



Zusammenfassung

Die Rezeptortyrosinkinase MET und ihr Ligand, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Scatter-Faktor (HGF), steuern lebenswichtige Prozesse, wie Überleben, Proliferation, Differenzierung und Motilität von Zellen. Die HGF-induzierte MET-Signalübertragung ist entscheidend sowohl für die Embryonalentwicklung als auch die Geweberegeneration im Erwachsenenalter. Eine Dysregulation des HGF/MET-Signalwegs kann die Tumorentstehung und Metastasierung fördern. Die Liganden-vermittelte MET-Aktivierung ist abhängig von Isoform der CD44v6. Diese Transmembranproteine CD44v6 haben zwei Funktionen: der extrazelluläre Teil reguliert die Phosphorylierung von MET, wohingegen die zytoplasmatische Domäne an der Internalisierung von MET und der daraus resultierenden Signalübertragung beteiligt ist. Neben dem humanen Liganden HGF kann der Ligand Internalin B (InIB) an Met binden, welcher auf der Zelloberfläche des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* exprimiert ist. In diesem Fall induziert InIB die ebenfalls CD44v6-abhängige Aktivierung von MET, was dessen Internalisierung zusammen mit dem Bakterium zur Folge hat.

Co-Immunpräzipitation mit MET, CD44v6 und den Liganden HGF oder InIB zeigten indirekt die Bildung eines trimeren Komplexes in Tumoren und mehreren Zelllinien. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass HGF nur an Zellen bindet, die CD44v6 exprimieren. So wurde mittels Microscaler Thermophorese eine physische Assoziation in Lösung zwischen der Ektodomäne zwischen CD44v6 mit HGF beziehungsweise CD44v6 und InIB nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde in Lösung keine Bindung zwischen MET und CD44v6 beobachtet, aber das Verhalten von Proteinen in lebenden Zellen kann aufgrund der durch die Plasmamembran auferlegten Beschränkungen anders sein. Außerdem ist der Bindungsmechanismus zwischen CD44v6 und den Liganden von MET in lebenden Zellen noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von MET und CD44v6 während der MET-Aktivierung untersucht. Habe ich die Oligomerisierung und Mobilität von MET und CD44v6 während der MET-Aktivierung an der Plasmamembran charakterisiert.

In diesem Zusammenhang beobachteten wir mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) - Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM) eine direkte Interaktion zwischen CD44v6 und MET nach Induktion mit HGF oder InIB in T-47D-Zellen. Darüber hinaus wurde



mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) eine verringerte Mobilität von CD44v6 bei der Interaktion mit MET und HGF festgestellt, was die Bildung eines oligomeren Komplexes aus CD44v6-MET-HGF bestätigt. Außerdem wurde in T-47D-Zellen mittels FCS gezeigt, dass die Dimerisierung von CD44v6 durch HGF oder InlB induziert wird.

Interessanterweise führte die Bindung der beiden Liganden an CD44v6 auch zu einem Anstieg der Mobilität des Co-Rezeptors CD44v6 in der Membran. Die Reduktion von Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin induzierte einen vergleichbaren Anstieg der Mobilität von CD44v6. Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass CD44v6 aus einer Lipiddomäne herausgelöst werden kann, anschließend dimerisiert und mit dem Liganden HGF interagiert. Des Weiteren untersuchten wir die Rolle der Lipiddomänen im Aktivierungsprozess von MET in HeLa-Zellen. Zu diesem Zweck fokussierten wir uns auf die Hauptbestandteile der Lipiddomänen wie Cholesterin und Sphingomyelin und untersuchten die Phosphorylierung von MET und dessen nachgeschalteten Zielmolekülen. Keine der Targeting-Strategien beeinflusste die MET- oder ERK-Phosphorylierung. Dies lässt vermuten, dass die MET-Aktivierung unabhängig von Lipiddomänen ist.

Zusammenfassend stimmen unsere Daten mit einem Modell überein, bei dem CD44v6 aus den begrenzten Lipiddomänen rekrutiert wird, dimerisiert und an HGF oder InlB bindet. Dieser Komplex würde dann den MET-Proteinen präsentiert werden, um einen oligomeren, aktiven Komplex für die Signalgebung zu bilden.