C. carpio</i>	62
Abbildung 32	EGFR-Nachweis in Forellen-Organen	63
Abbildung 33	EGFR- Nachweis in Karpfen-Organen	64
Abbildung 34	Umklonierung des Hybridrezeptorkonstruktes	67
Abbildung 35	RT-PCR-Nachweis des Prolactinrezeptors in verschiedenen Karpfenorganen	68
Abbildung 36	Schematische Darstellung der Domänentopologie des Karpfen-Prolactinrezeptors	69
Abbildung 37	Sequenzausschnitte des isolierten Prl-Rezeptorabschnittes aus dem Karpfen	70
Abbildung 38	Konstruktion des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors	72
Abbildung 39	Transmembrandomäne des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors	73
Abbildung 40	RT-PCR-Nachweis der Transfektion des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors	76
Abbildung 41 a- b	Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors	77
Abbildung 42	Western Blot zum Nachweis des hEGF/cPRL-Hybridrezeptors	77
Abbildung 43	Western Blot zum Nachweis von MAP-Kinasen in EPC und CLC	79
Abbildung 44 a- b	Western Blot zum Nachweis von STAT-Faktoren in EPC und CLC	79

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primärantikörper	32
Tabelle 2	Verwendete Sekundärantikörper	32
Tabelle 3	Sequenz der Primer für die Identifizierung des EGF-Rezeptors in <i>O. mykiss</i>	45
Tabelle 4	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Abschnittes aus <i>O. mykiss</i> mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	52
Tabelle 5	Sequenz der Primer für die Identifizierung des EGF-Rezeptors in <i>C. carpio</i>	53
Tabelle 6	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teil 1 aus <i>Cyprinus carpio</i> mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	56
Tabelle 7	Aminosäuresequenzvergleich des EGFR-Teil 2 aus <i>Cyprinus carpio</i> mit ausgewählten EGFR-Sequenzen	61
Tabelle 8	Sequenzen der Primer für die Synthese des cPrl-Rezeptor-Abschnittes	69
Tabelle 9 a- b	Vergleich der Aminosäuresequenzen und Domänenzugehörigkeit	74

12 Anhang

cDNA-Sequenzen

EGF-Rezeptor (part); *Oncorhynchus mykiss*;
AC- Nr.: FM865854

```

1 ctggagaacc tgcgcatcat ccgaggccac actctctatg acagtggctt tgccttggct
61 gtggtgctga actataacaa gtccatgcga gcaggcacca ctgagctgcc tctgaccagc
121 ctcacagaga tcctgaaagg aggagtgaag ttctcagaca accagctgtg taacgtggag
181 accatccagt ggttggacat tgtaaacagt aacagcaaac ccaacatgca gttacctgaa
241 cccagcaaca atcggctctg taaaagatgt gatcctggat gcttcaatgg ttcattgttg
301 gcgcccggcc cagaacactg ccagacattg acgaagctga actgtgcccc gcagtgtctt
361 aagagggtga aggggtccgtc tcccacgcac tgctgcaacg aacactgtgc tgcaggctgc
421 actggaccca gacctacaga ctgtctggcc tgccgggact ttcaggatga cgggacgtgt
481 aaagactcgt gtccgcgcct cctgctctac gaccgcaacc ttcaccaact agtcaacaac
541 ccagacggga agtacaactt cggggccacc tgcgtcaaga cctgcctca taactatgtg
601 gtgacagacc atggagcgtg cgttcggaca tgcagtgggtg acacgtacga agtggacgag
661 ggaggagtca ggaagtgcaa gaagtgtgat ggactgtgcc ccaaagtttg caatggactt
721 ggaatgggga aacttgacaa aattctgtca atcaacgcca ccaacattga cacattcaaa
781 aactgcacca aaatcaatgg gaacattgct attatctaca cgtctatcca t

```

EGF-Rezeptor (part1); *Cyprinus carpio*
AC- Nr.: FM865855

```

1 ttgtcctcct gtaactacaa caacagcatc gggcaaggcg tgaaccagtt gcttctgact
61 agcttaactg aaatactgaa ggggtgggata atatthttcca gtaacaatca tttatgtaac
121 gtggagtcca tcctgtggag tgacattctg aacttgaaga gccagcctaa aatcagagag
181 ccggaaccaa gctcagcaga aactgttaag aagtgtgacc ggagctgtta caatgggtcc
241 tgttggggcc ctagtcccca aaactgcca aaaatgacta gggatgatctg tgcggagcag
301 tgttcgggga ggtgtaaggg gcccaaacc attgactgct gtaatgaaca ttgtgctgct
361 ggctgc

```

EGF-Rezeptor (part2); *Cyprinus carpio*
AC- Nr.: FM865856

```

1 cctccaccgt ccagcttata acccagtttg atgccctacg gctgtttgcg ggactacgtc
61 agagaaaaca aggacaacat cggtctctca cacctgctca actgggtgtg gcagattgct
121 aagggtatga gttacctaga agagcgtcat cttgtgcaca gagacttggc tgctcgtaat
181 gtggttgtaa agaccctca gcatgtgaag atcactgatt ttggcttggc caagctgttg
241 aatgccgatg agaaggagta tcacgcagat ggcggaaagg tgccaataaa atggatggca
301 ctggaatcca tctgacacg aacatacacc caccagagtg acgtctggag ttatgggtgtg
361 acagtctggg ac

```

cDNA- Sequenz des hEGF-/cPrl-Hybridrezeptors (3057 bp)

```

1 ATGCGACCCCT CCGGGACGGC CGGGGCAGCG CTCCTGGCGC TGCTGGCTGC GCTCTGCCCC 60
61 GCGAGTCGGG CTCTGGAGGA AAAGAAAGTT TGCCAAGGCA CGAGTAACAA GCTCACGCAG 120
121 TTGGGCACTT TTGAAGATCA TTTTCTCAGC CTCCAGAGGA TGTTC AATAA CTGTGAGGTG 180
181 GTCCTTGGGA ATTTGGAAAT TACCTATGTG CAGAGGAATT ATGATCTTTC CTTCTTAAAG 240
241 ACCATCCAGG AGGTGGCTGG TTATGTCCTC ATTGCCCTCA ACACAGTGGA GCGAATTCCT 300
301 TTGAAAAACC TGCAGATCAT CAGAGGAAAT ATGTACTACG AAAATTCCTA TGCCTTAGCA 360
361 GTCTTATCTA ACTATGATGC AAATAAAACC GGACTGAAGG AGCTGCCCAT GAGAAATTTA 420
421 CAGGAAATCC TGCATGGCGC CGTGC GGTTT AGCAACAACC CTGCCCTGTG CAACGTGGAG 480
481 AGCATCCAGT GCGGGGACAT AGTCAGCAGT GACTTTCTCA GCAACATGTC GATGGACTTC 540
541 CAGAACCACC TGGGCAGCTG CAAAAAGTGT GATCCAAGCT GTCCCAATGG GAGCTGCTGG 600
601 GGTGCAGGAG AGGAGAACTG CCAGAAACTG ACCAAAATCA TCTGTGCCCA GCAGTGTCTC 660
661 GGGCGCTGCC GTGGCAAGTC CCCAGTGAC TGCTGCCACA ACCAGTGTGC TGCAGGCTGC 720
721 ACAGGCCCCC GGGAGAGCGA CTGCC TGGT TGCCGCAAAT TCCGAGACGA AGCCACGTGC 780
781 AAGGACACCT GCCCCCCACT CATGCTCTAC AACCACCA CGTACCAGAT GGATGTGAAC 840
841 CCCGAGGGCA AATACAGCTT TGGTGCCACC TGCGTGAAGA AGTGTCCCCG TAATTATGTG 900
901 GTGACAGATC ACGGCTCGTG CGTCCGGGGC TGTGGGGCCG ACAGCTATGA GATGGAGGAA 960
961 GACGGCGTCC GCAAGTGTA GAAAGTGC GAA GGGCCTTGCC GCAAAGTGTG TAACGGAATA 1020
1021 GGTATTAGTG AATTTAAAGA CTCACTCTCC ATAAATGCTA CGAATATTA AACTTCAA 1080
1081 AACTGCACCT CCATCAGTGG CGATCTCCAC ATCTGCCGG TGGCATTAG GGTGACTCC 1140
1141 TTCACAGATA TCCTCCTCT GGATCCACAG GAAC TGATA TTCTGAAAAC CGTAAAGGAA 1200
1201 ATCACAGGTT TTTTGCTGAT TCAGGCTTGG CCTGAAAACA GGACGGACCT CCATGCCCTT 1260
1261 GAGAACCTAG AAATCATACG CGGAGGACC AAGCAACATG GTCAGTTTTT TCTTGAGTC 1320
1321 GTCAGCCTGA ACATAACATC CTTGGGATTA CGCTCCCTCA AGGAGATAAG TGATGGAGAT 1380
1381 GTGATAAATTT CAGGAAACAA AAATTTGTGC TATGCAAATA CAATAAACTG GAAAAAACTG 1440
1441 TTTGGGACCT CCGGTCAGAA AACC AAAAT ATAAGCAACA GAGGTGAAA CAGCTGCAAG 1500
1551 GCCACAGGCC AGGTCTGCCA TGCCTTGTGC TCCCCGAGG GCTGCTGGGG CCCGGAGCCC 1560
1561 AGGGACTGCG TCTCTTGCCG GAATGTCAGC CGAGGCAGGG AATGCGTGGA CAAGTGCAAC 1620
1621 CTTCTGGAGG GTGAGCCAAG GGAGTTTGTG GAGAACTCTG AGTGCATACA GTGCCACCCA 1680
1681 GAGTGCCCTGC CTCAGGCCAT GAACATCACC TGCACAGGAC GGGGACCAGA CAACCGTATC 1740
1741 CAGTGTGCC ACTACATTGA CGGCCCCAC TGCGTCAAGA CCTGCCCGGC AGGAGTCATG 1800
1801 GGAGAAAAACA ACACCTGGT CTGGAAGTAC GCAGACGCCG GCCATGTGTG CCACCTGTGC 1860
1861 CATCCAAACT GCACCTACGG ATGCACTGGG CCAGGTCTTG AAGGCTGCC AACAAATGGG 1920
1921 CCCAAGATCC CGGATATCCT GTGGATCATA ATCAGGATAT TCTCTGTCTT CATCGTCTC 1980
1981 ATCCTCACCT GACTCTAAA TGTGAAAAGA AACAGTGTGA AGCTTTGTTT GCTGCCTCCT 2040
2041 GTTCTGGAC CAAAAATCAA AGGATTCGAC AAACAATTC TCAAGAGCGG AAAGACAGAG 2100
2101 GAAGTTTTCA ATTCTCTGGT GATCCAAGGT TTCCCTCAA CTATCGATTA CGACGACTTA 2160
2161 CTGGTGGAGT ACCTTGAGGT GTATGACAAT GAGGAGCAAG AATTGGTTCT GGACGGTAAA 2220
2221 GATCTATCAG AGGACTGCAT AAAGTCCAAA AGCCATCAG ATTGTGACTC AGGCCGGGGA 2280
2281 AGCTGCGACA GTCGCACTCT GCTTTTGGAG AAGTGCATGG TGGGACGGA AGGGAGTGGA 2340
2341 AGCGATCAAC ATCAGTACAG CCAGCATGGA AAAACGAGCT GGGCTTCTAC TGAAAGCAGT 2400
2401 GAATGCCAGG GTCTCGAACC TGGTTCTCCA GAATCCTCTG ATGGACGTGT GAAGACTTGG 2460
2461 CCTGTTGTGT TTTCGTCTCC GCAACCTCAC CACCATTACC AAGCAGAAAC TGTGAAACCG 2520
2521 GTCTACCACA GCGTCCCAGA GATCCTCAAC CATTATCGC CACACATAAT GCCAACCAAC 2580
2581 TACCACCACC TACCACATCA GGACATCCA CAACAGGAGG GCCGCCACGG TAAACCAGCC 2640
2641 TGGCGACATT CCCAAAGCTA CAACCACTTT AACCTGGACG GCCTCAACAC TCCTGCTCCT 2700
2701 GCGTATCTC CGTCACGTT TCTAGAATAC GTGGAGGTGC AAAGGGTCAA CCCAGAGAAT 2760
2761 ATGCTACTGC TTAGGCCACT TTCGGACCCA AACC GGAACTGAGGGGTC CGATTATGCT 2820
2821 GGGGAGGACT ACAGCAAGGT CAAAGAAGTA ACATCAAACA ATATTCTGCT TCTGCGGAGG 2880
2881 GATACGTCCC ATTA CTGTGT GGACGATTAC AGCCAGGCTA GTC AATGCAC AACCCAGCAA 2940
2941 CCACCTCATC CCTGCAAACC TGTCATCTAC CAATCGAACA GTGGGATGCC ACAGGAAGGC 3000
3001 ATGAGGGTGA TGGGAAATGG TTATGTGGAC TCAACAGTCT TAATGCCATC CTACTAG 3057

```

Für Vergleichszwecke herangezogene Sequenzen mit Accession-Nummern

Alle Sequenzen sind, sofern nicht gekennzeichnet, der NCBI- Genbank entnommen.

Organismus	AC- Nr. der verwendeten Gen-/ Aminosäuresequenz
<i>Anopheles gambiae</i> (Gambische Malariaeumücke)	EGFR (XM_314949)
<i>Bos taurus</i> (Rind)	EGFR (XM_592211)
<i>Canis familiaris</i> (Hund)	EGFR (XM_533073)
<i>Ciona intestinalis</i> (Schlauchseescheide)	EGFR (NM_001078516)
<i>Cyprinus carpio</i> (Karpfen)	PrIR (AY044448)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	EGFR (AY332223) ErbB2 (NM_200119) ErbB3a (NM_001005320), ErbB3b (NM_001014826) ErbB4 (EF190457)
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)	EGFR (NM_057410)
<i>Gallus gallus</i> (Huhn)	EGFR (NM_205497)
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	EGFR (NM_005228)
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)	EGFR (XM_001107305)
<i>Mus musculus</i> (Maus)	EGFR (NM_207655)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	PrIR (NM_001124599)
<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	EGFR (NM_031507)
<i>Sus scrofa</i> (Schwein)	EGFR (NM_214007)
<i>Takifugu rubripes</i> (Japanische Kugelfisch)	EGFRa (ENSTRUP00000029908)* EGFRb (ENSTRUP00000044719)*
<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Grüne Kugelfisch)	EGFRa (ENSTNIP00000017881)* EGFRb (ENSTNIP00000002388)*
<i>Xiphophorus xiphidium</i> (Schwertträger)	EGFRa (AY230135) EGFRb (AAD10500)

* Sequenzen sind „<http://ensembl.genomics.org.cn>“ entnommen.

Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer	5'-3'- Sequenz
hEGFR_Notlf	AGGCGGCCGCTTATGCGACCCTCC
PrlRCarp_EcoRVf	CAACTGATATCCTGTGGATCATAATCACGATATTC
PrlRCarp_Xholr	TAGGACTCGAGCTAGTAGGATGGCATTAAAGACTG
PrlRCarp_260f	CAAGCAGCAGGTGTCAGTGC
PrlRCarp_763r	GTAGACTGAACACATTGTAGTACT
PrlRTrout_250f	GAGTGTCCAGACTACCATAACAG
PrlRTrout_801r	ACAGTGCTTCACACTGCTTCTG
EgfRTrout_f1	CAGTGCTCTAAGAGGTGTAAGG
EgfRTrout_f2	CTGCAACGAACACTGTGCTGC
EgfRTrout_r1	CCAGAACTCTTAGCTTCTTTAGC
EgfRTrout_f3	CTCTTTGGTCTCCTATGCGTTG
EgfRTrout_r3	CACTGCTGGGCACAGTTCAG
Hybrid_r2	CTAGAAGGTGGGCATCGTGG
EgfRDanio_f1	GACCTGTCCTTCTCAAGAGC
EgfRDanio_r1	CCAGCAGCACAGTGTTCATTA
EgfRDanio_f2	GAGCATCCAGGAAGTTGGTGG
EgfRDanio_r2	CAGACAGTCTGTAGGTCTGGG
EgfRDanio_f3	CTCTGGAGAACCTGCGCATC
EgfRDanio_r3	ATGTCTTGATGCACGTCGCCC
EgfRDanio_f4	CGCATCATTCGCGGACACTC
EgfRDanio_r4	GTGATCCGTCACCACATAGTTG
EgfRDanio_f5	GAAGAGCCTGCCTACAATCG
EgfRDanio_r5	CCTCTGAATGTGGTGTGAG
EgfRDanio_f6	CAAAAGTGTGCAATGGGTTG
EgfRDanio_r6	TGAGCAGACATTCAGGATCG
EgfRDanio_f7	TTCTTGCAACCTGCTGAATG
EgfRDanio_r7	AGTGATGAGCTGCACTGTGG
EgfRDanio_f8	CACACTCATCTGGAAATACGC
EgfRDanio_r8	CATCCATTATCTCCTTGTTAGC
EgfRDanio_f9	CCACGTCTCCCAAAGCTAAC
EgfRDanio_r9	GGTCTGCTCTCAGCATCAATC
EgfRDanio_f10	GGGACGAAACCTTATGATGG
EgfRDanio_r10	CCGTTGGTGTGTGTTTTGAG
EgfRDanio_f11	AGTGCCCAATCACAGCTTCT
EgfRDanio_r11	TGCGTCTCTACTGGCATCAC
EgfRXiph_f1	CACTTCCATACAGGAGCTTCG
EgfRXiph_r1	GCATCCTGCTGCACAATGCTC
EgfRXiph_f2	GTTGTTACAATGGTTCATGTTGG
EgfRXiph_r2	GACCACGTCTCCGTCGCTG
EgfRXiph_f3	GAAGAGCATGAACTCACTCTCG
EgfRXiph_r3	CGTTCATGCGTAGACACTCAG
EgfRXiph_f4	GGAAGTGTACAGCAGACGGC
EgfRXiph_r4	CTGGAGCAGTCTGCGCATTG
EgfRXiph_f5	GGTCTCTCCATAATTGCAGCTG
EgfRXiph_r5	CTGAACACACCAGTTGAGCAG
EgfRXiph_f6	CTGCCTCACCTCGACGGTTC
EgfRXiph_r6	GCTGCTGAAGAAGCTGTGCTG
EgfRXiph_f7	CGAAGATGGCTCGAGATCCAC

EgfRXiph_r7	CTCTGCTGCTGGTATGTGTCC
fHR_EgfR	GTGCATACAGTGCCACCCAG
rHR_PrlR	GTACTCCACCAGTAAGTCGTC
HRc1_r	CTTCCTCCATCTCATAGCTGTC
HRc2_f	GTGGTGACAGATCACGGCTC
HRc2_r	GCAGTTTGGATGGCACAGGTG
HRc3_f	CTGGTCTGGAAGTACGCAGAC
HRc3_r	GGTGTAGGTGGTGGTAGTTGG
HRc4_f	GTGAAACCGGTCTACCACAGC

Verwendete Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden auf einen pH- Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

	Zusammensetzung
Mischmedium	12,22 g/l Iscove's DMEM 10,69 g/l Ham's F12 2,00 g/l NaHCO ₃ 10 % FKS
RPMI- Medium	10,49 g/l RPMI 1640 2,00 g/l NaHCO ₃ 10 % FKS
Leibovitz- Medium	15,00 g/l Leibovitz L-15 0,85 g/l NaHCO ₃ 2,38 g/l HEPES 10 ml/l Penicillin/Streptomycin 1 ml/l Gentamycin 10 % FKS
Medium 5	5,32 g/l MEM mit Hank's Salzen 4,76 g/l MEM mit Earle's Salzen 1,52 g/l NaHCO ₃ 10 ml/l non-essential Aminoacids 0,12 g/l Na-pyruvat 10 % FKS

Verwendete Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung
10x PBS	137 mM NaCl 27 mM KCl 17 mM KH ₂ PO ₄ 188 mM Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O
Fixierlösung: Methanol- Aceton	100 ml Aceton 100 ml Methanol
Fixierlösung: Paraformaldehyd	4 % PFA in PBS bei 60°C lösen
Lysepuffer	1 mM PMSF in 1x Cell Lysis buffer

5x Bradford-Reagenz	0,5 mg/ ml Coomassie Blue G250 23,5 % Ethanol 50 % Phosphorsäure
3x SDS-Probenpuffer	6 % (w/v) SDS 30 % Glycerin 15 mM EDTA 187,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 10 % β -Mercaptoethanol
10 % Trenngel (SDS-PAGE) 15 ml	5,9 ml A.dest. 5,0 ml 30 % (v/v) Acryl- Bisacrylamid 3,8 ml 1,5 M Tris [pH 8,8] 150 μ l 10 % SDS 150 μ l 10 % APS 6 μ l TEMED
5 % Sammelgel (SDS-PAGE) 5 ml	3,4 ml A.dest 0,9 ml 30 % (v/v) Acryl- Bisacrylamid 0,6 ml 1,5 M Tris [pH 6,8] 50 μ l 10 % SDS 50 μ l 10% APS 5 μ l TEMED
APS (10 %) (SDS- PAGE)	0,1 g/ ml Ammoniumpersulfat
Laufpuffer (SDS- PAGE)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Anodenpuffer 1 pH 10,4 (Western Blot)	0,3 M Tris-Base 20 % Methanol
Anodenpuffer 2 pH 10,4 (Western Blot)	25 mM Tris-Base 20 % Methanol
Kathodenpuffer (pH 9,4) (Western Blot)	40 mM 6-Amino-hexansäure 0,01 % SDS 20 % Methanol
Ponceau-S-Lösung	0,2 % Ponceau-S 3 % Trichloressigsäure
PBS-T-Puffer	0,05 % Tween 20 in 1x PBS
Blockierlösung	5% Magermilch oder BSA in PBS- T- Puffer
Solution A (ECL)	20 mM Tris-HCl (pH 8,6) 0,25 mg/ ml Luminol
Solution B (ECL)	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7) 2 % SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	60 % Glycerin 10 mM Tris-HCL (pH 8,0) 2,5 mg /ml Bromphenolblau
10x TBE-Puffer (DNA-Gelelektrophorese)	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 20 mM Na ₂ EDTA
TY- Kulturagar mit Tetracyclin	1,6 % Baktotrypton 1,0 % Hefeextrakt 85,6 mM NaCl 2,0 % Agar

nach dem Autoklavieren: Tetracyclin	0,1 % Tetracyclin
SOB- Flüssigmedium nach dem Autoklavieren: MgCL ₂ MgSO ₄ steril filtrieren	2,0 % Baktotrypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCL ₂ 10 mM MgSO ₄
PSI- Flüssigmedium nach dem Autoklavieren: MgSO ₄ steril filtrieren	2,0 % Baktotrypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 5,0 mM KCl 20 mM MgSO ₄
RF1 pH 5,8 pH mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren bei -20°C lagern	15 % Glycerin 100 mM RbCl 50 mM MnCl 30 mM KCl 10 mM CaCl ₂
RF2 pH 6,8 pH mit NaOH einstellen, steril filtrieren bei -20°C lagern	15 % Glycerin 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 10 mM MOPS
SOC- Flüssigmedium	2,0 % Baktotrypton 0,5 % Hefeextrakt 20 mM Glucose 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2,5 mM KCl
ampicillinhältiger IPTG/X-Gal- Nähragar nach dem Autoklavieren: X-Gal IPTG Ampicillin	1,6 % Baktotrypton 1,0 % Hefeextrakt 85,6 mM NaCl 2,0 % Agar 4,0 % X-Gal 0,04 mM IPTG 0,1 mg/ml Ampicillin
TY- Flüssigmedium	1,6 % Baktotrypton 1,0 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl 0,1 mg/ml Ampicillin
Lösung I (Plasmid- Minipräparation)	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA
Lösung II (Plasmid- Minipräparation)	0,2 N NaCl 1,0 % SDS
Lösung III (Plasmid- Minipräparation)	3,0 M Kaliumacetat 11,5 % Eisessig

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. em. Siegl für die Bereitstellung eines hoch interessanten Themas und Ihre intensive wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotionsarbeit. Besonders für Ihre Bereitschaft und Ihr Vertrauen, meine Arbeit auch im verdienten Ruhestand weiter zu betreuen, möchte ich Ihr hier ausdrücklich danken.

Dr. Bernd Köllner, Labor für Immunologie, FLI Riems, möchte ich für die Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen, die fachlichen Ratschläge und für die Möglichkeit eines intensiven Praktikums in seiner Arbeitsgruppe, welches entscheidende Impulse für die Durchführung meiner Arbeit gab, danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Seyfert vom FBN Dummerstorf, Bereich Molekularbiologie, für die Möglichkeit, jederzeit Versuche in den Labore seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Gleichmaßen danke ich Frau Deutscher vom FBN Dummerstorf für die Durchführung der Sequenzierungen.

Für seine große Hilfsbereitschaft, die wertvollen fachlichen Ratschläge und seine stetige gute Laune danke ich Dr. Alexander Rebl, Bereich Molekularbiologie des FBN Dummerstorf, ganz besonders.

Den technischen Mitarbeitern Antje Hlawa und Heidrun Blunk möchte ich herzlich danken für das sehr nette Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung im Labor und den ein oder anderen „Kaffeeklatsch“.

Meinen Freunden danke ich für die entspannenden und unvergessenen Stunden zwischendurch. Vor allem Doreen möchte ich für die vielen Gespräche und ihr Verständnis danken.

Zu guter Letzt und von ganzen Herzen danke ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meiner Schwester für die immerwährende Unterstützung, Aufmunterung und ihre Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden keine außer die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Rostock, Januar 2009

Anne Stielow