

Thomas Schmitt
Dr. med.

Charakterisierung intrazellulärer Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinase MET

Geboren am 26.10.1980 in Trier
Staatsexamen am 03.05.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. J.W.G. Janssen

In dem komplexen, mehrstufigen Prozess, der eine normale Zelle in eine Tumorzelle überführt, sind zwei große Gruppen von Genen, Onkogene und Tumorsuppressorgene, von ursächlicher Bedeutung. Onkogene werden durch Mutation zu Proteinen mit veränderter biologischer Funktion, aber auch Überexpression, Expression im falschen Zell- und Gewebekontext bzw. zum falschen Entwicklungszeitpunkt bewirken eine dominante Aktivierung. Sie kodieren für Wachstumsfaktoren (sis), Membranrezeptoren (erbb2, ret, fms), GTP-bindende Proteine (ras), intrazelluläre Kinasen (src, raf) und Transkriptionsfaktoren (myc, jun, fos). Dagegen müssen bei den Tumorsuppressorgen beide Allele des entsprechenden Gens inaktiviert werden, damit es zur Ausbildung eines malignen Phänotyps kommt. Klassische Tumorsuppressorgene sind GTPase-stimulierende Proteine (nf-1), Proteinphosphatasen (pten, shp), Inhibitoren der Transkription (vhl), Bindungspartner von Transkriptionsfaktoren (rb, apc) und Transkriptionsfaktoren selbst (p53).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der onkogenen Rezeptortyrosinkinase MET. Der MET-Rezeptor ist für eine Fülle biologischer Funktionen verantwortlich. Hierzu zählen Zellproliferation, Schutz vor Apoptose, Veränderung der Zellmorphie, Zelldissoziation und Motilität, Angiogenese sowie im Besonderen auf Tumoren bezogene Invasion und Metastasierung. Charakteristische MET-Mutationen, die z.T. bereits in der Keimbahn auftreten, aber auch somatisch erworben werden, finden sich in papillären Nierenzellkarzinomen, Magenkarzinomen, muskuloskelettalen Sarkomen, malignen hämatopoetischen Erkrankungen und einer Vielzahl weiterer Tumore. Die intrazellulären Signaltransduktionsprozesse, die zur Ausbildung des malignen Phänotyps führen, sind Gegenstand intensiver Forschung. Die Aufklärung dieser biochemischen Kaskaden verspricht Möglichkeiten neuer zielgerichteter und evtl. für den Patienten schonenderer Therapieverfahren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von C. Schaaf und J. Benzing in Vorexperimenten neu identifizierte Interaktionspartner SNAPIN, DCOHM, VAV-1, SNX-2, DAPK-3, SMC-1, α 2-Makroglobulin, CENPC und hTID-1, in Co-Immunopräzipitationen zu bestätigen und ihre Interaktion mit dem MET-Rezeptor an Hand von Rezeptormutanten, die Substitutionen in der für MET charakteristischen „multisubstrate binding site“ (MBS) bzw. Deletionen ganzer Domänen aufwiesen, näher zu untersuchen. Als interne Kontrolle diente dabei der bekannte Interaktionspartner GRB-2. Anstelle des MET-Rezeptors wurde das konstitutionell phosphorylierte und damit aktive Onkogenprodukt TPR/MET verwandt. Für die Co-

Immunopräzipitationen wurden HEK-293-Zellen transient mit Rezeptor bzw. Rezeptormutanten und den Interaktionspartnern transfiziert. So konnte eine Interaktion zwischen TPR/MET und SNAPIN, DCOHM, VAV-1, SNX-2, DAPK-3, SMC-1, α 2-Makroglobulin, GRB-2 und hTID-1 gezeigt werden. CENPC dagegen ließ sich nicht erfolgreich co-immunopräzipitieren. Die Bindung von SNAPIN und hTID-1 konnte dabei phosphorylierungsunabhängig an mehreren Motiven innerhalb des Rezeptors stattfinden. DCOHM interagiert, wiederum phosphorylierungsunabhängig wahlweise mit Tyrosin 1349 oder Tyrosin 1356. VAV-1 und α 2-Makroglobulin zeigten nur eine Assoziation mit dem intakten TPR/MET, jedoch wurden keine Versuche mit α 2-Makroglobulin und den Rezeptormutanten durchgeführt. SNX-2 konnte phosphorylierungsabhängig co-immunopräzipitiert werden, wobei die Interaktion im C-terminalen Ende des Rezeptors, jedoch außerhalb der MBS stattfinden mußte. Für DAPK-3 zeigte sich erstaunlicherweise nur eine Bindung an den nicht phosphorylierten Rezeptor. In diesem Verhalten ähnelte es sehr SMC-1, das eine wesentlich ausgeprägtere Assoziation mit denen in ihrer Kinasefunktion beeinträchtigten Rezeptormutanten zeigte. Wahrscheinlich fand die Interaktion im C-terminalen Ende, wiederum außerhalb der MBS, statt.

Die neu identifizierten Interaktionspartner zeigen im Besonderen Querverbindungen zwischen dem MET-Rezeptor und der Apoptose (DAPK-3, hTID-1), der Rezeptorinternalisation und -degradation (SNAPIN, SNX-2, hTID-1) sowie dem Zellzyklus (SMC-1) auf. Viele neu entstandene Fragen bieten ein weites Feld für die zukünftige Forschung.