

## A. Zusammenfassung

Die Proteintyrosinkinase FAK ist maßgeblich an der integrinvermittelten Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Sie nimmt aber auch eine besondere Stellung im Rahmen der Signaltransduktion, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bzw. Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöst wird, ein. Die Bedeutung von FAK und der ihr homologen Tyrosinkinase Pyk2 im Osteoblasten wurde bisher nur in geringem Umfang untersucht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, welche Stellung FAK in der durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor) bzw. PTH (Parathyroidhormon) induzierten Signaltransduktion in osteoblastischen Zellen einnimmt. Hierzu wurde ein Zellsystem etabliert, das die parallele Untersuchung von sehr frühen Vorläufern der osteoblastischen Linie (*str-Zellen*) und einer Population von Präosteoblasten/Osteoblasten (*psp-Zellen*) erlaubt.

Es stellte sich hierbei heraus, daß in den *str-Zellen* zwar die PDGF-, nicht aber die PTH-Stimulation eine Autophosphorylierung, also Aktivierung, von FAK hervorruft. In den differenzierteren *psp-Zellen* können beide Stimuli FAK aktivieren. Dieses Phänomen beruht nicht auf der mRNA-Expression der Rezeptorgene. Die Expression aller drei Rezeptoren ist in den *str-Zellen* erhöht gegenüber den *psp-Zellen*.

Die Analyse der Signaltransduktionswege vom PDGF-Rezeptor zu FAK zeigte, daß in beiden Zelltypen die durch PDGF generierten Signale über PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), nicht aber über PKC (Proteinkinase C) vermittelt werden. Die direkte Aktivierung von PKC über PMA (Phorbol-12-Myristyl-14-Acetat) ruft allerdings in den *str-Zellen* eine FAK-Aktivierung hervor. Dies zeigt, daß FAK in diesen Zellen durch PKC aktiviert werden kann, diese Kinase aber in der PDGF-vermittelten Signaltransduktion zu FAK keine Rolle spielt. In den *psp-Zellen* ruft PMA eine nur schwache Aktivierung von FAK hervor. Dies weist daraufhin, daß PKC in den *psp-Zellen* auch in anderen Signaltransduktionswegen keinen essentiellen Einfluß auf FAK ausübt.

Die Analyse der PTH-induzierten FAK-Aktivierung zeigte, daß die Signale in den *psp-Zellen* über PKA (Proteinkinase A) und nicht über PKC zu FAK vermittelt werden. Die direkte Stimulierung von PKA über Forskolin zeigte, daß auch diese in den *str-Zellen* keine FAK-Aktivierung hervorrief. In den *psp-Zellen* hingegen wurde nach Forskolin-Stimulation sogar ein stärkerer Anstieg der FAK-Autophosphorylierung beobachtet als durch PTH. Diese Ergebnisse zeigen, daß in den *str-Zellen* FAK nicht in die PTH-vermittelte Signaltransduktion involviert ist und auch gegen die Stimulation durch PKA

unempfindlich reagiert. In den psp-Zellen hingegen rufen sowohl die Stimulation mit PTH als auch die direkte Aktivierung von PKA eine FAK-Aktivierung hervor.

Auch das Zytoskelett und die subzelluläre Lokalisation von FAK scheinen von Bedeutung für die PDGF-vermittelte Signaltransduktion zu sein: die Beeinträchtigung der Neuformation von Aktinfasern durch CytochalasinD reduziert die nach PDGF-Stimulation beobachtete FAK-Autophosphorylierung stark. Weiterhin konnte nach PDGF-Gabe eine Lokalisationsveränderung von FAK beobachtet werden: in unstimulierten Zellen ist FAK eher perinukleär lokalisiert, nach PDGF-Gabe hingegen über das gesamte Plasma verteilt und in den Fokalkontakten in der Peripherie der Zellen lokalisiert. Dies legt den Schluß nahe, daß FAK durch ein intaktes Zytoskelett in die Fokalkontakte geleitet wird, um dort mit anderen Signalproteinen in Kontakt zu treten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen im Vergleich zu normalen humanen Osteoblasten untersucht. Es zeigte sich hierbei, daß sowohl normale Osteoblasten als auch Tumorosteoblasten eine distinkte FAK- und Pyk2-Expression auf Proteinebene aufweisen. Die quantitative mRNA-Analyse über Real-Time-PCR zeigte, daß die FAK-Expression in den Osteosarkomen den normalen Osteoblasten entspricht, die Pyk2-Expression jedoch im Tumor herunterreguliert ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für das Prostatakarzinom veröffentlicht.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Einbindung von FAK in die PDGF- bzw. PTH-vermittelte Signaltransduktion in osteoblastischen Zellen analysiert. Es ergab sich hierbei das Grundgerüst für ein Signaltransduktionsmodell, das durch erweiterte Analysen vervollständigt werden sollte. Ebenso wurden erste Anhaltspunkte für die Bedeutung von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen gewonnen. Die weitere Analyse der Signaltransduktion von FAK und Pyk2 besonders in inasiven Tumorosteoblasten könnte eine Basis für neue Therapieansätze darstellen.