



Doctoral Thesis

## Investigating the role of PTPRJ in renal cell carcinoma

**Author(s):**

Casagrande, Silvia

**Publication Date:**

2011

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006490900> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No.19495

**Investigating the role of *PTPRJ*  
in Renal Cell Carcinoma**

A dissertation submitted to the  
ETH Zurich

For the degree of  
Doctor of Sciences

Presented by  
SILVIA CASAGRANDE

M.Sc. in Pharmaceutical Biotechnology, University of Padova, Italy

Born 16<sup>th</sup> of June 1981

Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Wilhelm Krek (examiner)  
Prof. Holger Moch (co-examiner)  
Prof. Christian Frei (co-examiner)

2011

## Summary

Renal cell carcinoma (RCC) represents more than 80% of all kidney malignancies. The most common subtype is clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC). Most of these tumors are characterized by mutations of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene. Its gene product, pVHL, is an important regulator of the Hypoxia Inducible Factor- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ). Even under normoxia loss of function of pVHL leads to HIF- $\alpha$  stabilization, increased HIF transcriptional activity and up-regulation of HIF target genes involved in tumor promoting pathways. Several of those genes encode potential anticancer drug targets including VEGF-A, PDGF-A, EPO, CAIX and CXCR4.

Literature data about genes and proteins that become down-regulated via HIF due to loss of pVHL in ccRCC is quite moderate. To expand this knowledge, I focused on the protein-tyrosine phosphatase receptor type J (PTPRJ), because recent mass spectrometry experiments (performed by a former PhD student in our laboratory) identified its expression to be associated with the presence of pVHL. Quantitative RT-PCR as well as RNA in situ hybridization analysis on a TMA with more than 250 tumors showed that the majority of ccRCCs had *PTPRJ* mRNA expression levels that were reduced compared to those seen in matched normal tissues and in most *VHL* non-affected papillary RCCs. This result and the association between normal *PTPRJ* mRNA levels and nuclear/cytoplasmic pVHL positivity in ccRCC suggest that *PTPRJ* expression is positively linked to functional pVHL. Furthermore, both univariate and multivariate analysis showed that the maintenance of normal *PTPRJ* mRNA expression is significantly correlated with a better patient outcome.

*In vitro* experiments performed with ccRCC and non-cancerous kidney cell lines demonstrated that pVHL positively up-regulates *PTPRJ* mRNA and protein expression. In pVHL-deficient RCC cell lines HIF-2 $\alpha$  resulted to be the main isoform responsible for the down-regulation of *PTPRJ* expression. In contrast, in normal kidney cells exposed to hypoxia HIF-1 $\alpha$  and not HIF-2 $\alpha$  was able to suppress *PTPRJ*. In addition, SNAIL, a transcriptional regulator induced by HIF/hypoxia, acts as putative repressor of *PTPRJ* expression, but only in 786-0 cells. Luciferase gene reporter assays performed with the putative *PTPRJ* promoter region revealed that the identified putative HREs and reverse HREs are not sufficient to suppress *PTPRJ* expression. Silencing of PTPRJ by siRNA in RCC4 VHL cells did not produce significant effects on migration, whereas overexpression of PTPRJ in RCC4 cells resulted in reduced cell proliferation and lower levels of phospho-EGFR and phospho-AKT.

Finally, a mutation analysis of exons 5, 6, 7 and 13 of the *PTPRJ* gene identified two conservative (E206E and T233T) and three non-conservative polymorphisms (Q276P, R326Q and E872D) whose influence on PTPRJ expression is still unknown. There were not nonsense or frameshift mutations with potential severe consequences on PTPRJ function.

In conclusion, from this study we can state that down-regulation of *PTPRJ* is a characteristic feature in ccRCC that is closely linked to the loss of pVHL function and the activation of HIF. Furthermore, the inhibitory effects of PTPRJ on the EGFR-PI3K-AKT-mTOR pathway may have relevance for ccRCC patients regarding the use of an anti-AKT/mTOR therapy. Molecular studies of low abundant genes, such as *PTPRJ*, are a big challenge in cancer research as they are more sophisticated compared to investigations of those genes that become clearly up or down-regulated in tumors. They are nevertheless necessary to better understand the complex genetic network of cancer.

## Riassunto

Il carcinoma renale rappresenta più dell'80% dei tumori del rene. Il sottotipo più comune è il carcinoma renale a cellule chiare. La maggior parte di questi tumori è caratterizzata dalla presenza di mutazioni nel gene soppressore del tumore von Hippel-Lindau (*VHL*). La proteina prodotta da questo gene, pVHL, è un importante regolatore del fattore inducibile da ipossia (HIF- $\alpha$ ). Anche in condizioni di normossia la perdita di pVHL porta alla stabilizzazione di HIF- $\alpha$ , ad un'aumentata attività trascrizionale di HIF e ad un'up-regolazione dei geni target di HIF coinvolti in pathways che promuovono lo sviluppo del tumore. Molti di questi geni codificano potenziali target di farmaci anticancro, come ad esempio VEGF-A, PDGF-A, EPO, CAIX e CXCR4.

Nel carcinoma renale a cellule chiare le informazioni su geni e proteine che vengono down-regolate via HIF in seguito alla perdita di pVHL sono alquanto limitate. Allo scopo di espandere questa conoscenza, mi sono concentrata sullo studio della proteina tirosin fosfatasi recettoriale di tipo J (*PTPRJ*), perché recenti esperimenti di spettrometria di massa (eseguiti da un precedente dottorando del nostro laboratorio) hanno scoperto un'associazione positiva tra la sua espressione e la presenza di pVHL. Esperimenti di RT-PCR quantitativa e ibridizzazione in situ di RNA in un TMA contenente più di 250 tumori hanno dimostrato che nella maggioranza dei carcinomi renali a cellule chiare i livelli di espressione dell'mRNA di *PTPRJ* erano ridotti rispetto a quelli presenti nei corrispettivi tessuti normali e nella maggior parte dei carcinomi renali papillari nei quali *VHL* non è colpito. Questo risultato assieme all'evidenza di un'associazione tra la presenza di livelli normali di mRNA di *PTPRJ* e la presenza di pVHL nel nucleo e nel citoplasma nelle cellule di carcinoma renale a cellule chiare suggeriscono che l'espressione di *PTPRJ* sia positivamente collegata alla funzionalità di pVHL. Inoltre, sia l'analisi univariata che multivariata di sopravvivenza hanno dimostrato che il mantenimento di una normale espressione dell'mRNA di *PTPRJ* correla in maniera significativa con una migliore sopravvivenza.

Esperimenti *in vitro* eseguiti con linee cellulari di carcinoma renale a cellule chiare e linee cellulari non tumorali derivate da rene hanno dimostrato che pVHL regola positivamente l'espressione di *PTPRJ* a livello di mRNA e a livello proteico. In linee cellulari di carcinoma renale prive di VHL HIF-2 $\alpha$  è risultata essere la principale isoforma responsabile della down-regolazione dell'espressione di *PTPRJ*. Al contrario, in cellule di rene esposte a ipossia HIF-1 $\alpha$  e non HIF-2 $\alpha$  è l'isoforma in grado di ridurre *PTPRJ*. In aggiunta, SNAIL, un regolatore trascrizionale indotto da HIF/ipossia, agisce come repressore putativo dell'espressione di

*PTPRJ*, ma solo nella linea cellulare 786-0. Saggi reporter di luciferasi con il promotore putativo di *PTPRJ* hanno rivelato che le putative HREs e reverse HREs non sono sufficienti per sopprimere l'espressione di *PTPRJ*. Il silenziamento di *PTPRJ* ottenuto attraverso siRNA nelle cellule RCC4 VHL non ha prodotto effetti significativi in termini di migrazione, invece l'overespressione di *PTPRJ* nelle cellule RCC4 ha provocato una riduzione della proliferazione cellulare e livelli più bassi di EGFR fosforilato e AKT fosforilato.

Infine, l'analisi mutazionale degli esoni 5, 6, 7 e 13 del gene *PTPRJ* ha identificato due polimorfismi conservativi (E206E e T233T) e tre polimorfismi non conservativi (Q276P, R326Q e E872D) la cui influenza sull'espressione di *PTPRJ* è ancora sconosciuta. Non sono state trovate mutazioni nonsense o frameshift aventi possibili severe conseguenze sulla funzione di *PTPRJ*.

In conclusione, da questo studio possiamo affermare che la down-regolazione di *PTPRJ* è un aspetto caratteristico del carcinoma renale a cellule chiare ed è strettamente collegata alla perdita della funzione di pVHL e all'attivazione di HIF. Inoltre, l'effetto inibitorio di *PTPRJ* sull'attivazione del EGFR-PI3K-AKT-mTOR pathway potrebbe avere rilevanza per i pazienti di carcinoma renale a cellule chiare sulla possibilità dell'uso di una terapia anti-AKT/mTOR. Studi molecolari che riguardano geni poco abbondanti, come *PTPRJ*, sono grandi sfide nella ricerca contro il cancro dal momento che sono più sofisticati rispetto a investigazioni di geni che diventano chiaramente up o downregolati nei tumori. Sono comunque necessari per una migliore conoscenza del complesso network genetico del cancro.