

Funktionelle Charakterisierung der Protein- Tyrosinphosphatase DEP-1 in Kolonkarzinom- und Meningeomzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochem. Astrid Petermann
geboren am 8. November 1982 in Weimar

Gutachter : **Prof. Dr. Frank-D. Böhmer**
Institut für Molekulare Zellbiologie
CMB – Zentrum für Molekulare Biomedizin
Hans-Knöll-Str. 2
07745 Jena
Tel.: 03641 9395631

PD Dr. Alexander Berndt
Institut für Pathologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Ziegelmühlenweg 1
07743 Jena
Tel: 03641 933624

Prof. Dr. Fred Schaper
Lehrstuhl für Systembiologie
Institut für Biologie
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Leipziger Straße 44
Haus 65 Zenit
39120 Magdeburg
Tel.: 0391 6117150

Dissertation eingereicht am : 17.08.2010

Tag der Disputation : 28.10.2010

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 Protein-Tyrosinphosphatasen	5
1.1.1 Klassifizierung und katalytischer Mechanismus	5
1.1.2 Tumorsuppressorfunktion von PTPs	8
1.2 Die Protein-Tyrosinphosphatase DEP-1	9
1.2.1 Struktur und Expression	9
1.2.2 Signaltransduktion und biologische Funktion	10
1.2.3 Tumorsuppressoraktivität von DEP-1	11
1.3 Signaltransduktion von PDGF-Rezeptoren	12
1.3.1 PDGF- und PDGF-Rezeptor-Isoformen	13
1.3.2 PDGFR-abhängige Signaltransduktion	14
1.4 Migration	16
1.5 Adhäsionsabhängige Signaltransduktion.....	17
1.6 Kolonkarzinom.....	20
1.7 Meningeom	21
1.8 Zielstellung.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Material.....	24
2.2 Puffer.....	29
2.3 Methoden	30
2.3.1 Zellkultur.....	30
2.3.2 Klonierung.....	31
2.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	32
2.3.4 Substrat-Trapping.....	33

2.3.5	Herstellung von stabil DEP-1-depletierten Zellen.....	33
2.3.6	Zelllyse, Proteinbestimmung, WGA-Anreicherung und Westernblot.....	34
2.3.7	HGF- und PDGF-Stimulation.....	35
2.3.8	Antikörper-Array und Westernblot-Validierung (Kinexus Bioinformatics Corporation)	36
2.3.9	MTT-Proliferationsassay	36
2.3.10	Koloniebildungsassay.....	36
2.3.11	Adhäsionsassays.....	37
2.3.12	Adhäsionsabhängige Paxillin-Phosphorylierung.....	38
2.3.13	Time-Lapse-Mikroskopie	38
2.3.14	Immunfärbungen	38
2.3.15	Migrationsassays	39
2.3.16	Apoptoseassay	41
2.3.17	LOH-Analyse	41

3 ERGEBNISSE..... 42

3.1 Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen..... 42

3.1.1	Herstellung von DEP-1-depletierten Kolonkarzinomzelllinien.....	42
3.1.2	DEP-1 reguliert nicht die cMet-Signaltransduktion	43
3.1.3	Antikörper-Array-Analyse zur Identifikation von DEP-1-Substraten.....	45
3.1.4	DEP-1 assoziiert mit Fokaladhäsionsproteinen <i>in vitro</i>	48
3.1.5	DEP-1 ist ein positiver Regulator der Paxillin-Phosphorylierung in Kolonkarzinomzellen	51
3.1.6	Funktionelle Assays	53
3.1.7	Xenotransplantation von Kolonkarzinomzellen	56
3.1.8	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen in Kolonkarzinomzellen	57

3.2 Funktion von DEP-1 in Meningeomzellen 57

3.2.1	DEP-1/ <i>PTPRJ</i> -Expression und -LOH in Meningeomen und Meningeomzelllinien	58
3.2.2	DEP-1 ist ein negativer Regulator der Paxillin-Phosphorylierung in Meningeomzellen	60
3.2.3	DEP-1 ist ein positiver Regulator der Ausbreitung von Meningeomzellen.....	61
3.2.4	DEP-1 reguliert die Anzahl und Verteilung von Zell-Matrix-Kontakten in Meningeomzellen ...	62
3.2.5	DEP-1 ist ein positiver Regulator der Adhäsion von Meningeomzellen	63
3.2.6	DEP-1 ist ein negativer Regulator der Migration von Meningeomzellen	65
3.2.7	Die DEP-1-vermittelte Migrationshemmung ist PDGFR-abhängig	67
3.2.8	DEP-1 ist ein negativer Regulator der PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion in Meningeomzellen	69
3.2.9	DEP-1 hemmt die Koloniebildung von Meningeomzellen in Softagar	72
3.2.10	DEP-1 hemmt das invasive Wachstum von Meningeomzellen <i>in vivo</i>	73

4	DISKUSSION	75
4.1	Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen	75
4.2	Funktion von DEP-1 in Meningeomzellen	79
4.2.1	DEP-1 als positiver Regulator der Adhäsion in Meningeomzellen	79
4.2.2	DEP-1 als negativer Regulator der Migration und der PDGFR-abhängigen Signaltransduktion in Meningeomzellen	83
4.2.3	DEP-1 als negativer Regulator der Tumorinvasion	85
4.2.4	Ausblick	86
4.2.5	Modell	87
5	REFERENZEN	90
6	ANHANG	I
6.1	Abkürzungsverzeichnis	i
6.2	Beiträge von Kollegen im Rahmen des gemeinsamen Projektes	iii
6.3	Danksagung	iv
6.4	Selbständigkeitserklärung	vi
6.5	Erklärung zur Bewerbung	vii
6.6	Lebenslauf	viii

Zusammenfassung

Tyrosinphosphorylierungs-abhängige Signalwege sind an der Regulation vieler zellulärer Prozesse wie z.B. der Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung beteiligt. Der Umfang der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen wird durch die Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen und Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) gesteuert. Ein Ungleichgewicht in der Aktivität beider Enzymklassen kann zur Entstehung von Krankheiten, beispielsweise Tumorerkrankungen, beitragen.

DEP-1 (Density-enhanced phosphatase 1; kodiert durch *PTPRJ*) ist eine rezeptorähnliche PTP, die in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird. Das Auftreten von *PTPRJ*-Allelverlust in humanen Tumoren, z.B. im Kolonkarzinom, sowie anti-transformierende Effekte durch DEP-1-Überexpression in Zellen deuten auf eine Tumorsuppressorfunktion von DEP-1 hin. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nur ansatzweise bekannt. Dabei mangelt es vor allem an Daten, die durch DEP-1-Funktionsverlust erhalten wurden.

Basierend auf Daten unserer Gruppe zur DEP-1-Überexpression in Kolonkarzinomzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von DEP-1 durch stabilen, shRNA-vermittelten Knockdown in Kolonkarzinomzellen untersucht. Zusätzlich wurde mit dem „Substrat-Trapping“ ein unabhängiger Ansatz zur Identifizierung von DEP-1-Substraten verfolgt. Durch Substrat-Trapping wurde eine Assoziation von DEP-1 mit Fokaladhäsionsproteinen (FAK, Paxillin und Src) und Regulatoren des Actinzytoskeletts (Rho GEF 16 und p140 Sra-1) festgestellt. In DEP-1-depletierten HCT116-Kolonkarzinomzellen wurde eine Reduktion der adhäsionsabhängigen Paxillin-Phosphorylierung beobachtet. Die Adhäsion der Zellen auf verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix wurde durch die DEP-1-Depletion jedoch nicht beeinflusst. Die zuvor beschriebene negative Regulation der cMet-Signaltransduktion, Proliferation, Migration und Apoptose durch DEP-1-Überexpression in Kolonkarzinomzellen konnte mit Hilfe des Knockdown-Ansatzes nicht bestätigt werden. DEP-1-depletierte Zellen wiesen ein leicht gesteigertes, verankerungsunabhängiges Wachstum in Softagar auf. Die Xenotransplantation der Zellen in Mäuse lieferte keine Hinweise auf eine Funktion von

DEP-1 für das Tumorwachstum *in vivo*, da der Knockdown von DEP-1 in den gebildeten Tumoren nicht aufrechterhalten wurde.

DEP-1 gilt als Regulator der Phosphorylierung von Rezeptoren des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (platelet-derived growth factor; PDGF). PDGF-Rezeptoren (PDGFR) sind in Meningeomen häufig aktiviert. Deshalb wurden Meningeomzellen als weiteres Zellmodell in die funktionellen Untersuchungen einbezogen. Ein erster Hinweis auf eine potentielle Tumorsuppressorfunktion von DEP-1 für das Meningeom wurde durch den Nachweis von *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in Meningeom-Tumorproben erhalten. Der stabile shRNA-vermittelte Knockdown von DEP-1 in Meningeomzelllinien führte, wie auch in Kolonkarzinomzellen, zu einer Reduktion der adhäsionsabhängigen Paxillin-Phosphorylierung. In Meningeomzellen war dieser Effekt jedoch mit einer verminderten Zell-Matrix-Adhäsion sowie einer reduzierten Ausbreitung der Zellen auf Fibronectin verbunden. DEP-1-depletierte Meningeomzellen wiesen außerdem eine reduzierte Anzahl und eine abweichende Lokalisation von Zell-Matrix-Kontakten auf. Neben der Regulation von Integrin-vermittelten Prozessen wurde auch eine Regulation von PDGFR-abhängigen Prozessen durch DEP-1 festgestellt. Der Knockdown von DEP-1 führte zu einer Steigerung der PDGF-stimulierten Migration von Meningeomzellen sowie zu einer erhöhten PDGFR- und PLC γ -Phosphorylierung. Weiterhin wurde ein deutlicher Anstieg der Koloniebildung von DEP-1-depletierten Zellen in Softagar festgestellt. Nach orthotoper Xenotransplantation in Mäuse wiesen die DEP-1-depletierten Zellen im Vergleich zu DEP-1-exprimierenden Zellen ein invasives Wachstum auf.

Die Hemmung der Adhäsion sowie die Steigerung der Migration und des invasiven Wachstums infolge des DEP-1-Verlustes verbunden mit dem Nachweis von *PTPRJ*-Allelverlust in Meningeomen deuten auf eine Tumorsuppressorfunktion von DEP-1 für das Meningeom hin.

Summary

Tyrosine phosphorylation-dependent signaling pathways are involved in the regulation of a variety of cellular processes, such as proliferation, migration, adhesion, and differentiation. The tyrosine phosphorylation state of proteins is regulated by the activity of protein-

tyrosine kinases and protein-tyrosine phosphatases (PTPs). An imbalance in the activity of both enzyme classes can contribute to the development of diseases such as cancer.

DEP-1 (Density-enhanced phosphatase 1; encoded by *PTPRJ*) is a receptor-like PTP that is expressed in a large number of cell types. *PTPRJ* allele loss in human tumors such as colon carcinomas, and anti-transforming effects caused by DEP-1 overexpression in cells suggest a tumor suppressor function for DEP-1. However, the underlying molecular mechanisms are only partially understood, notably, loss-of-function studies are lacking.

Based on data obtained by DEP-1 overexpression in colon carcinoma cells in our group, the function of DEP-1 was analysed by stable shRNA-mediated knockdown in colon carcinoma cells. Furthermore, “substrate trapping” was performed as an independent approach to identify DEP-1 substrates. Substrate trapping revealed an association of DEP-1 with focal adhesion proteins (FAK, paxillin and Src) and regulators of the actin cytoskeleton (Rho GEF 16 und p140 Sra-1). In DEP-1-depleted HCT116 colon carcinoma cells an adhesion-dependent reduction of paxillin phosphorylation was observed. Adhesion of cells to different proteins of the extracellular matrix was, however, not affected by the depletion of DEP-1. The previously described negative regulation of cMet signal transduction, proliferation, migration, and apoptosis by DEP-1 overexpression in colon carcinoma cells could not be confirmed by the knockdown approach. DEP-1-depleted cells exhibited a slightly increased anchorage-independent growth in softagar. Xenotransplantation of cells in mice did not reveal a function of DEP-1 for tumor growth *in vivo*, since the knockdown of DEP-1 was not maintained in the tumors.

DEP-1 has been described as a negative regulator of receptors for the platelet-derived growth factor (PDGF). PDGF receptors (PDGFR) are frequently activated in meningioma. Therefore, meningioma cells were included in the functional studies as additional cellular model. First evidence for a potential tumor suppressor function of DEP-1 for meningioma was provided by the detection of loss of heterozygosity of *PTPRJ* in meningioma tumor samples. As in colon carcinoma cells, stable shRNA-mediated knockdown of DEP-1 in meningioma cell lines resulted in a reduction of adhesion-dependent paxillin phosphorylation. In meningioma cells, however, this effect was accompanied by a decreased cell-matrix adhesion and a reduced spreading of DEP-1-depleted cells on fibronectin. Furthermore, DEP-1-depleted cells exhibited a reduced number and aberrant

localization of cell-matrix-contacts. Besides the regulation of integrin-mediated processes, a regulation of PDGFR-dependent processes by DEP-1 was found. The knockdown of DEP-1 resulted in an increase in PDGF-dependent migration of meningioma cells and an enhanced PDGFR and PLC γ phosphorylation. Furthermore, a pronounced increase in colony formation of DEP-1-depleted meningioma cells in softagar was observed. In contrast to DEP-1-expressing cells, DEP-1-depleted cells exhibited invasive growth after orthotopic xenotransplantation in mice.

The inhibition of adhesion and the increase in migration and invasive growth as a result of DEP-1 loss in conjunction with the detection of *PTPRJ* allele loss in meningiomas suggest a tumor suppressor function of DEP-1 for meningioma.

1 Einleitung

1.1 Protein-Tyrosinphosphatasen

Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) bilden eine Enzym-Superfamilie, welche die Dephosphorylierung von Phosphotyrosinen katalysiert. Sie nehmen dadurch eine zentrale Funktion bei der Regulation der Tyrosinkinase-abhängigen Signaltransduktion ein und sind für die Regulation von Prozessen wie z.B. der Proliferation, Apoptose, Migration und Adhäsion von Bedeutung (Angers-Loustau et al. 1999, Chernoff 1999, MacKeigan et al. 2005, Ostman and Bohmer 2001, Stoker 2005).

1.1.1 Klassifizierung und katalytischer Mechanismus

Im humanen Genom sind 107 PTPs kodiert. Sie werden nach der Aminosäuresequenz ihrer katalytischen Domäne in vier Klassen eingeteilt (Alonso et al. 2004; Bild 1.1). Die Cystein-basierten Klasse I-Phosphatasen bilden mit 99 Mitgliedern die mit Abstand größte Phosphatase-Klasse. Auf die drei weiteren Klassen, die jeweils nur einzelne Vertreter aufweisen, soll hier nicht näher eingegangen werden. Innerhalb der Klasse I-Phosphatasen wird anhand der Substratspezifität noch einmal zwischen „klassischen“ Phosphotyrosin-spezifischen Phosphatasen (38 Vertreter) und „dual-spezifischen“ Phosphatasen (61 Vertreter) unterschieden. Letztere können neben Phosphotyrosin auch Phosphoserin oder Phosphothreonin dephosphorylieren. Einzelne Vertreter der dual-spezifischen PTPs weisen darüber hinaus auch eine Lipidphosphatase-Aktivität auf (Alonso et al. 2004).

Die klassischen PTPs werden noch einmal in zwei Gruppen unterteilt. Die rezeptorähnlichen PTPs (RPTPs) sind membranständige Proteine. Sie enthalten ein oder zwei Phosphatasedomänen in der intrazellulären Region, von denen meist aber nur die membrannahe Domäne volle katalytische Aktivität aufweist. Viele RPTPs enthalten in ihrer extrazellulären Region Domänen wie z.B. Fibronectin-Typ III-Domänen, die charakteristisch für Proteine sind, die an der Zelladhäsion beteiligt sind. Darüber hinaus können die extrazellulären Domänen die Bindung von Liganden vermitteln. Zytosolische/nicht-Rezeptor-PTPs (NRPTPs) enthalten eine einzige Phosphatasedomäne und meist weitere Domänen, wie z.B. SH2- oder PDZ-Domänen. Diese Domänen können

z.B. Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und die subzelluläre Lokalisation der PTPs regulieren (den Hertog et al. 2008, Ostman et al. 2006).

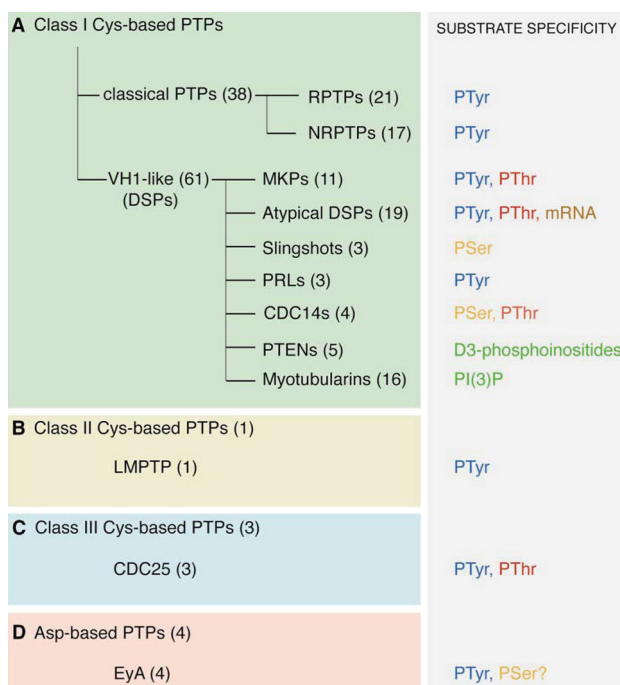


Bild 1.1: Klassifizierung und Substratspezifität der PTPs. Das Bild ist aus Alonso et al. 2004 entnommen.

Das Charakteristikum der PTPs ist das konservierte Signaturmotiv CX5R. Die Aminosäuren des Signaturmotivs bilden den Phosphatbindungsloop (P-Loop) im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne. Die Konformation des P-Loops ist zwischen den PTPs stark konserviert. Der P-Loop enthält das für die Dephosphorylierung essentielle katalytische Cystein. Im ersten Schritt der Katalyse übt das Cystein einen nukleophilen Angriff auf das Phosphat des Phosphotyrosins aus, wodurch ein Cysteinyl-Phosphat-Intermediat gebildet wird (Bild 1.2). Das konservierte Arginin des P-Loops ist in die Bindung des Phosphats und in die Stabilisierung des Intermediats involviert. An der Bildung des Cysteinyl-Phosphat-Intermediats ist außerdem das Aspartat des konservierten WPD-Loops beteiligt. Das Aspartat agiert zunächst als Säure, indem es den Sauerstoff des Tyrosins der Abgangsgruppe protoniert. Während der darauf folgenden Hydrolyse des Enzym-Phosphat-Intermediats übernimmt das Aspartat die Funktion einer Base, indem es als Protonenakzeptor für das Wasser dient.

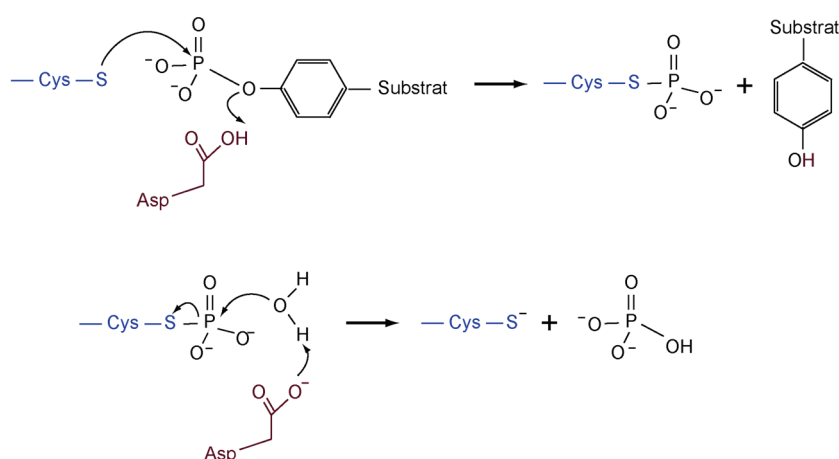


Bild 1.2: Katalytischer Mechanismus von PTPs. Das katalytische Cystein (Cys) ist blau hervorgehoben, das Aspartat (Asp) des WPD-Loops ist rot dargestellt. Das Schema wurde nach Tonks et al. 2003 modifiziert.

Neben den beschriebenen konservierten Aminosäuren und Strukturmotiven tragen weitere Elemente der katalytischen Domäne z.B. durch Positionierung des phosphorylierten Substrats oder des Wassers zur Katalyse bei (Tabernero et al. 2008).

PTPs weisen eine hohe Substratspezifität auf. Diese wird sowohl durch die intrazelluläre Lokalisation der PTPs als auch durch die intrinsische Substratspezifität der katalytischen Domäne gewährleistet (Tonks and Neel 2001). Mit der Aufklärung des katalytischen Mechanismus der PTPs wurde die Grundlage zur Entwicklung von „Substrat-Trapping“-Mutanten geschaffen und dadurch wesentlich zur Identifizierung von PTP-Substraten beigetragen. Das Substrat-Trapping beruht auf der Tatsache, dass bestimmte Mutationen innerhalb der katalytischen Domäne zu einer starken Verringerung der katalytischen Aktivität der Phosphatase führen, während gleichzeitig die Fähigkeit zur Substratbindung erhalten bleibt. Während Wildtyp-Phosphatasen die Substrate nach der Dephosphorylierung wieder freisetzen, bleiben Trapping-Mutanten aufgrund der eingeschränkten katalytischen Aktivität stabiler mit den Substraten assoziiert. Dadurch wird die Isolation und Analyse der gebundenen Substrate erleichtert. Eine häufig für Substrat-Trapping-Studien eingesetzte Mutante stellt die DA-Mutante dar, die eine Mutation des konservierten Aspartats des WPD-Loops zu Alanin aufweist (Blanchetot et al. 2005).

1.1.2 Tumorsuppressorfunktion von PTPs

Die onkogene Signaltransduktion von Tyrosinkinase ist an der Entstehung vieler Krebsformen beteiligt (Blume-Jensen and Hunter 2001). Für einige PTPs wurden anti-transformierende Eigenschaften und eine negative Regulation von Wachstumsfaktor-gesteuerten Signalwegen in der Zellkultur beobachtet. Es wurde deshalb vermutet, dass PTPs eine Tumorsuppressorfunktion ausüben könnten. Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass in verschiedenen Tumoren eine Inaktivierung von PTP-Genen nachgewiesen wurde. Im Kolonkarzinom wurden beispielsweise Punktmutationen im Gen *PTPRT/PTPp* festgestellt. Diese Mutationen waren mit einem Funktionsverlust der Phosphatase verbunden. Die Inaktivierung von *PTPN6/SHP1* in verschiedenen Leukämieformen erfolgte dagegen auf Expressionsebene durch Promotormethylierung. Ein weiterer Mechanismus, der zur Inaktivierung von PTPs beitragen kann, ist der Verlust eines Allels, nachweisbar als Heterozygotieverlust (LOH – Loss of heterozygosity). Dieser Mechanismus wurde in verschiedenen epithelialen Tumoren für die Phosphatase *PTPRJ/DEP-1* nachgewiesen (Hendriks et al. 2008, Ostman et al. 2006). Auf die Rolle von DEP-1 als potentiell Tumorsuppressor soll unter 1.2.3 näher eingegangen werden.

Wie Knockout-Mausmodelle gezeigt haben, ist der alleinige Verlust einer PTP in der Regel nicht ausreichend, um eine Tumorbildung zu induzieren. Es wird vermutet, dass der Verlust von PTPs erst im Zusammenhang mit weiteren Mutationen zu diesen funktionellen Folgen führt. Darüber hinaus sind einige PTPs offenbar funktionell redundant, so dass der Verlust einer PTP (zumindest teilweise) durch andere PTPs kompensiert werden könnte (Hendriks et al. 2008). Lediglich in Mäusen, die heterozygot für die dual-spezifische Phosphatase *Pten* sind (*Pten*-Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig), wurde ein Anstieg der Tumorzinzidenz nachgewiesen. Dieser Effekt wird jedoch eher auf die Lipidphosphatase- als auf die bei *Pten* ebenfalls vorhandene geringe Tyrosinphosphatase-Aktivität zurückgeführt. Eine erhöhte Prädisposition für verschiedene Krebsformen wurde auch für Personen beschrieben, die Träger von erblichen *PTEN*-Mutationen sind (Chow and Baker 2006).

1.2 Die Protein-Tyrosinphosphatase DEP-1

1.2.1 Struktur und Expression

DEP-1 (Density-enhanced phosphatase 1) ist eine rezeptorartige PTP. Das Protein, das auch unter dem Namen CD148 und HPTP eta bekannt ist, wird von dem Gen *PTPRJ* auf Chromosom 11 kodiert. Das Protein ist aus einer stark glykosylierten extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne aufgebaut (Bild 1.3). Die intrazelluläre Domäne enthält eine einzelne katalytische Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist noch einmal in acht Fibronectin-Typ III-Domänen untergliedert (de la Fuente-Garcia et al. 1998, Honda et al. 1994, Ostman et al. 1994).

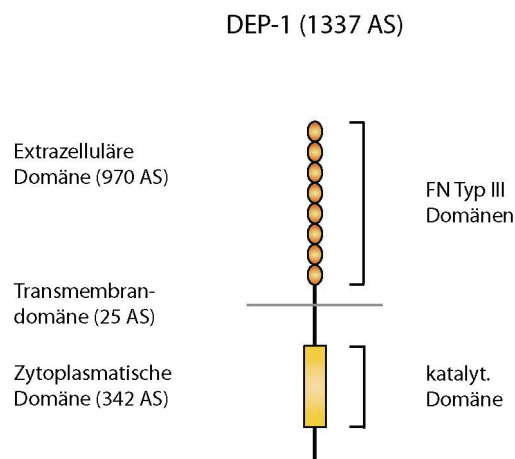


Bild 1.3: Schematische Darstellung der Struktur der Protein-Tyrosinphosphatase DEP-1. Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur und -größe (in Aminosäuren) der Phosphatase. Die Größendarstellung ist nicht maßstabsgetreu. AS-Aminosäuren; FN-Fibronectin

DEP-1 wird in einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert, z.B. in hämatopoetischen Zellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und verschiedenen Epithelzellen (Autschbach et al. 1999, Borges et al. 1996, de la Fuente-Garcia et al. 1998, Ostman et al. 1994). Wie der Name der Phosphatase andeutet, wird DEP-1 – zumindest in einigen Zelllinien – in Abhängigkeit von der Zelldichte exprimiert (Borges et al. 1996, Ostman et al. 1994). Die beobachtete Zunahme der Expression bei hoher Zelldichte weist darauf hin, dass DEP-1 an der Kontaktinhibition des Zellwachstums beteiligt sein könnte. Neben der Regulation der Expression wurde auch eine Regulation auf

Aktivitätsebene beschrieben. Durch Interaktion der extrazellulären Domäne von DEP-1 mit einer bisher nicht identifizierten Komponente aus Matrigel wurde eine Steigerung der spezifischen Aktivität beobachtet (Sorby et al. 2001).

1.2.2 Signaltransduktion und biologische Funktion

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass DEP-1 die Signaltransduktion verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen negativ reguliert. Die Regulation erfolgte sowohl durch direkte Rezeptordephosphorylierung als auch durch Dephosphorylierung von Rezeptor-aktivierten Signalproteinen. Der HGF-Rezeptor cMet wurde durch Substrat-Trapping als Substrat von DEP-1 identifiziert. Durch Koexpression beider Proteine wurde gezeigt, dass DEP-1 die Phosphorylierung des Rezeptors selektiv hemmt, wobei das bevorzugte Substrat die Gab1-Bindungsstelle (Y1349) darstellte (Palka et al. 2003). In Endothelzellen wurde eine negative Regulation der VEGFR-2-Signaltransduktion durch Dephosphorylierung des Rezeptors und einer damit verbundenen Hemmung der Rezeptorinternalisierung beobachtet (Chabot et al. 2009, Lampugnani et al. 2006). Eine negative Regulation durch DEP-1 wurde auch für das Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Ortholog LET-23 in *C. elegans* (Berset et al. 2005) und den EGFR in humanen Zelllinien beschrieben. Die Hemmung der EGFR-Signaltransduktion basierte auf der Dephosphorylierung des Rezeptors und der Hemmung der EGFR-Internalisierung (Tarcic et al. 2009). In mehreren Studien wurde DEP-1 als negativer Regulator der PDGFR-Signaltransduktion charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass DEP-1 den Rezeptor selektiv dephosphorylieren kann, wobei die Phosphotyrosine 1009/1021 die bevorzugten Angriffspunkte für die Dephosphorylierung darstellten. Durch Überexpression von DEP-1 in Fibroblasten wurde eine verminderte PDGF-induzierte Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃)-Bildung sowie Ras-, Erk1/2- und Akt-Aktivierung beobachtet (Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004).

Neben den beschriebenen Rezeptor-vermittelten Effekten wurde auch eine direkte Dephosphorylierung von Erk1/2 und der p85 Phosphoinositid 3-kinase (PI3K)-Untereinheit als Mechanismus beschrieben, der zur negativen Regulation der Signaltransduktion beiträgt (Sacco et al. 2009, Tsuboi et al. 2008).

In einer Reihe von Experimenten wurden anti-transformierende Effekte von DEP-1 in Zellkulturen beschrieben. In Mamma-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinomzellen,

Gliomzellen und Endothelzellen wurde eine Hemmung der Proliferation durch DEP-1 beschrieben (Iuliano et al. 2003, Keane et al. 1996, Massa et al. 2004, Trapasso et al. 2004). Im Zusammenhang mit der Proliferationshemmung wurde eine Stabilisierung des Zellzyklusinhibitors p27^{KIP1} beobachtet (Trapasso et al. 2000). In Pankreaskarzinomzellen und HeLa-Zellen wurde eine Induktion der Apoptose durch DEP-1-Reexpression nachgewiesen (MacKeigan et al. 2005, Trapasso et al. 2004). Weiterhin wurde eine Reduktion der PDGF-induzierten Migration in Endothelzellen und Fibroblasten beobachtet (Jandt et al. 2003, Kappert et al. 2007, Kellie et al. 2004). Mehrere Studien weisen auf eine Funktion von DEP-1 bei der Regulation der Zell-Matrix-Adhäsion hin (Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004, Pera et al. 2005). Eine Steigerung der Adhäsion durch DEP-1 wurde mit einer erhöhten Src-Aktivität sowie einer erhöhten Phosphorylierung der Fokaladhäsionsproteine Paxillin und Fokaladhäsionskinase (FAK) in Verbindung gebracht (Pera et al. 2005).

Untersuchungen an *Ptprj*-Knockout-Mäusen deuten ebenfalls auf eine Funktion von DEP-1 für die Regulation von Src-Familie-Kinasen (SFKs) hin. *Ptprj*-Knockout-Mäuse weisen eine erhöhte Blutungsneigung (durch verminderte Thrombozytenausbreitung und -adhäsion) sowie Defekte in der B-Zellreifung auf (Senis et al. 2009, Zhu et al. 2008). Als molekulare Ursache für diese Phänotypen wurde in Thrombozyten und B-Zellen eine reduzierte Aktivierung von SFKs durch verringerte Dephosphorylierung des inhibitorischen C-terminalen Tyrosins beschrieben. Zhu et al. 2008 haben auch gezeigt, dass sich die Funktionen von *Ptprj* und der rezeptorartigen PTP *Ptprc/CD45* überschneiden, und ein Verlust von *Ptprj* zumindest teilweise durch *Ptprc* kompensiert werden kann.

1.2.3 Tumorsuppressoraktivität von DEP-1

Wie auch in Knockout-Mäusen mit Inaktivierungen anderer klassischer PTPs wurden in *Ptprj*-Knockout-Mäusen keine Hinweise auf eine erhöhte spontane Tumorigenese gefunden (Trapasso et al. 2006). Dennoch weisen verschiedene Beobachtungen auf eine Tumorsuppressorfunktion von DEP-1 hin. Wie bereits beschrieben, hemmt die DEP-1-Überexpression eine Reihe von Wachstumsfaktor-vermittelten Signaltransduktionsprozessen und vermittelt anti-transformierende Effekte in Zellkulturen. Weiterhin lieferten genetische Untersuchungen Hinweise auf eine Tumorsuppressoraktivität. Die Analysen

humaner Kolon-, Mamma-, Lungen- und Schilddrüsenkarzinome zeigten, dass in einem Teil der Tumoren *PTPRJ*-Heterozygotieverlust aufgetreten war (Ruivenkamp et al. 2002). Die LOH-Analysen von Kolontumoren unterschiedlicher Entwicklungsstadien wiesen darauf hin, dass der Heterozygotieverlust ein frühes Ereignis im Verlauf der Kolonkarzinogenese ist (Luo et al. 2006, Ruivenkamp et al. 2003). Eine Funktion von DEP-1/*Ptprj* als Suppressor der Kolonkarzinogenese wird auch dadurch unterstützt, dass *Ptprj* im murinen Kolonkarzinom-Suszeptibilitätslocus (*susceptibility to colon cancer 1 locus (Sccl)*) lokalisiert ist (Ruivenkamp et al. 2002). Im Mammakarzinom wurden neben dem Heterozygotieverlust außerdem *PTPRJ*-Missense-Mutationen gefunden. Die Mutationen waren zwar nur in einem geringen Prozentsatz der Primärtumoren nachweisbar, allerdings zeigten Metastasen eine deutlich gesteigerten Mutationsrate (Ding et al. 2010).

Zwar deuten mehrere Analysen darauf hin, dass DEP-1 eine Rolle bei der Kolonkarzinogenese spielt, allerdings sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nur ansatzweise bekannt. Funktionelle Analysen in SW480-Kolonkarzinomzellen zeigten, dass die Reexpression von DEP-1 die Lysophosphatidsäure- und Serum-induzierte Migration der Zellen hemmt. Außerdem wurden eine Reduktion der Proliferation und eine Induktion der Apoptose durch DEP-1 beobachtet. Signaltransduktionsanalysen zeigten, dass DEP-1 die cMet-abhängige Signaltransduktion negativ und die Paxillin- und FAK-Phosphorylierung positiv reguliert (Balavenkatraman et al. 2006, Balavenkatraman, unpublizierte Daten).

1.3 Signaltransduktion von PDGF-Rezeptoren

Die PDGF-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen, die Prozesse wie z.B. die Proliferation, Migration und das Überleben von Zellen regulieren. Sie werden durch Mitglieder einer Familie von Wachstumsfaktoren, den PDGFs, aktiviert. Die PDGFR-abhängige Signaltransduktion ist für die Embryonalentwicklung von großer Bedeutung. Darüber hinaus spielen PDGF-Rezeptoren bei der Wundheilung eine Rolle, sie werden aber auch mit verschiedenen Krankheiten wie z.B. fibrotischen Erkrankungen, Gefäßkrankheiten und verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht (Andrae et al. 2008).

1.3.1 PDGF- und PDGF-Rezeptor-Isoformen

PDGF-Wachstumsfaktoren sind dimere Proteine. Es existieren vier PDGF-Isoformen, PDGF-A, -B, -C und -D. Die PDGF-Peptidketten können sich über Disulfidbrücken zu den Homodimeren PDGF-AA, -BB, -CC, und -DD bzw. zum Heterodimer PDGF-AB zusammenlagern (Fredriksson et al. 2004).

Von den PDGF-Rezeptoren existieren zwei Isoformen – PDGFR α und PDGFR β – die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Beide Rezeptoren weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. Sie sind aus einer extrazellulären Domäne mit fünf Immunglobulin-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit einer unterteilten Tyrosinkinase-Domäne aufgebaut. Diese Struktur teilen diese Rezeptoren mit den nahe verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen c-Fms, c-Kit und Flt3.

Die Ligandenbindung fördert die Dimerisierung der Rezeptoren und ermöglicht so deren Aktivierung. In Abhängigkeit von der Ligandenkonfiguration und dem Expressionsmuster der Rezeptoren kann es zu Bildung von PDGFR α - und PDGFR β -Homodimeren oder PDGFR $\alpha\beta$ -Heterodimeren kommen. Bild 1.4 zeigt die auf Zellkulturexperimenten basierenden Interaktionen zwischen den einzelnen PDGF- und PDGFR-Dimeren. *In vivo* wurde bisher jedoch nur eine Aktivierung des PDGFR α durch PDGF-AA und -CC und eine Aktivierung des PDGFR β durch PDGF-BB beobachtet (Andrae et al. 2008).

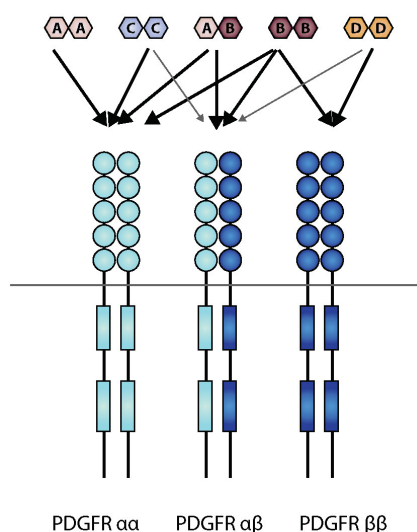


Bild 1.4: PDGF-PDGFR-Interaktionen *in vitro*. Jede Polypeptidkette eines PDGF-Dimers interagiert mit einer PDGFR-Untereinheit. Die schwarzen Pfeile stellen Interaktionen dar, die in Zellkulturexperimenten gezeigt wurden. Graue Pfeile repräsentieren schwache Interaktionen oder widersprüchliche Ergebnisse. (Modifiziert nach Andrae et al. 2008)

1.3.2 PDGFR-abhängige Signaltransduktion

Die Dimerisierung der PDGF-Rezeptoren ermöglicht deren wechselseitige Autophosphorylierung. Die Phosphorylierung von Y849 (PDGFR α) bzw. Y857 (PDGFR β) im Aktivierungsloop der Kinasedomäne trägt entscheidend zur Aktivierung der Kinase bei. Die aktivierten Rezeptoren können anschließend Tyrosine außerhalb der Kinasedomäne phosphorylieren. Dadurch werden Bindungsstellen für weitere Proteine wie z.B. Adapter- und Signalproteine geschaffen. Die PDGFR $\alpha\alpha$ - und PDGFR $\beta\beta$ -abhängige Signaltransduktion ähnelt sich in sehr vielen Aspekten. Es existieren aber auch Signalwege, die Rezeptorisoform-spezifisch aktiviert werden. Über die Signaltransduktion von PDGFR $\alpha\beta$ -Heterodimeren ist hingegen vergleichsweise wenig bekannt (Andrae et al. 2008). Im Folgenden soll ein Überblick über die PDGFR $\alpha\alpha$ - und PDGFR $\beta\beta$ -abhängigen Signalwege gegeben werden (Bild 1.5).

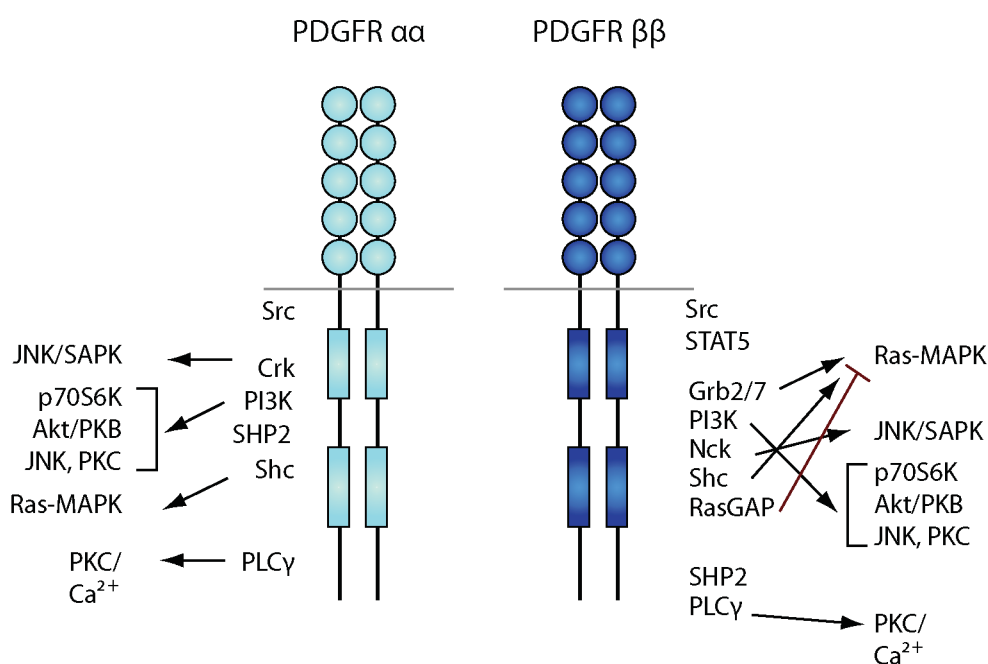


Bild 1.5: PDGFR-abhängige Signaltransduktion. Die PDGFR-interagierenden Proteine sowie deren Effektoren sind für die PDGFR α - und PDGFR β -Homodimere dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Andrae et al. 2008.

Aktivierung der MAPK-Kaskade (PDGFR α und - β). Die MAPK-Kaskade wird in erster Linie durch die Adapterproteine Shc und Grb2 als Folge von deren Bindung an die aktivierten PDGF-Rezeptoren vermittelt. Grb2 bindet den Guaninnucleotid-

Austauschfaktor Sos, welcher die GTPase Ras aktiviert. Daraufhin werden die Kinasen Raf-1, MEK und Erk1/2 aktiviert. Durch den Ras-MAPK-Signalweg wird die Transkription von Genen gefördert, die zur Stimulation des Zellwachstums, der Differenzierung und der Migration beitragen (Heldin et al. 1998).

Aktivierung der PI3K (PDGFR α und - β). Die Bindung der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3K an die PDGF-Rezeptoren sowie die Interaktion von Ras mit der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 führt zur Aktivierung der Lipidkinase-Aktivität und somit zur Erzeugung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Zu den Effektoren der PI3K zählen die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB, einige Mitglieder der PKC-Familie, p70S6-Kinase, JNK und die kleinen GTPasen der Rho-Familie. Die Aktivierung der PI3K ist mit der Reorganisation des Actinzytoskeletts, der gerichteten Zellbewegung, der Stimulation des Wachstums und Hemmung der Apoptose verbunden (Heldin et al. 1998)

Aktivierung der PLC γ (PDGFR α und - β). PLC γ wird infolge der PDGFR-Aktivierung an die Plasmamembran rekrutiert und bindet über eine SH2-Domäne an den PDGFR. Die Aktivierung von PLC γ erfolgt durch Phosphorylierung des Tyrosins Y783. Die Phosphorylierung kann sowohl durch den PDGFR als auch durch SFKs erfolgen. Die Aktivierung von PLC γ führt zur Freisetzung von intrazellulären Calciumionen und zur Aktivierung von PKC. Durch die PLC γ -vermittelte Signaltransduktion werden das Zellwachstum und die Motilität von Zellen stimuliert (Heldin et al. 1998).

Weitere Signalwege. Die Tyrosinkinase Src sowie weitere Mitglieder der SFKs können durch beide PDGFR-Isoformen aktiviert werden. Die Aktivierung der Kinasen wird mit einer Stimulation der Proliferation in Verbindung gebracht. Die Adapterproteine Nck (PDGFR β) und Crk (PDGFR α) können ebenfalls an PDGF-Rezeptoren binden und sind an der Aktivierung der Kinase JNK beteiligt. Weiterhin kann durch den PDGFR β eine Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren erfolgen (Heldin et al. 1998).

Negative Regulation von PDGF-Rezeptoren. Eine Hemmung der PDGFR-Signaltransduktion wird durch verschiedene Mechanismen sichergestellt. Eine negative Regulation der Aktivität von Ras wird beispielsweise durch die Bindung des Proteins Ras-GAP an den PDGFR β gewährleistet (Heldin et al. 1998). Eine negative Regulation der PDGFR β -Phosphorylierung wurde außerdem durch die PTPs TC-PTP (Persson et al.

2004), PTP1B (Haj et al. 2003), DEP-1 (Jandt et al. 2003) und LMW-PTP (Chiarugi et al. 2002) beschrieben. Zur negativen Regulation der PDGFR-Signaltransduktion trägt nicht zuletzt auch die Rezeptorinternalisierung mit anschließendem lysosomalen Abbau bei (Sorkin et al. 1991).

1.4 Migration

Die Fähigkeit von Zellen zur gerichteten Migration ist für Prozesse wie die Embryonalentwicklung, Wundheilung und Entzündungsreaktionen von großer Bedeutung. Sie bildet aber auch die Grundlage für diverse pathologische Prozesse wie chronisch entzündlichen Erkrankungen und Tumormetastasierung. Die Migration ist das Resultat zyklisch stattfindender, zeitlich und räumlich aufeinander abgestimmter Prozesse, über die im Folgenden ein Überblick gegeben werden soll.

Wenn eine Zelle einen Gradienten eines Chemoattraktants wahrnimmt, beginnt sie mit der Polarisierung in einen Leitsaum (leading edge) und eine Rückseite (trailing edge). Die Rezeptoren zur Wahrnehmung des Chemoattraktants vermitteln u. a. die Bildung eines intrazellulären PIP₃-Gradienten, der neben weiteren Faktoren zur Aktivierung der Rho-Familie-GTPasen Rac und/oder Cdc42 und der Actinpolymerisation am Leitsaum beiträgt. Die sich bildenden Actinfilamente stülpen die Membran in Migrationsrichtung aus und bilden fadenartige Filopodien (bestehend aus gebündelten Actinfilamenten) oder ein Lamellipodium (eine flache, breite Ausstülpung der Membran, die verzweigte Actinfilamente enthält) (Horwitz and Webb 2003).

Am Aufbau der Actinstrukturen im Leitsaum sind die Proteine der WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-Familie und der WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein)-Familie beteiligt. Sie werden von Rac und Cdc42 aktiviert und steuern die Aktivität von Regulatoren der Actinpolymerisation. An der Ausbildung verzweigter Actinstrukturen im Lamellipodium ist der Rac/WAVE-aktivierte Arp2/3-Komplex beteiligt. Dieser Komplex bindet seitlich an schon existierende Actinfilamente und fördert dort die Bildung neuer Filamente. Dadurch wird eine Verzweigung des Actinzytoskeletts erreicht (Vicente-Manzanares et al. 2005).

Die neu gebildeten Membranausstülpungen bilden Kontakte zur extrazellulären Matrix aus. Die Membranausstülpungen werden über Zell-Matrix-Kontakte (Fokale Kontakte) mit dem

Actinzytoskelett verbunden und stabilisiert. Die neu gebildeten Fokalen Kontakte können entweder zu den größeren, stabileren Fokaladhäsionen heranreifen oder wieder abgebaut werden (Turnover). Zell-Matrix-Kontakte initiieren verschiedene Signalwege, z.B. die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie und Erk. Auf die adhäsionsabhängigen Signaltransduktionsprozesse soll unter 1.5 noch einmal gesondert eingegangen werden

Nach der Membranerweiterung und Bildung von Zell-Matrix-Kontakten kann die Vorwärtsbewegung des Zellkörpers erfolgen. Die Translokation geschieht durch Actomyosin-abhängige Kontraktionen, die den Zellkörper nach vorne drücken. Die Zell-Matrix-Kontakte im Leitsaum stellen die dafür benötigten Ankerpunkte für die Ausübung von Zugkräften auf die Matrix dar. Für die Vorwärtsbewegung ist es außerdem notwendig, dass die Fokaladhäsionen an der Rückseite der Zelle aufgelöst werden. An der Regulation der Actomyosin-Kontraktion ist u. a. die GTPase Rho und deren Effektor Rho kinase (ROCK) beteiligt (Horwitz and Webb 2003).

1.5 Adhäsionsabhängige Signaltransduktion

Prozesse wie die Adhäsion, die Ausbreitung von Zellen und die Migration erfordern die Ausbildung von Kontakten zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix. Diese Kontakte werden durch Zell-Matrix-Adhäsionskomplexe hergestellt. In diesen komplexen Strukturen wird über Integrine eine Verbindung zur extrazellulären Matrix und zum Actinzytoskelett und intrazellulären Signalproteinen geschaffen (Berrier and Yamada 2007). Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die in Abhängigkeit von der Kombination verschiedener α - und β -Untereinheiten eine unterschiedliche Substratspezifität für Proteine der extrazellulären Matrix aufweisen. Die Signalübertragung durch Integrine kann bidirektional verlaufen. Die Bindung von Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagenen kann zur Aktivierung von Integrinen beitragen. Dadurch können intrazelluläre Signalprozesse reguliert werden („outside-in signaling“). Die Bindung von Proteinen an die intrazelluläre Domäne kann aber wiederum auch Einfluss auf die Bindung von extrazellulären Matrixproteinen nehmen. Dieser Prozess wird auch als „inside-out signaling“ bezeichnet (Hynes 2002).

Die Adhäsion von Zellen auf Proteine der extrazellulären Matrix führt zur Integrin-Aktivierung und zur Rekrutierung intrazellulärer Proteine an die Plasmamembran. Zu den

ersten Proteinen, die an Integrine binden, zählen Talin und Paxillin. Diese Adapterproteine tragen durch die Bindung weiterer Proteine zum Aufbau größerer Komplexe bei. Ein zentraler Regulator der Signaltransduktion in Zell-Matrix-Kontakten ist die zytosolische Tyrosinkinase FAK. Die Kinase kann nicht nur Proteine in Fokaladhäsionskomplexen phosphorylieren sondern dient zusätzlich als Phosphorylierungs-reguliertes Gerüstprotein. Die Assoziation von FAK erfolgt indirekt durch die Bindung der C-terminalen focal adhesion targeting (FAT)-Domäne an Integrin-assoziierte Proteine wie Talin und Paxillin. Die Rekrutierung von FAK ermöglicht die Autophosphorylierung des Tyrosins Y397. Das phosphorylierte Tyrosin stellt eine Bindungsstelle für Proteine mit SH2-Domänen dar. Wichtiger Bindungspartner von FAK- phospho-Y397 sind Src bzw. SFKs. Src wird durch Bindung der SH2-Domäne an FAK phospho-Y397 in eine aktive Konformation überführt. Die Src-Aktivierung kann aber auch durch direkte Bindung an Integrine erfolgen. Die aktivierte Src-Kinase kann eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren. Eines der Substrate stellt FAK selbst dar, das an weiteren Tyrosinresten phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von Y576 und Y577 im Aktivierungsloop trägt zur maximalen Aktivierung von FAK bei. Darüber hinaus werden durch Src die Tyrosine Y861 und Y925 phosphoryliert, wodurch weitere Proteinbindungsstellen erzeugt werden (Mitra et al. 2005, Wozniak et al. 2004). Die Phosphorylierung von FAK ist jedoch nicht ausschließlich von Adhäsionsprozessen abhängig, sondern kann auch durch Signalprozesse, die von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ausgehen, beeinflusst werden (Schlaepfer et al. 1999). FAK stellt somit ein Protein dar, das Signalprozesse unterschiedlicher Rezeptortypen integrieren kann. In Bild 1.6 sind Bindungspartner von FAK dargestellt. Unter diesen Proteinen befinden sich Aktivatoren und Inhibitoren von GTPasen der Rho-Familie, die Adapterproteine Paxillin, Talin und p130Cas, PI3K, PLC γ , und Adapterproteine wie Shc und Grb2, die an der Aktivierung der MAPK-Kaskade beteiligt sind (Mitra et al. 2005).

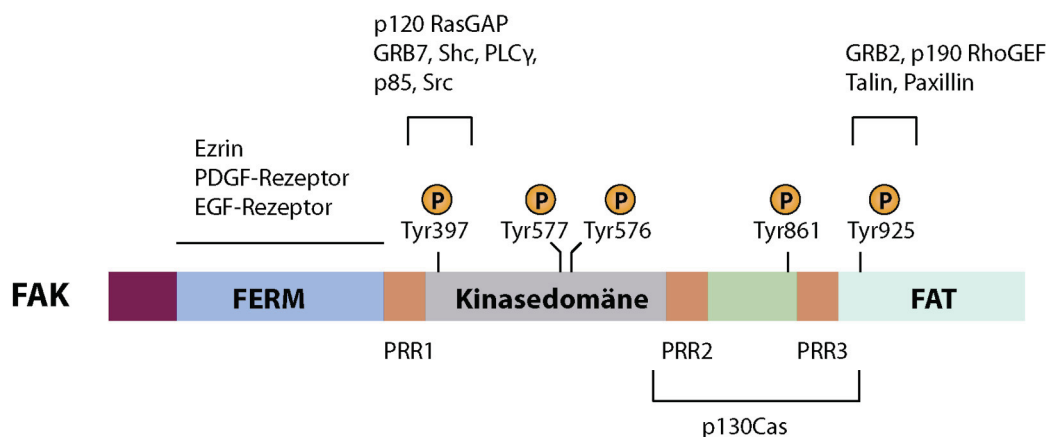


Bild 1.6: FAK-Domänenstruktur und Tyrosinphosphorylierungsstellen. FAK enthält eine FERM (protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology)-Domäne, eine Kinasedomäne, eine FAT-Domäne sowie drei prolinreiche Domänen (PRR). Bindungspartner für die unterschiedlichen Domänen und Phosphotyrosine sind dargestellt. Das Bild wurde modifiziert nach Mitra et al. 2005.

Sowohl Src als auch FAK können die Phosphorylierung ihrer Bindungspartner regulieren. Eines der Substrate von Src und FAK ist Paxillin. Das Adapterprotein vermittelt nicht nur den Kontakt zwischen Integrinen und FAK, sondern stellt auch ein weiteres essentielles Gerüstprotein für Signalproteine in Fokaladhäsionen dar. Über die Phosphorylierungsstellen und verschiedene Proteininteraktionsdomänen kann Paxillin Kinasen (z.B. FAK, Src), Phosphatasen (z.B. PTP-PEST), Actin-bindende Proteine (z.B. Vinculin) und Regulatoren und Effektoren der Rho-Familie-GTPasen binden (Deakin and Turner 2008) und zum Aufbau von Adhäsionskomplexen beitragen. Neben der Funktion als Plattform für Signalproteine dienen Zell-Matrix-Kontakte auch der Verankerung des Actinzytoskeletts. Die Verbindung wird über Proteine wie z.B. α -Actinin, Talin und Filamin hergestellt (Wozniak et al. 2004).

Die Proteinkomplexe, die sich an den Zell-Matrix-Kontakten ausbilden, unterliegen einem dynamischen, räumlich und zeitlich regulierten Aufbau und Abbau. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Komplexes und des Phosphorylierungszustandes der Komponenten können eine Vielzahl von Signalwegen reguliert werden, wodurch Prozesse wie die Migration, Proliferation und die Organisation des Actinzytoskeletts moduliert werden (Berrier and Yamada 2007; Bild 1.7)

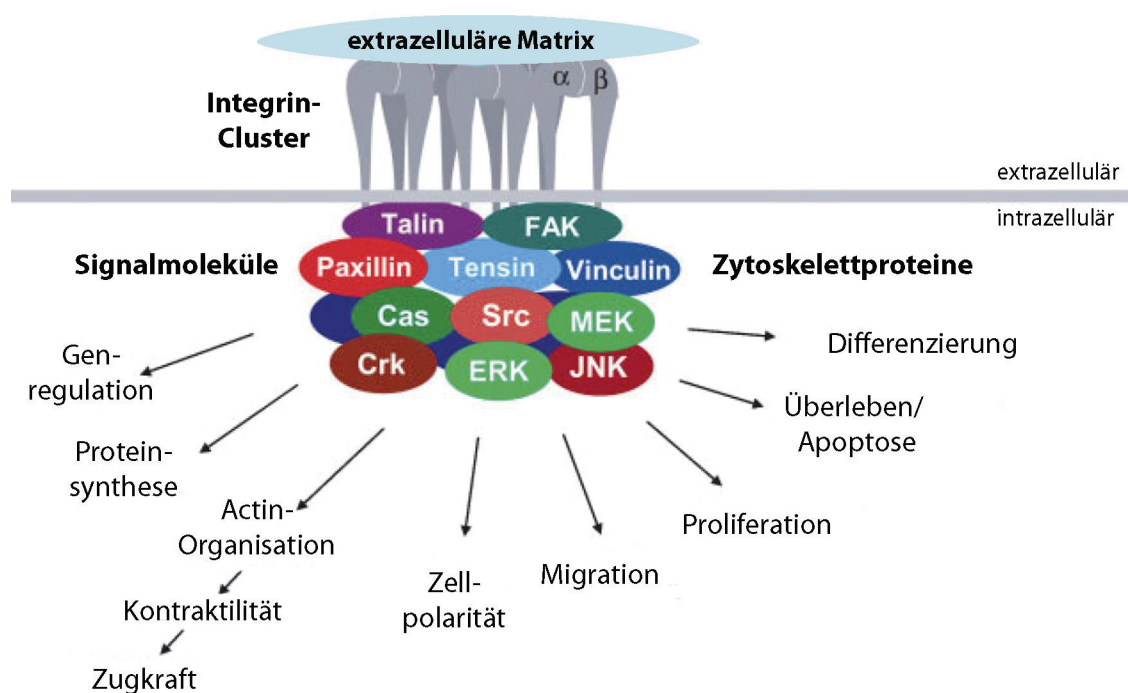


Bild 1.7: Allgemeines Modell der Zell-Matrix-Adhäsionskomplexe und deren Funktion. Integrin-haltige Zell-Matrix-Adhäsionen rekrutieren zytoplasmatische Proteine, die in Kooperation mit anderen Zelloberflächenrezeptoren vielfältige zelluläre Prozesse, Funktionen und Phänotypen regulieren. Modifiziert nach Berrier and Yamada 2007.

1.6 Kolonkarzinom

Das Kolonkarzinom zählt zu den häufigsten humanen Krebsformen. 2004 sorgte das Kolonkarzinom mit 639.000 Todesfällen weltweit für die dritthöchste Anzahl von Todesfällen durch Krebs (www.who.int.). Die Inzidenz ist in den Industrieländern im Allgemeinen höher als in den Entwicklungsländern. Zur Karzinogenese können sowohl erbliche als auch Umweltfaktoren beitragen (Rupnarain et al. 2004). Die genetischen Veränderungen während der Kolonkarzinogenese sind vergleichsweise gut charakterisiert und können teilweise mit bestimmten Tumorentwicklungsstadien in Verbindung gebracht werden (Bild 1.8).

Zu den wichtigsten Veränderungen zählt die Inaktivierung des Tumorsuppressors *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, die bereits in prämaligen Läsionen, so genannten „aberrant crypt foci“ auftritt. Eine Inaktivierung von *APC* resultiert in der Überaktivierung des Wnt-Signalwegs. In späteren Stadien der Karzinogenese treten häufig inaktivierende Mutationen im Tumorsuppressor und Zellzyklus-Regulator *TP53* auf. In einem großen

Anteil von Tumoren erfolgt außerdem eine Inaktivierung von Genen, die für Komponenten des TGF β -Signaltransduktionsweges kodieren. Durch Inaktivierung von *TGFBR2* oder *SMAD4* geht der TGF β -vermittelte Wachstumsarrest und die Apoptoseinduktion verloren. Aktivierende Mutationen von *KRAS* und *BRAF* und inaktivierende Mutationen in *PTEN* können außerdem zu einer Stimulation der Proliferation bzw. Hemmung der Apoptose und somit zur Tumorprogression beitragen (Markowitz and Bertagnolli 2009)

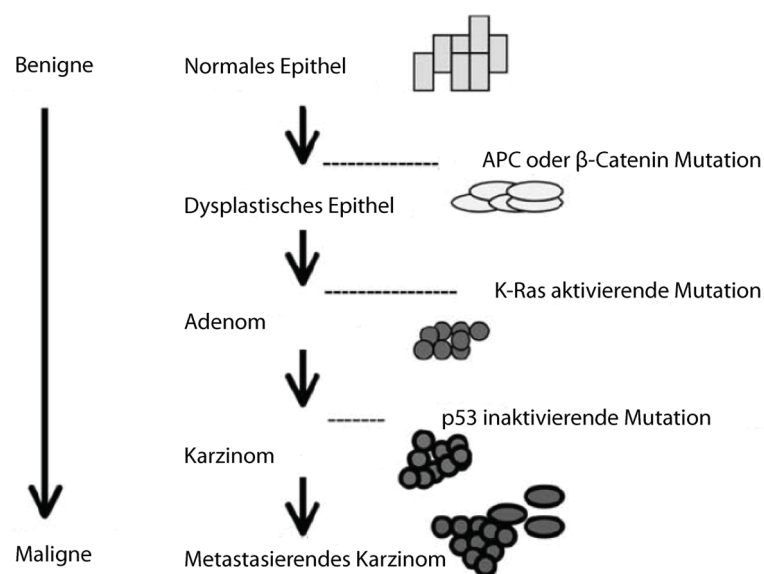


Bild 1.8: Genetische Veränderungen in unterschiedlichen Stadien der Kolonkarzinogenese. Das Bild wurde Rupnarain et al. 2004 entnommen und modifiziert.

1.7 Meningeom

Meningeome sind Tumoren der Hirnhaut und machen etwa 25-30% aller primären Hirntumoren aus. Die jährliche Inzidenz wird mit 4-6 pro 100.000 angegeben. Die Tumoren gehen aus arachnoidalen Deckzellen hervor. Diese meningoethelialen Zellen weisen sowohl Charakteristika epithelialer Zellen als auch mesenchymaler Zellen auf.

Nach der WHO-Klassifizierung werden Meningeome in drei Grade unterteilt. Das langsam wachsende benigne Meningeom (Grad I) ist mit etwa 80% die häufigste Tumorform. Etwa 15-20% der Meningeome entfallen auf das atypische Meningeom (Grad II), das durch ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko gekennzeichnet ist. Das anaplastische oder maligne Meningeom (Grad III) ist mit einer Häufigkeit von 1-2% sehr selten, weist aber ein hoch aggressives Wachstumsverhalten auf. Obwohl die große Mehrheit der Meningeome nicht

metastasiert, kann das Tumorwachstum aber mit Knochen- und Hirninvansion verbunden sein und beispielsweise zu neurologischen Ausfällen führen (Marosi et al. 2008, Perry et al. 2004).

Einen etablierten Tumorsuppressor für das Meningeom stellt das Gen *NF2* (*Neurofibromatosis 2*) dar, das auf Chromosom 22 kodiert wird. Zu den häufigsten beobachteten genetischen Veränderungen in Meningeomen zählt die biallelische *NF2* Inaktivierung durch inaktivierende *NF2*-Mutationen und Heterozygotieverlust von Chromosom 22q (Perry et al. 2004). Dass *NF2* eine wichtige Rolle für die Tumorsuppression von Meningeomen spielt, wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass Meningeome stark gehäuft in Patienten mit erblichen *NF2*-Mutationen (Neurofibromatose Typ 2) auftreten (Baser et al. 2003) und auch in Mäusen durch konditionellen *NF2*-Knockout induziert werden können (Kalamarides et al. 2002).

Neben der Inaktivierung von *NF2* wurden auch Mutationen von weiteren Tumorsuppressoren wie *CDKN2A* (p16^{INK4a}) und *CDKN2B* (p15^{INK4b}) in Meningeomen identifiziert. Darüber hinaus wurde die Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktor-abhängiger Signalwege beschrieben. Die gleichzeitige Expression von PDGF-Rezeptoren und PDGF-Liganden in einigen Meningeomen legt nahe, dass eine autokrine Stimulation der Rezeptoren zur Tumorigenese beitragen könnte (Riemenschneider et al. 2006).

1.8 Zielstellung

Der Heterozygotieverlust von *PTPRJ* in einem hohen Prozentsatz von Kolonkarzinomen weist auf eine Tumorsuppressorfunktion der Phosphatase hin (Ruivenkamp et al. 2003). Über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist jedoch wenig bekannt.

Funktionelle Analysen in SW480-Kolonkarzinomzellen zeigten, dass DEP-1 anti-transformierende Effekte vermittelt und die cMet-abhängige Signaltransduktion sowie die Paxillin- und FAK-Phosphorylierung reguliert. (Balavenkatraman et al. 2006, Balavenkatraman, unpublizierte Daten). Da die Daten – wie auch der Großteil der in anderen Zellmodellen beschriebenen Effekte – auf einer Überexpression von DEP-1 basierten, sollten die funktionellen Untersuchungen durch stabilen shRNA-vermittelten Knockdown von DEP-1 in Kolonkarzinomzelllinien ergänzt und die Relevanz der Befunde überprüft werden. Zusätzlich sollten mit Hilfe von Antikörper-Arrays und *in vitro*-

Substrat-Trapping-Analysen nach weiteren Substraten gesucht werden und deren Interaktion mit DEP-1 in intakten Zellen charakterisiert werden. Die Rolle von DEP-1 für das Tumorwachstum *in vivo* sollte durch Xenotransplantation von Kolonkarzinomzellen in Mäuse charakterisiert werden.

Da die Analyse der Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen jedoch nur wenige Erkenntnisse lieferte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit dem Meningeom eine weitere Tumorart in die Analysen einbezogen. Durch LOH-Analysen sollte untersucht werden, ob *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in Meningeomen auftritt und somit für die Tumorigenese von Bedeutung sein könnte. Durch stabilen Knockdown von DEP-1 in Meningeomzelllinien sollte die Funktion von DEP-1 durch funktionelle Assays und Signaltransduktionsstudien charakterisiert werden. Da PDGF-Rezeptoren einerseits Substrate von DEP-1 darstellen und andererseits möglicherweise an der Entstehung von Meningeomen beteiligt sind, sollten PDGF-vermittelte Prozesse näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zelllinien und Wachstumsmedien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
HCT116	humane Kolorektalkarzinom-zelllinie	McCoy's 5 A + Glutamax-I (Gibco) + 10% FCS (Biochrom)
DLD-1	humane Kolorektalkarzinom-zelllinie	RPMI 1640 + L-Glutamin (PAA) + 10% FCS (Biochrom)
Caco-2	humane Kolorektalkarzinom-zelllinie	RPMI 1640 + L-Glutamin (PAA) + 10% FCS (Biochrom)
SW480	humane Kolorektalkarzinom-zelllinie	RPMI 1640 + L-Glutamin (PAA) + 10% FCS (Biochrom)
KT21-MG1	humane Meningeomzelllinie; zurückzuführen auf ein malignes Meningeom	DMEM High Glucose + L-Glutamin + Pyruvat (PAA) + 10% FCS (Biochrom)
SF3061	humane Meningeomzelllinie; zurückzuführen auf ein malignes Meningeom	DMEM High Glucose + L-Glutamin + Pyruvat (PAA) + 10% FCS (Biochrom)
HEK293 T	humane embryonale Nierenzelllinie, SV40 large T-Antigen exprimierend	DMEM/F12 (Gibco) + 10% FCS (Biochrom)

KT21-MG1- (im Folgenden als „KT21“ bezeichnet) und SF3061-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Anita Lal (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Die restlichen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

Tumormaterial und Meningeomzelllysate

Meningeom-Tumorproben und Lysate der Zelllinien BenMen1, F5, HBL52, IOMM-Lee wurden von Dr. Daniela Haase/Prof. Dr. Christian Mawrin (Institut für Pathologie, Universität Jena/Institut für Neuropathologie, Universität Magdeburg) zur Verfügung gestellt.

Verwendete und erzeugte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pcDNA3-TAP-DEP-1-WT	Expressionsplasmid für WT-DEP-1 mit C-terminalem TAP-Tag	T. Tenev
pcDNA3-TAP-DEP-1-DA	Expressionsplasmid für DEP-1 mit D1205A-Mutation und C-terminalem TAP-Tag	T. Tenev
pGEX6P-1-cat.DEP-1-CS	bakterielles Expressionsplasmid für GST-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne von DEP-1 mit C1239S-Mutation des katalytischen Cysteins	T. Tenev
pGEX6P-1-cat.DEP-1-WT	bakterielles Expressionsplasmid für GST-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne von WT-DEP-1	erzeugt
pGEX6P-1-cat.DEP-1-DA	bakterielles Expressionsplasmid für GST-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne von DEP-1 mit D1205A-Mutation	erzeugt
pRev	Plasmid für Lentivirus-Produktion	C. Stocking, Hamburg
pEnv-VSV-G	Plasmid für Lentivirus-Produktion	C. Stocking, Hamburg
pMDLg	Plasmid für Lentivirus-Produktion	C. Stocking, Hamburg
pLKO.1-DEP-1 shRNA 1-4	Expressionsplasmide für DEP-1-targeting-shRNAs; shRNA-Sequenzen siehe Tabelle „shRNA-Sequenzen“	SHCLNG-NM_002843 Sigma-Aldrich
pLKO.1-control	Expressionsplasmid für eine non-targeting („control“-shRNA; shRNA-Sequenz siehe Tabelle „shRNA-Sequenzen“	SHP002 Sigma-Aldrich

siRNA-Sequenzen

siRNA	Sequenz	Katalog-Nr.
DEP-1	sense: ant sense:	UACUGUGUCUUGGAAUCUAdGdC UAGAUUCCAAGACACAGUAdGdG
control	„Target“-DNA-Sequenz:	AATTCTCCGAACGTGTCACGT

shRNA-Sequenzen

shRNA	Sequenz	Katalog-Nr.	Region
DEP-1 - 1	CCGGCCACACAAGCACGTATGACAACTCG AGTTGTCATACGTGCTTGTGTGGTTTTT	SHCLNG-NM_002843 TRCN0000002869 Sigma-Aldrich	CDS
DEP-1 - 2	CCGGGCCATAGAGTTCAGGACAAATCTCG AGATTTGTCCTGAACTCTATGGCTTTTT	SHCLNG-NM_002843 TRCN0000002870 Sigma-Aldrich	CDS
DEP-1 - 3	CCGGCCGATAACAATGCCACCGTTTACTCG AGTAAACGGTGGCATTGTATCGGTTTTT	SHCLNG-NM_002843 TRCN0000002871 Sigma-Aldrich	CDS
DEP-1 - 4	CCGGCCTACTGTGTCTTGGAAATCTACTCG AGTAGATTCCAAGACACAGTAGGTTTTT	SHCLNG-NM_002843 TRCN0000002872 Sigma-Aldrich	3' UTR
control	CAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTT GGTGCTCTTCATCTTGTTG	SHP002 Sigma-Aldrich	-

CDS - kodierende Sequenz; UTR - untranslatierte Region

Primärantikörper

Antikörper		Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
anti-phospho-PLC γ 1 (Tyr783)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	2821
anti-PLC γ (E-12)	Maus MK	1:1000 (WB)	Santa Cruz	sc-7290
anti-phospho-PDGF Rezeptor α (Tyr849)/ β (Tyr857)	Kaninchen MK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3170
anti-PDGF-Rezeptor α	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3164
anti-PDGF-Rezeptor β	Kaninchen MK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	4564
anti-phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen MK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	4058
anti-Akt	Kaninchen PK	1:2000 (WB)	Cell Signaling	9272
anti-phospho-Paxillin (Tyr118)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	2541
anti-Paxillin (H-114)	Kaninchen PK	1:1000 (WB) 1:250 (IF)	Santa Cruz	sc-5574
anti-phospho-p44/42 Erk (Thr202/Tyr204)	Maus MK	1:2000 (WB)	Cell Signaling	9106
anti-Erk1	Maus MK	1:1000 (WB)	Transduction Laboratories	610123
anti-DEP-1 (143-41)	Maus MK	1:3000 (WB)	Santa Cruz	sc-21761
anti- β -Actin	Maus MK	1:5000 (WB)	Sigma-Aldrich	A5441

Antikörper		Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
anti-Vinculin	Maus MK	1:5000 (WB) 1:500 (IF)	Biozol	BZL03106
anti-phospho-Met (Tyr1349)	Kaninchen MK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3133
anti-phospho-Met (Tyr1230/ Tyr1234/Tyr1235)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-888G
anti-Met (C-28)	Kaninchen PK	1:200 (WB)	Santa Cruz	sc-161
anti-phospho Src (Tyr527)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	2105
anti-cSrc (SRC 2)	Kaninchen PK	1:3000 (WB)	Santa Cruz	sc-18
anti-phospho Tyrosin (4G10)	Maus MK	1:10.000 (WB)	Eigenproduktion	
anti-phospho FAK (Tyr925)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3284
anti-phospho FAK (Tyr397)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-631
anti-phospho FAK (Tyr407)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-631
anti-phospho FAK (Tyr576)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-631
anti-phospho FAK (Tyr577)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-631
anti-phospho FAK (Tyr861)	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Biosource	44-631
anti-FAK	Kaninchen PK	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3285
anti-p140Sra-1	Kaninchen PK	2 µg/ml	Millipore	07-531
anti-p120 Catenin	Maus MK	1:1000 (WB)	Transduction Laboratories	P17920

PK - polyklonal; MK - monoklonal; WB - Westernblot; IF - Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper

Antikörper		Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
anti-Mouse IgG-Peroxidase	Ziege	1:10.000 (WB)	KPL	074-1806
anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Ziege	1:10.000 (WB)	KPL	074-1506
anti-Mouse IgG-Cy3	Ziege	1:600 (IF)	Jackson ImmunoResearch	115-165- 003
anti-Rabbit IgG-Cy3	Ziege	1:600 (IF)	Jackson ImmunoResearch	111-165- 003

Weitere Materialien

Restriktionsenzyme	NEB
DNA-Kits (Gelextraktion, Minipräparationskit)	Qiagen
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific/Pierce
Cell Death Detection ELISA kit	1774425; Roche Diagnostics
Fibronectin	F1141; Sigma-Aldrich
Kollagen Typ I	C9791; Sigma-Aldrich
Kollagen Typ II	C9301; Sigma-Aldrich
PDGF-AA; human, rekombinant	PeproTech
PDGF-BB; human, rekombinant	Biosource
PDGF-DD; human, rekombinant	R&D Systems
HGF; human, rekombinant	PeproTech
Normal mouse IgG	sc-2025; Santa Cruz
Normal rabbit IgG	sc-2027; Santa Cruz
Goat Serum	G9023; Sigma-Aldrich
GSH-Sepharose	GE Healthcare
WGA-Agarose	Sigma-Aldrich
Superdex 200-Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Affigel 15-Agarose	Bio Rad
Sepharose CL 4B	Sigma-Aldrich
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich
CellTracker™ Green CMFDA	C2925; Invitrogen
MTT	Sigma-Aldrich
Staurosporin	Alexis Biochemicals
Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Natriumiodoacetat	I9148; Sigma-Aldrich
Oligofectamine	Invitrogen
Immumount	Thermo Scientific
Roti-Blue (Kolloidales Coomassie)	Roth
PEI (Polyethylenimin)	408727; Sigma-Aldrich
Western Lightning Plus ECL	Perkin Elmer
CELLview™ Zellkultur Schale (vier Kompartimente, Glasboden)	627 870; Greiner Bio-One

Thin Certs TC Einsätze (6-Well, 8 µm, translucent)	657638; Greiner Bio-One
96-Well-Platten für Fluoreszenzmessung	655098; Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen, -schalen,	Greiner Bio-One
Trypsin/EDTA	PAA

2.2 Puffer

Lysepuffer A (Standardlysepuffer)

50 mM HEPES pH 7,5
 150 mM NaCl
 2 mM EGTA
 1 mM EDTA
 1% NP 40
 10 mM Na-Pyrophosphat
 50 mM NaF

Proteaseinhibitoren (frisch zugesetzt):

1 µg/ml Leupeptin
 1 µg/ml Pepstatin A
 1 mM PMSF
 200 KIE/ml Aprotinin
 1 mM Benzamidin
 0,1 mg/ml Pefablock

Phosphataseinhibitoren (frisch zugesetzt):

1 mM Natriumorthovanadat
 10 mM β-Glyzerophosphat

Lysepuffer B (Bakterienlyse)

25 mM Tris pH 7,5
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 2 mM EGTA
 0,1% β-Mercaptoethanol
 + Proteaseinhibitoren (frisch zugesetzt)

Lysepuffer C (Substrat-Trapping)

50 mM HEPES pH 7,5
 150 mM NaCl
 1% NP40
 1 mM EDTA
 2 mM EGTA
 10% Glycerol
 5 mM Natriumiodoacetat
 + Proteaseinhibitoren (frisch zugesetzt)

Lysepuffer D (Adhäsionsassay)

50 mM HEPES pH 7,5
 1% NP40
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 2 mM EGTA

Waschpuffer A (Fusionsproteinaufreinigung)

25 mM Tris pH 7,5
 150 mM NaCl,
 1% Triton X-100,
 10 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer B (Substrat-Trapping)

50 mM HEPES pH 7,5
 150 mM NaCl
 1% NP40
 1 mM EDTA
 10% Glycerol

HEPES/NaCl Puffer

0,1 M HEPES pH 7,5
150 mM NaCl

KCM-Puffer

0,5 M KCl
0,15 M CaCl₂
0,25 M MgCl₂

LB-Medium

10 g Bactotrypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
1 l Wasser

6x Probenpuffer

6% SDS
30% β-Mercaptoethanol
40% Glycerol
Bromphenolblau

6x SDS/DTT-Probenpuffer

350 mM Tris pH 6,8
30% Glycerol
10% SDS
600 mM DTT
Bromphenolblau

SDS-PAGE Laufpuffer

384 mM Glycin
50 mM Tris
0,1% SDS

Anodenpuffer für Westernblot

300 mM Tris
20% Methanol

Kathodenpuffer für Westernblot

25 mM Tris
40 mM ε-Aminocaprinsäure
20% Methanol
0,05% SDS

NET-G

50 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM EDTA
0,05% Tween 20
0,04% Gelatine

Stripp-Puffer

62,5 mM Tris pH 6,7
100 mM β-Mercaptoethanol
2% SDS

1 mM Pervanadat

1 mM Natriumorthovanadat
5 mM H₂O₂
1 mM HEPES pH 7,4
frisch hergestellt; verwendet nach
5 min Inkubation

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

Die einzelnen Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Die verwendeten Medien und Seren sind in der Tabelle „Zelllinien und Wachstumsmedien“ aufgeführt. Wenn die Zellen 80-100% Konfluenz erreichten, wurde das Medium abgesaugt

und der Zellrasen 1-2x mit Trypsin/EDTA gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (1 ml pro 75 cm²-Flasche) im Inkubator behandelt, bis sich die Zellschicht vom Flaschenboden ablöste. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium resuspendiert und ein Teil der Zellsuspension in eine neue Flasche mit Wachstumsmedium überführt.

Zum Herstellen von Kryokonserven wurden die Zellen trypsinisiert, in Wachstumsmedium resuspendiert, abzentrifugiert und anschließend in 90% FCS/10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquoten in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden anschließend in Einfrierbehältern langsam auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff bzw. bei -150 °C.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryokonserven im Wasserbad (37 °C) erwärmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Alle Zellen wurden regelmäßig auf Mycoplasmen-Infektion überprüft.

2.3.2 Klonierung

Die intrazelluläre Domäne von DEP-1 (welche die katalytische Domäne enthält) sollte als Wildtyp (WT) oder D1205A-Mutante (DA) in den bakteriellen Vektor pGEX6P-1 kloniert werden, um GST-Fusionsproteine der Domänen herzustellen. Da bereits die C1239S-Mutante (CS) der intrazellulären Domäne in pGEX6P-1 vorlag (pGEX6P-1-cat.DEP-1-CS), wurde dieses Konstrukt zur Erzeugung des Wildtyps bzw. der DA-Mutante verwendet. Der WT und die D1205A-Mutation lagen bereits im eukaryotischen Expressionskonstrukt pcDNA3-TAP-DEP-1-WT bzw. pcDNA3-TAP-DEP-1-DA vor. Aus dem pGEX6P-1-cat.DEP-1-CS wurde deshalb ein Bereich, der sowohl die Sequenz für D1205 als auch die CS-Mutation kodiert, aus dem Plasmid geschnitten und durch den entsprechenden Abschnitt aus den vorliegenden Konstrukten pcDNA3-TAP-DEP-1-WT bzw. pcDNA3-TAP-DEP-1-DA ersetzt.

Das Plasmid pGEX6P-1-cat.DEP-1-CS wurde hierfür zunächst mit Hind III und Bsm I verdaut. Der Restriktionsansatz wurde über eine Plasmidpräparations-Säule aufgereinigt und mit BseAI geschnitten, um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation des Vektors infolge unvollständiger Spaltung zu verringern. Zur Erzeugung der Insert-Fragmente

wurden die Plasmide pcDNA3-TAP-DEP-1-WT und pcDNA3-TAP-DEP-1-DA ebenfalls mit Hind III und Bsm I verdaut. Die Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung eines Gelextraktionskits nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die Vektor- und Insert-Fragmente wurden ligiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* (XL1-Blue) nach der KCM-Methode mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Bakterien wurden auf ampicillinhaltigen (300 µg/ml) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Resistente Klone wurden in 2 ml LB-Medium mit 300 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die DNA wurde durch DNA-Minipräparation isoliert und die Einführung der Mutationen wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

2.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne von DEP-1 (WT oder D1205A-Mutante) wurden in *E. coli* Rosetta exprimiert. Dazu wurden die Bakterien zunächst mit den Expressionsplasmiden pGEX6P-1-cat-DEP-1-WT oder pGEX6P-1-cat-DEP-1-DA nach der KCM-Methode transformiert. Positive Klone wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol bei 37 °C bis zu einer OD von 0,5 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 5 h Inkubation bei RT wurden die Bakterien abzentrifugiert, in Lysepuffer B resuspendiert und mit Hilfe einer French Press lysiert. Die Lysate wurden 30 min bei 30.000 rpm zentrifugiert, der Überstand gefiltert (0,45 µm Filterporengröße) und anschließend mit GSH-Sepharose 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Sepharose wurde 4x mit Waschpuffer A und 1x mit Waschpuffer A ohne Triton gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit 20 mM Glutathion in Waschpuffer ohne Triton eluiert und mit einer Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheit (Ultracel-30 Membran) konzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend mittels FPLC über eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule in HEPES/NaCl Puffer aufgereinigt. Fraktionen, die GST-Fusionsproteine enthielten, wurden kombiniert und auf eine Pufferkonzentration von 0,1 M HEPES pH 7,5, 75 mM NaCl verdünnt. Die Proteine wurden 4 h bei 4°C an Affigel 15-Agarose gekoppelt. Danach wurde die Agarose 5x mit HEPES/NaCl Puffer gewaschen und in HEPES/NaCl Puffer mit 0,02% Natriumazid gelagert.

2.3.4 Substrat-Trapping

SW480-Kolonkarzinomzellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 ml 100 µM Pervanadat (1:10 Verdünnung von frisch hergestelltem 1 mM Pervanadat) pro Flasche in serumfreiem Medium 10 min bei 37 °C inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in jeweils 5 ml Lysepuffer C auf Eis lysiert. Nach 5 min wurde DTT (10 mM Endkonzentration) zugegeben und das Lysat für weitere 5 min auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation der Lysate wurde eine Reinigung (*preclearing*) mit 200 µl gewaschener Sepharose CL 4B (1:1 Suspension) für 6 h bei 4 °C auf dem Drehrad durchgeführt. Anschließend wurde das Lysat (100 mg Protein pro Ansatz; Pervanadat-behandelt oder unbehandelt) mit 100 µg gekoppelter intrazellulärer Domäne (DEP-1-WT/DA) über Nacht auf dem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden 4x mit 3 ml Waschpuffer B gewaschen und im Anschluss in 70 µl 3x SDS/DTT-Probenpuffer 1 h bei 37 °C inkubiert. 40 µl dieses Eluats wurden für die anschließende Massenspektrometrie-Analyse durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Massenspektrometrie-Analytik wurde von Herrn Dr. Karl-Heinz Gührs (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) durchgeführt. Für die Analyse des Eluats mittels Westernblot wurden 10 µl Aliquote eingesetzt.

2.3.5 Herstellung von stabil DEP-1-depletierten Zellen

Ein stabiler Knockdown von DEP-1 wurde durch Lentivirus-vermittelte Transduktion der Zielzelllinien mit pLKO.1-shRNA-Expressionsplasmiden erzielt. Es wurden vier nicht-validierte DEP-1 shRNA-Sequenzen getestet (MISSION shRNA-Kollektion SHCLNG-NM_002, Sigma-Aldrich). Zur Erzeugung einer Kontrollzelllinie wurde eine non-targeting shRNA („control shRNA“) verwendet.

Die zu transduzierenden Zelllinien wurden am Tag vor der Virusinfektion in 6-Well-Platten in Wachstumsmedium eingesät. Die Konfluenz zum Zeitpunkt der ersten Infektion betrug ca. 30%.

Für die Virusherstellung wurden HEK293 T-Zellen mit der PEI-Transfektionsmethode mit den pLKO.1-Plasmiden und Virus-Verpackungsplasmiden transfiziert. Dazu wurden pro 6-Well 2 µg pMDLg, 1 µg pRev, 0,4 µg pEnv-VSV-G und 2 µg pLKO.1-shRNA-Plasmid (DEP-1 shRNA oder control shRNA) in 250 µl DMEM ohne FCS verdünnt. In einem

separaten Ansatz wurden 2,5 µg PEI/µg DNA in 250 µl DMEM ohne FCS verdünnt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde der PEI-Ansatz zum DNA-Ansatz pipettiert, gemischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen (in 2 ml serumfreiem DMEM) pipettiert. Nach 4 h wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml Wachstumsmedium ersetzt. Alle folgenden Arbeitsschritte und die Kultivierung der Zellen erfolgten unter S2-Bedingungen.

Die erste Virusernte erfolgte 24 h nach Transfektion der HEK 293 T-Zellen. Hierfür wurde das Medium, welches die Viruspartikel enthielt, abgenommen und filtriert. Zu den Zellen wurden 2 ml frisches Wachstumsmedium gegeben, welches nach weiteren 24 h geerntet wurde (zweite Virusernte). Zur Infektion der Zielzelllinien wurde 0,5 ml Virusüberstand der ersten oder zweiten Ernte und 0,5 ml Wachstumsmedium zusammen mit 8 µg Polybren zu den Zielzellen (in 6-Well-Platten) gegeben. Die Platte wurde anschließend für 1 h bei 500 g zentrifugiert. Die Infektion erfolgte in drei aufeinander folgenden Zyklen von je 8 h bzw. über Nacht mit frischem Virusüberstand. Mit der Puromycin-Selektion transduzierter Zellen (HCT116: 0,5 µg/ml, DLD-1 und Caco-2: 2 µg/ml, KT21 und SF3061: 1,5 µg/ml Puromycin) wurde 48 h nach der letzten Infektion begonnen. Drei Wochen nach Beendigung der Virusinfektion wurden die Zellen wieder unter S1-Bedingungen kultiviert.

Die für die späteren Untersuchungen verwendeten, mit dem DEP-1-shRNA-Target Nr.4 transduzierten Zellen bzw. die control shRNA-exprimierenden Zellen werden im Folgenden als „HCT116-DEP-1 shRNA“ und „HCT116-control shRNA“ bezeichnet (bzw. analoge Bezeichnung für die anderen Zelllinien).

2.3.6 Zellyse, Proteinbestimmung, WGA-Anreicherung und Westernblot

Zellen wurden vor der Lyse auf Eis mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer A (1 ml/10 cm-Schale bzw. 0,5 ml/6 cm-Schale) 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber gesammelt und durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden in 1x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C denaturiert.

Für den Nachweis von DEP-1, cMet oder PDGF-Rezeptoren wurde zunächst eine Glykoproteinanreicherung mit WGA-Agarose durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl in

Lysepuffer A gewaschene WGA-Agarosebeads (20 µl 1:1 Suspension) mit dem Lysat (500-1000 µg Protein) kombiniert und 2 h oder über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden anschließend 3x mit Lysepuffer gewaschen und zum Eluieren der Proteine mit 2x SDS-Probenpuffer 30 min bei 37 °C oder 5 min bei 95 °C inkubiert.

Die Proteinproben wurden durch SDS-PAGE in 7,5% oder 10% Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend nach dem Semidry-Verfahren unter Verwendung von in Kathoden- bzw. Anodenpuffer getränkten Filterpapieren auf eine PVDF-Membran geblottet (16 V; 60-80 min). Die Membran wurde 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit NET-G blockiert und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (verdünnt in NET-G) inkubiert. Die Membran wurde 3x 10 min mit NET-G gewaschen, 1 h bei RT mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (in NET-G) inkubiert und erneut 3x 10 min gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Reagenz; die Detektion erfolgte mit einer LAS 4000 Kamera (Fujifilm). Sollten auf einer Membran weitere Proteine detektiert werden, wurde die Membran 30 min bei 65 °C mit Stripp-Puffer inkubiert, anschließend gründlich mit NET-G gewaschen, mit NET-G blockiert und erneut mit Antikörperlösung inkubiert.

Die Signale wurden mit der Multi Gauge V3.0-Software (Fujifilm) quantifiziert.

2.3.7 HGF- und PDGF-Stimulation

Transduzierte Kolonkarzinomzelllinien wurden in 6 cm-Zellkulturschalen, transduzierte KT21- und SF3061-Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen in Wachstumsmedium eingesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit sterilem PBS gewaschen und über Nacht in serumfreiem Medium gehungert.

Die Stimulation der Kolonkarzinomzellen erfolgte mit 50 ng/ml HGF in serumfreiem Medium für 0, 5, 15 bzw. 30 min bei 37 °C. Die Meningeomzellen wurden mit 50 ng/ml PDGF-AA, 50 ng/ml PDGF-BB oder 100 ng/ml PDGF-DD für 0, 2,5, 5 bzw. 15 min bei 37 °C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer A lysiert. Die Lysate wurden durch Westernblot analysiert.

2.3.8 Antikörper-Array und Westernblot-Validierung (Kinexus Bioinformatics Corporation)

HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1 shRNA-Zellen wurden in Wachstumsmedium kultiviert und bei annähernd 100%iger Konfluenz trypsiniert und eingefroren. Die Zellen wurden von Kinexus Bioinformatics Corporation (Kanada) lysiert und zunächst mit dem Kinex™ Antibody Microarray (377 pan-spezifische und 273 Phosphorylierungsstellen-spezifische Antikörper) untersucht. Ausgewählte Proteinphosphorylierungen wurden anschließend durch Kinexus Bioinformatics Corporation mittels Westernblot (Kinetworks™ KCPS 1.0 Service) analysiert.

2.3.9 MTT-Proliferationsassay

5000 HCT116-Zellen, 2000 KT21- oder 2500 SF3061-Zellen (untransduziert, DEP-1-shRNA- oder control shRNA-exprimierend) wurden pro Well in 100 µl Wachstumsmedium in 96-Well-Platten eingesät. Nach 24, 48, 72 bzw. 96 h wurden 10 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung zugegeben. Nach weiteren 4 h im Inkubator wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Solubilisierungspuffer (10% SDS, 0,01 M HCl) über Nacht im Inkubator lysiert. Die MTT-Farbreaktion wurde durch Messung der Absorption bei 570 nm in einem Plattenphotometer quantifiziert. Für jeden Messpunkt wurden 6fach-Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.3.10 Koloniebildungsassay

Im 42 °C Wasserbad wurde eine 0,5%ige Softagarlösung, bestehend aus 10 ml 1x DMEM, 4 ml 2x DMEM, 2 ml FCS und 4 ml 2,5%ige Agarlösung (zuvor aufgeköcht und auf 42 °C abgekühlt), hergestellt. Je 0,5 ml der Mischung wurden in die Wells einer 24-Well-Platte pipettiert. Zum Festwerden des Agars wurde die Platte 30 min bei 4 °C und 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen trypsiniert, in Wachstumsmedium resuspendiert und auf eine geeignete Konzentration (HCT116-Zelllinien: 20.000 Zellen/ml; KT21-Zelllinien: 10.000 Zellen/ml) mit Wachstumsmedium verdünnt. Im Anschluss wurden 0,5 ml der noch flüssigen Softagarlösung mit 0,5 ml Zellsuspension gemischt und von diesem Ansatz 0,5 ml in die Platten auf die untere Agarschicht pipettiert. Von jeder Zelllinie wurden 4 Replikate angesetzt. Die Platte wurde 5 min bei 4 °C und 10 min bei RT inkubiert und anschließend in den Inkubator überführt. Nach 10-15 Tagen wurden die Kolonien durch Überschichten des Agars mit 0,5 ml MTT (0,5 mg/ml) 2 h im Inkubator

angefärbt. Anschließend wurde die MTT-Lösung abgesaugt und die Platte eingescannt. Die Koloniezahl und -größe wurden mit dem Programm Colony V1.1 (Fujifilm) bestimmt.

2.3.11 Adhäsionsassays

Quantitativer Assay (Fluoreszenzmarkierung)

Für die Adhäsionsassays wurden 96-Well-Platten (Greiner Bio-One, Kat. Nr. 655098) mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin, $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen Typ I bzw. $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen Typ II beschichtet. Für die Beschichtung wurde pro Well die dafür berechnete Menge Protein in $50 \mu\text{l}$ PBS verdünnt. Nach 3 h Beschichtung im Inkubator wurden die Lösungen abgesaugt und die Platte über Nacht unter UV-Licht in einer Sterilbank getrocknet. Vor der Einsaat der Zellen wurde die Platte 2x mit $100 \mu\text{l}$ PBS/Well gewaschen.

Control shRNA- bzw. DEP-1 shRNA-exprimierende HCT116- und KT21-Zellen wurden trypsinisiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und zur Fluoreszenzmarkierung mit $1 \text{ ml } 10 \mu\text{M}$ CellTracker™ Green CMFDA (10 mM Stammlösung in DMSO) in Medium mit 1% FCS-Zusatz resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min im Inkubator markiert, wobei die Zellen gelegentlich leicht geschüttelt wurden. Danach wurden die Zellen 3x mit serumfreiem Medium gewaschen und auf eine Konzentration von $500.000/\text{ml}$ (HCT116-Zellen) bzw. $150.000/\text{ml}$ (KT21-Zellen) eingestellt. Die Zellen wurden 1 h bei 4°C in Suspension gehalten. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension pro Well in die beschichteten 96-Well-Platten eingesät. Für jeden Messpunkt wurden 6fach-Bestimmungen durchgeführt. Nach 0, 15, 30, 45, 60 bzw. 120 min wurden das Medium und nicht-adhärierte Zellen abgesaugt, die verbliebenen adhären Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und anschließend in $100 \mu\text{l}$ Lysepuffer D 10 min bei RT unter leichtem Schütteln lysiert. Die Fluoreszenz der Lysate wurde in einem Plattenlesegerät (Infinite F200; Tecan; Anregungswellenlänge: 485 nm ; Emissionswellenlänge: 535 nm) gemessen. Die Fluoreszenz des Lysepuffers wurde als Hintergrundwert von den einzelnen Messwerten abgezogen. Die Fluoreszenzwerte wurden auf den 120 min-Wert der control shRNA-exprimierenden Zelllinie normalisiert.

Qualitativer Assay (Kristallviolett-Färbung)

Unmarkierte, control shRNA- bzw. DEP-1 shRNA-exprimierende KT21-Zellen wurden trypsinisiert, 3x mit serumfreiem Medium gewaschen, 1 h in serumfreiem Medium

gehungert und in beschichtete 96-Well-Platten eingesät. Nach 2 h Adhäsion im Inkubator wurden das Medium und nicht-adhärerte Zellen abgesaugt, die adhärerten Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, mit 0,5% Kristallviolett in 20% Methanol für 5 min gefärbt und erneut 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte gescannt.

2.3.12 Adhäsionsabhängige Paxillin-Phosphorylierung

Control shRNA- bzw. DEP-1 shRNA-exprimierende HCT116- und KT21-Zellen wurden trypsiniert, in Wachstumsmedium resuspendiert, 3x mit serumfreiem Medium gewaschen und 1 h in serumfreiem Medium in Suspension ($1,2 \times 10^6$ Zellen/ml (HCT116-Zellen) bzw. 160.000 Zellen/ml (KT21-Zellen)) bei 4 °C inkubiert. 2,5 ml der Zellsuspension wurden pro Well einer Fibronectin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-Well-Platte eingesät. Die Beschichtung erfolgte mit 10 μg Fibronectin in 1,5 ml PBS pro 6-Well, wie unter 2.3.11 beschrieben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden das Medium und nicht-adhärerte Zellen abgesaugt und die Zellen in Lysepuffer A lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

2.3.13 Time-Lapse-Mikroskopie

Control shRNA- und DEP-1 shRNA-exprimierende KT21-Zellen wurden trypsiniert, mit serumfreiem Medium gewaschen und 30 min in Medium ohne Serum bei 4 °C in Suspension gehalten. Danach wurden die Zellen in eine Fibronectin-beschichtete 4-Kammer-Zellkulturschale mit Glasboden (CELLview™) eingesät. Die Ausbreitung beider Zelllinien wurde parallel mit einem Time-Lapse-Mikroskop (AxioVision, Carl Zeiss) mit 37 °C / 5% CO₂-Inkubationskammer über einen Zeitraum von 90 min verfolgt. Hierfür wurden in 10 min-Abständen mit einem 25x Objektiv Z-Stapel-Bilderserien (1,89 μm Abstände) von jeweils 5 Positionen pro Zelllinie aufgenommen.

2.3.14 Immunfärbungen

Zellen wurden auf Fibronectin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Deckgläschen eingesät und mit 4% Paraformaldehyd in PBS 10 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, mit 0,2% Triton in PBS 4 min permeabilisiert und 1 h mit 1,5% BSA + 10% Serum (aus Spezies, in welcher der Sekundärantikörper erzeugt wurde) in PBS blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörper in 1,5% BSA/PBS erfolgte 1 h bei RT oder über

Nacht bei 4 °C. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit normal mouse- bzw. normal rabbit IgG (entsprechend der Spezies des Primärantikörpers) in gleicher Konzentration durchgeführt.

Nach dreimaligem Waschen mit 1,5% BSA/PBS wurden die Zellen mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper 1 h bei RT inkubiert, 3x mit PBS und 1x mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Immumount auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet.

Für die Detektion von filamentösem Actin wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert, permeabilisiert und anschließend mit 1,5% BSA/PBS blockiert. Die Färbung erfolgte mit 0,2 µM TRITC-gekoppeltem Phalloidin in 1,5% BSA/PBS 30 min bei RT.

Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden mittels Laser-Scanning-Mikroskopie erzeugt (Zeiss LSM510, Carl Zeiss; Anregungslaser: 543 nm He/Ne Laser; Detektionsfilter: HFT488/543; LP560).

2.3.15 Migrationsassays

Transwell-Assay

HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurden trypsiniert und 1x mit serumhaltigem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10 µM CellTracker™ Green CMFDA (10 mM Stammlösung in DMSO) in Medium mit 1% FCS-Zusatz resuspendiert. Diese Fluoreszenzmarkierung erfolgte innerhalb von 30 min im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 500.000/ml verdünnt. In der Zwischenzeit wurden die Zellkultureinsätze (Thin Certs TC Einsätze - 6-Well, 8 µm, translucent; Greiner Bio-One) mit 3 ml Kollagen Typ I-Lösung (50 µg/ml in PBS) in 6-Well-Platten 1 h im Inkubator beschichtet. Danach wurde die Kollagen-Lösung abgesaugt und die Inserts 3x mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden 1,5 ml Zellsuspension (750.000 Zellen) in die Inserts und 1,5 ml serumfreies Medium oder Medium mit 2% FCS Zusatz in die unteren Kompartimente (Wells) pipettiert, so dass die FCS-Endkonzentration 0% bzw. 1% betrug. Alle Ansätze wurden in Duplikaten ausgeführt.

Nach 14 h im Inkubator wurden die migrierten Zellen aus dem unteren Kompartiment und von der Membranunterseite gesammelt. Dazu wurde das Medium aus dem Well in ein 15 ml-Röhrchen überführt und das Well 1x mit PBS gespült, welches ebenfalls gesammelt wurde. Eventuell verbliebenes Medium aus dem Zellkulturinsert wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA in das Well pipettiert und der Zellkultureinsatz eingesetzt, um die Zellen an der Unterseite der Membran abzulösen. Nach 5 min Inkubation im Brutschrank wurde 1 ml Medium mit 10% FCS zum Trypsin in das Well pipettiert und die Lösung mit dem bereits gesammelten Medium kombiniert. Das Well wurde noch 2x mit Medium gespült, welches ebenfalls gesammelt wurde. Die Zellsuspension wurde nun zentrifugiert, das Zellpellet wurde 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Kat. Nr. 655098) überführt. Die Fluoreszenz wurde in einem Plattenlesegerät gemessen (Infinite F200; Tecan; Anregungswellenlänge: 485 nm; Emissionswellenlänge: 535 nm).

Wound healing-Assay

Untransduzierte und control shRNA- bzw. DEP-1 shRNA-exprimierende KT21- und SF3061-Zellen wurden in 6 cm-Schalen bis zur Konfluenz kultiviert. Um die Proliferation zu inhibieren, wurden die Zellen für 2 h mit 10 µg/µl Mitomycin C behandelt, bevor die Zellschicht mit einer sterilen 20 µl-Pipettenspitze „verwundet“ wurde. Abgelöste Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde Wachstumsmedium zu den Zellen gegeben. Nach 0, 6 und 20 h wurden Fotos der „Wunden“ an identischen Positionen (auf der Unterseite der Schale markiert) aufgenommen. Mit Image J 1.40g wurde der Anteil der Wundfläche quantifiziert, der zu den jeweiligen Zeitpunkten durch migrierte Zellen bedeckt war.

Boyden-Kammer-Assay

Die Analyse der PDGF-abhängigen Migration erfolgte mit Hilfe einer Boyden-Kammer. Dazu wurden in die oberen Vertiefungen der Kammer 4×10^4 untransduzierte KT21-Zellen und control shRNA- bzw. DEP-1 shRNA-exprimierende KT21-Zellen in serumfreiem Medium pipettiert, während in die unteren Vertiefungen 10 ng/ml PDGF-BB oder serumfreies Medium pipettiert wurde. Die beiden Teile der Kammer wurden durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 8 µm getrennt. Nach vierstündiger Inkubation der Kammer im Inkubator wurden die auf der Membran

anhaftenden Zellen mit 0,5% Kristallviolett in 20% Methanol gefärbt. Anschließend wurden die nicht-migrierten Zellen auf der Membranoberseite mit einem Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten ausgeführt.

2.3.16 Apoptoseassay

Die Staurosporin-induzierte Apoptose von HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurde mit dem Cell Death Detection ELISA Kit (Roche) untersucht. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten eingesät und am darauf folgenden Tag 4 h mit 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 bzw. 1 μ M Staurosporin behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit dem Lysepuffer des Kits 30 min bei RT lysiert und bei 200 x g 10 min zentrifugiert. Die Lysate wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls mittels ELISA analysiert.

2.3.17 LOH-Analyse

Für die LOH-Analyse wurden 32 Meningeome verschiedenen histologischen Subtyps und Tumorgrades (Klassifizierung entsprechend der WHO-Klassifizierung für Hirntumoren von 2007 (Louis et al. 2007)) untersucht. Für *PTPRJ* wurden vier Mikrosatellitenmarker (D11S1350, D11S1784, D11S4117 und D11S4183; wie unter (Ruivenkamp et al. 2003) beschrieben) und für *NF2* drei Mikrosatellitenmarker (D22S268, D22S421 und D22S929; (Kaufman et al. 2003)) analysiert. Dazu wurde DNA aus Tumoren und Blutproben derselben Patienten nach Standardmethoden isoliert. Gepaarte genomische DNA-Proben wurden mit fluoreszenzmarkierten (Cy5) Primern durch PCR amplifiziert. Oligonukleotidsequenzen wurden der UniSTS Datenbank von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen. Für die PCR wurden 100 ng DNA entsprechend der Herstellerinformation (DyNAzyme DNA polymerase kit, FINNZYMES, Espoo, Finnland) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren: 10 min initiale Denaturierung, gefolgt von 35 Zyklen [94 °C für 20 s, 58 °C für 20 s, 72 °C für 30 s] und einer abschließenden Inkubation bei 72 °C für 7 min. Die PCR-Produkte wurden 1:10 verdünnt und mit einem CEQ8000 genetic analyzer (Beckman Coulter, CA, USA) analysiert. Ein Unterschied des Intensitätsverhältnisses der zwei Allele in Tumor DNA verglichen mit normaler DNA von mindestens 30% wurde als Heterozygotieverlust angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen

Das Auftreten von *PTPRJ*-Allelverlust in humanen Kolonkarzinomen weist auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion der Phosphatase hin. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch nur ansatzweise bekannt. Durch DEP-1-Reexpression in SW480-Kolonkarzinomzellen wurde eine vollständige Hemmung der HGF-abhängigen Signaltransduktion beschrieben. Weiterhin wurde eine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung der Fokaladhäsionsproteine FAK und Paxillin beobachtet. Außerdem wurde eine anti-migratorische, anti-proliferative und pro-apoptotische Funktion von DEP-1 beschrieben. (Balavenkatraman 2006, Balavenkatraman, unpublizierte Daten).

Da diese Daten – ebenso wie der Großteil der in anderen Zellmodellen beschriebenen Effekte – auf DEP-1-Überexpression basierten, sollte nun die Funktion von DEP-1 durch Knockdown der Phosphatase in Kolonkarzinomzelllinien charakterisiert werden. Die schon beschriebenen Effekte dienten hierbei als Ausgangspunkt für die Untersuchungen, darüber hinaus sollten aber auch unabhängige Strategien verfolgt werden, um nach weiteren DEP-1-Substraten zu suchen.

3.1.1 Herstellung von DEP-1-depletierten Kolonkarzinomzelllinien

Zur Analyse der Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen sollten Zelllinien erzeugt werden, in denen die DEP-1-Expression stabil herabgesetzt ist. Hierfür wurden drei Zelllinien – HCT116, DLD-1 und Caco-2 – ausgewählt, die einen hohen DEP-1-Expressionsspiegel aufweisen. Die Zelllinien wurden lentiviral mit jeweils einem von vier nicht-validierten DEP-1 shRNA- bzw. einem control shRNA-Expressionskonstrukt transduziert. Nach der Selektion der transduzierten Zellen wurde mittels Westernblot überprüft, ob der DEP-1-Knockdown erfolgreich war.

Wie aus Bild 3.1 hervorgeht, verursachte die DEP-1 shRNA-Sequenz Nr. 4 in allen drei Zelllinien einen starken Knockdown. Diese mit dem vierten DEP-1 shRNA-Target transduzierten Zellen und die control shRNA-exprimierenden Zellen (im Folgenden als

„HCT116-DEP-1 shRNA“ und „HCT116-control shRNA“ bezeichnet; Bezeichnung analog für DLD-1 und Caco-2) standen nun für die weiteren Analysen zur Verfügung.

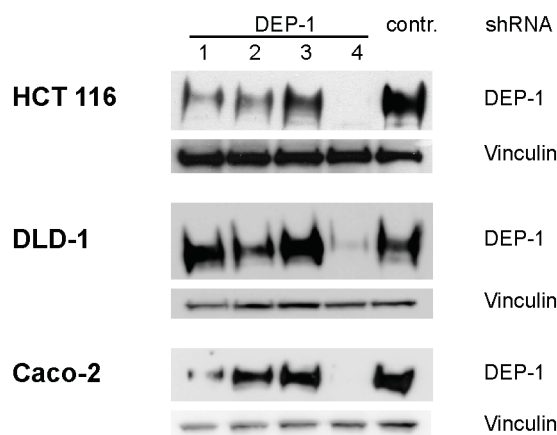


Bild 3.1: shRNA-vermittelter Knockdown von DEP-1 in Kolonkarzinomzelllinien. HCT116-, DLD-1- und Caco-2-Zellen wurden lentiviral mit jeweils einem von vier verschiedenen DEP-1 shRNA-Expressionskonstrukten oder einem control shRNA-Expressionskonstrukt transduziert. Transduzierte Zellen wurden mit Puromycin selektiert. Die Detektion von DEP-1 bzw. der Ladekontrolle Vinculin erfolgte mittels Westernblot. Für den Nachweis von DEP-1 wurde eine WGA-Anreicherung der Glykoproteinfraktion durchgeführt, Vinculin wurde direkt im Zelllysatz nachgewiesen.

3.1.2 DEP-1 reguliert nicht die cMet-Signaltransduktion

In einer früheren Studie einer anderen Arbeitsgruppe wurde der HGF-Rezeptor cMet als Substrat von DEP-1 identifiziert. Die Koüberexpression beider Proteine ergab, dass DEP-1 den Rezeptor selektiv dephosphoryliert. Die Gab1-Bindungsstelle (Y1349) stellte dabei den bevorzugten Angriffspunkt von DEP-1 dar (Palka et al. 2003). In unserem Labor wurde in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 eine vollständige Dephosphorylierung der cMet-Aktivierungsloop-Tyrosine Y1230/1234/1235 sowie eine vollständige Hemmung der cMet-abhängigen Erk- und Akt-Phosphorylierung durch DEP-1-Reexpression beschrieben (Balavenkatraman, unpublizierte Daten).

Der Effekt von DEP-1 auf die cMet-Signaltransduktion sollte nun mit dem rigoroseren Knockdown-Ansatz überprüft werden. Dazu wurden HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1 shRNA-Zellen gehungert, mit HGF stimuliert und mittels Westernblot analysiert. Die HCT116-Zelllinien wiesen eine hohe Basalphosphorylierung von cMet an den Tyrosinen Y1230/1234/1235 auf, während die Phosphorylierung von Y1349

ligandenabhängig war. Es zeigte sich in diesen Versuchen, dass der DEP-1-Knockdown weder die Phosphorylierung der cMet-Tyrosine Y1230/1234/1235 und Y1349, noch die Erk- und Akt-Phosphorylierung beeinflusste (Bild 3.2). Die HGF-Stimulationsexperimente wurden zusätzlich mit den erzeugten transduzierten DLD-1- und Caco-2-Zellen durchgeführt, um zelllinienspezifische Effekte auszuschließen. Aber auch in diesen Zelllinien war keine Veränderung der HGF-abhängigen Signaltransduktion durch DEP-1-Knockdown festzustellen (Daten nicht gezeigt). Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass es sich bei cMet wahrscheinlich nicht um ein Substrat von DEP-1 handelt, es sei denn es existieren kompensatorische Mechanismen, die den Verlust von DEP-1 ausgleichen.

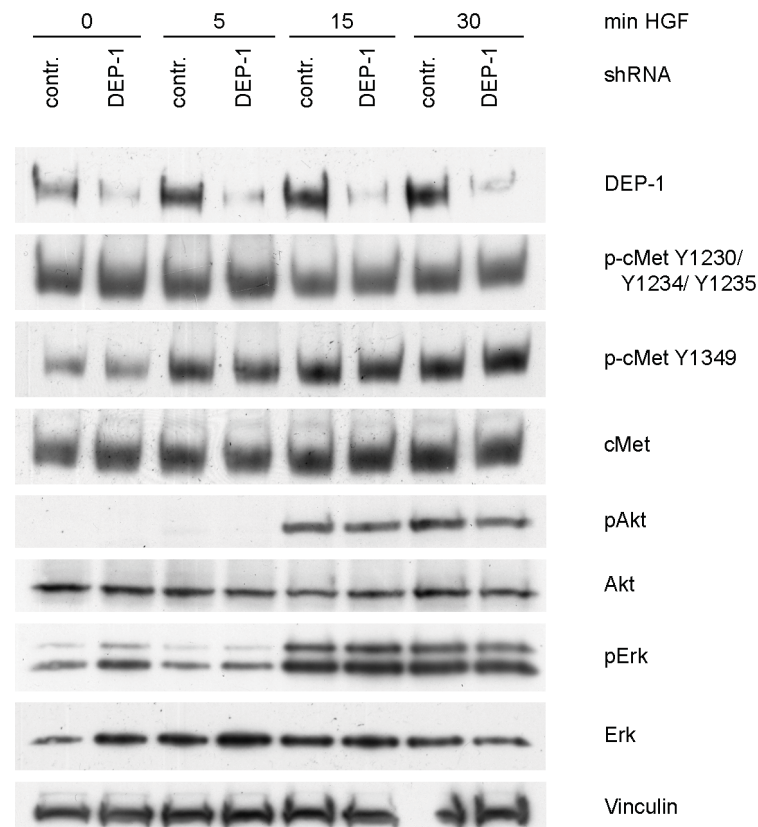


Bild 3.2: DEP-1 reguliert nicht die cMet-Signaltransduktion in Kolonkarzinomzellen. HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurden über Nacht gehungert und für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Lysate der Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Für den Nachweis von cMet und DEP-1 wurde eine WGA-Anreicherung der Glykoproteinfraktion durchgeführt, die restlichen Proteine wurden direkt im Zelllysate nachgewiesen.

3.1.3 Antikörper-Array-Analyse zur Identifikation von DEP-1-Substraten

Da eine Regulation der cMet-Signaltransduktion in den DEP-1-depletierten Zellen nicht bestätigt werden konnte, sollten nun alternative Strategien verfolgt werden, um DEP-1-Substrate bzw. DEP-1-regulierte Signalwege zu identifizieren. Eine Möglichkeit, eine Vielzahl von Signalproteinen gleichzeitig hinsichtlich ihrer Phosphorylierung und Expression zu untersuchen, bietet die Antikörper-Array-Analyse. Wir entschieden uns für die Analyse mit dem „Kinex™ Antibody Microarray (KAM-1.1)“ (Kinexus Bioinformatics, Kanada), der 273 phosphorylierungsspezifische und 378 pan-spezifische Antikörper zur Detektion von Signalproteinen umfasst. Für die Array-Analyse wurden HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1-shRNA-Zellen in Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend trypsinisiert und eingefroren. Die Zelllyse und Analytik wurde von Kinexus Bioinformatics durchgeführt. Da die Antikörper-Lysat-Interaktion auf den Arrays unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgt, kann es beispielsweise durch Maskierung von Epitopen aufgrund von Proteinkomplexbildung oder durch Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern zum Auftreten von falsch negativen oder falsch positiven Signalen kommen. Deshalb wird eine Validierung der Ergebnisse durch Westernblot empfohlen. Anhand der Ergebnisse der Array-Analyse wurden deshalb 18 Proteine bzw. Phosphorylierungsstellen ausgewählt, deren Regulation bestätigt werden sollte. Hierfür wurde auf den Custom Kinetworks™ KCPS 1.0 Westernblot-Service von Kinexus Bioinformatics zurückgegriffen.

Für die ausgewählten Proteine sind die Ergebnisse der Array- und der Westernblot-Analyse in Tabelle 3.1 gegenübergestellt. Diese gibt das Signalverhältnis von HCT116-DEP-1 shRNA- zu HCT116-control shRNA-Zellen an – folglich lagen Proteine, die einen Wert über 1 aufweisen, in den DEP-1-depletierten Zellen verstärkt phosphoryliert vor und kämen potentiell als DEP-1-Substrat in Frage. Für mehrere Proteine wurden im Westernblot Doppelbanden detektiert. Diese wurden einzeln quantifiziert und sind beide in der Tabelle aufgeführt. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde ein Anstieg der Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen grün und eine Abnahme rot hervorgehoben. Als Kriterium für eine Regulation wurde eine Änderung der Signalintensität von mindestens 30% festgesetzt. Aus dieser Darstellung ist zunächst zu erkennen, dass es kaum Übereinstimmungen zwischen der Array- und Westernblot-Analyse gab. Ein Drittel der Proteine war mittels Westernblot gar nicht nachweisbar. Für

die meisten Proteine war bei der Westernblot-Analyse sogar ein entgegengesetzter Trend der Regulation im Vergleich zur Array-Analyse zu verzeichnen. In Übereinstimmung mit den Array-Daten wurde mittels Westernblot eine geringfügig erhöhte Phosphorylierung von EGFR Y1148 detektiert. Für phospho-Paxillin Y118 und phospho-FAK Y576 wurde sowohl mit der Array- als auch mit der Westernblot-Analytik eine reduzierte Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen nachgewiesen. Diese Daten waren Ausgangspunkt, um nun noch einmal selbst mit den zur Verfügung stehenden phosphorylierungsspezifischen Antikörpern die HCT116-Zelllinien unter gleichen Kultivierungsbedingungen zu untersuchen. Unterschiede in den Spiegeln von phospho-Paxillin und phospho-FAK Y576 waren jedoch nicht festzustellen. In die eigenen Westernblot-Analysen wurden zusätzlich die FAK-Phosphorylierungsstellen Y397, Y407, Y577, Y861 und Y925 einbezogen, allerdings konnte auch hierfür keine DEP-1-abhängige Phosphorylierung beobachtet werden. Das gleiche galt für die EGFR-Phosphorylierung und die Phosphorylierung von Src Y529 (Daten nicht gezeigt).

Über die Ursachen für die Diskrepanz zwischen den Analysen von Kinexus und den eigenen Experimenten kann nur spekuliert werden. Möglicherweise gab es Unterschiede in der Qualität bzw. Sensitivität der verwendeten Antikörper, so dass unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Denkbar wäre auch, dass die genauen Bedingungen für den Zellaufschluss, der für die Array-Analyse und die Westernblot-Validierung von Kinexus durchgeführt wurde, für die Extraktion und somit auch für die Detektion der Proteine eine entscheidende Rolle spielte. Zusammenfassend lieferte dieser Ansatz also keine neuen Erkenntnisse über die Funktion von DEP-1 für die Signaltransduktion in HCT116-Zellen. Wenn auch durch eigene Experimente nicht bestätigt, wiesen die Kinexus-Daten für Paxillin und FAK, wie schon frühere Befunde in Re-/Überexpressionsexperimenten, auf eine mögliche Rolle von DEP-1 für die Regulation in fokalen Adhäsionskomplexen hin.

Tabelle 3.1: Gegenüberstellung der Antikörper-Array- und Westernblot-Analyse. HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurden in Wachstumsmedium zu hoher Konfluenz kultiviert und anschließend durch Kinexus Bioinformatics mit einem Antikörper-Array und durch Westernblot analysiert. Das Signalverhältnis von HCT116-DEP-1 shRNA- zu HCT116-control shRNA-Zellen ist dargestellt. Eine um mindestens 30% erhöhte Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen ist grün dargestellt, eine um mindestens 30% reduzierte Phosphorylierung ist rot hervorgehoben. Doppelbanden wurden getrennt quantifiziert und angegeben. Die Daten sind nach den Signalverhältnissen der Array-Analyse sortiert dargestellt.

Protein		Phosphorylierung	Array [DEP-1 shRNA/ control shRNA]	Westernblot [DEP-1 shRNA/ control shRNA]
Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	RSK1/2	S363/S369	6,69	1,45 / 0,85
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	Src	Y529	4,23	0,14 / 0,49
Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	p38a MAPK	T180+Y182	4,08	0,27 / 1,02
Mammalian target of rapamycin	mTOR (FRAP)	S2448	4,02	0,82
I-kappa-B kinase gamma/NF-kappa-B essential modulator (NEMO)	IKKg/ NEMO	pan	3,24	3,16
Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha	GSK3a	Y279	3,02	0,34
Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	GSK3b	Y216	3,02	0,09
Insulin receptor / Insulin-like growth factor 1 receptor	IR/IGF1R (INSR)	Y1189/Y1190	2,89	1,20
Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK))	JNK	T183+Y185	2,79	0,30 / 0,36
Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase	Met	Y1230+Y1234+ Y1235	2,75	nicht detektiert
Protein-tyrosine kinase 2	Pyk2	Y579	2,70	nicht detektiert
Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	EGFR	Y1068	2,25	nicht detektiert
Focal adhesion protein-tyrosine kinase	FAK	Y397	2,05	0,20
Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	EGFR	Y1148	2,03	1,31
Focal adhesion protein-tyrosine kinase	FAK	Y577	0,97	nicht detektiert
Focal adhesion protein-tyrosine kinase	FAK	pan	0,96	nicht detektiert
Focal adhesion protein-tyrosine kinase	FAK	Y577	0,58	nicht detektiert
Focal adhesion protein-tyrosine kinase	FAK	Y576	0,52	0,52
Paxillin 1	Paxillin 1	Y118	0,25	0,08

3.1.4 DEP-1 assoziiert mit Fokaladhäsionsproteinen *in vitro*

Zusätzlich zur Antikörper-Array-Analyse wurde mit dem so genannten „Substrat-Trapping“ noch eine weitere, unabhängige Strategie verfolgt, um DEP-1-Substratproteine zu identifizieren. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass durch bestimmte Mutationen in der katalytischen Domäne von PTPs die Fähigkeit zur Substratbindung beibehalten wird, aber die katalytische Aktivität des Enzyms stark herabgesetzt wird. Als Folge dessen wird im Vergleich zur WT-Phosphatase ein stabilerer Enzym-Substrat-Komplex erhalten, der isoliert und analysiert werden kann (Blanchetot et al. 2005).

Für unsere Untersuchungen wurde zunächst eine DEP-1-Substrat-Trapping-Mutante erzeugt. Dazu wurde eine Mutation in ein bakterielles Expressionsplasmid für die intrazelluläre Domäne von DEP-1 eingeführt, die auf Proteinebene eine Mutation des Aspartats des WPD-Loops der katalytischen Domäne zu Alanin zur Folge hat (D1205A). Diese „DA-Mutante“ und die WT-Domäne wurden nun bakteriell exprimiert, aufgereinigt und kovalent an Beads gekoppelt. Die gekoppelten Domänen wurden anschließend mit Lysat von SW480-Zellen inkubiert. Für die Enzym-Substrat-Interaktion ist es erforderlich, dass das Substrat in phosphorylierter Form vorliegt. Dieser Aspekt wurde zum einen dadurch gewährleistet, dass mit SW480-Zellen eine Zelllinie ausgewählt wurde, die keine DEP-1-Expression aufweist. Dadurch wurde verhindert, dass die DEP-1-Substrate schon in der Zelle dephosphoryliert wurden, noch bevor die Inkubation mit den bakteriell exprimierten Domänen stattfand. Zum anderen wurden die SW480-Zellen vor der Lyse mit dem PTP-Inhibitor Pervanadat behandelt. Dadurch wird in den Zellen generell die Dephosphorylierung von tyrosinphosphorylierten Proteinen geblockt, woraufhin der Phosphotyrosin-Spiegel in der Zelle ansteigt.

Nach der Inkubation der DEP-1-Domänen (WT oder DA) mit Lysat von Pervanadat-behandelten oder unbehandelten SW480-Zellen wurden die gebundenen Proteine mit reduzierendem SDS-haltigem Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Da Substratproteine nur in phosphorylierter Form an die Phosphatase binden, konnte mittels anti-Phosphotyrosin-Westernblot überprüft werden, ob eine Bindung potentieller Substrate stattgefunden hatte. Wie aus Bild 3.3 (A) hervorgeht, wurden von der WT-Domäne erwartungsgemäß keine phosphorylierten Proteine gebunden, da durch die katalytische Aktivität eine Dephosphorylierung und somit Freisetzung der Substrate aus

dem katalytischen Zentrum erfolgt. Im Gegensatz dazu war eine Assoziation vieler tyrosinphosphorylierter Proteine mit der DA-Mutante zu erkennen. Diese Interaktion war strikt abhängig von der Pervanadat-Behandlung der SW480-Zellen vor der Zellyse.

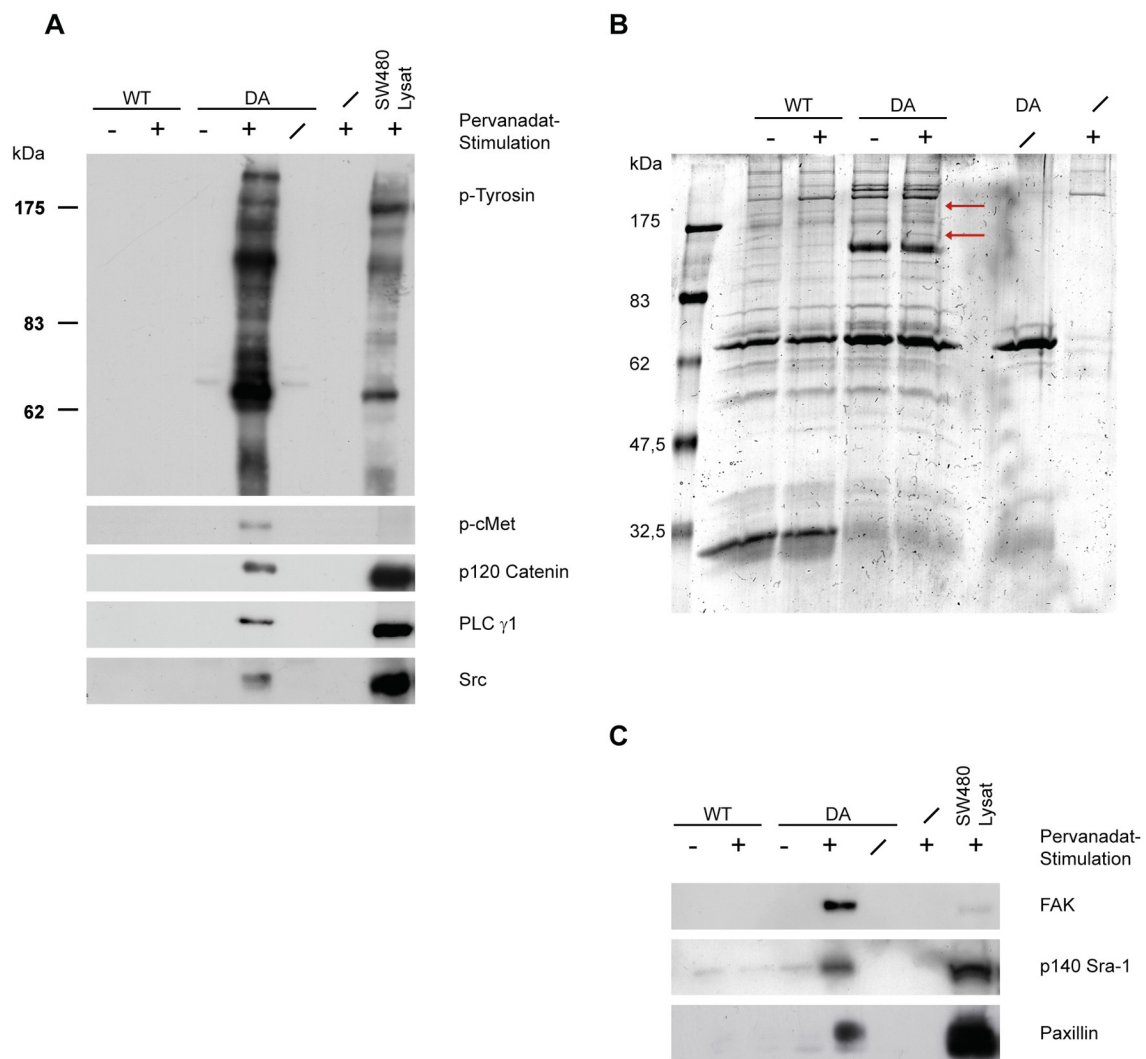


Bild 3.3: DEP-1 interagiert mit Fokaladhäsionsproteinen. Die an Beads gekoppelte, bakteriell exprimierte intrazelluläre Domäne von DEP-1 (Wildtyp oder D1205A Mutante) wurde mit Lysat von unbehandelten oder Pervanadat-behandelten SW480-Zellen inkubiert. Zur Kontrolle wurde die DA-Mutante nur mit Lysepuffer inkubiert bzw. wurden ungekoppelte Beads mit Lysat Pervanadat-behandelter Zellen inkubiert. Die gewaschenen Enzym-Substrat-Komplexe wurden eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Westernblot zum Nachweis von tyrosinphosphorylierten Proteinen und bekannten DEP-1-Interaktionspartnern. (B) Coomassie-Färbung der eluierten Proteine. Die Pfeile kennzeichnen Banden, die ausschließlich in der Bahn DA +Pervanadat auftraten. (C) Westernblot-Detektion der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine FAK und p140Sra-1 sowie Detektion von Paxillin.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich unter den Proteinen schon beschriebene Interaktionspartner oder Substrate von DEP-1 befanden. Dazu wurde die Membran noch einmal mit Antikörpern gegen phospho-cMet (Y1230/Y1234/Y1235), p120 Catenin, PLC γ und Src inkubiert. Tatsächlich war eine Assoziation mit diesen Proteinen nachweisbar, was darauf hindeutet, dass das Substrat-Trapping unter geeigneten experimentellen Bedingungen erfolgte. Der Nachweis von phospho-cMet in den Substrat-Trapping-Fractionen zeigte allerdings auch, dass die gewählten Bedingungen zu Interaktionen führen können, die wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, möglicherweise physiologisch nicht relevant sind.

Um neue DEP-1-Substrate zu identifizieren, sollten die gebundenen Proteine durch Massenspektrometrie analysiert werden. Dazu wurden die Proben zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt. In Bild 3.3 (B) ist das eingescannte Gel dargestellt. Daraus geht hervor, dass auch einige Proteine von der WT-Domäne gebunden wurden. Eine Interaktion fand auch zwischen der DA-Mutante und Proteinen aus Zelllysat unbehandelter SW480-Zellen statt. Da für diese Proteine im Westernblot keine Tyrosinphosphorylierung nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Proteinen entweder um unspezifisch assoziierte Proteine handelt oder um Interaktionspartner, die keine Substrate von DEP-1 darstellen.

Proteine, die phosphorylierungsabhängig ausschließlich an die DA-Mutante gebunden hatten und somit potentielle Substrate darstellen könnten, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Da es aber auch Proteine geben könnte, deren Bindung unterhalb der Detektionsgrenze der Coomassie-Färbung lag, wurde der gesamte Gelabschnitt des DEP-1-DA/+Pervanadat Ansatzes mit einem Molekulargewicht oberhalb dem der intrazellulären DEP-1-Domäne durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF und ESI) analysiert. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Karl-Heinz Gührs (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) durchgeführt. Auf die Analyse von Proteinen mit kleinerem Molekulargewicht wurde verzichtet, da sich trotz kovalenter Kopplung ein Teil der DEP-1-Domänen und deren Abbauprodukte von den Beads löste und damit vermutlich Signale anderer Proteine überlagert hätte.

Unter den identifizierten Proteinen befanden sich FAK, der Actinzytoskelett-Regulator p140 Sra-1 (Specifically Rac1-associated protein) und ein bisher nicht näher

charakterisierter Guaninnukleotid-Austauschfaktor, Rho GEF 16 (Daten nicht gezeigt). Da gegen die ersten beiden genannten Proteine Antikörper zur Verfügung standen, sollte die Assoziation nun mittels Westernblot bestätigt werden. Sowohl FAK als auch p140 Sra-1 waren auch im Westernblot nachweisbar (Bild 3.3 (C)). Da mit FAK und Src zwei Proteine gefunden wurden, die an Fokaladhäsionen lokalisiert sind, und die parallel durchgeführten Analysen von Kinexus auf eine Regulation der Fokaladhäsionskomponente Paxillin hinwiesen, wurde zusätzlich untersucht, ob auch Paxillin im Trapping-Ansatz zu finden ist. Eine phosphorylierungsabhängige Assoziation mit der DA-Mutante war tatsächlich nachweisbar (Bild 3.3 (C)). Die phosphorylierungsabhängige Bindung lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei den gefundenen *in vitro* Interaktionspartnern um potentielle DEP-1-Substrate handeln könnte. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion nur indirekt durch Kopräzipitation mit einem DEP-1-Substrat erfolgte. Erst der Nachweis der Dephosphorylierung der potentiellen Substrate durch DEP-1 würde bestätigen, dass es sich bei den Bindungspartnern tatsächlich auch um Substrate handelt.

3.1.5 DEP-1 ist ein positiver Regulator der Paxillin-Phosphorylierung in Kolonkarzinomzellen

Anhand der bisherigen Analysen konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob DEP-1 für die Regulation der FAK- und Paxillin-Phosphorylierung relevant ist. Eine positive Regulation der Tyrosinphosphorylierung von FAK und Paxillin wurde in DEP-1-reexprimierenden SW480-Kolonkarzinomzellen nachgewiesen (Balavenkatraman, unpublizierte Daten). Durch Substrat-Trapping-Assays wurde eine Interaktion von FAK und Paxillin mit einer DEP-1-Trapping-Mutante gezeigt, und die Antikörper-Array- und Westernblot-Analysen von Kinexus Bioinformatics ergaben ebenfalls eine erhöhte DEP-1-abhängige Tyrosinphosphorylierung beider Proteine. Andererseits waren die Ergebnisse der Analysen von Kinexus von uns nicht reproduzierbar. Diese bisherigen Untersuchungen wurden an Zellen durchgeführt, die in serumhaltigem Medium kultiviert worden waren. Ein weiterer physiologischer Stimulus für die FAK- und Paxillin-Phosphorylierung ist auch die Zelladhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin. Dieser Stimulus sollte nun getestet und überprüft werden, ob unter diesen Bedingungen eine Regulation durch DEP-1 erfolgt. Zu diesem Zweck wurden HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1-shRNA-Zellen in Suspension gehungert, um adhäsionsabhängige

Signalwege abzuschalten. Anschließend wurden die Zellen in Fibronectin-beschichtete Platten eingesät. Nach unterschiedlichen Adhäsionszeiten wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung von FAK und Paxillin mittels Westernblot analysiert. Bild 3.4 zeigt, dass offenbar die Phosphorylierung von FAK an den Tyrosinen Y397, Y576 und Y861 nicht in Abhängigkeit von der DEP-1-Expression reguliert wurde. Im Gegensatz dazu war aber eine Abnahme der Paxillin-Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen zu erkennen. DEP-1 scheint also in der Tat eine regulierende Rolle an fokalen Adhäsionskomplexen zu spielen. Die Abnahme der Paxillin-Phosphorylierung in Abwesenheit von DEP-1 deutet allerdings darauf hin, dass es sich bei Paxillin nicht um ein Substrat von DEP-1 handelt, da in diesem Fall eine Zunahme der Phosphorylierung nach DEP-1-Knockdown zu erwarten wäre. Folglich ist die Bindung von Paxillin an DEP-1 in den Substrat-Trapping-Versuchen wahrscheinlich über ein noch zu identifizierendes direktes DEP-1-Substrat erfolgt.

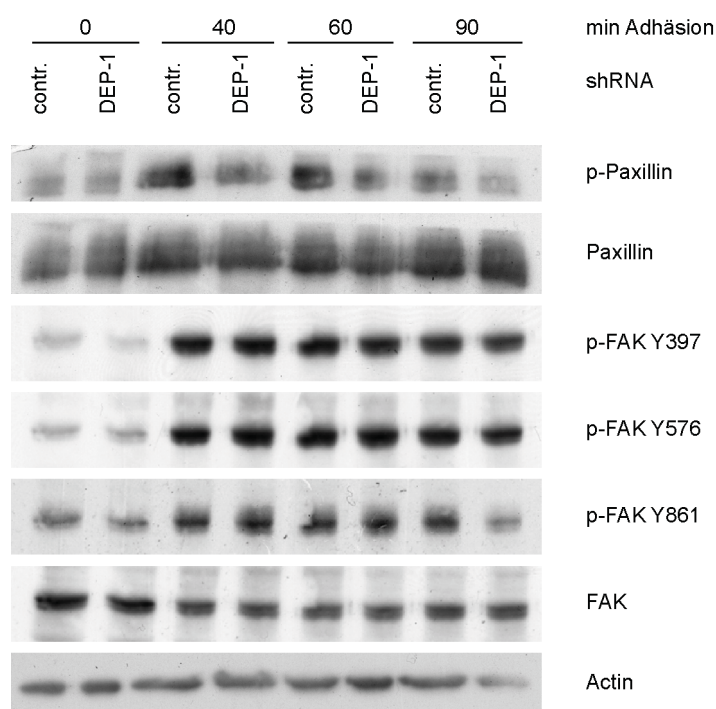


Bild 3.4: Reduzierte Paxillin-Phosphorylierung in DEP-1-depletierten HCT116-Zellen. DEP-1 shRNA- und control shRNA-exprimierende HCT116-Zellen wurden 1 h in serumfreiem Medium in Suspension gehalten und in Fibronectin-beschichtete Platten eingesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Ein repräsentatives Beispiel für drei Versuche ist dargestellt.

3.1.6 Funktionelle Assays

In verschiedenen Studien wurden anti-transformierende Effekte durch DEP-1-Überexpression in Zellen beschrieben. Es sollte deshalb unter Verwendung der DEP-1-depletierten Zelllinien überprüft werden, ob sich der Knockdown von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen ebenfalls auf verschiedene onkologisch relevante, zelluläre Funktionen auswirkt. Im Folgenden soll ein Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten funktionellen Assays geben werden.

Adhäsion

Eine DEP-1-abhängige Regulation der Adhäsion wurde für Fibroblasten und Schilddrüsenkarzinomzellen beschrieben (Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004, Pera et al. 2005). Diese Untersuchungen basierten wiederum auf Überexpression. Die bisherigen Signaltransduktionsanalysen in HCT116-Zellen ergaben, dass DEP-1 die adhäsionsabhängige Paxillin-Phosphorylierung positiv reguliert. Ob sich dieser Effekt auf die Adhäsionsstärke der Zellen auswirkt, wurde mit Hilfe eines Adhäsionsassays überprüft. Dazu wurden die HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen fluoreszenzmarkiert, in Suspension gehungert und dann in Kollagen Typ I-, Kollagen Typ II- oder Fibronectin-beschichtete Platten eingesät. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten das Medium und die nicht-adhären Zellen abgesaugt und die adhären Zellen lysiert. Durch Messung der Fluoreszenz wurde die Adhäsion quantifiziert. Ein stabiler Effekt von DEP-1 auf die Adhäsion der Kolonkarzinomzellen konnte jedoch im Unterschied zu später analysierten Zellen anderen Ursprungs (siehe Kapitel 3.2.5) auf keinem der drei getesteten Matrixproteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Proliferation

In Mamma-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinomzellen, sowie in Gliomzellen und Endothelzellen wurde eine Hemmung der Proliferation durch DEP-1 beschrieben (Iuliano et al. 2003, Keane et al. 1996, Massa et al. 2004, Takahashi et al. 2003, Trapasso et al. 2004). Auch durch Reexpression von DEP-1 in SW480-Kolonkarzinomzellen wurde eine verminderte Proliferation festgestellt (Balavenkatraman et al. 2006). Mit Hilfe des MTT-

Assays sollte deshalb die Proliferation der HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen analysiert werden. Die Zellen wurden dazu in Medium mit 10% und 2% Serumgehalt über einen Zeitraum von 96 Stunden kultiviert. Mit Hilfe der MTT-Farbreaktion wurde die Proliferation quantifiziert. DEP-1-abhängige Unterschiede hinsichtlich der Proliferation wurden jedoch nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Apoptose

In Pankreaskarzinomzellen wurde eine Induktion der Apoptose durch DEP-1-Reexpression beschrieben (Trapasso et al. 2004). Auch in HeLa-Zellen wurde ein positiver Effekt von DEP-1 auf die Induktion der Apoptose durch zytotoxische Agenzien gezeigt (MacKeigan et al. 2005). In DEP-1-reexprimierenden SW480-Kolonkarzinomzellen wurde auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose festgestellt (Balavenkatraman, unveröffentlichte Daten). Die Staurosporin-induzierte Apoptose wurde deshalb in HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen zunächst vier Stunden mit Staurosporin (Konzentrationsbereich von 0-1 μ M) behandelt. Im Anschluss wurde die Apoptose mit Hilfe eines ELISA-basierten Assays quantifiziert. Stabile Effekte auf die Apoptose in Abhängigkeit von der DEP-1-Expression waren jedoch nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Migration

Anti-migratorische Effekte von DEP-1 wurden in Fibroblasten (Jandt et al. 2003, Kappert et al. 2007, Kellie et al. 2004) und SW480-Kolonkarzinomzellen (Balavenkatraman et al. 2006) beschrieben. Die Migration der HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurde mit einem Transwell-Assay untersucht. Dazu wurden die Zellen fluoreszenzmarkiert und in Kollagen Typ I-beschichtete Zellkultureinsätze mit einer porösen Membran eingesät. Die Migration gegen einen Gradienten von 0% bzw. 1% Serum wurde untersucht, indem die durch die Membran migrierten Zellen durch Fluoreszenzmessung quantifiziert wurden. Es zeigte sich jedoch, dass die Migration der DEP-1-depletierten Kolonkarzinomzellen in Abhängigkeit von der DEP-1-Expression nicht signifikant verschieden war (Bild 3.5).

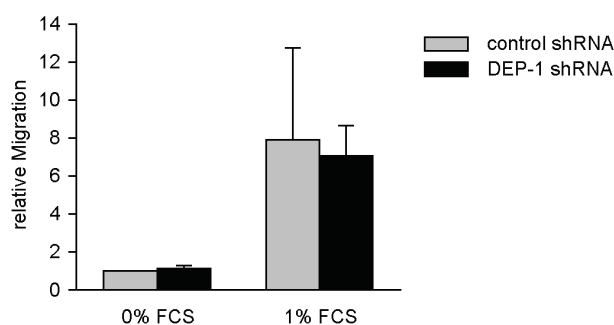


Bild 3.5: DEP-1 reguliert nicht die Serum-induzierte Migration von HCT116-Zellen. HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurden trypsinisiert, fluoreszenzmarkiert und in serumfreiem Medium in Kollagen Typ I-beschichtete Transwell-Inserts eingesät. Die Migration gegen einen Gradienten von 0 bzw. 1% Serum wurde nach 14 h durch Messung der Fluoreszenz der migrierten Zellen quantifiziert. Der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Koloniebildung

Es wurde weiterhin überprüft, ob der DEP-1-Spiegel einen Einfluss auf einen klassischen Transformationsparameter, das verankerungsunabhängige Wachstum in Softagar, hat. Dazu wurden HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1 shRNA-Zellen zwölf Tage in Softagar-Medium kultiviert. Anschließend wurden die gebildeten Kolonien mit MTT angefärbt und die Koloniezahl und die durchschnittliche Koloniegröße bestimmt (Bild 3.6). Den Graphen ist zu entnehmen, dass die durchschnittliche Koloniegröße beider Zelllinien nicht signifikant variierte. Allerdings wurde ein geringer Anstieg der Koloniezahl der DEP-1-depletierten Zellen von 25% beobachtet, der statistische Signifikanz erzielte.

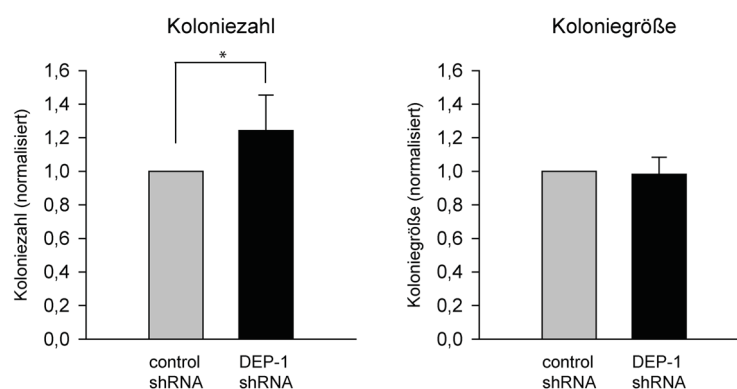


Bild 3.6: Der DEP-1-Knockdown steigert die Koloniebildung von HCT116-Zellen in Softagar-Medium geringfügig. HCT116-DEP-1 shRNA- und HCT116-control shRNA-Zellen wurden 12 Tage in Softagar-Medium kultiviert. Kolonien wurden mit MTT gefärbt. Koloniezahl und -größe wurden mit der Colony V1.1-Software (Fujifilm) bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Quantifizierung von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Replikaten pro Ansatz sind dargestellt (* $p < 0,05$ durch t-Test).

3.1.7 Xenotransplantation von Kolonkarzinomzellen

Nachdem mit Hilfe von Softagar-Assays eine geringfügige Steigerung der Koloniebildung der DEP-1-depletierten Zellen festgestellt worden war, sollte nun das Wachstumsverhalten der Zelllinien nach Xenotransplantation in Mäuse überprüft werden. Diese Methode bietet den Vorteil, dass authentischere Bedingungen für das Wachstum der Zellen geschaffen werden, indem z.B. die Vaskularisierung und Interaktion mit Fibroblasten des Tumorstromas gewährleistet wird.

In Kooperation mit Prof. Arne Östman (Karolinska Institut, Stockholm) wurden HCT116-control shRNA- und HCT116-DEP-1 shRNA-Zellen subcutan in die Flanken von jeweils zehn SCID Mäusen injiziert. Die Tumorgröße wurde in regelmäßigen Abständen gemessen, und bei Erreichen der maximal zulässigen Größe wurden die Mäuse getötet und die Tumoren isoliert. Das Tumorgewebe wurde für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet oder kryokonserviert. Ein Teil jedes Tumors wurde für die Westernblot-Analyse lysiert.

Von den zehn Mäusen pro Gruppe entwickelten sechs Mäuse aus der control shRNA-Gruppe und vier Mäusen aus der DEP-1-shRNA-Gruppe einen Tumor (Daten nicht gezeigt). Hierbei war auffällig, dass sowohl die Zeitspanne zwischen Injektion der Zellen und erstmaliger Nachweisbarkeit der Tumoren als auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren innerhalb einer Gruppe sehr stark variierten.

Mit Hilfe von Immunfärbungen wurden Kryo- und Paraffinschnitte der Tumoren auf die Expression des Proliferationsmarkers PCNA und des Vaskularisierungsmarkers CD31 getestet, um die Tumoren näher zu charakterisieren. Aber auch bei der Markeranalyse zeigte sich eine sehr hohe Heterogenität innerhalb der Tumorgruppen (Daten nicht gezeigt).

In den Lysaten der Tumoren wurde auch die Phosphorylierung von cMet, FAK, Paxillin, Akt und Erk mittels Westernblot untersucht. Eine Regulation der Phosphorylierung dieser Proteine war zuvor durch DEP-1-Reexpression in SW480-Kolonkarzinomzellen gefunden worden (Balavenkatraman, unpublizierte Daten). Weiterhin wurde überprüft, ob der DEP-1-Knockdown in den Tumoren aufrechterhalten wurde. Wie schon bei der Untersuchung des Tumorwachstums zeigte sich auch bei der Analyse der Phosphorylierung, dass die Variation innerhalb einer Tumorgruppe sehr stark ausgeprägt

war, so dass keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden konnten. Die Analyse der DEP-1-Expression zeigte interessanterweise, dass der Knockdown von DEP-1 in den HCT116-DEP-1 shRNA-Tumoren nicht aufrechterhalten wurde.

Aufgrund des Verlustes des DEP-1-Knockdowns in den HCT116-DEP-1 shRNA-Tumoren sowie der allgemein sehr hohen Variabilität der untersuchten Marker konnten aus diesen Experimenten keine Rückschlüsse auf die Rolle von DEP-1 für die Tumorigenese *in vivo* gezogen werden.

3.1.8 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen in Kolonkarzinomzellen

Durch stabilen Knockdown von DEP-1 sollte die Funktion der Phosphatase in Kolonkarzinomzellen charakterisiert werden. Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren Daten aus DEP-1-Überexpressionsexperimenten. Mit Antikörper-Array- und Substrat-Trapping-Analysen wurden außerdem unabhängige methodische Ansätze zur Identifizierung von DEP-1-Substraten bzw. DEP-1-regulierten Signalwegen verfolgt. Weiterhin wurden umfangreiche funktionelle Assays etabliert und durchgeführt sowie xenotransplantierte Tumoren analysiert. Es konnte eine Assoziation von DEP-1 mit Fokaladhäsionsproteinen sowie eine adhäsionsabhängige Paxillin-Hypophosphorylierung in DEP-1-depletierten HCT116-Zellen beobachtet werden. Funktionelle Assays ergaben einen geringen Anstieg der Koloniebildung in Softagar-Medium nach DEP-1-Knockdown, wobei Xenotransplantationsexperimente keine Hinweise auf eine erhöhte Tumorigenität der DEP-1-depletierten Kolonkarzinomzellen lieferten.

Da eine weitere Untersuchung der Funktion von DEP-1 mit dem vorliegenden Zellmodell als nicht sehr aussichtsreich angesehen wurde, sollte die Untersuchung der Funktion von DEP-1 mit den etablierten Methoden nun an einem alternativen Zellmodell weitergeführt werden.

3.2 Funktion von DEP-1 in Meningeomzellen

Meningeome sind Tumoren der Meningen, die häufig ein benignes Wachstum aufweisen. Während *NF2*/Merlin als Tumorsuppressor für das Meningeom etabliert ist, ist die Rolle von PTPs für die Tumorigenese weitestgehend unbekannt. Neben dem Verlust von *NF2* wurde in Meningeomen eine autokrine PDGFR-Aktivierung als Mechanismus beschrieben, der zur Tumorentstehung beitragen könnte (Figarella-Branger et al. 1994, Shamah et al.

1997). Da der PDGFR in anderen Untersuchungen wiederum als ein Substrat von DEP-1 identifiziert wurde, war die Analyse der Funktion von DEP-1 in Meningeomen von besonderem Interesse. Da außerdem – wie im nächsten Abschnitt detaillierter dargestellt – LOH-Untersuchungen auf eine mögliche Relevanz von DEP-1 für die Entstehung von Meningeomen hindeuteten, wurde nun das Meningeom als Modell für die Charakterisierung der Funktion von DEP-1 ausgewählt. Das Projekt wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Christian Mawrin (Institut für Pathologie, Universität Jena/Institut für Neuropathologie, Universität Magdeburg) und Dr. Daniela Haase (Institut für Pathologie, Universität Jena) bearbeitet.

3.2.1 DEP-1/*PTPRJ*-Expression und -LOH in Meningeomen und Meningeomzelllinien

Zunächst sollte untersucht werden, ob DEP-1 in Meningeomzelllinien und Tumoren exprimiert wird. Aus den Westernblot-Analysen geht hervor, dass DEP-1 in zwei der getesteten Zelllinien, KT21 und SF3061, stärker exprimiert wird, während in den Zelllinien F5, HBL52, BenMen1 und IOMM keine bzw. nur eine sehr geringe Expression nachweisbar war (Bild 3.7 (A)). Die analysierten Tumoren wiesen ebenfalls sehr unterschiedliche DEP-1-Expressionsspiegel auf, wobei aber aufgrund der relativ geringen Zahl untersuchter Proben keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen Tumorgrad und Expressionsspiegel gezogen werden konnten (Bild 3.7 (A)).

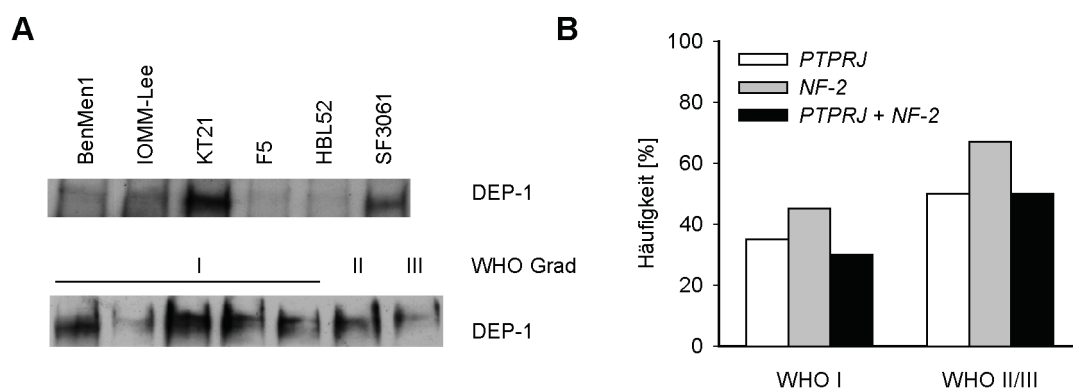


Bild 3.7: Analyse der DEP-1-Expression in Meningeomzelllinien und Tumorproben. (A) Gleiche Proteinmengen von Lysaten der angegebenen Zelllinien (oben) oder von Tumoren (unten) wurden mit WGA-Agarose inkubiert und die DEP-1-Expression wurde in der so isolierten Glykoproteinfraktion mittels Westernblot analysiert. (B) LOH am *PTPRJ*- oder *NF2*-Locus wurde durch PCR-Amplifikation von vier bzw. drei etablierten Mikrosatellitenmarkern analysiert. Die LOH-Häufigkeit am *PTPRJ*- und *NF2*-Locus sowie an beiden Loci in Tumoren verschiedener WHO-Grade ist dargestellt.

In verschiedenen humanen Karzinomen, wie z.B. dem Kolonkarzinom oder Lungenkarzinom, wurde Heterozygotieverlust für das DEP-1-kodierende Gen *PTPRJ* beschrieben (Ruivenkamp et al. 2002). Ob dieser Mechanismus für die Entstehung von Meningeomen relevant ist, wurde in 32 Tumoren durch PCR-Amplifikation von etablierten Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die Analysen zeigten *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in 35% (7/20) der informativen Grad I-Tumoren und in 50% (3/6) der informativen Grad II- und III-Tumoren. Zum Vergleich wurde zusätzlich die LOH-Häufigkeit für den Tumorsuppressor *NF2* untersucht. Die LOH-Häufigkeit lag mit 45% für die informativen Grad I-Tumoren bzw. mit 67% für die informativen Grad II- und III-Tumoren etwas höher als für *PTPRJ* und deckte sich mit Angaben aus der Literatur (Baser and Poussaint 2006). In 30% der Grad I-Tumoren und 50% der Grad II- und III-Tumoren war Heterozygotieverlust für beide Gene nachweisbar (Bild 3.7 (B)). Der *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in einem hohen Anteil von Meningeomen deutet darauf hin, dass DEP-1 für die Tumorigenese des Meningeoms relevant sein könnte. Um die Funktion von DEP-1 im Meningeom näher zu charakterisieren, wurden deshalb die beiden Zelllinien mit der stärksten DEP-1-Expression, KT21 und SF3061, lentiviral mit einem DEP-1 shRNA- bzw. einem control shRNA-Expressionskonstrukt transduziert. Der DEP-1-Knockdown in beiden Zelllinien ist in Bild 3.8 dargestellt.

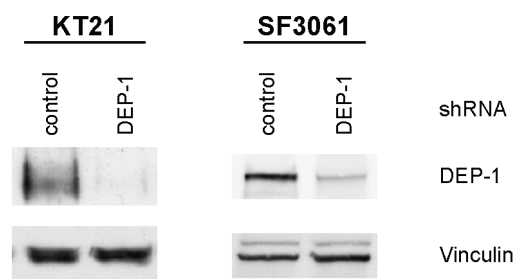


Bild 3.8: Stabiler Knockdown von DEP-1 in Meningeomzelllinien. KT21- und SF3061-Zellen wurden lentiviral mit DEP-1 shRNA- bzw. control shRNA-Expressionskonstrukten transduziert. Die DEP-1-Expression wurde nach WGA-Anreicherung der Glykoproteinfraktion mittels Westernblot nachgewiesen; die Detektion von Vinculin erfolgte im Zellysat.

3.2.2 DEP-1 ist ein negativer Regulator der Paxillin-Phosphorylierung in Meningeomzellen

Aus den Untersuchungen an HCT116-Kolonkarzinomzellen ging hervor, dass DEP-1 die Paxillin-Phosphorylierung nach Zelladhäsion positiv reguliert. Es sollte nun geklärt werden, ob dieser Effekt auch in Meningeomzellen auftritt. Dazu wurden die Kontroll- und DEP-1-depletierten KT21-Zellen in Suspension gehungert, für unterschiedliche Zeiten in Fibronectin-beschichtete Platten eingesät und lysiert. Die Lysate wurden durch Westernblot analysiert. Aus Bild 3.9 geht hervor, dass die Paxillin-Phosphorylierung auch in den DEP-1-depletierten KT21-Zellen reduziert war. Der Graph stellt die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dazu wurde das phospho-Paxillin-Signal auf das pan-Paxillin-Signal normalisiert. Für die einzelnen Adhäsionszeitpunkte ist dargestellt, um welchen Faktor sich die (normalisierte) Paxillin-Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen gegenüber der Phosphorylierung in den Kontrollzellen unterscheidet. Wie auch in den Kolonkarzinomzellen war der Effekt nicht sehr stark ausgeprägt. Die Reduktion der Paxillin-Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen lag im Mittel bei 20-30%, allerdings war der Effekt in mehreren unabhängigen Versuchen reproduzierbar. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei der positiven Regulation der Paxillin-Phosphorylierung nicht um eine zelltypspezifische Funktion von DEP-1 handelt. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen der HCT116-Zellen war auch in KT21-Zellen keine adhäsionsabhängige Regulation der FAK-Phosphorylierung durch DEP-1 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

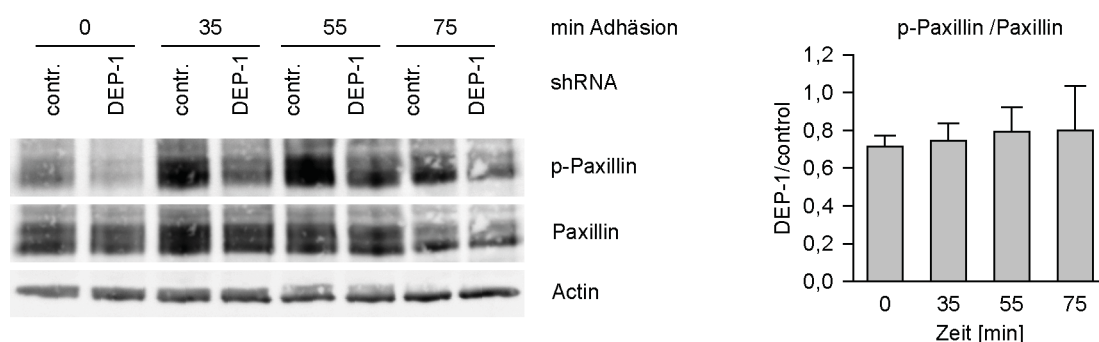


Bild 3.9: Hypophosphorylierung von Paxillin in DEP-1-depletierten KT21-Zellen. DEP-1 shRNA- und control shRNA-exprimierende KT21-Zellen wurden in serumfreiem Medium in Suspension gehalten und in Fibronectin-beschichtete Platten eingesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Lysate anschließend mittels Westernblot analysiert. Die Blots wurden densitometrisch quantifiziert. Die Signalintensität von phospho-Paxillin wurde auf die Intensität von pan-Paxillin normalisiert. Das Verhältnis der normalisierten Werte von DEP-1 shRNA- zu control shRNA-exprimierenden Zellen wurde für die jeweiligen Zeitpunkte berechnet. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 DEP-1 ist ein positiver Regulator der Ausbreitung von Meningeomzellen

Nachdem eine adhäsionsabhängige Regulation der Paxillin-Phosphorylierung durch DEP-1 nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob sich dieser Effekt auf Prozesse wie beispielsweise die Ausbreitung und Adhäsion von Zellen auswirkt.

Um die Ausbreitung der Zellen zu verfolgen, wurden KT21-control shRNA- und KT21-DEP-1 shRNA-Zellen in serumfreiem Medium in eine Fibronectin-beschichtete, kompartimentierte Schale eingesät. Die Ausbreitung beider Zelllinien wurde nun parallel unter einem Time-Lapse-Mikroskop über einen Zeitraum von 90 Minuten beobachtet. Eine typische Zelle jeder Linie ist in Bild 3.10 (A) dargestellt. Die Aufnahmen zeigen, dass sich die Kontrollzellen sehr stark ausbreiteten. Im Gegensatz dazu war die Ausbreitung der DEP-1-depletierten Zellen verzögert und weniger stark ausgeprägt.

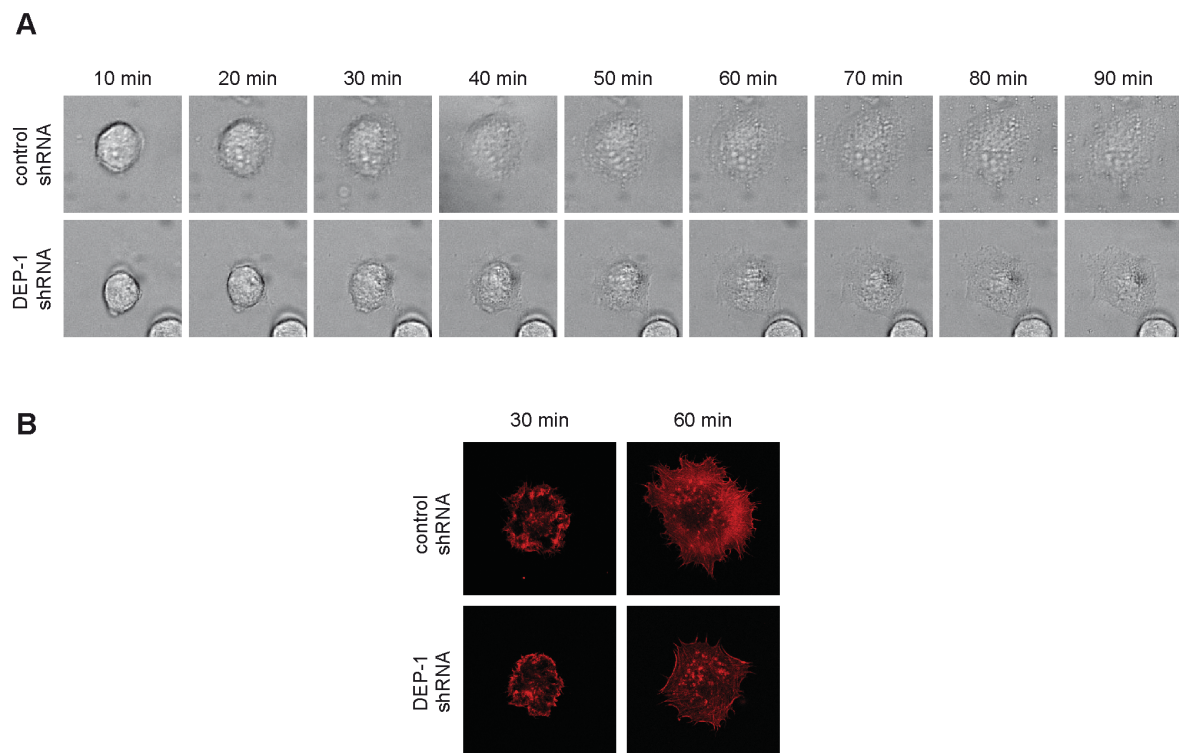


Bild 3.10: Verminderte Ausbreitung von DEP-1-depletierten KT21-Zellen. (A) Die Ausbreitung von KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen auf einer Fibronectin-beschichteten Schale wurde simultan unter einem Time-Lapse-Mikroskop über einen Zeitraum von 90 min verfolgt. Ein repräsentatives Beispiel für zwei unabhängige Experimente mit jeweils fünf analysierten mikroskopischen Gesichtsfeldern ist dargestellt. (B) KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden in Suspension gehungert und auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen eingesät. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen fixiert und filamentöses Actin mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängige Experimente mit jeweils 20 analysierten Zellen ist dargestellt.

Eine verminderte Ausbreitung der DEP-1-depletierten Zellen war auch in einem zweiten experimentellen Ansatz zu beobachten. Hierzu wurden die beiden transduzierten KT21-Zelllinien auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen gesät und die Zellen nach unterschiedlichen Zeiten fixiert. Anschließend wurde das Actinzytoskelett der Zellen mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie sichtbar gemacht. Eine Zelle typischer Größe ist in Bild 3.10 (B) zu sehen. Auch in diesem Ansatz ist deutlich zu erkennen, dass sich die DEP-1-depletierten Zellen weniger ausbreiteten als die Kontrollzellen.

3.2.4 DEP-1 reguliert die Anzahl und Verteilung von Zell-Matrix-Kontakten in Meningeomzellen

Einen wichtigen Schritt im Rahmen der Ausbreitung von Zellen stellt die Ausbildung von Kontakten zur extrazellulären Matrix dar. Da die vorangegangenen Experimente eine verminderte Ausbreitung der DEP-1-depletierten Zellen zeigten, sollte analysiert werden, ob der Effekt im Zusammenhang mit einer veränderten Anzahl oder Verteilung von Zell-Matrix-Kontakten steht. Zu diesem Zweck wurden KT21-control shRNA- und KT21-DEP-1 shRNA-Zellen auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen gesät und nach zwei Stunden fixiert. Durch Immunfärbung der Adapterproteine Paxillin und Vinculin wurden anschließend Zell-Matrix-Kontakte sichtbar gemacht. Bild 3.11 zeigt Aufnahmen der Färbungen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie.

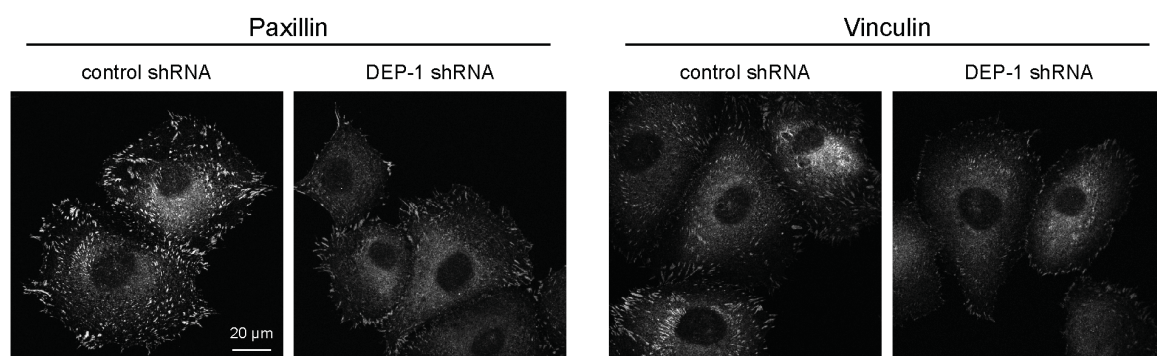


Bild 3.11: Reduzierte Bildung von Zell-Matrix-Kontakten in DEP-1-depletierten KT21-Zellen. KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden in serumfreiem Medium in Suspension gehungert und anschließend auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen eingesät. Nach 2 h wurden die Zellen fixiert und mit Paxillin- oder Vinculin-Antikörpern sowie Cy3-konjugierten Sekundäntikörpern gefärbt. Die Bilder wurden mittels Laser-Scanning-Mikroskopie erhalten und die Fluoreszenzsignale in Graustufen umgewandelt. Ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängige Experimente mit jeweils 20 analysierten Zellen pro Zelllinie ist dargestellt. Färbungen mit Kontroll-IgGs anstelle von Primäntikörpern ergaben keine Signale und sind hier nicht dargestellt.

Die DEP-1-depletierten Zellen wiesen eine diffuse Verteilung von Paxillin im Zytosol auf sowie Paxillin-haltige komplexartige Strukturen, die sich hauptsächlich auf die Peripherie der Zellen konzentrierten. Im Gegensatz dazu war Paxillin in den Kontrollzellen weniger diffus verteilt sondern stattdessen verstärkt in größere Proteinkomplexe eingelagert. Diese Strukturen waren nicht nur auf die Peripherie der Zellen beschränkt und waren darüber hinaus zum Teil auch zu größeren Clustern zusammengelagert. Ein ähnliches Verteilungsmuster war auch für Vinculin zu beobachten.

3.2.5 DEP-1 ist ein positiver Regulator der Adhäsion von Meningeomzellen

Da sich gezeigt hatte, dass sich die DEP-1-exprimierenden Zellen besser auf Fibronectin ausbreiten und eine erhöhte Anzahl von Zell-Matrix-Kontakten aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass diese Effekte in einer verstärkten Adhäsion der Zellen resultieren könnten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Adhäsion der KT21-control shRNA- und KT21-DEP-1 shRNA-Zellen auf Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Fibronectin untersucht. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium in Suspension gehungert und anschließend in eine mit den Matrixproteinen beschichtete 96-Well-Platte eingesät. Nach zwei Stunden wurde das Medium zusammen mit den nicht-adhären Zellen abgesaugt. Im Anschluss wurden die verbliebenen, adhären Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Das Ergebnis ist in Bild 3.12 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die DEP-1-depletierten Zellen auf allen drei Matrixproteinen schwächer adhären.

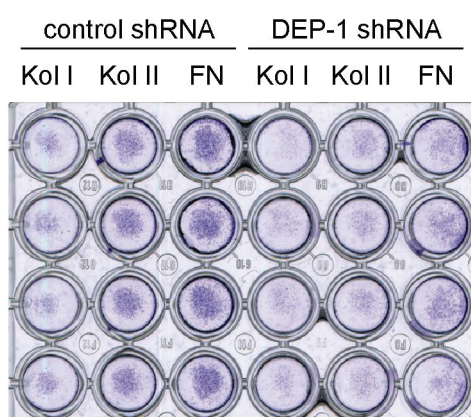
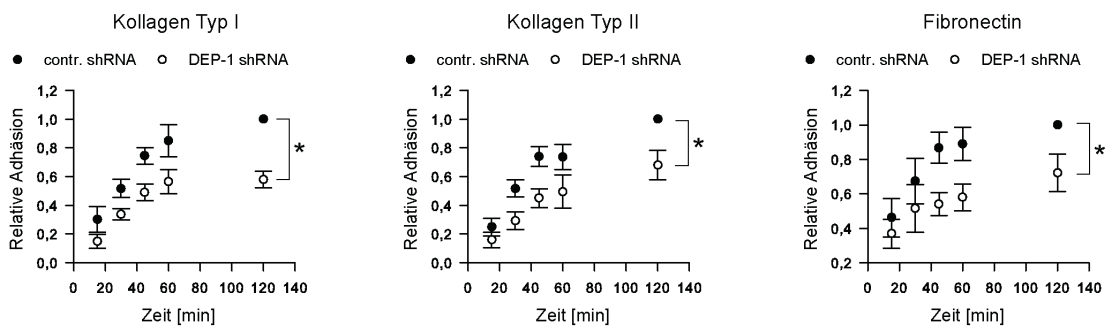


Bild 3.12: DEP-1 ist ein positiver Regulator der Zell-Matrix-Adhäsion von KT21-Zellen. KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden in Suspension gehungert und in eine mit Kollagen Typ I (Kol I)-, Kollagen Typ II (Kol II)- bzw. Fibronectin (FN)-beschichtete 96-Well-Platte eingesät. Nach 2 h wurden das Medium und nicht-adhären Zellen abgesaugt; die adhären Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Das Bild wurde mit Hilfe eines Flachbett-Scanners im Durchlichtmodus erzeugt.

Nach diesem ersten Hinweis auf eine positive Funktion von DEP-1 auf die Zell-Matrix-Adhäsion sollte der Effekt nun genauer charakterisiert werden. Zum einen sollte die Kinetik der Adhäsion verfolgt, und zum anderen die Adhäsion quantitativ erfasst werden. Außerdem wurden die SF3061-Zellen in die Analyse mit einbezogen, um zelllinienspezifische Effekte auszuschließen. Hierfür wurde der Versuchsaufbau etwas abgewandelt. Es wurde auf die Färbung mit Kristallviolett nach der Adhäsion verzichtet, stattdessen wurden die Zellen vor der Einsaat mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Adhäsion wurde quantifiziert, indem die adhärenierten Zellen zu unterschiedlichen Zeiten lysiert und anschließend die Fluoreszenz der Lysate gemessen wurde. Der Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten ist in Bild 3.13 dargestellt.

KT21



SF3061

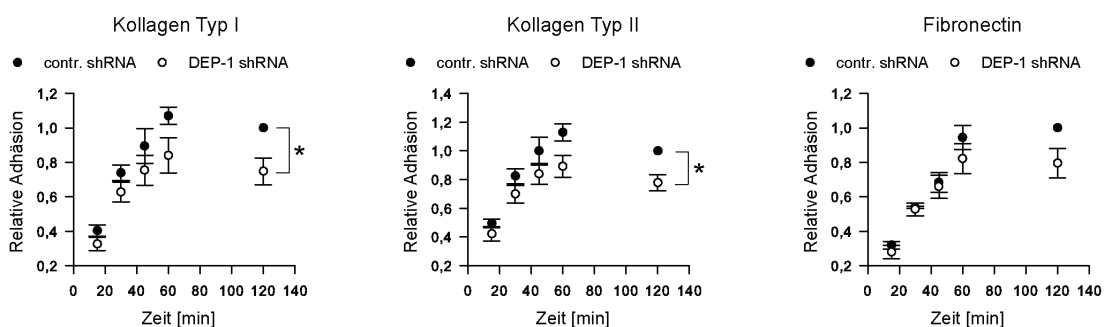


Bild 3.13: DEP-1 ist ein positiver Regulator der Zell-Matrix-Adhäsion von Meningeomzellen. KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen bzw. SF3061-DEP-1 shRNA- und SF3061-control shRNA-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CellTracker™ Green CMFDA markiert, 1 h in Suspension gehungert und in 96-Well-Platten (beschichtet mit den angegebenen Matrixproteinen) eingesät. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurden nicht-adhärenierte Zellen abgesaugt, adhärenierte Zellen lysiert und die Fluoreszenz der Lysate gemessen. Innerhalb eines Experiments wurden sechs Replikate pro Bedingung gemessen; die Fluoreszenz der Lysate wurde auf den 120 min-Wert der jeweiligen Kontrollzelllinie normalisiert. In den Graphen ist der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts der normalisierten Werte von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Zweifaktorielle ANOVA wurde zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien angewendet (* $p < 0,05$).

Den Graphen ist zu entnehmen, dass die Adhäsion der DEP-1-depletierten KT21-Zellen auf allen drei Matrixproteinen signifikant vermindert war. Auch für die DEP-1-depletierten SF3061-Zellen wurde eine geringere Adhäsion gemessen, allerdings war hier der Effekt etwas schwächer ausgeprägt und für die Adhäsion auf Fibronectin nicht signifikant. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass DEP-1 ein positiver Regulator der Zell-Matrix-Adhäsion von Meningeomzellen ist.

3.2.6 DEP-1 ist ein negativer Regulator der Migration von Meningeomzellen

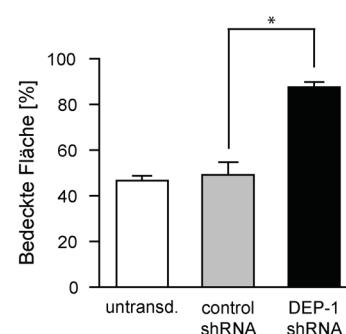
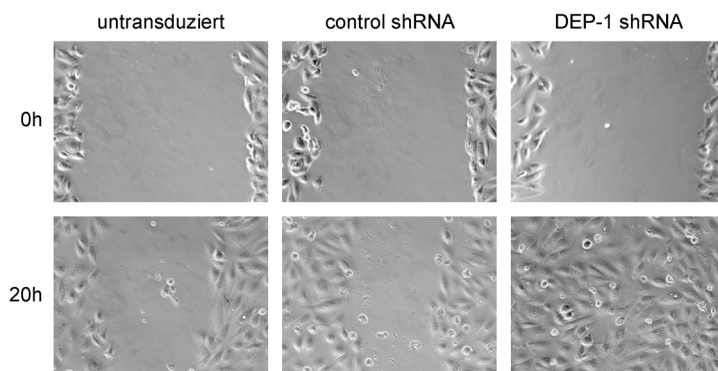
Für Kolonkarzinomzellen und Fibroblasten wurde eine Hemmung der Migration nach DEP-1-Überexpression beschrieben (Balavenkatraman et al. 2006, Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004). Ob DEP-1 auch in Meningeomzellen anti-migratorische Effekte ausübt, sollte mit Hilfe von „Wound healing“-Assays überprüft werden. Hierfür wurden untransduzierte KT21-Zellen, KT21-control shRNA- und KT21-DEP-1 shRNA-Zellen zunächst bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit Mitomycin C behandelt, um die Proliferation zu blocken, und im Anschluss wurde die Zellschicht mit einer Pipettenspitze „verwundet“. Direkt nach der Verwundung und nach 20 Stunden Inkubation mit Wachstumsmedium wurden die Wunden fotografiert und die Migration über die Bestimmung der mit Zellen bedeckten Wundfläche quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Migration der DEP-1-depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht war. Eine deutliche Steigerung der Migration war auch für DEP-1-depletierte SF3061-Zellen zu beobachten (Bild 3.14 (A))

Zusätzlich zu den stabil DEP-1-depletierten Zellen wurden auch KT21-Zellen analysiert, in denen die DEP-1-Expression durch transiente Transfektion mit einer DEP-1 siRNA herabgesetzt wurde. Bild 3.14 (B) zeigt, dass auch der akute Knockdown von DEP-1 eine deutliche Erhöhung der Motilität der Zellen hervorrief.

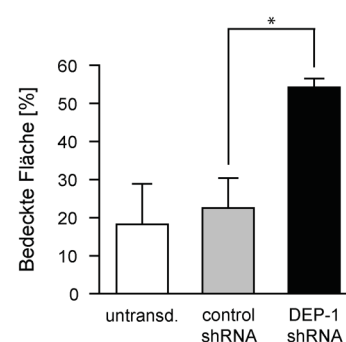
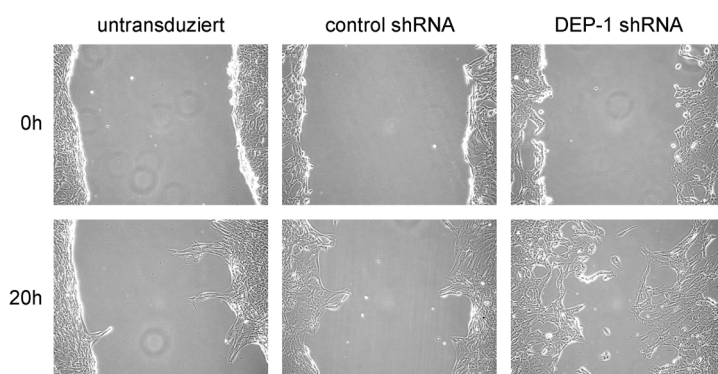
Einerseits erschien es wichtig, ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte nicht auf einer Beeinflussung der Proliferation beruhten. Andererseits war der Effekt der DEP-1-Depletion auf die Proliferation per se von Interesse. Deshalb wurde die Proliferation von jeweils untransduzierten, control shRNA- und DEP-1 shRNA-exprimierenden KT21- und SF3061-Zellen in Wachstumsmedium mit dem MTT-Assay bestimmt. Wie aus Bild 3.15 hervorgeht, variierte die Proliferation der KT21- und SF3061-Zellen auch nach 96 Stunden Kultivierung nicht signifikant in Abhängigkeit von der DEP-1-Expression.

A

KT21



SF3061



B

KT21

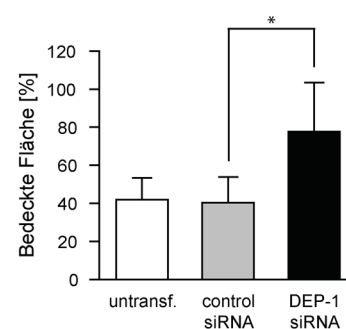
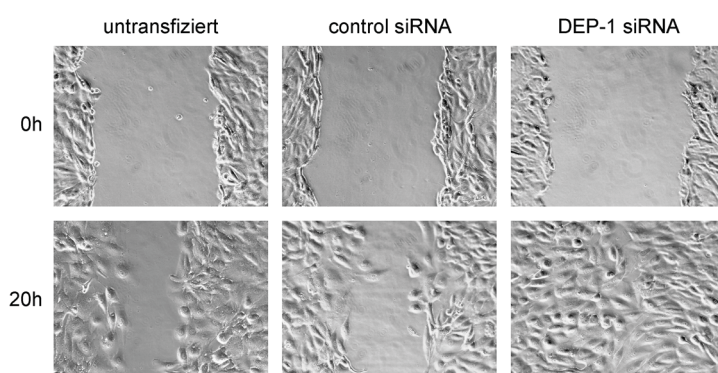


Bild 3.14: DEP-1 hemmt die Migration von Meningeomzellen. (A) Untransduzierte KT21- und SF3061-Zellen und stabil DEP-1 shRNA- oder control shRNA-exprimierende Zellen wurden mittels Wound healing-Assays analysiert. 0 h und 20 h nach Verwunden der Zellschicht wurden drei Positionen pro Ansatz fotografiert und der Bereich der Wunde, der nach 20 h mit Zellen bedeckt war, quantifiziert. Der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei (KT21) bzw. drei (SF3061) unabhängigen Experimenten ist in den Graphen dargestellt (* $p < 0,05$ durch t-Test). (B) Wound healing-Assay mit untransfizierten KT21-Zellen und Zellen, die transient mit DEP-1 siRNA oder control siRNA transfiziert wurden. Der Versuch wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Drei verschiedene Positionen in drei unabhängigen Experimenten wurden quantifiziert. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind im Graph dargestellt (* $p < 0,05$ durch t-Test).

Folglich können die beobachteten Unterschiede der Zelllinien in den Wound healing-Migrationsassays tatsächlich ausschließlich auf eine gesteigerte Migration der Zellen zurückgeführt werden. DEP-1 ist offenbar unter den getesteten Bedingungen kein Effektor der Proliferation der Meningeomzellen.

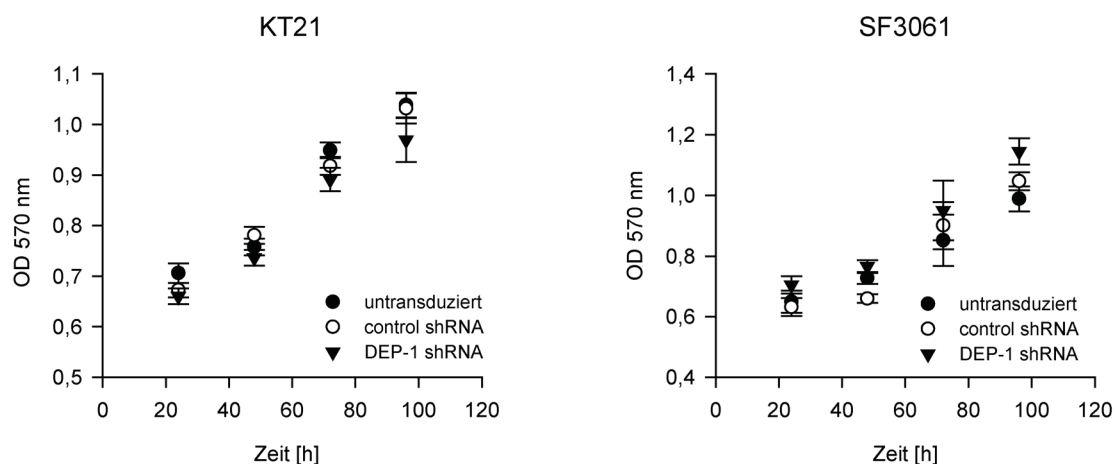


Bild 3.15: DEP-1 reguliert nicht die Proliferation von Meningeomzellen unter normalen Wachstumsbedingungen. Untransduzierte KT21- und SF3061-Zellen sowie stabil DEP-1 shRNA- und control shRNA-exprimierende Zellen wurden in 96-Well-Platten in Wachstumsmedium eingesät. Nach den angegebenen Zeiten wurde dem Medium MTT-Reagenz zugesetzt. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und die Absorption bei 570 nm gemessen. Innerhalb eines Experiments wurden sieben Replikate gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung eines repräsentativen Experiments (von drei unabhängigen Experimenten) sind gezeigt.

3.2.7 Die DEP-1-vermittelte Migrationshemmung ist PDGFR-abhängig

Mit Hilfe von Wound healing-Assays wurde eine Hemmung der Migration durch DEP-1 beobachtet. Aus diesen Experimenten lassen sich allerdings keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Migrationshemmung ziehen, da die Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium erfolgte und somit potentiell eine Reihe von Faktoren für die Stimulation der Migration in Frage käme. In früheren DEP-1-Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass DEP-1 die PDGF-abhängige Migration negativ reguliert (Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004). Es sollte deshalb untersucht werden, ob PDGF-Rezeptoren auch in Meningeomzellen an den DEP-1-abhängigen Migrationseffekten beteiligt sind. Dies war insbesondere auch deshalb von Interesse, da die autokrine Stimulation von PDGF-

Rezeptoren in Meningeomen als Mechanismus diskutiert wird, der zur Tumorigenese beitragen könnte (Figarella-Branger et al. 1994, Shamah et al. 1997)

Die Migrationsversuche mit untransduzierten KT21-Zellen und DEP-1 shRNA- bzw. control shRNA-exprimierenden KT21-Zellen wurden deshalb nun noch einmal in der Gegenwart zweier PDGFR-Kinaseinhibitoren – Imatinib und AG1295 – durchgeführt. Beide Substanzen können noch eine geringe Zahl anderer Kinasen hemmen, insbesondere die weiteren Targets von AG1295 (cKit, Flt3) sind aber in Meningeomzellen nicht relevant. Da beide Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde zusätzlich eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Bild 3.16 (A) stellt die Quantifizierung der Experimente dar. Aus dem Graph geht hervor, dass die erhöhte Motilität der DEP-1-depletierten Zellen sowohl durch AG1295 als auch durch Imatinib signifikant auf das Niveau der control shRNA-exprimierenden Zellen herabgesetzt wurde. Diese Experimente lieferten somit einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von PDGF-Rezeptoren an der erhöhten Migration der DEP-1-depletierten Zellen.

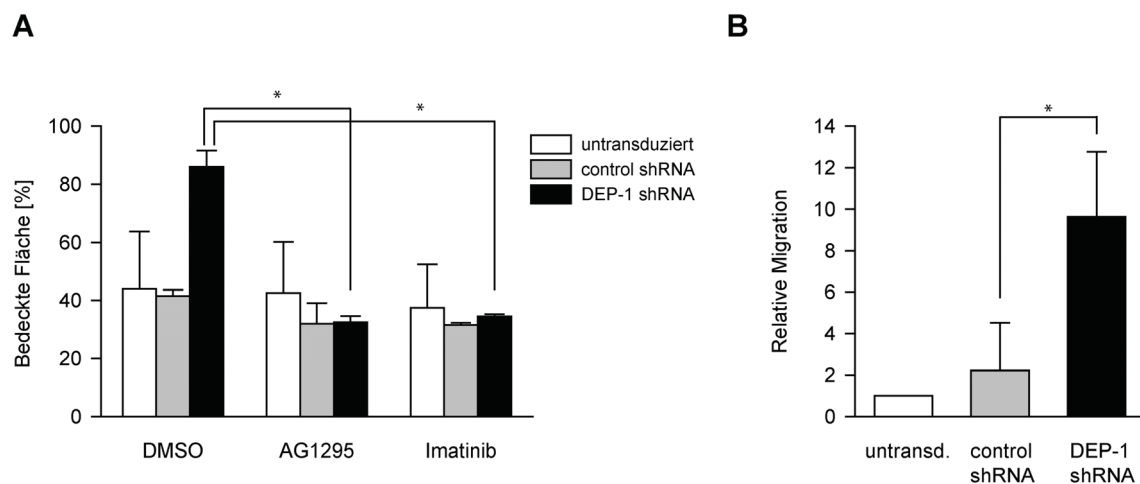


Bild 3.16: DEP-1 hemmt die PDGF-abhängige Migration von Meningeomzellen. (A) Untransduzierte KT21-Zellen, KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden wie in Bild 3.14 behandelt, außer dass dem Medium nach Verwunden der Zellschicht die PDGFR-Kinaseinhibitoren AG1295 (20µM) oder Imatinib/STI571 (2 µM), bzw. das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurden. Der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt (*p<0,05 durch t-Test). (B) Die PDGF-BB (10 ng/ml)-abhängige Migration von untransduzierten KT21-Zellen, DEP-1 shRNA- und control shRNA-exprimierenden KT21-Zellen wurde in einer Boyden-Kammer analysiert. Nach 4 h wurden die Zellen, die auf die Unterseite der Membran gewandert waren, gezählt. Der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt (*p<0,05 durch t-Test).

In einem zweiten Ansatz wurde die PDGF-BB-abhängige Migration direkt analysiert. Dazu wurden gehungerte, untransduzierte KT21-Zellen und DEP-1 shRNA- bzw. control shRNA-exprimierenden KT21-Zellen in serumfreiem Medium in eine Boyden-Kammer eingesät. Nach vier Stunden wurden die Zellen quantifiziert, die gegen einen PDGF-Gradienten durch die poröse Membran migriert waren. Im Einklang mit den PDGFR-Inhibitor-Studien lag auch in diesem Assay die Zahl der migrierten DEP-1-depletierten Zellen signifikant über der Zahl der Kontrollzellen (Bild 3.16 (B)). Unter diesen Bedingungen war der durch DEP-1-Depletion verursachte Anstieg der Migration sogar noch stärker ausgeprägt als in den Wound healing-Assays.

Somit konnte mit Hilfe von zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt werden, dass PDGF-Rezeptoren in die DEP-1-abhängige Migrationsregulation involviert sind.

3.2.8 DEP-1 ist ein negativer Regulator der PDGFR-Signaltransduktion in Meningeomzellen

Da die vorangegangenen Migrationsversuche auf eine Beteiligung von PDGF-Rezeptoren an der DEP-1-vermittelten Migrationsregulation hinwiesen, sollte nun untersucht werden, wie DEP-1 in die PDGFR-abhängige Signaltransduktion eingreift. Zunächst wurde der Einfluss von DEP-1 auf die PDGFR-Phosphorylierung analysiert. Dazu wurden KT21- und SF3061-Zellen (DEP-1-depletierte bzw. Kontrollzellen) mit PDGF-BB stimuliert. Die Phosphorylierung der Rezeptoren wurde durch Westernblot mit einem phospho-Y849 (PDGFR α)/phospho-Y857 (PDGFR β)-spezifischen Antikörper analysiert, der die Phosphorylierung beider Rezeptorisoforamen aufgrund hoher Sequenzhomologie erkennt. Diese Tyrosine, die sich im Aktivierungsloop der jeweiligen Kinasedomäne befinden, werden infolge von Ligandenbindung autophosphoryliert, was zur Aktivierung der Kinase beiträgt (Heldin et al. 1998).

In Bild 3.17 (A) sind jeweils ein repräsentatives Beispiel und die Quantifizierung von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Es zeigte sich, dass die PDGF-BB-stimulierte PDGFR-Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen erhöht war. Die Quantifizierungsgraphen stellen für die einzelnen Zeitpunkte dar, um welchen Faktor die PDGFR-Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen gegenüber der Phosphorylierung in den Kontrollzellen erhöht ist (DEP-1 shRNA/control shRNA).

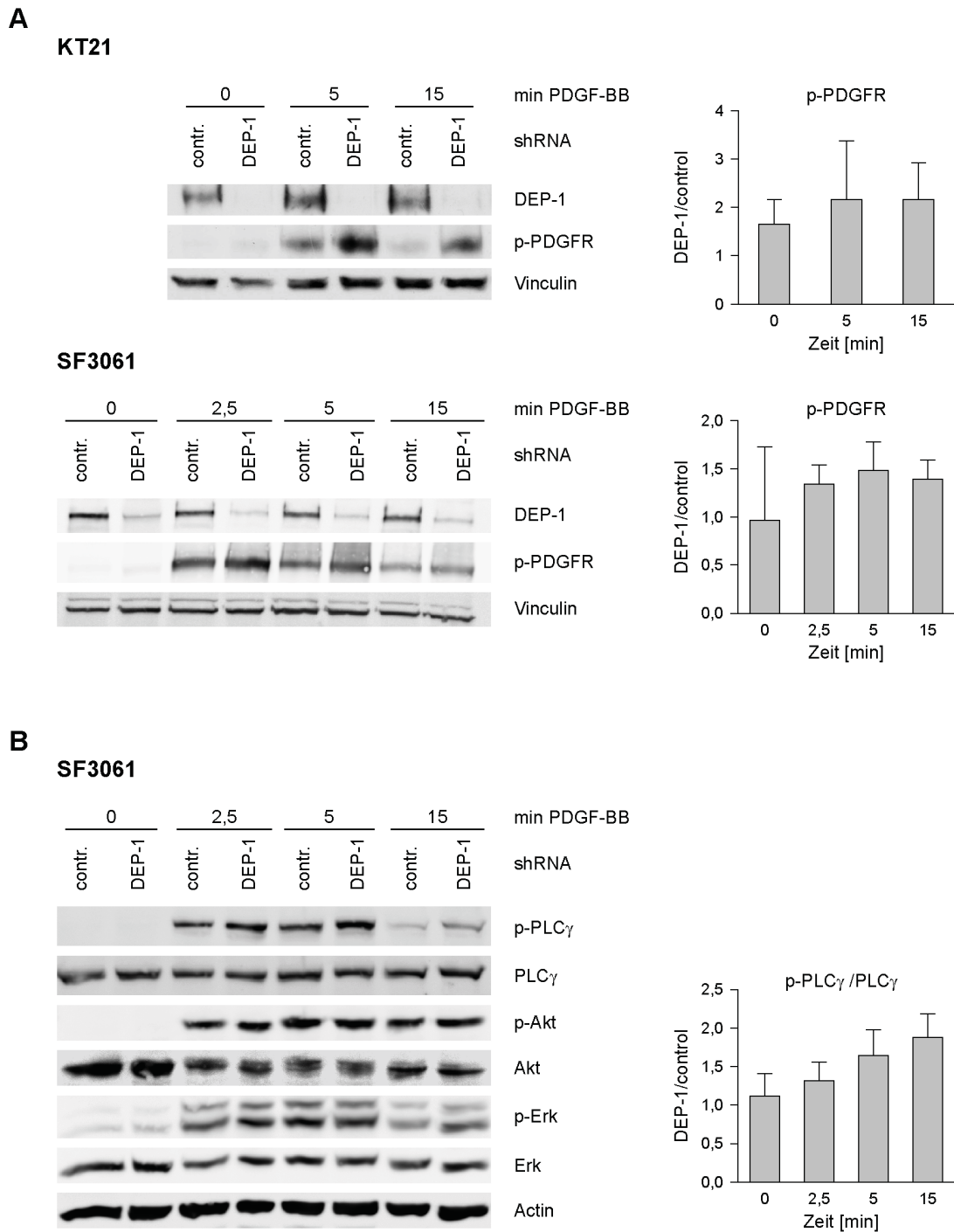


Bild 3.17: DEP-1 hemmt die PDGFR- und PLC γ -Phosphorylierung in Meningeomzellen. KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen (A) oder SF3061-DEP-1 shRNA- und SF3061-control shRNA-Zellen (A,B) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und in serumfreiem Medium über Nacht gehungert. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml PDGF-BB stimuliert und die PDGFR-Aktivierung (A) oder die Aktivierung von downstream Signalwegen (B) mittels Westernblot analysiert. Gleiche Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt; für die DEP-1- und PDGFR-Detektion wurde vor der Auftrennung eine Glykoproteinanreicherung mit WGA-Agarose vorgenommen. Die Blots wurden densitometrisch quantifiziert. Das Signalverhältnis von DEP-1 shRNA- zu control shRNA-exprimierenden Zellen wurde für die phospho-PDGFR-Signale bzw. für die normalisierte PLC γ -Phosphorylierung (phospho-PLC γ normalisiert auf pan-PLC γ) für die jeweiligen Zeitpunkte berechnet. In den Diagrammen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Neben der Rezeptorphosphorylierung wurde auch die PDGF-stimulierte Phosphorylierung der Proteine Akt, Erk und PLC γ in SF3061-Zellen analysiert. Während die Phosphorylierung von Akt und Erk nicht durch die DEP-1-Expression reguliert war, wurde eine Steigerung der PLC γ -Phosphorylierung in den DEP-1-depletierten Zellen beobachtet (Bild 3.17 (B)).

Als nächstes sollte untersucht werden, welche der beiden PDGFR-Isoformen durch DEP-1 dephosphoryliert wird, da der verwendete Antikörper die Phosphorylierung beider Isoformen erfasst. Da in KT21 mittels Westernblot nur die Expression von PDGFR α nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), kommt in dieser Zelllinie folglich auch nur der PDGFR α als Substrat in Frage. Im Gegensatz dazu exprimieren SF3061-Zellen beide Rezeptorisformen, so dass prinzipiell eine Dephosphorylierung beider Isoformen möglich wäre. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Stimulationsversuche mit SF3061-Zellen noch einmal mit PDGFR-Isoform-selektiven PDGF-Liganden wiederholt. Während PDGF-AA nur PDGFR α -Homodimere stimuliert, werden durch PDGF-DD bevorzugt PDGFR β -Homodimere aktiviert (Tallquist and Kazlauskas 2004). Auf diese Art und Weise kann mit dem nicht-selektiven anti-phospho-PDGFR-Antikörper dennoch unterschieden werden, welche Rezeptorisform bevorzugt reguliert wird.

Die Stimulation von SF3061-Zellen durch PDGF-DD ergab, dass die PDGFR β -Phosphorylierung offenbar nicht durch DEP-1 reguliert wurde, zumindest nicht an den untersuchten Phosphorylierungsstellen. Dagegen war eine geringfügige DEP-1-abhängige Regulation der Phosphorylierung nach PDGFR α -Aktivierung festzustellen (Bild 3.18). Dieser Effekt war jedoch schwächer ausgeprägt als der Effekt nach PDGF-BB-Stimulation (Bild 3.17 (B)). Da PDGF-BB allerdings nicht nur PDGFR α - bzw. PDGFR β -Homodimere aktiviert, sondern auch PDGFR $\alpha\beta$ -Heterodimere, ist es denkbar, dass DEP-1 besonders effektiv die Phosphorylierung von Heterodimeren reguliert, die bei der Stimulation mit PDGF-AA und -DD nicht aktiviert werden.

SF3061

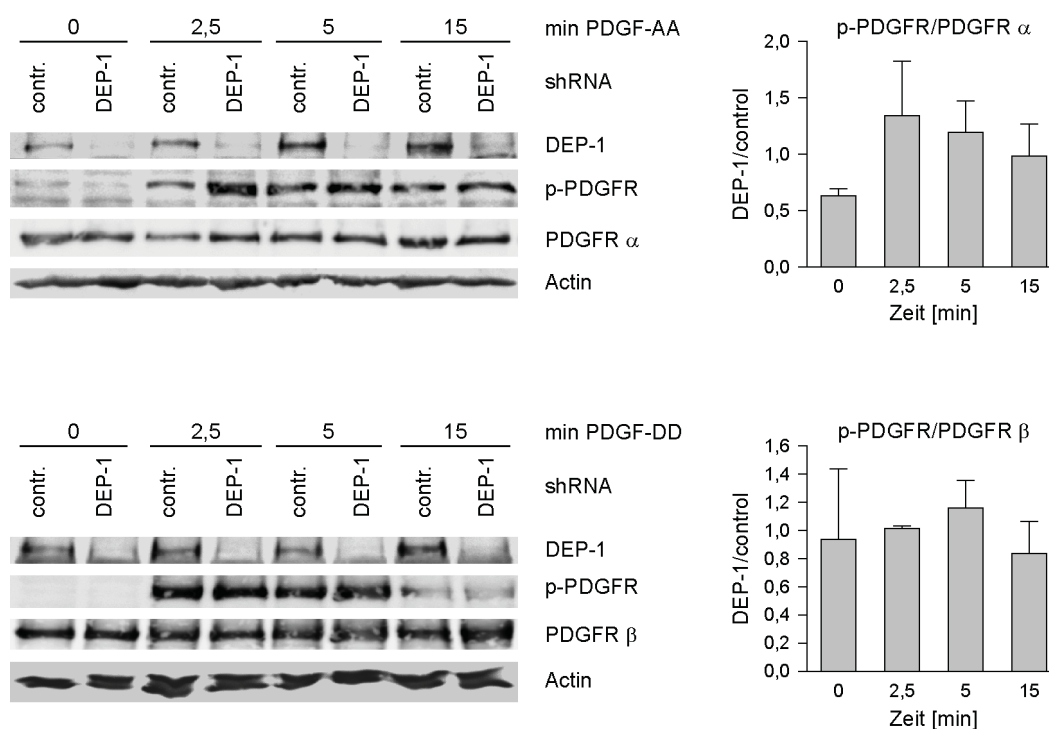


Bild 3.18: DEP-1 reguliert die PDGFR α -Phosphorylierung in SF3061-Zellen. SF3061-DEP-1 shRNA- und SF3061-control shRNA-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und in serumfreiem Medium über Nacht gehungert. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml PDGF-AA (oben) oder mit 100 ng/ml PDGF-DD (unten) stimuliert und die PDGFR-Aktivierung mittels Westernblot analysiert. Gleiche Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Für die DEP-1- und PDGFR-Detektion wurde vor der Auftrennung eine Glykoprotein-anreicherung mit WGA-Agarose vorgenommen. Die Blots wurden densitometrisch quantifiziert. Die phospho-PDGFR-Signale wurden auf die pan-PDGFR-Signale normalisiert. Das Verhältnis der normalisierten Signale von DEP-1 shRNA- zu control shRNA-exprimierenden Zellen wurde für die jeweiligen Zeitpunkte berechnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind in den Diagrammen dargestellt.

3.2.9 DEP-1 hemmt die Koloniebildung von Meningeomzellen in Softagar

Für DEP-1-depletierte HCT116-Kolonkarzinomzellen wurde bereits eine geringfügige Steigerung der Koloniebildung in Softagar-Medium festgestellt. Ob DEP-1 auch Einfluss auf das verankerungsunabhängige Wachstum von Meningeomzellen nimmt, wurde anhand der Koloniebildung von KT21-Zellen in Softagar untersucht. In Bild 3.19 sind ein repräsentatives Beispiel und die Quantifizierung von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Daraus geht sehr deutlich hervor, dass die Koloniezahl der DEP-1-depletierten Zellen signifikant um ein Vielfaches erhöht war.

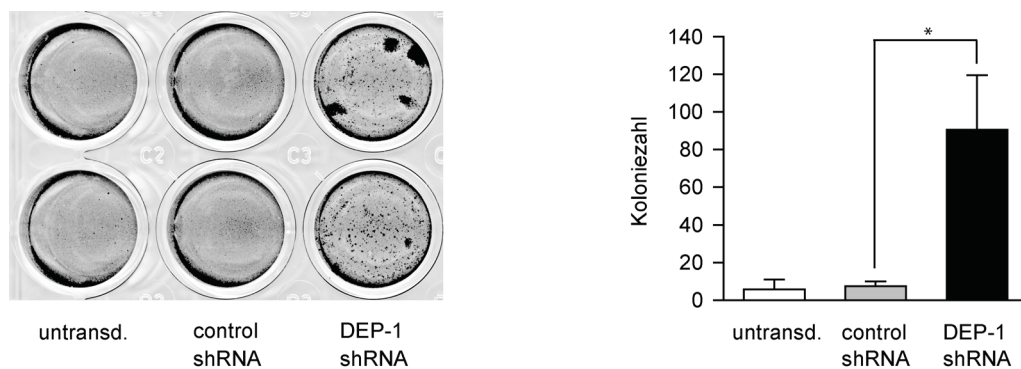


Bild 3.19: DEP-1 hemmt die Koloniebildung von KT21-Zellen in Softagar. Untransduzierte KT21-Zellen, KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden 15 Tage in Softagar-Medium kultiviert. Kolonien wurden mit MTT gefärbt und gezählt. Ein repräsentatives Beispiel und der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Replikaten pro Ansatz sind dargestellt (* $p < 0,05$ durch t-Test).

3.2.10 DEP-1 hemmt das invasive Wachstum von Meningeomzellen *in vivo*

Um zu untersuchen, ob sich die anti-transformierende Aktivität von DEP-1 auch auf das Tumorstadium *in vivo* auswirkt, wurden von unseren Kooperationspartnern Dr. Makoto Nakamura, Sabrina Friedrich (Klinik für Neurochirurgie, Medizinische Hochschule Hannover) und Prof. Dr. Christian Mawrin (Institut für Neuropathologie, Universität Magdeburg) das Wachstum der KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell analysiert. Diese Daten wurden mit Zustimmung der Kooperationspartner hier dargestellt, um die Charakteristika der DEP-1-depletierten Meningeomzellen umfassend zu präsentieren.

Jede Zelllinie wurde dazu intracranial in fünf NMRI nu/nu Mäuse injiziert. Nach zehn Tagen wurde das Tumorstadium histologisch untersucht. Die Injektion der Zellen führte in allen Tieren zur Bildung von Tumorgewebe, das sich über beide Hemisphären erstreckte (Bild 3.20 I, II). Drei von fünf Mäusen, denen DEP-1-depletierte Zellen injiziert worden waren, wiesen eine Infiltration der Tumorzellen in das Gehirn auf (Pfeile in Bild 3.20 II und IV), die histologisch dem invasiven Tumorstadium humaner hochgradiger Meningeome ähnelte (Bild 3.20 II, IV, VI). Im Gegensatz dazu wurde für die DEP-1-exprimierenden Tumoren in nur einem Fall ein zusätzliches Wachstum in das Gehirn beobachtet, das jedoch verdrängenden und nicht infiltrierenden Charakter hatte (Bild 3.20 III, V). Die Ergebnisse zeigen, dass der DEP-1-Verlust die Motilität von Meningeomzellen fördert und zu einem invasiven Wachstum *in vivo* beiträgt.

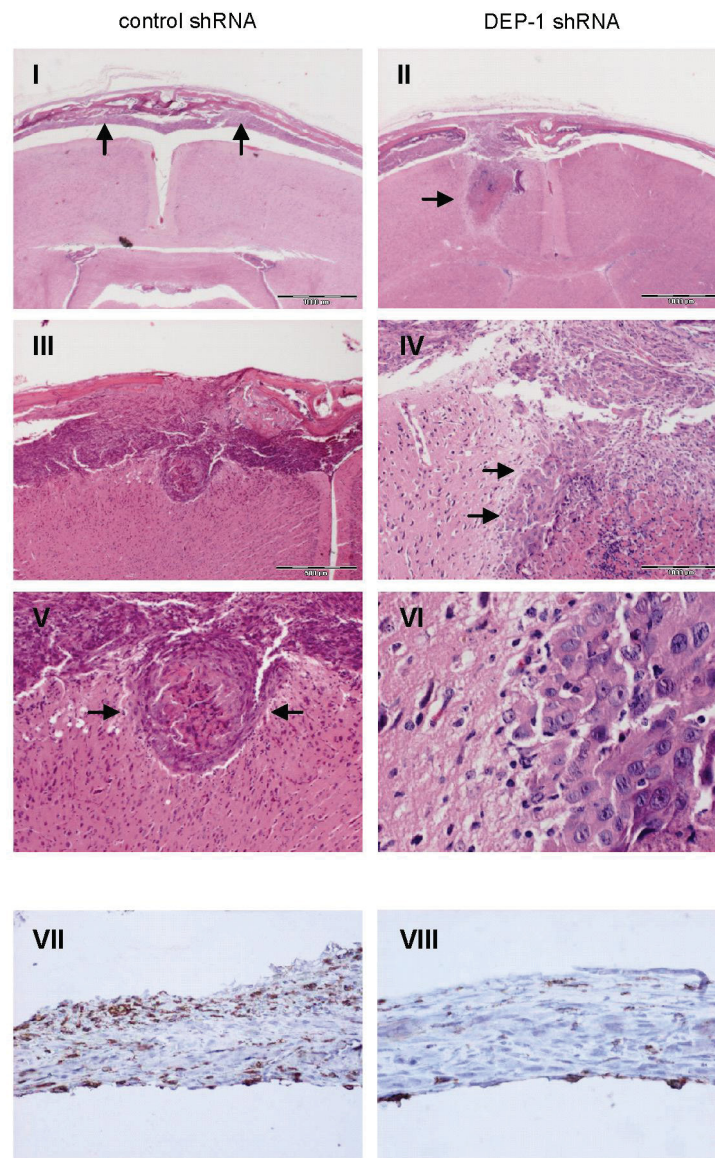


Bild 3.20: DEP-1 hemmt das invasive Wachstum von Meningeomzellen *in vivo*. KT21-DEP-1 shRNA- und KT21-control shRNA-Zellen wurden stereotaktisch in den präfrontalen Kortex von NMRI nu/nu Mäusen transplantiert. Das Tumorwachstum wurde histologisch analysiert. Die Messbalken repräsentieren 1000 µm (I,II,IV) und 500 µm (III). Bilder V und VI stellen höhere Vergrößerungen von III bzw. IV dar. DEP-1-Immunfärbungen von Paraffinschnitten der intracranialen Tumoren von Kontroll- (VII) oder DEP-1-depletierten Zellen (VIII) zeigen die Aufrechterhaltung des DEP-1-Status während des gesamten Experiments. Die Daten wurden von Dr. Makoto Nakamura, Sabrina Friedrich (Klinik für Neurochirurgie, Medizinische Hochschule Hannover) und Prof. Dr. Christian Mawrin (Institut für Neuropathologie, Universität Magdeburg) erhalten.

4 Diskussion

4.1 Funktion von DEP-1 in Kolonkarzinomzellen

Der *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in humanen Kolonkarzinomen und die Identifizierung von *Ptprj* als Gen des murinen *susceptibility to colon cancer (Sccl)*-Locus weisen darauf hin, dass DEP-1 im Kolon als Tumorsuppressor wirken könnte (Ruivenkamp et al. 2002). Die molekularen Mechanismen, die der Tumorsuppression zugrunde liegen, sind jedoch nicht genau charakterisiert. Untersuchungen in SW480-Kolonkarzinomzellen deuteten darauf hin, dass DEP-1 die Signaltransduktion des HGF-Rezeptors cMet negativ reguliert (Balavenkatraman, unpublizierte Daten). Die cMet-vermittelte Signaltransduktion stimuliert u. a. die Proliferation, die Migration und das Überleben von Zellen und ist in verschiedenen Krebsformen verstärkt. (Peruzzi and Bottaro 2006). In SW480-Zellen wurde eine komplette Dephosphorylierung der Aktivierungsloop-Tyrosine Y1230/1234/1235 sowie eine vollständige Dephosphorylierung von Erk und Akt durch DEP-1 beobachtet. Da diese Daten, wie auch die große Mehrheit der bisher publizierten Studien zur Funktion von DEP-1, auf DEP-1-Überexpression basierten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der Phosphatase durch stabilen shRNA-vermittelten Knockdown überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden drei Kolonkarzinomzelllinien (HCT116, DLD1 und Caco-2) lentiviral mit einem DEP-1 shRNA- bzw. einem control (non-targeting) shRNA-Expressionskonstrukt transduziert und anschließend auf stabile Expression selektiert. In allen Zelllinien wurde ein effektiver Knockdown von DEP-1 erzielt. Die Analyse der cMet-Signaltransduktion in den erzeugten Zelllinien ergab jedoch, dass in keiner der Linien die Phosphorylierung von cMet Y1230/1234/1235, Erk und Akt durch DEP-1 beeinflusst wurde. Durch Koüberexpression von DEP-1 und cMet in 293-Zellen war gezeigt worden, dass die Dephosphorylierung von cMet unter diesen Bedingungen selektiv erfolgte und die Gab1-Bindungsstelle phospho-Y1349 das bevorzugte DEP-1-Substrat darstellte (Palka et al. 2003). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Phosphorylierung von Y1349 in den DEP-1-depletierten bzw. Kontroll-Kolonkarzinomzelllinien ließen jedoch keine DEP-1-abhängigen Unterschiede erkennen. Untersuchungen, die mit einem Ansatz des Funktionsverlustes durchgeführt werden, sind

in der Regel aussagefähiger als Überexpressionsuntersuchungen. Die erhaltenen Ergebnisse legen deshalb nahe, dass es sich bei cMet nicht um ein physiologisches DEP-1-Substrat handelt und die beobachtete Dephosphorylierung von cMet in DEP-1-überexprimierenden SW480- und 293-Zellen vermutlich durch unphysiologisch hohe DEP-1-Expressionsspiegel zustande kam.

Zur Identifizierung von DEP-1-Substraten wurde ein *in vitro* Substrat-Trapping durchgeführt. Die Interaktionsstudien ergaben eine Assoziation der DEP-1-DA-Substrat-Trapping-Mutante mit den Fokaladhäsionskomponenten FAK, Src und Paxillin. Eine Assoziation allein ist aber noch kein Beweis dafür, dass es sich bei den Proteinen um physiologische Substrate handelt. Zum einen kann bei diesem Ansatz, insbesondere in der hier gewählten Variante, nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine mit der Trapping-Mutante assoziieren, die *in vivo* aber beispielsweise aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation gar nicht an die Phosphatase binden könnten. Der ursprüngliche Versuch, DEP-1 (WT bzw. DA-Mutante) stabil in SW480-Kolonkarzinomzellen zu exprimieren und anschließend mit den assoziierenden Proteinen aus den Zellen zu isolieren, ist wegen sehr geringer DEP-1-Expressionsspiegel nicht erfolgreich gewesen (Daten nicht gezeigt). Zum anderen ist es möglich, dass zusammen mit einem Substrat weitere Proteine kopräzipitieren, die selbst keine Substrate darstellen. In DEP-1-Überexpressionsstudien in SW480-Kolonkarzinomzellen (Balavenkatraman, unpublizierte Daten) und in Schilddrüsenkarzinomzellen (Pera et al. 2005) wurde eine positive Regulation der Tyrosinphosphorylierung von FAK und Paxillin durch DEP-1 beschrieben. Die Analyse der FAK- und Paxillin-Phosphorylierung in DEP-1-depletierten HCT116-Zellen zeigte, dass unter normalen Kultivierungsbedingungen keine Regulation durch DEP-1 erfolgt. Hingegen wurde eine verminderte Paxillin-, aber nicht FAK-, Phosphorylierung in DEP-1-depletierten HCT116-Zellen nach Adhäsion auf Fibronectin-beschichteten Platten beobachtet. Im Gegensatz zur Regulation der cMet-Phosphorylierung konnte der Effekt von DEP-1 auf die Paxillin-Phosphorylierung in Kolonkarzinomzelllinien durch DEP-1-Knockdown also bestätigt werden. Eine Hyperphosphorylierung von Paxillin in der Gegenwart von DEP-1 deutet aber auch darauf hin, dass Paxillin kein Substrat von DEP-1 ist. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Assoziation zwischen der DEP-1-DA-Substrat-Trapping-Mutante und den Proteinen Paxillin und FAK indirekt erfolgte.

Neben FAK und Paxillin wurden in den Substrat-Trapping-Komplexen auch das bisher nicht weiter charakterisierte Rho GEF 16 und das Protein p140 Sra-1/Sra-1/PIR121 identifiziert. p140 Sra-1 (Specifically Rac1-associated protein) interagiert direkt mit aktiviertem Rac1 (Kobayashi et al. 1998) und ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der an der Aktivierung von WAVE-Proteinen beteiligt ist. WAVE-Proteine können wiederum Arp2/3-Komplexe aktivieren und dadurch die Actinpolymerisation stimulieren. p140 Sra-1 stellt somit eine Verbindung zwischen der Aktivierung von Rac1 und der Actinpolymerisation her (Stradal and Scita 2006). Außerdem wird das Protein für die Ausbildung von Lamellipodien benötigt (Steffen et al. 2004). p140 Sra-1 kann an Tyrosinen phosphoryliert werden (Chen et al. 2007), so dass das Protein potentiell ein Substrat von DEP-1 darstellen könnte. Welche Konsequenzen die Tyrosinphosphorylierung für die Funktion von p140 Sra-1 hat, ist allerdings nicht bekannt.

Die Regulation der Actinzytoskelettstruktur und die Ausbildung von Fokaladhäsionen bilden die Grundlage für die Zell-Matrix-Adhäsion und Migration (Berrier and Yamada 2007, Vicente-Manzanares et al. 2005). Frühere Überexpressionsstudien zeigten, dass DEP-1 die Adhäsion von Fibroblasten und Schilddrüsenkarzinomzellen (Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004, Pera et al. 2005) und die Serum-induzierte Migration von SW480-Kolonkarzinomzellen (Balavenkatraman et al. 2006) regulieren kann. Die adhäsionsabhängige DEP-1-vermittelte Paxillin-Hyperphosphorylierung in HCT116-Zellen sowie die Assoziation mit weiteren Fokaladhäsionskomponenten und Regulatoren der Actinzytoskelettstruktur *in vitro* ließen eine DEP-1-vermittelte Regulation der Adhäsion und Migration auch in HCT116-Zellen vermuten. Es zeigte sich jedoch, dass die Adhäsion auf drei verschiedenen Matrixproteinen (Fibronectin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ II) sowie die Serum-induzierte Migration nicht durch DEP-1 beeinflusst wurden. Darüber hinaus konnten auch die beschriebene DEP-1-vermittelte Hemmung der Proliferation und die Induktion der Apoptose in SW480 und weiteren Zelllinien (Balavenkatraman et al. 2006, Iuliano et al. 2003, Keane et al. 1996, MacKeigan et al. 2005, Massa et al. 2004, Trapasso et al. 2004) in HCT116-Zellen nicht bestätigt werden. Der einzige Phänotyp von DEP-1-depletierten HCT116-Zellen, der in funktionellen Assays beobachtet wurde, war eine geringfügige Steigerung des verankerungsunabhängigen Wachstums. Ob dieser Phänotyp für das Tumorwachstum *in vivo* relevant ist, wurde durch Xenotransplantationsversuche in Mäusen überprüft. Dadurch, dass der DEP-1-Knockdown

in den xenotransplantierten Tumoren nicht aufrechterhalten wurde, kann allerdings keine Aussage zur Rolle von DEP-1 für das Wachstum der Kolonkarzinomzellen in diesem Modell getroffen werden.

Luo et al. 2006 haben beschrieben, dass der *PTPRJ*-Heterozygotieverlust ein frühes Ereignis im Verlauf der Kolonkarzinogenese ist und häufig bereits vor der Mutation von *APC* auftritt. Es wäre demnach möglich, dass der *PTPRJ*-Allelverlust eher für die Entstehung von prämaligen Läsionen als für die Progression in fortgeschrittenere Tumorstadien von Bedeutung ist. Zellen eines früheren Tumorstadiums könnten somit möglicherweise ein besser geeignetes Modell darstellen. Um zu überprüfen, ob der Knockdown von DEP-1 in weniger stark transformierten Kolonepithelzellen mit der Ausbildung von stärker ausgeprägten Phänotypen verbunden ist, wurde versucht, die DEP-1-Expression in einer Adenomzelllinie (LT97) mit den schon zuvor verwendeten shRNA-Expressionsplasmiden stabil herabzusetzen. Da jedoch die Effizienz der lentiviralen Transduktion sehr gering war, konnte dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden (Daten nicht gezeigt).

Obwohl LOH-Analysen und Überexpressionsexperimente in Kolonkarzinomzelllinien auf eine Funktion von DEP-1 als Tumorsuppressor im Kolon hindeuteten, lieferte der Knockdown-Ansatz – mit Ausnahme der leichten Steigerung des verankerungsunabhängigen Wachstums der DEP-1-depletierten HCT116-Zellen – keine Hinweise auf eine Tumorsuppressorfunktion.

Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte in der funktionellen Redundanz von DEP-1 mit anderen PTPs liegen. Signaltransduktionsanalysen in B-Zellen und Makrophagen von *Ptprj*-Knockout-Mäusen zeigten, dass der Verlust von DEP-1 weitestgehend durch die Phosphatase CD45 (*Ptpnc*) kompensiert werden konnte. Erst der *Ptprj/Ptpnc*-Doppelknockout führte zu stärker ausgeprägten Phänotypen (Zhu et al. 2008). Es wäre prinzipiell möglich, dass auch in den Kolonkarzinomzellen die DEP-1-Depletion durch eine oder mehrere PTPs mit ähnlicher Substratspezifität kompensiert worden ist und deshalb keine DEP-1-abhängigen Phänotypen beobachtet werden konnten. Weiterhin wäre es denkbar, dass in den malignen Zellen onkogene Signalwege bereits so stark überaktiviert vorliegen, dass man durch den Verlust eines negativen Regulators keine weitere Steigerung erzielen kann.

Ob das verwendete Zellmodell ungeeignet war oder DEP-1 für die Kolonkarzinogenese tatsächlich nicht von Bedeutung ist, ist schwer abzuschätzen. Die Analyse von *Ptprj*-Knockout-Mäusen lieferte keine Hinweise auf eine erhöhte spontane Tumorigenese (Trapasso et al. 2006). Der Knockout von *Ptprj* in Mäusen mit Kolonkarzinogenese-relevanten Mutationen, wie z.B. *Apc*-Mutationen, könnte allerdings zum Verständnis der Rolle von DEP-1 für die Kolonkarzinogenese beitragen.

4.2 Funktion von DEP-1 in Meningeomzellen

Der Verlust des Tumorsuppressors *NF2*/Merlin in Meningeomen ist ein gut charakterisiertes Ereignis, das zur Entstehung von Meningeomen beiträgt (Perry et al. 2004). Ob PTPs an der Tumorigenese des Meningeoms beteiligt sind, wurde bisher jedoch nicht näher analysiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Funktion die Phosphatase DEP-1 in Meningeomzellen ausübt und ob ein Verlust der Funktion möglicherweise im Zusammenhang mit der Entstehung von Meningeomen stehen könnte.

Die Analyse der DEP-1-Expression in Meningeom-Tumorproben und Meningeomzelllinien ergab, dass DEP-1 in einem Teil der untersuchten Zelllinien und Tumoren exprimiert wird. Der Nachweis von *PTPRJ*-Heterozygotieverlust in einem Teil der Tumoren deutet darauf hin, dass DEP-1 möglicherweise für die Tumorigenese des Meningeoms von Bedeutung ist. In Grad II- und III-Tumoren wurde eine etwas höhere LOH-Häufigkeit als in Grad I-Tumoren festgestellt. Allerdings war die Zahl der analysierten Grad II- und III-Tumoren sehr klein, so dass nicht mit statistischer Sicherheit von einer Korrelation zwischen Tumorgrad und LOH-Häufigkeit gesprochen werden kann.

Da der *PTPRJ*-Heterozygotieverlust auf eine Funktion von DEP-1 als Tumorsuppressor hinweist, sollten die Folgen des DEP-1-Verlustes durch stabilen Knockdown von DEP-1 in Meningeomzelllinien charakterisiert werden. Zur Untersuchung der Funktion der Phosphatase wurde die DEP-1-Expression in zwei Zelllinien mit hohen DEP-1-Expressionsspiegeln (KT21 und SF3061) mit Hilfe von DEP-1-shRNA-Expressionskonstrukten stabil herabgesetzt.

4.2.1 DEP-1 als positiver Regulator der Adhäsion in Meningeomzellen

Die vorangegangenen Signaltransduktionsanalysen in HCT116-Zellen zeigten, dass in der Gegenwart von DEP-1 die adhäsionsabhängige Paxillin-Phosphorylierung erhöht war.

Ausgehend von diesem Befund wurde überprüft, ob auch in Meningeomzellen eine Regulation unter denselben Bedingungen erfolgt. Da der Effekt in Meningeomzellen bestätigt werden konnte, und auch in Schilddrüsenkarzinomzellen (Pera et al. 2005) und SW480-Kolonkarzinomzellen (Balavenkatraman, unpublizierte Daten) eine erhöhte Phosphorylierung von Paxillin bei DEP-1-Überexpression beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die positive Regulation der Paxillin-Phosphorylierung durch DEP-1 nicht zelltypspezifisch erfolgt. Bisher ungeklärt ist die Frage, durch welchen Mechanismus DEP-1 die Paxillin-Phosphorylierung positiv reguliert. Tyrosinkinasen, die adhäsionsabhängig aktiviert werden und Paxillin phosphorylieren können, sind Src (pp60c-Src) bzw. die SFKs und FAK (Deakin and Turner 2008). Src/SFKs könnten prinzipiell eine Verbindung zwischen DEP-1 und der Paxillin-Phosphorylierung herstellen, da sie durch Dephosphorylierung aktiviert werden können. Src/SFKs, die am C-terminalen Tyrosin (Y527 in Src) phosphoryliert sind, gehen eine intramolekulare Wechselwirkung mit der SH2-Domäne ein, die zur Inaktivierung der Proteine führt. Die Aktivierung kann entweder durch Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosins erfolgen oder durch Konformationsänderungen vermittelt werden, die durch die Bindung der Src-SH2-Domäne an Phosphotyrosine in anderen Proteinen verursacht werden (Frame 2002). Chabot et al. 2009, Pera et al. 2005 und Zhu et al. 2008 haben gezeigt, dass DEP-1 die Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyrosins von Src und der SFK Lyn katalysieren kann. Unter den Bedingungen der DEP-1-vermittelten Effekte auf die Paxillin-Phosphorylierung wurde deshalb in KT21-Zellen überprüft, ob eine Aktivierung von Src durch DEP-1 erfolgt. Es wurden sowohl phosphorylierungsspezifische Antikörper zur Analyse der Src-Phosphorylierung mittels Westernblot eingesetzt als auch direkte Messungen der Src-Enzymaktivität durch *in vitro* Kinaseassays nach Immunpräzipitation der Kinase vorgenommen. Allerdings lieferten die bisher durchgeführten Experimente keine Hinweise auf eine DEP-1-abhängige Regulation (Daten nicht gezeigt). Chabot et al. 2009 haben gezeigt, dass in VEGF-stimulierten Endothelzellen nur die Aktivität eines subzellulären Src-Pools, nicht aber die Aktivität des gesamten intrazellulären Src-Proteins durch DEP-1 reguliert wird. Möglicherweise beschränkt sich die Regulation von Src in den Meningeomzellen auch auf einen subzellulären Src-Pool. Da die *in vitro* Interaktionsstudien auf eine Assoziation von DEP-1 mit mehreren Komponenten von Fokaladhäsionskomplexen hinwiesen, wäre es denkbar, dass DEP-1 auch *in vivo* mit

Fokaladhäsionskomplexen assoziiert und möglicherweise einen Fokaladhäsions-assoziierten Src-Pool aktiviert. Neben dem untersuchten pp60c-Src kämen auch weitere SFKs als Vermittler der DEP-1-abhängigen Paxillin-Hyperphosphorylierung in Frage. Die Aktivitätsanalyse weiterer SFKs sowie die Untersuchung unterschiedlicher subzellulärer Src-Pools könnten somit zum Verständnis des Mechanismus der DEP-1-abhängigen Paxillin-Hyperphosphorylierung beitragen. Die nur mäßig starke Ausprägung der Hyperphosphorylierung des analysierten gesamten zellulären Paxillins könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass unter Umständen auch nur bestimmte subzelluläre Paxillin-Pools durch DEP-1 reguliert werden.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die adhäsionsabhängige DEP-1-vermittelte Paxillin-Hyperphosphorylierung mit der Ausbreitung der Zellen auf Fibronectin korreliert. Die Ausbreitung der KT21-Zelllinien wurde sowohl durch Time-Lapse-Mikroskopie verfolgt als auch durch Fixierung und Färbung der Zellen nach unterschiedlichen Adhäsionszeiten untersucht. Beide Methoden zeigten übereinstimmend, dass der Knockdown von DEP-1 mit einer verminderten Ausbreitung der Zellen verbunden war. Eine defekte Ausbreitung auf Fibronectin wurde zuvor auch für Thrombozyten und Megakaryozyten von *Ptpn11*-Knockout-Mäusen beschrieben (Senis et al. 2009).

Die Ausbreitung von Zellen erfordert die Regulation der Aktivität von GTPasen der Rho-Familie. Durch die Aktivität von Rac1 und Cdc42 wird die Actinpolymerisation und Erweiterung der Zellmembran gefördert. Die Aktivität von RhoA hingegen sorgt für die Ausbildung von Stressfasern und Reifung von Fokaladhäsionen. In frühen Stadien der Ausbreitung oder auch in Lamellipodien von migrierenden Zellen erfolgt eine Aktivierung von Rac1 und eine Inaktivierung von RhoA (Arthur et al. 2002, Huveneers and Danen 2009). Die Regulation der Aktivität der GTPasen erfolgt durch GEFs und GAPs. Diese Proteine werden u. a. durch Integrin-abhängige Signalprozesse reguliert. Sie können beispielsweise in Abhängigkeit von der Phosphorylierung von Fokaladhäsionsproteinen an die Fokaladhäsionen rekrutiert und/oder durch Phosphorylierung aktiviert werden (Huveneers and Danen 2009). tyrosinphosphoryliertes Paxillin kann z.B. indirekt Rac1 aktivieren und RhoA hemmen, indem es den Rac1-aktivierenden CrkII-DOCK180-ELMO-Komplex bindet oder mit p120RasGAP interagiert, was mit einer Hemmung von RhoA verbunden ist (Deakin 2008). Nicht nur die DEP-1-abhängigen Unterschiede in der Ausbreitung der Zellen auf Fibronectin legen eine Regulation von Rho-Familie-GTPasen

nahe, sondern auch die *in vitro* Interaktion mit den Proteinen Rho GEF 16 und p140 Sra-1. Die Funktion von Rho GEF 16 wurde zwar bisher nicht näher analysiert, allerdings ist bekannt, dass p140 Sra-1 an der Rac-abhängigen Regulation der Actinpolymerisation beteiligt ist und zur Ausbildung von Lamellipodien benötigt wird (Steffen et al. 2004, Stradal and Scita 2006). Rac- und Rho-Aktivitätsassays wären wichtige weitere Untersuchungen, um die Frage zu klären, ob die DEP-1-abhängige Ausbreitung tatsächlich auf einer Regulation der Aktivität der GTPasen basiert.

Um in Erfahrung zu bringen, ob DEP-1 einen Einfluss auf die Bildung bzw. Verteilung von Zell-Matrix-Kontakten nimmt, wurden Immunfärbungen der Adapterproteine Paxillin und Vinculin vorgenommen. Sowohl Paxillin als auch Vinculin werden infolge der Integrin-Aktivierung zur Plasmamembran rekrutiert. Sie tragen durch Interaktion mit weiteren Signal- und Adapterproteinen zum Aufbau größerer Komplexe bei und sind an der Regulation von Integrin-abhängigen Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Wozniak et al. 2004). Im Vergleich zu den DEP-1-depletierten KT21-Zellen wiesen die DEP-1-exprimierenden Kontrollzellen sowohl größere als auch eine höhere Anzahl von Paxillin- und Vinculin-haltigen Zell-Matrix-Kontakten auf. Die Zell-Matrix-Kontakte in den Zelllinien unterschieden sich zusätzlich hinsichtlich ihrer Lokalisation. Während die Adhäsionskomplexe in den DEP-1-depletierten Zellen überwiegend in der Zellperipherie lokalisiert waren, waren die Komplexe der DEP-1-exprimierenden Zellen gleichmäßiger über die Zelle verteilt. Bisher ungeklärt ist die Frage, in welcher Form DEP-1 in den Aufbau oder Abbau der Proteinkomplexe eingreift. Der Nachweis einer reduzierten Zahl von Komplexen könnte sowohl auf eine ineffiziente Bildung oder Stabilität zurückzuführen sein als auch auf eine unzureichende Dynamik (Turnover) der Proteinkomplexe hinweisen. Wie auch für die DEP-1-depletierten KT21-Zellen wurde für Fibroblasten von PTP α -Knockout-Mäusen eine defekte Ausbreitung auf Fibronectin beobachtet. Neben einer reduzierten Rac1-Aktivität wiesen diese Zellen auch eine reduzierte Anzahl von Fokaladhäsionen auf. Die Fokaladhäsionskomplexe der PTP α -Knockout-Zellen waren durch eine erhöhte Stabilität und ein vermindertes Turnover gekennzeichnet (Herrera Abreu et al. 2008). Die Expression von fluoreszenzmarkierten Fokaladhäsionsproteinen in den stabilen Meningeomzelllinien in Verbindung mit der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellen nach Adhäsion auf Fibronectin könnte einen Hinweis auf die Funktion von DEP-1 für die Zell-Matrix-Kontakt-Bildung liefern. Ob DEP-1 das Turnover von

Adhäsionskomplexen reguliert, könnte beispielsweise mit Hilfe von FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)-Analysen geklärt werden.

Bisher ist ungeklärt, ob DEP-1 an Zell-Matrix-Kontakten lokalisiert bzw. angereichert ist. Die Assoziation der DEP-1-Substrat-Trapping-Mutante mit Fokaladhäsionsproteinen deutet zumindest auf eine Lokalisation an Zell-Matrix-Kontakten hin. Immunfärbungen von DEP-1 und die Kofärbungen von Fokaladhäsionsproteinen sollten eine Antwort auf die Frage der subzellulären Lokalisation von DEP-1 geben.

Die verminderte Ausbreitung und die abweichende Anzahl und Verteilung von Zell-Matrix-Kontakten ließen einen Adhäsionsdefekt der DEP-1-depletierten Zellen vermuten. Die Analyse der Adhäsion der KT21- und SF3061-Zelllinien auf drei Proteinen der extrazellulären Matrix bestätigte, dass der DEP-1-Knockdown mit einer verminderten Zell-Matrix-Adhäsion verbunden war. Diese Daten sind in Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, die eine Verstärkung der Adhäsion von Schilddrüsenkarzinomzellen und Fibroblasten durch Überexpression von DEP-1 gezeigt haben (Jandt et al. 2003, Pera et al. 2005).

4.2.2 DEP-1 als negativer Regulator der Migration und der PDGFR-abhängigen Signaltransduktion in Meningeomzellen

In verschiedenen Studien wurde eine Hemmung der Migration von Zellen durch DEP-1-Über-/Reexpression beobachtet (Balavenkatraman et al. 2006, Jandt et al. 2003, Kellie et al. 2004). Es wurde deshalb untersucht, ob DEP-1 auch die Migration von Meningeomzellen reguliert. Durch Wound healing-Migrationsassays mit den transduzierten KT21- und SF3061-Meningeomzelllinien konnte eine anti-migratorische Funktion von DEP-1 bestätigt werden. Durch den Einsatz von PDGFR-Inhibitoren in den Wound healing-Assays sowie durch die Verwendung von PDGF als Chemoattraktant in Boyden-Kammer-Assays konnte gezeigt werden, dass die DEP-1-abhängige Migrationsregulation zumindest teilweise von der PDGFR-Aktivität abhängig ist. Durch Signaltransduktionsanalysen sollte deshalb geklärt werden, wie DEP-1 in die PDGFR-abhängige Signaltransduktion eingreift. Die Analysen zeigten, dass DEP-1 die PDGFR-Phosphorylierung negativ reguliert. Das Aktivierungsloop-Tyrosin Y849 des PDGFR α schien im Gegensatz zum Aktivierungsloop-Tyrosin Y857 des PDGFR β das bevorzugte DEP-1-Substrat in SF3061-Zellen zu sein. In KT21-Zellen konnte keine PDGFR β -

Expression nachgewiesen werden, so dass in diesen Zellen von vornherein nur der PDGFR α als Substrat von DEP-1 in Frage kommt. Die Untersuchung von PDGFR-aktivierten Signalproteinen ergab, dass die Phosphorylierung von Akt und Erk durch DEP-1 nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine negative Regulation der PLC γ -Phosphorylierung festgestellt. In früheren *in vitro*- und Überexpressionsstudien wurde der PDGFR β als Substrat von DEP-1 beschrieben (Jandt et al. 2003, Kovalenko et al. 2000, Persson et al. 2002). Als bevorzugte Dephosphorylierungsstelle wurde das Tyrosin Y1021, die PLC γ -Bindungsstelle des PDGFR β , identifiziert. In SF3061-Zellen konnten jedoch keine DEP-1-abhängigen Unterschiede der PDGFR β Y1021-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die DEP-1-abhängige Reduktion der PLC γ -Phosphorylierung könnte möglicherweise durch die Dephosphorylierung der PLC γ -Bindungsstelle des PDGFR α vermittelt worden sein und/oder aus einer direkten Dephosphorylierung von PLC γ resultieren. Eine direkte Dephosphorylierung von PLC γ durch DEP-1 *in vitro* wurde bereits gezeigt, ebenso wie eine DEP-1-abhängige PLC γ -Dephosphorylierung in T-Zellen (Baker et al. 2001). Die negative Regulation der PLC γ -Phosphorylierung durch DEP-1 könnte an der Migrationshemmung beteiligt sein, da verschiedene Studien darauf hinweisen, dass die Aktivität von PLC γ für die PDGF-induzierte Migration von Bedeutung ist (Ronnstrand and Heldin 2001).

Zu den noch offenen Fragen zählt, ob neben dem Aktivierungsloop-Tyrosin von PDGFR α weitere Phosphorylierungsstellen von PDGFR α oder PDGFR β durch DEP-1 reguliert werden und dadurch zusätzliche PDGF-abhängige Signalprozesse, wie z.B. die Aktivierung von STAT-Proteinen, Src oder JNK/SAPK, beeinflusst werden. Weiterhin ist unbekannt, ob in den Meningeomzellen ein „Crosstalk“ zwischen PDGFR- und Integrin-abhängigen Signalprozessen stattfindet oder dieser durch DEP-1 reguliert wird. Verschiedene Signalproteine, wie z.B. Src und FAK, PI3K und Rho-Familie-GTPasen, können sowohl durch PDGFR- als auch durch Integrin-Aktivierung reguliert werden (Heldin et al. 1998). Außerdem kann PDGFR β über das Adapterprotein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF) mit FAK interagieren und durch NHERF zusammen mit Proteinen der Merlin and Ezrin-Radixin-Moesin (MERM)-Familie eine Verbindung zum Actinzytoskelett herstellen (James et al. 2004).

Die Migration erfordert eine zeitliche und räumliche Regulation des Auf- und Abbaus von Zell-Matrix-Kontakten. Bei der Hemmung der PDGF-vermittelten Migration durch DEP-1 könnten sowohl PDGFR-vermittelte als auch Integrin-abhängige Signalprozesse zusammenwirken. Die Tyrosinphosphorylierung von Paxillin kann in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Paxillin-assoziiierenden Proteine zu einer Steigerung oder einer Hemmung der Migration führen (Petit et al. 2000, Yano et al. 2000). Ob auch unter den Bedingungen der PDGF-induzierten, DEP-1-abhängigen Migrationsregulation eine Regulation der Paxillin-Phosphorylierung durch DEP-1 erfolgt, ist jedoch noch nicht geklärt.

4.2.3 DEP-1 als negativer Regulator der Tumorinvasion

Die gleichzeitige Expression von PDGF-Wachstumsfaktoren und PDGF-Rezeptoren in einigen Meningeomen weist darauf hin, dass eine autokrine Stimulation der PDGFR-Signaltransduktion an der Tumorigenese beteiligt sein könnte (Figarella-Branger et al. 1994, Shamah et al. 1997). Da DEP-1 die PDGFR-Signaltransduktion sowie die PDGF-abhängige Migration von Meningeomzellen negativ reguliert, könnte der Verlust von DEP-1 zur Tumorentstehung oder Tumorprogression beitragen.

Um in Erfahrung zu bringen, ob DEP-1 Einfluss auf das verankerungsunabhängige Zellwachstum von Meningeomzellen nimmt, wurden Koloniebildungsassays in Softagar-Medium durchgeführt. In Kolonkarzinomzellen wurde zuvor eine leichte Hemmung der Koloniebildung durch DEP-1 beobachtet. Der Effekt von DEP-1 auf das Koloniewachstum von KT21-Zellen fiel dagegen wesentlich deutlicher aus. Die Bildung von Kolonien wurde durch die Expression von DEP-1 sehr stark unterdrückt.

Um die Rolle von DEP-1 für das Tumorwachstum *in vivo* zu analysieren, wurde eine orthotope Xenotransplantation der Meningeomzelllinien in Mäuse vorgenommen. Zwar wurde durch DEP-1 die Tumorbildung nicht verhindert, aus der Untersuchung der Tumoren ging jedoch hervor, dass die DEP-1-Expression mit einer Hemmung des invasiven Wachstums verbunden ist.

Die beobachteten anti-transformierenden Aktivitäten von DEP-1 in Meningeomzellen im Zusammenhang mit dem *PTPRJ*-Allelverlust in einem Teil der untersuchten Meningeome deuten darauf hin, dass DEP-1 als Tumorsuppressor für das Meningeom agieren könnte. Zwar wurde in *Ptprj*-Knockout-Mäusen keine spontane Tumorbildung festgestellt

(Trapasso et al. 2006), in Verbindung mit weiteren Mutationen könne der Verlust von DEP-1 jedoch möglicherweise zur Tumorentstehung beitragen.

Parallel zu den *PTPRJ*-LOH-Analysen wurden die Meningeom-Tumorproben auf Heterozygotieverlust des Tumorsuppressors *NF2* untersucht. Die Analysen ergaben, dass in einem Teil der Tumoren sowohl *PTPRJ*- als auch *NF2*-Allelverlust erfolgt war. Merlin, das *NF2*-Genprodukt, weist Sequenzhomologien zu Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-Familie-Proteinen auf. Merlin und ERM-Proteine agieren als Verbindungsproteine zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett. Merlin geht zahlreiche Interaktionen mit Transmembranproteinen (z.B. den Adhäsionsrezeptoren CD44 und β 1-Integrin) und intrazellulären Proteinen (z.B. Paxillin) ein. Merlin ist für die Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinase- und Adhäsionsrezeptor-abhängigen Signalwegen von Bedeutung und beeinflusst u. a. die Morphologie, Proliferation und Motilität von Zellen (Stamenkovic and Yu 2010).

Inwieweit der Verlust von Merlin und DEP-1 in meningealen Zellen synergistisch zur Tumorigenese beiträgt oder beide Proteine redundante Funktionen aufweisen, ist nicht bekannt. Durch die Beeinflussung der DEP-1- und Merlin-Expression in Meningeomzellen könnten jedoch Hinweise zum möglichen Zusammenspiel beider Proteine erhalten werden.

4.2.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Funktionen von DEP-1 in Meningeomzellen identifiziert. Einige Aspekte sind allerdings noch ungeklärt. An dieser Stelle soll deshalb ein Überblick über mögliche weiterführende Experimente gegeben werden.

Die Analyse der Aktivität von Src und weiteren SFKs durch Immunpräzipitation der Kinasen und anschließende *in vitro*-Kinaseassays könnte klären, ob die Paxillin-Hypophosphorylierung in DEP-1-depletierten Zellen durch eine verminderte Aktivierung dieser Kinasen vermittelt wird. Da die Aktivierung der Kinasen lokal erfolgen könnte, sollten subzelluläre Src/SFK-Pools in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Analyse von Fokaladhäsions-assoziierten Pools wäre nahe liegend, da durch Substrat-Trapping eine Assoziation von DEP-1 mit mehreren Fokaladhäsionsproteinen festgestellt worden ist. Ob DEP-1 möglicherweise an Fokaladhäsionen angereichert ist, könnten Immunfärbungen von DEP-1 und Kofärbungen von Fokaladhäsionsproteinen zeigen.

Durch Transfektion von Zellen mit Expressionskonstrukten für fluoreszenzmarkierte Fokaladhäsionsproteine und anschließende Time-Lapse-Fluoreszenzmikroskopie sowie durch FRAP-Messungen könnte geklärt werden, ob bzw. wie DEP-1 einen Einfluss auf die Bildung und das Turnover von Zell-Matrix-Komplexen nimmt.

Ob die Ausbreitungs- und Adhäsionsdefekte der DEP-1-depletierten Meningeomzellen durch eine Regulation der Rho-Familie-GTPasen erfolgt, könnte durch Pulldown der aktivierten Form der GTPasen oder durch Westernblot unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch die aktivierte, GTP-beladene Form der GTPasen erkennen, untersucht werden.

Weiterhin könnte analysiert werden, ob neben der Integrin-abhängigen Aktivierung auch PDGF-Rezeptoren an der Regulation der Aktivität bzw. Phosphorylierung der Rho-Familie-GTPasen, Src und Paxillin beteiligt sind. Zusätzlich zu den bisher untersuchten PDGFR-Phosphorylierungsstellen könnten weitere Phosphorylierungsstellen des Rezeptors in PDGF-stimulierten Meningeomzellen analysiert werden, um die Rolle von DEP-1 für die PDGFR-Signaltransduktion umfassender zu charakterisieren.

Die DEP-1-Depletion verursachte eine erhöhte PDGFR-Phosphorylierung in Meningeomzelllinien. Ob auch in Tumoren eine Korrelation zwischen der PDGFR-Phosphorylierung und der Expression von DEP-1 besteht, könnte durch Immunfärbungen von Tumorschnitten oder durch Westernblot-Analyse von Tumorlysaten analysiert werden.

Unklar ist, ob das an die Substrat-Trapping-Mutante gebundene Protein p140 Sra-1 tatsächlich ein Substrat von DEP-1 darstellt. Die Analyse der Tyrosinphosphorylierung des Proteins in Abhängigkeit von der DEP-1-Expression sollte diese Frage klären.

Ob die Proteine Merlin und DEP-1 synergistisch zur Tumorigenese des Meningeoms beitragen, könnte durch gleichzeitige Beeinflussung der Expression der Proteine in Meningeomzellen untersucht werden.

4.2.5 Modell

Die Daten zur Funktion von DEP-1, die auf Grundlage der shRNA-vermittelten Depletion der Phosphatase in Meningeomzelllinien erhalten wurden, sollen nun noch einmal zusammengefasst werden (siehe auch Bild 4.1).

DEP-1 wurde als positiver Regulator der adhäsionsabhängigen Paxillin-Phosphorylierung identifiziert. Die Verbindung zwischen DEP-1 und der Paxillin-Hyperphosphorylierung könnte durch SFKs hergestellt werden, die zum einen durch Integrin-abhängige Signalprozesse und zum anderen durch Dephosphorylierung aktiviert werden können. Im Zusammenhang mit der verstärkten Paxillin-Phosphorylierung wurde eine Steigerung der Ausbreitung von Zellen auf Fibronectin, eine erhöhte Anzahl von Zell-Matrix-Kontakten sowie eine verstärkte Zell-Matrix-Adhäsion beobachtet. Diese Effekte könnten durch GTPasen der Rho-Familie vermittelt werden. Deren Regulatoren – die GEF- und GAP-Proteine – werden u. a. durch Tyrosinphosphorylierung von Fokaladhäsionsproteinen an die Zell-Matrix-Kontakte rekrutiert sowie durch Tyrosinphosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert.

Signaltransduktionsanalysen in PDGF-stimulierten Meningeomzellen zeigten, dass DEP-1 die PDGF-abhängige PDGFR- und PLC γ -Phosphorylierung negativ reguliert sowie die PDGF-abhängige Migration hemmt. Die verminderte PLC γ -Phosphorylierung, die auch auf einer direkten Dephosphorylierung durch DEP-1 basieren könnte, bildet möglicherweise die Grundlage der Migrationshemmung.

Zusätzlich wurden eine DEP-1-abhängige Hemmung des verankerungsunabhängigen Wachstums sowie eine Hemmung des invasiven Wachstums von xenotransplantierten Meningeomzellen in Mäusen festgestellt.

Die Hemmung der Adhäsion sowie die Steigerung der Migration und des invasiven Wachstums infolge des DEP-1-Verlustes in Meningeomzellen verbunden mit dem Nachweis von *PTPRJ*-Allelverlust in Meningeomen deuten darauf hin, dass DEP-1 eine Funktion als Tumorsuppressor für das Meningeom haben könnte.

Die erhaltenen Daten zeigen erstmals mit dem rigorosen Ansatz des stabilen Knockdowns Funktionen von DEP-1 *in vitro* und *in vivo*, die für eine Tumorsuppressorfunktion auch über das Meningeom hinaus relevant sein könnten.

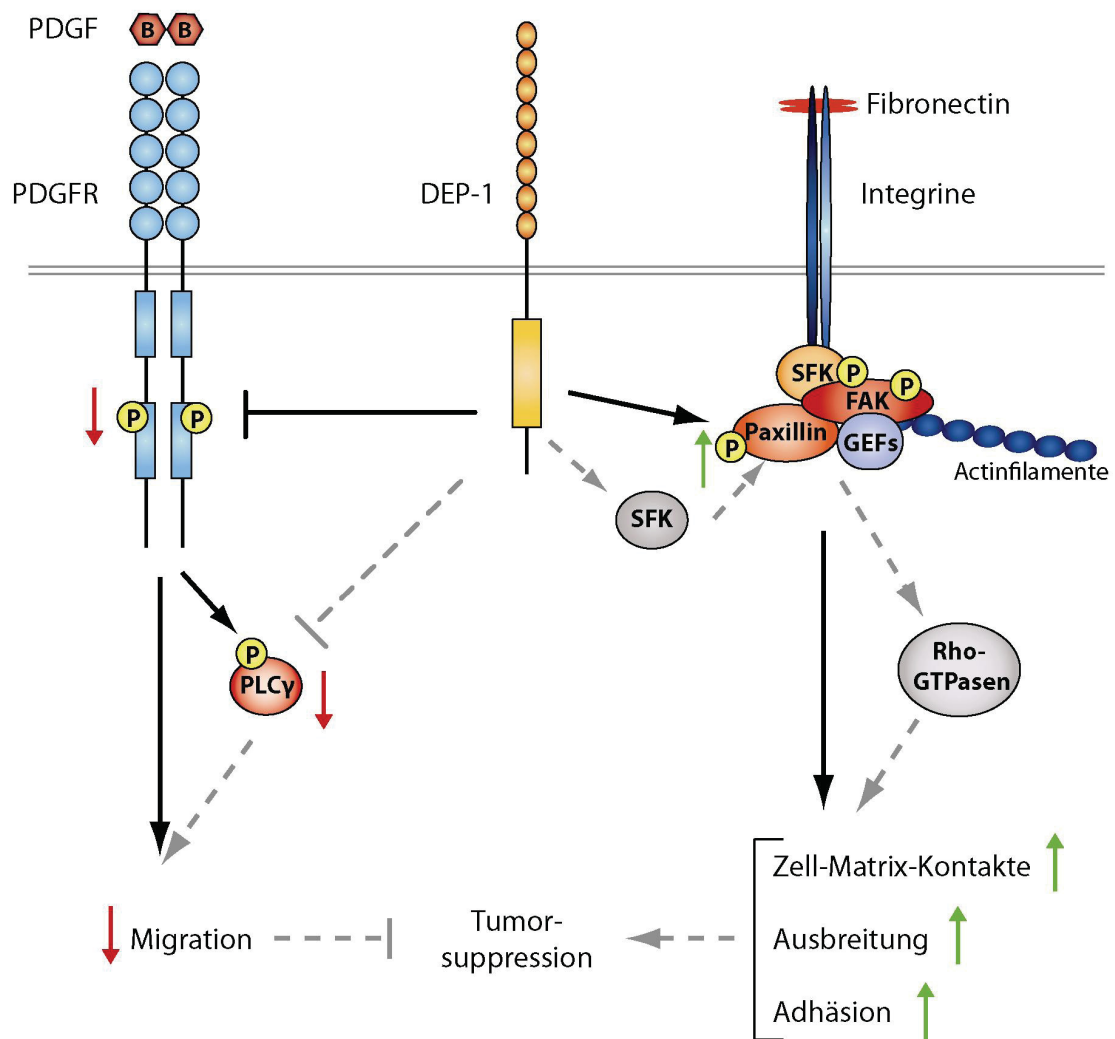


Bild 4.1: Modell für die Funktion von DEP-1 in Meningeomzellen. DEP-1 hemmt die PDGF-BB-abhängige PDGFR- und PLC γ -Tyrosinphosphorylierung sowie die PDGF-stimulierte Migration. Die negative Regulation der PLC γ -Phosphorylierung könnte auch durch direkte Dephosphorylierung durch DEP-1 vermittelt sein. DEP-1 fördert die adhäsionsabhängige Paxillin-Phosphorylierung, möglicherweise durch Aktivierung von SFKs. Die Paxillin-Hyperphosphorylierung steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Zahl von Zell-Matrix-Kontakten, einer verstärkten Ausbreitung der Zellen auf Fibronectin und einer verstärkten Zell-Matrix-Adhäsion. Rho-Familie-GTPasen könnten potentielle Mediatoren der adhäsionsabhängigen Effekte darstellen. Die Hemmung der Migration sowie die verstärkte Adhäsion könnten die Grundlage für eine Tumorsuppressorfunktion von DEP-1 bilden. - Die experimentellen Beobachtungen sind durch schwarze Linien gekennzeichnet, potentielle Mechanismen sind durch graue gestrichelte Linien dargestellt. Eine positive Regulation durch DEP-1 ist durch grüne Pfeile und eine negative Regulation durch rote Pfeile gekennzeichnet.

5 Referenzen

Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A *et al* (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**: 699-711.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* **22**: 1276-1312.

Angers-Loustau A, Cote JF, Tremblay ML (1999). Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* **77**: 493-505.

Arthur WT, Noren NK, BurrIDGE K (2002). Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res* **35**: 239-246.

Autschbach F, Palou E, Mechtersheimer G, Rohr C, Piroto F, Gassler N *et al* (1999). Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues. *Tissue Antigens* **54**: 485-498.

Baker JE, Majeti R, Tangye SG, Weiss A (2001). Protein tyrosine phosphatase CD148-mediated inhibition of T-cell receptor signal transduction is associated with reduced LAT and phospholipase Cgamma1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **21**: 2393-2403.

Balavenkatraman KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Ostman A *et al* (2006). DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene*.

Baser ME, DG RE, Gutmann DH (2003). Neurofibromatosis 2. *Curr Opin Neurol* **16**: 27-33.

Baser ME, Poussaint TY (2006). Age associated increase in the prevalence of chromosome 22q loss of heterozygosity in histological subsets of benign meningioma. *J Med Genet* **43**: 285-287.

Berrier AL, Yamada KM (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**: 565-573.

Berset TA, Hoier EF, Hajnal A (2005). The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl1 inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev* **19**: 1328-1340.

Blanchetot C, Chagnon M, Dube N, Halle M, Tremblay ML (2005). Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* **35**: 44-53.

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

Borges LG, Seifert RA, Grant FJ, Hart CE, Disteché CM, Edelhoff S *et al* (1996). Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res* **79**: 570-580.

Chabot C, Spring K, Gratton JP, Elchebly M, Royal I (2009). New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol* **29**: 241-253.

Chen Y, Choong LY, Lin Q, Philp R, Wong CH, Ang BK *et al* (2007). Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Mol Cell Proteomics* **6**: 2072-2087.

Chernoff J (1999). Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of mitogenic signaling. *J Cell Physiol* **180**: 173-181.

Chiarugi P, Cirri P, Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Buricchi F *et al* (2002). Insight into the role of low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) on platelet-derived growth factor receptor (PDGF-r) signaling. LMW-PTP controls PDGF-r kinase activity through TYR-857 dephosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 37331-37338.

Chow LM, Baker SJ (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* **241**: 184-196.

de la Fuente-Garcia MA, Nicolas JM, Freed JH, Palou E, Thomas AP, Vilella R *et al* (1998). CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood* **91**: 2800-2809.

Deakin NO, Turner CE (2008). Paxillin comes of age. *J Cell Sci* **121**: 2435-2444.

den Hertog J, Ostman A, Bohmer FD (2008). Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. *FEBS J* **275**: 831-847.

Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW *et al* (2010). Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **464**: 999-1005.

Figarella-Branger D, Vagner-Capodano AM, Bouillot P, Graziani N, Gambarelli D, Devictor B *et al* (1994). Platelet-derived growth factor (PDGF) and receptor (PDGFR) expression in human meningiomas: correlations with clinicopathological features and cytogenetic analysis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **20**: 439-447.

Frame MC (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* **1602**: 114-130.

Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 197-204.

Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* **278**: 739-744.

Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* **1378**: F79-113.

Hendriks WJ, Elson A, Harroch S, Stoker AW (2008). Protein tyrosine phosphatases: functional inferences from mouse models and human diseases. *FEBS J* **275**: 816-830.

Herrera Abreu MT, Penton PC, Kwok V, Vachon E, Shalloway D, Vidali L *et al* (2008). Tyrosine phosphatase PTPalpha regulates focal adhesion remodeling through Rac1 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: C931-944.

Honda H, Inazawa J, Nishida J, Yazaki Y, Hirai H (1994). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP. *Blood* **84**: 4186-4194.

Horwitz R, Webb D (2003). Cell migration. *Curr Biol* **13**: R756-759.

Huveneers S, Danen EH (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**: 1059-1069.

Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.

Iuliano R, Trapasso F, Le Pera I, Schepis F, Sama I, Clodomiro A *et al* (2003). An adenovirus carrying the rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the growth of human thyroid carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res* **63**: 882-886.

James MF, Beauchamp RL, Manchanda N, Kazlauskas A, Ramesh V (2004). A NHERF binding site links the betaPDGFR to the cytoskeleton and regulates cell spreading and migration. *Journal of cell science* **117**: 2951-2961.

Jandt E, Denner K, Kovalenko M, Ostman A, Bohmer FD (2003). The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene* **22**: 4175-4185.

Kalamarides M, Niwa-Kawakita M, Leblois H, Abramowski V, Perricaudet M, Janin A *et al* (2002). Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningioma development in the mouse. *Genes Dev* **16**: 1060-1065.

Kappert K, Paulsson J, Sparwel J, Leppanen O, Hellberg C, Ostman A *et al* (2007). Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation. *FASEB J* **21**: 523-534.

Kaufman DL, Heinrich BS, Willett C, Perry A, Finseth F, Sobel RA *et al* (2003). Somatic instability of the NF2 gene in schwannomatosis. *Arch Neurol* **60**: 1317-1320.

Keane MM, Lowrey GA, Ettenberg SA, Dayton MA, Lipkowitz S (1996). The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res* **56**: 4236-4243.

Kellie S, Craggs G, Bird IN, Jones GE (2004). The tyrosine phosphatase DEP-1 induces cytoskeletal rearrangements, aberrant cell-substratum interactions and a reduction in cell proliferation. *J Cell Sci* **117**: 609-618.

Kobayashi K, Kuroda S, Fukata M, Nakamura T, Nagase T, Nomura N *et al* (1998). p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem* **273**: 291-295.

Kovalenko M, Denner K, Sandstrom J, Persson C, Gross S, Jandt E *et al* (2000). Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* **275**: 16219-16226.

Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* **174**: 593-604.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A *et al* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**: 97-109.

Luo L, Shen GQ, Stiffler KA, Wang QK, Pretlow TG, Pretlow TP (2006). Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis* **27**: 1153-1159.

MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* **7**: 591-600.

Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* **361**: 2449-2460.

Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E *et al* (2008). Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol* **67**: 153-171.

Massa A, Barbieri F, Aiello C, Arena S, Pattarozzi A, Pirani P *et al* (2004). The expression of the phosphotyrosine phosphatase DEP-1/PTPeta dictates the responsivity of glioma cells to somatostatin inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem* **279**: 29004-29012.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 56-68.

Ostman A, Yang Q, Tonks NK (1994). Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9680-9684.

Ostman A, Bohmer FD (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* **11**: 258-266.

Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 307-320.

Palka HL, Park M, Tonks NK (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* **278**: 5728-5735.

Pera IL, Iuliano R, Florio T, Susini C, Trapasso F, Santoro M *et al* (2005). The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **24**: 3187-3195.

Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004). Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* **70**: 183-202.

Persson C, Engstrom U, Mowbray SL, Ostman A (2002). Primary sequence determinants responsible for site-selective dephosphorylation of the PDGF beta-receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *FEBS Lett* **517**: 27-31.

Persson C, Savenhed C, Bourdeau A, Tremblay ML, Markova B, Bohmer FD *et al* (2004). Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **24**: 2190-2201.

Peruzzi B, Bottaro DP (2006). Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 3657-3660.

Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology* **148**: 957-970.

Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G (2006). Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* **5**: 1045-1054.

Ronnstrand L, Heldin CH (2001). Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *Int J Cancer* **91**: 757-762.

Ruivenkamp C, Hermsen M, Postma C, Klous A, Baak J, Meijer G *et al* (2003). LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12-21. *Oncogene* **22**: 3472-3474.

Ruivenkamp CA, van Wezel T, Zanon C, Stassen AP, Vlcek C, Csikos T *et al* (2002). Ptprij is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers. *Nat Genet* **31**: 295-300.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem* **385**: 449-464.

Sacco F, Tinti M, Palma A, Ferrari E, Nardoza AP, Hooft van Huijsduijnen R *et al* (2009). Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK1/2 kinases. *J Biol Chem* **284**: 22048-22058.

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 435-478.

Senis YA, Tomlinson MG, Ellison S, Mazharian A, Lim J, Zhao Y *et al* (2009). The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis. *Blood* **113**: 4942-4954.

Shamah SM, Alberta JA, Giannobile WV, Guha A, Kwon YK, Carroll RS *et al* (1997). Detection of activated platelet-derived growth factor receptors in human meningioma. *Cancer Res* **57**: 4141-4147.

Sorby M, Sandstrom J, Ostman A (2001). An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene* **20**: 5219-5224.

Sorkin A, Westermarck B, Heldin CH, Claesson-Welsh L (1991). Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor. *J Cell Biol* **112**: 469-478.

Stamenkovic I, Yu Q (2010). Merlin, a "Magic" Linker between Extracellular Cues and Intracellular Signaling Pathways that Regulate Cell Motility, Proliferation, and Survival. *Curr Protein Pept Sci*.

Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J *et al* (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J* **23**: 749-759.

Stoker AW (2005). Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* **185**: 19-33.

Stradal TE, Scita G (2006). Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 4-10.

- Tabernero L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlacsek SE (2008). Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J* **275**: 867-882.
- Takahashi T, Takahashi K, St John PL, Fleming PA, Tomemori T, Watanabe T *et al* (2003). A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Mol Cell Biol* **23**: 1817-1831.
- Tallquist M, Kazlauskas A (2004). PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 205-213.
- Tarcic G, Boguslavsky SK, Wakim J, Kiuchi T, Liu A, Reinitz F *et al* (2009). An unbiased screen identifies DEP-1 tumor suppressor as a phosphatase controlling EGFR endocytosis. *Curr Biol* **19**: 1788-1798.
- Tonks NK, Neel BG (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 182-195.
- Trapasso F, Iuliano R, Boccia A, Stella A, Visconti R, Bruni P *et al* (2000). Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27(Kip1). *Mol Cell Biol* **20**: 9236-9246.
- Trapasso F, Yendamuri S, Dumon KR, Iuliano R, Cesari R, Feig B *et al* (2004). Restoration of receptor-type protein tyrosine phosphatase eta function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **25**: 2107-2114.
- Trapasso F, Drusco A, Costinean S, Alder H, Aqeilan RI, Iuliano R *et al* (2006). Genetic ablation of Ptpnj, a mouse cancer susceptibility gene, results in normal growth and development and does not predispose to spontaneous tumorigenesis. *DNA Cell Biol* **25**: 376-382.
- Tsuboi N, Utsunomiya T, Roberts RL, Ito H, Takahashi K, Noda M *et al* (2008). The tyrosine phosphatase CD148 interacts with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* **413**: 193-200.
- Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* **118**: 4917-4919.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**: 103-119.
- Yano H, Uchida H, Iwasaki T, Mukai M, Akedo H, Nakamura K *et al* (2000). Paxillin alpha and Crk-associated substrate exert opposing effects on cell migration and contact inhibition of growth through tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9076-9081.
- Zhu JW, Brdicka T, Katsumoto TR, Lin J, Weiss A (2008). Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling. *Immunity* **28**: 183-196.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous polyposis coli
AS	Aminosäure
BSA	Bovine serum albumin
CS-Mutante	Cystein-Serin-Mutante
DA-Mutante	Aspartat-Alanin-Mutante
DEP-1	Density-enhanced phosphatase 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FAK	Fokaladhäsionskinase
FAT	Focal adhesion targeting
FCS	Fetal calf serum
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
LM PTP	Low molecular weight protein tyrosine phosphatase
LOH	Loss of heterozygosity - Heterozygotieverlust
MAPK	Mitogen activated protein kinase
NF2	Neurofibromatosis 2
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline

PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEI	Polyethylenimin
phospho-Y	Phosphotyrosin
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
P-Loop	Phosphatbindungsloop
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
pTyr	Phosphotyrosin
p140 Sra-1	Specifically Rac1-associated protein
RasGAP	Ras GTPase-activating protein
RPTP	rezeptorähnliche Protein-Tyrosinphosphatase
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-activated protein kinase
Scc1	Susceptibility to colon cancer-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFK	Src-Familie-Kinase
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
STAT	Signal transducers and activators of transcription
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
WB	Westernblot
WGA	Wheat germ agglutinin
WHO	World health organization
WT	Wildtyp

6.2 Beiträge von Kollegen im Rahmen des gemeinsamen Projektes

Bild 3-7 (B) Die LOH-Analysen wurden von Dr. Daniela Haase durchgeführt.

Bild 3-8 Die Herstellung der control shRNA- und DEP-1 shRNA-exprimierenden SF3061-Zellen und der Nachweis des DEP-1-Knockdowns in diesen Zellen wurden von Andrea Wetzel durchgeführt.

Bild 3-10 (A) Die Time-Lapse-Mikroskopie-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Haase durchgeführt.

Bild 3-14 Die Migrationsassays mit KT21-Zellen wurden von Dr. Daniela Haase durchgeführt, die Assays mit SF3061-Zellen von Andrea Wetzel.

Bild 3-16 Die Migrationsassays wurden von Dr. Daniela Haase durchgeführt.

Bild 3-17 (A) In die Berechnungen des Mittelwertes der Rezeptoraktivierung wurden Daten von Andrea Wetzel einbezogen.

(B) Die Signaltransduktionsanalysen wurden von Andrea Wetzel durchgeführt.

Bild 3-18 Die Signaltransduktionsanalysen wurden von Andrea Wetzel durchgeführt.

Bild 3-19 Die Koloniebildungsassays wurden von Dr. Daniela Haase durchgeführt.

Die Daten wurden mit Zustimmung von Dr. Daniela Haase und Andrea Wetzel gezeigt.

6.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Frank Böhmer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen, der mich hervorragend betreut hat und mir durch seinen immerwährenden Optimismus auch bei experimentellen Misserfolgen immer wieder Mut gemacht hat.

Prof. Dr. Christian Mawrin, Dr. Daniela Haase und Andrea Wetzel danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen des Meningeomprojektes.

Bei Prof. Dr. Arne Östman, Dr. Martin Augsten und Åsa Sandin (Karolinska Institut, Stockholm) möchte ich mich herzlich für die Kooperation im Rahmen der Kolonkarzinom-Xenotransplantationsversuche bedanken sowie für die hervorragende Betreuung und die tolle Zeit in ihrem Labor.

Dr. Karl-Heinz-Gührs (FLI, Jena) danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Meinen Thesis-Committee-Mitgliedern Prof. Dr. Regine Heller (CMB, Jena) und Dr. Christoph Kaether (FLI, Jena) danke ich für die Begleitung meines Projektes durch fachliche Diskussionen.

Dem BMBF und der DFG (SFB604) danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Bei den Mitgliedern des Instituts für Molekulare Zellbiologie möchte ich mich ganz herzlich für die familiäre Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Antje, Deepika, Rinesh, Christian, Volker und Susi – Vielen Dank für Eure Hilfe und Unterstützung, aufmunternden Worte, lustige Kaffeepausen, viel Spaß bei allerlei Aktivitäten innerhalb und außerhalb des Labors und die vielen kulinarischen Leckereien.

Andrea U., Annette, Lucho und Jörg – Ich danke Euch für Eure herzliche Art und für die experimentellen Hilfestellungen.

Gabriele, Jana und Andrea W. – Vielen Dank für die sehr gute und nette Zusammenarbeit.

Dorith, Manu, den fleißigen TAs und Heidi danke ich für die Organisation rund um das Experimentieren.

Bei Antje und Andrea U. möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt haben.

6.4 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

Jena, den 17.08.2010

Astrid Petermann

6.5 Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher, noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, den 17.08.2010

Astrid Petermann

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Petermann
Geburtsdatum: 8. November 1982
Geburtsort: Weimar
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Hochschulausbildung

seit 12/2006 Promotion am Institut für Molekulare Zellbiologie,
Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB) am
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

10/2001 bis 11/2006 Studium der Biochemie/Molekularbiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Schwerpunkt: Molekulare Medizin
Abschluss: Diplom

Schulbildung

09/1993 bis 06/2001 Friedrich-Schiller-Gymnasium Weimar
Abschluss: Abitur

Publikationen

Petermann A, Haase D, Wetzel A, Balavenkatraman KK, Tenev T, Gührs KH, Friedrich S, Nakamura M, Mawrin C, Böhmer FD

Loss of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ drives meningioma cell motility.

eingereicht bei Brain Pathology (in Revision)

Petermann A, Miene C, Schulz-Raffelt G, Palige K, Hölzer J, Gleis M, Böhmer FD.

GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage.

Mol Nutr Food Res. 2009 Oct;53(10):1245-53.

Gerhäuser C, Klimo K, Hümmer W, Hölzer J, **Petermann A**, Garreta-Rufas A, Böhmer FD, Schreier P.

Identification of 3-hydroxy-beta-damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity.

Mol Nutr Food Res. 2009 Oct;53(10):1237-44.

Karagyozov L, Godfrey R, Böhmer SA, **Petermann A**, Hölter S, Ostman A, Böhmer FD.

The structure of the 5'-end of the protein-tyrosine phosphatase PTPRJ mRNA reveals a novel mechanism for translation attenuation.

Nucleic Acids Res. 2008 Aug;36(13):4443-53.

Vorträge

The protein-tyrosine phosphatase DEP-1/ PTPRJ is a negative regulator of meningioma cell motility

Tyrosine Kinase Signaling Meeting 2010

Uppsala, Schweden; 26.-27. Mai 2010

Posterpräsentationen

The protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is a negative regulator of meningioma cell motility

2nd Postgraduate Symposium on Cancer Research

Dornburg; 24. April 2010

DEP-1/PTPRJ regulates adhesion signaling in epithelial and arachnoidal cells

Europhosphatases 2009 - Protein phosphatases in development and disease; EMBO conference series, second in a series

Egmond aan Zee, Niederlande; 14.-18. Juli 2009

Functional characterization of protein tyrosine phosphatase DEP-1 in colon epithelial cells

EMBO Meeting on Cellular Signaling & Molecular Medicine

Cavtat/Dubrovnik, Kroatien; 29. Mai - 4. Juni 2008