

Aus der I. Medizinischen Klinik  
Zentrum für Innere Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Rolle der fokalen Adhäsionskinasen in der Signaltransduktion in  
malignen Leberzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

**Alev Tulun**  
aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

## **Meiner Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>5</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>6</b>
3.1 MATERIALIEN .....	6
3.1.1 <i>Zellkultur</i> .....	6
3.1.2 <i>Puffer</i> .....	6
3.1.3 <i>Wachstumsfaktoren</i> .....	7
3.1.4 <i>Src-Inhibitoren</i> .....	7
3.1.5 <i>Antikörper</i> .....	8
3.1.6 <i>Chemikalien</i> .....	9
3.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	10
3.1.8 <i>Geräte</i> .....	11
3.2 METHODEN.....	12
3.2.1 <i>Zellkulturarbeiten</i> .....	12
3.2.1.1 Auftauen der Zellen .....	12
3.2.1.2 Passagieren der Zellen.....	12
3.2.1.3 Zellaussaat für die Stimulationsversuche .....	13
3.2.1.4 Zellstimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren .....	13
3.2.1.5 Präinkubation der Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2 und dem inaktiven Analogon PP3 .....	14
3.2.2 <i>Methoden zur Proteinanalyse</i> .....	15
3.2.2.1 Lysieren von Zellen zur Proteinextraktion .....	15
3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA.....	15
3.2.2.3 Immunpräzipitation mit dem monoklonalen FAK- und PYK2- Antikörper.....	16
3.2.2.4 Immunpräzipitation mit dem Antiphosphotyrosin-Antikörper (PY20)...	17
3.2.2.5 SDS-PAGE .....	17
3.2.2.6 Western Blot.....	18
3.2.2.7 Immunnachweis von Proteinen .....	19
3.2.2.8 Strippen der Membran .....	20
3.2.2.9 Densitometrische Auswertung und Statistik .....	21

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>22</b>
4.1	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DER BEIDEN PROTEINTYROSINKINASEN FAK UND PYK2 IN HEPG2-ZELLEN .....	22
4.2	NACHWEIS DER FAK-AKTIVIERUNG DURCH HGF UND IGF.....	23
4.2.1	<i>Konzentrationsabhängige Veränderung der FAK-Tyrosinphosphory- lierung</i> .....	23
4.2.2	<i>Zeitabhängige Veränderung der FAK-Tyrosinphosphorylierung</i> .....	25
4.3	UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT DER AUTOPHOSPHORYLIERUNGSSTELLE 397 VOR UND NACH STIMULATION DER HEPG2-ZELLEN MIT HGF UND IGF-I .....	28
4.4	EINFLUSS DES SRC-INHIBITOREN PP2 AUF DIE FAK-AKTIVITÄT IN HEPG2- ZELLEN.....	30
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchonininsäure (bicinchoninic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CCK <sub>A</sub> -Rezeptor	Cholezystokinin <sub>A</sub> -Rezeptor
Cu <sup>+1</sup>	Kupferionen
D-MEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence detection
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis- (2-Aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase (focal adhesion kinase)
FAT	focal adhesion targeting sequence
FBS	fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FRNK	FAK-related Non-Kinase
g	Gramm
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
Grb7	Growth factor receptor binding protein 7
h	Stunde
H + L	Heavy + Light (beide Ketten des IgG)
HCC	Hepatocellular carcinoma
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IGF-IR	Insulin-like growth factor-I receptor
ILK	integrin linked kinase
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
kDa	Kilodalton
LPA	lysophosphatidic acid
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mFAK-Ab	monoklonaler FAK-Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
nM	Nanomolar
PBS	Phosphatpuffer (phosphat-buffered saline)
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC-γ	Phospholipase Cγ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine

PP3	4-Amino-7-phenylpyrazolo[3,4-d]pyrimidine
pY	Phosphotyrosin
PYK2	Prolinreiche Tyrosinkinase 2 (proline-rich tyrosine kinase 2)
Raf	Ras-activated-factor
Ras	Ratten-Sarkom-Virus
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SH-Domäne	Src-homologe Domäne
Sos	Son of Sevenless (Ausdruck aus der Drosophila Genetik)
TEMED	NNN`N`-Tetramethylethylendiamine
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Tyrosin
TyrP	Tyrosinphosphorylierung
U / min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 1 Einleitung

Der häufigste maligne Lebertumor ist das hepatozelluläre Karzinom (Hepatocellular Carcinoma, HCC), das sich klinisch mit rascher Progredienz und einer limitierten therapeutischen Möglichkeit manifestiert. Weltweit ist das HCC die fünfthäufigste Tumorentität und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache (Parkin, 2001). Epidemiologischen Untersuchungen zufolge besteht die höchste Inzidenz des HCC in Zentralafrika und Südostasien, während in Mittel- und Nordeuropa sowie in Nordamerika seine Inzidenz vergleichsweise gering ist (Pisani et al., 1993).

Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms sind insbesondere virale Hepatiden (Hepatitis B, Hepatitis C). Die chronische Hepatitis B mit HBs-Antigenpersistenz ist mit über 200-fach erhöhtem Risiko, ein HCC zu entwickeln, verbunden (Beasley et al., 1981). Untersuchungen zur chronischen Hepatitis C-Infektion weisen auf ein noch höheres HCC-Risiko hin (Deuffic et al., 1999). Weitere Risikofaktoren sind die Hämochromatose, Aflatoxinexposition sowie die Leberzirrhose, die unabhängig von der Ätiologie von einigen Autoren als Präkanzerose angesehen wird (Fattovich, 2004). Patienten mit einem HCC haben eine äußerst schlechte Prognose, was vor allem dem besonders ausgeprägten angioinvasiven Potential des Tumors und dem Fehlen von kurativen Therapiemöglichkeiten zuzuschreiben ist. Wenn der Tumor nicht chirurgisch radikal entfernt werden kann, ist die Prognose sehr schlecht. Der Tumor ist nahezu resistent gegenüber bisher eingesetzten Chemo- oder Strahlentherapien (Okada, 1998).

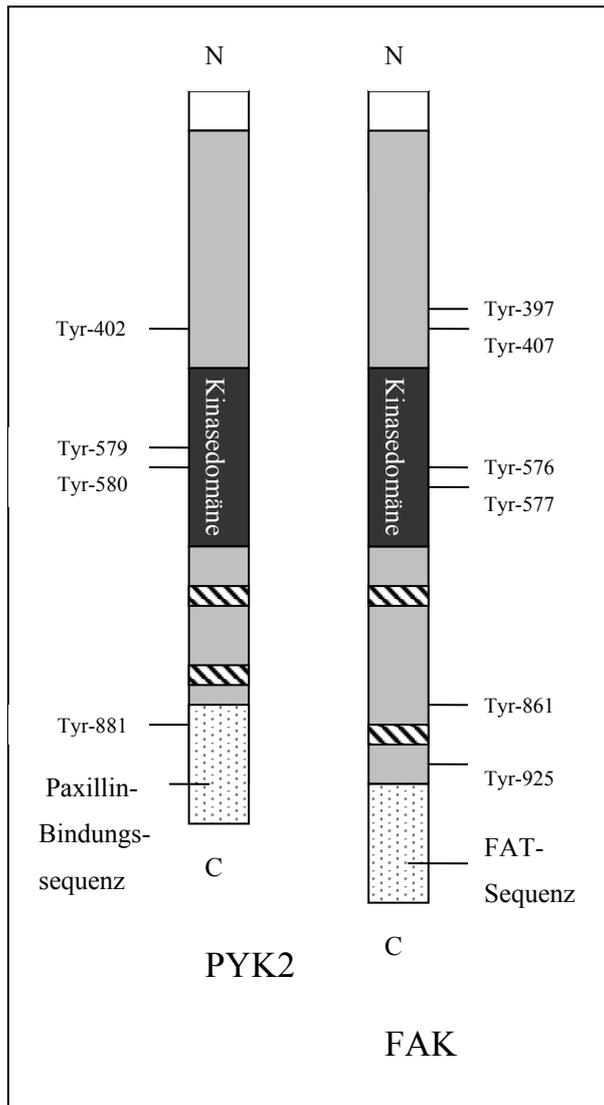
Die molekulare Pathogenese des HCC ist bisher nicht vollständig geklärt. Neben der Aktivierung von Onkogenen (Liu et al., 1997; D'Errico et al., 1996) und der Veränderung von Tumorsuppressorgenen (Puisieux und Ozturk, 1997) gibt es Hinweise dafür, dass eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren bei der Entstehung des HCC eine wichtige Rolle spielt. So wurde in einer Reihe von verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass sowohl der IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) als auch der HGF-Rezeptor (Met), ein Produkt des Proto-Onkogens *c-met* (Furge et al., 2000), im HCC überexprimiert werden (Ljubimova et al., 1997; Lee et al., 1998; Nakanishi et al., 1999; Tavian et al., 2000; Alexia et al., 2004). Die Überexpression von Met korreliert mit einer vermehrten Metastasierungstendenz der Tumorzellen (Xie et al., 2001, Luo et al., 1999). Durch eine Hemmung des IGF-IR in vivo konnte das Wachstum verschiedener HCC-Zelllinien inhibiert werden (Ellouk-Achard et al., 1998; Hopfner et al., 2006). Met und IGF-IR gehören zur großen Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Die Ligandenbindung an diese Rezeptoren induziert die Aktivie-

rung bzw. Tyrosinphosphorylierung zytoplasmatischer Proteine, die extrazelluläre Signale in die Zelle bis hin zum Zellkern weiterleiten. Für die beiden zytoplasmatischen Tyrosinkinasen FAK und PYK2 konnte nachgewiesen werden, dass sie an der Signaltransduktion des Met und IGF-IR beteiligt sind (Maulik et al., 2002; Sekimoto et al., 2005). Welche Bedeutung die beiden Proteintyrosinkinasen in der Pathogenese des HCC haben, ist jedoch unklar.

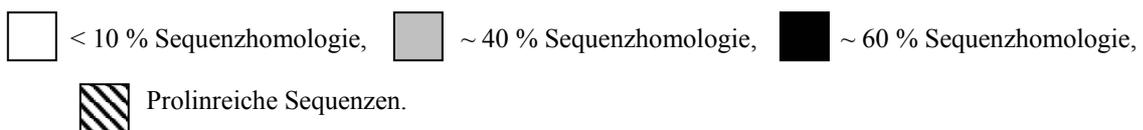
FAK und PYK2 gehören zur Gruppe der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, die beim Weiterleiten der Signale aus dem Extrazellulärraum ins Zellinnere eine wichtige Rolle spielen (Avraham et al., 2000). Sie weisen bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und Strukturbauelemente viele Gemeinsamkeiten auf. Eine zentrale katalytische Domäne wird von einer großen C- und N-terminalen nicht-katalytischen Region flankiert (Schlaepfer et al., 1999; siehe Abb. 1). Im Unterschied zu den anderen Proteintyrosinkinasen fehlen FAK und PYK2 die SH2- und SH3-Domäne (SH = Src-homolog, da diese Domänen ursprünglich im Src-Protein gefunden wurden). Durch ihre prolinreichen Sequenzen im C-Terminus aber haben sie die Fähigkeit, die SH3-Domänen anderer Signalproteine wie p130<sup>Cas</sup> oder Grb zu binden (Polte et al., 1997; Astier et al., 1997a; Astier et al., 1997b; Hildebrand et al., 1996; Ohba et al., 1998). Über phosphorylierte Tyrosinreste binden sie selektiv SH2-Domänen anderer Signalproteine wie z. B. Src-Kinasen (Pawson, 1994; Schaller et al., 1994).

Die Tyrosinkinase FAK besitzt sechs verschiedene Tyrosinstellen mit unterschiedlichen Funktionen: 2 im N-Terminus (Tyr-397, Tyr-407), 2 innerhalb der Kinasedomäne (Tyr-576, Tyr-577) und 2 im C-Terminus (Tyr-861, Tyr-925) (Calalb et al., 1995; Calalb et al., 1996; Schlaepfer et al., 1997; Schwartz et al., 1995; Parsons, 2003).

Der Tyrosinrest 397 wurde als Autophosphorylierungsstelle der FAK identifiziert, die im phosphorylierten Zustand an die SH2-Domäne der Src-Kinasen (Schaller, 1994), PI3-Kinase (Chen et al., 1996), Phospholipase-C- $\gamma$  (Zhang et al., 1999) und Grb7 (Reiske et al., 1999; Han et al., 1999) bindet. Die beiden Tyrosinreste 576 und 577 im Bereich der Kinasedomäne ermöglichen im phosphorylierten Zustand erst die vollständige Kinaseaktivität von FAK (Calalb et al., 1995; Owen et al., 1999; Ruest et al., 2000). Durch die Phosphorylierung des Tyrosins 925 entsteht eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2. Dieses koppelt FAK über das GDP-GTP-Austauschprotein Sos an den MAPK-Signalweg (Schlaepfer et al., 1994). Die Rolle der beiden Tyrosinstellen 407 und 861 ist derzeit noch unklar.



**Abbildung 1: Struktur von FAK und PYK2 (Schlaepfer et al., 1999)**



Vier der oben genannten Tyrosinreste (Tyr-397, Tyr-576, Tyr-577, Tyr-861) sind in der zu FAK strukturhomologen Kinase PYK2 konserviert (Tyr-402, Tyr-579, Tyr-580, Tyr-881). Es konnte gezeigt werden, dass sie die gleiche Funktion wie die korrespondierenden Tyrosinstellen der FAK erfüllen (Schlaepfer et al., 1999; Avraham et al., 2001). Die C-terminale FAT-Sequenz der FAK bindet an Paxillin und Talin und ermöglicht so die Lokalisation an Fokalkontakten (Schlaepfer et al., 1999). Fokalkontakte sind membranassoziierte komplexe Formationen, die eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix herstellen. Obwohl PYK2 C-terminal Konsensussequenzen für

die Paxillinbindung enthält, wurde sowohl endogen als auch exogen exprimiertes PYK2 nur schwach in Fokalkontakten nachgewiesen (Li und Earp., 1997; Sasaki et al., 1995).

FAK und PYK2 können durch eine Reihe verschiedener Stimuli aus dem Extrazellulär-  
raum aktiviert werden: nach EZM-Zellkontakten via Integrine (Zheng et al., 1998; Lipfert  
et al., 1992; Li et al., 1996; Astier et al., 1997b), über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren  
(Pace et al., 2003; Tang et al., 2000; Tapia et al., 1999; Lee und Villeral., 1996), durch  
Wachstumsfaktoren (Rankin und Rozengurt, 1994; Abedi und Zachary, 1997; Brinson et  
al., 1998), regulatorische Peptide (Zachary et al., 1992; Wu et al., 2002; Sorokin et al.,  
2001; Dikic et al., 1996) und mechanische Faktoren (Wang et al., 2001).

Als erste Reaktion auf eine Stimulation erfolgt bei beiden Kinasen eine Autophosphorylie-  
rung, und zwar an der FAK-Tyrosinstelle 397 und dem PYK2-Tyrosinrest 402. Hierdurch  
entsteht eine Bindungsstelle für die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, der größten  
Familie der zytoplasmatischen Tyrosinkinase der Säugertiere. Die Src-Kinasen wiederum  
phosphorylieren weitere Tyrosinstellen der FAK und PYK2 und ermöglichen dadurch die  
vollständige Aktivierung der beiden Tyrosinkinase.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit gibt es einige Unterschiede in der Funktion der beiden  
Proteintyrosinkinase. So führt z.B. eine Zunahme der FAK-Expression in Fibroblasten zu  
einer Steigerung der DNA-Synthese, die Überexpression einer inaktiven FAK-Mutante  
dagegen zu einer Hemmung des Zellzyklus (Zhao et al., 1998; Oktay et al., 1999). Es  
konnte gezeigt werden, dass FAK vermittelt über verschiedene Signaltransduktionswege  
eine anti-apoptotische Wirkung auf die Zellen hat (Hungerford et al., 1996; Frisch et al.,  
1996; Ilic et al., 1998; Almeida et al., 2000; Sonoda et al., 2000). Im Unterschied dazu  
führt eine PYK2-Überexpression zu einem vermehrten Zelluntergang durch Apoptose (Xi-  
ong und Parsons, 1997; Chauhan et al., 1999; Pandey et al., 1999a, 1999b; Susa, 1999). In  
einer Reihe von verschiedenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass neben der Zellpro-  
liferation auch die Zellmigration durch eine gesteigerte FAK-Expression gefördert wird.  
Durch die Überexpression einer nicht-katalytisch wirkenden fokalen Adhäsionskinase (F  
AK-relatededennon-Kinase, FRNK) wird sie gehemmt (Cary et al., 1996; Gilmore und Romer,  
1996; Sieg et al., 1999; Owen et al., 1999). Bei der FRNK handelt es sich um eine Splice-  
Variante von FAK, die als ein endogener, negativer Regulator agieren kann (Richardson  
und Parson, 1996). Die Pyk2-Expression dagegen ist in FAK-defizienten Zellen, die eine  
verringerte Motilität aufweisen, gesteigert (Sieg et al., 1998).

## 2 Ziel der Arbeit

Es ist in mehreren Studien gezeigt worden, dass eine erhöhte FAK-Expression auch in Tumorzellen vorkommt (Weiner et al., 1993; Owens et al., 1995; Watermann et al, 2005). Die FAK-Überexpression geht dabei mit einer gesteigerten Zellmotilität und Invasivität einher (Owens et al., 1995; Slack et al., 2001; Wang et al., 2000; Cance et al, 2000). Im Gegensatz zu FAK ist die Expression der Tyrosinkinase PYK2 im maligne entarteten Gewebe und in metastasierenden Tumorzellen herunterreguliert (Stanzione et al., 2000; Lipinski et al., 2003; Forest et al., 2005)

Über die Funktion der beiden Proteintyrosinkinasen im HCC ist zurzeit noch wenig bekannt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, die Expression und die intrazelluläre Aktivierung der FAK und PYK2 in einer hepatischen Tumorzelllinie zu untersuchen, und zwar mit der Fragestellung, ob FAK in diesen Zellen ähnlich in anderen malignen Geweben eine übergeordnete Rolle spielt. Als ein Modellsystem des HCC wurde die HepG2-Zelllinie ausgewählt. Hierbei handelt es sich um eine gut differenzierte Hepatoblastomzelllinie, die 1975 etabliert wurde, und die in vielen Charakteristika dem klinischen HCC ähnlich ist (Aden et al., 1979; Darlington et al, 1987). Die intrazelluläre Aktivierung und die Regulation der beiden Tyrosinkinasen FAK und PYK2 sollte nach Stimulation der Zellen mit HGF und IGF-I, die beide eine bedeutende Funktion in der Hepatokarzinogenese haben, untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Zellkultur

###### HepG2:

humane Hepatoblastomzelllinie (ATCC: HB-8065, Cell line services), 1975 etabliert (Aden et al, 1979), epithelartige Zellen, adhärenent als Monolayer wachsend.

###### Nährmedium:

Die HepG2-Zellen wurden im D-MEM (500 ml, Glukosegehalt von 4500 mg / l) kultiviert. Dieses Medium wurde mit folgenden Zusätzen supplementiert:

- +10 % FBS
- +2 % Natriumbikarbonat (1,5 g/l)
- +1 % Natriumpyruvat (1 mM)
- +1 % L-Glutamin (2 mM)
- +1 % Non-Essential Amino Acide
- +1 % Penicillin / Streptomycin

###### M0-Medium:

12-16h vor dem geplanten Stimulationsversuch wurden die in Petrischalen ausgesetzten Zellen mit Nährmedium ohne Zusatz von FBS inkubiert, um eine Synchronisation der Zellteilung zu erreichen. Dieses Medium wurde als M0 bezeichnet.

##### 3.1.2 Puffer

###### Blockpuffer:

- 50 mM Trisbase (pH 8,0), CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 80 mM, 0,5 % Tween 20, 5 % Magermilch

###### Laufpuffer:

- 25 mM Trisbase (pH 8,3), 192 mM Glycin, 1 % SDS

###### Ladepuffer:

- 0,2 M Trisbase (pH 6,8), 0,2 M DTT, 4 % SDS, 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenol, 5 % Mercaptoethanol

Lysis Puffer:

- 50 mM Trisbase (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Deoxicholate, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 2,5 µM Aprotinin, 2,5 µM Leupeptin, 1 mM PMSF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

Sammelgelpuffer:

- 0,5 M Trisbase pH 6,8

Stripping-Puffer:

- 100 mM Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Trisbase (pH 6,7), ad Aqua dest.

Transferpuffer:

- 48 mM Trisbase (pH 9,2), 1,3 mM SDS, 20 % Methanol, 1,6 g Glycin

Trenngelpuffer:

- 1,5 M Trisbase pH 8,8

Waschpuffer:

- 50 mM Tris (pH 8,0), CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 80 mM, 0,5 % Tween 20

Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels:

	<b>10 %-iges Trenngel</b>	<b>4,5 %-iges Sammelgel</b>
<b>10 % Acrylamid</b>	3,75 ml	0,5 ml
<b>Puffer</b>	3,75 ml Trenngelpuffer	1,25 ml Sammelgelpuffer
<b>Aqua dest.</b>	7,19 ml	3,2 ml
<b>10 % SDS</b>	150 µl	50 µl
<b>10 % APS</b>	150 µl	50 µl
<b>TEMED</b>	7,5 µl	10 µl

**Tabelle 1**

### 3.1.3 Wachstumsfaktoren

IGF-I, Recombinant Human Insulin Like Growth Factor-I, Cat. No. 100-11, Peprotech

HGF, Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor, Cat. No. 100-39, Peprotech

### 3.1.4 Src-Inhibitoren

PP2, Cat. No. 529573, Calbiochem

PP3, Cat. No.529574, Calbiochem

### 3.1.5 Antikörper

#### Primärantikörper:

	Spezies	Verwendung (Konzentration)	Firma (Bestellnummer)
Anti-FAK monoklonaler Antikörper (250 µg / ml)	Maus	WB (0,25 µg / ml) IP (3 µg / µl)	BD Transduction Laboratories (610088)
Anti-PYK2 monoklonaler Antikörper (250 µg / ml)	Maus	WB (0,5 µg / ml ) IP (3 µg / µl)	BD Transduction Laboratories 61059
Antiphosphotyrosin-PY20 Antikörper (1 mg / ml)	Maus	WB (1 µg / ml) IP (4 µg / µl)	BD Biosciences (610000)
Anti-FAK polyklonaler Antikörper pY397 (0,5 mg / ml)	Kaninchen	WB (1 µg / ml)	Biosource ( 44-624G)
Anti-PYK2 polyklonaler Antikörper pY402 (0,52 mg / ml)	Kaninchen	WB (1 µg / ml)	Biosource (44-618G)

**Tabelle 2**

#### Sekundärantikörper:

- Goat anti-mouse IgG (H+L), Horseradish Peroxidase conjugated antibody, Verdünnung für Western Blot 1: 6000, Pierce (No. 31432)
- Goat anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase conjugated antibody, Verdünnung für Western Blot 1: 10000, Santa Cruz Biotechnology

### 3.1.6 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co.
40 % Acrylamid	Bio-Rad
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
APS	Bio-Rad
BCA-Proteinassay Reagent A and B	Pierce
Bromphenolblau	Merck
BSA	Pierce
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Merck
Deoxicholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
D-MEM	Gibco
DMSO	Aldrich
DTT	Sigma Chemical Co.
ECL-Reagent	Amersham Biosciences
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EGTA	Merck
Ethanol	J.T. Baker
FBS	Gibco
Glycerol	Merck
Glycin	Carl Roth GmbH
HCL (Salzsäure)	Merck
Isopropanol 80 %	Merck
Ladder	Invitrogen
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	Gibco
Magermilchpulver	Heirler
Methanol	J.T. Baker
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumbicarbonat)	Gibco
NaCl (Natriumchlorid)	J.T. Baker
NaN <sub>3</sub> (Natriumacide)	Merck
NaOH (Natronlauge)	Merck
NaPyruvat (Natrium-Pyruvat)	Gibco

Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Natrium-Orthovanadate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Non-Essential Amino Acide	Gibco
PBS	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
PMSF	Sigma Chemical Co.
Protein G („Beads“)	Pierce
SDS	Bio-Rad
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton X-100	Merck
Trypanblaulösung 0,5 %	Serva
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween	Sigma Chemical Co.

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

#### Materialien

Cell-Scraper  
 Einmalspritzen, Injekt 5ml  
 Falcon Zentrifugenröhrchen 15ml / 50ml  
 Gel- Blotting Papier GB002  
 Kanülen, 100 Sterican, 0,9 x 40mmØ  
 Petrischalen, Tissue Culture Dish,  
 60 x 15mmØ /100 x 20mmØ  
 Pipetten 5ml / 10ml/ 25ml, steril  
 Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane  
 Röntgenfilm, Hyperfilm™ ECL, 18 x 24 cm  
 Zellkulturflaschen, Tissue Culture Flask 175 cm<sup>2</sup>  
 Tissue Culture Plate 96-well

#### Hersteller

Nunc, USA  
 Braun, Melsungen  
 Becton Dickinson, New York  
 Schleicher & Schuell, Dassel  
 Braun, Melsungen  
 Sarstedt, Newton, USA  
 Becton Dickinson, New York  
 Schleicher & Schuell, Dassel  
 Amersham Biosciences,  
 Buckinghamshire, UK  
 Sarstedt, Newton, USA  
 Sarstedt, Newton, USA

### 3.1.8 Geräte

#### Geräte

Absauggerät, Miniport  
 Blottingkammer  
 EL 808 Ultra Microplate Reader  
 Feinwaage  
 Filmcassette 18 x 24cm  
 Gelelektrophorese für Minigele  
 (Mini- Protean II Electrophoresis Cell)  
 Heizblock, Dri- Block DB- 3D  
 Inkubator  
 Kühlzentrifuge  
 Magnetrührer und Heizplatte  
 Microprocessor pH-Meter 537  
  
 Mikroskop  
 Multi-Shaker- Rotator RS-24  
 Pipettierhilfe, pipetus classic  
 Pipettierhilfe, pipetman  
 Powersupply Power Pac 300  
 Präzisionspipetten (Dispenser)  
 Schüttler KL  
 Vortexer VF2  
 Wasserbad  
 Werkbank(„Hood“)  
 Zentrifuge, Minifuge RF  
 Zentrifuge, Biofuge 13

#### Hersteller

Servox Medizintechnik GmbH  
 Biometra  
 Bio-Tek. Instruments  
 Kern 822  
 Rego  
  
 Bio-Rad  
 Techne  
 Heraeus Instruments  
 Sigma 3K30  
 Sigma  
 Wissenschaftliche-Technische  
 Werkstätten GmbH  
 Wilovert und Wetzler  
 peQlab Biotechnologie GmbH  
 Hirschmann  
 Gilson  
 Bio-Rad  
 Eppendorf  
 E. Bühler  
 Jahnke und Kunkel IKA  
 GFL  
 Heraeus  
 Heraeus  
 Heraeus Sepatech

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturarbeiten**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank („Hood“) durchgeführt. Die Medien und die Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

#### **3.2.1.1 Auftauen der Zellen**

Die HepG2-Zellen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Für die Kultivierung der Zellen wurde ein Röhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Rasches Auftauen der Zellen ist nötig, um die Schädigung der Zellen durch den im aufgetauten Zustand toxischen DMSO-Anteil zu minimieren. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein mit 30 ml Nährmedium gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und anschließend für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 15 ml Nährmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in eine 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt.

#### **3.2.1.2 Passagieren der Zellen**

Vor jedem Mediumwechsel wurden die Flaschen im Lichtmikroskop betrachtet, um Wachstum und Form der Zellen zu beurteilen. Sobald der Zellrasen eine Konfluenz von 70-80% erreicht hat, passagiert man die Zellen, da ein zu dichter Zellrasen eine Wachstumsinhibition zur Folge hat. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe der Protease Trypsin voneinander und vom Boden der Flasche abgelöst. Durch die Aufnahme der Zellsuspension in Nährmedium wurde die zytotoxische Wirkung von Trypsin gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde dann in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes und der Resuspension des Zellpellets in 3 ml Nährmedium wurden jeweils 1,5 ml dieser Suspension mit 25 ml Medium verdünnt und in eine 175 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden anschließend für 3 Tage im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gewechselt wurde.

### **3.2.1.3 Zellaussaat für die Stimulationsversuche**

Um die jeweilige Proteinmenge bei jedem Versuch konstant zu halten, war es notwendig, die Zellen in einer bestimmten Anzahl in Petrischalen auszuplattieren.

Für das Ausplattieren der Zellen wurde eine Zellkulturflasche ausgewählt, die subkonfluent bis konfluent bewachsen war. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, trypsiniert (siehe 3.2.1.2) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden 10 µl Zellsuspension 1:2 mit Trypanblaulösung verdünnt. Lebende Zellen nehmen wegen ihrer intakten Membran den Farbstoff nicht auf, während abgestorbene Zellen sich anfärben lassen und deshalb unter dem Mikroskop blau erscheinen. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde dann die Zellzahl in der Zellsuspension ermittelt. Hierzu hat man alle vitalen Zellen in den vier großen Quadranten der Zählkammer gezählt und den Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor (1:2 Verdünnung mit Trypanblau) und mit  $10^4$  (Volumen über einem großen Quadrat) multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Auf kleine Petrischalen wurden 600000 Zellen/cm<sup>2</sup> und auf große Petrischalen 1200000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, die anschließend mit Nährmedium versetzt und im Brutschrank inkubiert wurden.

### **3.2.1.4 Zellstimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren**

Es wurde zunächst eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, um zu untersuchen, bei welcher Konzentration des jeweiligen Wachstumsfaktors eine optimale Aktivierung der FAK stattfindet.

#### Dosis-Wirkungskurve für HGF und IGF-I

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden die Zellen auf Petrischalen ausplattiert und für vier bis fünf Tage im Brutschrank kultiviert. Sobald die Zellen eine gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurde das Nährmedium abgesaugt und M0-Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann für 12-16 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium M0 abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit der Zellstimulation begonnen. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe für HGF und IGF-I mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: HGF 1; 0,1; 0,01 und 0,001 nM, für IGF-I 100; 10; 1 und 0,1 nM. Die Verdünnung auf die entsprechende Konzentration erfolgte jeweils

mit 5 ml M0 Medium. Die Zellen wurden mit HGF und IGF-I in der jeweiligen Konzentration bei Raumtemperatur für die Zeitdauer von 30 s bis eine Minute bei Raumtemperatur stimuliert. Dabei wurde jeweils eine Petrischale einem bestimmten Wachstumsfaktor und einer bestimmten Konzentration zugeordnet. Gleichzeitig wurden zwei unstimulierte Proben mitgeführt. Anschließend wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, um die Aktivierung zu stoppen. Sofort nach dem Waschvorgang wurden die Schalen auf Eis gestellt und mit der Zell-Lyse begonnen (siehe 3.2.2.1).

#### Zeit-Wirkungskurve für HGF und IGF-I

Mit diesem Versuch soll der zeitliche Verlauf der FAK-Aktivierung in HepG2-Zellen untersucht werden.

Die HepG2-Zellen wurden zunächst in Petrischalen ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Nach vier bis fünf Tagen wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen für 12-16 h mit Medium M0 inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das M0-Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es war aus Voruntersuchungen mit einem anderen Zellsystem und Stimulationsfaktor bekannt, dass FAK nach einer kurzen Inkubationsdauer maximal aktiviert wird. Für die Versuche wurden daher die vier folgenden Zeiten festgelegt: 0,5; 1; 2,5 und 5 Minuten. Für jede dieser Zeitintervalle wurde jeweils eine Schale mit HGF (0,1 nM) und eine Schale mit IGF-I (10 nM) bei Raumtemperatur inkubiert. Zwei Schalen wurden als unstimulierte Kontrolle verwendet. Nach 0,5; 1; 2,5 und 5 Minuten wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal eiskaltem PBS gewaschen und die Schalen zur Durchführung der Zell-Lyse (siehe 3.2.2.1) auf Eis gestellt.

#### **3.2.1.5 Präinkubation der Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2 und dem inaktiven Analogon PP3**

Dieser Versuch dient dazu, die Aktivierung der FAK in Abhängigkeit von der Aktivität der Src-Kinase zu untersuchen.

Hierzu wurden die Zellen in Petrischalen ausgesät und nach vier bis fünf Tagen Kultur über Nacht mit M0-Medium inkubiert. Es wurden jeweils zwei Petrischalen für einen Versuch mit dem Src-Inhibitor PP2 und zwei Schalen für einen Versuch mit dem inaktiven Analogon PP3 eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit PP2 und PP3 wurde für eine

Stunde unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde die Stammlösung von PP2 und PP3 jeweils 1:1000 mit 5 ml M0-Medium verdünnt, um eine Endkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Die Reaktion wurde durch das Absaugen des Stimulationsmediums und durch einen Waschvorgang mit PBS gestoppt. Die Zellen wurden anschließend mit den beiden Wachstumsfaktoren HGF und IGF-I stimuliert (siehe 3.2.1.4).

### **3.2.2 Methoden zur Proteinanalyse**

#### **3.2.2.1 Lysieren von Zellen zur Proteinextraktion**

Im Anschluß an die Stimulationsversuche wurde eine Zell-Lyse durchgeführt, um die Proteine aus den Zellen zu extrahieren.

Hierzu wurden die Zellen auf jeweils einer Schale in 300-500  $\mu\text{l}$  Lysis Puffer resuspendiert. Die Zell-Puffer Suspension wurde dann in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen abpipettiert und bei + 4 °C für 30 Minuten auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen bei + 4 °C für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation kam es zu einer Zweiphasenbildung, wobei der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt wurde. In diesem Zell-Lysat kann nun die Proteinkonzentration mittels BCA-Proteinassay ermittelt werden.

#### **3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA**

Der BCA-Proteinassay kombiniert die Biuret-Reaktion, die Reduktion von zweiwertigen zum einfachen Kupferionen durch Protein unter alkalischem pH, mit der Fähigkeit von Bicinchonininsäure (bicinchoninic acid, BCA), mit  $\text{Cu}^{+1}$ -Ionen einen stabilen Farbkomplex zu bilden, der kolorimetrisch bei 562 nm detektiert werden kann.

Der Proteinassay wurde in 96-Lochplatten durchgeführt. Zunächst wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA) als Standard mit fünf Konzentrationen zwischen 500  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  und 2500  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  nach folgendem Pipettierschema angesetzt (siehe Tabelle 3):

<b>BSA 2 mg/ml (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Aqua dest. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Eichreihe (<math>\mu</math>g / <math>\mu</math>l)</b>
<b>0</b>	10	0
<b>2,5</b>	7,5	500
<b>5</b>	5	1000
<b>7,5</b>	2,5	1500
<b>10</b>	0	2000
<b>12,5</b>	0	2500

Tabelle 3

Anschließend wurden jeweils 10  $\mu$ l der Lysate 1:2 und 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und in die 96-Lochplatte pipettiert. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration in den Lysaten mussten die Proben soweit verdünnt werden, dass ihre Konzentration im Bereich der Eichreihe liegt. Von jeder Probe und von jedem Standard wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Nach dem Auftragen der Standardreihe und der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu$ l BCA-Arbeitslösung pro Vertiefung, bestehend aus 50 Teilen Reagenz A (Puffer) und ein Teil Reagenz B (Kupfersulfatlösung), gestartet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 540 nm im ELISA gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der KC 4 Software von Biograph (Version 3.0, Rev 29). Die entsprechende Proteinkonzentration, das in mg Protein pro ml Lösung angegeben wird, wurde anhand der aus dem BSA-Standard abgeleiteten Eichgeraden ermittelt. Entsprechend dem Ergebnis wurden die Proben dann in der benötigten Menge entweder direkt auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder für eine Immunpräzipitation eingesetzt.

### **3.2.2.3 Immunpräzipitation mit dem monoklonalen FAK- und PYK2-Antikörper**

Es wurde eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalem FAK- und PYK2-Antikörper durchgeführt, um die Expression der beiden Proteintyrosinkinasen in HepG2-Zellen zu untersuchen.

Zunächst wurden die Zellen in Petrischalen ausplattiert und für vier bis fünf Tage im Brutschrank kultiviert. Nach anschließender Zell-Lyse und Proteinbestimmung der Lysate wurden die Proben für die Immunpräzipitation vorbereitet. Dazu wurden 250-400  $\mu$ g Protein in 500  $\mu$ l Lysis Puffer aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurden jeweils 3  $\mu$ g monoklo-

nalere FAK- und PYK2-Antikörper und 20 µl Protein G, das den Protein-Antikörper-Komplex isolieren soll, dazu pipettiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht unter ständiger Rotation bei + 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde diese Suspension dann eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Kanüle abgenommen. Das Pellet wurde anschließend wie folgt gewaschen:

1. Hinzugabe von 1 ml eiskaltem PBS
2. 30 s Zentrifugation bei 13000 U/min
3. Absaugen des Überstandes

Die drei letzten Schritte wurden insgesamt zwei Mal durchgeführt. Bis zu diesem Punkt erfolgte die Bearbeitung der Proben auf Eis, um eine vorzeitige Zerstörung der Proteine zu vermeiden.

#### **3.2.2.4 Immunpräzipitation mit dem Antiphosphotyrosin-Antikörper (PY20)**

Die FAK-Aktivierung, also der Nachweis der Phosphorylierung, wurde mittels einer Immunpräzipitation mit dem PY20-Antikörper durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der spezifisch Phosphotyrosinstellen bindet.

Dazu wurden die HepG2-Zellen wie oben beschrieben jeweils mit HGF und IGF-I stimuliert und anschließend lysiert. Eine bestimmte Proteinmenge des Zell-Lysates wurde mit 4 µg PY20-Antikörper und 20 µl Protein G über Nacht im Kühlraum unter ständiger Rotation inkubiert. Die nachfolgenden Schritte der Immunpräzipitation wurden wie unter Punkt (siehe 3.2.2.3) beschrieben durchgeführt.

#### **3.2.2.5 SDS-PAGE**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte nun das Immunpräzipitat durch Auftrennung der Proteine analysiert werden.

Zwei Glasplatten wurden zu einer Kammer zusammengesetzt, in die das Polyacrylamidgel gegossen werden konnte. Dieses Gel besteht aus zwei Teilen: einem 10%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel. Zuerst wurde das Trenngel in die Kammer gegossen und mit 80% Isopropanol beschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel in die Kammer hineingegossen. Gleich nach dem Gießen wurde ein Taschenkamm mit 10 Taschen in das Sammelgel gesteckt. Dieser wurde erst nach vollständigem Aushärten des

Gels entfernt. Das fertige Polyacrylamidgel wurde anschließend in eine mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer überführt. In der Zwischenzeit wurden die Immunpräzipitate vorbereitet. Hierzu wurden die Proben (Pellets) mit 12 µl Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei  $-95^{\circ}\text{C}$  gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 14 µl vom Überstand abgenommen und zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf das Gel aufgetragen.

Nach vollständiger Beladung der Taschen mit den Proben wurde das Gel an eine Spannungsquelle angeschlossen. In den ersten 10 min wurde die Elektrophorese bei 80 V durchgeführt, sodass die Proben langsam in das Sammelgel laufen konnten. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine für 90 min bei 120 V Gleichspannung.

Die Proteine wandern mit einer konstanten Geschwindigkeit, die von ihrem Ladungszustand und Molekulargewicht abhängt, durch das Gel in Richtung Anode. Um ihre Trennung vom Ladungszustand unabhängig zu gestalten, wurde den Gelen SDS zugesetzt. SDS ist ein Detergenz, das die Proteine denaturiert. Dadurch wird ihnen soviel negative Ladung verlieht, dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit und damit ihre Trennung von der Ladung unabhängig und somit ausschließlich eine Funktion der Molekülgröße wird.

### 3.2.2.6 Western Blot

Beim Western Blot werden die im Gel befindlichen Proteine durch Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran überführt.

Zunächst wurden das Gel-Blotting Papier und die Nitrozellulosemembran auf die richtige Größe zugeschnitten (ca. 5 x 5 cm) und mit Transferpuffer durchfeuchtet. Jeweils ein Gel und eine Nitrozellulosemembran wurden mit drei Lagen Gel-Blotting Papier in Sandwichtechnik auf die Anode gelegt (siehe Abb. 2). Anschließend wurde die Kathode aufgesetzt und der Transfer erfolgte unter Eiskühlung bei konstanten 400 mA für 55 min.

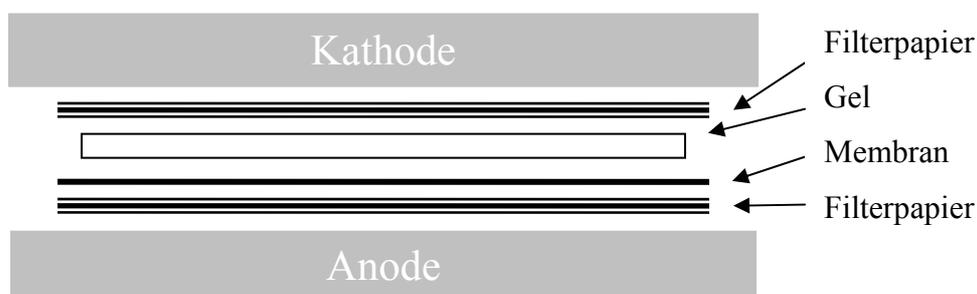


Abbildung 2: Aufbau des Western Blots

### 3.2.2.7 Immunnachweis von Proteinen

Die Identifizierung eines in dem geblotteten Bandenmuster gesuchten Proteins erfolgt durch das Binden eines spezifischen Antikörpers.

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst mit 15 ml Blockpuffer über Nacht bei +4°C auf einem Schüttler inkubiert, um eine unspezifischen Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde zum Blockpuffer die erste Antikörperlösung in der entsprechenden Verdünnung zugesetzt und die Membran darin inkubiert. Je nach Antikörper wurden unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen der Membran für vier Minuten mit Blockingpuffer entfernt. Nach dem Waschen wurde der entsprechende Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum aufgetragen. Anschließend wurde die Membran mit Blockpuffer und Waschpuffer für jeweils zwei Mal vier Minuten gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden auf der Membran erfolgte mit dem ECL-System. Hierbei handelt es sich um eine nicht-radioaktive Methode zur Identifizierung von immobilisierten Antigenen, die mit einem Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiertem Antikörper markiert worden sind (siehe Abb. 3).

Jeweils 2 ml Reagenz 1 und 2 ml Reagenz 2 des ECL-Detektionssystems wurden gemischt und auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von fünf Minuten wurde die Membran in eine Klarsichtfolie verpackt und in eine 18 x 24 cm große Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde für verschiedene Zeiten (30 s bis 45 min) ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und maschinell entwickelt.

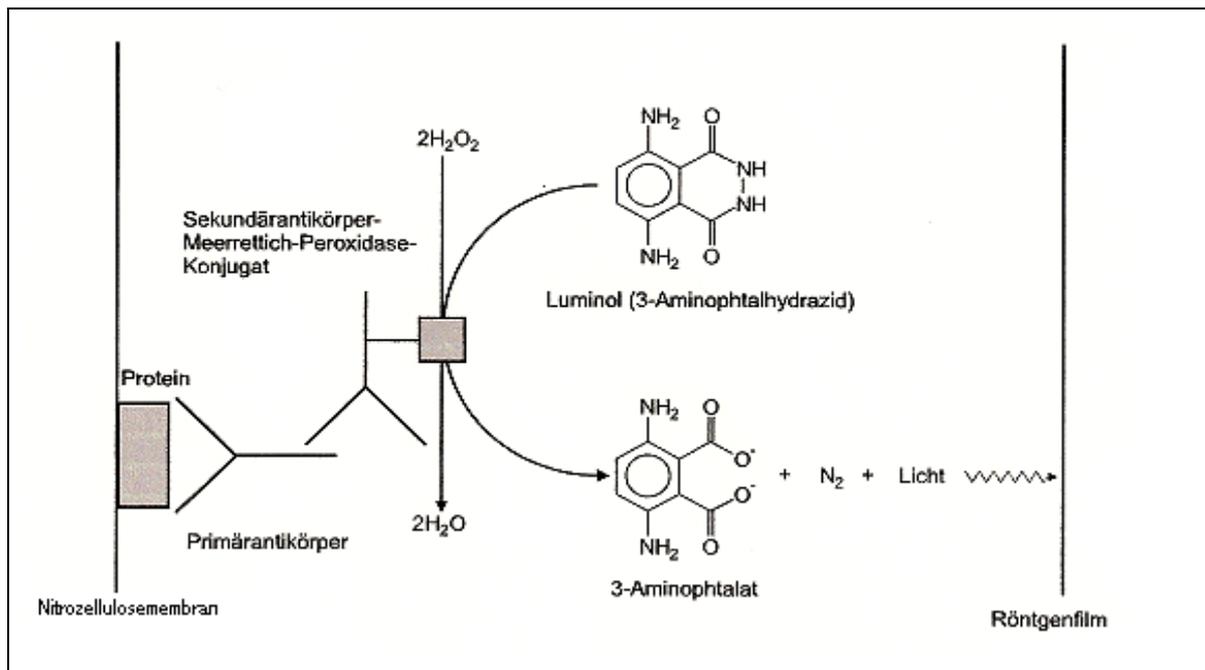


Abbildung 3: Prinzip der ECL-Detektion. An das immobilisierte Protein bindet der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper. Dieser wird vom Sekundärantikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Durch dieses Enzym wird das Substrat Luminol in einer lichterzeugenden Reaktion umgesetzt. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert (Spiegel, M. 2000).

### 3.2.2.8 Strippen der Membran

Nach der Detektion des gesuchten Proteins auf der Nitrozellulosemembran wurde eine Beladungskontrolle durchgeführt, um Pipettierfehler auszuschließen.

Hierzu wurde die Membran, die vorher mit einem phosphospezifischen Antikörper behandelt wurde, für 30 min bei Raumtemperatur in einem Stripping-Puffer inkubiert („gestrippt“). Durch das Strippen werden die auf der Membran vorhandenen Antikörper entfernt. Nach 30 min wurde die Membran zwei Mal 10 min mit Waschlösung gewaschen und über Nacht bei  $+4^\circ\text{C}$  mit Blockpuffer behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in der ersten Antikörperlösung. Die nachfolgenden Schritte wurden wie unter Punkt 3.2.2.7 beschrieben durchgeführt.

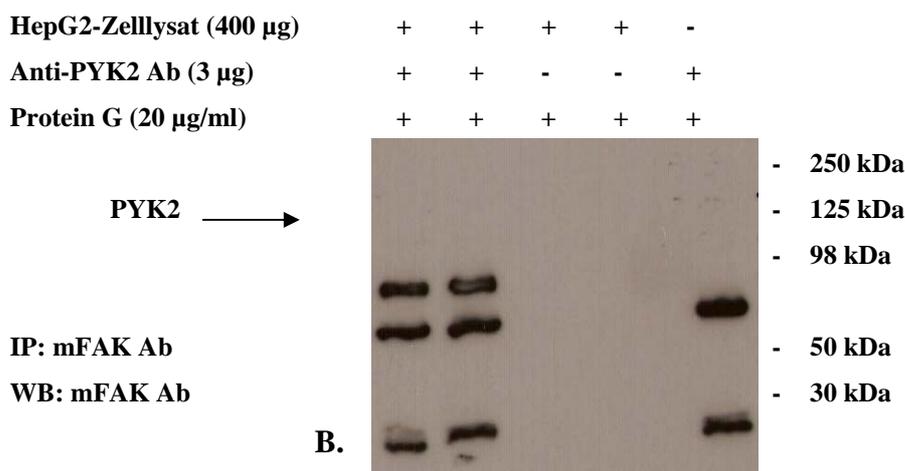
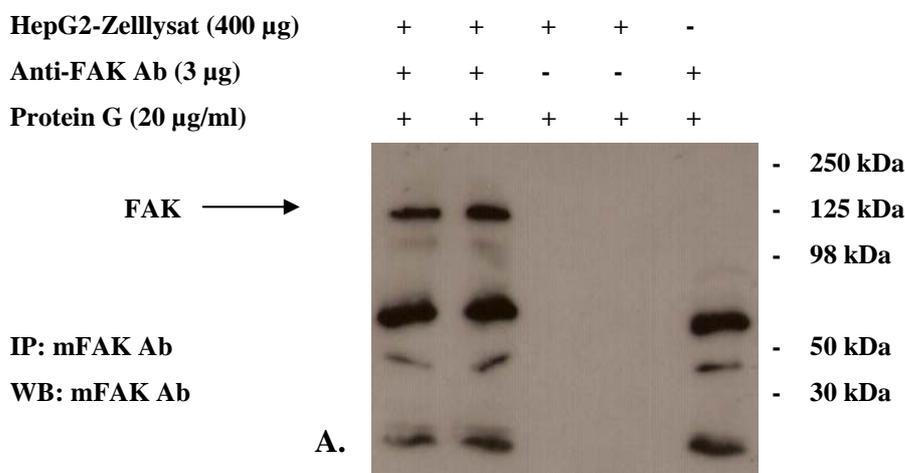
### **3.2.2.9 Densitometrische Auswertung und Statistik**

Die aus den Western Blot Experimenten hervorgegangenen Filme wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners der Firma Canon eingescannt und mit dem NIH-Computerprogramm Image J (Version 1,31v) ausgewertet. Aus den Einzelwerten wurden in jeder Versuchsreihe jeweils der arithmetische Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean, SEM) berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen behandelten Zellen und unbehandelten Zellen wurde mit dem Student's t-Test geprüft. Hierbei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  % als Signifikanzniveau angenommen. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Expression der beiden Proteintyrosinkinasen FAK und PYK2 in HepG2-Zellen

Die Expression der beiden Proteintyrosinkinasen FAK und Pyk2 in HepG2-Zellen wurde mittels einer Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper untersucht. Hierzu wurde eine bestimmte Proteinmenge eines HepG2-Zelllysates mit einem monoklonalen FAK- und PYK2-Antikörper immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.



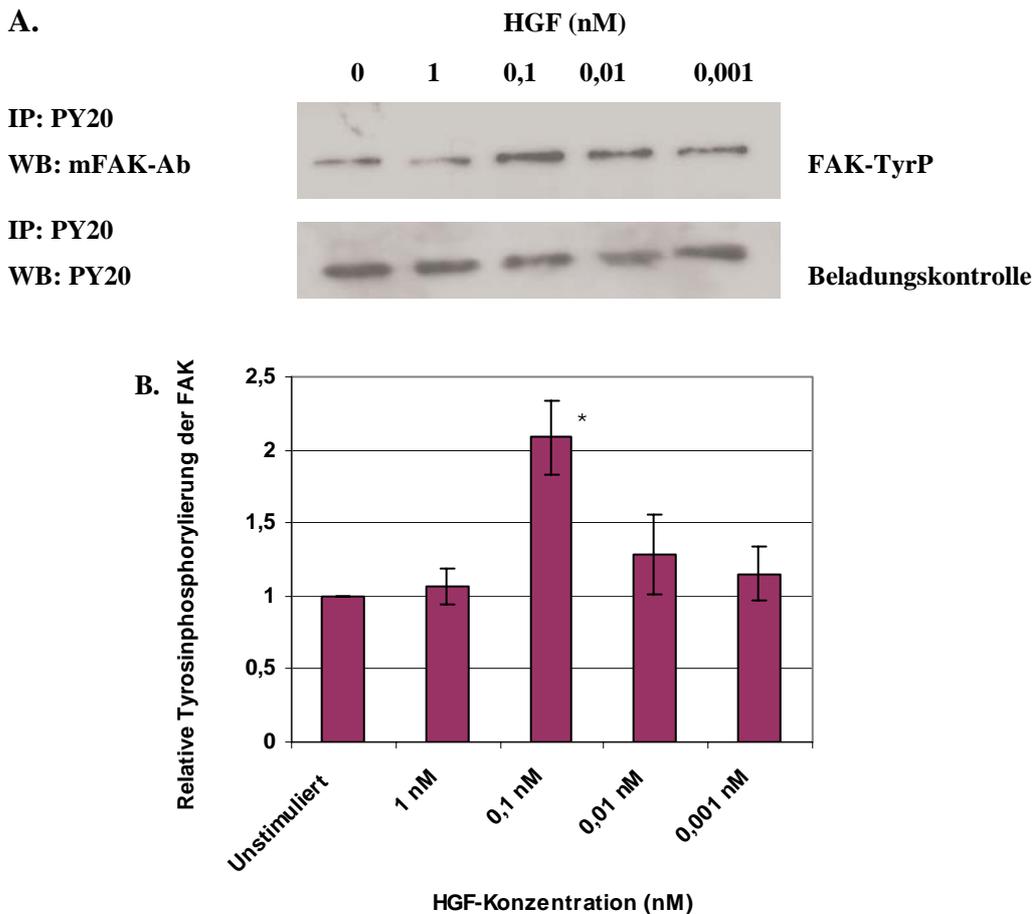
**Abbildung 4: Western Blots von Zell-Lysaten der HepG2-Zelllinie.**

Es wurden jeweils 400 µg Zellprotein und 20 µl Protein G (20 µg/ml) für FAK und PYK2 mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper (Anti-FAK bzw. Anti-Pyk2) immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western Blot mit dem monoklonalen FAK- bzw. PYK2-Ab (n = 12).

Die Abbildung 1 zeigt, dass FAK in der humanen Hepatoblastomzelllinie HepG2 exprimiert wird (Abb. 4 A). PYK2 dagegen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4 B).

## 4.2 Nachweis der FAK-Aktivierung durch HGF und IGF

### 4.2.1 Konzentrationsabhängige Veränderung der FAK-Tyrosinphosphorylierung



**Abbildung 5: FAK-Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration.**

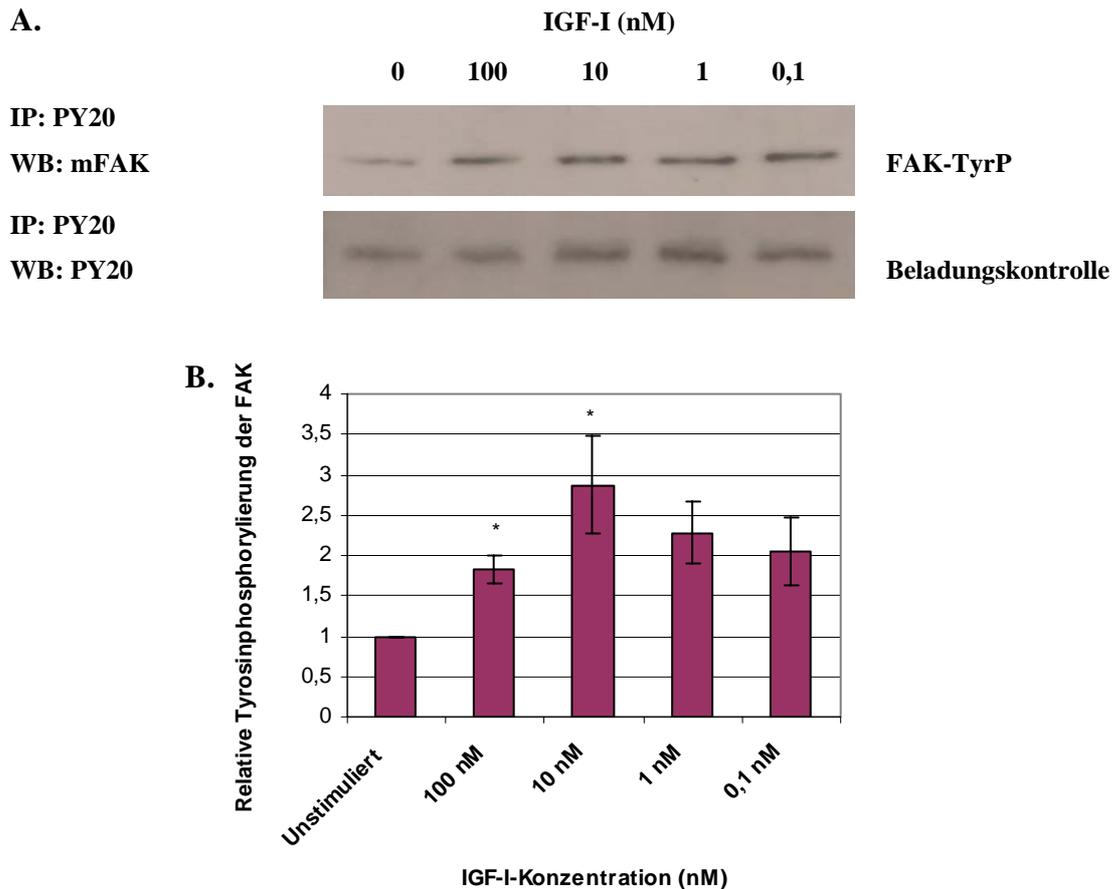
**A.** Die HepG2-Zellen wurden für die Zeitdauer von einer Minute mit HGF in den Konzentrationen 0,001 nM bis 10 nM stimuliert und anschließend lysiert. Jeweils 300 µg Zellprotein und 20 µl Protein G wurden dann mit 4 µg PY20 immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der FAK-TyrP erfolgte im Western Blot mit dem mFAK-Ab. Die Membran wurde danach für 30 min bei Raumtemperatur gestrippt und mit dem PY20-Antikörper inkubiert (Beladungskontrolle).

**B.** Die FAK-Phosphorylierung nach Stimulation wurde in Verhältnis zu der FAK-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 9); \* signifikante Aktivierung der FAK (p < 0,05).

Es wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, um zu untersuchen, bei welcher Konzentration des jeweiligen Wachstumsfaktors eine optimale Aktivierung der FAK stattfindet. Hierzu wurden die Zellen mit HGF in den Konzentrationen 0,001 nM bis 10 nM für 60 s und mit IGF-I in den Konzentrationen 0,10 nM bis 100 nM für 30 s stimuliert. Die FAK-Aktivierung wurde mittels einer Immunpräzipitation mit dem PY20-Antikörper untersucht und im Western Blot mit dem monoklonalen FAK-Antikörper detektiert.

Die Abb. 5 zeigt die HGF-induzierte FAK-Aktivierung, die durch den Quotienten FAK-Phosphorylierung nach Stimulation/ basale Phosphorylierung dargestellt ist. Eine Zunahme der Aktivierung der Tyrosinkinase FAK ist erst ab einer HGF-Konzentration von 0,001 nM zu beobachten. Bei dieser Konzentration steigert HGF die Phosphorylierung um den Faktor  $1,2 \pm 0,2$ . Mit steigender HGF-Konzentration nimmt die Tyrosinphosphorylierung zu und erreicht bei einer Konzentration von 0,1 nM ein Maximum mit einem signifikanten Anstieg um das 2,1-fache  $\pm 0,3$ .

In Abb. 6 sind die Werte der Stimulationen mit IGF-I dargestellt. Die stärkste FAK-Aktivierung ist nach einer Inkubation mit IGF-I in einer Konzentration von 10 nM zu beobachten. Hierbei kommt es zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung um den Faktor  $2,9 \pm 0,6$ . Im Vergleich dazu wird bei einer IGF-I-Konzentration von 100 nM eine Steigerung der Phosphorylierung nur um den Faktor  $1,8 \pm 0,2$  erreicht. In beiden Fällen ist der Anstieg statistisch signifikant gegenüber der FAK-Aktivität in unstimulierten Zellen.



**Abbildung 6: Tyrosinphosphorylierung der FAK in Abhängigkeit von der IGF-I-Konzentration.**

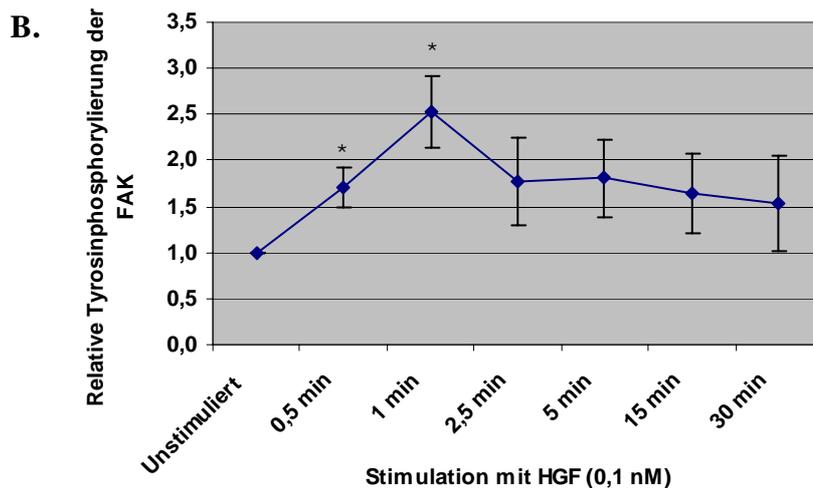
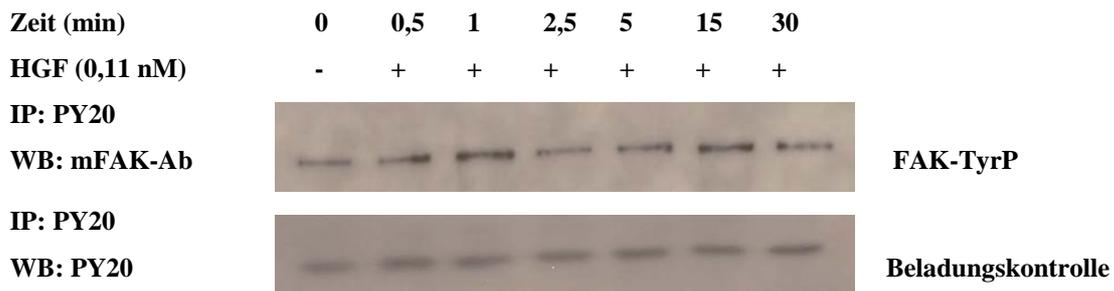
**A.** Die HepG2-Zellen wurden für die Zeitdauer von 30 s mit IGF-I in den Konzentrationen 0,1 nM bis 100 nM stimuliert und anschließend lysiert. Jeweils 400 µg Zellprotein und 20 µl Protein G wurden dann mit 4 µg PY20 immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der FAK-TyrP erfolgte im Western Blot mit dem mFAK-Antikörper. Die Membran wurde danach für 30 min bei Raumtemperatur gestriipt und mit dem PY20-Antikörper inkubiert (Beladungskontrolle).

**B.** Die FAK-Phosphorylierung nach Stimulation wurde in Verhältnis zu der FAK-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 9); \* signifikante Aktivierung der FAK (p < 0,05).

#### 4.2.2 Zeitabhängige Veränderung der FAK-Tyrosinphosphorylierung

Timecourse-Versuche wurden durchgeführt, um die Aktivierung von FAK im Zeitverlauf darzustellen. Hierzu wurden 6 Zeiten festgelegt: 0,5; 1; 2,5; 5; 15 und 30 Minuten. Für jedes dieser Zeitintervalle wurden die HepG2-Zellen jeweils mit HGF (0,1 nM) und IGF-I (10 nM) stimuliert.

A.



**Abbildung 7: Kinetik der HGF-induzierten FAK-Tyrosinphosphorylierung.**

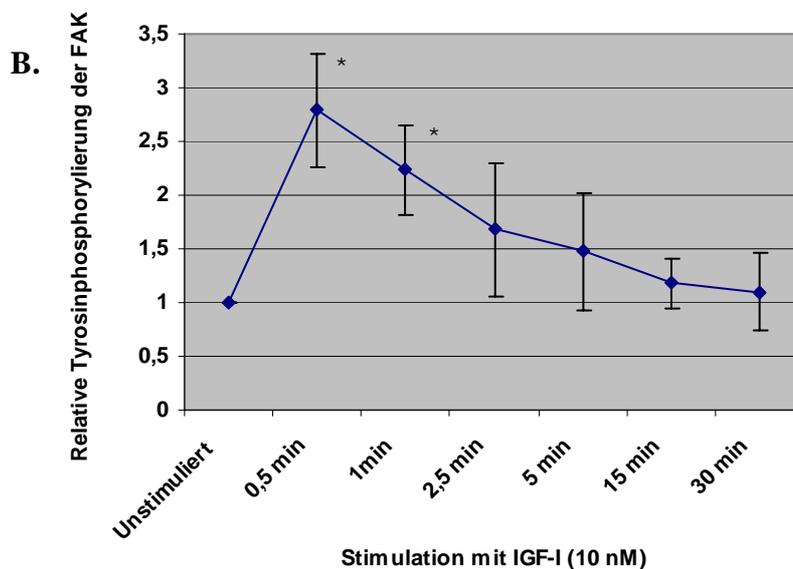
**A.** Die HepG2-Zellen wurden mit HGF (0,1 nM) jeweils für die Zeitdauer von 30 s bis 30 min stimuliert und anschließend lysiert. Jeweils 300 µg Zellprotein und 20 µl Protein G wurden dann mit 4 µg PY20 immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der FAK-TyrP erfolgte im Western Blot mit dem mFAK-Ab. Die Membran wurde danach für 30 min bei Raumtemperatur gestrippt und mit dem PY20-Antikörper inkubiert (Beladungskontrolle).

**B.** Die FAK-Phosphorylierung nach Stimulation wurde in Verhältnis zu der FAK-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 8); \* signifikante Aktivierung der FAK (p < 0,05).

Es wurde die basale Phosphorylierungsrate der FAK mit der Kinetik der Phosphorylierung nach Stimulation mit HGF (Abb. 7) und IGF (Abb. 8) verglichen. Die Behandlung der HepG2-Zellen mit HGF (0,1 nM) und IGF-I (10 nM) über einen Zeitraum von 30 s bis 30 min führt zunächst zu einer Zunahme der FAK-Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zu der FAK-Aktivität in unstimulierten Zellen. Die HGF-induzierte FAK-Aktivierung erreicht nach einer Inkubationsdauer von einer Minute ein Maximum mit einem signifikanten Anstieg um das 2,5-fache ± 0,4. IGF-I dagegen führt nach 30 s zu einer maximalen Steigerung

der FAK-Tyrosinphosphorylierung um den Faktor  $2,7 \pm 0,5$ . Auch dieser Anstieg ist signifikant gegenüber der Basalaktivität der FAK in unstimulierten Zellen. Sowohl bei der Stimulation mit HGF als auch bei der Stimulation mit IGF-I kommt es mit zunehmender Zeit zur Abnahme der FAK-Tyrosinphosphorylierungsrate.

### A.



### Abbildung 8: Kinetik der IGF-induzierten FAK-Phosphorylierung

**A.** Die HepG2-Zellen wurden mit IGF-I (10 nM) jeweils für die Zeitdauer von 30 s bis 30 min stimuliert und anschließend lysiert. Jeweils 400 µg Zellprotein und 20 µl Protein G wurden dann mit 4 µg PY20 immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der FAK-TyrP erfolgte im Western Blot mit dem mFAK-Ab. Die Membran wurde danach für 30 min bei Raumtemperatur gestrippt und mit dem PY20-Antikörper inkubiert (Beladungskontrolle).

**B.** Die FAK-Phosphorylierung nach Stimulation wurde in Verhältnis zu der FAK-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 14); \* signifikante Aktivierung der FAK (p < 0,05).

### **4.3 Untersuchung der Aktivität der Autophosphorylierungsstelle 397 vor und nach Stimulation der HepG2-Zellen mit HGF und IGF-I**

Die Aktivierung der Tyrosinkinase FAK ist abhängig von der Aktivität der Autophosphorylierungsstelle 397. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen der Phosphorylierungsgrad dieser Tyrosinstelle untersucht, indem die Zellen mit HGF (0,1 nM) und IGF-I (10 nM) jeweils für die Zeitdauer von 30 s bis 30 min stimuliert wurden. Jeweils 100µg Protein wurde in einem 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem phosphospezifischen FAK pY397-Antikörper untersucht.

Die Phosphorylierung der Tyrosinstelle 397 nach Stimulation mit IGF-I wurde in Relation zu der basalen Phosphorylierung in unbehandelten Zellen gesetzt, um herauszufinden um welchen Faktor IGF-I die Aktivität dieser Stelle steigert. Dieses wird in Abb. 9 dargestellt. Nach 30 s ist eine deutliche Zunahme der FAK-Autophosphorylierung in HepG2-Zellen detektierbar, die nach einer Minute ein Maximum mit einem signifikanten Anstieg um das 4,1-fache  $\pm$  0,81 erreicht. Mit zunehmender Inkubationsdauer kommt es aber zu einer Abnahme der Phosphorylierungsrate.

Aufgrund der schlechten Bildqualität einiger Filme konnten die Ergebnisse der Experimente mit HGF und der Autophosphorylierungsstelle 397 der FAK nicht quantitativ zusammengefasst und graphisch ausgewertet werden.

A.

Zeit (min)	0	0,5	1	2,5	5	15	30
IGF-I (13 nM)	-	+	+	+	+	+	+

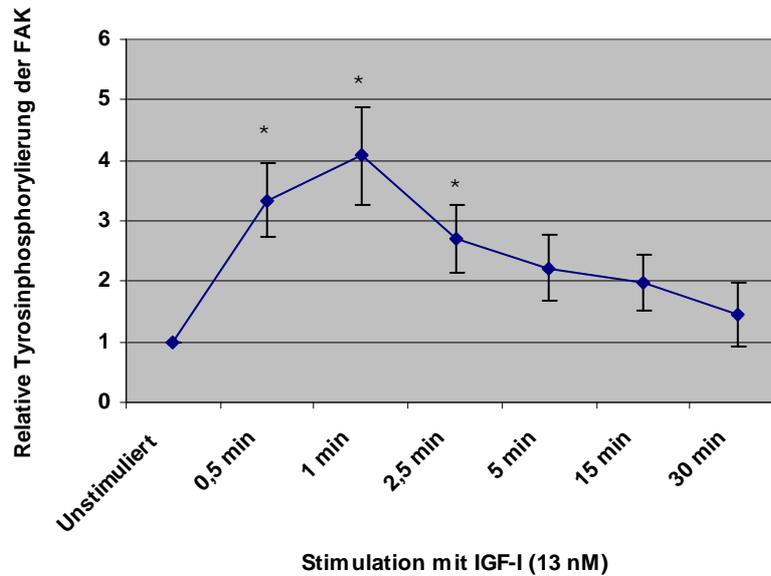
FAK pY397



Beladungskontrolle



B.



**Abbildung 9: Kinetik der FAK-Autophosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit IGF.**

**A.** Die HepG2-Zellen wurden mit IGF-I (10 nM) für die Zeitdauer von 30 s bis 30 min stimuliert und anschließend lysiert. Jeweils 100 µg Protein wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem FAK pY397-Antikörper untersucht. Nach dem Strippen der Membran für 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die Beladungskontrolle mit dem mFAK-Ab.

**B.** Die Tyrosinphosphorylierung der FAK nach Stimulation wurde in Verhältnis zu der Tyrosinphosphorylierung in unstimulierten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 5); \* signifikante Aktivierung der FAK (p < 0,05).

#### **4.4 Einfluss des Src-Inhibitoren PP2 auf die FAK-Aktivität in HepG2-Zellen**

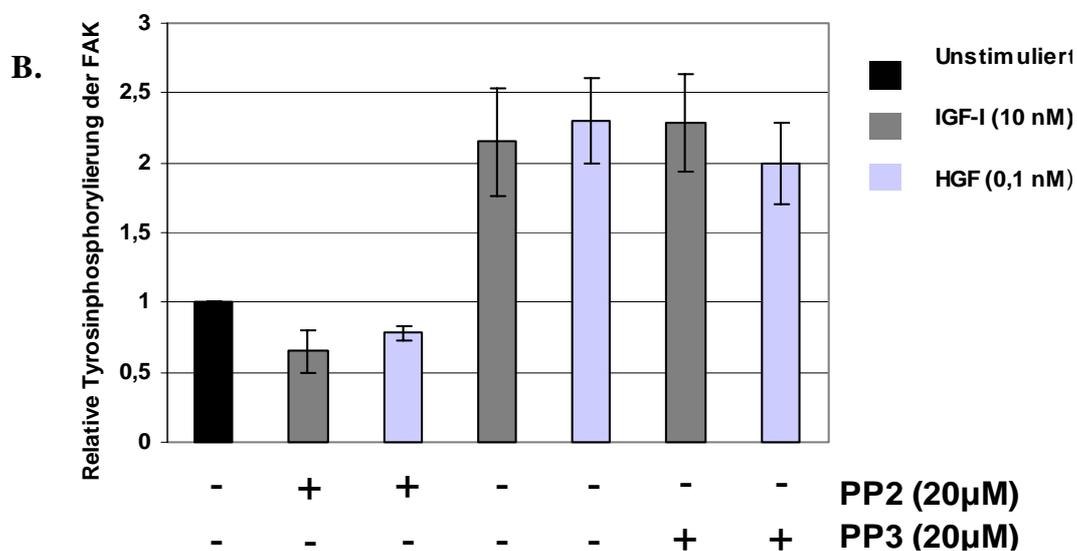
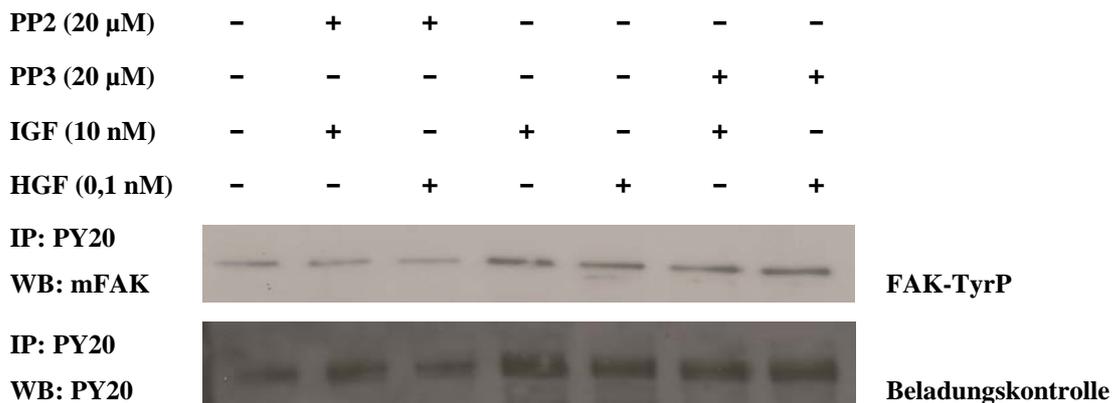
Die Autophosphorylierungsstelle 397 bindet nach Aktivierung an andere Signalproteine wie z.B. c-Src. Die Src-Kinase wiederum phosphoryliert die FAK-Tyrosinreste Tyr-576 und 577, die im phosphorylierten Zustand erst die vollständige Kinaseaktivität von FAK ermöglichen, und den Tyr-925, der über die Bindung an das Adapterprotein Grb2 zur Aktivierung weiterer Signalproteine führt.

Eine Stunde vor Stimulation mit IGF-I (10 nM) und HGF (0,1 nM) wurden die Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2 (20  $\mu$ M) und dem inaktiven Analogon PP3 (20  $\mu$ M) inkubiert, um zu untersuchen, ob die Src-Kinase einen Einfluss auf die durch Wachstumsfaktoren induzierte FAK-Aktivierung in HepG2-Zellen hat. In unseren Experimenten wurde PP3 als eine Kontrollkomponente eingesetzt, die strukturell dem Inhibitor sehr ähnlich ist, aber keine inhibitorische Wirkung auf das Zielprotein hat.

Die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab, dass PP2 in der Lage ist die durch HGF und IGF-I induzierte Zunahme der FAK-Tyrosinphosphorylierung aufzuheben. PP3 hingegen hatte keinen Einfluss auf die FAK-Aktivität in den HepG2-Zellen (siehe Abb. 10).

In Abbildung 11 wird die Abnahme der FAK-Aktivität als Prozent von der maximalen FAK-Aktivierung dargestellt. Nach einer Stunde Vorinkubation mit PP2 kommt es zu einer Minderung der FAK-Tyrosinphosphorylierung auf  $57 \% \pm 17$  in Gegenwart von IGF-I und auf  $47 \% \pm 15$  in Gegenwart von HGF.

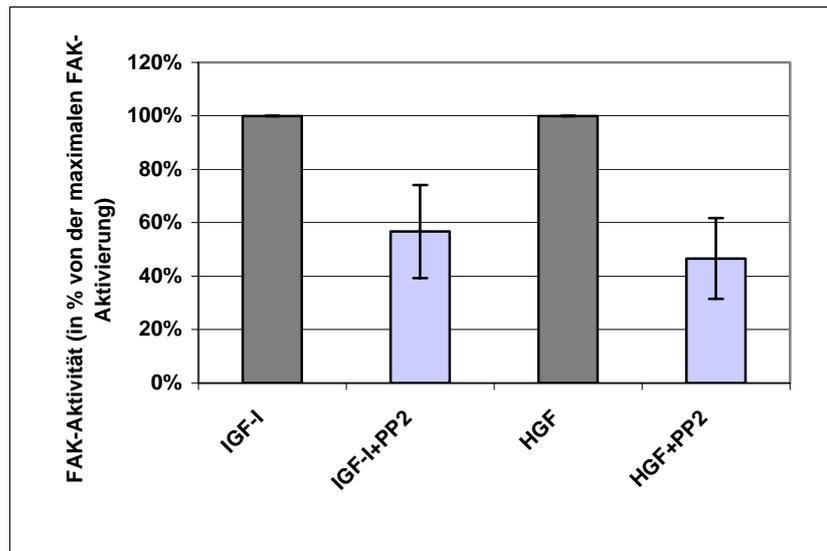
A.



**Abbildung 10: FAK-Tyrosinphosphorylierung nach 60 minütiger Inkubation mit PP2 (20  $\mu$ M) und PP3 (20  $\mu$ M) und nach Stimulation mit HGF (0,1 nM) und IGF (10 nM).**

A. Die HepG2-Zellen wurden für 60 min mit PP2 (20  $\mu$ M) und PP3 (20  $\mu$ M) inkubiert und anschließend für 30 sek mit IGF-I (10 nM) und für eine Minute mit HGF (0,1 nM) stimuliert. Jeweils 400  $\mu$ g Protein wurden mit 4  $\mu$ g PY20 und 20  $\mu$ l Protein G (20  $\mu$ g/ml) immunpräzipitiert und in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western Blot mit dem m FAK-Ab. Die Membran wurde danach für 30 min bei Raumtemperatur gestriipt und mit dem PY20-Antikörper inkubiert (Beladungskontrolle).

B. Die FAK-Phosphorylierung nach Inkubation der Zellen mit PP2, PP3, HGF und IGF-I wurde in Verhältnis zu der FAK-Phosphorylierung in unbehandelten Zellen gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrisch festgestellten Einzelergebnisse dar (n = 7).



**Abbildung 11: FAK-Aktivität in Prozent von der maximalen FAK-Aktivierung in HepG2-Zellen.**

Die durch HGF und IGF-I induzierte FAK-Tyrosinphosphorylierung nach Vorinkubation mit PP2 wurde mit der FAK-Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit HGF und IGF-I (ohne Vorinkubation) verglichen.

## 5 Diskussion

Das HCC macht ungefähr 80 % der primären malignen Lebertumore bei Erwachsenen aus und ist damit die häufigste Form des Leberkrebses. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass eine Vielzahl von verschiedenen Signal- und Strukturproteinen in der Entstehung und Progression des HCC eine wichtige Rolle spielen (Liu et al., 1997; D'Errico et al., 1996; Puisieux und Ozturk, 1997; Ljubimova et al., 1997; Lee et al., 1998; Nakanishi et al., 1999; Tavian et al., 2000; Alexia et al., 2004). Welche Bedeutung die beiden zytosolischen Tyrosinkinasen FAK und PYK2 in der Pathogenese dieser Erkrankung haben, ist jedoch unklar. Beide Kinasen sind massgeblich an der Regulation wichtiger zellulärer Schlüsselfunktionen wie Wachstum und Migration beteiligt. So geht die Überexpression von FAK mit einer gesteigerten Zellproliferation und DNA-Synthese einher (Zhao et al., 1998; Oktay et al., 1999; Hungerford et al., 1996; Frisch et al., 1996; Ilic et al., 1998; Almeida et al., 2000). Die PYK2-Überexpression dagegen führt zu einer Zunahme der Apoptoserate (Xiong und Parsons, 1997; Ueda et al., 2000; Chauhan et al., 1999; Pandey et al., 1999a, 1999b; Susa, 1999). Normalerweise unterliegt die Apoptose ebenso wie die Zellteilung homöostatischen Kontrollmechanismen. Im neoplastischen Gewebe ist das Gleichgewicht typischerweise in Richtung Wachstum verschoben. Für FAK konnte eine Überexpression in Tumoren und Metastasen nachgewiesen werden. So haben 1993 erstmals Weiner und Mitarbeiter auf Transkriptionsebene die FAK-Expression in 49 verschiedenen Gewebeproben untersucht, und zwar immer paarweise neoplastische und die korrespondierenden normalen Gewebe (Weiner et al., 1993). Dabei wurde eine FAK-Überexpression in einem von 8 adenomatösen Geweben, in 17 von 20 invasiven Tumoren und in allen 15 metastasierenden Tumoren detektiert (Weiner et al., 1993). In einer weiteren Studie wurde eine signifikant erhöhte FAK-Expression bei 100 % der invasiven und metastasierenden Kolonkarzinome und bei 88 % der Mammakarzinome nachgewiesen (Owens et al., 1995). Durch FAK-antisense Oligonukleotide oder durch die Überexpression von FRNK konnte die Migration bzw. die Motilität einiger Tumorzellen gehemmt werden (Hauck et al., 2001, 2002; Slack et al., 2001). Diese Daten verdeutlichen, dass einige Tumorzellen nicht nur eine erhöhte FAK-Expression aufweisen, sondern auch dass die Zellen, die FAK überexprimieren, das Potential haben umliegende Gewebe zu invadieren und Metastasen zu setzen. Die Expression der Tyrosinkinase PYK2 dagegen ist im maligne entarteten Gewebe herunterreguliert. So haben Stanzione und Mitarbeiter die PYK2-Expression im normalen Prostatagewebe untersucht und diese mit der Expression im Prostatakarzinom verglichen (Stanzione et al., 2000). Hierbei konnte molekularbiologisch und immunhistologisch deutlich gezeigt wer-

den, dass PYK2 hauptsächlich im gesunden Prostatagewebe exprimiert wird, und dass diese Expression mit steigendem Malignitätsgrad abnimmt (Stanzione et al., 2000). In dieser Arbeit wurde parallel zu der PYK2-Expression auch die FAK-Expression untersucht und festgestellt, dass FAK im Gegensatz zu PYK2 vornehmlich im hochmalignen und undifferenzierten Gewebe vorkommt (Stanzione et al., 2000). Ein unterschiedliches Expressionsmuster der beiden Proteintyrosinkinasen wurde auch im Glioblastom beobachtet. Die Proliferation der Glioblastomzellen wurde durch eine FAK-Überexpression gesteigert und umgekehrt durch eine PYK2-Überexpression gehemmt (Lipinski et al., 2003). In einer Zelllinie des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnte nach Apoptoseinduktion mit Vinorelbin eine Zunahme der PYK2-Expression festgestellt werden (Forest et al., 2005)

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, die Expression und die intrazelluläre Aktivierung der FAK und PYK2 in der hepatischen Tumorzelllinie HepG2 zu untersuchen. Diese Zellen gelten als besonders gut geeignete in-vitro Modelle des HCC, da sie in vielen Charakteristika, z.B. der Synthese diverser spezifischer Plasmaproteine, dem klinischen HCC besonders ähnlich sind (Aden et al., 1979; Darlington et al., 1987).

Im ersten Abschnitt wurde die Expression der beiden Proteintyrosinkinasen in HepG2-Zellen untersucht. Die Western Blot Analysen zeigten, dass FAK in HepG2-Zellen exprimiert wird, PYK2 dagegen nicht. In Übereinstimmung mit dem vorliegenden Ergebnis wurde in einer Reihe verschiedener anderer Untersuchungen die Expression der Tyrosinkinase FAK in HepG2-Zellen nachgewiesen (Tu et al., 2001; Carloni et al., 2001; Zhang et al., 2003). Neben HepG2-Zellen wurden noch in vier weiteren hepatischen Tumorzelllinien eine FAK-Expression beobachtet: Huh7-Zellen (Carloni et al., 2001; Lee et al., 2003; Zhang et al., 2003; Itoh et al., 2004), SMMC-7721-Zellen (Zhang et al., 2003), Hep3B-Zellen und PLC-Zellen (Itoh et al., 2004). Weitere Untersuchungen zeigen, dass verschiedene Signale eine Tyrosinphosphorylierung und damit eine Aktivierung der FAK im HCC hervorrufen können. So haben z.B. Tu und Mitarbeiter in HepG2-Zellen eine Zunahme der FAK-Tyrosinphosphorylierung nach Inkubation der Zellen mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat), einem Aktivator der Proteinkinase-C, beobachtet (Tu et al., 2001). Eine andere Gruppe hat FAK in Zusammenhang mit integrinvermittelter Signaltransduktion nach Adhäsion der HepG2- und Huh7-Zellen auf der extrazellulären Matrix untersucht (Carloni et al., 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung der FAK in den Zellen abhängig von der Expression des Integrinrezeptors  $\alpha 6\beta 1$  ist, und dass diese Aktivierung wiederum für die Zellmigration eine wichtige

Rolle spielt. In SMMC-7721 Zellen führt TGF- $\beta$ 1 über eine Zunahme der Expression des Integrinrezeptors  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 zu einer Steigerung der FAK-Tyrosinphosphorylierung, die mit vermehrter Zelladhäsion und Migration einhergeht (Cai et al., 2000). In einer weiteren Untersuchung wurde festgestellt, dass Selen über eine Aktivierung der FAK und PI3-Kinase die Apoptose in Huh7-Zellen verhindert (Lee et al., 2003). Eine ähnliche Beobachtung haben Su und Mitarbeiter in SMMC-7721-Zellen gemacht (Su et al., 2005). Sie konnten nachweisen, dass ein Abnahme der Expression der Zelladhäsionsmoleküle wie FAK, ILK (integrin linked kinase) und  $\beta$ -catenin die Apoptoserate der Zellen erhöht (Su et al., 2005). Eine interessante Erkenntnis war weiterhin, dass die FAK-Expression im HCC mit einer gesteigerten Metastasierungstendenz der Tumorzellen sowie einer signifikant schlechteren Prognose einhergeht (Itoh et al., 2004). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass FAK einen wichtigen Faktor in der Hepatokarzinogenese darstellt. Für PYK2 dagegen existieren zurzeit nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft keine zuverlässigen Daten hinsichtlich der Expression oder Aktivierung im HCC. Untersuchungen in anderen Tumoren aber zeigen, dass die PYK2-Expression im Unterschied zu FAK in proliferierenden, malignen Tumorzellen herunterreguliert ist (Stanzione et al., 2000; Lipinski et al., 2005). Da in HepG2-Zellen eine deutliche FAK-Expression, nicht aber PYK2 detektiert werden konnte, lag der Schluss nahe, dass FAK ähnlich in anderen malignen Geweben auch in HepG2-Zellen eine übergeordnete Rolle spielt. Daher wurde FAK im Folgenden genauer untersucht.

Im zweiten Abschnitt der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der beiden Wachstumsfaktoren HGF und IGF-I auf die Aktivität der Tyrosinkinase FAK in HepG2-Zellen analysiert. Es gab verschiedene Gründe dafür, die HGF und IGF-I für die Untersuchung der FAK-Aktivierung in HepG2-Zellen auszuwählen. HGF wurde primär als Wachstumsfaktor für Hepatozyten identifiziert (Nakamura et al., 1986). Er gliedert sich in eine  $\alpha$ - (69 kD) und in eine  $\beta$ -Untereinheit (34 kD), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Leber und Pankreas sind die Hauptbildungsorte. IGF-I ist ein 7,6 kD Polypeptid, das aus 70 Aminosäuren besteht, und nach Stimulation durch das Wachstumshormon (STH) in Hepatozyten, Fibroblasten und Chondrozyten gebildet wird. IGF-I vermittelt so einen Grossteil der von STH abhängigen Wachstumsprozesse. Beide Wachstumsfaktoren wurden als Modulatoren der Zellproliferation, Differenzierung und Migration beschrieben (Lai et al., 2000; Ma et al., 2002; Chen et al., 1998; Kim und Feldman, 2002; Jehle et al., 1996). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass sowohl HGF als IGF-I eine mitogene und motogene Wirkung auf Tumorzellen haben (Matsumoto et al., 1994; Chan et al., 2002; Maulik

et al., 2002; Tai et al., 2003; Qiang et al., 2004). Beide Wachstumsfaktoren entfalten ihre Wirkung auf die Zellen über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor, der zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen gehört. Diese bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem hydrophoben transmembranären Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Nach Ligandenbindung leiten sie ein Signal aus dem Extrazellulär- raum in das Zellinnere über eine Tyrosinphosphorylierung zytoplasmatischer Bindungspro- teine. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zeigen, dass FAK unter anderem zu diesen Proteinen gehört (Casamassima und Rozengurt, 1998; Kim und Feld- man, 2002; Chen et al., 1998; Lai et al., 2000). In der Literatur werden die beiden Wachs- tumsfaktoren auch im Zusammenhang mit dem HCC beschrieben. So konnten Lee und Mitarbeiter die Expression des HGF-Rezeptors (Met) in sechs verschiedenen Zelllinien des HCC nachweisen (Lee et al., 1998). Hierbei wurde beobachtet, dass HGF das Wachstum in vier der sechs untersuchten HCC-Zelllinien stimuliert, darunter auch in HepG2-Zellen (Lee et al., 1998). Eine andere Studie hat ergeben, dass HGF in HepG2-, Hep3B- und Huh7- Zellen zu einer Steigerung der Zellmotilität führt (Nakanishi et al., 1999). Horiguchi und Mitarbeiter konnten in HGF-transgenen Mäusen eine erhöhte Tumorgenese nachweisen, wobei 33% der männlichen und 23% der weiblichen transgenen Mäusen ein HCC entwi- ckelten (Horiguchi et al., 2002). Neben dem HGF-Rezeptor wurde auch die Expression des IGF-I Rezeptors (IGF-IR) im HCC beschrieben (Tsai et al., 1988; Alexia et al., 2004; Luo et al., 2005). Hopfner und Mitarbeiter haben den Effekt des Tyrosinkinase-Inhibitors NVP- AEW541 in vier verschiedenen Hepatomazelllinien untersucht und festgestellt, dass eine Hemmung des IGF-IR mit einer erhöhten Apoptoserate der Zellen einhergeht (Hopfner et al., 2006). Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass HGF und IGF-I in der Re- gulation von Zellwachstum und Migration eine wichtige Rolle spielen. Der Nachweis der Expression der beiden Wachstumsfaktorrezeptoren in Tumoren, darunter auch im HCC, veranschaulicht die mögliche Beteiligung des HGF- und IGF-I-Rezeptorsystems bei der Tumorentstehung und Metastasierung. Darüber hinaus zeigen Voruntersuchungen, dass FAK in der Signaltransduktion der beiden Wachstumsfaktorrezeptoren involviert ist (Mau- lik et al., 2000; Sekimoto et al., 2005; Leventhal et al., 1997; Poncharek et al., 2005; Ba- ron et al., 1997; Lai et al., 2000; Casamassima et Rozengurt, 1998; Kim et Feldmann, 1998). Aufgrund der Beobachtungen, dass sowohl der Met-Rezeptor als auch der IGF-IR in HepG2-Zellen exprimiert werden, ist diese Zelllinie für die Untersuchung der FAK- Aktivierung durch die beiden Wachstumsfaktoren hervorragend geeignet.

Der Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren HGF und IGF-I auf die Aktivität der Tyrosinkinase FAK wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zuerst wurde in einer Dosis-Wirkungskurve für HGF und IGF-I diejenige Wachstumsfaktorkonzentration ermittelt, bei der es zu einer deutlichen Tyrosinphosphorylierung der FAK kommt. Im zweiten Ansatz wurde dann der zeitliche Verlauf der FAK-Tyrosinphosphorylierung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass sowohl HGF als auch IGF-I eine Tyrosinphosphorylierung der FAK in HepG2-Zellen hervorrufen können. Bei einer HGF-Konzentration von 0,1 nM kommt es zu einer maximalen Steigerung der FAK-Tyrosinphosphorylierung mit einem Anstieg um den Faktor  $2,1 \pm 0,25$ , was gegenüber der FAK-Aktivität in unstimulierten Zellen statistisch signifikant ist. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Chen und Mitarbeiter in human embryonic kidney 293 Zellen (Chen et al., 1998). Sie konnten zeigen, dass HGF bei einer Konzentration von 10 ng/ml (0,1 nM) die FAK-Tyrosinphosphorylierung maximal steigert (Chen et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe hat die FAK-Aktivierung in Abhängigkeit von der IGF-I-Konzentration in Neuroblastomzellen untersucht. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde hierbei nachgewiesen, dass die Tyrosinphosphorylierung der FAK bei einer IGF-I-Konzentration von 10 nM ein Maximum erreicht (Leventhal et al., 1997).

Für die Untersuchung der FAK-Aktivität im Zeitverlauf wurden die Zellen für die Zeitdauer von 30 s bis 30 min mit HGF (0,1 nM) und IGF-I (10 nM) stimuliert.

Nach einer Inkubationsdauer von einer Minute mit HGF kommt es zu einer maximalen Tyrosinphosphorylierung der FAK. Die Stimulation mit IGF-I dagegen führt nach 30 s zu einem Maximum der FAK-Tyrosinphosphorylierung. In beiden Fällen ist der maximale Anstieg statistisch signifikant gegenüber der FAK-Aktivität in unstimulierten Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass sowohl HGF als auch IGF-I innerhalb einer kurzen Zeit eine maximale FAK-Tyrosinphosphorylierung in HepG2-Zellen induzieren können. Bei weiterer Zunahme der Inkubationsdauer kommt es zu einer Abnahme der Phosphorylierungsrate. Neben Wachstumsfaktoren können noch verschiedene andere Stimuli aus dem EZM eine schnelle Tyrosinphosphorylierung der FAK hervorrufen. Lipfert und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Thrombin- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung zu einer Integrin-abhängigen FAK-Tyrosinphosphorylierung führt, welche nach einer Minute Inkubationsdauer ein Maximum erreichte (Lipfert et al., 1992). Neben Thrombin und Kollagen, führt auch LDL in Thrombozyten zu einer FAK-

Tyrosinphosphorylierung, die aber Integrin-unabhängig ist. Sie wurde 10 s nach LDL-Zugabe sichtbar und erreichte nach zwei Minuten ein Maximum (Hackeng et al., 1999). Verschiedene regulatorische Peptide wie Bombesin, Endothelin und LPA induzieren über eine Bindung an G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren eine FAK-Aktivierung (Seufferlein und Rozengurt, 1994; Sinnet-Smith et al., 1993, Eble et al., 2000). So wurde in einer Untersuchung in Swiss 3T3-Zellen beobachtet, dass Bombesin nach einer kurzen Inkubationsdauer (60 s) zu einem Maximum der FAK-Tyrosinphosphorylierung führt (Sinnnet-Smith et al., 1993). In Rattenpankreasazinuszellen konnte für CCK, dessen Rezeptor in die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört (de Weerth et al., 1993a, 1993b), eine schnelle Induktion der FAK-Tyrosinphosphorylierung (Maximum zwischen 30 s und 2,5 min) nachgewiesen werden (Pace et al., 2003). Während in HepG2-Zellen die beiden Wachstumsfaktoren HGF und IGF-I nach einer kurzen Inkubationszeit zu einer maximalen Tyrosinphosphorylierung der FAK führen, weisen Untersuchungen mit denselben Wachstumsfaktoren in anderen Zellen daraufhin, dass ein Maximum der FAK-Aktivierung erst nach einer langen Zeitdauer erreicht wird. So haben Pongchairok und Mitarbeiter die HGF-abhängige FAK-Aktivierung in HuCC-1-Zellen untersucht und festgestellt, dass eine Stimulation mit HGF erst nach 60 min Inkubationsdauer zu einer maximalen Tyrosinphosphorylierung der FAK führt (Pongchairok et al., 2005). Eine Untersuchung in Neuroblastomzellen hat ergeben, dass eine Zunahme der FAK-Tyrosinphosphorylierung erst nach 5 min Inkubation mit IGF-I sichtbar wird und nach 15 min ein Maximum erreicht (Leventhal et al., 1996).

Es kann hiermit geschlussfolgert werden, dass verschiedene Stimulationsfaktoren oder dieselben Stimuli in unterschiedlichen Zelltypen eine unterschiedliche Kinetik der FAK-Tyrosinphosphorylierung hervorrufen können.

FAK besitzt sechs verschiedene Tyrosinresten mit unterschiedlicher Funktion. Der Tyrosinrest 397 wurde als Autophosphorylierungsstelle identifiziert (Schaller et al., 1993). Die Autophosphorylierung schafft die Voraussetzung für die Assoziation mit der SH2-Domäne der Src-Kinasen (Schaller, 1994), PI3-Kinase (Chen et al., 1996), Phospholipase-C- $\gamma$  (Zhang et al., 1999) und Grb7 (Reiske et al., 1999; Han et al., 1999). Die an den Tyrosinrest 397 gebundenen Src-Kinasen phosphorylieren wiederum die anderen FAK-Tyrosinresten, wodurch einerseits eine vollständige Aktivierung der Tyrosinkinase erreicht, und andererseits Bindungsstellen für weitere Signalproteine (Schaller, 2001) geschaffen werden.

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss von HGF und IGF-I auf die Aktivität der Autophosphorylierungsstelle 397 untersucht, um zu prüfen, ob eine Stimulation der HepG2-Zellen mit Wachstumsfaktoren eine Autophosphorylierung der FAK induziert, und ob die Kinetik der FAK-Autophosphorylierung mit dem Peak der Tyrosinphosphorylierung des gesamten FAK-Proteins übereinstimmt.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass IGF-I eine Phosphorylierung am Tyrosinrest 397 hervorrufen kann. Nach einer Inkubationsdauer von 30 s führt IGF-I zu einer sichtbaren Autophosphorylierung, die nach einer Minute ein Maximum mit einem signifikanten Anstieg um den Faktor  $4,0 \pm 0,81$  gegenüber der unstimulierten Kontrolle erreicht. Eine ähnliche Beobachtung haben Derkinderen und Mitarbeiter in Rattenhippocampuszellen gemacht (Derkinderen et al., 2001). Sie konnten nachweisen, dass die FAK-Autophosphorylierung nach einer Minute Stimulation mit Endocannabinoiden ein Maximum erreicht (Derkinderen et al., 2001). Die Untersuchung der FAK-Aktivität in Thrombozyten hat ergeben, dass Thrombin nach zwei Minuten eine maximale Tyrosinphosphorylierung an der Position 397 induziert (Relou et al., 2003). Pace und Mitarbeiter haben die Kinetik der Autophosphorylierungsstelle 397 unter dem Einfluss von CCK untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass CCK nach 2,5 min zu einer maximalen Tyrosinphosphorylierung an der Tyrosinposition 397 führt (Pace et al., 2003). Die rasche Aktivierung der FAK-Autophosphorylierungsstelle 397 auch in HepG2-Zellen legt die Vermutung nahe, dass die Autophosphorylierung den ersten Schritt der FAK-Aktivierung auf eine Stimulation darstellt.

Die vollständige Kinaseaktivität der FAK wird aber erst durch die Phosphorylierungen an den Tyrosinresten 576 und 577 im Bereich der zentralen katalytischen Domäne ermöglicht (Owen et al., 1999; Ruest et al., 2000). Die Phosphorylierung dieser Tyrosinreste wird durch die Src-Kinase katalysiert, die an die Autophosphorylierungsstelle 397 der FAK bindet (Calalb et al., 1994). Src, der Prototyp der Familie der Src-Kinasen, ist eine zytosolische Proteintyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Die Familie der Src-Kinasen zählt neun Mitglieder. Diese werden hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, spielen aber auch in anderen Geweben eine große Rolle (Pace et al., 2006; Tapia et al., 2003). Aktiviertes Src reguliert Wachstum, Differenzierung, Migration und Adhäsion von Zellen und kann als transformierendes Onkogen wirken (Brown et al., 1996). Src besteht aus einer Kinasedomäne mit dem Tyrosinrest 416, einem carboxyterminalen Ende mit dem Tyrosinrest 527 und einem aminoterminalen Ende, das eine Myristinsäure-

sequenz zur Verankerung von Src in die Zellmembran aufweist (Frame et al., 2002). Der Tyrosinrest 527 bindet im phosphorylierten Zustand an die eigene SH2-Domäne und führt damit über eine Konformationsänderung zu einer Inaktivierung der Kinase. Diese intramolekulare Hemmung kann aber durch die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten anderer Proteine, die eine viel höhere Affinität für die SH2-Domäne der Src-Kinase aufweisen, aufgehoben werden (Biscardi et al., 1999; Schaller, 2001). Die Tyrosinkinase FAK gehört zu diesen Proteinen. So weisen einige Untersuchungen daraufhin, dass die beiden Kinasen in verschiedenen Zellen einen stabilen Komplex miteinander formen, und dass für diese Interaktion die FAK-Autophosphorylierungsstelle 397 und die SH2-Domäne der Src-Kinase notwendig sind (Schaller et al., 1993; Cobb et al., 1993; Xing et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung der FAK in den Zellen erhöht ist, die mit dem Rous-Sarcoma-Virus-kodierten Onkoprotein v-Src transformiert wurden (Schaller et al., 1993; Calalb et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde die HGF- und IGF-I-abhängige FAK-Tyrosinphosphorylierung unter dem Einfluss des Src-Inhibitors PP2 untersucht, um zu prüfen, ob die Aktivierung der FAK in HepG2-Zellen Src-abhängig ist. Die Behandlung der HepG2-Zellen mit PP2 über einen Zeitraum von 60 min führte zu einer Abnahme der FAK-Tyrosinphosphorylierung auf  $57 \% \pm 17$  in Gegenwart von HGF und auf  $47 \% \pm 15$  in Gegenwart von IGF-I. PP2 ist somit in der Lage, die durch HGF und IGF-I induzierte Tyrosinphosphorylierung der FAK teilweise aufzuheben; d.h. dieser Signalweg ist zu 50 % Src-abhängig. Neben der Src-Kinase können aber noch verschiedene andere Signalproteine wie z.B. die SH2-Domäne der PLC- $\gamma$ 1 (Zhang et al., 1999) oder die p85-Untereinheit der PI3-Kinase (Chen et al., 1996) an die FAK-Autophosphorylierungsstelle 397 im phosphorylierten Zustand binden und dadurch Src-unabhängige Signalwege aktivieren.

In Swiss 3T3 Zellen haben Salazar und Rozengurt die Interaktion der beiden Tyrosinkinasen unter dem Einfluss von Bombesin und PDGF untersucht (Salazar und Rozengurt, 1999). Sie konnten nachweisen, dass sowohl Bombesin als auch PDGF eine Assoziation der FAK mit Src induziert. Während die Phosphorylierung am Tyrosinrest 577 der FAK in Gegenwart von PP2 gehemmt wurde, blieb die FAK-Src-Komplexbildung unbeeinflusst (Salazar und Rozengurt, 1999). Das bedeutet, dass die Bindung von Src an FAK unabhängig von der Src-Kinaseaktivität ist. Derkinderen und Mitarbeiter haben in Rattenhippokampuszellen beobachtet, dass eine Vorinkubation mit PP2 zu einer Hemmung der

Phosphorylierung an den Tyrosinstellen 577 und 925, nicht aber an der Tyrosinstelle 397, führt (Derkinderen et al., 2001). Die durch VEGF induzierte Tyrosinphosphorylierung der FAK an der Position 861 in Endothelzellen wurde ebenfalls durch PP2 teilweise aufgehoben, was gleichzeitig mit einer verminderten Zellmigration und einer verminderten antiapoptotischen Wirkung von VEGF einherging. Dagegen blieb die Autophosphorylierung der FAK unbeeinträchtigt (Abu-Ghazaleh et al., 2001). Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass die Autophosphorylierung der FAK und die nachfolgende Bildung eines FAK-Src-Komplexes zwar unabhängig von der Aktivität der Src-Kinase sind, die Src-Kinase aber wiederum für die vollständige Aktivierung der FAK notwendig ist.

FAK kann mit einer Vielzahl verschiedener Signal-, Adapter- und Strukturproteine assoziieren. Diese Interaktionen werden durch die Autophosphorylierung und durch Phosphorylierungen an sekundären Positionen, teilweise Src-abhängig, reguliert (Schaller, 2001). So führt die Bindung der Src-Kinase an die Autophosphorylierungsstelle 397 zu einer Tyrosinphosphorylierung an der Position 925 der FAK, wodurch die Bindung des kleinen Adapterproteins Grb2 über dessen SH2-Domäne (Schlaepfer et al., 1994, Schlaepfer et Hunter., 1996). Die Assoziation von Grb2 mit dem GDP-GTP Austauschprotein Sos führt über dem membranassoziierten kleinen G-Protein Ras und der Serin/Threoninkinase Raf zur Aktivierung der MAPK-Kaskade. Die MAP-Kinasen gehören zur Gruppe der Serin-/Threonin-Kinasen. Sie lassen sich in drei Unterfamilien gliedern: die extracellular signal-regulated kinases 1 und 2 (ERK-1 und ERK-2 bzw. p42<sup>MAPK</sup> und p44<sup>MAPK</sup>), c-Jun NH2-terminal kinases (JNK) und die p38<sup>MAPK</sup>. Während ERK1/2 in der Regel hauptsächlich nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden, wird die Aktivität der JNK und der p38-Kinase durch zellulären Stress in Form von UV-Bestrahlung oder osmotischen Schock induziert (Cobb und Goldsmith, 1995). Nach Aktivierung können die MAP-Kinasen in den Zellkern transloziert werden, wo sie über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Genexpression nehmen (Gille et al., 1992; Khokhlatchev et al., 1991). Somit könnte FAK über die Kommunikation mit dem Signalweg der MAP-Kinase in die Expression von Genen, die Wachstum und Differenzierung regulieren, eingreifen. Um die die Frage beantworten zu können, ob FAK im HCC an proliferativen Vorgängen beteiligt ist, müssen in zukünftigen Experimenten die Signaltransduktionswege im HCC aufgeschlüsselt werden, die an der MAPK-Aktivierung beteiligt sind. Weiterhin wäre es interessant zu überprüfen, welchen Einfluss die in vitro Überexpression von FAK auf die Zellphysiologie hat. Der

Einfluss auf zellphysiologische Vorgänge wie z.B. Proliferation und Migration kann über verschiedene bekannte Assays nachgewiesen werden (BrdU-Inkorporation bzw. modifizierte Boyden Chambers).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass in HepG2-Zellen ähnlich in anderen malignen Geweben FAK, nicht aber PYK2 exprimiert wird. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass FAK durch die beiden Wachstumsfaktoren HGF und IGF-I aktiviert wird. Die Aktivierung konnte durch die Tyrosinphosphorylierung und die Autophosphorylierung der FAK dargestellt werden. Sowohl HGF als auch IGF-I führen zu einer dosisabhängigen und raschen Aktivierung der Tyrosinkinase. Die FAK-Aktivierung in HepG2-Zellen ist teilweise Src-abhängig. Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle der FAK in der Signaltransduktion der beiden Wachstumsfaktoren in HepG2-Zellen hin.

## 6 Zusammenfassung

Die beiden strukturhomologen Proteintyrosinkinasen FAK und PYK2 beeinflussen das Wachstum- und Migrationsverhalten gesunder und maligner Zellen in unterschiedlicher Weise. FAK ist in vielen Tumoren überexprimiert (Weiner et al., 1993; Owens et al., 1995; Watermann et al., 2005), und einige Untersuchungen zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der FAK-Überexpression und dem invasiven Verhalten der Tumorzellen gibt (Owens et al., 1995; Slack et al., 2001; Wang et al., 2000; Cance et al., 2000). Die PYK2-Expression dagegen ist häufig im maligne entarteten Gewebe und in metastasierenden Tumorzellen herunterreguliert (Stanzione et al., 2000; Lipinski et al., 2003; Forest et al., 2005). Über die Funktion der beiden Tyrosinkinasen in der Pathogenese des HCC ist zurzeit wenig bekannt. Während die FAK-Expression in verschiedenen humanen Lebertumorzelllinien nachgewiesen werden konnte (Tu et al., 2001; Carloni et al., 2001; Zhang et al., 2003; Lee et al., 2003; Itoh et al., 2004), existieren für PYK2 bislang keine zuverlässigen Daten hinsichtlich der Expression und Regulation im HCC. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher die Expression und die intrazelluläre Aktivierung der FAK und PYK2 in einer hepatischen Tumorzelllinie. Als ein Modellsystem des HCC wurde die humane Hepatoblastomzelllinie HepG2 ausgewählt.

Die Western Blot Analysen zeigen, dass HepG2-Zellen FAK, nicht aber PYK2 exprimieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass FAK ähnlich in anderen malignen Geweben auch in diesem Modell eine übergeordnete Rolle spielt. In den folgenden Versuchen wurde daher diese Tyrosinkinase genauer untersucht. Die intrazelluläre Aktivierung und Regulation der FAK sollte nach Stimulation der HepG2-Zellen mit Wachstumsfaktoren dargestellt werden. Hierzu wurden HGF und IGF-I ausgewählt, deren Rezeptor in HepG2 exprimiert wird und die eine bedeutende Funktion in der Hepatokarzinogenese haben. Sowohl HGF als auch IGF-I führen zu einer dosisabhängigen und raschen Tyrosinphosphorylierung der FAK, die teilweise Src-abhängig ist. Die Interaktion der Tyrosinkinase FAK mit Src weist daraufhin, dass in HepG2-Zellen FAK an der intrazellulären Signaltransduktion, die durch HGF und IGF-I induziert wird, beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurden wichtige grundlegende Erkenntnisse über die Expression von FAK und PYK2 sowie die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion in einer hepatischen Tumorzelllinie gewonnen, die auf eine zentrale Stellung der FAK in der Hepatokarzinogenese hinweisen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abedi, H. und Zachary, I. (1997)**

Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells.

*J Biol Chem*, 272(24): 15442-15451

**Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M. und Zachary, I. (2001)**

Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J*, 360(Pt 1): 255-264

**Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B. B. (1979)**

Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739): 615-616

**Alexia, C., Fallot, G., Lasfer, M., Schweizer-Groyer, G. und Groyer, A. (2004)**

An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signaling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 68(6): 1003-1015

**Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D. und Damsky, C. H. (2000)**

Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol*, 149(3): 741-754

**Astier, A., Avraham, H., Manie, S. N., Groopman, J., Canty, T., Avraham, S. und Freedman, A. S. (1997a)**

The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after  $\beta$ 1-integrin stimulation in B cells and binds to p130<sup>Cas</sup>. *J Biol Chem*, 272(1): 228-232

**Astier, A., Manie, S. N., Avraham, H., Hirai, H., Law, S. F., Zhang, Y., Golemis, E. A., Fu, Y., Druker, B. J., Haghayeghi, N., Freedman, A. S. und Avraham, S. (1997b)**

The related adhesion focal tyrosine kinase differentially phosphorylates p130<sup>Cas</sup> and the Cas-like protein, p105<sup>HEF1</sup>. *J Biol Chem*, 272(32): 19719-19724

**Avraham, H., Park, S. Y., Schinkmann, K. und Avraham, S. (2000)**

RAFTK/ PYK2- mediated cellular signalling. *Cell Signal*, 12(3): 123-133

**Baron, V., Calléja, V., Ferrari, P., Alengrin, F. und Van Obberghen, E. (1998)**

p125<sup>FAK</sup> focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem*, 273(12): 7162-7168

**Beasley, R. P., Lin, C. C., Hwang, L. Y. und Chien, C. S. (1981)**

Hepatocellular carcinomas and hepatitis B virus: a prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet*, 2(8256): 1129-1133

**Biscardi, J. S., Tice, D. A. und Parsons, S. J. (1999)**

C-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res*, 76: 61-119, Review

- Brinson, A. E., Harding, T., Diliberto, P. A., He, Y., Li, X., Hunters, D., Herman, B., Earp, S. und Graves, L. M. (1998)**  
Regulation of a calcium-dependent tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells by angiotensin II and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 273(3): 1711-1718
- Brown, M. T. und Cooper, J. A. (1996)**  
Regulation, substrates and functions of Src.  
*Biochim Biophys Acta*, 1287(2-3): 121-149, Review
- Cai, T., Lei, Q. T., Wang, L. Y. und Zha, X. L. (2000)**  
TGF- $\beta$ 1 modulated the expression of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin and integrin-mediated signalling in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 274(2): 519-525
- Calalb, M. B., Polte, T. R. und Hanks, S. K. (1995)**  
Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src-family kinases. *Mol Cell Biol*, 15(2): 954-963
- Calalb, M. B., Zhang, X., Polte, T. R. und Hanks, S. K. (1996)**  
Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src.  
*Biochem Biophys Res Commun*, 228(3): 662-668
- Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S. und Xu, L. (2000)**  
Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and Colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 6(6): 2417-2423
- Carloni, V., Mazzocca, A., Pantelo, P., Cordella, C., Laffi, G. und Gentilini, P. (2001)**  
The integrin,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, is necessary for the matrix-dependent activation of FAK and MAP kinase and the migration of human hepatocarcinoma cells. *Hepatology*, 34(1): 42-49
- Cary, L. A., Chang, J. F. und Guan, J. L. (1996)**  
Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci*, 109(Pt 4): 1787-1794
- Casamassima, A. und Rozengurt, E. (1998)**  
Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130<sup>Cas</sup>, focal adhesion kinase, and paxillin. *J Biol Chem*, 273(40): 26149-26156
- Chan, P. C., Liang, C. C., Yu, K. C., Chang, M. C., Ho, W. L., Chen, B. H. und Chen, H. C. (2002)**  
Synergistic effect of focal adhesion kinase overexpression and hepatocyte growth factor stimulation on cell transformation. *J Biol Chem*, 277(52): 50373-50379
- Chauhan, D., Hideshima, T., Pandey, P., Treon, S., Teoh, G., Raje, N., Rosen, S., Krett, N., Husson, H., Avraham, S., Kharbanda, S. und Anderson K. C. (1999)**  
RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells.  
*Oncogene*, 18(48): 6733-6740

**Chen, H. C., Appeddu, P. A., Isoda, H. und Guan, J. L. (1996)**

Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 271(42): 26329-26334

**Chen, H. C., Chan, P. C., Tang, M. J., Cheng, C. H. und Chang, T. J. (1998)**

Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 273(40): 25777-25782

**Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H. und Parsons, J. T. (1994)**

Stable association of pp60<sup>Src</sup> and pp59<sup>Fyn</sup> with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125<sup>FAK</sup>. *Mol Cell Biol*, 14(1): 147-155

**Cobb, M. H. und Goldsmith, E. J. (1995)**

How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, 270(25): 14843-14846, Review

**D'Errico, A., Grigioni, W.F., Fiorentino, M., Ponzetto, A., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Brechot, C., Scoazec, J.Y. und Grigioni, W.F. (1996)**

Liver hepatocyte growth factor does not always correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: its specific receptor c-met does. *Hepatology*, 24(1): 60-64

**Darlington, G. J., Kelly, J. H. und Buffone, G. J. (1987)**

Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23(5): 349-354

**De Weerth, A., Pisegna, J. R., Huppi, K. und Wank, S. A. (1993a)**

Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of the human cholecystokinin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 194(2): 811-818

**De Weerth, A., Pisegna, J. R. und Wank, S. A. (1993b)**

Guinea pig gallbladder and pancreas possess identical CCK-A receptor subtypes: receptor cloning and expression. *Am J Physiol*, 265(6 Pt 1): G1116-G1121

**Derkinderen, P., Toutant, M., Kadaré, G., Ledent, C., Parmentier, M. und Girault, J. A. (2001)**

Dual role of Fyn in the regulation of FAK<sup>+</sup> 6,7 by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem*, 276(41): 38289-38296

**Deuffic, S., Poynard, T. und Valleron, A.J. (1999)**

Correlation between hepatitis C virus prevalence and hepatocellular carcinoma mortality in Europe. *J Viral Hepat*, 6(5): 411-413

**Dikic, L., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A. und Schlessinger, J. (1996)**

A role for PYK2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, 383(6600): 547-550

**Eble, D. M., Strait, J. B., Govindarajan, G., Lou, J., Byron, K. L. und Samarel, A. M. (2000)**

Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(5): 1695-1707

**Ellouk-Achard, S., Djenabi, S., De Oliveira, G. A., Desauty, G., Duc, H. T., Zohair, M., Trojan, J., Claude, J. R., Sarasiin, A. und Lafarge-Frayssinet, C. (1998)**

Induction of apoptosis in rat hepatocarcinoma cells by expresion of IGF-I-antisense c-DNA. *J Hepatol*, 29(5): 807-818

**Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I und Donato, F. (2004)**

Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1): S35-50

**Forest, V., Campos, L., Vergnon, J. M., Cornillon, J. und Guyotat, D. (2005)**

Characterization of the focal adhesion complex in human non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res*, 25(6B): 4135-4140

**Frame, M. C. (2002)**

Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 1602(2): 114-130, Review

**Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E. und Chan-Hui, P. Y. (1996)**

Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134(3): 793-799

**Furge, K. A., Zhang, Y. W. und Vande Woude, G. F. (2000)**

Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19(49): 5582-5589, Review

**Gille, H., Sharrocks, A. D. und Shaw, P. E. (1992)**

Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinases stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*, 358(6385): 414-417

**Hackeng, C. M., Pladet, M. W., Akkerman, J.-W. N. und van Rijn, H. J. M. (1999)**

Low density lipoprotein phosphorylates the focal adhesion-associated kinase p125<sup>FAK</sup> in Human platelets independent of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J Biol Chem*, 274(1): 384-388

**Han, D. C. und Guan, J. L. (1999)**

Associaton of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*, 274(34): 24425-24430

**Hauck, C. R., Sieg, D. J., Hsia, D. A., Loftus, J. C., Gaarde, W. A., Monia, B. P. und Schlaepfer, D. D. (2001)**

Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res*, 61(19): 7079-7090

**Hauck, C. R., Hsia, D. A., Puente, X. S., Cheresch D. A. und Schlaepfer, D. D. (2002)**

FRNK blocks v-src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J*, 21(23): 6289-6302

**Hildebrand, J. D., Taylor, J. M. und Parsons, J. T. (1996)**

An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 16(6): 3169-3178

**Hopfner, M., Huether, A., Sutter, A. P., Baradari, V., Schuppan, D. und Scherubl, H. (2006)**

Blockade of IGF-I receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular cells. *Biochem Pharmacol*, 71(10): 1435-1448

**Horiguchi, N., Takayama, H., Toyoda, M., Otsuka, T., Fukusato, T., Merlino, G., Takagi, H. und Mori, M. (2002)**

Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine. *Oncogene*, 21(12): 1791-1799

**Hungerford, J. E., Compton, M. T., Matter, M. L., Hoffstrom, B. G., und Otey, C. A. (1996)**

Inhibition of pp125<sup>FAK</sup> in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J Cell Biol*, 135(5): 1383-1390

**Ilic, D., Almeida, E. A., Schlaepfer, D. D., Dazin, P., Aizawa, S. und Damsky, C. H. (1998)**

Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol*, 143(2): 547-560

**Itoh, S., Maeda, T., Shimada, M., Aishima, S., Shirabe, K., Tanaka, S. und Maehara, Y. (2004)**

Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(8): 2812-2817

**Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. und Cobb, M. H. (1998)**

Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93(4): 605-615

**Kim, B. und Feldman, E. L. (1998)**

Differential regulation of focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinase tyrosine phosphorylation during insulin-like growth factor-I-mediated cytoskeletal reorganization. *J Neurochem*, 71(3): 1333-1336

**Kim, B. und Feldman, E. L. (2002)**

Insulin-like growth factor I prevents mannitol-induced degradation of focal adhesion kinase and Akt. *J Biol Chem*, 277(30): 27393-27400

**Lai, J. F., Kao, S. C., Jiang, S. T., Tang, M. J., Chan, P. C. und Chen, H. C. (2000)**

Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby Canine Kidney cells. *J Biol Chem*, 275(11): 7474-7480

**Lee, H. S., Huang, A. M., Huang, G. T., Yang, P. M., Chen, P. J., Sheu, J. C., Lai, M. Y., Lee, S. C., Chou, C. K. und Chen, D. S. (1998)**

Hepatocyte growth factor stimulates the growth and activates mitogen-activated protein kinase in human hepatoma cells. *J Biomed Sci*, 5(3): 180-184

**Lee, K. M. und Villereal, M. L. (1996)**

Tyrosine phosphorylation and activation of pp60<sup>c-Src</sup> and pp125<sup>FAK</sup> in bradykinin-stimulated fibroblasts. *Am J Physiol*, 270(5 Pt1): C1430-C1437

**Lee, Y. C., Tang, Y. C., Chen, Y. H., Wong, C. M. und Tsou, A. P. (2003)**

Selenite-induced survival of HuH7 hepatoma cells involves activation of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway and Rac1. *J Biol Chem*, 278(41): 39615-39624

**Leventhal, P. S., Shelden, E. A., Kim, B. und Feldman, E. L. (1997)**

Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem*, 272(8): 5214-5218

**Li, J., Avraham, H., Rogers, R. A., Raja, S. und Avraham, S. (1996)**

Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood*, 88(2): 417-428

**Li, X. und Earp, H. S. (1997)**

Paxillin is tyrosin-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem*, 272(22): 14341-14348

**Lipfert, L., Haimovich, B., Schaller, M. D., Cobb, B. S., Parsons, J. T. und Brugge, J. S. (1992)**

Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125<sup>FAK</sup> in platelets. *J Cell Biol*, 119(4): 905-912

**Lipinski, C. A., Tran, N. L., Bay, C., Kloss, J., McDonough, W. S., Beaudry, C., Berens, M. E. und Loftus, J. C. (2003)**

Differential role of proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase in determining glioblastoma migration and proliferation. *Mol Cancer Res*, 1(5): 323-332

**Liu, P., Terradillos, O., Renard, C. A., Feldmann, G., Buendia, M. A. und Berneau, D. (1997)**

Hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus/c-myc mice: sustained cell proliferation and biphasic activation of insulin-like growth factor II. *Hepatology*, 25(4): 874-883

**Ljubimova, J. Y., Petrovic, L. M., Wilson, S. E., Geller, S. A. und Demetriou, A. A. (1997)**

Expression of HGF, its receptor c-met, c-myc, and albumin in cirrhotic and neoplastic human liver tissue. *J Histochem Cytochem*, 45(1): 79-87

**Luo, Y. Q., Wu, M. C. und Cong, W. M. (1999)**

Gene expression of hepatocyte growth factor and its receptor in HCC and nontumorous liver tissues. *World J Gastroenterol*, 5(2): 119-121

**Luo, S. M., Tan, W. M., Deng, W. X., Zhuang, S. M. und Luo, J. W. (2005)**

Expression of albumin, IGF-I, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 11(27): 4272-4276

**Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J und Salgia, R. (2003)**

c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition.

*Cancer Metastasis Rev*, 22(4): 309-325

**Matsumoto, K., Matsumoto, K., Nakamura, T. und Kramer, R. H. (1994)**

Hepatocyte growth factor/ Scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 269(50): 31807-31813

**Maulik, G., Kijima, T., Ma, P. C., Ghosh, S. K., Lin, J., Shapiro, G. I., Schaefer, E., Tibaldi, E., Johnson, B. E. und Salgia, R. (2002)**

Modulation of the c-met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer.

*Clin Cancer Res*, 8(2): 620-627

**Nakamura, T., Teramoto, H. und Ichihava, A. (1986)**

Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 83(17): 6489-6493

**Nakanishi, K., Fujimoto, J., Ueki, T., Kishimoto, K., Hashimoto-Tamaoki, T., Furuyama, J., Itoh, T., Sasaki, Y. und Okamoto, E. (1999)**

Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via PI3-kinase. *Clin Exp Metastasis*, 17(6): 507-514

**Ohba, T., Ishino, M., Aoto, H. und Sasaki, T. (1998)**

Interactions of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase  $\beta$  with SH3 domains of p130<sup>Cas</sup>-related proteins and a GTPase-activating protein, Grb2.

*Biochem J*, 330(Pt 3): 1249-1254

**Okada, S. (1998)**

Chemotherapy in hepatocellular carcinoma.

*Hepatogastroenterology*, 45 (Suppl 3): 1259-1263

**Oktay, M., Wary, K. K., Dans, M., Birge, R. B. und Giancotti, J. (1999)**

Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signalin to Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle.

*J Cell Biol*, 145(7): 1461-1469

**Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W. und Hanks, S. K. (1999)**

Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-Null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of PYK2.

*Mol Cell Biol*, 19(7): 4806-4818

**Owens, L. V., Xu L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T. und Cance, W. G. (1995)**

Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors.

*Cancer Res*, 55(13): 2752-2755

**Pace, A., Garcia-Marin, L. J., Tapia, J. A., Bragado, M. J. und Jensen R. T. (2003)**  
Phosphospecific site tyrosine-phosphorylation of p125<sup>FAK</sup> and proline-rich kinase 2 is differentially regulated by choleystokinin receptor type A activation in pancreatic acini. *J Biol Chem*, 278(21): 19008-19016

**Pace, A., Tapia, J. A., Garcia-Marin, M. J. und Jensen, R. T. (2006)**  
The src family kinase, Lyn, is activated in pancreatic acinar cells by gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors which stimulate its association with numerous other signaling molecules. *Biochim Biophys Acta*, 1763(4): 356-365

**Pandey, P., Avraham, S., Place, A., Kumar, V., Majumder, P. K., Cheng, K., Nakazawa, A., Saxena, S. und Kharbanda, S. (1999a)**  
Bcl-xL blocks activation of related adhesion focal tyrosine kinase/ proline-rich tyrosine kinase 2 and stress-activated protein kinase/ c-Jun N-terminal protein kinase in the cellular response to methylmethane sulfonate. *J Biol Chem*, 274(13): 8618-8623

**Pandey, P., Avraham, S., Nakazawa, A., Place, A., Ghanem, L., Rhana, A., Kumar, V., Majumder, P. K., Avraham, H., Davis, R. J. und Kharbanda, S. (1999b)**  
Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by PYK2: related adhesion focal tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 274(15): 10140-10144

**Parkin, D.M. (2001)**  
Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, 2: 533-543

**Parsons, J. T. (2003)**  
Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8): 1409-1416, Review

**Pawson, T. (1994)**  
SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv Cancer Res*, 64: 87-110

**Pisani, P., Parkin, D. M. und Ferlay, J. (1993)**  
Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer*, 55(6): 891-903

**Polte, T. R. und Hanks, S. K. (1997)**  
Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130<sup>Cas</sup>) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation *J Biol Chem*, 272(9): 5501-5509

**Pongchairerk, U., Guan, J. L. und Leardkamolkarn, V. (2005)**  
Focal adhesion kinase and Src phosphorylations in HGF-induced proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line, HuCCA-1. *World J Gastroenterol*, 11(37): 5845-5852

**Puisieux, A. und Ozturk, M. (1997)**  
TP53 and hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol (Paris)*, 45(10): 864-870

**Qiang, Y. W., Yao, L., Tosato, G. und Rudikoff, S. (2004)**  
Insulin-like growth factor I induce migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood*, 103(1): 301-308

**Rankin, S. und Rozengurt, E. (1994)**

Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 269(1): 704-710

**Reiske, H. R., Kao, S. C., Cary, L. A., Guan, J. L., Lai, H. C., und Chen, J. (1999)**

Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*, 274(18): 12361-12366

**Relou, I. A. M., Bax, L. A. B., van Rijn, H. J. M. und Akkerman, J.-W. (2003)**

Site-specific phosphorylation of platelet focal adhesion kinase by low-density lipoprotein. *Biochem J*, 369 (Pt 2): 407-416

**Richardson, A. und Parsons, J. T. (1996)**

A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125<sup>FAK</sup>. *Nature*, 380(6574): 538-540

**Rozengurt, E. (1995)**

Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv*, 24: 81-96

**Ruest, P. J., Roy, S., Shi, E., Mernaugh, R. L. und Hanks, S. K. (2000)**

Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth Differ*, 11(1): 41-48

**Salazar, E. P. und Rozengurt, E. (1999)**

Bombesin and platelet-derived growth factor induce association of endogenous focal adhesion kinase with Src in intact Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 274(40): 28371-28378

**Sasaki, H., Nagura, K., Ishino, M., Tobioka, H., Totani, K. und Sasaki, T. (1995)**

Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem*, 270(36): 21206-21219

**Schaller, M. D. (2001)**

Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1540(1): 1-21, Review

**Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, F. W., Vines, R. R. und Parsons, J. T. (1994)**

Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125<sup>FAK</sup>, directs SH2-dependent binding of pp60<sup>Src</sup>. *Mol Cell Biol*, 14(3): 1680-1688

**Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. und van der Geer, P. (1994)**

Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372(6508): 786-791

**Schlaepfer, D. D. und Hunter, T. (1996)**

Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 16(10): 5623-5633

**Schlaepfer, D. D., Broome, M. A. und Hunter, T. (1997)**

Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: Involvement of the Grb2, p130<sup>Cas</sup> and Nck adaptor proteins.

*Mol Cell Biol*, 17(3): 1702-1713

**Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. und Sieg, D. J. (1999)**

Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4): 435-478

**Schwartz, M. A., Schaller, M. D., und Ginsberg, M. H. (1995)**

Integrins: emerging paradigms of signal transduction.

*Annu Rev Cell Dev Biol*, 11: 549-599

**Sekimoto, H., Eipper-Mains, J., Pond-Tor, S. und Boney, C. M. (2005)**

(alpha)v(beta)3 integrins and PYK2 mediate insulin-like growth factor I activation of Src and mitogen-activated protein kinase in 3T3-L1 cells.

*Mol Endocrinol*, 19(7): 1859-1867

**Seufferlein, T. und Rozengurt, E. (1994)**

Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. *J Biol Chem*, 269(12): 9345-9351

**Sieg, D. J., Duško, I., Jones, K. C., Damsky, C. H., Hunter, T. und Schlaepfer, D. D. (1998)**

PYK2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but PYK2 does not fully function to enhance FAK cell migration. *Embo J*, 17(20): 5933-5947

**Sieg, D. J., Hauck, C. R. und Schlaepfer, D. D. (1999)**

Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration.

*J Cell Science*, 112(Pt 16): 2677-2691

**Sinnett-Smith, J., Zachary, I., Valverde, A. M. und Rozengurt, E. (1993)**

Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation.

*J Biol Chem*, 268(19): 14261-14268

**Slack, J. K., Adams, R. B., Rovin, J. D., Bissonette, E. A., Stoker, C. E. und Parsons, J. T. (2001)**

Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene*, 20(10): 1152-1163

**Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S. K. und Kasahara, T. (2000)**

Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem*, 276(21): 16309-16315

**Sorokin, A., Kozlowski, P., Graves, L. und Philip, A. (2001)**

Protein-tyrosine kinase PYK2 mediates endothelin-induced p38 MAPK activation in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*, 276(24): 21521-21528

**Spiegel, M. (2000)**

Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor. *Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.*

**Stanzione, R., Picascia, A., Chieffi, P., Imbimbo, C., Calmieri, A., Mirone, V., Stai-bano, S., Franco, R., De Rosa, G., Schlessinger, J. und Tramontano, D. (2001)**

Variations of proline-rich kinase PYK2 expression correlate with prostate cancer progres-sion. *Lab Invest, 81(1): 51-59*

**Su, J. M., Wang, L. Y., Liang, Y. L. und Zha, X. L. (2005)**

Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World J Gastroenterol, 11(30): 4667-4673*

**Susa M. (1999)**

Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone. *Int J Mol Med, 3(2): 115-126*

**Tai, Y. T., Podar, K., Catley, L., Tseng, Y. H., Akiyama, M., Shringarpure, R., Bur-ger, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Munshi, N. C., Kahn, C. R., Mitsiades, C. und Anderson, K. C. (2003)**

Insulin-like growth factor-I induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of  $\beta 1$ -integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/ Akt signaling. *Cancer Res, 63(18): 5850-5858*

**Tang, H., Zhao, Z. J., Landon, E. J. und Inagami, T. (2000)**

Regulation of calcium-sensitive tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in endothelial cells. *J Biol Chem, 275(12): 8389-8396*

**Tapia, J. A., Ferris, H. A., Jensen, R. T. und Garcia, L. J. (1999)**

Cholecystokinin activates PYK2/CAK $\beta$  by a phospholipase C-dependent mechanism and its association with the mitogen-activated protein kinase signalling pathway in pancreatic acinar cell. *J Biol Chem, 274(44): 31261-31271*

**Tapia, J. A., Garcia-Marin, L. J. und Jensen, R. T. (2003)**

Cholecystokinin-stimulated protein kinase C- $\delta$  kinase activation, tyrosine phosphoryla-tion, and translocation are mediated by src tyrosine kinases in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem, 278(37): 35220-35230*

**Tavian D., De Petro, G., Benetti, A., Portolani, N., Giulini, S. M. und Barlati, S. (2000)**

u-Pa and c-met mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer, 87(5): 644-649*

**Tsai, T. F., Yauk, Y. K., Chou, C. K., Ting, L. P., Chang, C., Hu, C. P. Han, S. H. und Su, T. S. (1988)**

Evidence of autocrine regulation in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun, 153(1): 39-45*

**Tu, L. C., Chou, C. K., Chen, H. C. und Yeh, S. F. (2001)**

Protein kinase c-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *J Biomed Sci*, 8(2): 184-190

**Wang, D., Grammer, J. R., Cobbs, C. S., Stewart, J. E., Jr, Liu, Z., Rhoden, R., Hecker, T. P., Ding, Q. und Candece, L. G. (2000)**

p125 focal adhesion kinase promotes malignant astrocytoma cell proliferation in vivo. *J Cell Sci*, 113(Pt 23): 4221-4230

**Wang, J. G., Miyazu, M., Matsushita, E., Sokabe, M. und Naruse, K. (2001)**

Uniaxial cyclic stretch induces focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation followed by mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(2): 356-361

**Watermann, D. O., Gabriel, B., Jäger, M., Orłowska-Volk, M., Hasenburg, A., Zur Hausen, A., Gitsch, G. und Stickeler, E. (2005)**

Specific induction of pp125 focal adhesion kinase in human breast cancer. *Br J Cancer*, 93(6): 694-698

**Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J. und Cance, W. G. (1993)**

Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 342(8878): 1024-5

**Wu, S. S., Chiu, T. und Rozengurt, E. (2002)**

Ang II and LPA induce PYK2 tyrosine phosphorylation in intestinal epithelial cells: role of  $Ca^{2+}$ , PKC, and Rho kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(6): 1432-1444

**Xie, Q., Liu, K. D., Hu, M. Y. und Zhou, K. (2001)**

SF/ HGF-c-Met autocrine and paracrine promote metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 7(6): 816-820

**Xing, Z., Chen, H. C., Nowlen, J. K., Taylor, S. J., Shalloway, D. und Guan, J. L. (1994)**

Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell*, 5(4): 413-421

**Xiong, W. und Parsons, J. T. (1997)**

Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem*, 272(2): 529-539

**Zachary, I., Sinnott-Smith, J. und Rozengurt, E. (1992)**

Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 267(27): 19031-19034

**Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G. und Hanks, S. K. (1999)**

Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma 1 activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 96(16): 9021-9026

**Zhang, L., Yu, Q., He, J. and Xiliang, Z. (2004)**

Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines. *Mol Cell Biochem*, 262(1-2): 25-33

**Zhao, J. H., Reiske, J. L. und Guan, J. (1998)**

Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 143(7): 1997-2008

**Zheng, C., Xing, Z., Bian, C., Guo, C., Akbay, A., Warner, L. und Guan, J. L. (1998)**

Differential regulation of PYK2 and focal adhesion kinase (FAK).

*J Biol Chem*, 273(4): 2384-2389

## 8 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Andreas de Weerth danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses Themas sowie die Bereitschaft, meine Dissertation als Doktorvater zu betreuen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Andrea Pace für die Einführung in das Arbeitsthema und die intensive Betreuung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente bedanken. Seine ausführlichen Erklärungen und hilfreichen Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn PD. Dr. Micheal Bläker bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und die fachliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die praktische Unterstützung im Labor und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Mein aufrichtiger Dank geht an Inke Stange, Martina Schulz, Nina Pluntke, Dr. Sibyll Hein und Kathrin Berke.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Alev Tulun
Geburtsdatum	18.03.1981
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

---

1988 - 1992	Grundschule Arnkielstrasse
1992 - 1993	Realschule Arnkielstrasse
1993 - 2000	Gymnasium Bahrenfeld
06/2000	Abitur

### Studium

---

10/2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/2002	Physikum
09/2003	1. Staatsexamen
09/2005	2. Staatsexamen 3. Staatsexamen voraussichtlich 04/2007

### Praktisches Jahr

---

04/2006 – 08/2006	Pädiatrie, Altonaer-Kinderkrankenhaus, Hamburg
08/2006 – 12/2006	Innere Medizin, UKE, Hamburg
12/2006 – 01/2007	Allgemeinchirurgie, AK-Altona, Hamburg
02/2007 – 03/2007	Kinderchirurgie, Altonaer-Kinderkrankenhaus, Hamburg

## 10 Erklärung

### Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Alev Tulun