

# **Die SRC-Tyrosinkinase in Synovialen Sarkomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sebastian Yves Friedrich Michels

aus Bergisch Gladbach

2016

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H.-P. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.10.2016

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Kristiansen

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Synovialsarkome	10
1.2	Die SS18-SSX Fusionsproteine	13
1.3	Tyrosinkinase sind Mediatoren der Signaltransduktion	16
1.4	Die SRC-Tyrosinkinase: Prototyp eines Onkogens	17
1.5	Funktion und Regulierung der SRC-Tyrosinkinase in Neoplasien	19
1.6	Die „Insulin-like growth factor I receptor“-Signalkaskade	24
1.7	Die Bedeutung von FAK und der Rho-GTPasen in der Tumorzellmotilität	26
1.8	Der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib	28
1.9	Fragestellung	29
1.10	Hinweise zur Publikation	30
<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	Patientenkollektiv	31
2.2	Immunhistochemische Untersuchungen	31
2.2.1	Immunhistochemische Untersuchungen der primären Synovialsarkome	31
2.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen der Xenotransplantate	32
2.3	Zelllinien und allgemeine Zellkulturbedingungen	33
2.4	Das <i>in vitro</i> Synovialsarkom-Modell	34
2.4.1	Prinzip der Erstellung des <i>in vitro</i> Synovialsarkom-Modells	34
2.4.2	Erstellung der DNA-Inserts	34
2.4.3	Die Erstellung des Entry-Vektors	36
2.4.4	Rekombination und Klonierung des Destination-Vektors	38
2.4.5	Selektion der transformierten <i>E. coli</i> -Bakterien sowie Plasmid-Aufreinigung	41
2.4.6	Expression der Inserts in pT-REx-293-Zellen	42
2.5	Proteinanalysen	44
2.5.1	Gewinnung von Proteinlysaten	44
2.5.2	Proteinanalysen im Westernblot	45
2.5.3	Der Phospho-Kinase Array	47
2.6	RNA-Analysen	48

2.6.1	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	48
2.6.2	Analyse der RNA-Expression mittels Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese	49
2.7	IGF-2-Stimulationsversuch	51
2.8	Allgemeines zur Behandlung mit Dasatinib	52
2.9	siRNA-Knockdown	52
2.10	Proliferations- und Apoptoseuntersuchungen	54
2.10.1	Proliferationsuntersuchungen	54
2.10.2	Durchflusszytometrische Untersuchungen	55
2.10.3	Quantifizierung der Apoptoserate mittels DAPI-Färbung	56
2.11	Zellmotilitäts- und Invasionsanalysen	58
2.11.1	Untersuchung der Zellmotilität im „wound scratch assay“	58
2.11.2	Motilitätssanalysen mittels Boyden- und Invasion-Chambers	58
2.11.3	Kolorimetrische Bestimmung der Aktivität der Rho-GTPasen	60
2.12	Xenotransplantate synovialer Sarkome und Therapie mit Dasatinib <i>in vivo</i>	61
2.13	Statistische Tests	62
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Zellen synovialer Sarkome zeigen eine hohe Expression von aktiviertem SRC	63
3.2	Humane Synovialsarkome weisen ein erhöhtes Level von aktiviertem SRC auf	64
3.3	Die Expression von SS18-SSX in TReX-293 führt zur Aktivierung von SRC	66
3.4	Die Aktivierung von SRC in Synovialsarkomen ist abhängig von IGF-2	67
3.5	SRC ist essentiell für die Vitalität von Synovialsarkomzellen	70
3.6	Die Hemmung von SRC führt zu einer Deaktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden	71
3.7	Die Behandlung mit Dasatinib verringert die Proliferationsrate und induziert Apoptose in Zellen synovialer Sarkome	72
3.8	Die Kombination von Dasatinib und konventionellen Chemotherapeutika zeigt additive Effekte in Zellen synovialer Sarkome	74



3.9	Dasatinib hemmt die Migrations- und die Invasionsfähigkeit von Zellen synovialer Sarkome	77
3.10	Inhibition der SRC Kinase durch Dasatinib führt in Synovialsarkom-Zellen zu einer Verminderung der Aktivität von Rac-1 und einer Zunahme der Aktivität von RhoA	79
3.11	Unter Dasatinib kommt es zur Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit von Tumor-Xenotransplantaten in athymischen Nacktmäusen	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1	Synoviale Sarkome weisen eine hohe Expression von aktiviertem SRC auf	83
4.2	Die Aktivierung der SRC-Tyrosinkinase durch SS18-SSX ist IGF-2-vermittelt	84
4.3	Die Blockade von SRC führt zur Inhibition onkogener Eigenschaften	85
4.4	Die Abhängigkeit synovialer Sarkome vom IGF-1R/SRC-Signalweg - Translationaler Bezug zur Klinik und therapeutische Möglichkeiten	88
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

* , ** , ***	Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ , $p < 0,01$ , $p < 0,001$
ACT-D	Actinomycin-D
Asp	Asparaginsäure
BMMSC	Bone marrow derived mesenchymal stem cells
bp	Base pairs
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
CDK4/6	Cyclin dependent kinase 4/6
cleaved PARP	Cleaved poly-ADP-ribose polymerase
CSK	C-terminal SRC-kinase
c-SRC	Cellular sarcoma-Gen, vgl. SRC
c-SRC	Cellular sarcoma-Protein, vgl SRC
CT-Antigen	Cancer-testis-Antigen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Deoxyribonucleic acid
DOXO	Doxorubicin/Adriamycin
DTT	Dithiothreitol
EGFR	Epithelial-derived growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

FAK	Focal adhesion kinase
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
FBS	Fetales bovines Serum
GDI	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GIST	Gastrointestinaler Stomatumor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HRP	Horseradish peroxidase
IC50	Inhibitory concentration 50 %
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
<i>IGF-1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor-Gen
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
<i>IGF-2</i>	Insulin-like growth factor 2-Gen
IGFBP5/7	Insulin-like growth factor binding protein 5/7
JAK2	Janus kinase 2
KRAB	Krüppel-associated box
MAPK	Mitogen activation protein kinase
mTOR	Mamalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
PALETTE	Pazopanib explored in soft-tissue sarcoma - a phase 3 study, Verbundprojekt zur Erforschung von Pazopanib in der Therapie von Weichgewebssarkomen
PBS	Phosphate buffered saline

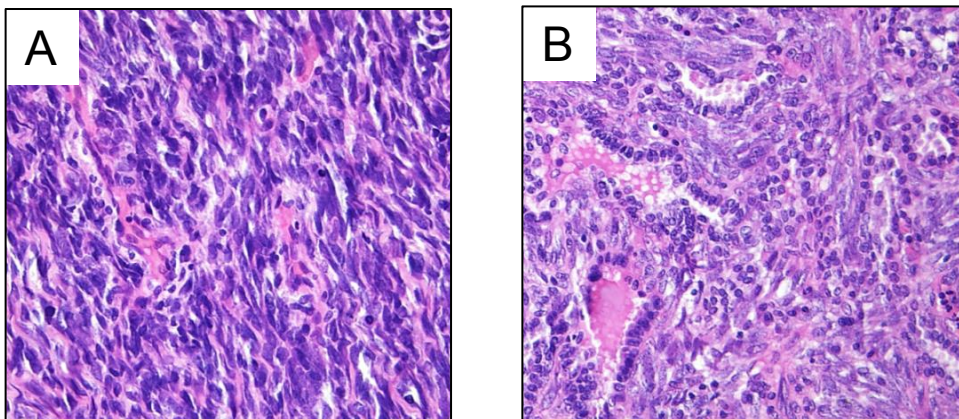
PcG	Polycomb-group
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
pHH3	Phospho-(Ser10)-Histon H3
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	Phosphotyrosin-Phosphatase
PTP1B	Phosphotyrosin-Phosphatase 1B
<i>PTP1B</i>	Phosphotyrosin-Phosphatase 1B-Gen
QPGY	Glutamin, Prolin, Glycin, Tyrosin
rpm	Rounds per minute
RNA/RNS	Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standard error of the mean
Ser	Serin
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SH2/3/4	SRC-homology 2/3/4
SNH	SNF-1 homology
SRC	Humanes SRC-Protein, vgl. c-SRC
<i>SRC</i>	Humanes SRC-Gen, vgl. c- <i>SRC</i>
<i>SS18</i>	Synovial sarcoma translocation chromosome 18-Gen
<i>SS18</i>	Synovial sarcoma translocation chromosome 18-Protein
<i>SSX1/2/3</i>	Synovial sarcoma X-Gen 1/2/3
<i>SSX1/2/3</i>	Synovial sarcoma X-Protein 1/2/3
SSXRD	SSX-repression domain
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
Thr	Threonin
TMA	Tissue-microarray
Tyr	Tyrosin
VCR	Vincristin
<i>v-scr</i>	Viral sarcoma-Gen
v-SRC	Viral sarcoma-Protein

## 1. Einleitung

### 1.1 Synovialsarkome

Synoviale Sarkome sind hochmaligne Weichgewebstumore, welche bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen und Kindern auftreten und ungefähr 5-10 % aller Weichgewebssarkome ausmachen. Über 70 % aller Patienten sind bei Erstdiagnose zumindest 20 Jahre alt, wobei das mittlere Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 30 Jahren liegt. Die Geschlechterverteilung ist leicht zuungunsten des männlichen Geschlechtes verschoben. In der Literatur sind primäre Synovialsarkome in nahezu allen Körperregionen dokumentiert. Fast die Hälfte aller Synovialsarkome finden sich jedoch an der unteren Körperextremität, meist in der Umgebung der großen Gelenke. Ein Viertel aller Fälle manifestiert sich an den oberen Extremitäten, deutlich seltener sind die Kopf-Hals-Region, das Retroperitoneum sowie Herz und Lunge befallen (Miettinen, 2010; Raney, 2005; Singer, 1996; Spillane, 2000).



**Abb. 1:** Mikroskopische Aufnahmen eines (A) monophasischen Synovialsarkoms und (B) eines biphasischen Synovialsarkoms (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 20-fache Vergrößerung).

In der histopathologischen Begutachtung imponieren Synovialsarkome morphologisch uneinheitlich. Man unterscheidet neben Tumoren mit einer monophasischen und einer biphasischen solche mit undifferenzierter Histologie (siehe Abbildung 1). Nicht selten kommen diese Wuchsmuster parallel in einem Tumor vor, meist in unterschiedlicher Ausprägung und Differenzierung.

Zwischen 20 % und 30 % aller synovialen Sarkome weisen bei Vorliegen einer epithelialen Komponente auch eine spindelzellige Komponente, also eine biphasische Differenzierung auf. Dabei kann es zur Ausbildung solider epithelialer Strukturen bis hin zu drüsenartigen Komplexen kommen. Die stromale Komponente ist durch uniforme spindelförmige Zellen charakterisiert. Weitaus häufiger finden sich monophasische Synovialsarkome (50-60 %), mit spindelförmigen, in Faszikeln oder Lamellen angeordneten Zellen. Undifferenzierte synoviale Sarkome zeichnen sich vielfach durch kleinerkalibrige Zellen sowie eine Mitoserate von mehr als 15 Mitosen auf 10 Gesichtsfelder aus (Miettinen, 2010).

Synovialsarkome stammen, anders als historisch angenommen und entgegen ihrem Namen histopathologisch nicht von synovialen Gewebe ab. Arbeiten an transgenen Mäusen sowie murinen *in vitro* Stammzellmodellen lassen hingegen auf eine Entstehung aus mesenchymalen Stammzellen, insbesondere myogenen Vorläuferzellen schließen (Haldar et al., 2007; Naka et al., 2010) (siehe Kapitel 1.2), welche durch die Expression des Fusionsproteins SS18-SSX2 transformiert werden.

Obgleich uneinheitlich hinsichtlich des histologischen Wachstumsmusters, molekular weisen 95 % der Tumoren unabhängig vom histologischen Subtyp eine spezifische Translokation zwischen Chromosom 18 und dem X-Chromosom t(X;18)(p11.2;q11.2) auf, welche als pathognomonisch für Synovialsarkome angesehen wird (Sandberg und Bridge, 2002) (siehe Kapitel 1.2). Das Ergebnis ist die Fusion der kodierenden Sequenzen des SS18-Gens und eines Gens der SSX-Familie, dessen Produkt ein chimäres Translokationsprotein SS18-SSX kodiert. Bei bislang fünf bekannten Varianten des SSX-Gens sind in Synovialsarkomen nur Translokationen zwischen SS18 und SSX1 oder SSX2 sowie sehr selten SSX4 beschrieben (Clark et al., 1994; Güre et al., 1997; Shipley et al., 1994; Skytting et al., 1999; Turc-Carel et al., 1987). Mehrere Studien konnten eine signifikante Korrelation zwischen den Fusionstypen sowie dem histologischen Subtyp zeigen. Während in zwei unabhängigen Arbeiten biphasische Tumoren zum überwiegenden Teil eine SS18-SSX1 Expression aufweisen, zeigt sich bei monophasischen Tumoren kein einheitliches Bild (Kawai et al., 1998; Ladanyi et al., 2002).

Detektiert werden können die Translokationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (Fligman et al., 1995; Lee et al., 1993). Der Nachweis einer t(X;18) stellt, aufgrund der Spezifität für synoviale Sarkome, eines der wesentlichen Diagnosekriterien dar.

Wie für die meisten Weichgewebstumoren gibt es auch für Synovialsarkome, nicht zuletzt aufgrund der Seltenheit der Erkrankung, keine auf randomisierten Studien basierenden, tumorspezifischen Therapieleitlinien. Demnach erfolgt die Behandlung synovialer Sarkome gemäß einem standardisierten multimodalen Therapiekonzept zur Behandlung von Weichgewebstumoren allgemein. Die radikale chirurgische Resektion, die Polychemo- sowie Radiotherapie bilden dabei in den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) stadienabhängige Therapiemodalitäten (Schütte et al., 2011). Dabei sollte bei lokal begrenzten Tumoren anfangs stets der Versuch einer chirurgischen Resektion des Tumors im Gesunden erfolgen.

Chemotherapeutische Regime, welche in älteren und neusten retrospektiven Studien an Patienten mit Synovialsarkomen hohe Remissionsraten erwirkten, sind insbesondere die Kombination zwischen Doxorubicin (Adriamycin) und hochdosiertem Ifosfamid sowie die Monotherapie mit Trabecitidin (ET-743) (Le Cesne et al., 2005; Edmonson et al., 2003; Rosen et al., 1994). In einer umfangreichen Phase III Studie (PALETTE) zeigte der Multikinaseinhibitor Pazopanib in synovialen Sarkomen zwar keine signifikante Zunahme der Überlebenszeit, jedoch ein in der Tendenz um 13 Wochen verlängertes progressionsfreies Überleben (Van der Graaf et al., 2012).

Die Prognose für Erkrankte ist insgesamt ungünstig. So überleben Patienten mit metastasiertem Synovialsarkom keine fünf Jahre nach Erstdiagnose. Bei Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei etwa 70 %, die 10 Jahres-Überlebensrate bei nur 50-34 %. Allerdings zeigt sich bei Patienten mit lokal begrenztem Befund eine deutliche Diskrepanz der Überlebenszeit abhängig von der Größe des Primärtumors (Singer et al., 1996). Abgesehen von Tumorgöße und Metastasierung scheint es darüberhinaus zudem für die Prognose ausschlaggebend, welcher Fusionsstyp vorliegt. Demnach haben Patienten, deren Tumoren eine SS18-SSX2-Fusion aufweisen, eine signifikant höhere metastasenfreie Überlebenszeit, respektive Gesamt-



überlebenszeit als Patienten, deren Tumoren eine *SS18-SSX1*-Mutation aufweisen (Kawai et al., 1998; Ladanyi et al., 2002). Nach Ausschöpfung der chirurgischen R0-Resektion sowie konventioneller adjuvanter Therapien ergeben sich für die meisten Patienten bis heute keine vielversprechenden zielgerichteten Therapieansätze. Die Entwicklung und die klinische Erprobung neuer Pharmakotherapeutika stellen die einzigen Möglichkeiten dar, die Prognose der Patienten mit rezidivierender oder metastatischer Erkrankung nachhaltig zu verbessern.

## 1.2 Die *SS18-SSX* Fusionsproteine

Der *SSX*-Genlocus kodiert für eine Familie von 9 nukleären Proteinen, welche untereinander eine Homologie von 70-90 % aufweisen. So ist deren Länge stets 188 Aminosäuren und das C-terminale Ende azidisch. Aufgrund der Tatsache, dass *SSX*-Proteine sowohl physiologischerweise in Hodengewebe als auch pathologischerweise in vielen Tumorgeweben nachweisen kann, werden *SSX*-Proteine in der Literatur als „cancer testis“-(*CT*)-Antigene bezeichnet. (Güre et al., 1997; Güre et al., 2002; Dos Santos et al., 1997; Tureci et al., 1998)

*SSX*-Proteine wirken als transkriptionelle Repressoren. Alle *SSX*-Proteine verfügen über zwei unterschiedliche, innerhalb der Familie hochgradig homologe Repressionsdomänen. Das  $\text{NH}_2$ -terminalen Ende weist eine Aminosäuresequenz auf, welche starke Ähnlichkeit mit „Krüppel-associated box“-(*KRAB*)-Domänen anderer transkriptioneller Zink-Finger-Repressoren besitzt (Crew et al., 1995; Huntley et al., 2006; Margolin et al., 1994). Diese sogenannte „*KRAB*-like domain“ selbst hat keine *DNS*-Bindungsstelle, sondern reguliert über die Interaktion mit Histondeacetylase-Komplexen die Transkription. Dabei kommt es zur Deacetylierung von Lysinen der Histone und somit zu einer Verstärkung der *DNS*-Bindung und der Blockierung etwaiger Transkriptionsfaktoren (Pengue und Lania, 1996). Die zweite und wichtigere Repressionsdomäne befindet sich am C-terminalen sauren Ende des Proteins. Diese ist einmalig und trägt deshalb den Namen „*SSX*-repression domain“ (*SSXRD*). Der genaue Funktionsmechanismus dieser Domäne ist noch nicht im Detail verstanden. Bekannt ist jedoch die Interaktion zwischen *SSXRD* und Polycomb-group-Proteinen (*PcG*) (Lim et al., 1998; Dos Santos et al., 1997; Soulez et al., 1999). *PcG* sind transkriptionelle Repressoren, welche ebenfalls über

Chromatinmodifikationen wirken, essentiell für die Stammzellregulation sind und für die Entstehung von Tumorstammzellen verantwortlich gemacht werden (Sauvageau und Sauvageau, 2010).

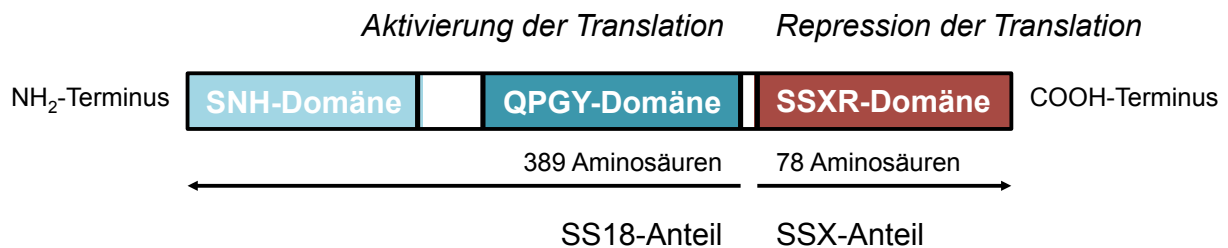
Auch SS18 (früher SYT) ist ein nukleäres Protein und verfügt ebenfalls über zwei aktive Domänen (Dos Santos et al., 1997). In menschlichen Zellen ist seine physiologische und pathologische Funktion noch nicht im Detail verstanden. Bekannt ist allerdings, dass SS18 eine wichtige Rolle in der Embryogenese als auch in der Entstehung diverser Neoplasien spielt.

Funktionstreibend ist dabei unter anderem die sogenannte QPGY-Domäne in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Diese ist reich an Glutamin, Prolin, Glycin und Tyrosin und somit in der Lage, Homooligomere sowie Heterooligomere mit Proteinen des Multiproteinkomplexes SWI/SNF zu bilden (Perani et al., 2003; Thaete et al., 1999). Diese Komplexe sind in der Lage, die Expression von Genen zu beeinflussen, indem sie die Nukleosomenstruktur auflockern sowie die DNS-Methylierung regulieren (Harikrishnan et al., 2005). Demnach kann auch die Expression solcher Gene aktiviert werden, die epigenetisch durch p300 oder Histonmodifikationen herunterreguliert werden (Narlikar et al., 2002; Peterson und Tamkun, 1995). Aufgrund dieser Eigenschaften wirken SWI/SNF-Komplexe in diversen Neoplasien als Tumorsuppressoren (Li et al., 2011; Versteeg et al., 1998). Die zweite funktionelle Domäne, die sogenannte SNH-Domäne am NH<sub>2</sub>-Terminus, interagiert ebenfalls mit p300 sowie mit dem „histon-deacetylase associated corepressor“, also ebenfalls mit Regulatoren der Histonacetylierung und epigenetischen Transkriptionsregulation (Barco et al., 2009; Eid et al., 2000; Ito et al., 2004). Auch ist eine direkte Interaktion zwischen der SNH-Domäne und Proteinen des SWI/SNF-Komplexes nachweisbar (Perani et al., 2003). Beide Domänen haben demnach synergistische Eigenschaften und sind gemeinsam in der Lage, die DNS-Transkription über epigenetische Modifikationen zu beeinflussen, vor allem aber deren Expression zu fördern.

Im Vergleich von SS18- und den SSX-Proteinen wird eine entgegengesetzte Funktion in der epigenetischen Regulation der Transkription deutlich. Während SSX-Proteine als

Repressoren agieren, weist das SS18-Protein eine indirekte transkriptionsfördernde Funktion auf.

Im Kontext der Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2) kommt es folglich zu einer (onkogenen) Fusion dieser beiden funktionalen Gegenspieler. Dabei werden die letzten acht Aminosäuren des SS18-Proteins durch die 78 C-terminalen Aminosäuren der SSX-Proteine ersetzt. Die so entstandenen chimären Proteine haben eine Länge von 457 Aminosäuren und besitzen in der NH<sub>2</sub>-terminalen Region sowohl die QPGY- als auch die SNH-Domäne des SS18-Proteins sowie an ihrem C-Terminus die SSXR-Domäne der SSX-Proteine, entfallen ist hingegen deren KRAB-Domäne (Clark et al., 1994; Perani et al., 2003).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des SS18-SSX-Fusionsproteins.

In Studien hinsichtlich der funktionellen Rolle des SS18-SSX-Proteine konnten Haldar und Kollegen in transgenen Mäusen, die konstitutionell *SS18-SSX2* exprimierten, das Entstehen von Synovialsarkomen aus unreifen Myoblasten mit einer nahezu 100%igen Penetranz beobachten (Haldar et al., 2007). Garcia et al. konnten darüber hinaus durch die Expression des SS18-SSX2-Proteins *in vitro* die Reprogrammierung von myogenen Progenitorzellen und „bone-marrow derived mesenchymal stem cells“ (BMMSCs) induzieren und deren Ausdifferenzierung verhindern (Garcia et al., 2011).

Aufgrund der konträren Funktionen der beiden Fusionspartner SS18 und SSX war die biologische Wirkung der SS18-SSX-Fusionsproteine lange unklar. Heute weiß man indes, dass SS18-SSX über die oben genannten epigenetischen Interaktionen die Expression einer Vielzahl onkogener Proteine reguliert. Eine umfangreiche DNS-Microarray-Analyse an einem Synovialsarkomzellmodell aus *SS18-SSX2* exprimierenden HEK-293-

TREx-Zellen zeigte eine Veränderung der Expression vor allem Methylierungs-sensitiver Gene. So zeigte sich unter anderem eine deutliche Expressionszunahme von *IGF-2*, einem proliferationsfördernden Liganden des IGF-1R. Zudem kam es zu einer Verminderung der Expression der proliferationshemmenden IGF-bindenden Proteine 5 und 7 - *IGFBP5* und *IGFBP7* (siehe Kapitel 1.6) (De Bruijn et al., 2006). Ebenfalls zeigte sich eine Abnahme der Expression des LDL-Rezeptors assoziiert mit einer Zunahme der Expression wichtiger Enzyme der Cholesterin-Biosynthese. Auch dies ist ein Muster, welches mit der Tumorigenese vieler Neoplasien in Verbindung gebracht werden kann (Roa, 1995). Parallel zu den Arbeiten von De Bruijn gelang Sun und Kollegen der Nachweis einer Expressionsinduktion von *IGF-2* durch das SS18-SSX-1-Fusionsprotein in Fibroblasten. Interessanterweise zeigten induzierte Zellen, deren *IGF-2*-Expression durch siRNA herunterreguliert wurde, eine geringere Proliferationsrate als solche ohne siRNA-Knockdown, was eine essentielle Rolle von *IGF-2* im Rahmen der Transformation durch *SS18-SSX1* andeutet (Sun et al., 2006). Auch in Zelllinien primärer Synovialsarkome konnte die Bedeutung des IGF-Pathways in der Tumorbilogie belegt werden (Friedrichs et al., 2008; Törnkvist et al., 2008) (siehe Kapitel 1.5). Cyclin D1 ist ein weiteres Protein, welches *in vitro* SS18-SSX-abhängig überexprimiert wird. Cyclin D1 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus welcher als Co-Faktor von CDK4 und CDK6 den Übergang der G1- in die S-Phase bewirkt, also die Zellproliferation fördert (Xie et al., 2002a; Xie et al., 2002b). Weiterhin induziert SS18-SSX in Zellen synovialer Sarkome sowie im murinen Tumormodell die Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl2 (Jones et al., 2012). Darüberhinaus bewirken die beiden häufigsten SS18-SSX-Proteine in Zellen synovialer Sarkome eine Abnahme der Zelladhäsion über die Hemmung der Expression der „myosin light-chain kinase“ (*MLCK*) (Takenaka et al., 2010).

Die Expression von SS18-SSX wirkt demnach nicht nur proliferationsfördernd und anti-apoptotisch sondern bewirkt auch eine Zunahme der Zell-Motilität.

### **1.3 Tyrosinkinase sind Mediatoren der Signaltransduktion**

Tyrosinkinase sind essentielle Proteine der extra- und intrazellulären Signaltransduktion. Sie werden der Familie der Proteinkinase zugeordnet und im weiteren Sinne der

Superfamilie der Phosphotransferasen zugerechnet. Die katalytische Funktion von Proteinkinasen besteht in der reversiblen Übertragung von Phosphatresten eines Nucleosidtriphosphates auf alkoholische Aminosäuren. Im Gegensatz dazu stehen Phosphorylasen, welche Phosphatreste von Aminosäuren entfernen und somit den biochemischen Gegenspieler der Proteinkinasen darstellen. Phosphorylierungen beziehungsweise Dephosphorylierungen der Hydroxylgruppe alkoholischer Aminosäuren modifizieren die Tertiärstruktur von Proteinen und können somit zum Beispiel biologisch aktive Domänen freilegen oder verbergen. Diese regulierende Eigenschaft von Proteinkinasen spielt vor allem in der Übertragung von intra- und extrazellulären Informationen in Rahmen von Signal-Kaskaden eine Rolle.

Da zu der Gruppe der Aminosäuren mit funktioneller OH-Gruppe lediglich Serin, Threonin und Tyrosin gehören, lassen sich die Proteinkinasen im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen: Serin-/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen (Heinrich et al., 2007).

#### **1.4 Die SRC-Tyrosinkinase: Prototyp eines Onkogens**

1910 gelang es dem Arzt und Wissenschaftler Peyton Rous erstmalig, einen Tumor von einem Individuum auf ein anderes zu übertragen. Er injizierte Zellen aviärer spindelzeller Sarkome eines Huhns auf ein nächstes und konnte das Wachstum eines morphologisch und histologisch gleichen Tumors an der Injektionsstelle nachweisen (Rous, 1910). Später veröffentlichte Rous eine Arbeit, in der er durch Injektion zellfreier Filtrate der gleichen Tumoren ein Tumorwachstum in gleicher Weise induzieren zeigte (Rous, 1911). Somit war erwiesen, dass es sich bei den entstandenen Tumoren nicht lediglich um Zelltransplantate handeln konnte. Vielmehr musste ein unbekanntes Agens die Onkogenese ausgelöst haben. Aufgrund dieser bahnbrechenden Entdeckungen wurde Rous 1966 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet.

Lange war jedoch nicht klar, dass es sich bei diesem karzinogenen Agens um ein Virus handelt, welches später als Prototyp infektiöser Neoplasien gelten sollte. In den folgenden Jahren entwickelte sich das Rous-Sarcoma-Virus zu einem prominenten Thema der Krebsforschung, und so konnte in den Siebzigerjahren von diversen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass lediglich ein Gen des Rous-Sarcoma-Virus-Genoms notwendig war

um die maligne Transformation gesunder Zellen zu induzieren (Lai et al., 1973; Martin et al., 1971; Vogt, 1971).

Kurz darauf gelang die Identifizierung eines homologen Gens auch im Genom von Vögeln, womit zum ersten Mal in der Geschichte der Medizin ein Pendant zu einem viralen Gen in eukaryoten Zellen gefunden wurde (Stehelin et al., 1976). Zur Differenzierung der beiden Gene entschied man sich, das eukaryote Gen „cellular src“ (*c-SRC*) zu benennen. In einer Zeit, in der sich die molekulare Tumorforschung noch in den Anfängen befand, galt die Entdeckung von *c-src* als Erstbeschreibung eines Proto-Onkogens und ebnete den Weg zur Erforschung der etwa einhundert heute bekannten.

1980 konnte schließlich die katalytische Funktion des Genprodukts von *v-src*, dem Protein *v-SRC*, abschließend aufgeklärt werden. So identifizierten die Arbeitsgruppen um Hunter und Sefton sowie Collett *v-SRC* als die erste Kinase überhaupt, deren Funktion darin bestand Tyrosinreste an Proteinen zu phosphorylieren (Collett et al., 1980; Hunter und Sefton, 1980).

Im Zuge der weiteren Forschungen gelang die Identifizierung einer ganzen Reihe von Tyrosinkinase, welche sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Konfiguration eine große Homologie mit *c-SRC* aufweisen. So bilden insgesamt die Tyrosinkinase SRC, FYN, YES, LCK, HCK, BLK, FGR, LYN und YRK die SRC-Tyrosinkinase Familie, oder kurz SFK (Roskoski Jr., 2004).

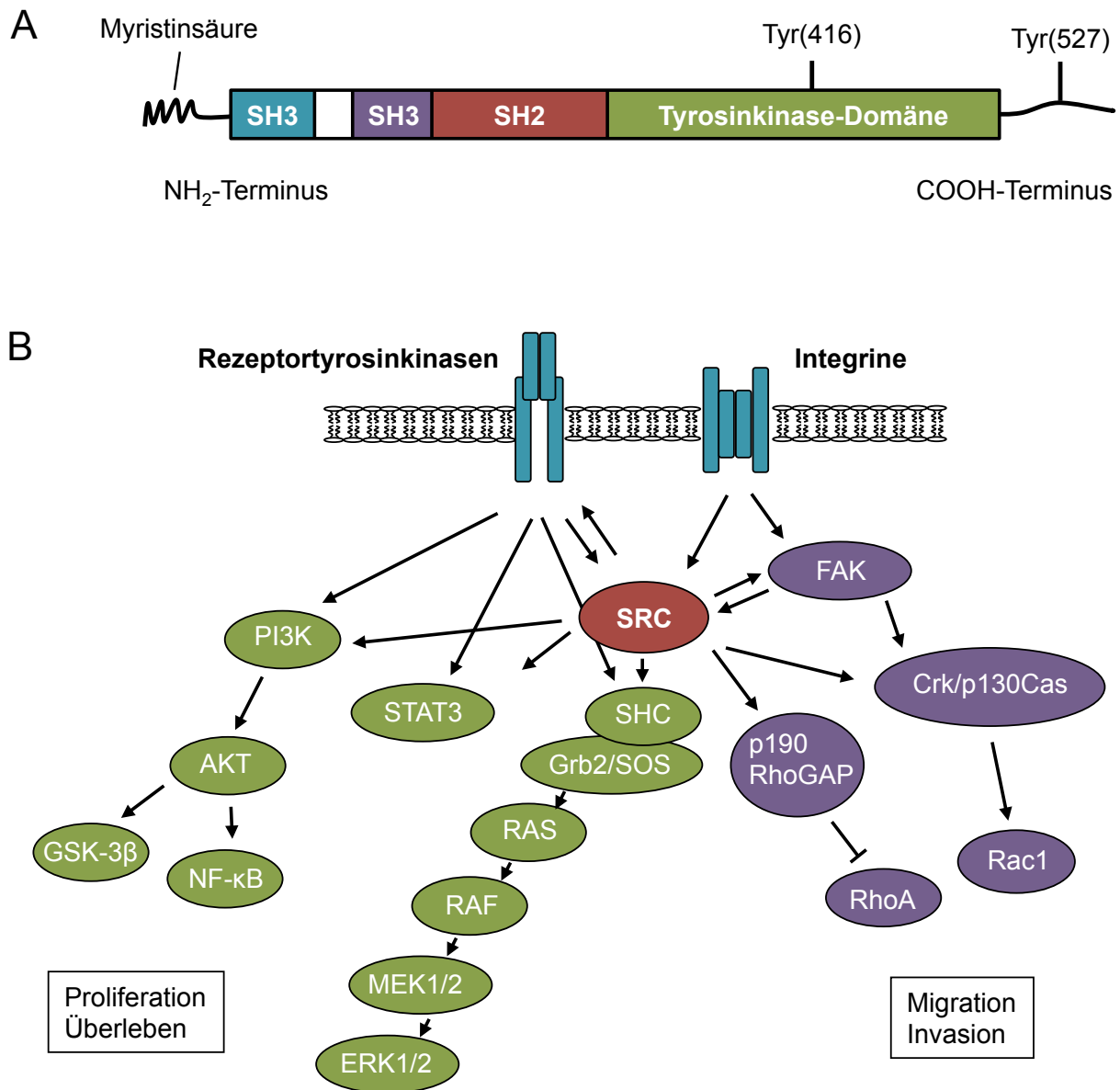
Die Entdeckung von *v-src* und *c-SRC* als homologe Gene in Viren, Vögeln und Menschen ermöglichte es auch, den komplexen Regulationsmechanismus der SRC-Tyrosinkinase zu verstehen. Während der simple Einbau des viralen *src*-Gens in das Genom einer gesunden Zelle zu deren Transformation führt, ist das ubiquitäre Vorkommen des *c-SRC* Gens in eukaryoten Zellen physiologisch (Collett et al., 1979; Oppermann et al., 1979). Analysen der Aminosäuresequenzen der beiden Kinasen zeigten bei nahezu kompletter Homologie (Czernilofsky et al., 1980; Takeya und Hanafusa, 1982), einen entscheidenden Unterschied in deren Länge. So konnten Takeya und Hanafusa zeigen, dass es sich bei dem viralen *v-SRC* um ein, im Vergleich zum aviären *c-SRC*, um sieben Aminosäuren verkürztes Protein handelt (Takeya und Hanafusa, 1983). Zugrunde liegt dem jedoch nicht lediglich eine Deletion am 3'-Ende der codierenden Bereiche des *v-src* Gens sondern ein komplexer viraler Rekombinationsmechanismus: *v-*

SRC und c-SRC unterscheiden sich nämlich nicht nur in ihrer Länge voneinander sondern auch in der Aminosäuresequenz ihrer C-Termini. Vergleichende Aminosäuresequenzanalysen brachten den Austausch der letzten 19 Aminosäuren des c-SRC durch einen 12 Aminosäuren langen C-Terminus im v-SRC zum Vorschein. Codiert wird dieser 12 Aminosäuren lange Bereich im aviären Genom 900 bp unterhalb des Stopcodons von *c-src*, also außerhalb des c-SRC codierenden Bereiches. So liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem viralen src-Gen um einen inkompletten und fehlerhaften Einbau der eukaryoten c-SRC-Gens in das virale Genom im Rahmen einer retroviralen Rekombination handelt (Takeya und Hanafusa, 1983). Darüber hinaus konnten Iba und Kollegen zeigen, dass Rous-Sarcoma-Viren ihre Fähigkeit zur Transformation verlieren, wenn *v-src* mit *c-src* in deren Genom ausgetauscht wurde. Weiterhin weist c-SRC eine geringere Kinaseaktivität *in vitro* auf als v-SRC (Iba et al., 1984; Tanaka und Fujita, 1986). Die C-terminale Domäne der c-SRC-Tyrosinkinase, deren Aminosäuresequenz im v-SRC mutiert ist, scheint demnach regulative Funktionen zu verfügen.

Der Einfachheit halber, wird in der Literatur das humane Gen mit *SRC* und das humane Protein mit SRC benannt. Die im Verlauf dieser Arbeit angegebenen Aminosäuren beziehen sich auf die Positionen im humanen SRC-Protein.

### 1.5 Funktion und Regulierung der SRC-Tyrosinkinase in Neoplasien

Die humane SRC-Tyrosinkinase ist eine ubiquitäre zytosolische Tyrosinkinase mit einer Größe von 60 kDa und einer Länge von 536 Aminosäuren (Roskoski Jr., 2004) (siehe Abbildung 3). Sie besteht im Wesentlichen aus vier funktionellen Domänen. Am NH<sub>2</sub>-Terminus des Proteins befindet sich die „SRC-homology 4“-(SH4)-Domäne, welche für die Lokalisierung der Kinase an Plasmamembranen verantwortlich ist. Dieser schließen sich die Domänen „SRC-homology 3“ (SH3) und „SRC-homology 2“ (SH2) an. Beide Domänen sind für die inter-molekulare Bindung mit SRC-Interaktionspartnern zuständig. Die Aminosäuresequenzen der SH-Domänen und somit auch deren Funktion sind hochkonserviert und finden sich in einer Vielzahl von Proteinen der menschlichen Zelle wieder (daher die Bezeichnung „SRC-homology“-(SH)-Domäne). Weiter C-terminal folgt nun die Tyrosinkinase-Domäne mit dem katalytischen Zentrum der SRC-Kinase.



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung (A) des strukturellen Aufbaus der SRC-Tyrosinkinase sowie (B) der Interaktionspartner auf molekularer Ebene (Roskoski Jr, 2004)

Nach heutigem Kenntnisstand erfolgt die Regulation der Kinase über zwei essentielle Phosphorylierungsstellen - Tyrosin 527 (Tyr(527)) in der C-terminalen Domäne sowie Tyrosin 416 (Tyr(416)) in der Kinase-Domäne (Piwnica-Worms et al., 1987) (siehe Abbildung 4).

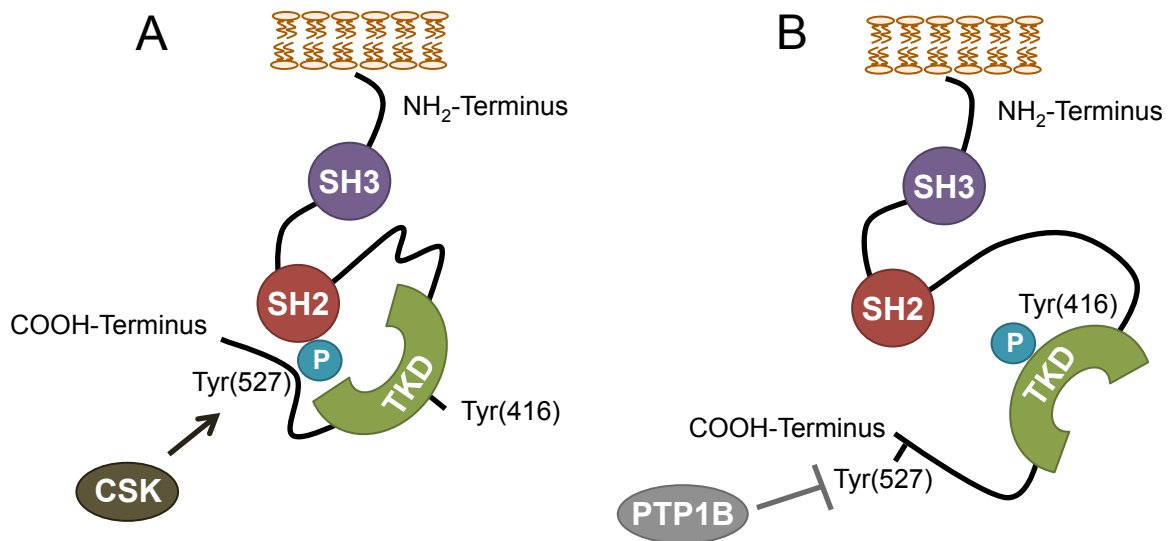
Im Ruhezustand, also im Zustand ohne katalytische Aktivität, bindet die SH2-Domäne des SRC intramolekular an das phosphorylierte Tyrosin 527 (Bibbins et al., 1993). Die



katalytische Bindungsstelle ist damit verdeckt und Tyrosin 416 ist dephosphoryliert. Die inaktivierende Phosphorylierungsstelle an Tyrosin 527 ist insofern kritisch, als sie beim daueraktivierten v-SRC aufgrund des verkürzten C-Terminus fehlt. Bei Bindung von Interaktionspartnern an die SH2- oder SH3-Bindungsstelle von SRC kommt es zur Dephosphorylierung von Tyrosin 527 und zur Freilegung des katalytischen Zentrums, so dass die Autophosphorylierung an Tyrosin 416 erfolgen kann, womit die Kinaseaktivität maximal wird (Xu et al., 1999). In computergestützten Strukturanalysen zeigt sich dabei die reversible Bildung eines sogenannten „hydrophobic spine“, welcher die Kinaseaktivität stabilisiert (Kornev et al., 2006). Neueste vergleichende Strukturanalysen von v-SRC und SRC zeigten eine entscheidende Mutation in der Aminosäuresequenz dieser Struktur. Der Austausch des Threonins an Stelle 341 durch die Aminosäure Isoleucin stabilisiert den „hydrophobic spine“, bewahrt ihn vor dem Strukturverlust und verhindert die Rückkehr der Kinase in die inaktive Konformation. Als Folge dessen und als Folge des Fehlens der deaktivierenden Phosphorylierungsstelle Tyrosin 527 ist die virale SRC-Tyrosinkinase konstitutionell aktiviert. Dieser über viele Tyrosinkinasen hinweg hoch konservierte Threoninrest stellt eine der Bildungsstellen für niedermolekulare Kinaseinhibitoren dar (Lombardo et al., 2004). Mutationen dieses Threonins können deshalb nicht nur zur Daueraktivierung der Kinase führen, sondern auch dazu, dass die zielgerichtete Blockade des katalytischen Zentrums der Kinase unmöglich wird. Der Aminosäureaustausch dieses Threoninrests stellt somit einen der gefährlichsten erworbenen Resistenzmechanismen gegen die Behandlung mit herkömmlichen Tyrosinkinaseinhibitoren dar. Aufgrund dessen und aufgrund der essentiellen Bedeutung des Threonins 341 in der Strukturregulation des „hydrophobic spine“, ist in der Literatur der Begriff „gatekeeper threonine“ geprägt worden (Azam et al., 2008).

Die Dephosphorylierung, also Inaktivierung, von Tyrosin 527 erfolgt dabei unter anderem durch ubiquitäre Phosphotyrosin-Proteinphatasen (PTP) (Bjorge et al., 2000b). Die Phosphorylierung andererseits geschieht durch die „C-terminal-SRC“-Kinase (CSK) (Wang et al., 2001). Eine Überexpression von *PTP1B* in Mammakarzinomen wie auch eine Delokalisation und Aktivitätsminderung von CSK in Kolonkarzinomen konnten als pathogenetisch relevante Ereignisse hinsichtlich einer aberranten Aktivierung von SRC

verantwortlich gemacht werden (Bjorge et al., 2000a; Sirvent et al., 2006; Zhu et al., 2007).



**Abb. 4:** Vereinfachte Darstellung der Regulation von SRC. (A) Die Phosphorylierung von Tyrosin 527 (Tyr(527)) durch die „C-terminal-SRC“-Kinase (CSK) bewirkt die sterische Inaktivierung der Kinase. (B) PTP1B katalysiert die Dephosphorylierung von Tyr(527) und die Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung von Tyr(416). TKD: Tyrosinkinase-Domäne; SH2: SH2-Domäne; SH3: SH3-Domäne; Pfeil: Phosphorylierung; T-Pfeil: Dephosphorylierung; P: Phosphat-Rest.

Die Funktion von SRC ist komplex und auch heute noch nicht abschließend aufgeklärt. Die starke Affinität von SRC zu Lipidmembranen wird über die SH2- und SH3-Domänen sowie eine terminale Myristilisierung vermittelt (Kaplan et al., 1990). Dabei handelt es sich um eine posttranslationale Veresterung des Proteins mit der gesättigten Fettsäure Myristinsäure.

Ein großer Anteil der SRC-Tyrosinkinase wird dementsprechend nach der Expression in die Plasmamembran transloziert. Dort vermittelt SRC über eine Reihe von Kaskaden extrazelluläre Signale von Rezeptortyrosinkinasen und Zelladhäsionsmolekülen. In erster Linie handelt es sich dabei um mitogene Signale sowie solche, die die Konfiguration des Zytoskeletts modifizieren (siehe Kapitel 1.6 und Abbildung 3).

So vermitteln insbesondere die Rezeptortyrosinkinasen „Insulin-like growth factor I receptor“ (IGF-1R), „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) und „epithelial-de-

rived growth factor receptor“ (EGFR) eine Aktivierung durch Ligandenbindung über SRC an den Zellkern. Dabei erfolgt die Übermittlung der Signale für Proliferation und Apoptose vor allem über die Signalkaskaden der „mitogen-activated protein“-Kinasen (MAP-Kinasen) (u.a. p42/p44 MAPK=ERK1/2), über den „signal transducers and activators of transcription“- (STAT)-Signalweg (u.a. STAT3) sowie über die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR-Signalkaskade (Bjorge et al., 2000a; Laird et al., 2003; Parsons und Parsons, 2004; Peterson et al., 1996; Roskoski Jr., 2004). Am Ende dieser regulativen Kaskaden stehen oftmals Transkriptionsfaktoren, welche den Zellzyklus steuern und zu einer Steigerung des Zellumsatzes führen.

Die Funktion von SRC in der Regulation des Zytoskeletts ist komplexer und beruht im Wesentlichen auf einer Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen und solchen, die die Motilität der Zellen regulieren. So bilden Integrine oder Cadherine in einem Zusammenspiel mit der „focal-adhesion kinase“ (FAK) und der SRC-Kinase einen regulatorischen Komplex zur Steuerung von Migration und Invasion. Bestandteil dieses Komplexes sind unter anderem auch die Rho-GTPasen RhoA und Rac (siehe Kapitel 1.7) (Huveneers und Danen, 2009).

Bis heute konnte *SRC* als Onkogen in einer ganzen Reihe von soliden Neoplasien identifiziert werden. *SRC* spielt demnach eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie der sechs häufigsten Malignome des Erwachsenen (Wheeler et al., 2009; Kaatsch et al., 2012): Kolonkarzinome (Talamonti et al., 1993), nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Song et al., 2006), Karzinome der Brust (Ottenhoff-Kalff et al., 1992), Karzinome der Prostata (Nam et al., 2005), Plattenepithelkarzinome des Halses und Kopfes (Van Oijen et al., 1998) sowie Pankreaskarzinome (Lutz et al., 1998). Auch in mesenchymalen Neoplasien wie dem Chondrosarkom, dem Osteosarkom oder dem Kaposi-Sarkom konnte die Bedeutung der SRC-Tyrosinkinase für die Tumorbilogie gezeigt werden (Munshi et al., 2000; Schrage et al., 2009; Shor et al., 2007).

Die Ursachen für die gesteigerte Aktivität von SRC ist bis heute in vielen Tumorentitäten nicht abschließend geklärt. In Brustkrebs sowie Kolonkarzinomen konnte eine Überaktivierung der SRC-Kinase durch die beiden Regulatorischen Proteine PTP1B und CSK

demonstriert werden. So zeigte sich in Kolonkarzinom-Zellen sowohl eine Membrandelocalisation von CSK als auch dessen Aktivierung verantwortlich für eine Zunahme der Phosphorylierung von SRC an Tyrosin 416 (Cam et al., 2001; Sirvent et al., 2010). Ebenfalls konnten in Kolonkarzinomen als auch in diversen Mammakarzinom-Zelllinien eine Überexpression und Überaktivität der Phosphatase PTP1B als Ursache für eine SRC-Aktivierung ausgemacht werden (Bjorge et al., 2000c; Zhu et al., 2007).

Aufgrund der zentralen Position der SRC-Kinase in der Biologie solider Tumoren wurde in den letzten Jahren intensiv an der Möglichkeit geforscht, SRC als Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie zu nutzen. Ein Pharmakon, welches sich in präklinischen Studien als vielversprechend erwiesen hat, ist der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib (siehe Kapitel 1.8).

### **1.6 Die „Insulin-like growth factor I receptor“-Signalkaskade**

Die „Insulin-like growth factor I receptor“ (IGF-1R)-Signalkaskade überträgt extrazelluläre mitogene und anti-apoptotische Signale an den Zellkern. Die wichtigsten Bausteine dieser Kaskade sind neben dem IGF-1 Rezeptor die Liganden „Insulin-like growth factor 1“ (IGF-1), „Insulin-like growth factor 2“ (IGF-2) sowie die „IGF-binding proteins“ (IGFBP) (Pollak, 2008).

Der IGF-1R ist ein zellmembranständiger Oberflächen-Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität. Die Tyrosinkinase-Domäne weist eine 84%ige Homologie mit der Kinase-Domäne des Insulinrezeptors auf (Ullrich et al., 1986). Der heterotetramere IGF-1R besteht aus vier Untereinheiten, zwei alpha- sowie zwei beta-Einheiten. Während die alpha-Untereinheit extrazellulär liegt und die Liganden-Bindungsstelle beinhaltet, befindet sich die beta-Untereinheit plasmazellulär und beherbergt die Tyrosinkinase-Einheit. Die Bindung eines der IGF-1R-Liganden - IGF-1 oder IGF-2 - führt zur Dimerisierung der Untereinheiten sowie zur Autophosphorylierung aktivierender Phosphorylierungsstellen. Dies hat die Aktivierung der intrinsischen Kinase-Aktivität des IGF-1-Rezeptors sowie der Signalkaskade zur Folge.

Die IGF-1R-Signalkaskade beeinflusst das Zellwachstum durch zwei Mechanismen. Der wohl wichtigste ist die Vermittlung anti-apoptotischer Signale über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)/AKT-Signalkaskade, was zur Inaktivierung pro-apoptotischer sowie zur Expression anti-apoptotischer Faktoren führt (Pollak, 2008; Zha und Lackner, 2010).

Neben diesen anti-apoptotischen Signalen leitet der IGF-1-Rezeptor auch mitogene und pro-proliferative Signale an den Zellkern weiter. Diese werden über den „Mitogen-activated protein“- (MAP-) Kinase-Signalweg, so unter anderem über die p44/42 MAP-Kinasen (p44/42 MAPK=ERK1/2) übermittelt (Boguski und McCormick, 1993).

Beide Signalkaskaden interagieren mit der SRC-Tyrosinkinase und so kommt es am IGF-1R neben einer ligandenabhängigen Phosphorylierung auch zu einer SRC-abhängigen Phosphorylierung aktivierender Aminosäurereste (Peterson et al., 1996). Analog zur Expression von SRC im Zellmodell bewirkt auch eine Überexpression von IGF-1R alleine eine Zell-Transformation (Kaleko et al., 1990). Dabei ist das Zusammenspiel beider Faktoren essentiell: durch Ausschalten des IGF-1-Rezeptor mittels homologer Rekombination konnten im Mausmodell transformierenden Eigenschaften von SRC unterbunden werden (Peterson et al., 1996).

Der IGF-1R kann über zwei homologe Liganden aktiviert werden - IGF-1 und IGF-2. Die Sekretion von IGF-1 (Somatomedin C) in der Leber wird durch das Wachstumshormon Somatotropin stimuliert und unterliegt einer intrinsischen Regulationsschleife. Während IGF-1 physiologisch postnatal an der Übermittlung von Wachstumsreizen beteiligt ist, handelt es sich bei IGF-2 in erster Linie um einen fetalen Wachstumsfaktor. Auch IGF-2 wird von der Leber systemisch sezerniert; in der Tumorigenese allerdings spielt die autokrine oder parakrine Stimulation durch IGF-2 in eine wichtigere Rolle (De Bruijn et al., 2006).

„Insulin-like growth factor binding“-Proteine (IGFBP) sind Regulatoren der IGF-Wirkung. Sie können IGFs binden und somit die Konzentration an frei verfügbaren Liganden beeinflussen. Allerdings ist der Effekt nicht auf eine alleinige Reduzierung der IGF-Konzentration zurückzuführen, sondern wesentlich komplexer. So wird angenommen, dass die IGFBP auch in der Lage sind, IGF in der Umgebung von IGF-1-Rezeptoren zu

poolen, also die Konzentration an verfügbarem IGF am Rezeptor zu erhöhen (Firth und Baxter, 2002).

Neben den IGFBP ist auch der „Insulin-like growth factor 2“-Rezeptor an der Regulation der IGF-2-Konzentration beteiligt, wobei hier ein negativer Regulationsmechanismus vorliegt: nach Ligandenbindung kommt es zur Internalisierung und subsequenten lysosomalen Abbau des Rezeptor-Liganden-Komplexes (Braulke, 1999).

Die starke anti-apoptotische Wirkung des IGF-1R-Signalwegs ist besonders in der Biologie maligner Zellen relevant (Resnicoff et al., 1995). So kann die Aktivierung des IGF-1R apoptotische Signale durch das Onkogen *c-MYC* inhibieren (Harrington et al., 1994). Generell ist die anti-apoptotische Wirkung des IGF-1R bei Zellen am höchsten, die keine Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte ausgebildet haben, wie es für aberrant mobile Tumorzellen bekannt ist (Hellawell et al., 2002; Resnicoff et al., 1995).

Klinisch von großer Bedeutung ist auch der durch eine Überexpression des *IGF-1*-Rezeptors oder seines Liganden IGF-2 vermittelte Resistenzmechanismus gegen proapoptotische Faktoren wie ionisierende Strahlung (Turner et al., 1997), das Chemotherapeutikum Etoposid (Sell et al., 1995) sowie EGFR-Inhibitoren (Buck et al., 2008).

Unter anderem konnte bisher in Karzinomen der Brust (Turner et al., 1997), in Osteosarkomen (Sekyi-Otu et al., 1995) und in Prostata-Karzinomen (Hellawell et al., 2002) eine Überexpression von *IGF-1R* als einer der Pathomechanismen der Tumorbilogie identifiziert werden. Auch in synovialen Sarkomen konnte die essentielle Bedeutung der IGF-1R-Signalkaskade in der Tumorigenese durch die Translokation t(X;18) gezeigt werden (De Bruijn et al., 2006; Friedrichs et al., 2008; Sun et al., 2006).

### **1.7 Die Bedeutung von FAK und der Rho-GTPasen in der Tumorzellmotilität**

Eine gesteigerte Motilität ist einer der essentiellen Malignitätsfaktoren neoplastischer Zellen. Dabei spielt sich die Steuerung der Migration und Invasion im Wesentlichen auf Ebene der sogenannten „focal adhesion complexes“ ab. Ein wichtiger Bestandteil ist hier die Interaktion zwischen der extrazellulären Proteinmatrix, den plasmamembranständigen Integrinen und dem intraplasmazytären Zytoskelett. Bei der Vermittlung der Signale spielen sowohl Proteinkinasen als auch GTPasen eine entscheidende Rolle. Die wich-

tigste Rolle jedoch spielt die SRC-Tyrosinkinase, welche im Zentrum der Abläufe dieser Signalkaskaden steht.

Integrine sind bi-direktionale heterodimere Rezeptormoleküle. Sie fungieren als Bindeglied zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett und sind darüber hinaus auch an der Übermittlung extrazellulärer Signale beteiligt (Humphries, 2000; Hynes und Zhao, 2000). Kommt es zur Aktivierung des Integrinrezeptors durch Liganden wie Kollagene, Fibronectine und Laminine, ist die Bindung und Autophosphorylierung der „focal adhesion kinase“ (FAK) und damit deren Aktivierung möglich. An die auf diese Weise an FAK freigewordenen SH2-Bindungsstellen heftet sich die SRC-Tyrosinkinase und es kommt analog zu weiteren aktivierenden intramolekularen Phosphorylierungen (Playford und Schaller, 2004). Dieser SRC-FAK-Komplex wiederum aktiviert unter anderem die kleinen Effektor-GTPasen Rac1 und Cdc42. Beide GTPasen führen über zwischengeschaltete Faktoren zur Ausbildung von Membranausstülpungen sowie zu einer Abnahme der Zytoskelettkontraktilität und Motilität (Chodniewicz und Klemke, 2004; Huveneers und Danen, 2009). Der Gegenspieler von Rac1 ist die kleine GTPase RhoA, deren Aktivierung zu einer Zunahme der Aktinomyosinkontraktilität und einer Versteifung des Zytoskeletts sowie zur Ausbildung fokaler Adhäsionen führt. Der SRC-FAK-Komplex ist in der Lage, die Funktion von RhoA zu inhibieren (Huveneers und Danen, 2009; Ren et al., 2000).

Während der Migration einer Zelle ist ein geordnetes Zusammenspiel der genannten GTPasen ausschlaggebend. Zu einer Vorwärtsbewegung kommt es, indem am vorderen sowie am hinteren Pol der Zelle alternierend die Kontraktilität des Zytoskeletts erhöht beziehungsweise erniedrigt wird (Huveneers und Danen, 2009). Ähnlich dem Fortbewegungsmuster einer Raupe wird der hintere Teil des Zelleibes nachgezogen. Dabei überwiegt jedoch bei einer Zunahme der gerichteten Zellmotilität die Aktivität der Rac1-GTPase (Pankov et al., 2005). So gilt die Zunahme des Levels an aktiviertem Rac1 und die Abnahme des Levels an aktiviertem RhoA als Indikator für die Zunahme der Zellmotilität (Nobes und Hall, 1999).

Kleine GTPasen bilden eine größere Super-Familie von Proteinen, wobei RhoA und Rac1 zur Sub-Familie der Rho-GTPasen gehören. Alle GTPasen funktionieren nach

dem gleichen Prinzip. In ihrem aktivierten Zustand binden GTPasen Guanosintriphosphat. Dieser Aktivitätszustand hält nur sehr kurzfristig an: unmittelbar kommt es, vermittelt durch „GTPase-activating proteins“ (GAPs), zur Aktivierung der GTPase Funktion und zur Hydrolyse des GTPs zu GDP mit dem Ergebnis einer Inaktivierung des Proteins. Wenn nicht benötigt, wird inaktives RhoA durch „Rho-GDP dissociation inhibitors“ (Rho-GDIs) im Zytoplasma gespeichert. Um die GTPase erneut in ihren aktiven Zustand zu versetzen, ist die Dissoziation des GDPs und der Austausch mit einem GTP-Molekül notwendig. Um seiner Funktion im Umbau des Zytoskeletts nachgehen zu können, ist die Translokation des zytoplasmatischen RhoA an die Plasmamembran notwendig (Huvencsics und Danen, 2009).

Die Kinase FAK sowie die GTPasen Rac1 und RhoA eignen sich aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Zytoskelettregulation und aufgrund der Möglichkeit des biochemischen Aktivitätsnachweises als indirekte Parameter für Zellmobilität und Migrationsverhalten.

### **1.8 Der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib**

Dasatinib (BMS-354825) ist ein Vertreter der oral verfügbaren, niedermolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren, welche sich in der erfolgreichen Behandlung von Imatinib-resistenten chronisch-myeloischen Leukämien bei einem niedrigen Nebenwirkungsspektrum bewährt hat (Hochhaus und Kantarjian, 2013).

Wie die meisten Tyrosinkinaseinhibitoren ist auch Dasatinib im weitesten Sinne ein Multikinaseinhibitor. Allerdings zeigt Dasatinib in Enzymanalysen eine große Affinität für die SFKs SRC, LCK und YES sowie die Fusionskinase BCR-ABL. So liegt die Konzentration von Dasatinib, bei der die Kinaseaktivität von SRC um 50 % reduziert wird (IC<sub>50</sub>), um sechs Zehnerpotenzen niedriger als zum Beispiel für die Kinasen AKT oder FAK (Lombardo et al., 2004). In der Literatur wird deshalb meist von einem SRC-/BCR-ABL-spezifischen Inhibitor gesprochen.

Die antineoplastische Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren, also auch die von Dasatinib, beruht auf einer Unterbrechung essentieller und pathogenetisch treibender Signaltrans-



duktionswege in der Tumorzelle. Dabei sind diese niedermolekularen Wirkstoffe in der Lage, das katalytische Zentrum einer Tyrosinkinase zu blockieren, indem sie an Aminosäurereste des „hydrophobic spine“ in der Tiefe der ATP-Bindungstasche andocken und ihn so destabilisieren. Im Falle der SRC-Kinase ist dies unter anderem der oben erwähnte Threoninrest 341 (Thr(341)), das „gatekeeper threonine“ (Azam et al., 2008; Lombardo et al., 2004). Mutationen an der Stelle des „gatekeeper threonines“, wie sie in v-SRC oder bei Imatinib-resistenten chronisch myeloischen Leukämien vorkommen, sind ein natürlicher oder durch Selektion entstandener Resistenzmechanismus gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (Azam et al., 2008).

Bisher veröffentlichte präklinische Untersuchungen mit Dasatinib in einer größeren Zahl von Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* zeigten ein vielversprechendes Wirkspektrum (Finn et al., 2007; Konecny et al., 2009; Nagaraj et al., 2011; Nam et al., 2005; Shor et al., 2007; Song et al., 2006). Unter diesen Studien findet sich auch eine umfangreiche *in vitro* Testung von Dasatinib an menschlichen Sarkomzellen, welche Leiomyosarkom-, Osteosarkom-, Ewingsarkom-, Fibrosarkom- und Rhabdomyosarkom-Zellen einschließt. In den Zellen dieser Weichgewebssarkome wurde nicht vordergründig eine Hemmung der Zellvitalität sondern eine Abnahme der Zellmotilität beobachtet (Shor et al., 2007).

## 1.9 Fragestellung

Grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung in der Pathogenese Synovialer Sarkome funktionell relevanter onkogener Proteinkinasen, mit dem Ziel eines verbesserten Verständnis der Tumorbiologie einerseits und der Etablierung neuer translationaler Therapieansätze andererseits. In einem initialen Screening-Ansatz erwies sich die SRC-Tyrosinkinase als die unter 46 repräsentierten Kinasen am kräftigsten phosphoryliert. Die durchgeführten Experimente zielten in ihrer Gesamtheit auf das Verständnis der Relevanz der SRC-Kinase in der Biologie des Synovialsarkoms und auf ihre Testung mit Blick auf mögliche zielgerichtete therapeutische Ansätze. Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

- Wie ist das Expressionsprofil der beiden funktionell differenten phosphorylierten Varianten der SRC-Kinase in einem repräsentativen Kollektiv von Synovialsarkomen?

- Lässt sich eine Assoziation des gefundenen Profils mit CSK1 und/oder PTP1B nachweisen, welche die Phosphorylierung am Tyrosinrest 527 regulieren?
- Ist die Regulation der Phosphorylierung der SRC-Kinase an der aktivierenden Phospho-Stelle Tyrosin 416 in einem Modellsystem Synovialer Sarkome abhängig von der Expression des Fusionsproteins?
- Lässt sich die über die Translokationsproteine induzierbare Phosphorylierung von SRC an Tyr416 kausal mit Regulationsmechanismen auf Ebene des Insulin-like growth factor Systems assoziieren?
- Wie reagieren primäre Synovialsarkomzellen hinsichtlich zellulärer Proliferation und Apoptose bei Inhibition der SRC-Kinase mittels Dasatinib oder siRNA und sind die gefundenen Veränderungen mit spezifischen Veränderungen des Phosphorylierungsniveaus von SRC-Zielproteinen assoziiert?
- Lassen sich durch SRC-Inhibition Effekte auf die zelluläre Motilität bzw. das Migrationsverhalten von Zellen Synovialer Sarkome erzielen und ergeben sich Hinweise auf einen mechanistischen Hintergrund mit Blick auf die Effektor-GTPasen Rac1 und RhoA?
- Wie wirkt Dasatinib *in vivo* im Synovialsarkom-Modell xenotransplanteder athymischer Nacktmäuse?

### **1.10 Hinweise zur Publikation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Bestandteil der Publikation von Sebastian Michels und Marcel Trautmann, et al. über: SRC Signaling Is Crucial in the Growth of Synovial Sarcoma Cells, erschienen 2013 in Cancer Research, Ausgabe 73, Seiten 2518-2528 (Michels et al., 2013). Im Verlauf wird auf eine Zitierung der Arbeit verzichtet.

## 2. Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Das analysierte Tumorkollektiv setzte sich aus 30 primären Synovialsarkomen zusammen. Das zur Diagnostik eingegangene Tumormaterial wurde nach Standardprotokollen in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich) fixiert und in Paraffin eingebettet (Sigma-Aldrich).

Zusätzlich zu basalen diagnostischen immunhistochemischen Untersuchungen wurde mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung bzw. Polymerase-Kettenreaktion im Vorfeld dieser Arbeit im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung der Tumoren eine pathognomonische Translokation *SS18-SSX* beziehungsweise ein chromosomales Rearrangement im Bereich des *SS18*-Lokus nachgewiesen.

### 2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

#### 2.2.1 Immunhistochemische Untersuchungen der primären Synovialsarkome

Um das Expressionsmuster der beiden funktionell relevanten phosphorylierten Formen von *c-SRC*, von *PTP1B* und *CSK* in den 30 primären Synovialsarkomen zu analysieren, wurde das Tumormaterial immunhistochemisch untersucht. Für die immunhistochemischen Färbungen des Tumorgewebes wurden Antikörper gegen folgende Antigene verwendet: p-(Tyr416)-SRC und p-(Tyr527)-SRC, PTP1B und CSK.

Antikörper	Klonalität	Hersteller	Konzentrationen
p-(Tyr416)-SRC	polyklonal	Cell Signaling Technology	1:100
p-(Tyr527)-SRC	polyklonal	Cell Signaling Technology	1:100
PTP1B	monoklonal	abcam	1:100
CSK	monoklonal	abcam	1:50

#### Durchführung

Von den Paraffinblöcken o.g. Tumorproben wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Demaskierung der Antigenstrukturen wurde das Material mit Natriumcitrat-Puffer bei einem pH von 6 in der Mikrowelle (600 W) 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit den Primärantikörpern (alle 1:100 in TBS) inkubiert. CSK und

PTP1B wurden mittels eines Autostainers (DAKO) gefärbt; die Färbungen für p-(Tyr416)-SRC sowie p-(Tyr527)-SRC wurden unter Einsatz des Catalyzed Signal Amplification Systems (CSA II) (DAKO) nach dem Protokoll des Herstellers manuell angefertigt. Die Antikörperbindung von PTP1B und CSK wurde mittels 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, ABC-Methode) visualisiert, für die Detektion der beiden SRC-Varianten wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, braun) eingesetzt. Adäquate Positivkontrollen (invasives Mammakarzinom, NST) und Negativkontrollen (Kaninchen IgG Isotypkontrolle) wurden eingeschlossen. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines semiquantitativen Scores mit der Einteilung des Expressionsmusters in negativ, schwach, moderat und stark bewertet; dabei wurde das Expressionsniveau der Positivkontrolle (invasives ductales Mammakarzinom) als stark gewertet.

### 2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen der Xenotransplantate

Die explantierten Tumoren der *in vivo*-Versuche wurden immunhistochemisch auf folgende Proteine untersucht (siehe Kapitel 2.15): p-(Tyr416)-SRC und p-(Tyr527)-SRC, cleaved Caspase-3 (Asp175) und p-(Ser10)-Histon H3.

Antikörper	Klonalität	Hersteller	Konzentrationen
p-(Tyr416)-SRC	polyklonal	Cell Signaling Technology	1:100
p-(Tyr527)-SRC	polyklonal	Cell Signaling Technology	1:100
cleaved Caspase-3 (Asp175)	monoklonal	Cell Signaling Technology	1:300
p-(Ser10)-Histon H3	monoklonal	Merck Millipore	1:500

#### Durchführung

Die entnommenen Xenotransplantate wurden in 4%iger gepufferter Paraformaldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich) für 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (Sigma-Aldrich). Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen ist in Kapitel 2.2 beschrieben.

Die Auswertung erfolgte analog zur Auswertung des Gewebes der primären Synovialsarkome (siehe Kapitel 2.2).

### 2.3 Zelllinien und allgemeine Zellkulturbedingungen

Folgende Zelllinien primärer Synovialsarkome wurden für die Zellkultur- und Xenotransplantatversuche eingesetzt:

<b>Zellreihe</b>	<b>Translokation</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Erstbeschreibung</b>
FUJI	SS18-SSX2	10 % FBS RPMI 1 % L-Glutamin	Watanabe et al., 2006
CME-1	SS18-SSX2	10 % FBS RPMI 1 % L-Glutamin	Mancuso et al., 2000
SYO-1	SS18-SSX2	10 % FBS DMEM 1 % L-Glutamin 1 % Pyruvat	Kawai et al., 2004
1273/99	SS18-SSX2	15 % FBS F-12 1 % L-Glutamin 1 % Pyruvat	Xie et al., 2002
HS-SY-II	SS18-SSX1	10 % FBS DMEM 1 % L-Glutamin	Sonobe et al., 1992

### Lösungen und Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM+GlutaMAX-I	Invitrogen
DPBS/Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Invitrogen
F-12+GlutaMAX-I	Invitrogen
FBS/Fetal Bovine Serum	Invitrogen
Gelantine, gepulvert	Merck
L-Glutamin	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Sodium Pyruvat	Invitrogen
Trypsin-EDTA 0,25 %	Invitrogen
CellSTAR, Kulturflaschen 25/75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One

## Durchführung

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Experimente wurden mit sterilen Instrumenten an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in 25 cm<sup>3</sup> oder 75 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen gehalten (Greiner Bio-One). Die Beschichtung des Flaschenbodens mit einer 0,1 % Gelatine-ddH<sub>2</sub>O-Lösung (Merck) war für die Kultur von FUJI und 1273/99 Zellen erforderlich.

Die Lösung der Zellen aus ihrem Zellverband erfolgte nach Absaugen des Kulturmediums und Spülung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Invitrogen) durch Zugabe von 0,5-1ml Trypsin-EDTA (Invitrogen). Die gelösten Zellen wurden anschließend in dem zuvor abgenommenen Medium zur Inaktivierung des Trypsins resuspendiert und bei 800 rpm für 3 min abzentrifugiert. Nach Suspension in frischem Medium konnten die Zellen den weiteren Anwendungsschritten entsprechend verarbeitet werden.

## 2.4 Das *in vitro* Synovialsarkom-Modell

### 2.4.1 Prinzip der Erstellung des *in vitro* Synovialsarkom-Modells

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle der SS18-SSX-Expression in den Tumorzellen nutzten wir ein Modell aus humanen TReX-293-Zellen (Invitrogen) in denen wir unter Zuhilfenahme des pTReX DEST30 Gateway Expression Systems (Invitrogen) die Fusionsproteine SS18-SSX1 und SS18-SSX2 sowie Kontrollen exprimierten.

Die Erstellung der Expressionsvektoren erfolgte in 3 Schritten: 1. Erstellung und Aufreinigung der DNA-Inserts, 2. TOPO-Klonierung in den pENTR/D-TOPO<sup>TM</sup>-Entry-Vektor (Invitrogen) und 3. Direktionale Rekombination in den pT-REX-DEST -Vektor. Dieses Gateway<sup>TM</sup>-Vektoren-System von Invitrogen erlaubt den direktionalen Einbau von stumpfen PCR-Produkten in den Destination-Vektor und eine effektive Expression in der Zielzelle.

### 2.4.2 Erstellung der DNA-Inserts

Die Generierung der Inserts für die Expression von SS18-SSX1-, SS18-SSX2 sowie der Inserts für die Kontrollen mit SS18, SSX1 und SSX2 erfolgte aus primärem Synovialsar-

komgewebe mittels PCR-Amplifikation und Aufreinigung. Alle eingesetzten forward Primer verfügten an ihren 5'-Enden über eine CACC-Flankierung. Diese ermöglicht anschließend die Klonierung in das eingesetzte TOPO-Vektoren-System mittels Bindung des GTGG-Überhanges im Vektor. Hinter dieser Sequenz findet sich ebenfalls in jedem der Primer eine ATG-Sequenz, welche das Startcodon für die Expression der Transkripte bildet.

Da die Sequenzen von *SS18-SSX1* und *SS18-SSX2* eine große Homologie aufweisen, wurden gleiche Primerpaare eingesetzt.

### **Primer-Sequenzen**

SS18-SSX1 und SS18-SSX2:

Forward: 5'-CACCATGTCTGTGGCTTTCGCG-3'

Reverse: 5'-GGGCATGTGTCGTATCCC-3'

SS18:

Forward: 5'-CACCATGTCTGTGGCTTTCGCG-3'

Reverse: 5'-TCACTGCTGGTAATTTCCATACTGTCCCTGGTCATATCCATAAGG-3'

SSX1:

Forward: 5'-CACCATGAACGGAGACGACACCT-3'

Reverse: 5'-GGGCATGTGTCGTATCCC-3'

SSX2:

Forward: 5'-CACCATGAACGGAGACGACGCC-3'

Reverse: 5'-GGGCATGTGTCGTATCCC-3'

### **Lösungen und Materialien**

#### **Bezeichnung**

#### **Hersteller**

QIAquick® Spin

Qiagen

PCR Purification Kit

## Durchführung

Die Durchführung der PCR-Amplifikation sowie der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.6 beschriebenen Verfahren.

Zur Isolierung der DNA-Inserts wurde das QIAquick<sup>®</sup> Spin PCR Purification Kit verwendet (Qiagen). Alle aufgeführten Materialien wurden dem Kit entnommen. Die jeweiligen DNA-Banden wurden unter UV-Licht manuell herausgeschnitten und für 10 min bei 50 °C mit dem 3-fachen Volumen Puffer QG inkubiert, um das Agarose-Gel aufzulösen. Da der pH zur optimalen Absorption in den Absorptionssäulen bei 7,5 liegt, ist es wichtig diesen falls abweichend auszugleichen. Im Anschluss wurde der Lösung Isopropanol in einem Verhältnis von 100 µl zu 100 mg Ausgangsgewicht des Gelstreifens zugefügt. Das gesamte Volumen der Lösung (max. 800 µl in einem Durchgang) wurde anschließend auf die im Kit mitgelieferten Absorptionssäulen gegeben und bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Im Anschluss hieran wurden die Säulen mit 0,5 ml Puffer QG bei 13.000 rpm für eine Minute ausgewaschen. Die Säulen wurde nun für 2 min in 0,75 ml Puffer PE inkubiert und anschließend für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen konnten nun für eine Minute in Puffer BE inkubiert werden und die DNA für eine Minute bei 13.000 rpm herunterzentrifugiert werden. Die eluierte Inserts wurde bei -20 °C gelagert

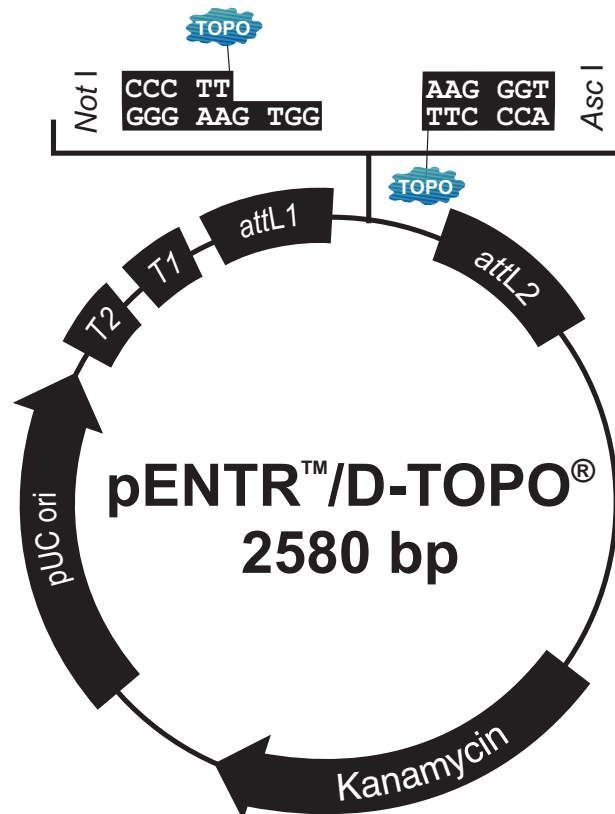
### 2.4.3 Die Erstellung des Entry-Vektors

Die TOPO-Klonierung der Inserts in den Entry-Vektor (pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>, Invitrogen) erfolgte strikt nach Herstellerangaben. Die so erstellten Vektoren konnten anschließend in E. coli (One Shot<sup>®</sup> Top 10 Chemically Competent E. coli, Invitrogen) transformiert werden. Das Vektorensystem kodiert neben den klonierten Inserts einen Kanamycin-Resistenz Faktor. Durch Inkubation mit Kanamycin konnten transformierte E. coli-Klone selektioniert werden. Die kompetenten Klone wurden anschließend kultiviert und die Entry-Vektoren isoliert.

Das Prinzip der TOPO-Klonierung liegt in dem direktionalen Einbau von PCR-Produkten mit CACC-Überhängen in den durch Topoisomerase I freigelegten GTGG-Überhang im



Vektor. Topoisomerase I bindet spezifisch an CCCTT-Sequenzen der Klonierungs-Site der Vektoren und ist in der Lage mittels Hydrolyse der Basen am 3'-Ende der CCCTT-Sequenz eines Stranges den GTGG-Überhang des Reverse-Stranges freizulegen. Somit ist der streng unidirektionale Einbau der gewonnenen DNA-Inserts mit CACC-Überhang möglich (siehe Abbildung 5).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des eingesetzten pENTR™/D-TOPO®-Vektors von Invitrogen. Zu erkennen sind unter anderem die TOPO-Rekombinationssite sowie der Kanamycin-Resistenzfaktor (Abbildung aus: Handbuch zu pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen).

### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen
One Shot® Top 10 Chemically	Invitrogen
Competent E. coli	
S.O.C. Medium	Invitrogen

## Durchführung

Vier µl PCR-Produkt (DNA-Inserts: SS18-SSX1, SS18-SSX2, SS18, SSX1 und SSX2) wurden mit 1 µl der im Kit enthaltenen Salz-Lösung und ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 5 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl der pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-Lösung zugefügt. Das Mischungsverhältnis aus Vektor und DNA-Inserts sollte dabei ein Verhältnis von 0,5:1 bis 2:1 aufweisen. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und die Reaktion auf Eis abgestoppt. In der Zwischenzeit wurden mit 50 µg/ml Kanamycin behandelte Agarplatten sowie das S.O.C. Transformationsmedium auf Raumtemperatur gebracht. Pro eingesetzter Agarplatte wurde ein Ansatz der im One Shot<sup>®</sup> Top 10 Chemically Competent E. coli fraktionierten E. coli auf Eis aufgetaut. Zu diesen Ansätzen wurden nun 2 µl des Transformationssansatzes zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend für 30 s im 42 °C Wasserbad abgestoppt und die Suspension unmittelbar für 2 min auf Eis gelagert. Zu jedem Ansatz wurden nun 250 µl S.O.C. Medium beigefügt und die Lösung für 60 min bei 37 °C inkubiert. Pro Agarplatte wurden daraufhin 20 bis 100 µl der Bakteriensuspension aufgetragen. Die Kultivierung der Platten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

Die Durchführung der Selektion erfolgreich transformierter E. coli und die Isolierung der Plasmide zur Rekombination mit dem Destination-Vektor ist Kapitel 2.4.5 zu entnehmen.

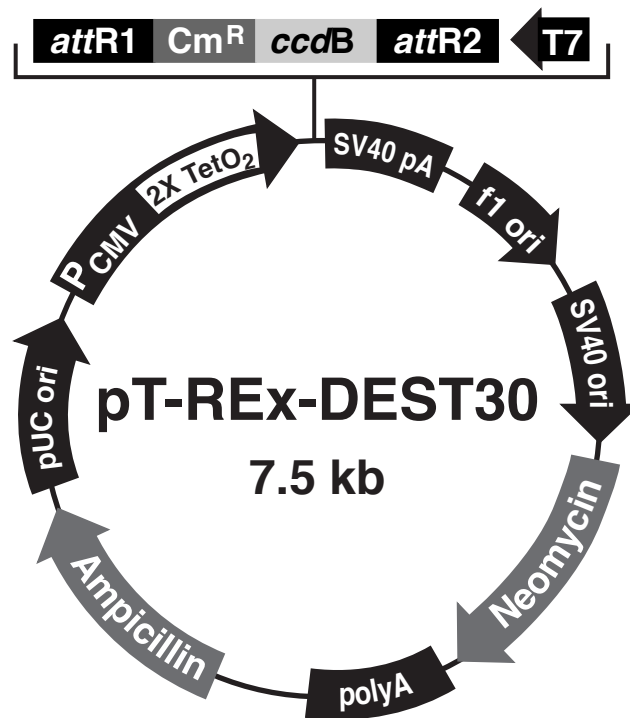
### 2.4.4 Rekombination und Klonierung des Destination-Vektors

Zur Erstellung der Destination-Vektoren (pT-REx-DEST Gateway<sup>TM</sup>, Invitrogen) wurden die, wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben, gewonnenen pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO Vektoren eingesetzt. Prinzip der Rekombination ist der Einbau von DNA-Inserts eines Entry-Vektors in einen Destination-Vektor (siehe Abbildung 6). Die Rekombinationssite (*ccdB*-Gen) des Destination-Vektors ist durch eine attR1- und eine attR2-Site flankiert. Durch Inkubation des Entry-Vektors und des Destination-Vektors mit einer Clonase (LR<sup>TM</sup> Clonase, Invitrogen) wird das *ccdB*-Gen über Ligation der korrespondierenden attL1- und attL2-Sites des Entry-Vektors durch das DNA-Inserts unidirektional ersetzt.

Die Selektion der erfolgreich transformierten *E. coli*-Klone gelingt mittels Inkubation mit Ampicillin aufgrund der Expression eines Ampicillin-Resistenz-Faktors. Darüber hinaus verfügen dieser Vektor über ein Neomycin-resistenz-Gen, welches die Selektion der transformierten TReX-293-Zellen mittels Geneticin erlaubt. Geneticin ist ein Zellgift sowohl für prokaryote als auch eukaryote Zellen. Als Aminoglykosid interagiert es mit der Proteinbiosynthese und ist eng mit Neomycin, Gentamycin und Kanamycin verwandt. Die Expression des Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gens bildet einen Resistenzfaktor auf die zytotoxische Wirkung der Aminoglykoside. Erfolgreich transformierten TReX-293-Zellen können somit isoliert werden.

Der eingesetzte pT-REX-DEST Gateway™ Destination-Vektor verfügte über zwei Tetracyclin-induzierbare CMV-Promoter-Sites (TetO2), welche die Expression der SS18-SSX1-, SS18-SSX2-, SS18, SSX1- und SSX2-Inserts steuern.

Die so erstellten Destination-Vektoren wurden anschließend in *E. coli* transformiert (One Shot® Top 10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des eingesetzten pT-REx-DEST Gateway™ Destination-Vektors von Invitrogen. Zu erkennen sind unter anderem die TOPO-Rekombinationssite sowie der Ampicillin-Resistenzfaktor (Abbildung aus: Handbuch zu pT-REx-DEST Gateway™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen).

### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
pT-REx-DEST Gateway™ Vector Kit	Invitrogen
One Shot® Top 10 Chemically	Invitrogen
Competent E. coli	
S.O.C. Medium	Invitrogen

### Durchführung

Alle Versuchsschritte erfolgten streng nach Herstellerprotokoll und mit den vom Hersteller bereit gestellten Lösungen und Materialien. Für die Rekombination wurden 50 bis 150 ng des Entry-Vektors, 1 µl pT-REx-DEST Gateway™ Destination-Vektor-Lösung (entsprechen 150 ng) sowie 2 µl LR Clonase II inkubiert und die Lösung auf ein Endvo-

lumen von 10 µl mit TE Puffer aufgefüllt. Nach 2 h auf 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Proteinkinase K bei 37 °C für 10 min abgestoppt.

Die Transformation der E. coli erfolgte analog zu Kapitel 3.4.3. Einzige Ausnahme hiervon stellte die Selektionierung der kompetenten Klone mittels Ampicillin dar. Die Ampicillin-Konzentration pro Agarplatte betrug 100 µl/ml.

#### **2.4.5 Selektion der transformierten E. coli-Bakterien sowie Plasmid-Aufreinigung**

Ziel der Selektion der transformierten E. coli-Bakterien sowie der Plasmid-Aufreinigung ist die Isolierung der rekombinanten Entry- und Destination-Vektoren. Zur Isolierung der erfolgreich transformierten E. coli enthalten beide Vektorsysteme Resistenzfaktoren für Antibiotika. Durch Inkubation mit dem jeweiligen Antibiotikum können so die transformierten Klone isoliert werden.

#### **Lösungen und Materialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
PureLINK HiPure®	Invitrogen
Plasmid Filter Purification Kit	

#### **Durchführung**

Die Durchführung der Selektion und Plasmid-Aufreinigung erfolgte für beide Vektorsysteme in gleicher Weise.

Mit einer gelben Pipettenspitze wurden die angewachsenen E. coli-Kolonien aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit Zugabe von Antibiotika (Ampicillin 100 µl/ml bzw. Kanamycin 50 µl/ml) zu einer Vorkultur im Inkubationsschrank bei 37 °C herangezogen. Die Überprüfung des Erfolges der Transformation erfolgte darüber hinaus mittels PCR und Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.6). Von dieser Vorkultur wurden jeweils 1 ml in 200 ml LB-Hauptkultur überführt und im Inkubationsschrank bei 37 °C unter Zugabe von Antibiotika über Nacht kultiviert. Die kultivierte Bakteriensuspension wurde anschließend

bei 5.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene E. coli-Pellet wurde anschließend für die Plasmid-Isolierung eingesetzt.

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit Hilfe des PureLINK HiPure® Plasmid Filter Purification Kits von Invitrogen. Alle eingesetzten Lösungen und Materialien wurde dem Kit entnommen. Vor Beginn der Isolierungsschritte mussten die Filtrations-Säulen mit Equilibrium Puffer vorbereitet werden. Das zuvor gewonnene Pellet wurde in 10 ml Resuspension Puffer und RNase A bei 4 °C resuspendiert, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml Lysis Puffer für 5 min inkubiert. Anschließend wurden der Suspension 10 ml Precipitation Puffer zugefügt und die vorsichtig gemischte Lösung auf die vorbereiteten Filtrations-Säulen gegeben. Der Schwerkraft nach kam es nach 10 bis 15 min zu einer Filtration der Lösung innerhalb der Säulen. Die Säulen wurden anschließend mit Waschpuffer gewaschen und der Durchfluss verworfen. Die in der Filtrationssäule gebundenen Plasmide wurden nun über einem frischen 50 ml Falcon-Röhrchen mit 15 ml Elution Puffer ausgewaschen. Zur Ausfällung der DNA wurden der Lösung 10,5 ml Isopropanol zugefügt. Nach 2 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung bei 4 °C und 15.000 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 5 ml 70 % Ethanol-Lösung resuspendiert und die Suspension für 5 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet konnte nun bei Raumtemperatur getrocknet werden und in 50 µl Elution Puffer aufgenommen werden. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt.

#### **2.4.6 Expression der Inserts in pT-REx-293-Zellen**

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle der SS18-SSX-Expression in den Tumorzellen nutzten wir ein Modell aus humanen TReX-293-Zellen (Invitrogen) in denen wir unter Zuhilfenahme des pT-REx DEST30 Gateway Expression Systems (Invitrogen) die Fusionsproteine SS18-SSX1 und SS18-SSX2 exprimierten. Die Selektion der erfolgreich transfizierten pT-REx-293-Zellen erfolgte durch die Zugabe von zytotoxischem Geneticin durch Expression des Neomycin-Resistenz-Gens. Darüber hinaus verfügte der Destination-Vektor über zwei Tetracyclin-induzierbare CMV-Promoter-Sites (TetO2), welche die

Expression der SS18-SSX1-, SS18-SSX2-, SS18, SSX1- und SSX2-Inserts steuern. Unter Hinzugabe von Tetracyclin kann somit die Expression der Inserts induziert werden.

### Lösungen und Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
T-REx-293-Zellen	Invitrogen
pT-REx/GW30/lacZ Vector	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
Opti-MEM I	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Geneticin G418	Invitrogen
Tetracyclin	Sigma-Aldrich

### Durchführung

Die Herstellung der Expressionsvektoren zur Transfektion in die T-REx-293-Zellen (Destination-Vektoren) erfolgte wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben. Als Kontrolle diente der  $\beta$ -Galactosidase exprimierende pT-REx/GW30/lacZ Vektor von Invitrogen. Am Vortag der Transfektion wurden 6-well-Platten mit jeweils 150.000 T-REx-293-Zellen beimpft und in 2 ml 10%igem FBS DMEM Medium kultiviert. Unmittelbar vor der Transfektion wurden pro 6-Well 2,5  $\mu$ g der Expressionsvektoren in 250  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium gelöst. In einem zweiten Ansatz wurden 4  $\mu$ l Lipofectamin 2000 mit 250  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium vermischt. Die beiden Ansätze wurden unter vorsichtigem auf- und abpipettieren zusammengeführt und für 20 min inkubiert. Die gesamte Lösung wurden anschließend jeweils in ein 6-well pipettiert. Sechs Stunden später, erfolgte ein Mediumwechsel auf 2 %-FBS-DMEM. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter Zugabe von 1 mg/ml Geneticin (G418) 6 Wochen selektiert. Die Expression der Vektorprodukte wurde durch die 24-stündige Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin (Sigma-Aldrich) induziert.

## 2.5 Proteinanalysen

### 2.5.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Für die Westernblotanalysen (siehe Kapitel 2.6) erfolgte die Proteingewinnung wie folgt:

#### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Proteinlysepuffer	Tris base 50 mM	Sigma-Aldrich
	NaCl 120 mM	Sigma-Aldrich
	Nonidet P-40 0,5 %	Sigma-Aldrich
	PMSF 1 %	Sigma-Aldrich
	Aprotonin 0,1 %	Sigma-Aldrich
	NaF 0,025 %	Sigma-Aldrich
	ddH <sub>2</sub> O	

#### Durchführung

Nach der dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechenden Vorbehandlung wurden die Zellen zweimalig vorsichtig mit PBS gewaschen und mittels einer adäquaten Menge des Proteinlysepuffers (50-100 µl) auf Eis lysiert, nach 30-minütiger Inkubation mit einem Gummispatel (Invitrogen) abgetragen und die Zellbruchstücke mit 15.000 x g über 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der abgenommene zellfreie Überstand wurde anschließend bei -20 °C in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf) gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Bestimmung der Farbabsorption im Photospektrometer nach Zugabe von Bradford-Lösung entsprechend den Herstellerangaben (1:5 Verdünnung in ddH<sub>2</sub>O) (Bio-Rad). Die Bestimmung erfolgte in 96-Loch Kulturplatten in Triplikaten. Die Messung der Absorption im Photospektrometer erfolgte bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 595 nm. Als Referenzwerte diente eine Proteinkonzentrationsreihe (0-5 mg/ml, in 1 mg/ml Schritten) aus bovinem Serumalbumin (Invitrogen).



## 2.5.2 Proteinanalysen im Westernblot

Für die Westernblot-Analysen wurden die folgenden Primär- und Sekundärantikörper eingesetzt.

<b>Antikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Abstammung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Anti-SRC*	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotech.	1:2000
Anti-p-(Tyr416)-SRC	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-(Tyr527)-SRC	polyklonal	Kaninchen	Cell SignalingTech.	1:1000
Anti-PTP1B	monoklonal	Kaninchen	abcam	1:500
Anti-CSK	polyklonal	Kaninchen	abcam	1:500
Anti-β-Actin*	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich	1:10000
Anti-Akt	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-Akt (Ser473)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-FAK	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-FAK (Tyr576/577)	polyklonal	Knainchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-IGF-I R β	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-IGF-I R β (Tyr1131)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p44/42 MAPK	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-STAT3	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
Anti-p-STAT3 (Tyr705)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Tech.	1:1000
ECL Anti-Rabbit -IgG,* HRP-konj.	polyklonal	Schaaf	GE Healthcare	1:50000
ECL Anti-Mouse -IgG,* HRP-konj.	polyklonal	Affe	GE Healthcare	1:50000

\* Zur Inkubation in 5 % Magermilch-TBS-Tween gelöst - alle anderen Antikörper in 5 % BSA-TBS-Tween

## Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
HRP-Detektionsreagenz	Amersham ECL	GE Healthcare
Laufpuffer	NuPAGE Running Buffer MOPS SDS	Invitrogen
Probenpuffer (4-fach)	NuPAGE LDS sample buffer 90 % NuPAGE reducing agent 10 %	Invitrogen Invitrogen
TBS (10-fach)	NaCl 80,0 g Tris Base 24,2 g ddH <sub>2</sub> O 1000 ml pH 7,6	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
TBS-Tween 0,1 %	TBS (einfach) Tween 0,1 %	Sigma-Aldrich
Transferpuffer	NuPAGE Transfer Buffer	Invitrogen
Längenstandard	NuPAGE Pre-stained Protein Ladder	Invitrogen
Blotmembran	Nitrocellulose Membrane Pure 0,2 µm	Bio-Rad
Blotkammer	xCell II Blot Module	Invitrogen
Laufgel	NuPAGE Gel Bis-Tris 4-12 % 1,0 mm x 15 well	Invitrogen
Laufmodul	xCell Mini-Cell Sure Lock	Invitrogen

## Durchführung

In einem ersten Schritt wurden die homogenen Proteinlysate gleicher Konzentration in einer Menge von 10-20 µl mit 5 µl Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend in die Kammern des Laufgels pipettiert und im Laufpuffer bei einer Spannung von 200 V für 65 min aufgetrennt. Anschließend erfolgte der elektrophoretische Proteintransfer auf die Zellulosemembran in der Blotkammer bei 30 V für 80 min. Die übertragenen Proteine wurden mit Ponceau S Lösung visualisiert und die Membran an den gewünschten Proteinlaufhöhen zurechtgeschnitten. Blot-

membranen wurden mit 5%iger Magermilch-TBS-Tween-Lösung in 10 min blockiert. Die Membranen wurden anschließend über Nacht mit den in 5%iger Magermilch-TBS-Tween- oder BSA-TBS-Tween-Lösung verdünnten Primärantikörpern bei 4-8 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Tween wurden die Membranen zur Darstellung der Primärantikörper mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG- oder Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörpern für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten zur Eliminierung der nicht gebundenen Antikörper wurden die Membranen mit Peroxidase-Reaktionslösung für eine Minute benetzt und zur Detektion der Lumineszenz-Reaktion zwischen Klarsichtfolie gebracht. Diese konnte anschließend mittels eines Röntgenfilms detektiert werden.

### **2.5.3 Der Phospho-Kinase Array**

Zur Analyse des Aktivierungsmusters relevanter Tyrosinkinase in Zellen synovialer Sarkome wurde der „Human Phospho-Kinase Antibody Array“ von R&D Systems eingesetzt. Dieser visualisiert antikörpervermittelt den Phosphorylierungsstatus von 46 ausgewählten Kinasen.

#### **Durchführung**

Sämtliche für diesen Versuch erforderlichen Reagentien sowie die Antikörpermembranen waren Bestandteil des Human Phospho-Kinase Antibody Array Kits, die Ausführung des Versuchs erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll.

1273/99- sowie HS-SY-II-Zellen wurden 48 Stunden in 10%igem FBS-Medium kultiviert. Anschließend wurden gemäß dem Herstellerprotokoll  $1 \times 10^7$  Zellen/ml lysiert und bei  $14.000 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Die Antikörper-beschichteten Membranen wurden über Nacht mit den Proteinlysaten inkubiert und anschließend mit Waschpufferlösung gewaschen. Im Anschluss hieran wurden die Membranen mit den jeweiligen Antikörperlösungen für 2 h Reaktionsschalen inkubiert und anschließend erneut mit Waschpufferlösung gewaschen. Die Antikörper-Antikörper-Bindung wurde nach 30-minütiger Behandlung mit Streptavidin-HRP-Lösung auf einem Röntgenfilm visualisiert. Die densitometrischen Analysen erfolgten mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ.

## 2.6 RNA-Analysen

### 2.6.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Zur Isolierung von zellulärer RNA wurde eine Trizol-Reagenz verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Genomische DNA wurde mittels DNase verdaut. Die cDNA-Transkription erfolgte mittels reverser Transkriptase.

#### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Trizol-Reagenz	Invitrogen
Chloroform	Merck
Isopropanol	KMF
Ethanol, 75%ige Lösung	KMF
DEPC (0,1 %)-ddH <sub>2</sub> O	Sigma

SuperScript™ III Reverse Transcriptase    Invitrogen

Zufallsprimer, Random Hexamers         Invitrogen  
(50 µM)

#### Durchführung

Durch herabzentrifugieren (800 rpm, 3 min) wurden aus den in Medium suspendierten Zellen Pellets gewonnen. Die Pellets wurden in 500 µl Trizol-Reagenz gelöst. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben, die Suspension geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei 12000 x g und 4 °C wurden die Rückstände für 15 min herabzentrifugiert. Zur Ausfällung der RNA wurde die obere, klare, Phase vorsichtig abpipettiert und mit 250 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde erneut bei 4 °C und 12000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet in Ethanol-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde anschließend bei 7500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen und nach dem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit erfolgte im Photospektrometer (Wellenlänge: 260 nm bzw. 280 nm).

Zur Synthese der cDNA wurde das SuperScript™ III Reverse Transcriptase System von Invitrogen verwendet. Alle Materialien wurden dem Kit entnommen und es wurde streng nach Herstellerprotokoll gearbeitet. 250 bis 500 ng RNA wurden mit 50 bis 250 ng Zufallsprimer inkubiert. Die Lösung wurde mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis gestoppt. Durch eine kurze Zentrifugation wurde der Inhalt am Boden des Röhrchens gesammelt. Zur reversen Transkription wurde der Lösung 4 µl 5-fach PCR-Puffer, 1 µl rekombinanter RNase Inhibitor, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl reverse Transkriptase (200 U/l) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 50 °C für 60 min. Um die Transkription zu stoppen, wurde die Lösung bei 70 °C für 15 min erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.6.2 Analyse der RNA-Expression mittels Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Zur Evaluierung der Wirkung der Fusionsproteine auf die Expression von *IGF-2* im Synovialsarkom-Tumormodell (siehe Kapitel 2.3) wurde die RNA-Transkription der vier unterschiedlichen Transkripte des IGF2 Gens in Abhängigkeit der Promotoren P1-4 unter Expression von *SS18-SSX1*, *SS18-SSX2*, *SS18*, *SSX1*, *SSX2* und  $\beta$ -Galaktosidase (Kontrolle) untersucht.

#### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
PCR-Gerät	Thermoblock Cycler	Biometra
PCR-Ansatz ad 50 µl für IGF2-Transkripte	0,4 µl FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/l) 1 µl dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 200 µmol/l) 5 µl 10 x PCR Puffer 4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 5 µl 10 x Forward-Primer (10 µM) 5 µl 10 x Reverse-Primer (10 µM) ddH <sub>2</sub> O ad 50 µl	Roche Roche Roche Roche
PCR-Ansatz ad 10 µl	0,1 µl FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/l)	Roche

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
für 28S-RNA-Transkr.	0,2 µl dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 200 µmol/l)	Roche
	1 µl 10 x PCR Puffer	Roche
	0,8 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Roche
	0,5 µl 10 x Forward-Primer (10 µM)	
	0,5 µl 10 x Reverse-Primer (10 µM)	
Elektrophoresekammer	Mighty Brighty	Hofer
Agarosegel	LE GP Agarose	Biozym
	Ethidiumbromid 10 µl	Roth
	ddH <sub>2</sub> O ad 100 ml	
TBE-Puffer (10-fach)	Tris-Base 108 g/l	Sigma
	EDTA (0,5 M) 40 ml	Invitrogen
	Borsäure 55 g/l	Sigma
	ddH <sub>2</sub> O ad 1 l	
Ladepuffer (5:2)	Ficoll Typ 400 (15 %)	Sigma
	Bromphenolblau (0,25 %)	Sigma
	Xylencyanol (0,25 %)	Merck
Längenstandard	10 bp DNA Ladder	NEB

### **Primer-Sequenzen**

Forward-Primer mit folgenden Sequenzen kamen zum Einsatz (Fragmentlänge):

IGF2-P1: 5'-GCTCCCAGAACTGAGGCTGG-3' (147 bp)

IGS2-P2: 5'-TGCCACAGAGCGTTCGATCG-3' (158 bp)

IGF2-P3: 5'-GCTGTTCGGTTTGGCAGACG-3' (144 bp)

IGF2-P4: 5'-GCTTCTCCTGTGAAAGAGAC-3' (174 bp)

28S: 5'-CCCAGTGCTGAATGTCAA-3' (130bp)

Reverse-Primer mit folgender Sequenz kam zum Einsatz:

IGF2-P1;-P2;-P3;-P4: 5'-GCGGTAAGCAGCAATGCAGC-3'

28S: 5'-AGTGGGAATCTCGTTCATCC-3'

### Durchführung

Das Volumen des PCR-Ansatzes für die IGF2-Amplifizierung von 50 µl setzte sich wie oben beschrieben zusammen. Die Gesamtmenge an cDNA pro Ansatz betrug 100 bis 250 ng. Die Amplifikation erfolgte auf einem Thermoblock Cycler (Biometra) unter folgenden Bedingungen: Denaturierung für 4 min bei 95 °C, 40 Zyklen à 30 s bei 95 °C, 30 Sekunden bei 55 °C, 40 s bei 72 °C, Extension für 7 min bei 72 °C.

Das Volumen des PCR-Ansatzes für die 28S-RNA-Amplifizierung von 10 µl setzte sich wie oben beschrieben zusammen. Die Amplifikation erfolgte auf einem Thermoblock Cycler (Biometra) unter den folgenden Bedingungen: Denaturierung für 4 min bei 95 °C, 25 Zyklen à 30 Sekunden bei 95 °C, 30 s bei 60 °C, 30 s bei 72 °C, Extension für 7 min bei 72 °C.

Die Beladung der Geltaschen erfolgte mit 1 Anteil PCR-Produkt in äquimolarer cDNA-Konzentration und 1 Anteil Ladepuffer sowie einem Längenstandard. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120-200 V für 10-30 min.

### 2.7 IGF-2-Stimulationsversuch

Zur Bestimmung des Einflusses des Insulin-like growth factor Systems auf die Aktivierung von SRC wurden Synovialsarkomzelllinien mit dem IGF-1R-Liganden IGF-II stimuliert.

### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Recombinant Human IGF-II	R&D Systems

### Durchführung

Am Vortag des Versuches wurden 1273/99, FUJI und CME-1 Zellen in 12-well-Platten ausgesät, so dass am Tag des Versuches eine Dichte von 60-70 % vorlag (Gesamtzellzahl: CME-1:  $1,5 \times 10^5$ , FUJI:  $3 \times 10^5$ , 1273/99:  $3 \times 10^5$ ). Nach 4-stündigem Aushungern der Zellen mit FBS-freiem Medium erfolgte die Inkubation mit 200 ng/ml rekombinantem

humanen IGF-II für 30 min. Die behandelten Zellen wurden anschließend lysiert und mittels Western-Blot analysiert (siehe Kapitel 2.6).

## 2.8 Allgemeines zur Behandlung mit Dasatinib

### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Dasatinib (sc-218081)	Santa Cruz Biotechnology
DMSO	Sigma-Aldrich

### Durchführung

Für Westernblot-Analysen der mit Dasatinib behandelten Zellen wurden diese 48 h zuvor in 6-well Platten (Corning) mit 2%igem FBS-Medium so ausgesät, dass am Behandlungstag eine ca. 60%ige Konfluenz vorlag (Gesamtzellzahl: CME-1:  $3 \times 10^5$ , SYO-1:  $5 \times 10^5$ , 1273/99:  $6 \times 10^5$ , FUJI:  $6 \times 10^5$ ). Es erfolgte die Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen Dasatinib von 0,0  $\mu\text{mol/l}$  (Kontrolle) bis 10  $\mu\text{mol/l}$  für 60 min. Die Konzentration des Lösungsmittels DMSO wurde in allen Ansätzen konstant gehalten. Eine Konzentration von 0,1 % DMSO wurde nicht überschritten.

## 2.9 siRNA-Knockdown

Zur Kontrolle des spezifischen Effektes von Dasatinib auf SRC in Zellen Synovialer Sarkome wurde als alternativer Ansatz die Expression des Proteins mittels „small interfering RNA“ (siRNA) inhibiert.

Um den Einfluss des Insulin-like growth factor-Signalweges auf die Aktivität der SRC-Kinase zu evaluieren, wurden CME-1-Zellen mit *IGF-1R*-siRNA behandelt.



## Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Konzentration
SRC siRNA-Triplet	Stealth RNAi HSS186080 HSS186081 HSS186082	Invitrogen	1:10
<i>IGF-1R</i> siRNA-Triplet	Stealth RNAi HSS105153 HSS105254 HSS179797	Invitrogen	1:10
Kontroll siRNA	Block-iT Alexa Fluor Red	Invitrogen	1:10
Transfektionsmedium	Opti-MEM I 10 % FBS	Invitrogen Invitrogen	
Transfektionsreagenz	Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen	
RNase freies Wasser	DEPC Treated Water	Invitrogen	

## Durchführung

Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in 25 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen in 10%igem FBS-Medium ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von ca. 30-60 % aufwiesen (Gesamtzellzahlen: SYO-1: 4x10<sup>5</sup>, CME-1: 2,5x10<sup>5</sup>, 1273/99: 4x10<sup>5</sup>, FUJI: 4x10<sup>5</sup>). Die Transfektion erfolgte stets mit 60 pmol Gesamt-siRNA eines SRC-spezifischen siRNA Triplets bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA pro Flasche. Die siRNAs wurden zuvor in 500 µl Transfektionsmedium gelöst. Die gelösten siRNAs anschließend mit in 1000 µl Transfektionsmedium diluierem Lipofectamin RNAiMax (15 µl) 15 min. inkubiert. Das Medium der Kulturflaschen wurde im Folgenden abgesaugt und durch 5000 µl frisches 10%iges FBS-Medium ersetzt. Zu jeder Kulturflasche wurden 1000 µl des Transfektionsansatzes zugegeben. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA (Invitrogen) aus ihrem Verbund gelöst und für die Proliferationsuntersuchungen sowie Western-Blot-Analysen ausgesät. Die Transfektionseffizienz wurde am Kontroll-siRNA-transfizierten Ansatz fluoreszenzmikroskopisch verifiziert. Zur Kontrolle des effektiven Protein-Knockdowns mittels Westernblot-Analysen wurden die Zellen 72 h nach Aussaat lysiert

und nach Protokoll weiter verfahren (siehe Kapitel 2.6). Die Behandlung der Zellen für die Proliferationsuntersuchungen erfolgte nach Protokoll (siehe Kapitel 2.9).

## **2.10 Proliferations- und Apoptoseuntersuchungen**

### **2.10.1 Proliferationsuntersuchungen**

Zur Beurteilung der Vitalität der mit Dasatinib, Chemotherapeutika oder siRNA behandelten Zellen wurden kolorimetrische Untersuchungen mittels des „Cell Proliferation Kit I (MTT)“ (Roche) durchgeführt. Dieses basiert auf der Metabolisierung eines gelben Tetrazolium-Farbstoffes (MTT) zu blauem, wasserunlöslichem Formazan durch vitale Zellen. Die Farbintensität wurde im Photospektrometer (Thermo) ausgelesen.

#### **Anzahl der ausgesäten Zellen pro Loch der 96-Loch Platte**

<b>Zellreihe</b>	<b>Zellzahl pro 100 <math>\mu</math>l</b>
CME-1	$5 \times 10^3$
SYO-1	$10 \times 10^3$
1273/99	$7,5 \times 10^3$
FUJI	$8,5 \times 10^3$

#### **Durchführung**

Für die Proliferations-Analysen unter Therapie mit Dasatinib wurden unbehandelte Zellen in 96-Loch Kulturplatten in 2%igem FBS-Medium in Triplets ausgesät (siehe Kapitel 2.8). Die Zellen wurden am Folgetag mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0,0  $\mu$ mol/l (Kontrolle) bis 10  $\mu$ mol/l Dasatinib behandelt.

Für die Proliferationsanalysen unter „siRNA-Knockdown“ von SRC wurden Triplets transfizierter Zellen in 96-Loch Kulturplatten in 2%igem FBS-Medium ausgesät (siehe Kapitel 2.9). Die Dichte des Zellrasens am Folgetag lag jeweils unter 60 %.

Zur Untersuchung synergistischer oder additiver Effekte eines Zusammenwirkens von Dasatinib mit konventionellen Chemotherapeutika wurden 1273/99- und FUJI-Zellen in 2%igem FBS-Medium ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vincristin (VCR), Doxorubicin (DOXO), Actinomycin-D (ACT-D) in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0,0 ng/ml bis 100 ng/ml inkubiert; Die Ko-Inkubation mit Dasatinib wurde mit

Konzentrationen von 2,5 nmol/l für FUJI und 30 nmol/l für 1273/99 durchgeführt, diese Konzentrationen führten in Vorexperimenten zu einer Wachstumsinhibition von 20-30 %. Die Chemotherapeutika wurden seitens der Apotheke der Universitätsklinik Bonn zur Verfügung gestellt.

Zweiundsiebzig Stunden nach Beginn der Behandlung erfolgte die Prozessierung der Zellen nach Herstellerprotokoll. In jede der Vertiefungen der 96-Well Platte wurden 10  $\mu$ l der Reaktionslösung I pipettiert und über 4 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100  $\mu$ l der Reaktionslösung II und die Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C. Die Auslesung der 96-Loch Platten im Spektrometer erfolgte bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 550-690 nm. Zur Datenauswertung wurde die prozentuale Veränderung der Lichtabsorption der behandelten Triplets zu den unbehandelten Kontrollen ermittelt. Dabei zeigt eine Abnahme der Farbintensität eine verringerte Zellvitalität.

### 2.10.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Zur Qualifizierung des Einflusses von Dasatinib auf die Zellvitalität führten wir durchflusszytometrische Analysen durch. Dabei diente das Level an „cleaved poly ADP ribose polymerase“ (cleaved PARP) als Apoptosemarker und der Nachweis von „phospho-(Ser10)-histone H3“ (pHH3) als Mitosemarker.

<b>Antikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Anti-cleaved PARP	monoklonal	Phycoerythrin	BD Bioscience	1:20
Anti-p-HH3	monoklonal	Alexa Fluor 647	Cell Signalling Tech.	1:5

## Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Fixierlösung 2 %	Paraformaldehyd 4 % 500 µl	Sigma-Aldrich
	PBS 500 µl	Invitrogen
Permeabilisierungslösung	Triton X100 0,25 %	Sigma-Aldrich
DAPI-PBS-Lösung (10 mg/ml)	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	Sigma-Aldrich

## Durchführung

Achtzehn Stunden vor Behandlungsbeginn wurden  $8 \times 10^5$  Zellen in  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen in 2%igem FBS-Medium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit  $0,1 \text{ µmol/l}$  und  $0,6 \text{ µmol/l}$  Dasatinib für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden dann trypsinisiert, in 2%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert (10 min auf Eis), bei  $4 \text{ °C}$  abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm) und mit  $1000 \text{ µl}$  0,25%iger Triton X-100-Lösung für 5 min auf Eis permeabilisiert. Die Reaktion wurde dann mit  $500 \text{ µl}$  PBS abgestoppt und die Zellen bei 1200 rpm bei  $4 \text{ °C}$  für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in einer 0,5%igen BSA-Lösung mit den beiden Antikörpern bei Raumtemperatur resuspendiert und simultan inkubiert. Nach Ablauf von 30 min erfolgte eine Färbung mit  $500 \text{ µl}$  einer DAPI-PBS-Lösung in einer Konzentration von  $10 \text{ µg/ml}$ . Zwischen allen Einzelschritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Die so behandelten Zellen wurden in einem 3-Laser LSR II Durchflusszytometer (BD Bioscience) analysiert. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, wobei bei jeder Einzelmessung mindestens 30.000 Ereignisse registriert wurden. Die generierten Daten wurden mit Hilfe der „FlowJo™“ Software (Tree Star) ausgewertet. Die Untersuchungen wurden an SYO-1-, 1273/99- und CME-1-Zellen durchgeführt.

### 2.10.3 Quantifizierung der Apoptoserate mittels DAPI-Färbung

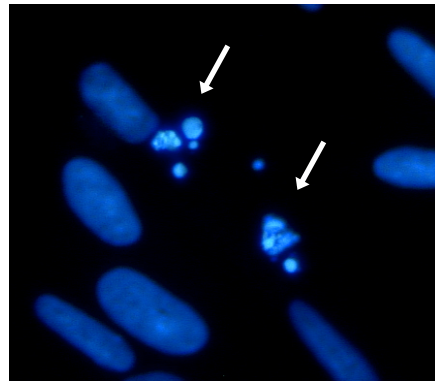
Als unabhängige Methode des Apoptosenachweises wurde eine mikroskopische Analyse mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich) gefärbter Zellkerne durchgeführt.

## Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Fixierlösung 4 %	Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich
DAPI-PBS-Lösung (1 µl/ml)	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	Sigma-Aldrich
Eindeckmedium	Fluoromount-G <sup>TM</sup>	Sigma-Aldrich
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLB	Leica

## Durchführung

Wie vorbeschrieben ausgesäte und kultivierte Zellen wurden für 12 h mit 0,03 µmol/l sowie 0,3 µmol/l Dasatinib inkubiert. Die mittels kurzer Trypsinierung abgeernteten Zellen wurden samt Überstand in 500 µl PBS verdünnt und abzentrifugiert (4 min 3000 rpm). Das Pellet wurde anschließend in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert, für 10 min fixiert und erneut zentrifugiert (4 min, 3000 rpm). Das gewonnene Pellet wurde mit 500 µl PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (4 min, 3000 rpm) und mit 400 µl einer 1 µg/mL DAPI-PBS-Lösung inkubiert. Nach Zentrifugation (4 min, 3000 rpm) wurden die Zellen erneut zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und das Pellet in 20 µl PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in einem weiteren Schritt mit 3 µl Menge „Fluoromount-G<sup>TM</sup>“ (Sigma-Aldrich) auf einen Objektträger aufgetragen. Der Versuch wurde in Zweifachansätzen durchgeführt. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops wurden 300 Zellkerne gezählt. Als apoptotisch wurden Zellen klassifiziert, deren Zellkerne morphologisch eine Kondensierung und/oder Fragmentierung aufwiesen (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (40-fache Vergrößerung) DAPI-gefärbter SYO-1 Zellen. Mit weißem Pfeil markierte Zellkerne zeigen eine Kondensation und Fragmentierung und wurden als apoptotisch klassifiziert.

## 2.11 Zellmotilitäts- und Invasionsanalysen

### 2.11.1 Untersuchung der Zellmotilität im „wound scratch assay“

Der sogenannte „wound scratch assay“ ist die einfachste Möglichkeit, die Motilität maligner Zellen unter Behandlung mit einer Substanz zu untersuchen.

#### Durchführung

Die Synovialsarkom-Zelllinien SYO-1 und CME-1 wurden am Vortag des Versuchs in 12-Loch-Platten ausgesät, so dass sie am Versuchstag in einer konfluierenden Zellschicht wuchsen (Gesamtzellzahl: CME-1:  $5 \times 10^5$ , SYO-1:  $10 \times 10^5$ ). Mit einer 100  $\mu$ l Pipettenspitze wurden in die Mitte jedes Wells ein gleichmäßiger Defekt in die Zellschicht eingebracht. Anschließend wurden jeweils Triplets mit Dasatinib behandelt. Unbehandelte Kontrollen wurden eingeschlossen. Mit einer Aufsichtmikroskopkamera (Zeiss) wurden zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 h Photographien der Defektzonen angefertigt.

### 2.11.2 Motilitätsanalysen mittels Boyden- und Invasion-Chambers

Zur Analyse des Migrations- und Invasionsverhaltens wurden die Zellen in Boyden-Chambers ausgesät, deren Boden aus einer multipel perforierten Membran besteht. Die Durchmesser der Membranporen sind mit 8  $\mu$ m so gewählt, dass sie für die Zellen eine Möglichkeit darstellen, aktiv hindurch zu migrieren. Um das Invasionsverhalten der Zel-

len zu untersuchen ist die Membran in den Invasionsuntersuchungen zusätzlich mit einer Protein-Gelmatrix beschichtet, welche eine Basalmembran simuliert.

### Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Kammerdiameter	Porengröße	Hersteller
Transwell™	6,5 mm	8 µm	Corning
Migrations-Kammer			
Matrigel Invasion Chamber™	6,4 mm	8 µm	BD Bioscience
Invasions-Kammer			
Paraformaldehyd 4 %			Sigma-Aldrich
Hämatoxylin-Ethanol 4 g/l			Sigma-Aldrich

### Durchführung

Für beide Versuche galt ein analoges Versuchsprotokoll. Die Anzahl an benötigten Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturplatte wurden mit 500 µl FBS-Medium mit 10 % FBS Supplement gefüllt. Anschließend wurden die Migrations- und Invasionskammern in die gefüllten Wells gehängt und mit 150 µl einer Zellsuspension aus 2%igem FBS-Medium beschickt (Zellzahlen pro Kammer: CME-1:  $2 \times 10^4$ , SYO-1:  $3,5 \times 10^4$ , 1273/99:  $7 \times 10^4$ ). Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten ausgesät. Zum oberen Kompartiment wurde anschließend die Kontroll-DMSO-Lösung oder eine Dasatinib-Lösung (Endkonzentrationen: 0,1 µmol/l, 0,3 µmol/l) hinzugefügt. Die Platten wurden 24 Stunden wie oben beschrieben bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen im oberen Kompartiment, welche nicht durch die Membran migriert sind, mit einem Wattestäbchen entfernt. Nach Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd (500 µl im unteren Kompartiment und 100 µl im oberen Kompartiment) wurden die Kammern zur Zellfärbung in einer Hämatoxylin-Lösung inkubiert (500 µl im unteren Kompartiment und 100 µl im oberen Kompartiment). Zwischen den Einzelschritten wurden die Einsätze mehrfach in destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Membranen mit einem Skalpell von der Kammer getrennt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die unter dem Mikroskop sichtbaren Zellen stellen den Anteil der Zellen dar, welche aktiv auf die andere Seite der Membran migriert sind. Zehn Gesichtsfelder wurden in 100 x Vergrößerung photodokumentiert und ausgezählt. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

### 2.11.3 Kolorimetrische Bestimmung der Aktivität der Rho-GTPasen

Die kleinen GTPasen Rac1 und RhoA nehmen eine Schlüsselrolle in der Steuerung der Motilität humaner Zellen ein und können als Effektoren für die Versteifung des Zytoskeletts (RhoA) oder die Zunahme der Zellmotilität (Rac1) analysiert werden (siehe Kapitel 1.6). Wir untersuchten den Aktivierungsgrad der beiden GTPasen mit Hilfe zweier spezifischer GTPasen-Aktivierungs-Tests. Das Prinzip der Versuche ist die Detektion der Antikörper-Bindung von aktiviertem Rac1 oder RhoA. Dies erfolgt durch die Bindung der aktivierten GTPasen über Domänen spezifischer Interaktionspartner, welche auf den Reaktionsplatten aufgeschichtet vorliegen.

#### Lösungen und Materialien

„Cytoskeleton™“ (G-LISA Rac1 Activation Assay Biochem Kit / G-LISA RhoA Activation Assay Biochem Kit).

#### Durchführung

Die Durchführung der Versuche erfolgte nach Herstellerangaben mit den vom Hersteller bereitgestellten Materialien. Für beide Versuche gilt ein analoges Protokoll. Sofern nicht anders benannt, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

$2 \times 10^5$  CME-1-Zellen und  $3,5 \times 10^5$  SYO-1-Zellen wurden in 6-Loch-Platten (Durchmesser 34,8mm; Corning) ausgesät, so dass nach 72 h eine Konfluenz von 60 % bis 70 % vorlag. Die Zellen wurden dann 20 min mit 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Dasatinib oder einer DMSO-Kontrolle inkubiert. Anschließend konnte von den derart behandelten Zellen Proteinlysate gewonnen werden. Diese wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des im Kit mitgelieferten Bestimmungssystems im Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 600 nm, die Proteinkonzentration lag entsprechend Herstellerangaben zwischen 0,4 und 2 ng/ml.

Fünfzig Mikroliter der eiskalten, homogenisierten Proteinlysate sowie der Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden jeweils in ein Well der vorgesehenen 96-Loch-Platten pipetiert. Die Inkubation erfolgte bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min auf einem Schüttler (400 rpm). Nach zweimaligem Waschen mittels Wasch-Puffer bei Raumtemperatur (im Kit mitgeliefert)



erfolgt die Inkubation mit dem vorgesehenen „antigen presenting buffer“ für 2 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgt die Zugabe des Primärantikörpers für 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (400 rpm). Die Wells wurden anschließend erneut in drei Schritten gewaschen und der HRP-konjugierte Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 30 min zupipettiert. Nach Zugabe von 50 µl der HRP-Reaktionslösung erfolgte die Messung der Absorption bei 490 nm im Photospektrometer. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

## **2.12 Xenotransplantate synovialer Sarkome und Therapie mit Dasatinib *in vivo***

Zur Evaluierung des Effekts von Dasatinib auf Synovialsarkomzellen im Tiermodell wurden  $5 \times 10^6$  SYO-1 Zellen subkutan in die Flanken fünf Wochen alter BALB/c Nacktmäuse (Charles River Laboratories) inokuliert. Das Volumen der Tumoren wurde täglich ausgemessen (Länge x Höhe x Breite x  $\pi/6$ ). Ab einem Volumen von  $100 \text{ mm}^3$  wurde die Behandlung mit Dasatinib begonnen. Dabei wurden an den Tagen 1-7 eine Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht/d intraperitoneal injiziert. Die Dosis wurde, bei Fehlen unerwünschter Nebenwirkungen, an den Tagen 8-14 verdoppelt (20 mg/kg Körpergewicht). Die Tumorumfänge wurden unter Behandlung täglich bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt keine Dasatinib-Behandlung, sondern gewichtsadaptierte Dosen des Lösungsmittels DMSO (2,05–4,10 ml/kg Körpergewicht).

Die Mäuse wurden an Tag 15 des Versuchs durch Genickbruch getötet, und die Tumoren explantiert. Das gewonnene Tumorgewebe wurde in Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (Sigma-Aldrich). Immunhistochemische Färbungen mit p-(Tyr416)-SRC, cleaved Caspase-3 (Asp175) (beide Cell Signaling Technologies), p-(Ser10)-Histon H3 (Merck Milipore) wurden zur Beurteilung des Aktivitätszustandes sowie zur Berechnung des Proliferations- und Apoptoseraten durchgeführt (siehe Kapitel 2.3).

Die Tiere wurden nach gängigen nationalen und europäischen Standards im Mausstall des Instituts für Pathologie der Universität Bonn gehalten. Eine Genehmigung der Ver-

suche durch die zuständigen Gremien an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn lag vor (Antragsnummer: AZ 84-02.04.2012.A537).

### **2.13 Statistische Tests**

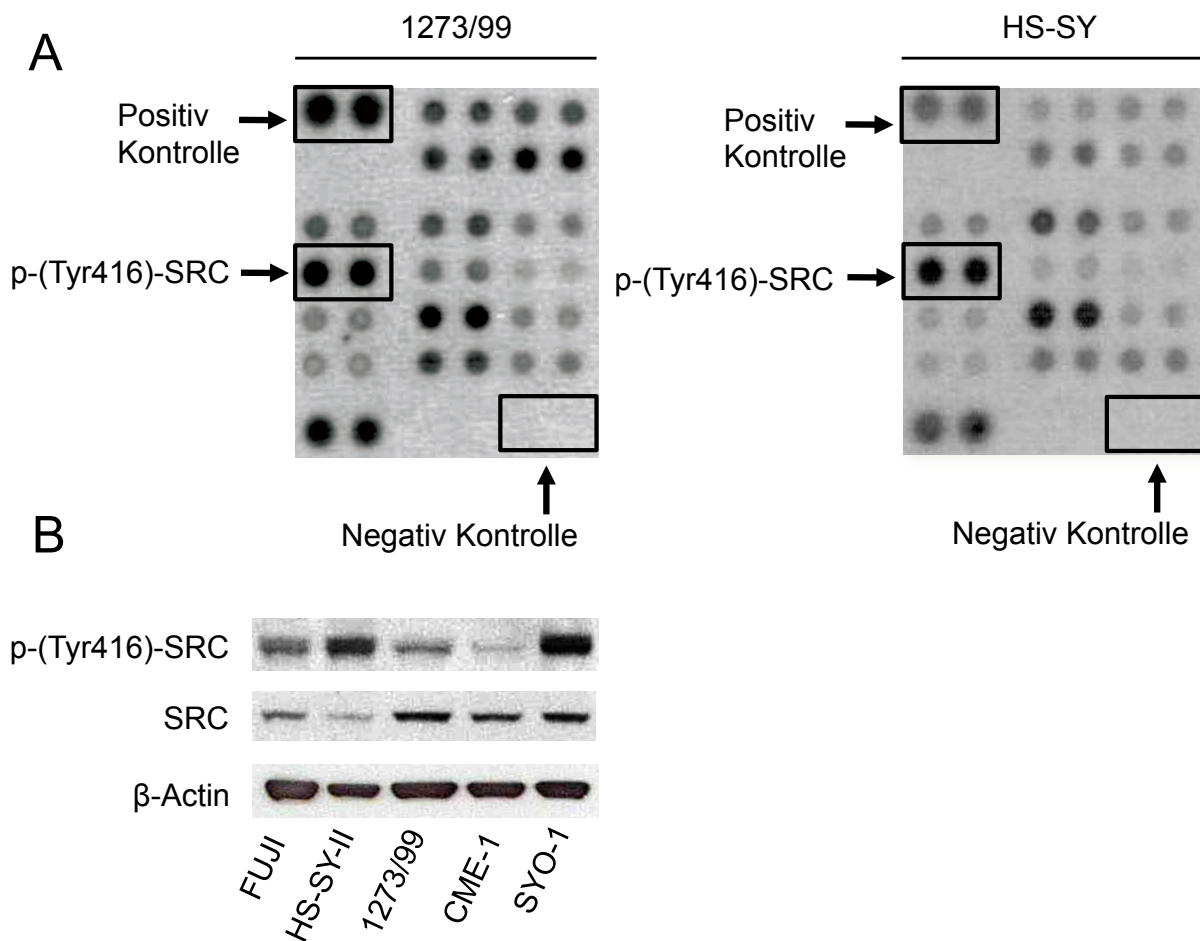
Die statistische und graphische Auswertung der Daten erfolgte mit Prism 6 (Graph Pad). Das Streuungsmaß ist als Standardfehler (SEM: „standard error of a mean“) angegeben. Zur Signifikanztestung wurden stets ungepaarte zweiseitige t-Test angewendet. Ein Signifikanzniveau von unter 0,05 wurde als signifikant eingestuft. Dabei gelten folgende Abstufungen der Signifikanzniveaus: < 0,05: \*, < 0,01: \*\*, < 0,001: \*\*\*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zellen synovialer Sarkome zeigen eine hohe Expression von aktiviertem SRC

In den durchgeführten Phosphokinase-Untersuchungen erwies sich in den beiden untersuchten Zelllinien 1273/99 und HS-SY-II die SRC-Tyrosinkinase als die von allen 46 repräsentierten Kinasen am stärksten phosphorylierte (siehe Abbildung 8), wobei es sich bei der hier nachgewiesenen Phosphorylierungssite um das Aktivitäts-indizierende Tyrosin 416 handelt.

In Westernblots der in die Studie eingeschlossenen Zelllinien FUJI, CME-1, 1273/99, SYO-1 und HS-SY-II zeigte sich eine deutliche, jedoch differentielle Phosphorylierung von SRC an Tyrosin 416 in allen Zelllinien synovialer Sarkome. CME-1 wies dabei das geringste Intensitätslevel von p-(Tyr416)-SRC auf. HS-SY-II wiesen bei hohem Niveau von von p-(Tyr416)-SRC die geringste Expression von (pan)-SRC Protein auf (siehe Abbildung 8).



**Abb. 8:** (A) Phosphokinasearrays der Zelllinien 1273/99 und HS-SY-II zeigen ein kräftiges Signal der an Tyrosin 416 phosphorylierten SRC-Kinase. (B) Westernblot-Analysen von SRC und p-(Tyr416)-SRC in den Synovialsarkom-Zelllinien FUJI, HS-SY-II, 1273/99, CME-1 und SYO-1.

### 3.2 Humane Synovialsarkome weisen ein erhöhtes Level von aktiviertem SRC auf

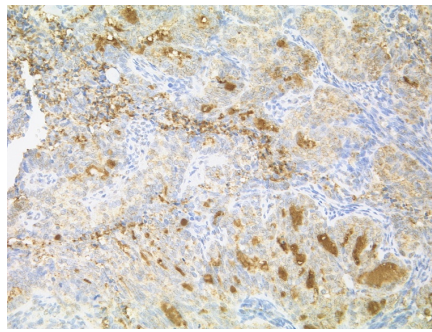
In immunhistochemischen Untersuchungen an 30 Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Synovialsarkomen zeigten 73 % der untersuchten Tumoren eine moderat bis stark erhöhte Färbeintensität für p-(Tyr416)-SRC. Ein erhöhtes Level an p-(Tyr527)-SRC war in 17 % der untersuchten Sarkome zu detektieren. Dreiundfünfzig Prozent der Fälle wiesen keine Phosphorylierung von SRC an Tyrosin 527 auf (siehe Tabelle 1), wobei hier ein Trend zu einer inversen Regulation angedeutet war.

Eine Korrelation zwischen den differentiellen Phosphorylierungen der SRC-Kinase und dem Expressionsmuster der beiden regulatorischen Proteine CSK und PTP1B konnte

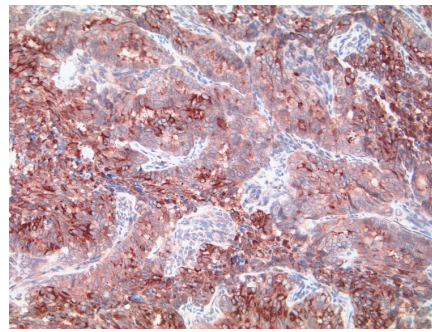
nicht nachgewiesen werden: 30 % der untersuchten Tumoren zeigten eine starke Expression von CSK, während 13 % ein erhöhtes Level an PTP1B aufwiesen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 9). Auch in Westernblot-Analysen der Tumorzelllinien konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der Expression der Kinase CSK beziehungsweise der Phosphatase PTP1B und den verschiedenen Phosphorylierungen von SRC festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

**Tab. 1:** Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für p-(Tyr416)-SRC, p-(Tyr527)-SRC, PTP1B und CSK.

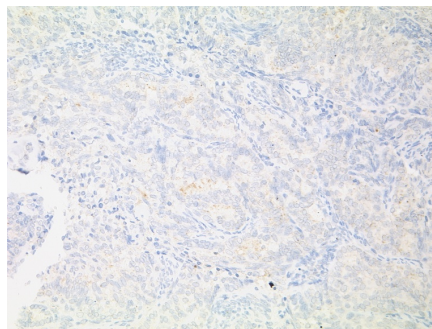
<i>Expressionsmuster</i>	Anteil (in %)			
	<i>p-(Tyr416)-SRC</i>	<i>p-(Tyr527)-SRC</i>	<i>CSK</i>	<i>PTP1B</i>
stark	13	7	30	13
moderat	60	10	17	37
schwach	27	30	50	40
kein	0	53	3	10



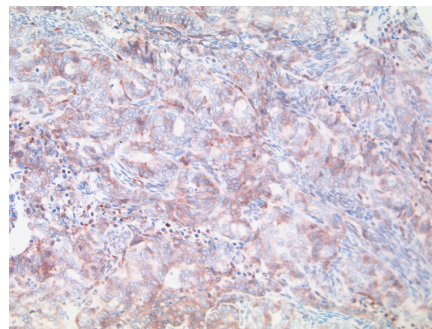
p-(Tyr416)-SRC



CSK



p-(Tyr527)-SRC

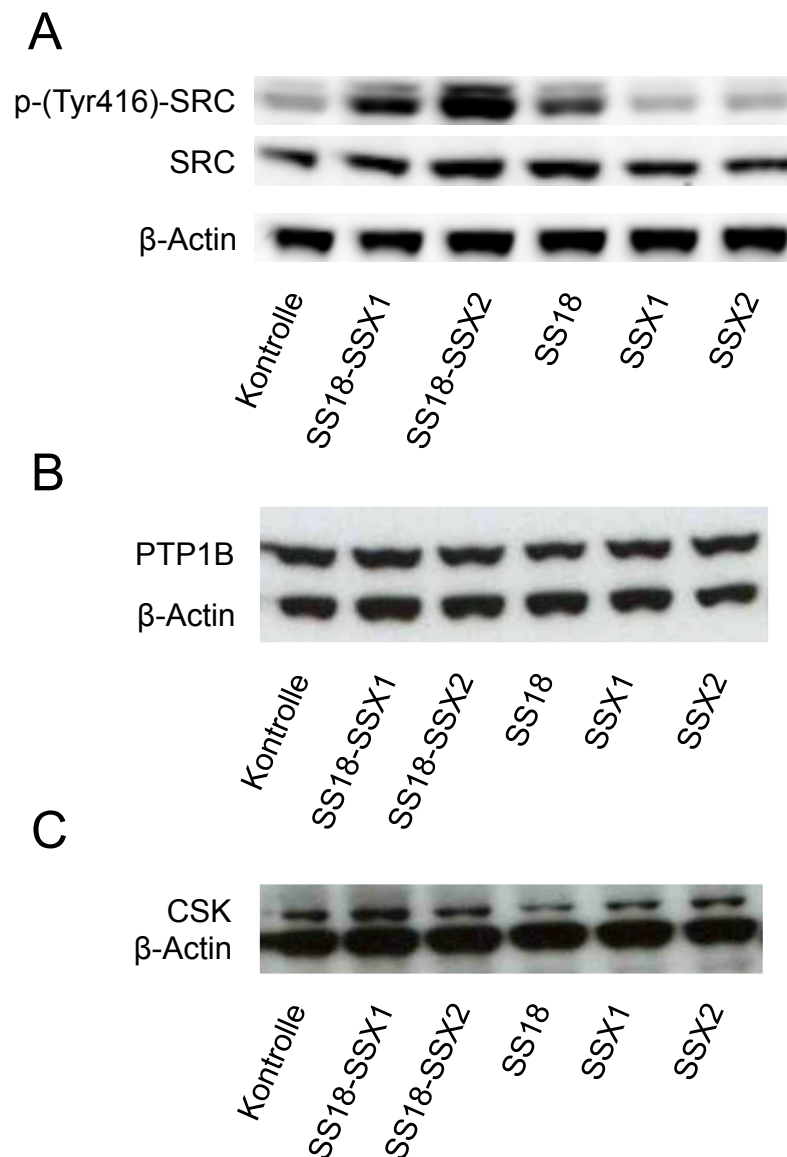


PTP1B

**Abb. 9:** Immunhistochemische Färbungen eines biphasischen Synovialsarkoms mit kräftiger Expression von p-(Tyr416)-SRC und CSK bei deutlich schwächerer Expression von p-(Tyr527)-SRC und der Phosphatase PTP1B (20-fache Vergrößerung). Nachweis der Antikörperbindung für p-(Tyr416)-SRC und p-(Tyr527)-SRC mit 3,3'-Diaminobenzidin und für CSK und PTP1B mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol.

### 3.3 Die Expression von SS18-SSX in TREx-293 führt zur Aktivierung von SRC

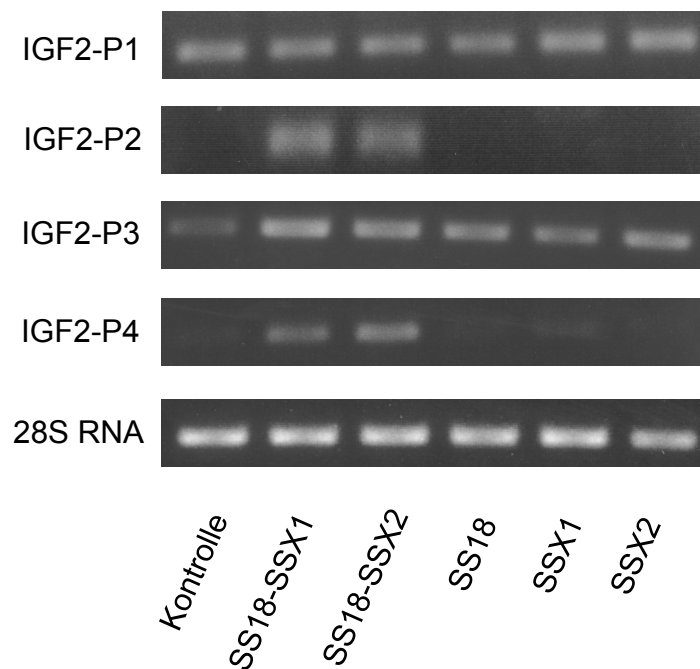
Bei Expression von SS18-SSX1 und SS18-SSX2 in TREx-293 Zellen ließ sich im Westernblot eine Zunahme der Intensität des Signals für p-(Tyr416)-SRC nachweisen, während eine vergleichbare Regulation bei Expression von SSX1, SSX2 oder SS18 wie auch in der Vektorkontrolle nicht nachweisbar war. Das Level an basalem SRC blieb in allen Ansätzen konstant (siehe Abbildung 10). Die Protein-Expression von PTP1B und CSK war hingegen in keinem der Ansätze signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 10).



**Abb. 10:** Westernblotanalysen von (A) SRC und p-(Tyr416)-SRC sowie (B) PTP1B und (C) CSK unter stabiler Expression der Fusionstranskripte im T-Rex-293-Tumorzellmodell.

### 3.4 Die Aktivierung von SRC in Synovialsarkomen ist abhängig von IGF-2

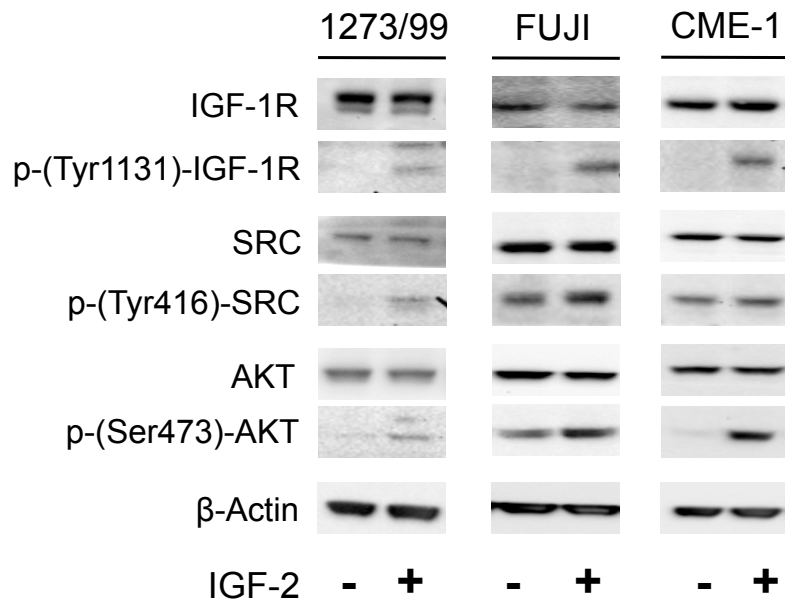
Bei Expression von *SS18-SSX1* und *SS18-SSX2* ließ sich im T-REx-Tumorzellmodell eine Zunahme der Promoter P2- und Promoter P4-abhängigen Expression von *IGF-2* mRNA nachweisen (siehe Abbildung 10).



**Abb. 11:** Promoter-abhängige *IGF-2*-Expression im Synovialsarkom-Zellmodell. Unter Expression von *SS18-SSX1* und *SS18-SSX2* kommt es zur Induktion Promoter P2- und P4-abhängiger *IGF-2*-Transkripte.

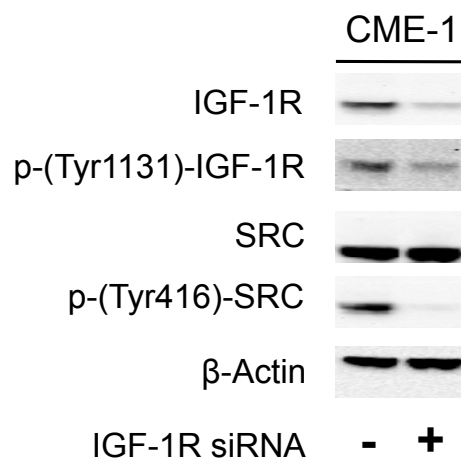
Bei Stimulation der Zelllinien 1273/99, FUJI und CME-1 mit rekombinantem IGF-2 kam es zu einer Induktion der (aktivierenden) Phosphorylierung von Tyrosin 1131 des IGF-1R. Bei gleichbleibender basaler *SRC*-Expression zeigte sich unter Stimulation mit IGF-2 eine Zunahme p-(Tyr416)-*SRC*. Ebenso war die Zunahme der Phosphorylierung der Kinase AKT an Serin 473 zu beobachten (siehe Abbildung 11).





**Abb. 12:** Unter IGF-2-Stimulation kommt es in 1273/99, FUJI und CME-1 zu einer Aktivierung der IGF-1-Rezeptor-Signalkaskade und Phosphorylierung der SRC-Kinase an Tyrosin 416.

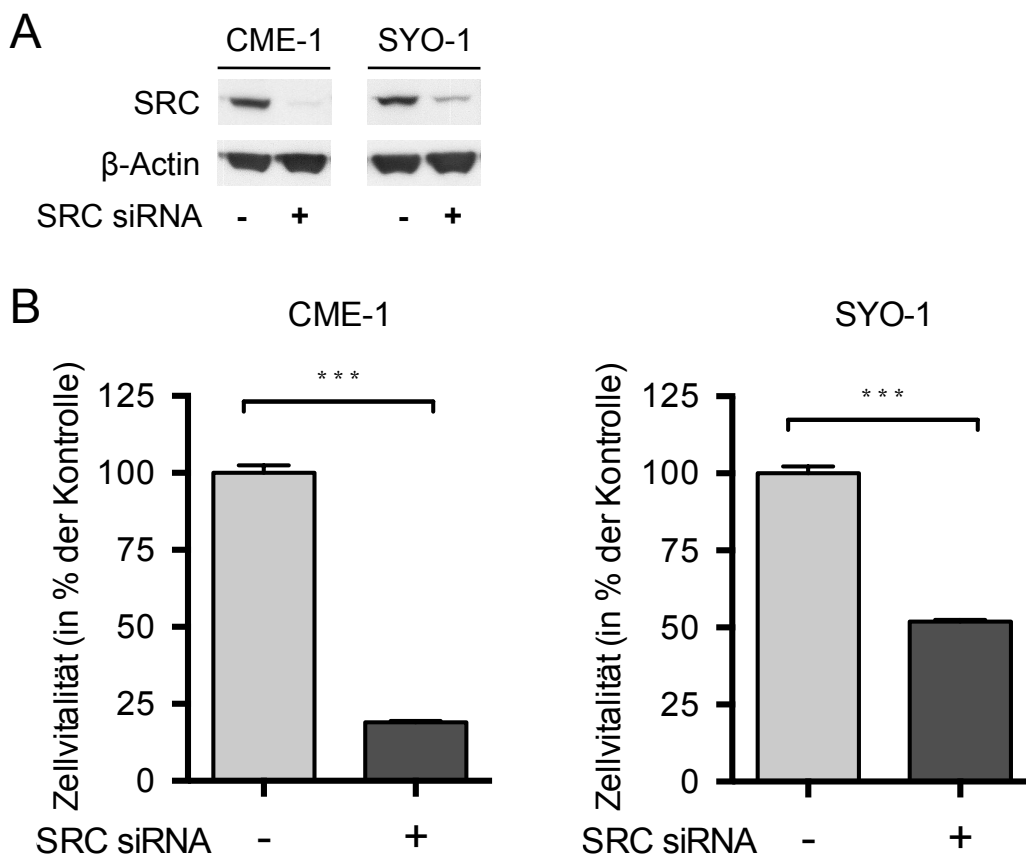
Umgekehrt ging eine Herunterregulierung des IGF-1R durch siRNA in CME-1-Zellen mit einer Abnahme der Phosphorylierung von SRC an Tyrosin 416 einher (siehe Abbildung 13).



**Abb. 13:** Der siRNA-gestützte Knockdown des IGF-1R geht im Westernblot mit einer Dephosphorylierung von SRC an Tyrosin 416 einher.

### 3.5 SRC ist essentiell für die Vitalität von Synovialsarkomzellen

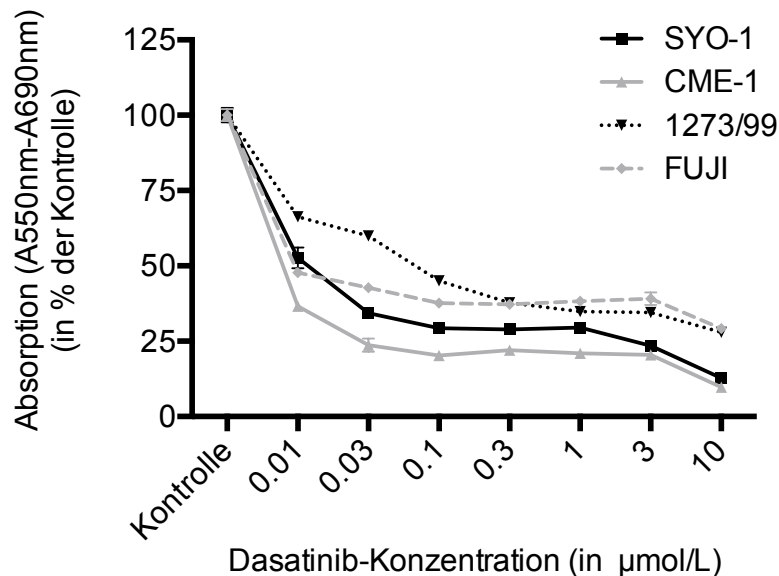
Zur initialen Evaluation der Bedeutung der SRC-Kinase für das Wachstum bzw. die Vitalität von Zellen synovialer Sarkome wurden Proliferationsuntersuchungen nach siRNA gestütztem Knockdown der Kinase durchgeführt. In MTT-Assays zeigte sich eine signifikante Abnahme des Zellwachstums von CME-1- und SYO-1-Zellen unter effizientem SRC Knockdown (siehe Abbildung 14).



**Abb. 14:** Effizienter siRNA gestützter Knockdown von SRC, hier im Westernblot (A), geht mit einer deutlichen Abnahme der Vitalität von CME-1- und SYO-1-Zellen in MTT-Proliferationsuntersuchungen einher (B).

Um den Effekt einer Inhibition der Aktivität von SRC durch ein klinisch einsetzbares Pharmakon zu evaluieren, wurden die Zelllinien mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib inkubiert. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums in MTT-Proliferationsuntersuchungen (siehe Abbildung 14). Dieser Effekt war bereits bei nanomolaren Konzentrationen von Dasatinib ausgeprägt. Mit einer IC<sub>50</sub> von 0,008

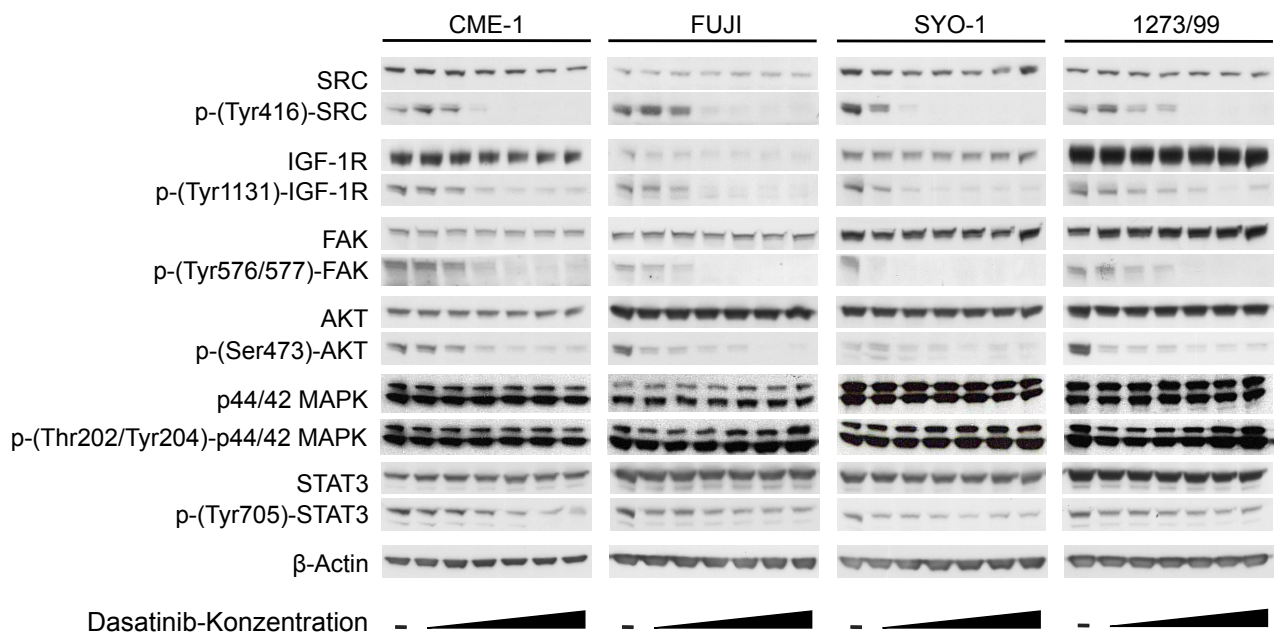
$\mu\text{mol/l}$  Dasatinib erwiesen sich CME-1-Zellen als die empfindlichsten; die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von FUJI- und SYO-1-Zellen lagen bei  $0,01 \mu\text{mol/l}$ , respektive  $0,013 \mu\text{mol/l}$ . Mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $0,077 \mu\text{mol/l}$  zeigte sich 1273/99-Zellen als am wenigsten empfindlich gegenüber Dasatinib.



**Abb. 15:** Dasatinib führt in MTT-Proliferationsassays zu einer Abnahme des Zellwachstums mit einer ausgeprägten Wirkung bereits bei nanomolaren Konzentrationen von  $0,01$ - $0,03 \mu\text{mol/l}$ .

### 3.6 Die Hemmung von SRC führt zu einer Deaktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden

Unter aufsteigende Dosen von Dasatinib ( $0$ ;  $0,01$ ;  $0,03$ ;  $0,1$ ;  $0,3$ ;  $1$ ;  $3 \mu\text{mol/l}$ ) zeigt sich in CME-1, FUJI, SYO-1 und 1273/99 in nanomolaren Konzentrationen eine Dephosphorylierung von SRC an Tyrosin 416 (siehe Abbildung 16). Parallel hierzu ist die Dephosphorylierung von p-(Tyr1131)-IGF-1R, p-(Tyr576/577)-FAK und p-(Ser473)-AKT zu erkennen, während eine komplette Dephosphorylierung von p-(Tyr705)-STAT3 nicht zu beobachten war. Eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung der Kinasen p44/42-MAPK an Threonin 202 beziehungsweise Tyrosin 204 ließ sich bei Behandlung mit steigenden Dosen Dasatinib nicht nachweisen. Allerdings fällt in FUJI- und 1273/99-Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung der MAP-Kinasen mit höheren Konzentrationen auf.



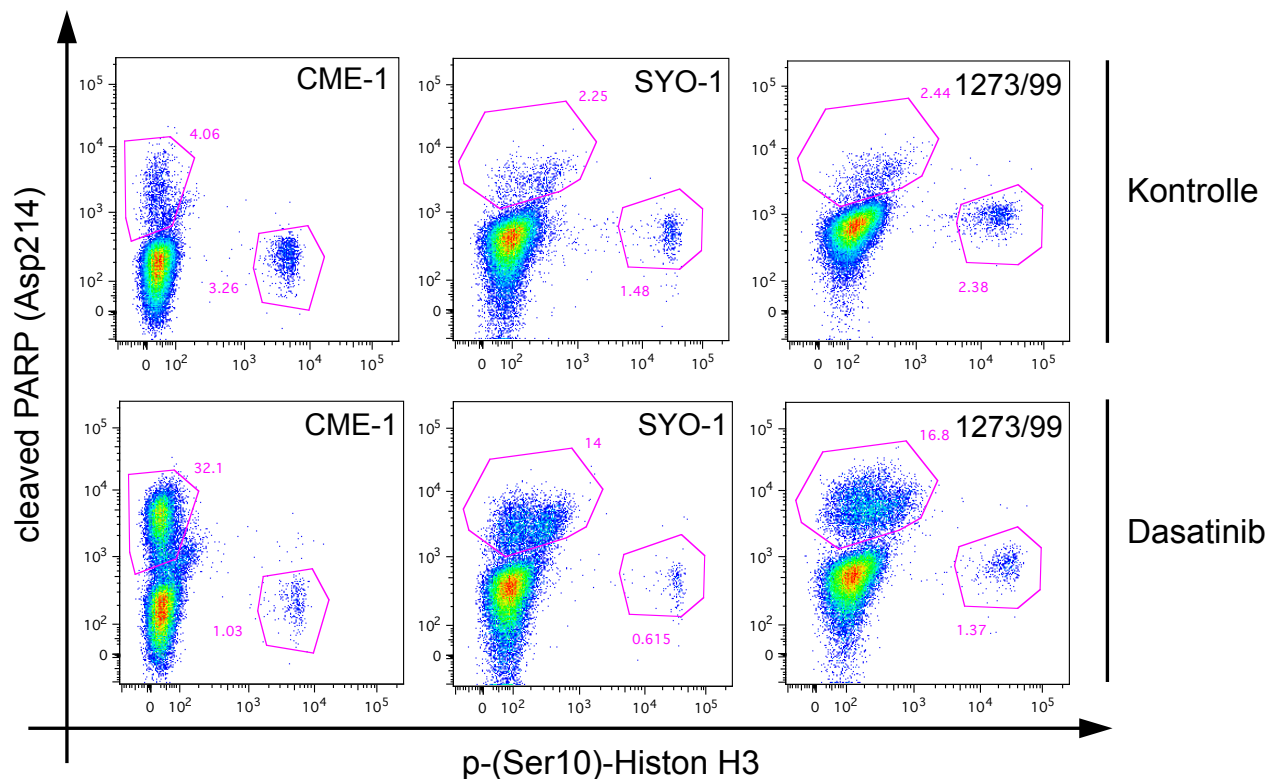
**Abb. 16:** Westernblot-Analysen der mit aufsteigenden Dosen Dasatinib (0-3 µmol/l) behandelten Zelllinien CME-1, FUJI, SYO-1 und 1273/99.

### 3.7 Die Behandlung mit Dasatinib verringert die Proliferationsrate und induziert Apoptose in Zellen synovialer Sarkome

Zur differenzierten Aufschlüsselung der Wachstumseffekte nach Proliferation und Apoptose wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt; die Apoptoserate wurde dabei anhand der Signalintensität des Apoptosemarkers cleaved-PARP (Asp214), die Proliferationsrate anhand des Signals des Mitosemarkers phospho-(Ser10)-Histon H3 bestimmt. In allen Zelllinien kam es unter der Behandlung mit Dasatinib in Konzentrationen von 0,1 µmol/l und 0,6 µmol/l zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion der Proliferationsrate bei signifikanter Zunahme der Apoptoserate (siehe Tabelle 2 und Abbildung 17).

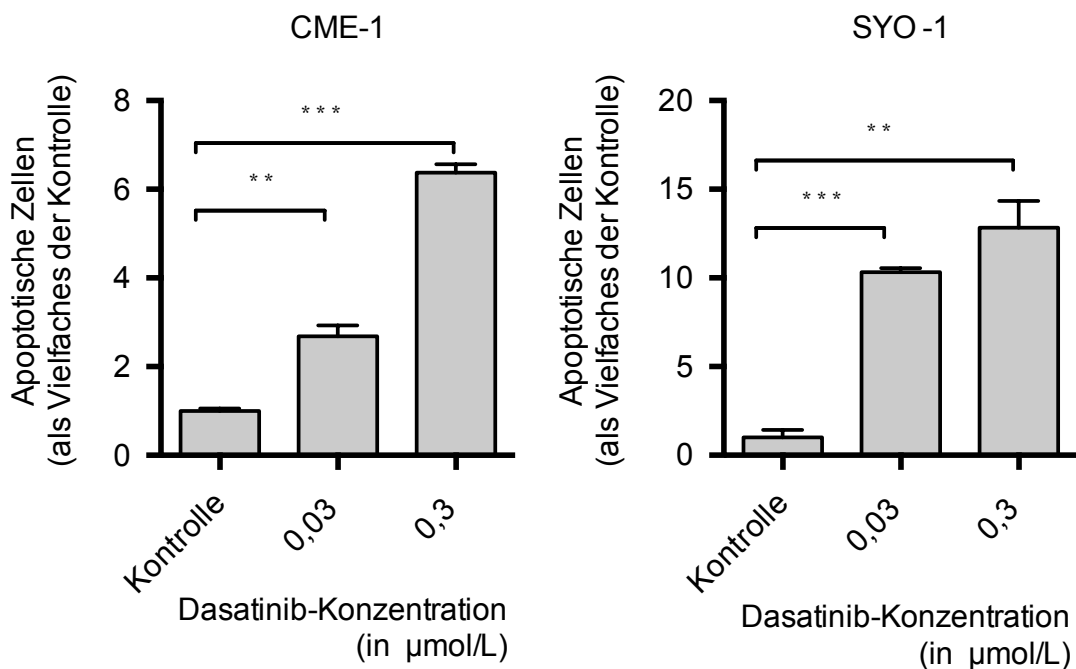
**Tab. 2:** Durchflusszytometrische Analysen von Zellen synovialer Sarkome nach 48-stündiger Behandlung mit Dasatinib. Die angegebenen Werte entsprechen Vielfachem der Kontrolle. Alle Messwerte weisen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ :\*\*\* auf.

Zelllinie	Dasatinib-Konzentration (in $\mu\text{mol/l}$ )	pHH3 (Ser10)	Cleaved PARP (Asp214)
CME-1	0,1	0,51	2,86
	0,6	0,34	7,54
SYO-1	0,1	0,47	5,26
	0,6	0,42	6,01
1273/99	0,1	0,68	2,95
	0,6	0,61	6,60



**Abb. 17:** Durchflusszytometrische Analysen von CME-1, SYO-1 und 1273/99 nach Behandlung mit 0,6  $\mu\text{mol/l}$  Dasatinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Induktion der Apoptoserate war auch durch mikroskopische Analyse mittels DAPI gefärbter Zellkerne nachweisbar. So zeigten sowohl SYO-1- als auch CME-1-Zellen eine deutliche Zunahme der Rate an fraktionierten und kondensierten Zellkernen (siehe Abbildung 18).

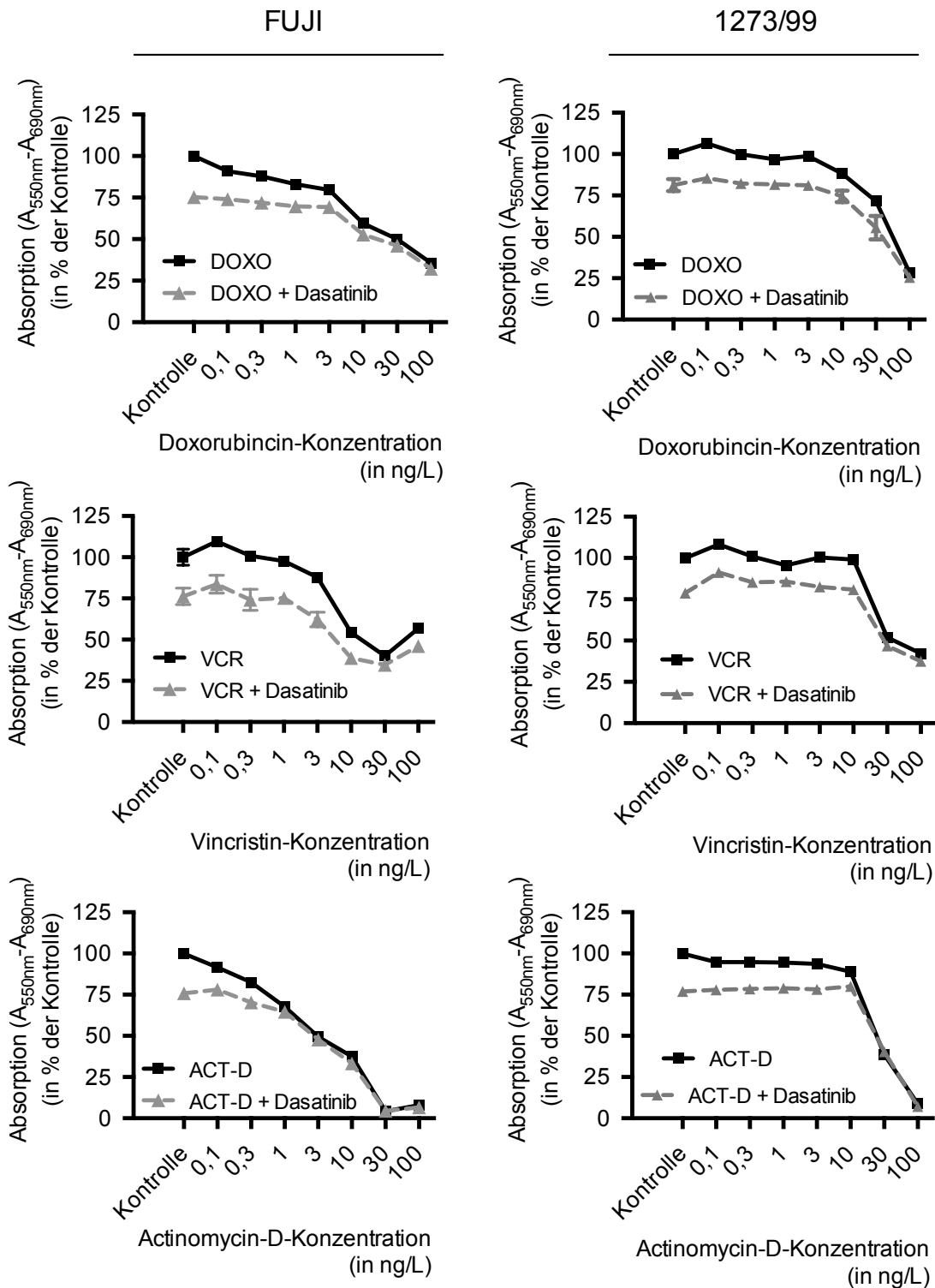


**Abb. 18:** Die morphologische Analyse der Apoptoserate in CME-1- und SYO-1-Zellen nach Behandlung mit 0,03 µmol/l und 0,3 µmol/l Dasatinib für 48 h zeigt eine signifikante dosisabhängige Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen.

### 3.8 Die Kombination von Dasatinib und konventionellen Chemotherapeutika zeigt additive Effekte in Zellen synovialer Sarkome

Vor dem Hintergrund, dass im klinischen Alltag der Einsatz einer Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren noch begrenzt ist, wurden Versuche zur Kombination von Dasatinib mit konventionellen Chemotherapeutika *in vitro* durchgeführt. Für die Versuche wurden die Zelllinien FUJI und 1273/99 verwendet, wobei sich letztere als am wenigsten empfindlich für eine Dasatinib Monotherapie erwiesen hatte. Als Kombinationstherapeutika wurden die in der Behandlung kindlicher Sarkome eingesetzten Chemotherapeutika Vincristin (VCR), Actinomycin-D (ACT-D) und Doxorubicin/Adriamycin (DOXO) eingesetzt. Die Dasatinib-Dosis wurde so eingestellt, dass die alleinige Behandlung zu einer

25-30%igen Reduktion der Zellvitalität führt. Nach Inkubation der Zellen mit den Chemotherapeutika in Kombination mit Dasatinib zeigten sich in MTT-Proliferationsuntersuchungen additive Effekte (siehe Abbildung 19).



**Abb. 19:** MTT-Proliferationsuntersuchungen von 1273/99 und FUJI nach Therapie mit Vincristin (VCR), Doxorubicin (DOXO) oder Actinomycin-D (ACT-D) alleine und in Kombination mit Dasatinib zeigen additive Effekte der Substanzen in den Kombinationsansätzen.

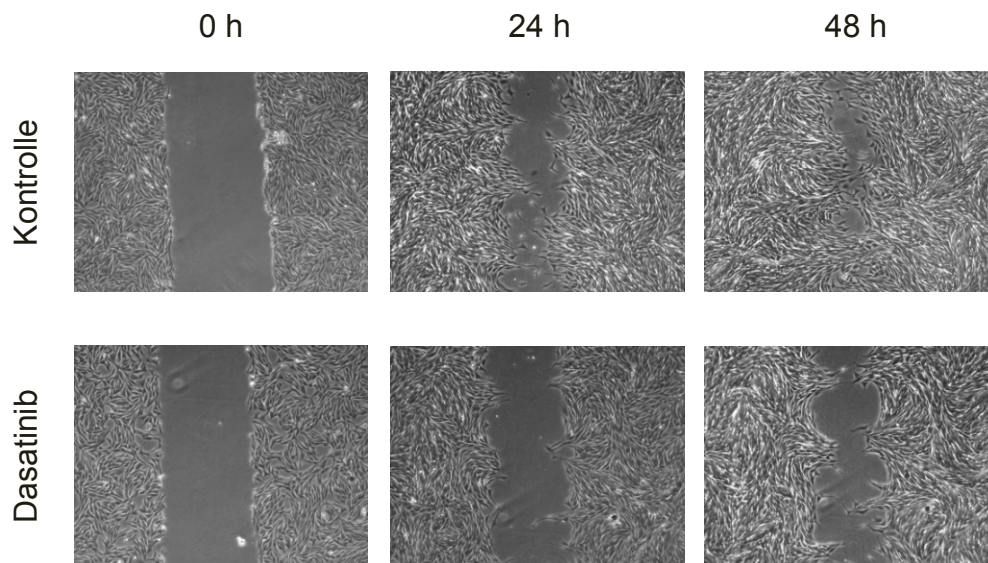


### 3.9 Dasatinib hemmt die Migrations- und die Invasionsfähigkeit von Zellen synovialer Sarkome

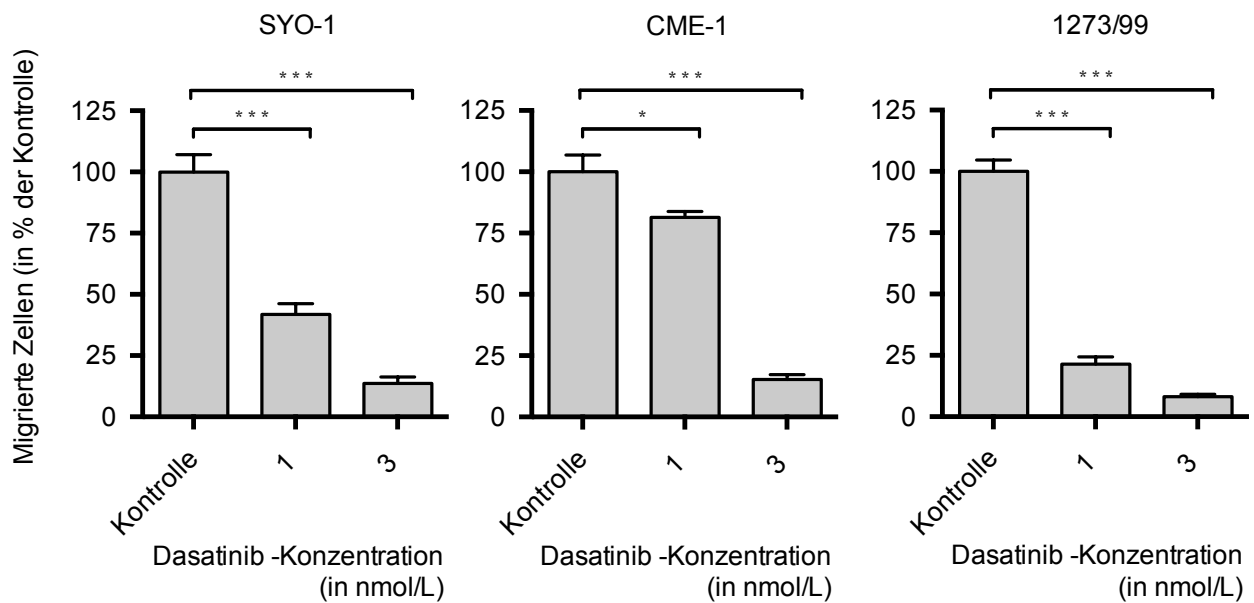
Vor dem Hintergrund der bekannten Funktion von SRC für Prozesse der Zellmotilität und in Anbetracht der Tatsache, dass mit Inhibierung der SRC-Kinase eine Abnahme der (aktivierenden) Phosphorylierung der FAK-Kinase einherging, wurde die Wirkung von Dasatinib auf die Motilität von Synovialsarkomzellen untersucht.

Eine 48-stündige Behandlung von SYO-1 Zellen mit Dasatinib in einer Konzentration von 0,003  $\mu\text{mol/l}$  führte im „scratch-assay“ zu einer deutlichen Verzögerung des Verschlusses des eingebrachten Defektes (siehe Abbildung 20).

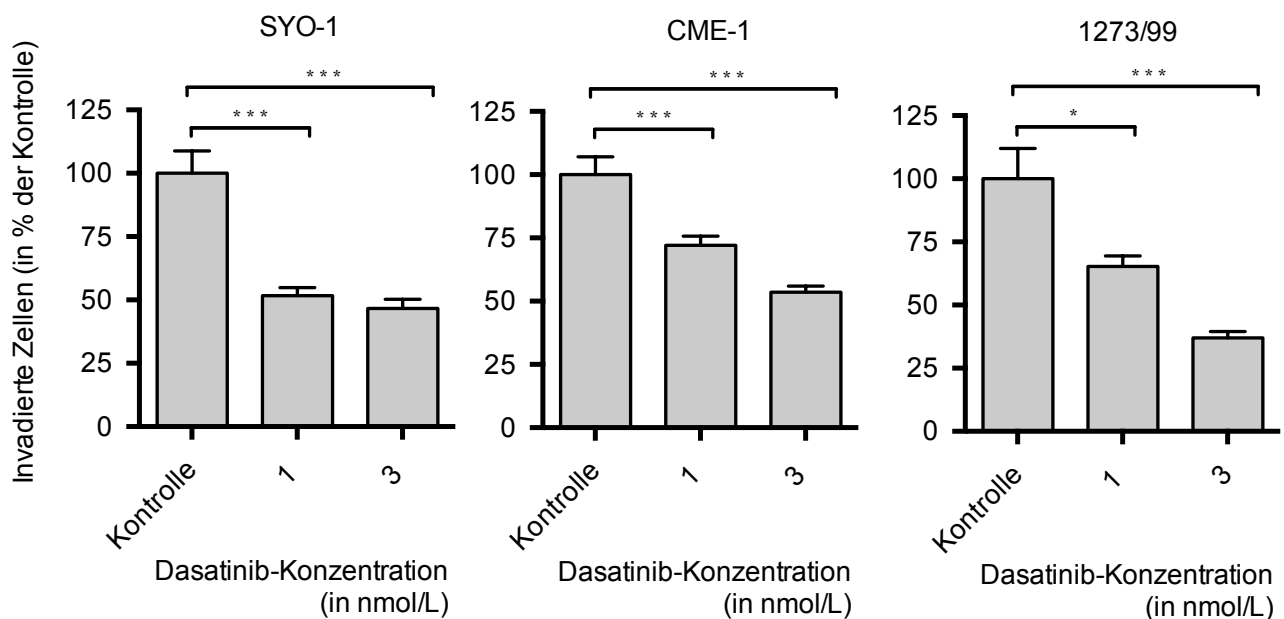
In „Transwell<sup>TM</sup>“-Migrationsuntersuchungen war unter Inkubation mit Dasatinib eine signifikante dosisabhängige Abnahme der Migrationsfähigkeit der CME-1-, 1273/99- sowie SYO-1-Zellen feststellbar. Gleichfalls zeigten die Zellen im „Matrigel<sup>TM</sup> Invasion Chamber Assay“ eine dosisabhängige Reduktion ihrer Invasionsfähigkeit unter Dasatinib-Behandlung (siehe Abbildungen 21 und 22).



**Abb. 20:** Mikroskopische Aufnahmen (20-fache Vergrößerung) der Scratch-Assays an den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h unter Inkubation von SYO-1 Zellen mit 0,003  $\mu\text{mol/l}$  Dasatinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit deutlich erkennbarer Einschränkung der Motilität der Zellen unter Dasatinib.



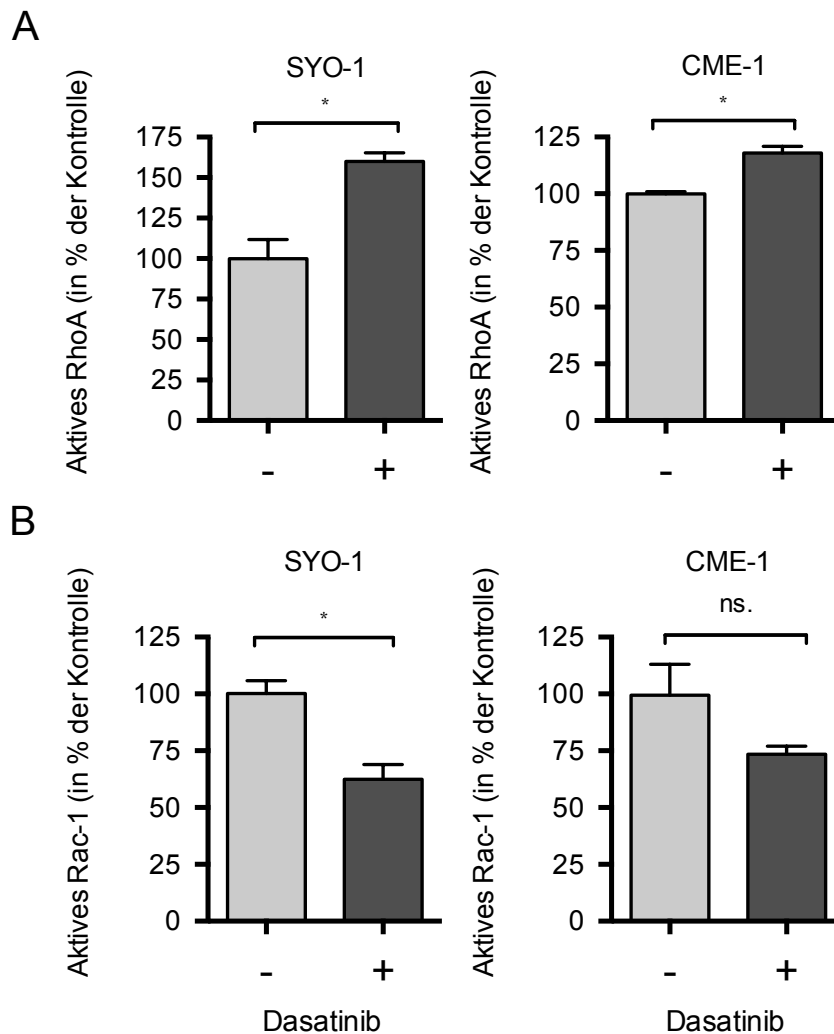
**Abb. 21:** Boyden-Chamber Migrationsassays von SYO-1-, CME-1- und 1273/99-Zellen. Unter Behandlung mit nanomolaren Dosen von Dasatinib zeigt sich eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Migrationsfähigkeit der Zellen.



**Abb. 22:** Boyden-Chamber Invasionsuntersuchungen von SYO-1, CME-1 und 1273/99. Unter Behandlung mit Dasatinib ist eine signifikante Reduktion der Invasionsfähigkeit der Zellen zu beobachten.

### **3.10 Inhibition der SRC Kinase durch Dasatinib führt in Synovialsarkom-Zellen zu einer Verminderung der Aktivität von Rac-1 und einer Zunahme der Aktivität von RhoA**

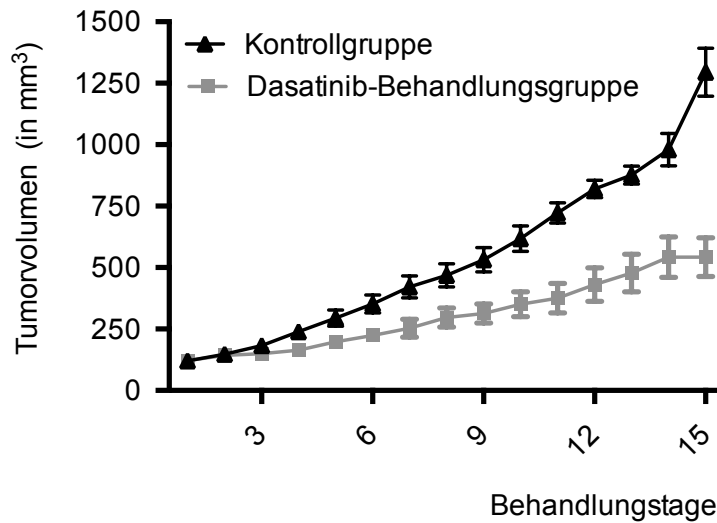
Nach 20-minütiger Behandlung mit Dasatinib zeigen SYO-1 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante, gegenläufige Veränderung der Aktivitätslevel von RhoA und Rac-1 im Sinne einer Zunahme der RhoA-Aktivität und einer Abnahme der Aktivität von Rac-1 (siehe Abbildung 23). Auch in CME-1-Zellen ließ sich dieser Effekt von Dasatinib messen. Allerdings lag die Verminderung des Levels an aktiviertem Rac-1 außerhalb des Signifikanzniveaus von  $p < 0,05$ .



**Abb. 23:** (A) RhoA- und (B) Rac-1-Aktivitätsmessungen im Photospektrometer. Die Zelllinien SYO-1 und CME-1 zeigen eine gegenläufige Beeinflussung der Aktivitätslevel von RhoA und Rac-1 nach einer 20-minütigen Behandlung mit 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Dasatinib.

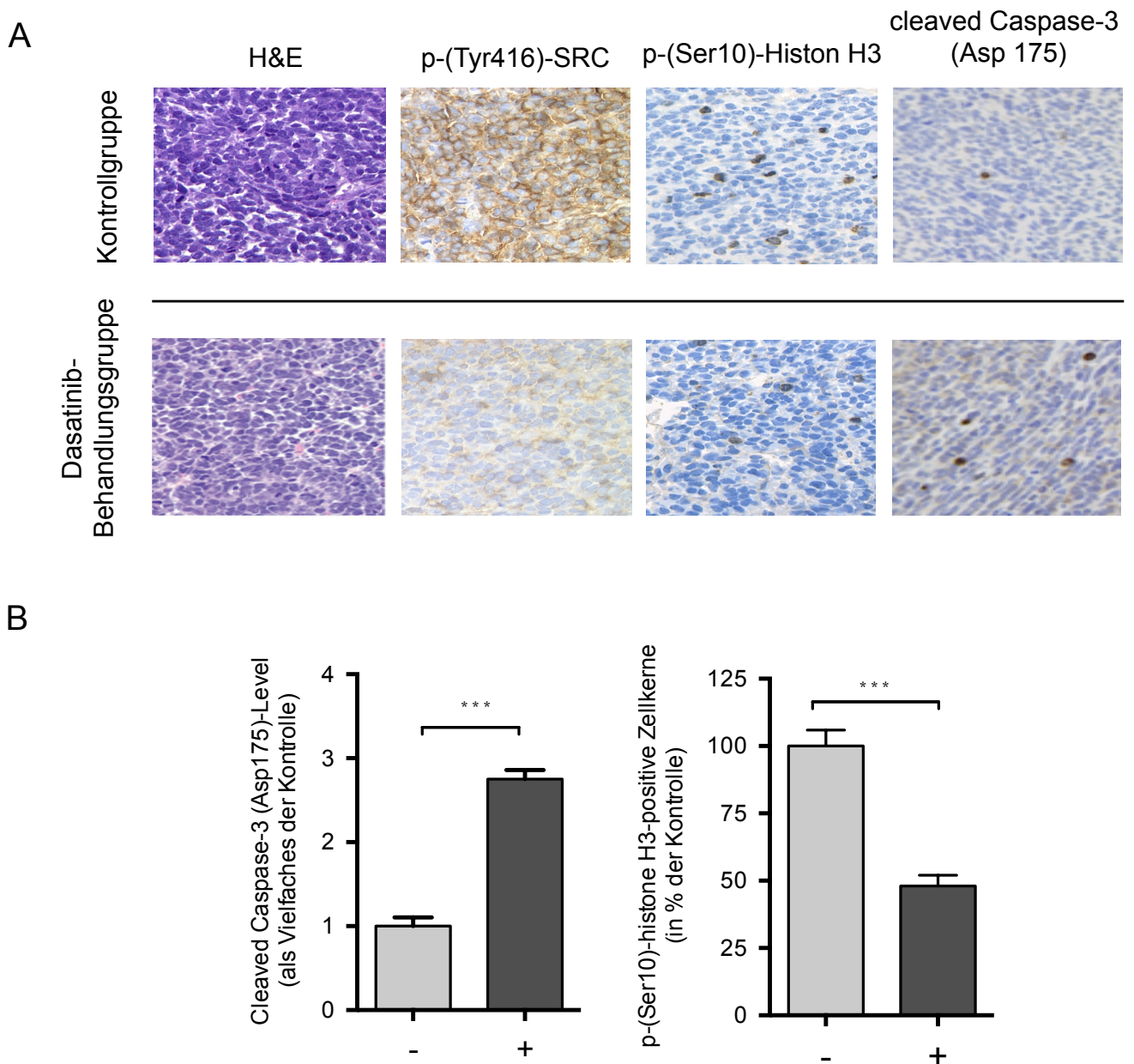
### 3.11 Unter Dasatinib kommt es zur Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit von Tumor-Xenotransplantaten in athymischen Nacktmäusen

Unter Behandlung mit Dasatinib zeigte sich eine deutliche Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der SYO-1-Xenotransplantate in Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am Versuchsendpunkt betrug das durchschnittliche Tumor-Volumen der Behandlungsgruppe  $542,9 \text{ mm}^3 \pm 79,5 \text{ mm}^3$  im Vergleich zu  $1294,6 \text{ mm}^3 \pm 97,5 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 24). Es ergab sich bis zum Ende der Behandlung kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht der behandelten und unbehandelten Nacktmäuse.



**Abb. 24:** Tumorzumina (in  $\text{mm}^3$ ) von SYO-1-Xenotransplantaten in Mäusen. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren in der mit Dasatinib behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

In immunhistochemischen Analysen zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme der Färbintensität für p-(Tyr416)-SRC in Tumoren nach Behandlung mit Dasatinib. Ferner ließ sich immunhistochemisch eine Induktion der cleaved Caspase-3 (Asp175)-positiven Zellfraktion bei gleichzeitiger Abnahme der für den Mitosemarker p-(Ser10)-Histon H3 positiven Zellfraktion nachweisen (siehe Abbildung 25).



**Abb. 25:** (A) Tumorgewebsproben zeigen in immunhistochemischen Färbungen eine Abnahme der Intensität der Färbung für p-(Tyr416)-SRC (Nachweis der Antikörperbindung mit 3,3'-Diaminobenzidin) sowie der Anzahl für p-(Ser10)-Histon H3 gefärbten Zellkerne in der Dasatinib-Behandlungsgruppe bei Zunahme der cleaved Caspase-3 (Asp175)-positiven Zellfraktion (jeweils im Vergleich zur Kontrolle, 20-fache Vergrößerung). (B) Graphische Auswertung der Veränderung der Anzahl der für p-(Ser10)-Histon H3 und cleaved Caspase-3 (Asp175) gefärbten Zellkerne nach Behandlung mit Dasatinib (+).

## 4. Diskussion

### 4.1 Synoviale Sarkome weisen eine hohe Expression von aktiviertem SRC auf

Die Aktivierung oder Überexpression der SRC-Tyrosinkinase gehört zum molekularbiologischen Muster einer ganzen Reihe maligner Tumoren (siehe Kapitel 1.4). In dieser Arbeit konnte erstmals schlüssig gezeigt werden, dass Synovialsarkome eine Aktivierung von SRC aufweisen und dass diese funktionell in der pathognomonischen und pathogenetisch essentiellen *SS18-SSX*-Translokation dieser Tumoren begründet ist.

Da Proteinkinasen eine wichtige Rolle in der Pathobiologie von Neoplasien spielen und bislang keine breiten systematische Untersuchungen hinsichtlich ihres Aktivitätsmusters in Synovialsarkomen vorlagen, wurde in dieser Arbeit initial ein umfangreiches Screening des Aktivitätslevels einer größeren Zahl von Proteinkinasen durchgeführt. Dabei ergab sich unter den getesteten Proteinkinasen für die an Tyr416 phosphorylierte SRC-Kinase das kräftigste Signal. Der Befund ließ sich in den Synovialsarkom Zelllinien HS-SY-II, FUJI, SYO-1, 1273/99 und CME-1 mit einer durchgehend nachweisbaren, jedoch unterschiedlich ausgeprägten Phosphorylierung von SRC (Tyr416) nachvollziehen. Dabei korrelierte eine kräftige Phosphorylierung von SRC nicht mit einer Überexpression von SRC.

Da es sich bei den getesteten Zellen zwar um Tumorzellen primärer Synovialsarkome handelt, diese jedoch in der Zellkultur im Vergleich zum Tumor *in situ* ein verändertes Expressionsmuster aufweisen können, wurden zur Frage der Relevanz unserer Ergebnisse immunhistochemische Untersuchungen an primärem Tumorgewebe durchgeführt. Hierbei wies die Mehrzahl der Tumoren eine moderate bis starke Aktivierung (gemessen als Phosphorylierung von Tyrosin 416) der SRC-Kinase auf, wohingegen überwiegend eine schwache bzw. keine Expression der inaktiven Form von SRC, p-(Tyr527)-SRC vorlag. Eine Abhängigkeit des Phosphorylierungsprofils von SRC an Tyrosin 527 durch eine Dysregulation von PTP1B bzw. CSK, wie sie für andere Tumoren beschrieben ist, ließ sich in Synovialsarkomen immunhistochemisch ausschließen (Bjorge et al., 2000a; Sirvent et al., 2006; Zhu et al., 2007).

#### 4.2 Die Aktivierung der SRC-Tyrosinkinase durch SS18-SSX ist IGF-2-vermittelt

Zur Frage ob und inwiefern die Aktivierung der SRC-Kinase von den für Synovialsarkome pathognomonischen SS18-SSX-Translokationen t(X;18) abhängig ist, wurden funktionelle Untersuchungen in einem Synovialsarkom-Zellmodell durchgeführt. Da die SS18-SSX-Fusionsproteine als Chromatin-assoziierte transkriptionelle Regulatoren selbst nicht unmittelbar die Aktivität der SRC-Kinase beeinflussen können, stellte sich im Wesentlichen die Frage, über welche Interaktionspartner die Aktivierung der SRC-Kinase zustande kommen könnte. Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Expression der Fusionsproteine und der Aktivierung der IGF-1R-Signalkaskade ist in der Literatur beschrieben (Sun et al., 2006; Törnkvist et al., 2008). Die SRC-Kinase nimmt in diversen Signalwegen, u.a. in der Übermittlung von Signalen des IGF-1R, eine zentrale Rolle ein, so dass hierüber die Aktivierung vermittelt sein könnte. Ein analoger Mechanismus der SRC-Aktivierung ist im Kaposi-Sarkom bekannt, wo die virusinduzierte Überexpression des „Vascular endothelial growth factor“-Rezeptors (VEGFR) und die gesteigerte Aktivität nachgeschalteter Signalkaskaden für die Aktivierung von SRC verantwortlich sind (Munshi et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte für Synovialsarkome gezeigt werden, dass eine autokrine IGF-2-Stimulationschleife an der Aktivierung von SRC in synovialen Sarkomen maßgeblich beteiligt ist. Unter Verwendung eines TReX-293-basierten Synovialsarkom-Tumormodells, welches die Analyse der Auswirkung der Fusionsproteine unabhängig von der weiteren Zellbiologie synovialer Sarkome erlaubt, ließ sich nachweisen, dass die Expression der beiden häufigsten SS18-SSX-Fusionsproteine zu einer Zunahme der Expression von Promoter P2- und P4-abhängigen *IGF-2*-Transkripten führt. Die basale Promoter P1- und Promoter P3-abhängige Expression von *IGF-2* blieb unter Einfluss der Fusionsproteine hingegen unverändert. Unsere Ergebnisse zur Regulation von *IGF-2* sind im Einklang mit publizierten Daten von De Bruijn und Kollegen, die zeigen konnten, dass die Expression der Fusionsproteine mit einer Veränderung der CpG-Methylierung in die *IGF-2*-Expression regulierenden DNA-Abschnitten einhergeht (De Bruijn et al., 2006). Gleichzeitig konnte belegt werden, dass unter Expression der Fusionsproteine die Phosphorylierung der SRC-Kinase an Tyrosin 416 zunimmt, sodass von einer funktionellen Aktivierung von SRC auszugehen ist. Als Hinweis auf einen kausalen Zusammen-



hang zwischen einer autokrinen Stimulation des IGF-1R durch IGF-2 und der Aktivierung von SRC konnte in primären Synovialsarkomzellen eine Zunahme der aktivierenden Phosphorylierungen des IGF-1R, von SRC sowie der Kinase AKT nach Stimulation durch rekombinantes IGF-2 belegt werden (siehe Abbildung 12). Invers ließ sich mittels siRNA gegen den IGF-1R eine Inaktivierung von SRC nachweisen. Interessanterweise war auch die Expression von SS18 im T-REx-Zellmodell alleine in der Lage, die Aktivierung von SRC zu vermitteln. Da die Expression von IGF-2 durch SS18 alleine allerdings unbeeinflusst blieb, muss die Aktivierung von SRC durch SS18 von der Induktion der *IGF-2*-Expression unabhängig sein.

Die Aktivierung von SRC in synovialen Sarkomen ist somit, zumindest in Teilen, abhängig von einer funktionierenden IGF-2/IGF-1R-Signalkaskade. Die SS18-SSX-Fusionsproteine aktivieren damit die SRC-Kinase durch die Überexpression von IGF-2 und die autokrine Stimulation des Rezeptors. Da neben dem IGF-1-Rezeptor auch andere Tyrosinkinase-rezeptoren wie PDGFR und EGFR in der Biologie synovialer Sarkome eine Rolle spielen und da auch diese Rezeptoren in Interaktion mit SRC stehen, ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch diese einen Beitrag zur Aktivierung von SRC leisten (Ho et al., 2012).

#### **4.3 Die Blockade von SRC führt zur Inhibition onkogener Eigenschaften**

Konsekutiv stellte sich die Frage nach der Bedeutung der SRC-Kinase in der Tumorbiologie synovialer Sarkome. Eine wichtige Rolle hinsichtlich Zellproliferation, Zellüberleben, Migration und Invasion ist in anderen mesenchymalen Tumoren wie Osteosarkomen, Ewing-Sarkomen, Leiomyosarkomen, Rhabdomyosarkomen, Chondrosarkomen sowie dem Kaposi-Sarkom beschrieben (Munshi et al., 2000; Schrage et al., 2009; Shor et al., 2007).

Nach Ausschaltung der SRC-Kinase durch siRNA in SYO-1 und CME-1 Zellen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität (siehe Abbildung 14). Die Ausschaltung der Kinase mittels siRNA ermöglicht dabei die Analyse ihrer spezifischen Funktionen unabhängig von off-target Effekten, wie sie für Tyrosinkinaseinhibitoren trotz aller Optimierung der Substanzspezifität zu erwarten sind. Hingegen ermöglicht die

Verwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren neben der Betrachtung der Funktionen von Kinasen in Tumorzellen, auch die konkrete präklinische Überprüfung der Wirksamkeit in der Therapie der Tumorerkrankung. Mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib steht ein solches Agens zur Inhibition der SRC Kinase zur Verfügung. Enzymatische Aktivitätsanalysen zeigten, dass Dasatinib mit einer um sechs Zehnerpotenzen höheren Affinität die SRC-Tyrosinkinase inhibiert als beispielsweise die Kinasen AKT oder FAK (Lombardo et al., 2004). Da neben der SRC-Kinase insbesondere die Fusionskinase BCR-ABL durch Dasatinib mit hoher Affinität gehemmt wird, spricht man in Literatur und Klinik deshalb von einem SRC-/BCR-ABL-spezifischen Inhibitor.

Wie nach siRNA-Inkubation kam es auch unter Dasatinib-Behandlung zu einer dosisabhängigen Hemmung der Vitalität aller untersuchten Zelllinien (siehe Abbildung 15). Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die Hemmung der Zellvitalität auf eine Reduktion der Mitoseaktivität, sowie in deutlicherem Maße auch auf eine Steigerung der Apoptoserate bis auf das 7,5-fache der Ausgangswerte zurückzuführen war (siehe Abbildung 17 und Tabelle 2). Als weiterer Hinweis auf die Spezifität der beobachteten Wachstums-assoziierten Effekte ging die SRC-Inhibition mit Veränderungen der Phosphorylierung von Effektoren vor- und nachgeschalteter Signalkaskaden einher (siehe Abbildung 16). Neben der Dasatinib-spezifischen Dephosphorylierung von SRC zeigte sich eine Dephosphorylierung der anti-apoptotischen Effektoren IGF-1R und AKT sowie des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors STAT3, sodass auf Proteinebene SRC-assoziierte Korrelate für die beobachteten biologischen Effekte gegeben sind.

Während man in CME-1 eine, wenn auch geringfügige, Deaktivierung der SRC nachgeschalteten, mitogenen MAP-Kinasen-Kaskade erkennen konnte, zeigte sich bei 1273/99 und FUJI nach Dephosphorylierung bei geringen Dosen eine Reaktivierung dieses Signalwegs. Vergleicht man die Sensitivität der Zellreihen gegenüber Dasatinib mit dem Aktivitätslevel der MAP-Kinasen, so zeigen die Linien mit zunehmender Aktivität der MAP-Kinasen unter Dasatinib, FUJI und 1273/99, die geringste Sensitivität gegenüber der Tyrosinkinaseinhibitor-Behandlung. Dies zeigt, dass die MAP-Kinasen in Folge der Inhibition der SRC-Signalkaskade in Synovialsarkomen gegenregulatorisch aktiviert werden können. Eine solche gegenregulatorische MAPK-Aktivierung bei Inhibition von SRC mit Dasatinib wurde bereits für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region so-

wie der Lunge beschrieben (Johnson et al., 2005). Zumindest in diesen Tumoren ist dieser Effekt auf eine Reaktivierung der mitogenen Kaskade durch eine STAT3/JAK-Interaktion zurückzuführen. Da in unseren Experimenten jedoch unter Dasatinib durchweg eine partielle Deaktivierung von STAT3 zu beobachten war, muss hierfür in Synovialsarkomzellen ein anderer Mechanismus verantwortlich sein.

Wie in den *in vitro* Analysen, zeigte Dasatinib in Nacktmäusen einen antineoplastischen Effekt auf xenotransplantierte Synovialsarkomzellen im Sinne einer Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dass es in diesem experimentellen Kontext unter Therapie mit Dasatinib zu keiner kompletten Tumorregression kam, ist nicht ungewöhnlich, zumal die Behandlung erst nach Erreichen eines signifikanten Tumolvolumens begonnen wurde - ganz in Analogie zu anderen Studien mit technisch vergleichbaren Ansätzen (Lin et al., 2012). Mögliche Erklärungen hierfür könnten in der im Vergleich zu humanen Tumoren geringer ausgeprägten Vaskularisierung der „unorganisierter“ wachsenden Xenotransplantate und damit einer geringeren Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe liegen. Eine andere Erklärung könnte in der zur Abschätzung des Nebenwirkungsprofils initial niedrigen Dasatinib-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht in den ersten 7 Tagen des Behandlungsregimes zu finden sein.

In den durchgeführten Untersuchungen lag keine Korrelation zwischen der Menge aktivierten SRC-Proteins und der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer SRC-Inhibition vor, wie sich insbesondere bei Betrachtung der Zelllinien CME-1 und SYO-1 darstellt. Beide Zelllinien sind mit einem IC50-Wert von 0,008  $\mu\text{mol/l}$  beziehungsweise 0,01  $\mu\text{mol/l}$  ähnlich sensibel gegenüber einer Behandlung mit Dasatinib. In der Stärke des Signals für p-(Tyr416)-SRC im Westernblot unterscheiden sich beide Zellreihen jedoch deutlich mit sehr niedrigem p-(Tyr416)-SRC-Signal in CME-1 und kräftiger Phosphorylierung in SYO-1 (siehe Abbildung 16). Analoge Befunde wurden auch in Zelllinien aus Osteosarkomen berichtet (Shor et al., 2007).

Die Inhibition von SRC führte in allen Zelllinien zu einer Dephosphorylierung der Kinase FAK an Tyrosin 576/577 und konsekutiver Deaktivierung (siehe Abbildung 16). FAK

vermittelt pro-motile Signale von Integrinen über SRC an Effektorproteine der Zytoskelettregulation, sodass eine Deaktivierung der Kinasefunktion mit einer Abnahme der Motilität maligner Zellen einhergeht (Chatzizacharias et al., 2008). Ganz im Einklang hiermit zeigten sich im „wound scratch assay“ wie auch in Boyden-Chamber- und Invasions-Chamber-Assays Synovialsarkomzellen unter Behandlung mit nanomolaren Konzentrationen von Dasatinib in ihrer Motilität deutlich eingeschränkt (siehe Abbildungen 20, 21 und 22). Die nachweisbare Deaktivierung der Kinase FAK durch SRC-Inhibierung kann als molekulares Korrelat für die Abnahme der Zellmotilität angesehen werden, wobei die FAK-SRC-Interaktion am „oberen Ende“ der Motilitätskaskade zu finden ist. Tatsächliche Effektoren auf Zytoskelett-Ebene sind hingegen die GTPasen Rac-1 und RhoA, welche als Gegenspieler in der Regulation der Zellmotilität fungieren (siehe Abbildung 23). Während die Aktivierung von RhoA zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen und zu einer Versteifung des Zytoskeletts führt, bewirkt die Aktivierung von Rac-1 die Ausbildung von Membranprotrusionen und die Zunahme der Zellmotilität (Nobes und Hall, 1999). Allerdings ist das Zusammenspiel der beiden Faktoren für zielgerichtete Bewegungen einer Zelle unerlässlich: so steigt das Level an aktivem Rac-1 an dem die Bewegung anführenden Ende der Zelle, während aktives RhoA das nachziehende Ende kontrahiert (Huveneers und Danen, 2009). Die Unterbrechung pro-motiler Signalkaskaden in der frühen Phase bewirkt die Zunahme des Levels an inaktiviertem Rac-1 und aktiviertem RhoA (Arthur et al., 2000; Nobes und Hall, 1999).

Die in unseren Untersuchungen nachweisbare Abnahme des Levels an aktiviertem Rac-1 sowie die gegenläufige Zunahme des Levels an aktiviertem RhoA unter Dasatinib belegen die Abhängigkeit der GTPasen-gesteuerten Zellmotilität von der Aktivität der SRC-Tyrosinkinase in Zellen synovialer Sarkome. Arthur und Kollegen berichteten analoge Befunde in Medulloblastom-Zellen (Arthur et al., 2000).

#### **4.4 Die Abhängigkeit synovialer Sarkome vom IGF-1R/SRC-Signalweg - Translati-onaler Bezug zur Klinik und therapeutische Möglichkeiten**

Ein Vergleich der Ergebnisse unserer Untersuchungen mit den Ergebnissen der Testungen von Dasatinib in anderen Malignomen unterstreicht die spezifische Wirkung des Inhibitors auf Zellen synovialer Sarkome.

In umfangreichen *in vitro* Testungen an Osteosarkomen, Ewing-Sarkomen, Rhabdomyosarkomen und Leiomyosarkomen zeigte Dasatinib nur in Zellen der ossären Sarkome eine zytotoxische Wirkung (Shor et al., 2007). Hier fanden Shor und Kollegen enzymatisch IC50-Werte für die Inhibition von SRC von 30 nmol/l bis 100 nmol/l. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen IC50-Konzentrationen für Dasatinib in Zellen Synovialer Sarkome (IC50: CME-1: 8 nmol/l; SYO-1: 10 nmol/l; FUJI: 13 nmol/l; 1273/99: 77 nmol/l) belegen im Gegensatz dazu die hohe Spezifität der Wirkung der Substanz auf das Wachstum von Synovialsarkomzellen.

Auch in Karzinomen, in denen zum Teil eine Aktivierung der SRC Kinase beschrieben wurde, sind die Daten zur Wirksamkeit von Dasatinib in präklinischen Studien uneinheitlich. So waren in umfangreichen Studien mit Dasatinib in Zelllinien von Kolonkarzinomen, oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, Mamma- sowie Ovarialkarzinomen IC50-Werte im Bereich zwischen 90 nmol/l und 1600 nmol/l nachweisbar (Finn et al., 2007; Johnson et al., 2005; Konecny et al., 2009, Serrels et al., 2006). Prostatakarzinomzellen und Zelllinien aus duktalem Pankreaskarzinomen zeigten keine Reduktion der Zellvitalität von mehr als 50 % im Vergleich zum Ausgangswert (Morton et al., 2010; Nam et al., 2005). In weiteren präklinischen Untersuchungen zeigte wiederum die Inhibition der Migrations- sowie Invasionsfähigkeit unter Behandlung mit Dasatinib, unabhängig von der Wirkung auf die Vitalität (Morton et al., 2010; Nam et al., 2005; Serrels et al., 2006). So zeigten Testungen in transgenen Pankreas-, Prostata- und Kolonkarzinom-Mausmodellen eine signifikante Reduktion der Metastasierungsfrequenz und Metastasengröße (Kopetz et al., 2009; Morton et al., 2010; Park et al., 2008). Analoge Effekte von Dasatinib konnten in klinischen Studien jedoch nur am metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Chee et al., 2013; Yu et al., 2009).

Trotz der teilweise erheblichen IC50-Werte und der vollständigen Unempfindlichkeit einiger Zelllinien wurden klinische Erprobungsstudien an Patienten mit diesen Tumoren durchgeführt. Jedoch zeigte Dasatinib als Monotherapeutikum in allen Phase-2-Studien bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium kein messbares Therapieansprechen (Brooks et al., 2011; Finn et al., 2011; Mayer et al., 2011; Schilder et al., 2012).

Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass sich mit dem ungezielten Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren die gewünschten Behandlungsziele nicht realisieren lassen. Die Selektion von Patienten mittels Mutationsanalysen bzw. dem Nachweis eines pathologischen Aktivierungsmusters stellt heute den Goldstandard zur Etablierung einer individualisierten Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren dar (Büttner et al., 2013; Heukamp et al., 2011).

Ausschlaggebend für das Aktivierungsmuster von SRC in synovialen Sarkomen ist die pathognomonische Expression der SS18-SSX-Fusionsproteine. Zumindest für die mit mehr als 95 % am häufigsten nachweisbaren Translokationsprodukte SS18-SSX1 und SS18-SSX2 konnten wir die Aktivierung der IGF-1R/SRC-Signalkaskade in allen untersuchten Zelllinien wie auch in der Mehrzahl der untersuchten primärem Tumorgewebe belegen, was die Rationale für die zielgerichtet Therapie von Dasatinib in dieser Tumorität bildet. Es besteht vor dem Hintergrund der dargestellten Daten Anlass zur Annahme, dass Dasatinib auch im Menschen zur Therapie des Synovialsarkoms eingesetzt werden könnte. Klinische Erprobungsstudien sind deshalb unerlässlich.

Nach wie vor stellen jedoch Chemotherapeutika das Grundgerüst zur Behandlung fortgeschrittener Synovialsarkome dar. Daher evaluierten wir den Effekt einer kombinierten Behandlung von Dasatinib und den zur Therapie von Sarkomen eingesetzten Chemotherapeutika Doxorubicin/Adriamycin, Actinomycin-D und Vincristin. In den Zelllinien FUJI und 1273/99 konnten wir additive, jedoch keine synergistischen Effekte der Kombinationsbehandlung beobachten (siehe Abbildung 19).

Eine grundsätzlich denkbare Möglichkeit einer Kombinationstherapie mit Dasatinib ist die Applikation zusammen mit einem MAPK-Inhibitor. Durch Hemmung der gegenregulatorischen Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42, wie wir sie in den Zellreihen FUJI und 1273/99 beobachten konnten, lässt sich möglicherweise ebenfalls die Wirkung von Dasatinib verstärken. Trametinib ist ein potenter MEK-Inhibitor, dessen therapeutische Wirkung in *BRAF p.V600E*-mutierten Melanomen belegt werden konnte und dessen Anwendung sicher ist (Kim et al., 2013).

Die Abhängigkeit synovialer Sarkome von der IGF-1R/SRC-Signalkaskade macht auch den IGF-1R zu einer Zielstruktur der molekularen Tumortherapie. So führt die Inhibition des IGF-1R in Zellen synovialer Sarkome durch den niedermolekularen Antagonisten NVP-AEW541 zu einer deutlichen Abnahme der Zellvitalität und Motilität (Friedrichs et al., 2008). Im Vergleich zu einer Inhibition des IGF-1R am „oberen“ Ende der Signalkaskade, bringt eine Inhibition von SRC an der Schnittstelle mehrerer Signalkaskaden allerdings den zusätzlichen Vorteil der Hemmung weiterer SRC-abhängiger Prozesse mit sich.

Als einer der wenigen in Synovialsarkomen getesteten Tyrosinkinaseinhibitoren konnte der Einsatz des VEGF-/PDGF-Rezeptor-Inhibitor Pazopanib eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens zeigen (PALETTE, Phase-III) (Van der Graaf et al., 2012). Da Pazopanib mit den Rezeptoren für PDGF und VEGF, parallel zur IGF-1R/SRC-Achse aktivierte Signalwege in Synovialsarkomen hemmt, wäre auch eine synergistische Kombinationsbehandlung aus Dasatinib und Pazopanib denkbar (Tamborini et al., 2004).

Die Ergebnisse der Therapie von Synovialsarkomen nach den aktuellen Standards zeigen die Notwendigkeit innovative, zielgerichtete Therapien in dieser Patientenpopulation zu etablieren. Da die Hemmung der onkogenen Translokation im Synovialsarkom technisch nicht möglich ist, zielt unser Ansatz auf die Hemmung der nachgeschalteten, epigenetisch aktivierten Signalkaskaden ab. SRC ist, wie unsere Ergebnisse zeigen ein guter Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie in Zellen Synovialer Sarkome. Aufgrund der Komplexität der epigenetischen Regulation der SS18-SSX-Translokationen, sollten Kombinationstherapien aus verschiedenen Inhibitoren in Zukunft erforscht werden.

## 5. Zusammenfassung

Synoviale Sarkome sind hochmaligne Weichgewebstumoren, welche sich molekulargenetisch durch eine reziproke Translokation  $t(X;18)$  auszeichnen. Diese führt zur Expression der transkriptionsmodulierenden chimären Proteine Synovial sarcoma translocation chromosome 18-Synovial sarcoma X (SS18-SSX).

In Phospho-Kinase-Screening Arrays identifizierten wir unter 46 Kinasen die Sarcoma-Tyrosinkinase (SRC) als die am stärksten phosphorylierte Tyrosinkinase in Zelllinien Synovialer Sarkome. Immunhistochemische Untersuchungen auf die Expression von phosphoryliertem SRC an Biopsaten Synovialer Sarkome zeigten eine hohe Expression von aktiviertem SRC, wobei eine Deregulation der C-terminal SRC-Kinase (CSK) und der Phosphotyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) als Ursache hierfür ausgeschlossen werden konnte. Ziel dieser Arbeit war es deshalb den Mechanismus der Aktivierung von SRC zu untersuchen sowie zu testen ob die Inhibition von SRC in Synovialen Sarkomen therapeutisch genutzt werden kann.

In einem *in vitro*-Modellsystem konnten wir mittels stabiler Expression von SS18-SSX1 und SS18-SSX2 zeigen, dass die Expression der Fusionsproteine zu einer aktivierenden Phosphorylierung von SRC führt. Diese ist zumindest in Teilen über eine transkriptionelle Induktion des Wachstumsfaktorgens Insulin-like growth factor 2 (*IGF-2*) und die Aktivierung der nachfolgenden IGF-1-Rezeptor-Kaskade vermittelt.

Die Antagonisierung von SRC in Zellen Synovialer Sarkome durch den SRC-Inhibitor Dasatinib führte zu einer dosisabhängig verminderten Proliferation, Motilität und Invasivität sowie einer Induktion der Apoptose. Damit korreliert die Hemmung SRC-abhängiger zellulärer Signalkaskaden sowie Veränderungen in der Aktivität von Guanosintriphosphat-Hydrolasen (GTPasen) der Ras homolog gene (Rho)-Familie mit der zytotoxischen Wirkung der SRC-Inhibition. Analog führte die Behandlung von Xenotransplantaten Synovialer Sarkome *in vivo* zu einem deutlich verminderten Tumorwachstum.

Unsere präklinischen Daten belegen die zentrale Rolle der SRC-Kinase in Synovialen Sarkomen, welche diese zu einem vielversprechenden und in der Tumorbilogie spezifisch fundierten therapeutischen Target macht. Die klinische Evaluation der Wirksamkeit von Dasatinib in Patienten mit Synovialsarkomen ist deshalb sinnvoll.



## 7. Literaturverzeichnis

Arthur WT, Petch LA, Burrige K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 2000; 10: 719–722

Azam M, Seeliger MA, Gray NS, Kuriyan J, Daley GQ. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 1109–1118

Barco R, Garcia CB, Eid JE. The synovial sarcoma-associated SYT-SSX2 oncogene antagonizes the polycomb complex protein Bmi1. *PLoS One* 2009; 4: epub

Betsholtz C, Westermarck B, Ek B, Heldin CH. Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. *Cell* 1984; 39: 447–457

Bibbins KB, Boeuf H, Varmus HE. Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7278–7287

Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 2000 a; 19: 5620–5635

Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000 b; 275: 41439–41446

Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993; 366: 643–654

Braulke T. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 1999; 31: 242–246

Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, Takebe N, Wright J, Tran HAT, Papadimitrakopoulou VA. Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2011; 117: 2112–2119

De Bruijn DRH, Allander S V, Van Dijk AHA, Willemse MP, Thijssen J, Van Groningen JJM, Metzler PS, van Kessel AG. The synovial-sarcoma-associated SS18-SSX2 fusion protein induces epigenetic gene (de)regulation. *Cancer Res* 2006; 66: 9474–9482

Buck E, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Thomson S, Mulvihill M, Barr S, Brown E, O'Connor M, Yao Y, Pachter J, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD, Gibson NW, Ji QS. Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. *Cancer Res* 2008; 68: 8322–8332

Buettner R, Wolf J, Thomas RK. Lessons Learned From Lung Cancer Genomics: The Emerging Concept of Individualized Diagnostics and Treatment. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1858-65

Byers LA, Sen B, Saigal B, Diao L, Wang J, Nanjundan M, Cascone T, Mills GB, Heymach JV, Johnson FM. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6852-6861

Cam WR, Masaki T, Shiratori Y, Kato N, Ikenoue T, Okamoto M, Igarashi K, Sano T, Omata M. Reduced C-terminal Src kinase activity is correlated inversely with pp60(c-src) activity in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 61-70

Le Cesne A, Blay JY, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, Lorigan P, Rodenhuis S, Ray-Coquard I, Bonvalot S, Collin F, Jimeno J, Di Paola E, van Glabbeke M, Nielsen OS. Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: a European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 480-484

Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Theocharis SE. Clinical significance of FAK expression in human neoplasia. *Histol Histopathol* 2008; 23: 629-650

Chee CE, Krishnamurthi S, Nock CJ, Meropol NJ, Gibbons J, Fu P, Bokar J, Teston L, O'Brien T, Gudena V, Reese A, Bergman M, Saltzman J, Wright JJ, Dowlati A, Brell J. Phase II Study of Dasatinib (BMS-354825) in Patients With Metastatic Adenocarcinoma of the Pancreas. *Oncologist* 2013; epub

Chodniewicz D, Klemke RL. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692: 63-76

Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, Gusterson BA, Cooper CS. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994; 7: 502-508

Collett MS, Brugge JS, Erikson RL, Lau AF, Krzyzek RA, Faras AJ. The src gene product of transformed and morphologically reverted ASV-infected mammalian cells. *Nature* 1979; 281: 195-198

Collett MS, Purchio AF, Erikson RL. Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60src shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature* 1980; 285: 167-169

Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, Shipley J, Gusterson BA, Cooper CS. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J* 1995; 14: 2333-2340

Czernilofsky AP, Levison AD, Varmus HE, Bishop JM, Tischer E, Goodman HM. Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* 1980; 287: 198-203

Edmonson JH, Ryan LM, Falkson CI, Hicks DG, Blum RH. Phase II Study of Ifosfamide+Doxorubicin in Patients With Advanced Synovial Sarcomas (E1793): A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Sarcoma* 2003; 7: 9–11

Eghtedar A, Verstovsek S, Estrov Z, Burger J, Cortes J, Bivins C, Faderl S, Ferrajoli A, Borthakur G, George S, Scherle PA, Newton RC, Kantarjian HM, Ravandi F. Phase II study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including post myeloproliferative neoplasms (MPN) acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2012; 119: 4614-4618

Eid JE, Kung AL, Scully R, Livingston DM. p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion. *Cell* 2000; 102: 839–848

Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roché H, Sparano JA, Strauss LC, Fairchild J, Sy O, Goldstein LJ. Dasatinib as a Single Agent in Triple-Negative Breast Cancer: Results of an Open-Label Phase 2 Study. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6905–6913

Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N, Slamon DJ. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/“triple-negative” breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 105: 319–326

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23: 824–854

Fligman I, Lonardo F, Jhanwar SC, Gerald WL, Woodruff J, Ladanyi M. Molecular diagnosis of synovial sarcoma and characterization of a variant SYT-SSX2 fusion transcript. *Am J Pathol* 1995; 147: 1592–1599

Friedrichs N, Kuchler J, Endl E, Koch A, Czerwitzki J, Wurst P, Metzger D, Schulte JH, Holst MI, Heukamp LC, Larso O, Tanaka S, Kawai A, Wardelmann E, Büttner R, Pietsch T, Hartmann W. Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J Pathol* 2008; 216: 428–439

Van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schöffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Die Tos AP, Hohenberger P. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 379: 1879-1886

Garcia CB, Shaffer CM, Alfaro MP, Smith AL, Sun J, Zhao Z, Young PP, van Saun MN, Eid JE. Reprogramming of mesenchymal stem cells by the synovial sarcoma-associated oncogene SYT-SSX2. *Oncogene* 2011; 31: 1–12

Güre A, Tureci O, Sahin U, Tsang S, Scanlan M, Jäger E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer* 1997; 72: 965–971

Güre AO, Wei IJ, Old LJ, Chen Y-T. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int J Cancer* 2002; 101: 448–453

Haldar M, Hancock JD, Coffin CM, Lessnick SL, Capecchi MR. A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer Cell* 2007; 11: 375–388

Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, El-Osta A. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 2005; 37: 254–264

Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI. c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 1994; 13: 3286–3295

Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F. Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC Hsrg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007: 755-808

Hellawell GO, Turner GDH, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 2002; 62: 2942–2950

Heukamp LC, Wolf J, Büttner R. Molecular diagnostics of lung cancer for treatment stratification. *Internist (Berlin)* 2011; 52: 146-154

Ho AL, Vasudeva SD, Laé M, Saito T, Barbashina V, Antonescu CR, Ladanyi M, Schwartz GK. PDGF receptor alpha is an alternative mediator of rapamycin-induced Akt activation: Implications for combination targeted therapy of synovial sarcoma. *Cancer Res* 2012; 72: 4515–4525

Hochhaus A, Kantarjian H. The development of dasatinib as a treatment for chronic myeloid leukemia (CML): from initial studies to application in newly diagnosed patients. *J Cancer Res* 2013; 139: 1971-1984

Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 311–340

Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Sci Acad USA* 1980; 77: 1311–1315

Huntley S, Baggott DM, Hamilton AT, Tran-Gyamfi M, Yang S, Kim J, Gordon L, Branscomb E, Stubbs L. A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: Insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors. *Genome Res* 2006; 16: 669–677

Huveneers S, Danen EHJ. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 2009; 122: 1059–1069

Hynes RO, Zhao Q. The Evolution of Cell Adhesion. *J Cell Biol* 2000; 150: 89–96

Iba H, Takeya T, Cross FR, Hanafusa T, Hanafusa H. Rous sarcoma virus variants that carry the cellular src gene instead of the viral src gene cannot transform chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Sci Acad USA* 1984; 81: 4424–4428

Ito T, Ouchida M, Ito S, Jitsumori Y, Morimoto Y, Ozaki T, Kawai A, Inoue H, Shimizu K. No SYT, a partner of SYT-SSX oncoprotein in synovial sarcomas, interacts with mSi3A, a component of histone deacetylase complex. *Lab Invest* 2004; 84: 1484–1490

Johnson FM, Bekele BN, Feng L, Wistuba I, Tang XM, Tran HT, Erasmus JJ, Hwang LL, Takebe N, Blumenschiein GR, Lippman SM, Stewart DJ. Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4609–4615

Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6924–6932

Jones KB, Su L, Jin H, Lenz C, Randall RL, Underhill TM, Nielsen TO, Sharma S, Capecchi MR. SS18-SSX2 and the mitochondrial apoptosis pathway in mouse and human synovial sarcomas. *Oncogene* 2012; 32: 1–7

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Berzt B, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2012

Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD. Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 464–473

Kawai A, Naito N, Yoshida A, Morimoto Y, Ouchida M, Shimizu K, Beppu Y. Establishment and characterization of a biphasic synovial sarcoma cell line, SYO-1. *Cancer Lett* 2004; 204: 105–113

Kawai A, Woodruff J, Healey JH, Brennan MF, Antonescu CR, Ladanyi M. SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N Engl J Med* 1998; 338: 153–160

Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 2013; 31: 482–489

Konecny GE, Glas R, Dering J, Manivong K, Qi J, Finn RS, Yang GR, Hong KL, Ginther C, Winterhoff B, Gao G, Brugge J, Slamon DJ. Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2009; 101: 1699–1708

Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, Park SI, Johnson M, Parikh NU, Kim MP, Abbruzzese JL, Ellis LM, Chandra J, Gallick GE. Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* 2009; 69: 3842–3849

Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Ten Eyck LF. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Sci Acad USA* 2006; 103: 17783–17788

Kruser TJ, Traynor AM, Wheeler DL. The use of single-agent dasatinib in molecularly unselected non-small-cell lung cancer patients. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20: 305–307

Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, Woodruff JM, Kawai A, Healey JH, Brennan MF, Bridge JA, Neff JR, Barr FG, Goldsmith JD, Brooks JS, Goldblum JR, Ali SZ, Shipley J, Cooper CS, Fisher C, Skytting B, Larsson O. Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res* 2002; 62: 135–140

Lai MM, Duesberg PH, Horst J, Vogt PK. Avian tumot virus RNA: a comparison of three sarcoma viruses and their transformation-defective derivatives by oligonucleotide fingerprinting and DNA-RNA hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 2266–2270

Laird AD, Li G, Moss K, Blake RA, Bromme MA, Cherrington JM, Mendel DB. Src family kinase activity is required for signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase phosphorylation and vascular endothelial growth factor signaling in vivo and for anchorage-dependent and -independent growth of human. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 461–469

Lee W, Han K, Harris CP, Shim S, Kim S, Meisner LF. Use of FISH to detect chromosomal translocations and deletions. Analysis of chromosome rearrangement in synovial sarcoma cells from paraffin-embedded specimens. *Am J Pathol* 1993; 143: 15–19

Li M, Zhao H, Zhang X, Wood LD, Anders RA, Choti MA, Pawlik TM, Daniel HD, Kannangai R, Offerhaus GJ, Velculescu VE, Wang L, Zhou S, Vogelstein B, Hruban RH, Papadopoulos N, Cai J, Torbenson MS, Kinzler KW. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43: 828–829

Lim FL, Soulez M, Koczan D, Thiesen HJ, Knight JC. A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene* 1998; 17: 2013–2018

Lin YC, Wu MH, Wei TT, Chuang KF, Cheng AL, Chen CC. Degradation of epidermal growth factor receptor mediates dasatinib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia* 2012; 14: 463–475

Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004; 47: 6658–6661

Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast BB, Vogelmann R, Lührs H, Friess H, Büchler MW, Adler G. Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 503–508

Mancuso T, Mezzelani A, Riva C, Fabbri A, Dal Bo L, Smpietro G, Perego P, Casali P, Zunino F, Sozzi G, Pierotti MA, Pilotti S. Analysis of SYT-SSX fusion transcripts and bcl-2 expression and phosphorylation status in synovial sarcoma. *Lab Invest* 2000; 80: 805-813.

Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK, Vissing H, Thiesen HJ, Rauscher FJ. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4509–4513

Martin GS, Venuta S, Weber M, Rubin H. Temperature-dependent alterations in sugar transport in cells infected by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2739–2741

Mayer E, Baurain J-F, Sparano JA, Strauss LC, Campone M, Fumoleau P. A phase 2 trial of dasatinib in patients with advanced HER2-positive and/or hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 69: 6897–68904

Michels S, Trautmann M, Sievers E, Kindler D, Huss S, Renner M, Friedrichs N, Kirfel J, Steiner S, Endl E, Wurst P, Heukamp LC, Penzel R, Larsson O, Kawai A, Tanaka S, Sonobe H, Schirmacher P, Mechterheimer G, Wardelmann E, Büttner R, Hartmann W. SRC Signaling Is Crucial in the Growth of Synovial Sarcoma Cells. *Cancer Res* 2013; 73: 2518-2528

Miettinen M. Primary soft tissue tumors with epithelial differentiation. In: Miettinen M Hsrg. *Modern Soft Tissue Pathology*. New York: Cambridge University Press, 2010: 777–789

Miller AA, Pang H, Hodgson L, Ramnath N, Otterson GA, Kelley MJ, Kratzke RA, Vokes EE. A phase II study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30602). *J Thorac Oncol* 2010; 5: 380–384

Morton JP, Karim SA, Graham K, Timpson P, Jamieson N, Athineos D, Doyle B, McKay C, Heung MY, Oien KA, Frame MC, Evans TR, Sansom OJ, Brunton VG. Dasatinib inhibits the development of metastases in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2010; 139: 292–303

Munshi N, Groopman JE, Gill PS, Ganju RK. c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 2000; 164: 1169–1174

Nagaraj NS, Washington MK, Merchant NB. Combined Blockade of Src Kinase and Epidermal Growth Factor Receptor with Gemcitabine Overcomes STAT3-Mediated Resistance of Inhibition of Pancreatic Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 483–493

Naka N, Takenaka S, Araki N, Miwa T, Hashimoto N, Yoshioka K, Joyama S, Hamasa K, Tsukamoto Y, Tomita Y, Ueda T, Yoshikawa H, Itoh K. Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem Cells* 2010; 28: 1119–1131

Nam S, Kim D, Cheng JQ, Zhang S, Lee J-H, Buettner R, Mirosevich J, Lee FY, Rove R. Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Cancer Res* 2005; 65: 9185–9189

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002; 108: 475–487

Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999; 144: 1235–1244

Van Oijen MG, Rijksen G, Ten Broek FW, Slootweg PJ. Overexpression of c-Src in areas of hyperproliferation in head and neck cancer, premalignant lesions and benign mucosal disorders. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 147–152

Oppermann H, Levison AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM. Uninfected vertebral cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma transforming gene (src). *Proc Natl Sci Acad USA* 1979; 76: 1804–1808

Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, Van Beurden EA, Hennipman A, Michels AA, Staal GE. Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer Res* 1992; 52: 4773–4778

Pankov R, Endo Y, Even-Ram S, Araki M, Clark K, Cukierman E. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol* 2005; 170: 793–802

Park SI, Zhang J, Phillips KA, Araujo JC, Najjar AM, Volgin AY, Gelovani JG, Kim SJ, Wang Z, Gallick GE. Targeting SRC family kinases inhibits growth and lymph node metastases of prostate cancer in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2008; 68: 3323–3333

Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; 23: 7906–7909



- Pengue G, Lania L. Kruppel-associated box-mediated repression of RNA polymerase II promoters is influenced by the arrangement of basal promoter elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1015–1020
- Perani M, Ingram CJ, Cooper CS, Garrett MD, Goodwin GH. Conserved SNH domain of the proto-oncoprotein SYT interacts with components of the human chromatin remodeling complexes, while the QPGY repeat domain forms homo-oligomers. *Oncogene* 2003; 22: 8156–8167
- Peterson CL, Tamkun JW. The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 143–146
- Peterson JE, Kulik G, Jelinek T, Reuter CW, Shannon JA, Weber MJ. Src phosphorylates the insulin-like growth factor type I receptor on the autophosphorylation sites. Requirement for transformation by src. *J Biol Chem* 1996; 271: 31562–31571
- Piwnica-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE, Cheng SH. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell* 1987; 49: 75–82
- Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004; 23: 7928–7946
- Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 915–928
- Raney RB. Synovial sarcoma in young people: background, prognostic factors, and therapeutic questions. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 207–211
- Ren XD, Kiosses WB, Sieg DJ, Otey CA, Schlaepfer DD, Schwartz MA. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci* 2000; 113: 3673–3688
- Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 2463–2469
- Roa KN. The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis. *Anticancer Res* 1995; 15: 309–314
- Rosen G, Forscher C, Lowenbraun S, Eilber F, Eckardt J, Holmes C, Fu YS. Synovial sarcoma. Uniform response of metastases to high dose ifosfamide. *Cancer* 1994; 73: 2506–2511
- Roskoski Jr. R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1155–1164

Rous P. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl.). *J Exp Med* 1910; 12: 696–705

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911; 13: 397–411

Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial Sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 133: 1–23

Dos Santos NR, De Bruijn DR, Balemans M, Janssen B, Gärtner F, Lopes JM, de Leeuw B, Geurts van Kessel A. Nuclear localization of SYT, SSX and the synovial sarcoma-associated SYT-SSX fusion proteins. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1549–1558

Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 299–313

Schilder RJ, Brady WE, Lankes HA, Fiorica J V, Shahin MS, Zhou XC, Mannel RS, Pathak HB, Hu W, Alpaugh RK, Sood AK, Godwin AK. Phase II evaluation of dasatinib in the treatment of recurrent or persistent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2012; 127: 70–74

Schrage YM, Briaire-de Bruijn IH, de Miranda NF, van Oosterwijk J, Taminiau AH, van Wezel T, Hogendoorn PC, Bovée JV. Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res* 2009; 69: 6216–6222

Schütte J, Hartmann TJ, Reichardt P, Issels RD, Tunn P, Budach V. Leitlinie Weichteilsarkome. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie Hsrg. Berlin: 2011

Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M, Andrulis IL. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res* 1995; 55: 129–134

Sell C, Baserga R, Rubin R. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; 55: 303–306

Sen B, Saigal B, Parikh N, Gallick G, Johnson FM. Sustained Src inhibition results in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and cancer cell survival via altered Janus-activated kinase-STAT3 binding. *Cancer Res* 2009; 69: 1958–1965

Serrels A, MacPherson IRJ, Evans TRJ, Lee FY, Clark EA, Sansom OJ, Ashton GH, Frame MC, Brunton VG. Identification of potential biomarkers for measuring inhibition of Src kinase activity in colon cancer cells following treatment with dasatinib. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3014–3022

Shiple J, Clark J, Crew AJ, Birdsall S, Rocques PJ, Gill S, Chelly J, Monaco AP, Abe S, Gusterson BA. The t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcomas involves two distinct loci on the X chromosome. *Oncogene* 1994; 9: 1447–1453

Shor AC, Keschman EA, Lee FY, Muro-Cacho C, Letson GD, Trent JC, Pledger WJ, Jove R. Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Res* 2007; 67: 2800–2808

Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, Terrier-Lacombe MJ, Mandahl N, Craver RD, Blin N, Sozzi G, Turc-Carel C, O'Brien KP, Kedra D, Frasson I, Guilbaud C, Dumanski JP. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet* 1997; 15: 95–98

Singer S, Baldini EH, Demetri GD, Fletcher JA, Corson JM. Synovial sarcoma: prognostic significance of tumor size, margin of resection, and mitotic activity for survival. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1201–1208

Sirvent A, Benistant C, Pannequin J, Veracini L, Simon V, Bourgaux JF, Hollande F, Cruzalegui F, Roche S. Src family tyrosine kinases-driven colon cancer cell invasion is induced by Csk membrane delocalization. *Oncogene* 2010; 29: 1303–1315

Skytting B, Nilsson G, Brodin B, Xie Y, Lundeberg J, Uhlen M, Larsson O. A Novel Fusion Gene, SYT-SSX4, in Synovial Sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 974–975

Sonobe H, Manabe Y, Furihata M, Iwata J, Oka T, Ohtsuki Y, Mizubuchi H, Yamamoto H, Kumonao O, Abe S. Establishment and characterization of a new human synovial sarcoma cell line, HS-SY-II. *Lab Invest* 1992; 67: 498–505

Soulez M, Saurin AJ, Freemont PS, Knight JC. SSX and the synovial-sarcoma specific chimaeric protein SYT-SSX co-localize with the human Polycomb group complex. *Oncogene* 1999; 18: 2739–2746

Spillane AJ, A'Hern R, Judson IR, Fisher C, Thomas JM. Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging, and prognostic assessment. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3794–3803

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260: 170–173

Sun Y, Gao D, Liu Y, Huang J, Lessnick S, Tanaka S. IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene* 2006; 25: 1042–1052

Takenaka S, Naka N, Araki N, Hashimoto N, Ueda T, Yoshioka K, Yoshikawa H, Ito K. Downregulation of SS18-SSX1 expression in synovial sarcoma by small interfering RNA enhances the focal adhesion pathway and inhibits anchorage-independent growth in vitro and tumor growth in vivo. *Int J Oncol* 2010; 36: 823–831

Takeya T, Hanafusa H. DNA sequence of the viral and cellular src gene of chickens. II. Comparison of the src genes of two strains of avian sarcoma virus and the cellular homolog. *J Virol* 1982; 44: 12–18

Takeya T, Hanafusa H. Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell* 1983; 32: 881–890

Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* 1993; 91: 53–60

Tanaka A, Fujita DJ. Expression of a molecularly cloned human c-src oncogene by using a replication-competent retroviral vector. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3900–3909

Thaete C, Brett D, Monaghan P, Whitehouse S, Renie G, Rayner E, Cooper CS, Goodwin G. Functional domains of the SYT-SSX synovial sarcoma translocation proteins and co-localization with SNF protein BRM in the nucleus. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 585–591

Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, Gronchi A, Riva C, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S. Expression of ligand-activated KIT and paletet-derived growth factor receptor beta tyrosine kinase receptors in synovial sarcoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 938–943

Tornkvist M, Natalishvili N, Xie Y, Girnita A, D'Arcy P, Brodin B, Axelsom M, Grnita L. Differential roles of SS18-SSX fusion gene and insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2008a; 368: 793–800

Turc-Carel C, Dal Cin P, Limon J, Rao U, Li FP, Corson JM, Zimmerman R, Perry DM, Cowan JM, Sandberg AA. Involvement of chromosome X in primary cytogenetic change in human neoplasia: nonrandom translocation in synovial sarcoma. *Proc Natl Sci Acad USA* 1987; 84: 1981–1985

Tureci O, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998; 77: 19–23

Turner BC, Haffty BG, Narayanan L, Yuan J, Havre PA, Gumbs AA, Kaplann L, Burgaud JL, Carter D, Baderga R, Glazer PM. Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res* 1997; 57: 3079–3083

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986; 5: 2503–2512

Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Autrias A, Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 1998; 394: 203–206

Vogt PK. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 1971; 46: 939–946

Wang D, Huang XY, Cole PA. Molecular determinants for Csk-catalyzed tyrosine phosphorylation of the Src tail. *Biochemistry* 2001; 40: 2004–2010

Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Ichihara S, Sawa H, Minami A, Mochizuki N, Nagashima K, Tanaka S. Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 499–510

Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 2009; 14: 667–678

Xie Y, Skytting B, Nilsson G, Gasbarri A, Haslam K, Bartolazzi A, Brodin B, Mandahl N, Larsson O. SYT-SSX is critical for cyclin D1 expression in synovial sarcoma cells: a gain of function of the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation. *Cancer Res* 2002 a; 62: 3861–3867

Xie Y, Skytting B, Nilsson G, Grimer RJ, Mangham CD, Fisher C, Shipley J, Bjerkenhagen B, Myklebost O, Larsson O. The SYT-SSX1 fusion type of synovial sarcoma is associated with increased expression of cyclin A and D1. A link between t(X;18)(p11.2; q11.2) and the cell cycle machinery. *Oncogene* 2002 b; 21: 5791–5796

Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* 1999; 3: 629–638

Yu EY, Wilding G, Posadas E, Gross M, Culine S, Massard C, Morris MJ, Hudes G, Calabrò F, Cheng S, Trudel GC, Paliwal P, Sternberg CN. Phase II study of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7421–7428

Zha J, Lackner MR. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2512–2517

Zhu S, Bjorge JD, Fujita DJ. PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res* 2007; 67: 10129–10137

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Elisabeth Sievers und Dr. rer. nat. Marcel Trautmann für die tolle Betreuung, bei Dagmar Kindler für die tatkräftige Unterstützung und bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Hartmann für die Ermöglichung dieses Projektes bedanken.

Ebenfalls möchte ich der BONFOR-Kommission für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Verleihung des BONFOR-Forschungspreises im Rahmen des 16. BONFOR-Symposiums der Universität Bonn meinen Dank aussprechen.

Auch möchte ich Isabelle, meiner Familie und allen Freunden danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.