

Christian Patrick Schaaf
Dr. med.

Identifikation neuer Interaktionspartner des MET-Rezeptors

Geboren am 17.06.1978 in Speyer
Staatsexamen am 29.11.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus R. Bartram

Auch zwanzig Jahre nach ihrer Entdeckung fasziniert die molekulare Komplexität der **Rezeptor-Tyrosinkinase MET**, des Rezeptors für den hepatozellulären Wachstumsfaktor (HGF). Ganz verschiedenartige zelluläre Prozesse werden durch Stimulation des MET-Rezeptors induziert. Seine Bedeutung in der Embryogenese, Karzinogenese und bei zahlreichen Regenerationsprozessen wurde beschrieben. Dabei stellt sich wie bei vielen Mitgliedern der Rezeptor-Tyrosinkinasen-Familie auch für MET die Frage, wie all diese unterschiedlichen Prozesse durch die Aktivierung eines einzigen Proteins und unter Verwendung eines beschränkten Spektrums bekannter intrazellulärer Signal-Moleküle vermittelt werden können.

Beim Screening einer *rat embryo* cDNA-Bibliothek auf Interaktion mit TPR/MET, dem onkogenen Fusionsprotein von MET, konnten im **Yeast Two-Hybrid System** mehrere potentielle, neue Interaktionspartner identifiziert werden. 13 interessant erscheinende cDNAs wurden ausgewählt und anschließend in Yeast Two-Hybrid Untersuchungen getrennt auf Interaktion mit MET allein und TPR allein analysiert. Zwölf der 13 Klone zeigten Wechselwirkung mit MET, eines (LAMININ B1) mit TPR. Die Sequenz-Analyse der Interaktionspartner von MET ergab folgende Proteine: SNAPIN, ZINC-FINGER PROTEIN 29, VAV 1, SORTING NEXIN 2, DEATH ASSOCIATED PROTEIN KINASE 3, SMC-1, ALPHA-2-MAKROGLOBULIN, CENP C und TID-1, darüber hinaus GRB 2 als bereits bekannter Interaktionspartner von MET und zwei Sequenzen, welche für unterschiedliche Abschnitte eines bislang unbekanntes Proteins codieren.

Durch **Mammalian Two-Hybrid Analysen** konnten die in Hefe gefundenen Interaktionen im eukaryontischen Kontext weitgehend bestätigt werden. Alle zwölf Interaktionspartner wurden auf Wechselwirkung mit TPR/MET wie auch auf Wechselwirkung mit MET allein untersucht. Bemerkenswert ist die bevorzugte Bindung von SMC-1 an TPR/MET im

Gegensatz zu allen anderen Proteinen, welche eine stärkere Interaktion mit MET allein erkennen lassen.

Der Nachweis direkter Interaktion zwischen radioaktiv markiertem TPR/MET-Protein und verschiedenen potentiellen Substrat-Molekülen wurde durch *in vitro* Bindungsstudien im **Far-Western-System** erbracht. Dabei bindet TPR/MET direkt an DAPK-3, SMC-1, CENP C, TID-1 und an den bekannten Interaktionspartner GRB 2. Nur schwach ist die *in vitro* Interaktion mit SNAPIN, dem bislang unbekanntem Protein, VAV 1 und SORTING NEXIN 2. ZINC-FINGER PROTEIN 29 und ALPHA-2-MAKROGLOBULIN zeigen keine direkte Interaktion mit TPR/MET in der Far-Western-Analyse. Dies könnte auf eine indirekte Bindung dieser beiden Proteine an MET über Adapter-Proteine hinweisen.

Co-Immunopräzipitationen gelten nach wie vor als die stringenteste biochemische Methode zur Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Die von uns identifizierten putativen Interaktionspartner des MET-Rezeptors wurden in HEK-293 (Affen-Nieren-) Zellen mit TPR/MET bzw. einer von uns generierten, ATP-Bindungsstellen-defizienten Mutante TPR/METs co-exprimiert. SORTING NEXIN 2, SMC-1, ALPHA-2 MAKROGLOBULIN und GRB 2 sind in der Lage, TPR/MET co-immunozupräzipitieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass SMC-1 und ALPHA-2-MAKROGLOBULIN auch die kinase-negative Variante des TPR/MET-Proteins co-immunopräzipitieren können, was für eine phosphorylierungsunabhängige Bindung dieser beiden Proteine an TPR/MET in Säugerzellen spricht. SORTING NEXIN 2 bindet ebenfalls ATP-Bindungsstellen-defizientes TPR/MET, wenn auch schwach.

Die Identifikation der genannten neuen Interaktionspartner des MET-Rezeptors zeigt, dass das mit ihm assoziierte intrazelluläre Signal-Netzwerk weit komplexer zu sein scheint als bis vor kurzem gedacht. Dies kann als weiterer Hinweis dafür angesehen werden, dass die Spezifität der molekularen Signal-Kaskaden von Rezeptortyrosinkinasen in der Rekrutierung spezifischer Interaktionspartner begründet liegt.

Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten und Erkenntnisse führen zu weiteren Fragestellungen, etwa nach der funktionellen Relevanz der identifizierten Interaktionen im zellulären Kontext. Fernziel bleibt die Aufklärung aller relevanten MET-assoziierten Signalwege innerhalb einer Zelle.