

Joachim Wahl

Dr. sc. hum.

Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Tetraspanins D6.1A

Geboren am 07. Januar 1971 in Obermarchtal

Diplom der Fachrichtung Biotechnologie am 15. August 1998 an der Fachhochschule
Mannheim

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel-Doeberitz

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Tetraspanins D6.1A als Organisator multimolekularer Komplexe auf Karzinomzellen der Ratte. Das Interesse an dem Tetraspanin D6.1A als potenziellem Metastasierungs-assoziierten Antigen in unserem Labor beruht auf einem Screening, dessen Ziel es war, Oberflächenproteine von Tumorzellen zu identifizieren, die relevant für Tumorprogression und Metastasierung sein könnten. Im Rahmen dieses Screens wurden Antikörper gegen fünf Antigene generiert, die ausschließlich die metastasierende und nicht die nicht-metastasierende Sublinie eines Pankreasadenokarzinoms erkennen. Als eines dieser fünf Antigene wurde D6.1A identifiziert. Eine Reihe von Befunden unserer und anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass D6.1A als Organisator von Proteinkomplexen mit besonderen Fähigkeiten, Signale zu verarbeiten und in die Zelle zu senden, eine besonders wichtige Rolle im Kontext der Tumorprogression zukommen könnte. Um mögliche Metastasierungs-relevante Funktionen von D6.1A definieren zu können, wurden D6.1A Komplexe wie sie auf Karzinomlinien vorliegen zunächst biochemisch charakterisiert. Der in Gegenwart von stringentem Detergenz stabile Kern-Komplex direkt interagierender Proteine ist dabei von besonderer Bedeutung. Dieser Kern-Komplex umfasst neben den Tetraspaninen CD9 und CD81 ein Mitglied der Immunoglobulin-Familie von Proteinen, das "prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor regulatory protein" oder FPRP. Dieses Protein verdankt seinen Namen der Eigenschaft, die Bindung des Agonisten $PGF_{2\alpha}$ an seinen Rezeptor zu inhibieren. Die Interaktion von D6.1A mit FPRP erfüllt, genau wie die Interaktionen mit CD9 und CD81, die Kriterien für eine primäre Interaktion: Sie erfolgt früh während der Biosynthese, ist quervernetzbar, hält stringenten Ly-

sisbedingungen stand und ist von hoher Stöchiometrie. Neben der Identifizierung dieser Proteine als primäre Interaktionspartner von D6.1A wurde auch die molekulare Grundlage der Interaktion mit CD9 evaluiert. Mit Hilfe chimärer Konstrukte aus D6.1A und dem unter diesen Bedingungen nicht interagierenden Tetraspanin CD151 wurde ermittelt, dass die EC2 Domäne von D6.1A für die Interaktion mit CD9 verantwortlich ist. Dagegen sind konservierte polare Aminosäuren in den Transmembrandomänen von D6.1A für diese Interaktion nicht von Bedeutung.

Mildere Detergenzien erlauben den Nachweis weiterer D6.1A-assoziiierter Moleküle. Dazu zählt das Tetraspanin CD151, das wahrscheinlich die Assoziation von D6.1A mit dem ebenfalls nachweisbaren $\alpha 3 \beta 1$ Integrin vermittelt. Als weiterer molekularer Partner von D6.1A unter solch milden Bedingungen der Membrandissoziation wurde das epitheliale Markerprotein EpCAM identifiziert. Die Assoziation von D6.1A mit EpCAM stellt wahrscheinlich eine indirekte Assoziation dar, da sie von niedriger Stöchiometrie ist und der Lyse in stringenteren Detergenzien nicht standhält.

Die dargestellten Daten belegen eine enge Assoziation von D6.1A mit Proteinkomplexen, die das Tetraspanin CD9 enthalten. In der Tat ist es nicht gelungen, ein D6.1A-assoziiertes Element zu identifizieren, das nicht auch mit CD9 interagiert. Dennoch vermag D6.1A Effekte zu vermitteln, die CD9 nicht hervorzurufen in der Lage ist, und die wichtig für das maligne Potenzial von Tumorzellen sein könnten. Transfiziert man D6.1A in HT1080 Zellen, so lässt sich ein deutlicher Anstieg an synthetisiertem MMP-2 und vor allem MMP-9 im Überstand dieser Zellen nachweisen. Transfektion mit CD9 cDNA resultiert hingegen eher in eine Abnahme von MMP-9. Werden CD9 exprimierende Zellen mit D6.1A übertransfiziert, so ist wiederum ein Anstieg der Gelatinasen im Kulturüberstand zu messen. Northern-Blot Analysen ergaben, dass der Anstieg an MMP-2 und MMP-9 auf vermehrter Transkription oder einer gesteigerten Stabilität der kodierenden mRNA in D6.1A-exprimierenden Zellen basiert. Aufgrund des Einflusses von Metalloproteasen auf zahlreiche bei der Metastasierung wichtigen Schritte, könnte die Fähigkeit von D6.1A, MMP-Produktion zu induzieren, von entscheidender Bedeutung für die vermutete Tumorprogression fördernde Wirkung dieses Tetraspanins sein. Die Aufklärung des Mechanismus, der über die Expression von D6.1A zur Synthese von MMP-2 und MMP-9 führt, ist Ziel weiterführender Studien.