

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

# **Charakterisierung der Rolle und Funktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase Meg2**

vorgelegt von

Andreas Weiß

aus

Bayreuth

München, 2003

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne erlaubte Hilfe erarbeitet. Die benutzte Literatur sowie sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

München, den 19.12.2002

.....

Dissertation eingereicht am: 19.12.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel Ullrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2003

*Es hilft nichts zu wissen, man muss auch anwenden,  
es hilft nichts zu wollen, man muss auch tun.*

J. W. von Goethe

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN</b>	<b>1</b>
1.1.1	REZEPTOR-ÄHNLICHE PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN	3
1.1.2	INTRAZELLULÄRE PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN	5
<b>1.2</b>	<b>PROTEIN-TYROSIN-KINASEN</b>	<b>7</b>
1.2.1	REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN	7
1.2.2	INTRAZELLULÄRE TYROSIN-KINASEN	8
<b>1.3</b>	<b>MAP-KINASE (MAPK)-KASKADEN</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>REGULATION DER SPEZIFITÄT UND AKTIVITÄT VON PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTION VON PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN</b>	<b>11</b>
1.5.1	REGULATION VON REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN UND MITOGENER SIGNALTRANSDUKTION	12
1.5.2	REGULATION VON ZELLADHÄSION UND ZELLMIGRATION	13
1.5.3	ROLLE VON PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN BEI DER TUMORENTSTEHUNG	15
<b>1.6</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>BEZUGSQUELLEN</b>	<b>18</b>
2.1.1	CHEMIKALIEN	18
2.1.2	ENZYME	19
2.1.3	RADIOCHEMIKALIEN	19
2.1.4	„KITS“ UND SONSTIGES	19
2.1.5	WACHSTUMSFAKTOREN UND LIGANDEN	20
2.1.6	MEDIEN UND PUFFER	20
2.1.7	ZELLKULTURMEDIEN	21
2.1.8	STAMMLÖSUNGEN UND HÄUFIG VERWENDETE PUFFER	21
2.1.9	BAKTERIENSTÄMME, ZELLLINIEN UND ANTIKÖRPER	22
2.1.9.1	Bakterienstämme	23
2.1.9.2	Zelllinien	23
2.1.9.3	Antikörper	24
2.1.10	PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	25



2.1.10.1	Ausgangsvektoren	25
2.1.10.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide	26
2.1.10.3	Wichtige Oligonukleotide	27
<b>2.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>28</b>
2.2.1	PLASMIDPRÄPARATION FÜR ANALYTISCHE ZWECKE	28
2.2.2	PLASMIDPRÄPARATION FÜR PRÄPARATIVE ZWECKE	28
2.2.3	ENZYMATISCHE BEHANDLUNG VON DNA	29
2.2.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	29
2.2.3.3	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	29
2.2.4	GELELEKTROPHORESE VON DNA	29
2.2.5	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	29
2.2.6	DNA-TRANSFER IN <i>E. COLI</i> -BAKERIEN	30
2.2.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	30
2.2.6.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	30
2.2.6.3	Dauerkulturen von <i>E. coli</i> -Bakterien	30
2.2.7	GEZIELTE MUTAGENESE VON DNA	30
2.2.7.1	Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3-DNA	30
2.2.7.2	Synthese des mutierten Stranges	31
2.2.8	SEQUENZIERUNG	31
2.2.9	ARBEITEN MIT RNA	31
2.2.9.1	Präparation von Total-RNA	31
2.2.9.2	Präparation von polyA <sup>+</sup> -RNA (mRNA) aus Total-RNA	32
2.2.9.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	32
2.2.9.4	Northern-Analyse	32
2.2.9.5	Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran	33
2.2.9.6	Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA	33
2.2.9.7	Synthese von cDNA	33
2.2.10	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-DATP	34
2.2.11	LIGHT CYCLER REAL TIME PCR	34
2.2.12	CDNA-FILTERHYBRIDISIERUNG	34
2.2.13	AMPLIFIKATION VON DNA-FRAGMENTEN DURCH PCR	35
<b>2.3</b>	<b>METHODEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYONTISCHEN ZELLEN</b>	<b>36</b>
2.3.1	ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN	36

2.3.2	MYKOPLASMENTEST	36
2.3.3	KALZIUMPHOSPHAT-TRANSFEKTION	37
2.3.4	TRANSFEKTION MIT ANDEREN METHODEN	37
2.3.5	BESTIMMUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ	37
2.3.6	RETROVIRALER GENTRANSFER IN SÄUGERZELLEN	37
2.3.7	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON ZELLEN	38
<b>2.4</b>	<b>PROTEINANALYTISCHE METHODEN</b>	<b>38</b>
2.4.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON GLUTATHION-S-TRANSFERASE (GST)- FUSIONSPROTEINEN	38
2.4.1.1	Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli BL21	38
2.4.1.2	Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose	39
2.4.2	TRITON X-100 LYSE VON ZELLEN	39
2.4.3	ZELLFRAKTIONIERUNG	39
2.4.4	PROTEINBESTIMMUNG	40
2.4.5	IMMUNPRÄZIPITATION VON PROTEINEN	40
2.4.6	PRÄZIPITATION VON ZELLYSATEN MIT GST-FUSIONSPROTEINEN	40
2.4.7	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	41
2.4.8	FÄRBen UND FIXIEREN VON POLYACRYLAMID-GELEN	41
2.4.9	TRANSFER VON PROTEINEN AUF NITROZELLULOSEMEMBRAN (WESTERN-BLOT)	41
2.4.10	IMMUNDETEKTION (IMMUNOBLOT-ANALYSE)	41
2.4.11	„FAR WESTERN PROTEIN OVERLAY“	42
2.4.12	ANALYSE DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT <i>IN VITRO</i> MITTELS pNPP-TEST	42
2.4.13	ANALYSE VON PROTEIN/LIPID-INTERAKTIONEN <i>IN VITRO</i> („PROTEIN-LIPID-OVERLAY“)	43
2.4.14	„GAP-ASSAY“	43
<b>2.5</b>	<b>ZELLBIOCHEMISCHE UND –BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>44</b>
2.5.1	STIMULATION VON ZELLEN	44
2.5.2	IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE	44
2.5.3	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON LEBENDEN ZELLEN (MTT-TEST)	44
2.5.4	FOCUSBILDUNGSTEST	45
2.5.5	GEZIELTE INHIBIERUNG DER GENEXPRESSION MITTELS siRNAs („RNA INTERFERENCE“)	45
<b>2.6</b>	<b>HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN</b>	<b>46</b>
2.6.1	POLYKLONALE ANTIKÖRPER AUS KANINCHEN	46

2.6.2	MONOKLONALE ANTIKÖRPER AUS RATTE	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>HERSTELLUNG VERSCHIEDENER GST-MEG2 FUSIONSPROTEINE UND MEG2-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>VERBREITUNG UND VORKOMMEN</b>	<b>50</b>
3.2.1	EXPRESSION VON PTP-MEG2 IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	50
3.2.1.1	Expression von PTP-Meg2 auf mRNA-Ebene	51
3.2.1.2	Expression von PTP-Meg2 auf Proteinebene	53
3.2.2	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON PTP-MEG2	54
<b>3.3</b>	<b>REGULATION DER EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON PTP-MEG2</b>	<b>57</b>
3.3.1	DIE EXPRESSION DER PTP-MEG2 KANN DURCH DIFFERENZIERUNGSAGENZIEEN BEEINFLUSST WERDEN	57
3.3.2	UNTERSUCHUNG DER MEG2-PHOSPHATASEAKTIVITÄT MIT REKOMBINANTEN PROTEINEN	58
3.3.3	DIE MEG2-PHOSPHATASEAKTIVITÄT KANN DURCH STIMULI REGULIERT WERDEN	59
3.3.4	PTP-MEG2 BINDET AN PHOSPHOLIPIDE UND KANN DADURCH AKTIVIERT WERDEN	60
3.3.5	PTP-MEG2 WIRD UNTER BESTIMMTEN BEDINGUNGEN MODIFIZIERT	63
<b>3.4</b>	<b>ASSOZIIERTE PROTEINE UND SUBSTRATE</b>	<b>65</b>
3.4.1	PTP-MEG2 ASSOZIIERT MIT DEM EGF-REZEPTOR <i>IN VITRO</i>	65
3.4.2	PTP-MEG2 BINDET DEN EGF-REZEPTOR NACH DESSEN AKTIVIERUNG	68
3.4.3	DIE CRALBP-DOMÄNE DER PTP-MEG2 VERMITTELT NICHT DIE ASSOZIATION MIT DEM EGF-REZEPTOR	70
3.4.4	KOIMMUNPRÄZIPITATION VON PTP-MEG2 UND EGF-REZEPTOR IN HEK 293-ZELLEN	71
3.4.5	DER EGF-REZEPTOR IST KEIN SUBSTRAT DER PTP-MEG2	73
3.4.6	WEITERE MIT PTP-MEG2 ASSOZIIERENDE PROTEINE	75
<b>3.5</b>	<b>BIOLOGISCHE FUNKTION DER PTP-MEG2</b>	<b>76</b>
3.5.1	PTP-MEG2 HAT KEINE GAP-AKTIVITÄT BEZÜGLICH RHO-GTPASEN	76
3.5.2	PTP-MEG2 INHIBIERT DIE VON V-ERBB UND DEM EGF-REZEPTOR VERMITTELTE TRANSFORMATION VON ZELLEN IM FOCUSBILDUNGSTEST	78
3.5.3	PTP-MEG2 HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE ZELLPROLIFERATION	81
3.5.4	PTP-MEG2 ERHÖHT DIE MIGRATION VON ZELLEN IM WUNDHEILUNGSEXPERIMENT	82
3.5.5	ANALYSE DER PTP-MEG2 FUNKTION MITTELS siRNA	84
3.5.5.1	Generierung und Test PTP- Meg2 spezifischer siRNAs auf Funktionalität	84

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>V</u>
3.5.5.2 Analyse der Tyrosinphosphorylierung nach siRNA induzierter Meg2-Depletion	86
3.5.5.3 Analyse der Genexpression nach siRNA induzierter Meg2-Depletion	87
<b>3.6 VERSUCH DER IDENTIFIKATION MIT DEM EGF-REZEPTOR BZW. HER2 ASSOZIIERENDER PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN</b>	<b>91</b>
<b><u>4 DISKUSSION</u></b>	<b><u>94</u></b>
4.1 VERBREITUNG UND VORKOMMEN	94
4.2 REGULATION DER EXPRESSION UND AKTIVITÄT	96
4.3 ASSOZIIERTE PROTEINE UND SUBSTRATE	100
4.4 BIOLOGISCHE FUNKTION	102
4.5 AUSBLICK	108
<b><u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>109</u></b>
<b><u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>7 ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b><u>127</u></b>

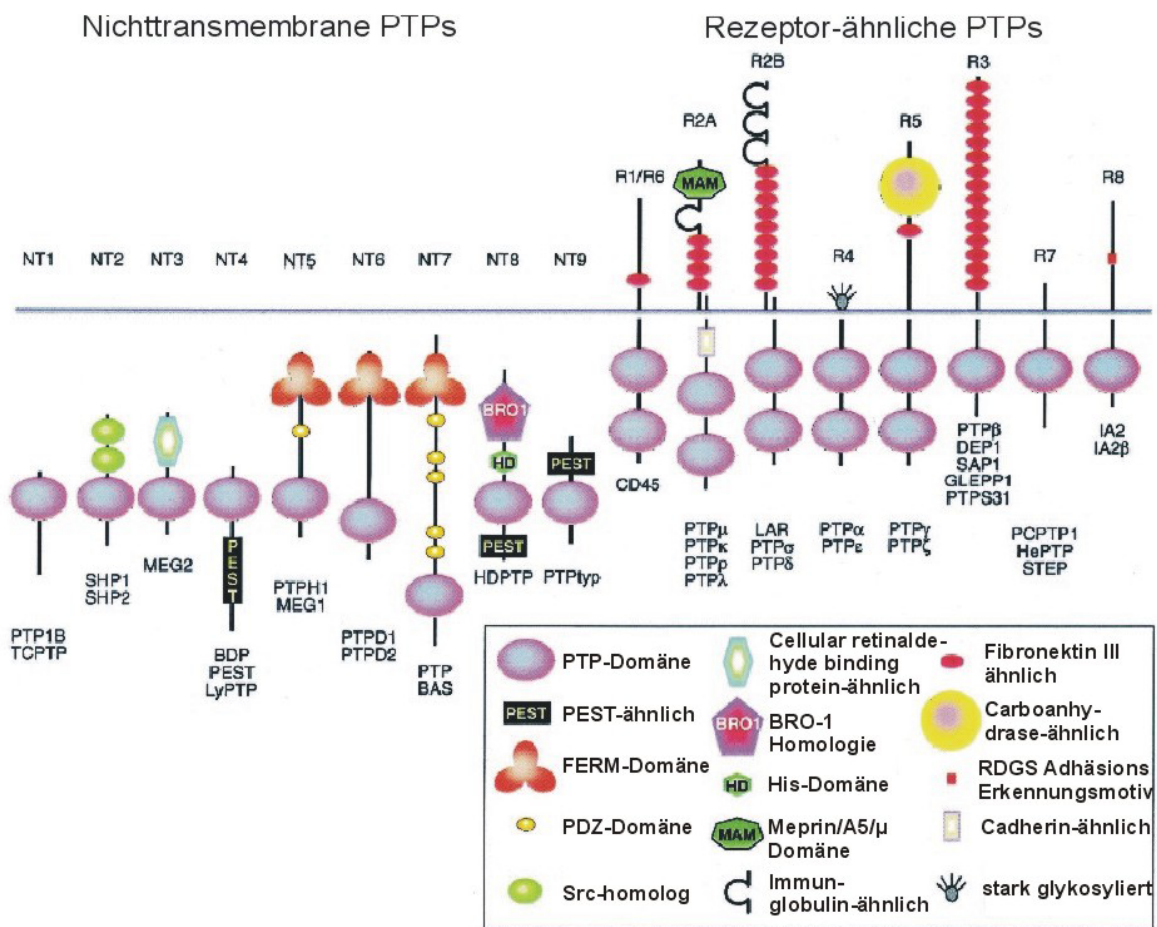
# 1 Einleitung

Die Entwicklung eines vielzelligen Organismus und die Aufrechterhaltung seiner Integrität und Funktionalität basieren auf einem komplexen Kommunikationssystem. Dessen Aufrechterhaltung ist essentiell für die Kontrolle und Koordination so vielfältiger Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Migration, Differenzierung und Adhäsion von Zellen. Die Kommunikation kann dabei durch direkte Kontakte einer Zelle mit benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix gesteuert werden. Viel häufiger ist aber der erste Schritt der Kommunikation die Bindung eines löslichen Liganden (Hormon, Wachstumsfaktor, Zytokin) an Oberflächenrezeptoren, in der Regel RTKn (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) oder GPCRen (G-Protein gekoppelte Rezeptoren), wonach eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die schlussendlich zu einer biochemischen bzw. physiologischen Antwort führt. Die Signalweiterleitung innerhalb einer Kaskade durch Aktivierung und Inaktivierung der beteiligten Proteine wird im Wesentlichen durch eine gezielt regulierte Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und vor allem Tyrosinresten gewährleistet. Ein genau abgestimmtes Wechselspiel zwischen PTKn (Protein-Tyrosin-Kinasen) und PTPasen (Protein-Tyrosin-Phosphatasen) spielt dabei für die Aufrechterhaltung eines Phosphorylierungsgleichgewichts eine entscheidende Rolle. Eine dauerhafte Verschiebung des Gleichgewichts führt häufig zu schwerwiegenden Erkrankungen. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, dass eine erhöhte Aktivität oder Überexpression von PTKn zur Transformation von Zellen führt und mit der Tumorentstehung bzw. -progression einhergeht. Bis vor kurzem haben sich Untersuchungen zur Funktion der Tyrosinphosphorylierung für die Modulation und Regulation von Signalkaskaden auf PTKn, so vor allem RTKn und Kinasen der Src-Familie, konzentriert. In der letzten Dekade wurde jedoch immer mehr deutlich, dass PTPasen als deren Antagonisten eine genauso bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Signalwegen spielen und ein besseres Verständnis der Funktion von PTPasen unbedingt erforderlich ist.

## 1.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Mitglieder der PTP-Superfamilie sind durch die Präsenz des hochkonservierten Signaturmotivs (I/V)HCXXGXXR(S/T)G innerhalb der PTP-Domäne gekennzeichnet (Andersen et al., 2001; Charbonneau et al., 1989; Zhang et al., 1994b). Sie können weiterhin in klassische PTPasen, dualspezifische Phosphatasen (DSPs) sowie LMW-Phosphatasen

(„Low Molecular Weight“), die außer dem CX<sub>5</sub>R-Motiv keinerlei Homologie zu anderen PTPasen aufweisen, unterteilt werden. Im Gegensatz zu den klassischen PTPasen, die ausschließlich Tyrosinreste dephosphorylieren können (Guan and Dixon, 1990; Sparks and Brautigan, 1985; Tonks et al., 1988), können DSPs und LMW-PTPasen sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threoninreste dephosphorylieren (Gautier et al., 1991; Guan and Dixon, 1991; Zhang et al., 1995). Anhand der die PTP-Domäne flankierenden Sequenzen werden die klassischen PTPasen in transmembrane, Rezeptor-ähnliche PTPasen (RPTPasen) und nicht-transmembrane, intrazelluläre PTPasen unterteilt (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Mitglieder der Protein-Tyrosin-Phosphatase Familie**  
 Klassifizierung der PTP Familie in 9 nicht-transmembrane (NT1-9) und 8 Rezeptor-ähnliche Subtypen (R1-8). Nur humane Vertreter sind aufgeführt und jeweils ein repräsentatives Mitglied dargestellt. (Abb. nach Andersen et al., 2001)

Die Phosphatase-Domäne umfasst einen Bereich von ca. 280 Aminosäureresten, die das Signaturmotiv umgeben, und weist eine Homologie von 30-40% innerhalb der PTPase-Familie auf (Andersen et al., 2001; Hooft van Huijsduijnen, 1998). Alle Mitglieder der PTPase-Familie nutzen den selben Katalysemechanismus, bei dem der invariante Cysteinrest

des Signaturmotivs einen nukleophilen Angriff auf die Phosphatgruppe des Substrats ausführt und diese während der Katalyse kurzzeitig kovalent bindet (Guan and Dixon, 1991), wobei das benachbarte Arginin an der Substratbindung und der Stabilisierung des Phosphoenzym-Intermediats beteiligt ist (Zhang et al., 1994b). Zusätzlich spielt ein invarianter Aspartatrest während der Katalyse eine entscheidende Rolle. Zuerst führt dieser als Säure zur Protonierung der abzuspaltenden Phenolatgruppe des Substrats, und anschließend als Base, durch Aktivierung eines Wassermoleküls, zur Einleitung der Hydrolyse des Cysteinyl-Phosphat-Intermediats (Denu et al., 1996; Jia et al., 1995; Pannifer et al., 1998). Die Spezifität der katalytischen Domäne für die Dephosphorylierung von Tyrosinresten wird durch ein Tyrosin in der katalytischen Spalte bestimmt, welches die Tiefe der Spalte in einer nur für Tyrosinreste zugänglichen Weise definiert.

Die Eigenschaften des katalytischen Zentrums haben zur Entwicklung von Mutanten geführt, die als sogenannte „Substratfänger“ bezeichnet werden. Diese Mutanten besitzen keine oder nur eine stark eingeschränkte PTPase-Aktivität, wobei die Substratbindungseigenschaften erhalten bleiben (Flint et al., 1997; Garton et al., 1996). Solche Eigenschaften weisen z.B. Mutanten auf, bei denen das katalytische Cystein zu Serin oder das invariante Aspartat zu Alanin ausgetauscht wurde. Diese „Substratfänger“ können aufgrund ihres beeinträchtigten Substratumsatzes und ein dadurch stabilisiertes Intermediat die Möglichkeit bieten, Enzym-Substrat-Komplexe zu präzipitieren und zu identifizieren.

### **1.1.1 Rezeptor-ähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Die transmembranen RPTPasen lassen sich in 8 Klassen (R1-8) unterteilen. Sie sind durch einen extrazellulären Teil, der verschiedene Strukturdomänen besitzen kann und häufig stark glykosyliert ist, eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären Anteil mit zwei, in wenigen Fällen nur einer PTP-Domäne, gekennzeichnet (Abb.1). Von den beiden PTPase-Domänen ist lediglich die membranproximale D1-Domäne signifikant aktiv, während die distale D2-Domäne nicht oder nur schwach aktiv ist und ihre Funktion in einigen Fällen auf der Regulation der D1-Domäne bzw. der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beruht (Pulido et al., 1995; Serra-Pages et al., 1995; Streuli et al., 1990). Die extrazelluläre Strukturierung liefert einen Hinweis auf eine mögliche Bindung von Liganden.

CD45 ist der repräsentative Vertreter der Klasse R1 der RPTPasen. Sie ist in ihrer Expression auf das hämatopoetische System beschränkt (Charbonneau et al., 1988; Thomas et al., 1985).

Der extrazelluläre Bereich weist zwei Spektrin-ähnliche sowie eine Fibronectin III (FN III)-ähnliche Domäne auf (Fang et al., 1994).

Die Klasse R2A der RPTPasen ist durch eine Kombination von Immunglobulin (Ig)-ähnlichen und FN III-ähnlichen Domänen im Extrazellulärbereich gekennzeichnet. Solche Strukturmerkmale sind für Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. N-CAM (neuronal cell adhesion molecule) (Cunningham, 1995; Williams and Barclay, 1988) charakteristisch. Dieser Gruppe gehören unter anderem LAR (Pot et al., 1991; Streuli et al., 1988), PTP $\delta$  (Krueger et al., 1990; Mizuno et al., 1993) und PTP $\sigma$  (Walton et al., 1993; Yan et al., 1993; Zhang et al., 1994a) an, wobei LAR den Prototypen dieser Klasse darstellt. LAR wird an der Zelloberfläche als Protein aus zwei nicht kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten exprimiert, das durch proteolytische Spaltung eines Vorläufermoleküls entsteht (Streuli et al., 1992; Yu et al., 1992).

PTP $\mu$  und PTP $\kappa$  (Gebbink et al., 1991; Zondag et al., 1995) bilden die Klasse R2B der RPTPasen, die sich von der Klasse R2A lediglich durch eine charakteristische N-terminale MAM-Domäne neben einer Ig- und vier FN III-ähnlichen Domänen unterscheidet. MAM-Domänen sind in einer Reihe Zelladhäsionsmolekülen zu finden (Beckmann and Bork, 1993). Über diese Domänen können beide Phosphatasen homophile Bindungen eingehen, die zu Zellaggregationen führen (Brady-Kalnay and Tonks, 1994; Gebbink et al., 1993; Sap et al., 1994). Ein weiteres Charakteristikum dieser Klasse ist eine Cadherin-ähnliche Domäne im Juxtamembranbereich.

Der extrazelluläre Bereich von Klasse R3 RPTPasen ist ausschließlich aus FN III-ähnlichen Domänen unterschiedlicher Anzahl zusammengesetzt. Zudem besitzen die Mitglieder dieser Klasse lediglich eine intrazelluläre PTP-Domäne. Dieser Klasse werden PTP $\beta$  (Krueger et al., 1990), DEP-1 (Ostman et al., 1994), SAP-1 (Matozaki et al., 1994) und Glepp1 (Wiggins et al., 1995) zugeordnet.

Lediglich kurze, jedoch stark glykosylierte extrazelluläre Bereiche ohne erkennbare Strukturhomologien kennzeichnen die Klasse R4 der RPTPasen, welche durch PTP $\alpha$  (Krueger et al., 1990) und PTP $\epsilon$  (Matthews et al., 1990) repräsentiert wird.

Das charakteristische Merkmal für die Klasse R5 RPTPasen, die aus PTP $\gamma$  (Barnea et al., 1993; Kaplan et al., 1990) und PTP $\zeta/\beta$  (Kaplan et al., 1990; Krueger and Saito, 1992; Levy et al., 1993) besteht, ist neben einem FN III-ähnlichen Bereich eine extrazelluläre Domäne, welche zu dem Enzym Carboanhydrase homolog ist. Es wird angenommen, dass diese Domäne Wechselwirkungen mit Tenascin, einem extrazellulären Matrixprotein, sowie



Zelladhäsionsproteinen vermittelt (Barnea et al., 1994a; Barnea et al., 1994b; Maurel et al., 1994).

Vertreter der Klassen R7 sind z.B. PTP-STEP (Lombroso et al., 1991) und HePTP (Adachi et al., 1992), welche jeweils nur eine intrazelluläre PTP-Domäne und einen sehr kurzen extrazellulären Bereich besitzen. Neben den RPTP-Formen existieren zudem eine Reihe intrazellulärer Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Ferner wird durch Proteolyse dieser intrazellulären Formen ihre Lokalisation reguliert (Nguyen et al., 1999; Sharma and Lombroso, 1995).

Bei den ähnlich aufgebauten Klasse R8 Phosphatasen, wie z.B. PTP-I2A (Lan et al., 1994), ist der extrazelluläre Bereich im Vergleich zu R7-PTPasen länger und zudem durch RDGS-Adhäsions-Erkennungsmotiv gekennzeichnet.

### **1.1.2 Intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Die intrazellulären PTPasen werden in 9 Klassen (NT1-9) eingeteilt (Abb. 1). Im Gegensatz zu den RPTPasen besitzen alle Vertreter nur eine PTP-Domäne. Zusätzlich zum katalytischen Teil besitzen intrazelluläre PTPasen unterschiedliche Struktur motive, die Homologien zu anderen zytosolischen Proteinen oder Domänen aufweisen und in der Regel Proteininteraktionen oder Lokalisationen bestimmen.

PTP1B und TC-PTP, welche eine 75%ige Homologie innerhalb der katalytischen Domäne aufweisen, bilden die Klasse NT1 der intrazellulären PTPasen (Brown-Shimer et al., 1990; Chernoff et al., 1990; Cool et al., 1989; Guan et al., 1990). Beide besitzen neben der N-terminalen klassischen PTP-Domäne eine C-terminale regulatorische Sequenz. Durch diese in ihrer Hydrophobizität zu typischen Transmembrandomänen vergleichbaren Sequenz wird PTP1B auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran verankert (Frangioni et al., 1992; Woodford-Thomas et al., 1992). Zwischen der PTP-Domäne und der Lokalisationssequenz für die ER-Membran befindet sich ein Abschnitt von 100 Aminosäuren, der einige Phosphorylierungsstellen enthält (Flint et al., 1993; Schievella et al., 1993; Shifrin et al., 1997), sowie eine prolinreiche Sequenz, welche SH3-Domänen binden kann (Liu et al., 1996). Die TC-PTP existiert in zwei verschiedenen Spleißvarianten, die die gleiche PTP-Domäne, jedoch unterschiedliche C-Termini aufweisen. TC48 besitzt einen ähnlichen C-Terminus wie PTP1B und lokalisiert im selben zelluläre Kompartiment, wogegen bei TC45 der hydrophobe C-Terminus durch eine Hexapeptidsequenz ersetzt ist. Hierdurch wird eine

Kernlokalisationssequenz verfügbar, welche TC45 im Grundzustand in den Nukleus dirigiert (Ibarra-Sanchez et al., 2000).

Die Klasse NT2 der intrazellulären PTPasen besteht aus den beiden nahe verwandten Vertretern Shp-1 (Matthews et al., 1992; Shen et al., 1991; Yi et al., 1992) und Shp-2 (Feng et al., 1993; Freeman et al., 1992; Vogel et al., 1993). Beide besitzen den gleichen Aufbau aus zwei N-terminalen SH2-Domänen, einer PTP-Domäne und einem C-Terminus mit zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen. Letztere sind im Falle von Shp-2 noch von einer prolinreichen Domäne umgeben. SH2-Domänen vermitteln eine Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste innerhalb bestimmter Sequenzen (Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1994) und sind häufige Strukturmerkmale von Proteinen, die in Signalkaskaden beteiligt sind.

Der Gegenstand dieser Arbeit, PTP-Meg2, ist der bis jetzt einzig bekannte Vertreter der Klasse NT3. PTP-Meg2 wurde ursprünglich aus Megakaryozyten kloniert (Gu et al., 1992). Ihre Einzigartigkeit verdankt PTP-Meg2 der N-terminalen CRALBP-Domäne, welche keine der bisher bekannten Phosphatasen besitzt. Diese Domäne weist eine hohe Homologie zum Zellulären Retinalaldehyd-Bindungsprotein sowie zu Sec14p, einem Lipidaustauscherprotein der Hefe, auf. Die Funktion dieser Domäne sowie der PTPase überhaupt ist gänzlich unbekannt.

Intrazelluläre Phosphatasen wie PTP-PEST (Yang et al., 1993) und die im Nukleus lokalisierte PEP (LyPTP) (Flores et al., 1994; Matthews et al., 1992) bilden die Klasse NT4 und zeichnen sich durch eine sogenannte PEST (Pro-Glu-Ser-Thr)-Sequenz aus, welche in anderen Proteinen zu einer erhöhten Degradation führt (Rogers et al., 1986). Die Funktion dieses Motivs in PTPasen ist noch nicht geklärt. Vertreter der Klassen NT8 und 9 besitzen neben der PEST-Sequenz noch weitere Strukturmerkmale.

Die Klassen NT5-7 der intrazellulären PTPasen zeichnen sich durch FERM- und PDZ-Domänen aus. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem PTPH1 (Yang and Tonks, 1991), PTP-Meg1 (Gu et al., 1991), PTPD1 (Moller et al., 1994) und PTP-BAS (Banville et al., 1994). Die ca. 320 Aminosäuren lange FERM-Domäne weist Homologien zu Proteinen auf, die an Aufbau und Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind, so z.B. Ezrin, Radixin und Talin. Die in unterschiedlicher Anzahl vorliegenden PDZ-Domänen vermitteln Interaktionen mit anderen Proteinen.

## 1.2 Protein-Tyrosin-Kinasen

Tyrosin-spezifische Proteinkinasen sind wie Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen weitverbreitete Werkzeuge der intrazellulären Signalleitung. Sie bilden eine der größten Familien homologer Proteine und verfügen über einen gemeinsamen, ATP-abhängigen enzymatischen Mechanismus der Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste von Substraten (Hanks and Hunter, 1995). Wie auch bei den PTPasen unterscheidet man aufgrund von Strukturmerkmalen transmembrane Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKn) und intrazelluläre PTKn.

### 1.2.1 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

RTKn bestehen aus einem extrazellulären Bereich, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Bereich. Als funktionelle Zelloberflächen-Rezeptoren setzen RTKn externe Stimuli wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in intrazelluläre Signalkaskaden um. Auf Grund der Strukturdiversität ihres aminoterminalen, extrazellulären Bereichs, der zur Ligandenbindung dient, werden RTKn derzeit in 19 verschiedene Subfamilien eingeteilt (zur Übersicht siehe van der Geer et al., 1994). Der intrazelluläre Teil lässt sich in eine Juxtamembrandomäne, eine hochkonservierte Kinasedomäne und eine C-terminale Domäne unterteilen.

Eine sehr bedeutende Subfamilie stellt die EGFR-Familie dar, deren extrazellulärer Bereich durch zwei cysteinreiche Domänen gekennzeichnet ist. Die vier Mitglieder dieser Familie, nämlich EGFR, HER2, HER3 und HER4, regulieren ein komplexes Signalnetzwerk, das von der Regulation der Zellteilung bis hin zu Zelltod, Zellbewegung und Adhäsion reicht. Dieses Netzwerk ist häufig dereguliert, wodurch diese Rezeptorfamilie bei der Entstehung bzw. Progression einer Reihe von Krebsarten, so vor allem Brustkrebs, eine wichtige Rolle spielt (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Als Folge der extrazellulären Ligandenbindung kommt es zur Bildung bzw. Stabilisierung von Rezeptor-Dimeren. Dabei können sowohl Homo- als auch Hetrodimere innerhalb einer RTK-Familie beobachtet werden (Schlessinger, 2000; Schlessinger and Ullrich, 1992; Ullrich and Schlessinger, 1990). Die Dimerisierung bewirkt eine Stimulation der intrinsischen Kinaseaktivität sowie die Autophosphorylierung an Tyrosinresten, die sich vor allem in der C-terminalen Region des Rezeptors befinden. Hierdurch entstehen Bindungsstellen, an welche Effektorproteine über ihre SH2- oder PTB-Domänen binden können. Die Assoziation von

Signalproteinen an ihre Rezeptoren kann jedoch auch unabhängig von solchen Domänen erfolgen. Die mit dieser Rekrutierung verbundene Translokation an die Membran, konformationelle Änderung oder Phosphorylierung der Effektorproteine gewährleistet letztendlich deren Aktivierung und eine Weiterleitung des Signals (Schlessinger, 2000).

Obwohl der Mechanismus der Signalweiterleitung durch RTKs hochkonserviert ist, wird eine Spezifität der unterschiedlichen aktivierten Signalkaskaden und damit eine Diversität der zellulären Antwort gewährleistet. Dies geschieht einerseits durch die Spezifität der Liganden-Rezeptor-Interaktion sowie durch das große Repertoire der Adapter- und Signaltransduktionsmoleküle, die an eine aktivierte RTK rekrutiert werden. Zum anderen tragen die Intensität des biochemischen Signals und gewebespezifische Signalmoleküle zu einer Diversität der zellulären Antwort bei.

### **1.2.2 Intrazelluläre Tyrosin-Kinasen**

Intrazelluläre Tyrosin-Kinasen beinhalten membranassoziierte, zytoplasmatische und nukleäre Proteine. Ebenso wie RTKs sind sie an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt, die Proliferation, Wachstum, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte regulieren. Intrazelluläre Tyrosin-Kinasen sind häufig an der Übertragung externer Signale in das Zellinnere beteiligt. Diese Signalübertragung erfolgt dabei meist durch Assoziation mit Transmembranrezeptoren ohne eigene Kinaseaktivität, wie z.B. Integrine, Zytokin-, oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Abram and Courtneidge, 2000; Cary et al., 1999; Parsons et al., 2000; Porter and Vaillancourt, 1998; Schlaepfer and Hunter, 1998).

Die meisten intrazellulären Tyrosin-Kinasen verfügen neben einer Kinase-Domäne, mit Ausnahme der Janus-Kinasen, die derer zwei besitzen, über zusätzliche Sequenzen, die Interaktionen mit anderen Proteinen oder Lokalisation regulieren. So finden sich in Kinasen der Src-Familie (Src, Fyn, Yes, Lck) sowie bei Csk und Abl SH2- und SH3-Domänen. Andere Tyrosin-Kinasen wie Syk und Fps besitzen dagegen lediglich SH3-Domänen, die an prolinreiche Sequenzen von Zielproteinen binden.

Die Aktivität intrazellulärer Tyrosin-Kinasen unterliegt unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Einen sehr häufigen Mechanismus zur Aktivierung der Kinase-Aktivität stellt die intermolekulare Phosphorylierung durch andere Kinasen oder die Autophosphorylierung dar. Tyrosinphosphorylierungen können jedoch auch inhibitorisch wirken, wie am Beispiel der Src-Kinase deutlich wird (Bjorge et al., 2000). Außerdem ist eine Aktivierung der Tyrosin-Kinasen oft von deren subzellulären Lokalisation abhängig. Kinasen der Src-Familie

sind z.B. durch N-terminale Myristoylierung an die Plasmamembran gebunden, wodurch sie erst in die Nähe ihrer Aktivatoren gebracht werden (Resh, 1994). Ein weiteres Beispiel stellt die Tyrosin-Kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) dar, welche ausschließlich an Kontaktpunkten zwischen Zellen mit der extrazellulären Matrix lokalisiert ist (Schlaepfer et al., 1999).

### 1.3 MAP-Kinase (MAPK)-Kaskaden

Nach der Stimulation von RTK<sub>n</sub> spielt die Aktivierung von sogenannten MAP-Kinase-Kaskaden eine zentrale Rolle für die Regulation von Überleben, Migration und mitogenen Prozessen (Cobb and Goldsmith, 1995; Kyriakis and Avruch, 2001). Zentrale Komponenten dieser Kaskaden sind drei Kinasen und deren sequentielle Aktivierung (Schaeffer and Weber, 1999; Whitmarsh and Davis, 1998). Dabei phosphoryliert eine MAPKKK (MAPKK-Kinase oder MEKK) eine MAPKK (MAPK-Kinase oder MEK), welche wiederum eine MAPK (Mitogen-aktiviert Protein-Kinase) aktiviert. Die MAPK ihrerseits reguliert direkt Transkriptionsfaktoren und somit die Genexpression. Mit dem ERK-, JNK/SAPK- und p38-Weg sind drei MAPK-Wege bekannt.

Die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation von RTK<sub>n</sub> ist die wichtigste und am besten untersuchte MAPK-Kaskade. Dabei kommt es zunächst zu der Grb2/Sos vermittelten Aktivierung der membranständigen kleinen GTPase Ras durch einen GDP/GTP-Austausch (Downward, 1997). Dadurch erhöht sich die Affinität von Ras zu der MAPKKK Raf, die somit an die Membran rekrutiert und aktiviert wird (Morrison and Cutler, 1997). Raf aktiviert anschließend die beiden dualspezifischen Kinasen MEK1 und MEK2 durch Phosphorylierung an Serinresten. Diese phosphorylieren nachfolgend ERK1/2 an einem Threonin und Tyrosin im regulatorisch wichtigen TEY-Motiv, was deren Translokation in den Nukleus bewirkt und zur Phosphorylierung diverser Transkriptionsfaktoren führt (Su and Karin, 1996). Erk1/2 kann ferner eine Reihe zytosolischer und membrangebundener Proteine, wie Signalmoleküle oder Komponenten des Zytoskeletts, phosphorylieren (Cobb et al., 1991).

Während für die Aktivität von MAPK<sub>n</sub> die Phosphorylierung des Threonin- und Tyrosinrestes erforderlich ist, ist für eine Inaktivierung die Dephosphorylierung nur eines Restes ausreichend. An der Inaktivierung von MAPK können drei verschiedene Phosphatase-Klassen beteiligt sein, die dualspezifischen Phosphatasen, Serin/Threonin-Phosphatasen sowie PTPasen.

## 1.4 Regulation der Spezifität und Aktivität von Protein-Tyrosin-Phosphatasen

PTPasen besitzen eine hohe Substratspezifität, nicht nur für bestimmte phosphorylierte Proteine und nicht-Protein Substrate, sondern in einigen Fällen auch für spezifische Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Substrats. Diese Spezifität wird nicht nur von Strukturmotiven, sondern in großem Maße auch von der PTP-Domäne gewährleistet. Während Struktur motive die Lokalisation von PTPasen steuern bzw. bestimmte Sequenzen eines Substrates erkennen und daran binden, tragen PTP-Domänen über molekulare Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten zur Spezifität für ein bestimmtes Substrat bei. So unterscheiden sich stark homologe PTPasen, wie z.B. Shp-1 und Shp-2 oder PTP1B und TC-PTP, die zudem auch den gleichen strukturellen Aufbau besitzen, stark in ihrer Substratspezifität (zur Übersicht siehe Tonks and Neel, 2001).

Neben der Lokalisation von PTPasen kann eine Reihe weiterer Mechanismen zu einer Modulation der spezifischen Phosphataseaktivität beitragen. Ein häufiger Mechanismus dabei ist die Phosphorylierung. Serin-/Threonin-spezifische Phosphorylierungen können die PTPase-Aktivität negativ sowie positiv beeinflussen. So kann PTP-PEST an zwei Serinresten phosphoryliert werden. Während eine Phosphorylierung an Ser435 die Aktivität reduziert, führt eine Phosphorylierung an Ser30 zu einer Delokalisation in Endosomen (Garton and Tonks, 1994). Beide Phosphorylierungen werden dabei durch PKA und PKC vermittelt. Ebenso führt bei PTP1B eine Phosphorylierung an zwei Serinresten (Ser286 und Ser352) zu einer reduzierten Aktivität (Flint et al., 1993). Auch für CD45 wurde eine Modulation der Aktivität durch Serinphosphorylierung beschrieben (Wang et al., 1999). Für einige PTPasen, so z.B. PTP1B (Liu and Chernoff, 1997) und Shp-1 (Uchida et al., 1994), wurde eine Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung, die durch den EGF-Rezeptor bzw. Insulin vermittelt wird, beschrieben. Durch Tyrosinphosphorylierungen der PTPasen können zudem Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen entstehen. So wird Shp-2 über ihre SH2-Domäne an den aktivierten PDGF-Rezeptor rekrutiert und tyrosinphosphoryliert, wodurch eine Bindungsstelle für das Adaptorprotein Grb2 entsteht (Bennett et al., 1994). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für PTP $\alpha$  nachgewiesen (den Hertog et al., 1994; Su et al., 1994).

Eine andere Möglichkeit zur Negativkontrolle der Aktivität von PTPasen ist die reversible Oxidation des katalytischen Cysteins durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Barrett et al., 1999; Denu and Tanner, 1998; Meng et al., 2002). So wurde unter anderem gezeigt, dass die Liganden-spezifische Aktivierung des EGF- bzw. PDGF-Rezeptors zur lokalen Produktion von Peroxid über einen

PI3-Kinase-abhängigen Weg führt (Bae et al., 1997; Bae et al., 2000). Eine reversible Inhibition durch  $H_2O_2$  ist für verschiedene PTPasen beschrieben (Blanchetot et al., 2002; Lee et al., 1998).

Die strukturelle Variabilität von RPTPasen lässt vermuten, dass sie selektiv mit Liganden interagieren, was möglicherweise unter anderem ihre Aktivität reguliert. In der Tat wurden einige RPTP-Liganden identifiziert. So wurde für RPTP $\zeta/\beta$ , die an der Oberfläche von Gliazellen lokalisiert ist, gezeigt, dass die Bindung des löslichen Liganden Pleiotrophin zur Inaktivierung führt, woraus eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin resultiert (Meng et al., 2002). Für DEP1 wurde eine Stimulation der Aktivität durch Matrigel, einer Präparation aus Proteinen der extrazellulären Matrix, gezeigt (Sorby et al., 2001). Bestimmte RPTPasen gehen homophile Bindungen ein, d.h. sie erkennen ein anderes Molekül des selben Proteins auf einer benachbarten Zelle (Brady-Kalnay and Tonks, 1994). Auch hier wäre neben der möglichen Kontrolle von auf Zellkontakten basierenden Phänomenen eine Regulation der Aktivität denkbar.

Einige Daten schlagen vor, dass manche RPTPasen über Dimerisierung inhibiert werden können. Dieser Art der Regulation, welche hauptsächlich an PTP $\alpha$  untersucht wurde (Bilwes et al., 1996; Jiang et al., 2000; Jiang et al., 1999), stellt jedoch wahrscheinlich keinen universellen Mechanismus dar.

Wie eine Vielzahl anderer Proteine könne PTPasen auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Hierdurch kann eine spezifische PTPase-Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt, der durch externe Stimuli oder entwicklungspezifisch bestimmt wird, verfügbar gemacht werden. So wurde für LAR, DEP1 und PTP $\sigma$  eine erhöhte Transkription mit zunehmender Zelldichte gezeigt (Celler et al., 1995; Longo et al., 1993; Ostman et al., 1994). Auch die induzierte Differenzierung von neuronalen oder hämatopoetischen Zellen führt zur erhöhten Expression einiger PTPasen (Bhoola and Hammond, 2000; den Hertog, 1999; den Hertog et al., 1999; Seimiya and Tsuruo, 1998; Taniguchi et al., 1999; Van Vactor, 1998).

## 1.5 Biologische Funktion von Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Für eine lange Zeit wurde angenommen, dass PTPasen lediglich eine unbedeutende Rolle als sogenannte „Haushaltsproteine“ spielen. Über die letzten Jahre wurde jedoch deutlich, dass PTPasen in der Regulation von Signaltransduktionsprozessen eine ebenso bedeutende Rolle spielen, wie PTKn und als deren Gegenspieler agieren. So sind PTPasen eminent wichtig für

die Regulation von Proliferation, Zelladhäsion und -migration, Entwicklung und Differenzierung.

### 1.5.1 Regulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und mitogener Signaltransduktion

Prinzipiell können PTPasen die Signaltransduktion von RTKn positiv sowie negativ beeinflussen. Eine positive Rolle wurde für Shp-2 nachgewiesen. So zeigen Shp-2<sup>-/-</sup>-Fibroblasten nur eine eingeschränkte Reaktion auf unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, FGF, IGF-1 und PDGF (Saxton et al., 1997; Shi et al., 1998), sowie eine defekte Integrin-Signaltransduktion (Oh et al., 1999; Saxton et al., 2000; Yu et al., 1998). Shp-2<sup>-/-</sup>-Mäuse sind zudem embryonal letal. Ferner ergaben genetische Analysen, dass Shp-2 eine positive Komponente des EGFR-Signalweges ist (Chen et al., 2000; Qu et al., 1999). Zudem blockiert die Expression katalytisch inaktiver Shp-2-Mutanten die durch Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung des Erk-Signalwegs (zur Übersicht siehe Neel and Tonks, 1997). Im Gegensatz dazu ist Shp-1, die in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, in der Regel ein negativer Regulator von Signalwegen. Dabei wird Shp-1 meist über ihre SH2-Domänen zu relevanten Rezeptoren, so z.B. dem Erythropoetin-Rezeptor (Klingmuller et al., 1995; Yi et al., 1995) oder Ros, rekrutiert. Eine generelle Funktion von Shp-1 scheint dabei die Inaktivierung von Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen zu sein. Ebenso reguliert Shp-1 die Signalkaskaden von Integrinen und sogenannten „inhibitorischen“ Rezeptoren (z.B. CD22) negativ (Ravetch and Lanier, 2000). Die meisten Hinweise zur Funktion von Shp-1 wurden durch Analysen zweier natürlich vorkommender Nullmutationen in Mäusen, den sogenannten *motheaten* (*me/me*) und *motheaten viable* (*me<sup>v</sup>/me<sup>v</sup>*) Phänotypen, erhalten. Mäuse dieser Phänotypen weisen ein ganzes Set hämatopoetischer Abnormalitäten auf (Tsui and Tsui, 1994).

Sehr gut untersucht ist die Regulation von RTKn durch TC-PTP und PTP1B. So interagieren TC48 und TC45 mit dem EGF-Rezeptor und TC45 mit p52Shc (Tiganis et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass TC45 PI3-Kinase-abhängige Signalwege des EGF-Rezeptors reguliert, jedoch nicht den Erk-Signalweg (Tiganis et al., 1999). Für PTP1B wurde eine Assoziation mit dem EGF-Rezeptor gezeigt, welche zu einer reduzierten EGFR-Phosphorylierung führt (Flint et al., 1997). Entsprechend zeigen PTP1B<sup>-/-</sup>-Fibroblasten eine erhöhte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors, aber auch des PDGF-Rezeptors. Trotz dieser Hyperphosphorylierung beider Rezeptoren konnte jedoch keine Änderung der Erk- bzw. Akt-



Aktivitäten detektiert werden. So weisen PTP1B<sup>-/-</sup>-Mäuse ebenfalls keine Anzeichen einer erhöhten EGFR- und/oder PDGFR-Phosphorylierung auf (Tonks and Neel, 2001). Das physiologisch relevante Substrat der PTP1B scheint der Insulin-Rezeptor (IR) zu sein. PTP1B<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen erhöht phosphorylierten IR in Leber und Muskel, sowie Insulin-sensitivität und Resistenz für eine Fett-Diät induzierte Fettleibigkeit (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000).

Für die drei RPTPasen LAR, PTP $\alpha$  und PTP $\epsilon$  wurde ebenfalls eine regulatorische Funktion im IR-Signalweg postuliert. Die Daten sind dabei für LAR am meisten überzeugend. So kolokalisiert und assoziiert LAR mit dem IR und reduziert dessen Autophosphorylierung sowie Signaltransduktion (Ahmad and Goldstein, 1997; Hashimoto et al., 1992; Li et al., 1996; Zhang et al., 1996). Eine durch Antisense-RNA verminderte LAR-Expression führt zudem zu einer erhöhten Phosphorylierung des Insulin-, EGF- und HGF-Rezeptors (Kulas et al., 1996; Kulas et al., 1995).

Für die zwei PTPasen PTP-SL und PTP-STEP wurde gezeigt, dass sie selektiv an Erk1/2 binden und diese inaktivieren (Pulido et al., 1998). Die Bindung von Erk1/2 erfolgt hierbei über die sogenannte KIM (Kinase Interaction Motif)-Dömannen der PTP-SL und wird durch deren PKA-abhängige Phosphorylierung reguliert (Blanco-Aparicio et al., 1999). Kürzlich wurde auch die Regulation von Erk5 durch PTP-SL beschrieben (Buschbeck et al., 2002).

## 1.5.2 Regulation von Zelladhäsion und Zellmigration

Die Zellmigration und -adhäsion ist ein äußerst wichtiger Prozess während der Embryogenese sowie bei Ereignissen wie Wundheilung und Entzündungsprozessen. Dazu ist eine streng kontrollierte Reorganisation des Zytoskeletts sowie ein schneller Auf- und Abbau von Zellkontakten mit der extrazellulären Matrix notwendig. Zell-Matrix-Kontakte werden über Tyrosin-phosphorylierung reguliert, wobei eine reduzierte Phosphorylierung zum Abbau, eine erhöhte Phosphorylierung zum Aufbau dieser Verbindungen führt (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Integrine stellen die wesentlichen Rezeptoren der Adhäsionspunkte mit der zellulären Matrix dar. Durch ihre Aktivierung kommt es zum phosphorylierungsabhängigen Aufbau eines großen Signalkomplexes, bestehend aus FAK, Src-Kinase, und Cas, der die Zytoskelettorganisation und mitogene Signalwege beeinflusst (Schlaepfer et al., 1999; Schlaepfer and Hunter, 1998).

Für die Bildung von Zell-Matrix-Kontakten spielt die Src-Kinase eine entscheidende Rolle. Die Überexpression von PTP $\alpha$  führt zu einer Aktivierung von Src (den Hertog et al., 1993;

Zheng et al., 2000; Zheng et al., 1992). In PTP $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass der Verlust von PTP $\alpha$  die Aktivität von Src und der verwandten Fyn-Kinase reduziert. Dieser Effekt wird von einer erhöhten Phosphorylierung des inhibitorischen Tyrosins beider Kinasen begleitet. Ähnliches wurde in PTP $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Geweben beobachtet (Ponniah et al., 1999; Su et al., 1999). Diese Regulation von Src durch PTP $\alpha$  führt zu entsprechenden Effekten auf Zell-Matrix-Kontakte (Harder et al., 1998).

Auch für PTP1B wurde eine direkte Regulation der Src-Aktivität vorgeschlagen (Arregui et al., 1998). So verursacht die Überexpression einer katalytisch inaktiven Form in Mausfibroblasten ein vermindertes Anhaften der Zellen an Fibronectin und eine reduzierte Zahl der Zell-Matrix-Kontakte. Jedoch konnte kein Einfluss auf die Phosphorylierung von Src-Substraten in diesen Kontaktstellen festgestellt werden. Konträr zu diesen Daten wurde eine Beteiligung von PTP1B bei der Regulation der Zellmigration postuliert (Liu et al., 1998). In Rattenfibroblasten vermindert die Überexpression von PTP1B den Aufbau des Zytoskeletts sowie von Zell-Matrix-Kontakten. Zudem wurde eine verminderte MAP-Kinase-Aktivität nachgewiesen. Als direktes Substrat von PTP1B konnte Cas identifiziert werden, ein essentielles Protein bei der durch FAK induzierten Zellmigration.

Auch PTP-PEST vermag p130Cas zu dephosphorylieren (Cote et al., 1998; Garton et al., 1996) und dessen Assoziation mit Crk zu vermindern (Garton and Tonks, 1999). Dieser Cas-Crk-Komplex spielt bei der Regulation der Zellmigration eine wichtige Rolle. Jedoch wurde sowohl nach Überexpression von PTP-PEST in Rattenfibroblasten als auch in PTP-PEST<sup>-/-</sup>-Zellen eine Inhibition der Zellmigration beobachtet (Angers-Loustau et al., 1999a; Garton and Tonks, 1999). In PTP1B<sup>-/-</sup>-Fibroblasten sind zudem Komponenten der Zell-Matrix-Kontakte, nämlich Paxillin und FAK, hyperphosphoryliert und die Anzahl dieser Kontakte ist stark erhöht.

Mit Shp-2 wurde eine weitere PTPase identifiziert, die FAK reguliert. So breiten sich Shp-2<sup>-/-</sup>-Zellen langsamer auf Fibronectin aus und zeigen eine verminderte Migration (Yu et al., 1998). FAK ist vermindert Tyrosin-phosphoryliert, die Zahl der Zellkontakte ist stark erhöht und das periphere F-Actin weist eine abnormale Aggregation auf. Jedoch bleibt bis jetzt offen, ob FAK ein direktes Substrat von Shp-2 darstellt.

Nach der Aktivierung von Integrinen durch die extrazelluläre Matrix stellt die GTPase Rho ein zentrales Element bei der Formation von Zell-Matrix-Kontakten sowie Stressfibrillen dar. Es wurde gezeigt, dass PTP-BAS mit PARG1, einem für Rho spezifischen GTPase-aktivierenden Protein (Rho-GAP), interagiert (Saras et al., 1997). Obwohl PARG1 nicht tyrosinphosphoryliert ist und somit kein Substrat für PTP-BAS darstellt, kann PTP-BAS

möglicherweise durch die Bindung des Rho-Aktivators dessen Funktion beim Aufbau von Zell-Matrix-Kontakten und Stressfibrillen inhibieren.

### 1.5.3 Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei der Tumorentstehung

Zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Migration werden entscheidend durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen kontrolliert. Dementsprechend birgt eine Deregulation der RTKn, z.B. durch Überexpression oder erhöhte Aktivität, ein großes onkogenes Potential, das sich in Form von Überproliferation, Tumorentstehung, Invasivität und Metastasierung ausdrücken kann (Blume-Jensen and Hunter, 2001). So stellen ein Drittel aller RTKn sogenannte Onkogene dar (Hunter, 1989). Als wichtige Antagonisten von RTKn kommt dementsprechend eine ebenso wichtige Rolle von PTPasen bei der Tumorentstehung in Betracht.

Die Beteiligung von PTPasen bei der Tumorentstehung wird am Beispiel von PTP $\alpha$  am deutlichsten. So resultiert eine erhöhte Aktivität von PTP $\alpha$  in einer Zelltransformation. Dieser Effekt ist hauptsächlich auf die damit verbundene Aktivierung von Kinasen der Src-Familie zurückzuführen. Eine gezielte Inhibition von PTP $\alpha$  in Tumoren mit erhöhter Src-Aktivität könnte somit als therapeutisches Ziel gelten. Ähnliches könnte ebenso für CD45 gelten, einer in hämatopoetischen Zellen exprimierten RPTPase, welche ebenfalls Src-Familie-Kinasen im Rahmen der T-Zell-Aktivierung positiv reguliert.

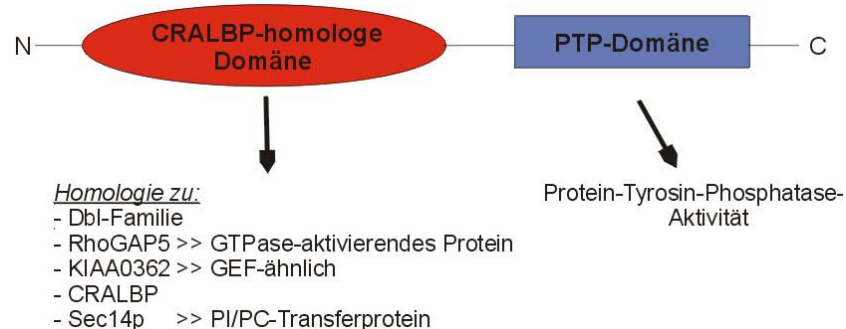
Prinzipiell ist vorstellbar, dass alle PTPasen, die die Signaltransduktion von RTKn negativ regulieren, eine Funktion als Tumorsuppressor besitzen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Regulation von Vertretern der EGFR-Familie sowie des PDGF-Rezeptors, die bei den meisten Brust- und Gehirntumoren hyperaktiv sind. So konnte für TC-PTP gezeigt werden, dass sie die Tumorigenität von Glioblastomzellen, die eine mutierte, hyperaktive Form des EGF-Rezeptors exprimieren, *in vivo* supprimiert (Klingler-Hoffmann et al., 2001). Zudem kann die Expression der TC-PTP die durch v-Fms verursachte Transformation von Zellen unterdrücken (Zander et al., 1993).

Der Verlust der Aktivität von PTPasen, z.B. durch chromosomale Defekte oder Deletionen, könnten prinzipiell die gleichen Folgen haben, wie die konstitutive Aktivierung von RTKn. Daher ist es interessant, dass die Gene einiger PTPasen auf Chromosomenabschnitten liegen, die in Krebszellen häufig deletiert sind. So ist der chromosomale Bereich, auf dem das für PTP $\gamma$  codierende Gen liegt (3p21), in vielen Lungen- und Nierenkarzinomen deletiert (LaForgia et al., 1991). In Normalgeweben erfolgt hingegen eine Expression dieser PTPase.

In gleicher Weise führt ein Verlust des Chromosomenabschnitts 12q12-13, auf dem das Gen für Shp-1 lokalisiert ist, zu einer malignen Transformation von Eosinophilen bzw. zu Leukämie bei Kindern. (Yi et al., 1992). Kürzlich wurde berichtet, dass DEP1 verschiedenen Charakteristika eines Tumorsuppressors besitzt und das dafür codierende Gen *ptprj* in einer Reihe humaner Krebsformen deletiert ist (Ruivenkamp et al., 2002).

## 1.6 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war über PTP-Meg2 sehr wenig bekannt. PTP-Meg2 wurde ursprünglich aus Megakaryozyten kloniert, scheint aber weit verbreitet exprimiert zu werden. Das Gen codiert für ein Protein aus 593 Aminosäuren und einem daraus berechneten Molekulargewicht von 68 kDa (Gu et al., 1992). Aufgrund nicht vorhandener potentieller Signal- und Transmembransequenzen wird eine zytosolische Lokalisation vermutet. Eine gewisse Einzigartigkeit unter den PTPasen verdankt PTP-Meg2 der N-terminalen CRALBP-Domäne, welche keine der bisher bekannten Phosphatasen besitzt (Abb. 2). Diese Domäne weist eine hohe Homologie zum Zellulären Retinaldehyd-Bindungsprotein sowie zu Sec14p, einem Lipidaustauscherprotein der Hefe, auf. Dieser auch Sec14-ähnliche Sequenz genannter Bereich wird zudem in einer Reihe weiterer Proteine, darunter Regulatoren kleiner GTPasen, gefunden (Aravind et al., 1999). Die Funktion der Domäne war zu Beginn dieser Arbeit gänzlich unbekannt. Ihr wurde jedoch eine Funktion als Proteininteraktionsdomäne, als Lipidbindungsdomäne bzw. als Membranlokalisator zugeschrieben.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der PTP-Meg2**

Erläuterungen siehe Text.

Bemerkenswert ist zudem die besondere Struktur des Meg2-Transkripts. So weist die mRNA einen langen, untranslatierten Bereich mit sehr hohem G/C-Gehalt auf (68%), der ein weiteres, aufwärts liegendes AUG-Startcodon enthält (Gu et al., 1992). Weniger als 10% aller

eukaryontischen mRNAs besitzen ein zweites, weiter aufwärts liegendes Startcodon und nur 1-2% besitzen, wie PTP-Meg2, einen untranslatierten Bereich, der größer als 500 Nukleotide ist (Kozak, 1987). Die meisten mRNAs, die solche Merkmale aufweisen, codieren für Proteine, die eine kritische Funktion für Zellwachstum besitzen, wie z.B. Protoonkogene (Kozak, 1987; Kozak, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der PTP-Meg2 in der zellulären Signaltransduktion untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Regulation, die Auswirkung auf biologische Prozesse sowie die Identifikation von Substraten gelegt werden. Von besonderem Interesse war zudem, ob und inwieweit PTP-Meg2 eine Funktion bei der Transformation von Zellen und Prozessen der Tumorentstehung hat.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellen

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG1478 (Tyrphostin)	P. Hirth, SUGEN
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
BES (N, N-Bis(2-Hydroxyl)-2- aminoethansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Biotin-X-NHS	Calbiochem, Bad Soden
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Calyculin A	Calbiochem, Bad Soden
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynucleotide (dNTPs)	Roche, Mannheim
Didesoxynucleotide (ddNTPs)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Genestein	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
GF109203X	LC Laboratories, Grünberg
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma, Taufkirchen
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringssperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Hygromycin A	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Lipofectamin®	Gibco, Eggenstein
Lipofectamin2000™	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
MBP	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Biomol, Haub
MTT (3-(4,5-Dimethyldiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Sternheim
Oligofect™	Invitrogen, Karlsruhe
Okadasäure	Calbiochem, Bad Soden
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein

Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphatidylcholin	Sigma, Taufkirchen
Phosphatidylinositol	Sigma, Taufkirchen
Phosphatidylinositolphosphate (PIPs)	Calbiochem, Bad Soden
PMSF (Phanylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (para-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Sigma, Taufkirchen
Polyfect®	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Qiagen, Hilden
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Taufkirchen
TEMED (N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Serva, Heidelberg
TPA (Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Wortmannin	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	NEB, Schwalbach
	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-Polymerase	Takara, Japan

### 2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$	> 5000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ , $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-Methionin}$	> 1000 Ci/mmol

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

### 2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

ECL-Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart

Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen Nunclon, Dänemark Falcon, U.K.
Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Oktyl-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
PIP-Strips™	Echelon, USA
Poly Prep® Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
PVDF-Membran	Millipor
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Sephadex	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0,22 µm/0,45µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
T7-Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (Maus)	Toyoba, Japan
FGF	Roche, Mannheim
Insulin	Lilly, Gießen
LPA	Sigma, Taufkirchen
PDGF B/B	Roche, Mannheim

### 2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E. coli* Bakterien

LB-Medium: 1,0% Trypton  
0,5% Hefeextrakt  
1,0% NaCl  
pH 7,2

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml

Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem Medium 1,5% Agar zugegeben.



### 2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum wurde von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat

RPMI 1640-Medium, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin

Leibowitz L15-Medium, 10% hitzeinaktiviertes FCS

Modified Eagle Medium (MEM), 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin

Modified Eagle Medium (MEM), 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1x MEM nichtessentielle Aminosäuren

McCoy's 5A Medium, 10% hitzeinaktiviertes FCS

Methioninfreies Medium zur radioaktiven Markierung von Zellen  
MEM (Eagle) mit Earle's Salzen, 2 mM Glutamin, 40  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionin

Einfriermedium  
90% FCS, 10% DMSO

### 2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
			pH 6,96
Denhardt (100x)	2,0	%	Polyvinylpirollidon
	2,0	%	Ficoll
	2,0	%	BSA
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glycerin
	100	mM	EDTA, pH 8,0
Lämmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glycerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	$\beta$ -Mercaptoethanol

MOPS (10x)	200,0 mM	Morpholinopropansulfonsäure
	80,0 mM	Natriumacetat
	10,0 mM	EDTA, pH 8,0 pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	150,0 mM	NaCl
	5,0 mM	EDTA
	50,0 mM	Tris
	0,05 %	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0 %	Formamid
	17,0 %	Formaldehyd
	11,0 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	40,0 mM	Glycin
	20,0 %	Methanol
	0,004 %	SDS
SSC (20x)	3,0 M	NaC
	0,3 M	Natriumcitrat
Strip-Lösung	62,5 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	2,0 %	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol
TAE (10x)	400,0 mM	Tris/Acetat
	10 mM	EDTA pH 8,0 (Eisessig)
TE	10,0 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,1 mM	EDTA, pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1918 mM	Glycin
	1,0 %	SDS

### 2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und der Referenzen aufgeführt.

**2.1.9.1 Bakterienstämme**

<u>Stamm</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
<i>E. coli</i> CJ236	dut <sup>-</sup> , ung <sup>-</sup> , thi <sup>-</sup> , relA <sup>-</sup>	Kunkel, 1985
<i>E. coli</i> DH5αF'	F'/endA1, hsd17, (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44 recA <sup>-</sup> , gyrA, (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) codon plus	F <sup>-</sup> , ompT, hadS <sub>B</sub> , (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), λ T7 RNA-Polymerase-Gen	Stratagene

**2.1.9.2 Zelllinien**

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Referenz</u>
A431	humane Zelllinie eines epidermoiden Karzinom	ATCC CRL-1555
A172	humane Glioblastoma-Zelllinie	ATCC CRL-1620
BT 20	humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-19
BT 549	humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-122
COS 7	Nieren-Zelllinie aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze, SV40 transformiert	ATCC CRL-1651
CHO-K1	Ovarienzellen, Hamster	SUGEN
GPE/X/v-ErbB2	Produktion von retroviralen v-ErbB2-Überständen	W. Rapp. d. AG
GPE/X/Her2	Produktion von retroviralen Her2-Überständen	U. Weiss. d. AG
HBL-100	humane Brustepithel-Zelllinie, Tumor	ATCC HBL-124
HEK 293	humane embryonale Nierenfibroblasten, Transformiert mit Adenovirus Typ V DNA	ATCC CRL-1573
HepG2	humane Hepatokarzinom-Zelllinie	ATCC HB-8065
MCF 7	humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-22
MCF 10A	humane Mammaepithel-Zelllinie	ATCC CRL-10317
MDA-MB 175	humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-25
MDA-MB 231	humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-26

MDA-MB 361	humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-27
MDA-MB 468	humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-132
NIH/3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
Phoenix A	modifizierte HEK 293-Linie zur Produktion von helfervirusfreien, amphotropen Retroviren	Nolan Lab, Stanford
Phoenix E	modifizierte HEK 293-Linie zur Produktion von helfervirusfreien, ecotropen Retroviren	Nolan Lab, Stanford
SKBr3	humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-30
U1242	humane Glioblastoma-Zelllinie	SUGEN
ZR75-1	humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC CRL-1500

Alle nicht aufgeführten Zelllinien entsprechen in Charakterisierungen und Ursprung laut ATCC.

### 2.1.9.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

<u>Antikörper</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
EGFR 108.1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFR	Lax <i>et al.</i> , 1989
EGFR UBI	Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytosolischen Domäne als Fusionsprotein	UBI, Lake Placid
Erk2 C-14	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem C-terminalen Bereich der Ratten-Erk2	Santa Cruz
GST	Kaninchen, polyklonal gegen GST	P. Knyazev, d. AG
GST 4H3	Maus, monoklonal, gegen GST aus <i>S. japonicum</i>	Biomol
JNK C-17	Kaninchen, polyklonal, gegen JNK	Santa Cruz

Meg2 2A9	Ratte, monoklonal, gegen Meg2 als Fusionsprotein	diese Arbeit
Meg2 962	Kaninchen, polyklonal, gegen Meg2 Peptid Position 338-354	diese Arbeit
Meg2 963	Kaninchen, polyklonal, gegen Meg2 als Fusionsprotein	diese Arbeit
P5D4	Maus, monoklonal, gegen Vsv-G	Roche, Mannheim
Pan-Erk	Maus, monoklonal, gegen Position 219-358 von Erk2	PAN
Phospho-Erk	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphoryliertes T202/Y204 von Erk	NEB
Phospho-JNK	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphoryliertes T183/Y185 von Erk	NEB

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert:

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Referenz</u>
Ziege gegen Maus	1:20000	Bio-Rad, München
Ziege gegen Kaninchen	1:40000	Bio-Rad, München
Kaninchen gegen Schaf	1:20000	Dianova
Ziege gegen Ratte	1:10000	Dianova

## 2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.1.10.1 Ausgangsvektoren

<u>Vektor</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Referenz</u>
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , pBR322-ori, Neo <sup>r</sup> , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pcDNA3J-Vsv	pcDNA3 mit Vsv-Epitop zu Expression von C-terminalen Vsv-Fusionsproteinen	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3-EKS und -ESK	pcDNA3 mit Polylinker aus pBS KS II	diese Arbeitsgruppe
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , pBR322-ori, SV40 Promotor, 5'- und 3'-LTR aus MoMuLV,	Miller & Rosman, 1989

pLXSN-EKS und -ESK	pLXSN mit Polylinker aus pBS KS I	diese Arbeitsgruppe
pRK5	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , pBR322-ori, DHFR, CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, USA

### ***2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide***

<u>Plasmid</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Referenz</u>
pBS KS II(+)-Meg2	cDNA der PTP Meg2 in pBS KS II(+)	diese Arbeit
pcDNA3-EGFR	cDNA des humanen EGFR	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3-ESK-Meg2	cDNA der PTP Meg2 in pcDNA3-ESK	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3-ESK-Meg2 C515S	cDNA der PTP Meg2 mit Serin an Position 515	diese Arbeit
pcDNA3-ESK-Meg2 D470A	cDNA der PTP Meg2 mit Alanin an Position 470	diese Arbeit
pcDNA3-GFP	Expressionsplasmid für GFP zur Bestimmung der Transformations-effizienz	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3J-Meg2-Vsv	cDNA der PTP Meg2 mit C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pcDNA3J-Meg2 C515S-Vsv	cDNA der PTP Meg2 mit Serin an Position 515 und C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pcDNA3J-Meg2 D470A-Vsv	cDNA der PTP Meg2 mit Alanin an Position 470 und C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pcDNA3J-Meg2 PD-Vsv	cDNA der Phosphatasedomäne mit C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pcDNA3J-Meg2 CRALBP-Vsv	cDNA der CRALBP-Domäne mit C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pGEX-5-X-1-Meg2	cDNA der PTP Meg2 mit N-terminalem GST	diese Arbeit
pGEX-5-X-1-Meg2 C515S	cDNA der PTP Meg2 mit Serin an Position 515 und N-terminalem GST	diese Arbeit

pGEX-5-X-1-Meg2 D470A	cDNA der PTP Meg2 mit Alanin an Position 470 und N-terminalem GST	diese Arbeit
pGEX-5-X-1-Meg2 PD	cDNA der Phosphatasedomäne und N-terminalem GST	diese Arbeit
pGEX-5-X-1-Meg2 PD C515S	cDNA der Phosphatasedomäne mit Serin an Position 515 und N-terminalem GST	diese Arbeit
pGEX-5-X-1-CRALBP	cDNA der CRALBP-Domäne mit N-terminalem GST	diese Arbeit
pLXSN-EGFR	cDNA des humanen EGFR	diese Arbeitsgruppe
pLXSN-Meg2-Vsv	cDNA der PTP Meg2 mit C-terminalem Vsv	diese Arbeit
pLXSN-Meg2 C515S Vsv	cDNA der PTP Meg2 mit Serin an Position 515 und C-terminalem Vsv	diese Arbeit

### 2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide

Nachfolgende Sequenzen sind in 5' > 3' Richtung angegeben.

<u>Sequenz</u>	<u>Name</u>
AGGAAGGGACACCATAGGCTGGCCAGCTCAAGAAGCTGGAA Zur Mutagenese und Herstellung der katalytisch beeinträchtigten Meg2 D470A Mutante	AW13
TGTCCTGCCAATGCCTGCACTGCTATGGACCACAATGGGGTG GCTC Zur Mutagenese und Herstellung der katalytisch inaktiven Meg2 C515S Mutante	Jens1
CGGAATTCGCCACCATGGGCCACCCAGATCCCTTCGATG 5'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 und CRALBP- Domäne in pcDNA3J-Vsv	AW8
GCTCTAGACTGACTCTCCACGGCCAGCA 3'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 und Meg2 PD-Domäne in pcDNA3J-Vsv	AW6
GCGAATTCGGTGGTGAGCCCGCGACCGCGCCCCG 5'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 und CRALBP-Domäne in pGEX-5-X-1	AW32

GCCTCGAGCTGACTCTCCACGGCCAGCA 3'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 und Meg2 PD-Domäne in pGEX-5-X-1	AW15
CGGAATTCGGTGGTGTGGACTATGTTAATGCCAGGC 5'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 PD-Domäne in pGEX-5-X-1	AW31
CGGAATTCGCCACCATGGGCCACCCAGATCCCTTCGATG 5'-Oligonukleotid zur Umklonierung der Meg2 PD-Domäne in pcDNA3J-Vsv	AW7
GCCTCGAGGTCTAAGGCAGGAGGGAGGGAG 3'-Oligonukleotid zur Umklonierung der CRALBP-Domäne in pGEX-5-X-1	AW33
GCTCTAGAGTCTAAGGCAGGAGGGAGGGAG 3'-Oligonukleotid zur Umklonierung der CRALBP-Domäne in pcDNA3J-Vsv	AW34
GGCTACCAAGCAGTTTCTCG 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation von Meg2 in der Light Cycler Real Time PCR	LC/Meg2/fwd1
ATTCTATGGCACGGAGCACA 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation von Meg2 in der Light Cycler Real Time PCR	LC/Meg2/rev1
CACCACATGCTTGCCATCC 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation von Zyklophilin A in der Light Cycler Real Time PCR	CycloB
CCGCGTCTCCTTTGAGCT 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation von Zyklophilin A in der Light Cycler Real Time PCR	CycloF

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen DNA (2-10 µg) nach der Methode von Lee und Rasheed (1990) präpariert.

### 2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von HEK 293, Phoenix A, Phoenix E und anderen Zellen wurden größere Mengen DNA benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des „Qiagen Maxi-Kits“



(Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen

### **2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA**

#### **2.2.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden oder ü.N. beim Temperaturoptimum des Enzyms.

#### **2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden**

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltener Vektor DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein „Qiagen Spin Column“ gereinigt.

#### **2.2.3.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase**

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2 bis 5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments, 1,5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 15 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

### **2.2.4 Gelelektrophorese von DNA**

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 bp bis 14 kb wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Sowohl dem Agarosegel als auch dem Laufpuffer wurde Ethidiumbromid (2 µl/ml) zugegeben. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h.

### **2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAex II Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

## 2.2.6 DNA-Transfer in *E. coli*-Bakterien

### 2.2.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (1993) verwendet. Die Transformations-effizienz war größer als  $5 \times 10^6$  Klone/ $\mu\text{g}$  DNA.

### 2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* wurden 10  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  5x KCM (500 mM KCl; 150mM  $\text{CaCl}_2$ ; 250 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 70  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 100  $\mu\text{l}$  kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 Min. bei RT belassen, dann mit 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und 40 Min. bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert.

### 2.2.6.3 Dauerkulturen von *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden.

## 2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

Mit Hilfe dieser Methode (nach Messing 1983 und Kunkel 1985) ist es möglich, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in einer bekannten DNA-Sequenz einzufügen.

### 2.2.7.1 Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3-DNA

Mit einer Einzelkolonie *E. coli* CJ236, die am Vortag mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert wurden, wurde eine 3 ml Kultur in 2x TY-Medium/Amp angesetzt und bei 37°C geschüttelt. Nach Auftreten der ersten sichtbaren Bakterienkulturen (frühe logarithmische Phase) wurde diese Kultur mit  $2 \times 10^7$  pfu/ml M13KO7-Helferphagen infiziert. Nach 1,5 h wurde die Kultur mit Kanamycin (Endkonzentration 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und weiter ü.N. bei 37°C geschüttelt. Danach enthielt das Medium den zur Infektion verwendeten M13-Phagen mit der Einzelstrang-DNA des Plasmids, an dem die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch dreimaliges Abzentrifugieren von 1,5 ml Kulturmedium gründlich aus dem Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  20% PEG/NaCl bei RT für 20 Min. präzipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Phagensediment wurde in 100  $\mu\text{l}$  TE resuspendiert und durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Phenol (TE-gesättigt) extrahiert. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase, welche die einzelsträngige DNA enthielt, wurde diese nach Zugabe von 1/10 Volumen 8 M LiCl und

dem 2,5fachen Volumen 95% Ethanol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 2 h gefällt und anschließend bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen. Die Qualität der ssDNA wurde auf einem Agarosegel überprüft.

### 2.2.7.2 *Synthese des mutierten Stranges*

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids an den uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen: 200 ng einzelsträngige DNA, 2-3pmol phosphoryliertes Oligomer und 1  $\mu\text{l}$  10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,4; 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 500 mM NaCl) wurden in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  in einem Heizblock 2 Min. zur Denaturierung der DNA inkubiert. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von  $30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1  $\mu\text{l}$  10x Synthesepuffer (5 mM dNTPs; 10 mM ATP; 180 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 20 mM DTT), 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (5 E), 1  $\mu\text{l}$  T4-Gen 32 Protein (1  $\mu\text{g}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Polymerase (3 E) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 Min. auf Eis, 5 Min. bei  $25^{\circ}\text{C}$  und anschließend 90 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt. 10  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien verwendet.

### 2.2.8 Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde der „Big Dye Ready Reaktion Terminator Cycle Sequencing Kit“ von ABI PRISM™ (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Weiterstadt) und den Macintosh Programmen ABI PRISM™ „310 Genetic Analyser“ Vers. 2.1.5 und „Sequencing Analyser“ Vers.3.4.1.

### 2.2.9 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNase-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore™-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei  $200^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

#### 2.2.9.1 *Präparation von Total-RNA*

Die Präparation von Total-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des „Roti-Quick-Kits“ für die RNA-Isolation nach Herstellerprotokoll. Hierzu wurden stets Zellkultur mit subkonfluent (90%) gewachsenen Zellen verwendet. Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese (s. unten) und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

### 2.2.9.2 *Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA (mRNA) aus Total-RNA*

Durch spezifische Bindung der polyadenylierten 3'-Bereiche von mRNA an eine Affinitätssäule aus kovalent gekoppelten Oligo(dT)-Resten, kann eine Anreicherung dieser Transkripte aus Total-RNA ermöglicht werden, wobei nicht gebundene RNA von der Säule gewaschen wird. Die gebundene mRNA kann anschließend wieder eluiert werden.

1g Oligo(dT)-Zellulose (Stratagene) wurde mit 10 ml Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS; in DEPC-H<sub>2</sub>O) 2-3 h bei RT gequollen. Jeweils 500 µg der Suspension wurden in eine silanierte, mit Glaswolle abgedichtete und autoklavierte Pasteurpipette gefüllt, mit 3 ml Elutionspuffer und anschließend mit 5 ml 1x Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5% SDS; in DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Total-RNA wurde 5 Min. bei 65°C inkubiert und mit dem gleichen Volumen, auf 65°C vorgewärmten, 2x Bindungspuffer versetzt. Der Ansatz wurde auf die Säule geladen und nach 2-3 Min. Exposition der Durchlauf ermöglicht. Nach Waschen der Säule mit 10 ml 1x Bindungspuffer wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA einmal mit 500 µl und zweimal mit je 400 µl Elutionspuffer eluiert. Die drei Fraktionen wurden mit je 1ml Ethanol absolut sowie 50 µl 5 M NaCl versetzt und die mRNA auf Trockeneis für 30 min präzipitiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (4°C, 13000 rpm, 30 Min.), mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Präzipitate der drei Fraktionen wurden in einem adäquaten Volumen ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der mRNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft. Die Ausbeute der mRNA, die sich in den ersten beiden Fraktionen befand, betrug in der Regel 2-4% der eingesetzten Total-RNA

### 2.2.9.3 *Elektrophoretische Auftrennung von RNA*

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosekammern (Lehrach *et al.*, 1977). 1,2 g Agarose wurden in 77 ml H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgekocht und 10 Min. bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in 10 ml 10x MOPS und 13 ml Formaldehyd (37% v/v) aufgefüllt und das Gel gegossen.

Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 3 µg polyA<sup>+</sup>-RNA wurde mit 2,5 µl 10x MOPS, 4,4 µl Formaldehyd (37% v/v) und 12,5 µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl gebracht. Die Proben wurden 15 Min. bei 55°C erhitzt, anschließend mit 10 µl RNA-Auftragspuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm<sup>2</sup> Gelfläche wurden 6 V Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Min. in 100 ml Laufpuffer mit 5 µl Ethidiumbromid gefärbt (10 mg/ml) und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 60 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (I = 302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

### 2.2.9.4 *Northern-Analyse*

Für eine Northern-Analyse muss die in einem denaturierenden Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennte mRNA auf einen Nitrozellulosefilter transferiert werden. Die im Formaldehyd/Agarosegel denaturierte, einzelsträngige RNA bindet an den Filter und wird durch Backen des Filters permanent an diesem fixiert.

### **2.2.9.5 Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran**

Der Transfer der RNA auf Nitrozellulosemembran erfolgte durch Kapillarkräfte (Thomas, 1983). Das RNA-Agarosegel wurde auf die minimal notwendige Größe zurechtgeschnitten und 30 Min. in 20x SSC äquilibriert. Auf eine gesockelte Glasplatte, die sich in einer mit 20x SSC gefüllten Glaswanne befand, wurden drei Lagen in 20x SSC getränktes und zurechtgeschnittenes 3 MM Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt, so dass sie über den Rand der Glasplatte in den Puffer hingen. Darauf wurden zwei weitere, ebenfalls mit 20x SSC getränkte, in Gelgröße geschnittene, 3 MM Whatmanpapiere gelegt. Das Agarosegel wurde auf das oberste Whatmanpapier gebracht und luftblasenfrei mit einer in 2x SSC angefeuchteten Nitrozellulose gleicher Größe bedeckt. Anschließend wurden drei weitere Lagen, in 2x SSC getränktes, sowie etwa 20 Lagen trockenes 3 MM Whatmanpapier aufgelegt. Der Transfer der RNA auf die Nitrozellulose erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose vorsichtig vom Agarosegel abgezogen und 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Danach wurde die Lage der einzelnen Geldaschen sowie die Position der 28S und 18S RNA unter UV-Licht mit einem Kugelschreiber markiert.

### **2.2.9.6 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA**

Die gebackenen Nitrocellulosefilter wurden für mindestens 4h bei 42°C in einer Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1% SDS) inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit gescherter Heringssperma-DNA (20 µg/ml Hybridisierungslösung) für 10 Min. bei 100°C hitzedenaturiert und zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 42°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie zweimal ca. 20 Min. in 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen und weitere 15 Min. in 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Exposition der Filter auf einer Phosphoimagerplatte und anschließend auf Röntgenfilm bei -80°C in einer Kassette mit Verstärkerfolie.

### **2.2.9.7 Synthese von cDNA**

Für bestimmte Analysen ist es notwendig, RNA in cDNA umzuschreiben. Hierzu wurden 3 µg der jeweiligen Total-RNA bzw. polyA<sup>+</sup>-RNA, 0,5 µl „Random“-Oligonukleotide, 0,5 µl Oligonukleotid K2 (nicht bei Synthese für Light Cycler) und 1 µl Oligonukleotid K1 zugegeben und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 9 µl Volumen gebracht. Der Ansatz wurde zur Denaturierung der RNA 3 Min. bei 70°C und anschließend 5 Min. bei RT inkubiert. Zur Synthese der cDNA wurden dann 1 µl RNase-Inhibitor, 4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer, 2 µl dNTPs, 2 µl DTT und 2 µl AMV Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz bei 42°C für 2 h inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden 80 µl TE zugegeben und anschließend bei 72°C für 7 Min. inkubiert. 10 µl des Gesamtansatzes der cDNA wurden dann in einem 1,5%igen Agarosegel hinsichtlich ihrer Qualität überprüft. Die verbleibenden 90 µl wurden zur Denaturierung der cDNA mit 10 µl 1 N NaOH versetzt und 20 Min bei 68°C inkubiert. Zur Neutralisation wurden 5 µl 2 N HCl sowie 5 µl 2 M Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Die cDNA wurde letztendlich mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen gereinigt.

### 2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP

Zur radioaktiven Markierung von DNA- bzw. cDNA-Fragmenten wurde der „Random Primed Labeling Kit“ von Boehringer verwendet, der auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) beruht. 50 ng DNA bzw. ca. 300 ng cDNA wurden zusammen mit 2,5  $\mu$ l Hexanukleotiden in einem Volumen von 10  $\mu$ l für 10 Min. bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 Min. auf Eis gebracht. Zum Reaktionsansatz wurden je 8,5  $\mu$ l Reaktionsmix (Puffer:dTTP:dCTP:dGTP = 5:4:4:4), 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP und 1,5 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen gereinigt und die radioaktiv markierte DNA in einem Volumen von 500  $\mu$ l eluiert.

### 2.2.11 Light Cycler Real Time PCR

Die Light Cycler Real Time PCR ist eine sehr sensitive Methode, die Expression eines Gens mittels einer kinetischen Echtzeit-PCR quantitativ zu bestimmen, wobei eine Messung des Produkts über eine Fluoreszenzmarkierung im Verlauf der gesamten Reaktion während jedes einzelnen Zykluses der logarithmisch linearen Phase erfolgt. PCR-Reaktionen und Detektion des Produkts erfolgten in einem Light Cycler (Roche Diagnostics) unter Verwendung des „Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kits“ (Roche), wobei der Farbstoff „SYBR Green“ bei Anlagerung an doppelsträngige DNA seine Fluoreszenzeigenschaften verändert und das PCR-Produkt so die exakte Transkriptmenge widerspiegelt.

Nach Isolierung der zytoplasmatischen RNA und cDNA-Synthese wurden 0,2  $\mu$ l cDNA (entspricht 50 ng gesamt-RNA) jeder Probe mit dem „Master SYBR Green I Kit“ nach Angaben des Herstellers in einer Glaskapillare auf Eis für die PCR vorbereitet. Zur Bestimmung der Meg2-mRNA-Konzentration wurden die Primer LC/Meg2/fwd1 und LC/Meg2/rev1 und zur Bestimmung der Cyclophilin A-mRNA-Konzentration die Primer CycloB und CycloF eingesetzt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde für jedes Primerpaar ein Ansatz mit H<sub>2</sub>O anstelle der cDNA verwendet. Als Maß für die mRNA-Menge wurde der Wendepunkt der Funktion *Fluoreszenz gegen Anzahl der Zyklen* verwendet, d.h. die Anzahl der Zyklen, bei denen die Hälfte der Primer umgesetzt ist.

### 2.2.12 cDNA-Filterhybridisierung

Die cDNA-Filter wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt. Die Herstellung erfolgte durch Spotten von pBluescript-Plasmiden, die Sequenzen von mehr als 500 Genen sowie Kontrollen enthielten, auf HybondN®-Membranen mit einem Gridder (Genomic Solutions). Die Plasmide wurden dreimal in unterschiedlichen Bereichen der Membran aufgetragen, was Mehrfachbestimmungen der Expression eines Gens erlaubt und somit die Zuverlässigkeit der Daten steigert. Anschließend wurden die Filter bei 80°C in einem Vakuumofen für 2 h gebacken.

Zur Prähybridisierung wurden die Membranen in einem Hybridisierungsgefäß mit 15 ml Prähybridisierungslösung + 150  $\mu$ l tRNA (Roche, 10 mg/ml) in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech) mindestens 16 h bei 68°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Hybridisierungspuffer + 150  $\mu$ l tRNA auf 70°C im Wasserbad erhitzt und die radioaktiv markierte, gereinigte und mit COT-DNA (Invitrogen) gegen unspezifische Bindungen blockierte cDNA-Sonde 10 Min. bei 100°C denaturiert. Die Sonde wurde dann mit dem Hybridisierungspuffer vermischt und gegen die Prähybridisierungslösung

ausgetauscht. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur der Hybridisierungslösung konstant blieb. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 68°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden diese zweimal für 20 Min. bei 42°C in 2x SSC, 0,1% SDS und anschließend zweimal in 0,2x SSC, 0,1% SDS (20 Min., 42°C; 60 Min., 65°C) gewaschen. Danach wurden die Filter noch dreimal kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und getrocknet. Anschließend wurden die Filter auf einer Phosphoimager-Platte exponiert, durch einen Phosphoimager eingelesen und die Daten digitalisiert.

2x Prähybridisierungslösung:

100x Denhardt	50 ml
20x SSC	250 ml
0,5 M NaPO <sub>4</sub> , pH 6,8	100 ml
100 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	90 ml

Hybridisierungspuffer:

20x SSC	250 ml
10% SDS	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	740 ml

Die Intensität der Punkte auf den cDNA-Filtern wurde mit Hilfe des Programms ArrayVision (Raytest, Kanada) ermittelt und die Daten in Microsoft Excel exportiert. In Excel wurden die Daten durch ein selbstgeschriebenes Macro (Dr. R. Abraham, U3-Pharma, Martinsried) ausgewertet. Zuerst wurde der durchschnittliche Hintergrund (pBluescript, Kontrollgene, Wasser) ermittelt. Dieser Wert wurde von den Werten aller anderen Hybridisierungssignale abgezogen. Ergaben sich dabei Werte kleiner Null, so wurden diese gleich Null gesetzt. Alle so ermittelten Werte eines Filters wurden summiert, um die Gesamtintensität zu ermitteln. Zum Abgleich der Gesamtintensität der einzelnen Filter untereinander wurde jeder Wert eines Filters durch die Gesamtintensität dividiert und zur leichteren Handhabung der Werte mit 10000 multipliziert (= normalisierter Wert). Aus den normalisierten Werten wurde anschließend der Durchschnitt der Triplets eines Gens und die Standardabweichung ermittelt. Diese Werte wurden dann zur Basis 2 logarithmiert. Alle Werte kleiner 0,1 wurden dabei gleich 0,1 gesetzt. Aus diesen Werten wurde zur Ermittlung induzierter Gene das Verhältnis zwischen siMeg2-Werten und siGL2-Werten gebildet, zur Ermittlung reduziert exprimierter Gene das reziproke Verhältnis. Zudem wurden Grenzwerte der jeweiligen Gene errechnet und von diesen Quotienten subtrahiert. Der Grenzwert eines induzierten Gens entsprach dabei dem Durchschnitt der drei Werte der Referenzzelllinie plus zweimal Standardabweichung, der Grenzwert eines reduziert exprimierten Gens dem Durchschnitt der drei Werte der Referenzzelllinie abzüglich zweimal Standardabweichung. Die so erhaltenen Werte für induzierte und reduziert exprimierte Gene wurden als fache Induktion bzw. Reduktion der Genexpression ausgedrückt.

### 2.2.13 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Methode der Polymerasen-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA-Bereich zwischen zwei bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere, wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell angereichert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Grundschema in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA  
 1 µl „sense“-Oligomer, 10 pmol  
 1 µl „antisense“-Oligomer, 10 pmol  
 5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (Takara)  
 1 µl dNTPs, 10 mM  
 1 µl Taq-Polymerase (Takara), 0,1-0,5 E  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die Matrizen-DNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in einem „Thermal Reaktor“ mit beheiztem Deckel der Fa. Techne nach folgendem Protokoll durchgeführt:

erste Denaturierung	3 Min.	94°C	
Amplifikation 10-30 Zyklen	1 Min.	94°C	(Denaturierung)
	1 Min.	T <sub>m</sub> -5°C	(Hybridisierung)
	1 Min./kb	72°C	(Synthese)
letzte Synthese	5 Min.	72°C	

Nach der Beendigung der PCR wurde der Ansatzes mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, das amplifizierte PCR-Fragment ausgeschnitten und die DNA mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ von Qiagen zur Weiterverarbeitung aus dem Gel extrahiert.

## 2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilwerkbänken ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Ferner wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in sogenanntem Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem „Coulter Counter“.

### 2.3.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse. Subkonfluente Zellen auf 6cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.



### 2.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK 293- und NIH3T3-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird durch Mischung der DNA mit  $\text{CaCl}_2$  und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das durch einen noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt episomal in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos und Ruttle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48 - 72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden hierzu 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale (6 ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 6  $\mu\text{g}$  DNA mit  $\text{H}_2\text{O}$  zu einem Volumen von 270  $\mu\text{l}$  verdünnt, mit 30  $\mu\text{l}$  einer 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 300  $\mu\text{l}$  2x BBS zugetropft. Nach 15 Min. Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in Medium gewaschen und eventuell mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

Für die Transfektion von Phoenix A- und Phoenix E-Zellen wurde das eben beschriebene Protokoll modifiziert: anstelle von BBS wurde HBS verwendet und die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung war 2 M.

### 2.3.4 Transfektion mit anderen Methoden

Zellen, bei denen eine Kalziumphosphat-Transfektion ineffizient war, wurden mit anderen, kommerziellen Transfektionsreagenzien transfiziert. Bei diesen handelt es sich in der Regel um polykationische bzw. auf Polyamine basierende Reagenzien, welche bei Inkubation mit DNA diese in liposomenartige Vesikel einschließen. Nach Zugabe zu den Zellen verschmelzen diese Vesikel mit der Zellmembran, wodurch die DNA in die Zellen gelangt. Dadurch wird ebenfalls eine transiente Expression der episomal vorliegenden DNA erreicht. Die Verwendung dieser Reagenzien, in der Regel Lipofectamin<sup>TM</sup> (Invitrogen) und PolyFect® (Qiagen) erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test wurden Säugerzellen mit einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) wie beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt.

### 2.3.6 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen

Zur Herstellung von nicht oder nur schlecht transfizierbaren, stabil exprimierenden Zelllinien wurde Phoenix E- bzw. Phoenix A-Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät und mit der zu exprimierenden cDNA im retroviralen Expressionsvektor pLXSN nach der Kalziumphosphat-

Methode transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen ü.N. (oder alternativ dreimal für 4 h) mit 3 ml Medium zum Sammeln des Virusüberstandes kultiviert und das Medium anschließend mit einem 45 µm Filter sterilfiltriert und ggf. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Infektion von Zellen wurden diese auf 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit 3 ml des gesammelten Virusüberstandes der transfizierten Phoenix Zellen (bzw. bereits stabil existierender GPE-Zellen) in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 4-16 h. Bei Mehrfachinfektionen wurde dreimal für 4 h infiziert. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden die Zellen in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgte mit G418, einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxy-streptamin), das über das 80S Ribosom die eukaryontische Proteinbiosynthese inhibiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, die von einem Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) auf dem pLXSN-Plasmid kodiert wird, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen starben innerhalb weniger Tage ab.

### 2.3.7 Radioaktive Markierung von Zellen

Zur radioaktiven Methioninmarkierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ü.N. mit 40 µCi/ml [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionin in methioninfreiem MEM Medium inkubiert. Dabei wird in alle neu synthetisierten Proteine das radioaktiv markierte Methionin eingebaut.

## 2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.4.1 Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Stämme genutzt werden, um eukaryontische Proteine als Fusionsproteine mit GST zu exprimieren. Diese Proteine können anschließend, wenn sie in löslicher Form vorliegen, über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose gereinigt werden.

#### 2.4.1.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21

*E. coli* BL21-Bakterien wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA (pGEX + Insert) mit der KCM-Methode transformiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie eine 100 ml Vorkultur in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Am nächsten Tag wurde mit dieser Vorkultur 1 l LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und die Proteinsynthese mit 0,1 mM IPTG für 4 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  oder ü.N. bei RT induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 g geerntet und in PBS mit 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin und 0,5 mM DTT resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch eine Inkubation mit Lysozym (1 mg/ml Endkonzentration) für 15 Min. auf Eis sowie einer anschließenden Ultraschall-Behandlung.

### 2.4.1.2 *Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose*

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden die mittels Zentrifugation geklärten Lysate mit Triton X-100 (Endkonzentration 1% v/v) versetzt und mit 1 ml Glutathion-Sepharose (Pharmacia) 4 h bis ü.N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Sepharose mit dem gebundenen Fusionsprotein wurde anschließend in eine Chromatographiesäule (Bio-Rad) überführt und exzessiv mit kaltem PBS gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine von der Sepharose erfolgte mit Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen (15 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 mM DTT; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X-100). Zur Kontrolle des Proteins wurden 10 µl aus jeder Fraktion mit 20 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Letztendlich wurden die das Protein enthaltenden Fraktionen gegen PBS/10% Glycerin ü.N. bei 4°C dialysiert sowie die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.4.2 **Triton X-100 Lyse von Zellen**

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden eukaryontische Zellen mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Natriumpyrophosphat; 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschalen richtete, lysiert. Zusätzlich wurden 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM Natriumorthovanadat pH 10 frisch zugegeben. Nach 10-15 Min. auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytoplasmatischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzelllysate weiterverarbeitet.

### 2.4.3 **Zellfraktionierung**

Zur getrennten Analyse einzelner Zellkompartimente wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit einer entsprechenden Menge hypotonischem Puffer (20 mM Hepes, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0), die sich nach der Größe der Zellkulturschalen richtete, abgekratzt. Zusätzlich wurden 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM Natriumorthovanadat pH 10 frisch zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem Homogenisator (Bellco, USA) mechanisch aufgeschlossen und das Lysat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden unlösliche Bestandteile wie Zytoskelett und nicht aufgeschlossene Zellen durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zum Sedimentieren der Zellkerne erneut bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde nun eine Ultrazentrifugation für 30 Min. bei 100000 g durchgeführt, wodurch die Membranbestandteile pelletiert und somit von der zytoplasmatischen Fraktion abgetrennt wurden. Der Überstand (= Zytosol) wurde abgenommen und zur weiteren Analyse verwendet. Die Membranfraktion wurde dann mit hypotonischem Puffer gewaschen und anschließend in einem adäquaten Volumen Triton X-

100 Lysepuffer, dem Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt wurden, solubilisiert und zur weiteren Analyse verwendet.

#### 2.4.4 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ von Pierce nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode wird nicht durch Detergenzien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-2000 µg Protein/ml) eingesetzt.

#### 2.4.5 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zelllysaten dienen spezifische, an Protein A- oder Protein G-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sogenannte Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Protein A und G sind Membranproteine des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, die spezifisch an die F<sub>c</sub>-Region einer Reihe von Immunglobulinen binden. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A/G-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes aus Antikörper und Protein erleichtert (Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A- bzw. G-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler oder 3-10 µg polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,1% Triton X-100) versetzten Zelllysaten gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6500 rpm abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAA-Gel wurden die Proben 5 Min. bei 100°C gekocht um den Immunkomplex von der Protein A/G-Sepharose zu lösen.

#### 2.4.6 Präzipitation von Zelllysaten mit GST-Fusionsproteinen

Zusammen mit GST-Fusionsproteinen kann man assoziierte Bindungspartner aus Zelllysaten präzipitieren. Dabei nutzt man die Eigenschaft von GST, mit hoher Affinität an kovalent mit Sepharose gekoppeltes Glutathion zu binden.

Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurden je 30 µl GSH-Sepharose und 1 µg GST zu den mit gleichem Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,1% Triton X-100) versetzten Zelllysaten gegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Sepharose/GST-Komplex abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation wurden nun 30 µl GSH-Sepharose und 1-3 µg GST-Fusionsprotein zugegeben und die Ansätze erneut für 2-3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6500 rpm abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAA-Gel wurden die Proben 5 Min. bei 100°C gekocht um den Komplex von der GSH-Sepharose zu lösen.

### 2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung oder Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, ferner Gele mit einem kontinuierlichem Gradienten von 15% nach 7,5%. Auf diese sogenannten Trenngele wurde im Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie in Sambrook et al. (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf eine Membran transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

<u>Protein:</u>	<u>MG in kDa:</u>	<u>Protein:</u>	<u>MG in kDa:</u>
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
β-Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

### 2.4.8 Färben und Fixieren von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 10 Min. gefärbt und dann mit Entfärbe-Lösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt. Anschließend wurden die Gele zwischen Zellophan eingespannt und in einem Ventilationsofen (Bio-Rad) getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einer Phosphoimager-Platte und danach auf Röntgenfilm in Abhängigkeit von der Signalstärke exponiert.

### 2.4.9 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western-Blot)

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni und Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2-3 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Nitrozellulosemembran in einer „Semidry“-Blotapparatur. Nachdem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

### 2.4.10 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion werden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem antikörpergekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Membran erkennen, während im zweiten Schritt diese

ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität wurden schließlich mit Hilfe des „ECL-Kits“ der Firma NEN die Antigenbanden detektiert.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET (NET-Gelatine) blockiert. Zur Detektion in der Immunoblot-Analyse wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET-Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500-1:1000 in NET-Gelatine verdünnt. Die Membran wurde 3 h bei RT oder ü.N. bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert und danach zweimal 5 Min. mit NET-Gelatine gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT mit dem speziesspezifischen sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper in NET-Gelatine inkubiert. Vor der Detektion mit dem „ECL-Kit“ wurde der Blot dreimal 10 Min. mit 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran 1 Min. in einer 1:1 Mischung von ECL-Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf Röntgenfilm exponiert.

Sollte die Membran ein zweites Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Strip-Lösung bei 50 °C für 1 h entfernt werden.

#### **2.4.11 „Far Western Protein Overlay“**

Bei dieser Methode kann die spezifische Interaktion von auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteinen mit einem GST-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Membran mit einem GST-Fusionsprotein und einem nachfolgenden Immunblot zum Nachweis des an Proteine gebundenen Fusionsproteins.

Um die unspezifische Bindung des GST-Fusionsproteins an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET (NET-Gelatine) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem GST-Fusionsprotein in NET-Gelatine für 1 h bei RT. Dabei wurden die GST-Fusionsproteine in einer Konzentration von 0,1 µg/ml eingesetzt. Nachdem die Membran dreimal für 15 Min. mit NET-Gelatine gewaschen worden war, erfolgte eine Inkubation der Membran ü.N. bei 4°C mit einem gegen GST gerichteten Antikörper. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Min. mit NET-Gelatine gewaschen. Die Detektion des gebundenen Fusionsproteins mittels Inkubation mit dem sekundären Antikörper sowie des „ECL-Kits“ erfolgte wie beschrieben.

#### **2.4.12 Analyse der Phosphataseaktivität *in vitro* mittels pNPP-Test**

Zur Analyse der *in vitro*-Phosphataseaktivität wurde pNPP (para-Nitrophenylphosphat) als Substrat verwendet. Dabei wird das farblose pNPP durch Tyrosinphosphatasen zu dem gelben para-Nitrophenolat gespalten, das sich an Hand seiner Absorption bei 405 nm leicht nachweisen lässt.

Zur Analyse der Aktivität von GST-Fusionsproteinen wurden diese direkt in einer Mikrotiterplatte mit pNPP-Lösung inkubiert und anschließend die Absorption bei 405 nm gemessen.

Zelluläre PTP-Meg2 wurde nach unterschiedlichen Stimulationen der Zellen mit dem spezifischen Antikörper 2A9 und Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde anschließend dreimal mit HNTG und nachfolgend weitere dreimal mit pNPP-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM DTT; 1 mM EDTA) gewaschen und dann mit pNPP-Lösung (10 mM pNPP in pNPP-Puffer) bei 37°C im Dunklen und unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

Um den Einfluss von Lipiden auf die Phosphataseaktivität zu untersuchen, wurden diese solubilisiert (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) und ü.N. bei 4°C an Oktyl-Sepharose gebunden. Der Komplex wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O und anschließend fünfmal mit pNPP-Puffer ohne DTT gewaschen. Danach wurden das zu untersuchende GST-Fusionsprotein in pNPP-Puffer ohne DTT zugegeben und der Ansatz für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens pNPP-Lösung (20 mM pNPP) sowie 10 mM DTT wurde bei 37°C im Dunklen und unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

#### 2.4.13 Analyse von Protein/Lipid-Interaktionen *in vitro* („Protein-Lipid-Overlay“)

Mit sogenannten „PIP-Strips“ (Echelon, USA), kann *in vitro* eine mögliche Affinität von Proteinen zu Lipiden, insbesondere Phosphatidylinositol-Phosphaten, untersucht werden. Hierzu werden Nitrozellulosefilterstreifen verwendet, auf denen jeweils 100 pmol folgender Lipide immobilisiert sind: LPA, LPC, S1P, PE, PA, PS, PC, PtdIns, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, Leerfeld.

Die Filterstreifen wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit 3% fettsäurefreiem BSA in TBS/T (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) zur Minimierung unspezifischer Bindungen blockiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem zu untersuchenden GST-Fusionsprotein (0,5  $\mu\text{g/ml}$  in TBS/T + 3% fettsäurefreies BSA) für 3-4 h bei RT. Nach einem Waschschrift von dreimal 10 Min. mit TBS/T + 3% fettsäurefreiem BSA wurden die Filter mit einem monoklonalen, gegen GST gerichteten Antikörper ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Min. mit TBS/T + 3% fettsäurefreiem BSA gewaschen. Die Detektion von an Lipide gebundenem Fusionsprotein erfolgte mittels Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 h, RT), nachfolgendem dreimaligen Waschen mit TBS/T + 3% fettsäurefreiem BSA, sowie unter Verwendung des „ECL-Kits“ wie beschrieben.

#### 2.4.14 „GAP-Assay“

Die Aktivität von GTPasen wird unter anderem durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert. Mit diesem Versuchsansatz konnte untersucht werden, ob Proteine als GAPs fungieren und somit die Aktivität von GTPasen stimulieren können.

50 ng GST-Rho, -Rac und -Cdc 42 wurden in 20  $\mu\text{l}$  Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM DTT; 4 mM EDTA, pH 8,0; 25 mM NaCl; 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-GTP) zur Beladung der GTPasen mit radioaktivem GTP bei 30°C für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde auf Eis MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 17 mM zugesetzt. Danach wurden 3,5 ng (= 6 nM Endkonzentration) der jeweiligen beladenen GTPasen mit Puffer B (20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM DTT; 4 mM GTP; 1 mg/ml BSA) auf ein Volumen von 30  $\mu\text{l}$  gebracht. Nachfolgend wurden 5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes entnommen (t = 0) und in 1 ml Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) überführt. Zu dem verbleibenden Ansatz wurde das zu untersuchende Protein zugegeben (10 ng) und dann bei 25°C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 Min. wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  entnommen und in 1 ml kalten Puffer C überführt. Alle entnommenen

Proben wurden danach durch mit Puffer C vorinkubierte Nitrozellulosefilter (25 mm) gesaugt und dreimal mit Puffer C gewaschen. Die Radioaktivität des verbleibenden GTPs der dadurch auf den Filtern immobilisierten GTPasen wurde letztendlich in einem Scintillator (Beckman) gemessen.

## **2.5 Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen**

### **2.5.1 Stimulation von Zellen**

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 20-24 h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Lyse wurden die Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Inhibitoren oder anderen Substanzen stimuliert. Nach der Zelllyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation angereichert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Immunoblot analysiert.

### **2.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläsern kultiviert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann bei RT 15 Min. mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran durch Inkubation mit PBS/0,1% Triton X-100 für 10 Min. bei RT. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Absättigung und Inhibierung der Autofluoreszenz freier Aldehydgruppen mit 10 mM Glycin und 0,1% Borhydrid in PBS für 10 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen wurde dann ein Blockierungsschritt für 1 h bei RT mit PBG (0,5% BSA; 0,045% Fisch-Gelatine) mit 5% Ziegennormalserum durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen ü.N. bei 4°C mit dem primären Antikörper in PBG/5% Ziegennormalserum inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde dreimal für 10 Min. mit PBG gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären, Cy<sup>3</sup>- oder FITC-gekoppeltem, Antikörper erfolgte in PBG/5% Ziegennormalserum für 2 h bei RT. Nachfolgend wurde wiederum dreimal für 10 Min. mit PBG und danach 2 h mit PBS gewaschen. Zuletzt erfolgte eine DNA-Färbung mit dem Farbstoff Bisbenzimid (1 µg/ml in PBS) für 5 Min. bei RT. Die Deckgläser wurden mit Dasca versetzt und umgedreht auf Objektträgern fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert S100 Fluoreszenzmikroskop und der Software Openlab 2.1.

### **2.5.3 Photometrische Bestimmung von lebenden Zellen (MTT-Test)**

Zur Bestimmung von adhärennten, lebenden Zellen wurde die von Mosmann (1983) beschriebene Methode für Zellen des Immunsystems auf adhärennte Zellen übertragen. Der Test misst die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms und reflektiert daher die Gesamtmenge der lebenden Zellen. Das Substrat MTT (3-(Dimethylthiazolyl-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolbromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazolrings von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein Formazanprodukt umgesetzt, dessen



Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Zum Test wurden die Zellen in einer angemessenen Zellzahl in 96-Loch-Platten in 100 µl Medium ausgesät. Zu den jeweiligen Messpunkten wurden den Zellen 20 µl MTT-Lösung (2,5 mg/ml in PBS) zugesetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zugabe von 99,4% DMSO, 0,6% Eisessig, 10% (w/v) SDS ü.N. lysiert und somit der Farbstoff gelöst. Die Messung des gelösten Farbstoffes erfolgte bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm.

#### 2.5.4 Focusbildungstest

Stabil transfizierte NIH3T3-Fibroblasten wurden mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro Schale auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und mit den von Produzentenzelllinien sezernierten retroviralen Überständen HER2, vErbB, EGFR und v-Ki-Ras infiziert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM-Medium mit 4% FCS kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Das Medium der EGFR-infizierten Zellen enthielt zusätzlich 10 ng/ml EGF. Nach 12 Tagen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett; 20% Methanol) fixiert und angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Foci per Hand ausgezählt.

#### 2.5.5 Gezielte Inhibierung der Genexpression mittels siRNAs („RNA interference“)

Unter „RNA interference“ versteht man den Prozess einer sequenzspezifischen, posttranskriptionellen Inhibierung der Genexpression, welche durch sogenannte doppelsträngige siRNAs induziert wird, die zu einer Sequenz des auszuschalteten Gens homolog sind. Diese siRNAs führen zu einer mRNA-Degradation und somit einer spezifischen Unterdrückung der Genexpression. Im Idealfall führt dies zur vollkommenen Eliminierung des entsprechenden Proteins in der Zelle und kommt einem „knock out“ des Gens gleich.

Die Sequenzen geeigneter siRNAs zur Suppression eines Gens wurden anhand der cDNA-Sequenz und eines Computerprogramms ermittelt. Die Synthese der siRNA-Duplices erfolgte durch die Firma Dharmacon (USA). Die lyophilisierten siRNAs wurden durch Lösen in 1 ml RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt.

Die Transfektion von siRNAs in Zellen erfolgte mit Lipofectamin™ 2000 bzw. mit Oligofectamine™ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ausgesät, wobei die Zellzahl bezüglich der Transfektionseffizienz für die verwendeten Zellen zuvor optimiert worden ist. Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 10 µl der jeweiligen siRNA transfiziert. In Abhängigkeit von der Abundanz des Zielproteins und dessen Halbwertszeit war bei funktioneller siRNA ein „knockdown“-Phänotyp nach 1-4 Tagen detektierbar.

Sequenzen verwendeter siRNAs (5'>3')

##### Lamin A

Zielsequenz (cDNA)	AACTGGACTTCAGAAGAACATC
„sense“ siRNA	CUGGACUCCAGAAGAACAdTdT
„antisense“ siRNA	UGUUCUUCUGGAAGUCCAGdTdT

GL2 Luciferase

Zielsequenz (cDNA)	AACGTACGCGGAATACTTCGATT
„sense“ siRNA	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
„antisense“ siRNA	UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT

Meg2/562

Zielsequenz (cDNA)	AAGGGAGCATTTCAGCTCGTTT
„sense“ siRNA	GGGAGCAUUUCCAGCUCGUdTdT
„antisense“ siRNA	ACGAGCUGGAAAUGCUCCCdTdT

Meg2/1047

Zielsequenz (cDNA)	AAGTGGCCATACTCAGACAGATT
„sense“ siRNA	GUGGCCAUACUCAGACAGAdTdT
„antisense“ siRNA	UCTGUCUGAGUAUGGCCACdTdT

## 2.6 Herstellung von Antikörpern

### 2.6.1 Polyklonale Antikörper aus Kaninchen

Als Antigene zur Immunisierung diente zum einen ein GST-Meg2 Fusionsprotein, zum anderen ein synthetisches, an KLH gekoppeltes Peptid, das der Meg2-Aminosäuresequenz 338-354 entspricht (Eurogentec). Vor der Immunisierung wurden den Kaninchen zunächst an der Ohrvene ca. 2 ml Präimmenserum abgenommen. Zur ersten Immunisierung wurden jeweils 500 µg des Antigens mit dem gleichen Volumen kompletten Freund's Adjuvanz (Sigma) versetzt und in einer Kanüle zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde den Kaninchen an mehreren Positionen subcutan injiziert. In gleicher Weise erfolgten zwei und nochmals vier Wochen später zwei weitere Immunisierungen, mit dem Unterschied, dass nun nicht-komplettes Freund's Adjuvanz verwendet wurde. Acht Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet.

Das Blut wurde ü.N. bei 4°C zur Präzipitation des sogenannten Blutkuchens stehen gelassen. Anschließend wurde der flüssige Bestandteil abgenommen und 10 Min. bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nachfolgend schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C für 10 Min. an. Danach wurde das Serum abgenommen, mit Natriumazid versetzt (Endkonzentration 0,02%), aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die polyklonalen Antiseren wurden als Kaninchen gegen Meg2 962 (gegen Peptid Position 338-354) und 963 (gegen GST-Meg2) bezeichnet.

### 2.6.2 Monoklonale Antikörper aus Ratte

Die monoklonalen Antikörper gegen Meg2 aus Ratte wurden in Kooperation mit Frau Dr. E. Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie, GSF, München, hergestellt. Als Antigen diente dabei GST-Meg2 Fusionsprotein. Nach der Immunisierung der Ratten und der Fusion wurden die Hybridomaüberstände vor der Reklonierung zunächst in einem ELISA-Test hinsichtlich ihrer Spezifität für das Antigen überprüft. Zusätzlich wurden Überstände, welche GST bzw. ein nicht verwandtes GST-Fusionsprotein unspezifisch erkannt haben, ausselektiert. Die verbleibenden Überstände wurden dann in Immunpräzipitation und

Immunblot getestet. Letztendlich wurden zwei Hybridomas ausgewählt und rekloniert. Hierbei handelt es sich um die Antikörper Ratte gegen Meg2 2A9 und 2E12. Die Isotypenbestimmung ergab, dass es sich bei 2A9 um ein IgG2a und bei 2E12 um ein IgG2b handelt.

### 3 Ergebnisse

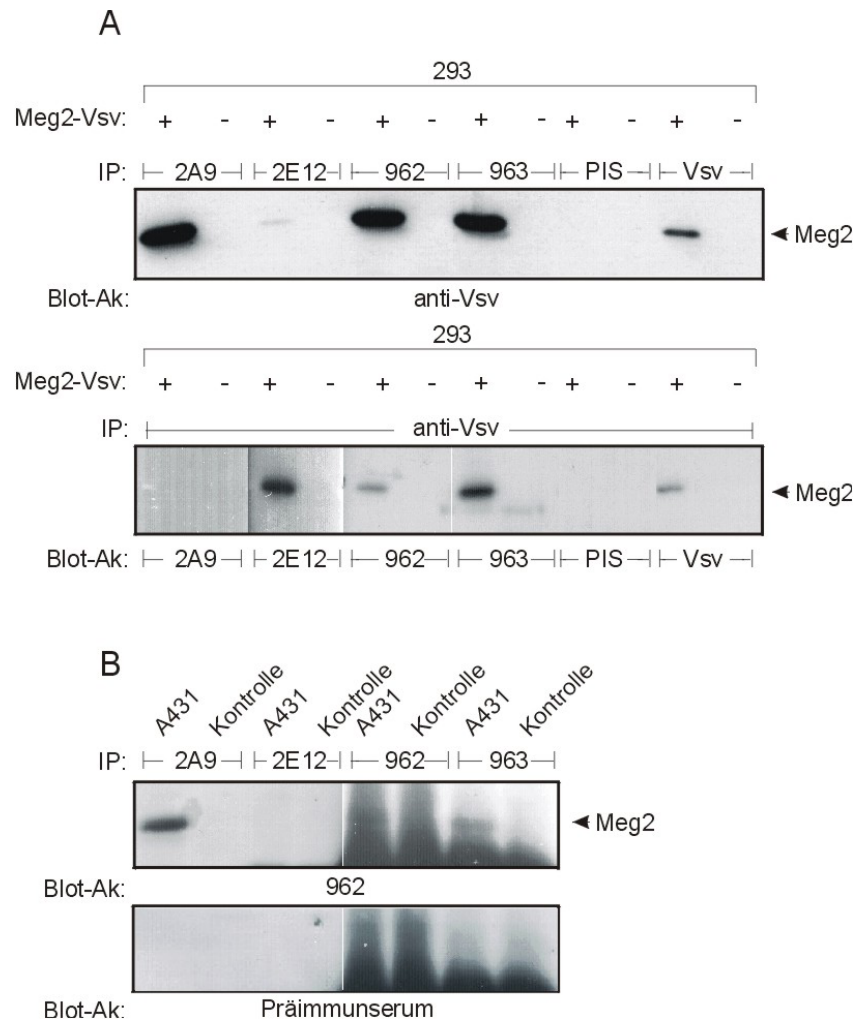
#### 3.1 Herstellung verschiedener GST-Meg2 Fusionsproteine und Meg2-spezifischer Antikörper

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene GST-Meg2 Fusionsproteine hergestellt, die zum einen als Antigen zur Generierung Meg2-spezifischer Antikörper genutzt, zum anderen als rekombinantes Protein für weitere experimentelle Ansätze eingesetzt werden konnten. Die Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. An dieser Stelle sollen die unterschiedlichen GST-Proteine vorgestellt und ihre Integrität demonstriert werden. Abb. 3A zeigt eine schematische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine. In Abb. 3B sind die aufgereinigten Fusionsproteine nach Auftrennung über SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau dargestellt.

Für die Herstellung von gegen Meg2 gerichteten Antikörpern wurde ausschließlich GST-Meg2 als Antigen verwendet. Das Antigen wurde sowohl zur Immunisierung von Ratten als auch von Kaninchen verwendet. Zudem wurde ein polyklonaler Peptid-Antikörper gegen PTP-Meg2 hergestellt. Dazu wurde den Kaninchen als Antigen ein an KLH gekoppeltes synthetisches Peptid, das der Aminosäureregion 338-354 entspricht, injiziert.

Um die Spezifität der generierten Antikörper zu testen, wurde mit Lysaten von HEK 293-Zellen, welche mit einem Meg2-Vsv-Fusionsprotein bzw. dem Leervektor transfiziert worden waren, sowohl eine Immunpräzipitation als auch eine Immunblotanalyse durchgeführt. Abb. 4A (oben) illustriert, dass alle vier hergestellten Antikörper, wie auch der monoklonale anti-Vsv-Antikörper, jedoch nicht das Präimmunserum, spezifisch ein 68 kDa Protein präzipitieren, bei dem es sich um Meg2-Vsv handelt. Jedoch scheint der rattenmonoklonale Antikörper 2E12 das Antigen nur relativ schwach zu präzipitieren. Ferner erkennen außer 2A9 alle gegen PTP-Meg2 gerichtete Antikörper spezifisch Meg2-Vsv im Immunblot (Abb. 4A, unten). Letztendlich wurden die anti-Meg2 Antikörper in einem endogenen Zellsystem auf ihre Spezifität getestet. Abb. 4B zeigt, dass die Antikörper 2A9, 962 und 963, nicht aber 2E12, eine 68 kDa Bande präzipitieren, die dem Molekulargewicht endogener PTP-Meg2 entspricht. Die Immundetektion dieser Banden erfolgte nur mit dem polyklonalen Antiserum 962 nach Immunpräzipitation von A431-Lysaten, nicht jedoch in den Kontrollen bzw. mit Präimmunserum.





**Abb. 4: Test der polyklonalen und monoklonalen Antikörper gegen Meg2**

(A) Gleiche Mengen Lysat von mit Meg2-Vsv bzw. Leervektor transfizierten HEK 293-Zellen wurden einer Immunpräzipitation mit anti-Meg2 rattenmonoklonalen Überständen (2A9, 2E12), polyklonalen Antiseren (962, 963), Präimmunserum (PIS) bzw. mausmonoklonalem anti-VSV-Antikörper unterzogen, über ein SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend wurde eine Immunblot-Analyse mit den gleichen Antikörpern durchgeführt. (B) Gleiche Mengen A431-Lysat bzw. HNTG (Kontrolle) wurden einer Immunpräzipitation mit anti-Meg2-Antikörpern unterzogen. Nach Auftrennung über ein SDS-Gel und Transfer auf Nitrozellulose erfolgte eine Immunblotanalyse mit polyklonalem anti-Meg2-Antiserum (962) bzw. Präimmunserum (PIS).

## 3.2 Verbreitung und Vorkommen

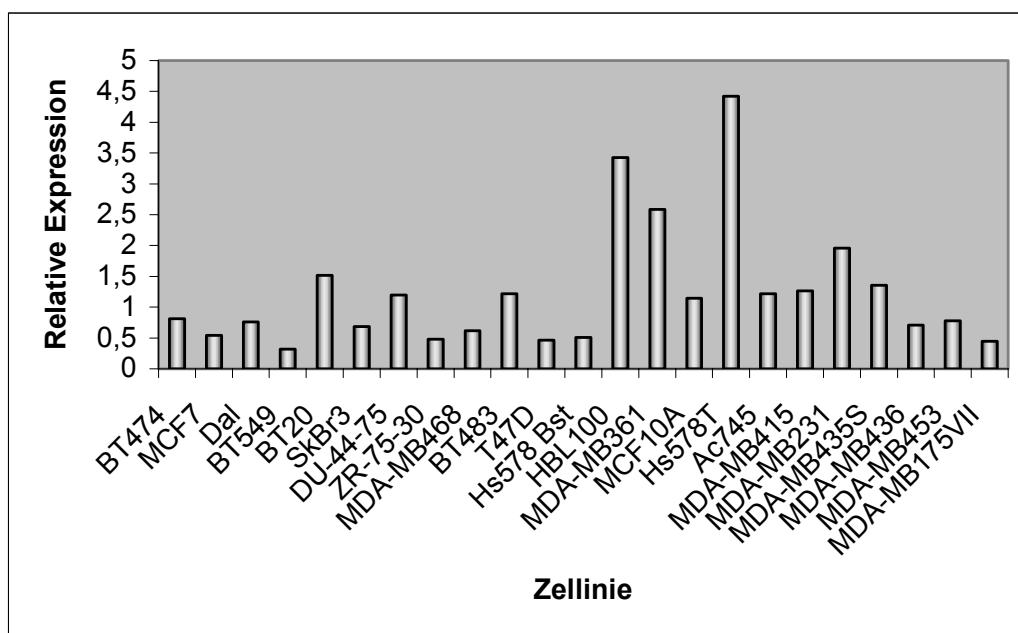
### 3.2.1 Expression von PTP-Meg2 in verschiedenen Zelllinien

Aus der Literatur war zu Beginn dieser Arbeit lediglich die Expression von PTP-Meg2 in 12 untersuchten Zelllinien auf mRNA-Ebene mittels Northern-Blot-Analyse bekannt (Gu et al., 1992). Auf Grund des unterschiedlichen Gewebersprungs der analysierten Zellen wird eine weitverbreitete Expression der PTP-Meg2 angenommen. Ferner wurde gezeigt, dass PTP-Meg2 in einer Reihe von hämatopoetischen Zelllinien exprimiert wird, wogegen eine

Expression in lymphoiden Organen nicht nachgewiesen werden konnte (Gjorloff-Wingren et al., 2000). Um genauere Informationen über die Verbreitung der PTP-Meg2 sowie ihres Expressionsniveaus zu erhalten und somit eine Einsicht in eine etwaige Bedeutung bei Transformationsprozessen zu erlangen, wurde in diversen Tumorzelllinien und nicht transformierten Zelllinien die Meg2-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

### 3.2.1.1 Expression von PTP-Meg2 auf mRNA-Ebene

Zur Untersuchung der Expression der PTP-Meg2 und einer eventuellen Bedeutung bei der Zelltransformation wurde zunächst auf bereits vorhandene Expressionsdaten aus cDNA-Filteranalysen von Brustkrebszelllinien (P. Knyazev, A. Roidl, persönliche Mitteilung) zurückgegriffen. Das relative Expressionsniveau der PTP-Meg2 wurde als Verhältnis zum „Haushaltsgen“  $\beta$ -Actin ermittelt. Dabei zeigte sich, dass PTP-Meg2 in allen untersuchten Brustkrebszelllinien exprimiert wird (Abb. 5). Verglichen mit den Expressionswerten anderer

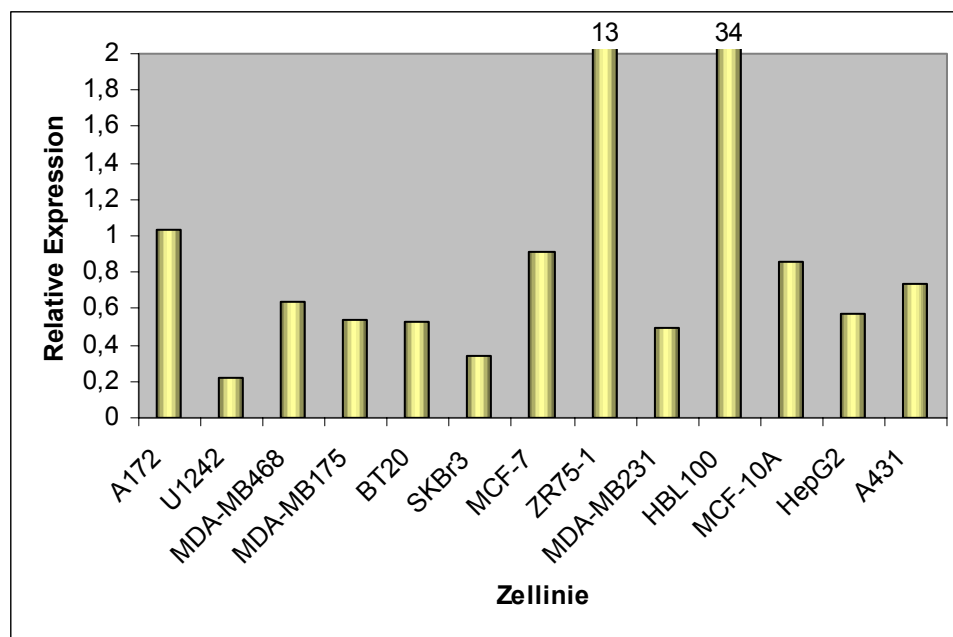


**Abb. 5: cDNA-Filteranalyse der Genexpression von PTP-Meg2 in verschiedenen Brustkrebszelllinien**  
cDNA-Filter wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus cDNA der entsprechenden Zelllinien hybridisiert. Die Werte der Meg2-Expression wurden nach Substraktion des Hintergrunds (pBluescript) gegen die Gesamtintensität aller Signale normalisiert (Array-Vision 5.1). Ebenso wurde mit den Werten des „Haushaltsgens“  $\beta$ -Actin verfahren. Die relative Expression ist als Verhältnis der Meg2/ $\beta$ -Actin-Expression wiedergegeben.

Gene auf den gleichen Filtern (Daten nicht gezeigt) wird PTP-Meg2 jedoch nur relativ schwach exprimiert, was aber für eine Vielzahl der Phosphatasen zutrifft. Betrachtet man die

Zelllinien untereinander, so lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen Expressionsstärke der PTP-Meg2 und krebsrelevanten Eigenschaften wie Invasivität oder Metastasierung feststellen. Auch die nicht-transformierten Zelllinien MCF 10A und Ac745 unterscheiden sich nicht im Vergleich zu den Tumorzelllinien. Auffällig ist lediglich, dass die Zelllinien HBL-100, MDA-MB 361 und Hs578T eine stark erhöhte Expression aufweisen.

Da PTP-Meg2 nur relativ schwach exprimiert wird, wurde die Expression in einigen Brustkrebszelllinien sowie Zelllinien anderen Ursprungs zusätzlich mit einer weitaus sensitiveren Methode analysiert, die es erlaubt auch geringste Transkriptmengen und Expressionsunterschiede zu erfassen. Als Nachweismethode wurde eine RT-PCR mit anschließender Quantifizierung des Produkts über Fluoreszenzmessung in einem „Light Cycler“ verwendet. Für die Amplifikation der cDNA wurden zwei Primer eingesetzt, die einen 134 bp Bereich am Anfang der CRALBP-Domäne der PTP-Meg2-Sequenz (Gu et al., 1992)



**Abb. 6: Expressionsanalyse von PTP-Meg2 in verschiedenen Zelllinien und Tumorzelllinien mittels „Real Time PCR“**

Zytoplasmatische gesamt-RNA und cDNA wurden wie in Material und Methoden beschrieben präpariert. Je 0,2 µl cDNA (entspricht 50 ng gesamt-RNA) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Normalisierung der Meg2-Expressionswerte erfolgte über das „Haushaltsgen“ Zyklophilin A. Im Diagramm ist das Verhältnis der normalisierten Expression von PTP-Meg2 in den getesteten Zelllinien zum Durchschnitt wiedergegeben.

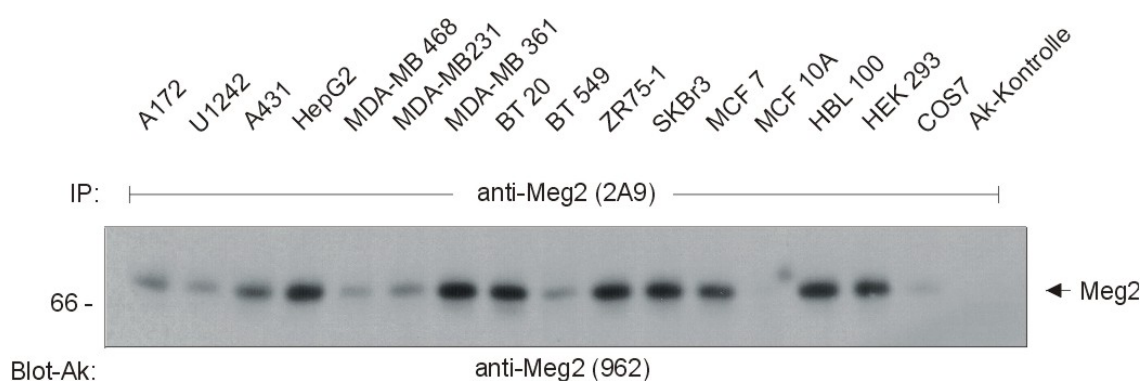
amplifizieren. Zur Normalisierung der Werte erfolgte eine Amplifikation des konstitutiv exprimierten „Haushaltsgens“ Zyklophilin A (Hager et al., 1999; Traish et al., 2000). Abb. 6 verdeutlicht, dass die erhaltenen Expressionswerte mit denen aus der cDNA-Filteranalyse korrelieren. Zudem weist die Zelllinie ZR75-1, wie auch HBL-100, MDA-MB 361 und



Hs578T, eine stark erhöhte Meg2-Expression auf. Ferner zeigt ein Vergleich der Meg2-Expression in den Brustkrebszelllinien mit der Expression in den Glioblastomzelllinien A172 und U1242, der Hepatokarzinomlinie HepG2 sowie der epidermoiden Zelllinie A431, dass es keine Expressionsunterschiede der PTP-Meg2 in Abhängigkeit des Herkunftsgewebes gibt.

### 3.2.1.2 Expression von PTP-Meg2 auf Proteinebene

Die Präsenz eines Proteins in der Zelle wird zum einen durch die Stabilität der mRNA und der damit verbundenen Translationseffizienz und zum anderen durch die Stabilität des Proteins selbst reguliert. Somit muss das Expressionsniveau von PTP-Meg2 auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Zellen nicht die tatsächlich vorhandene Proteinmenge widerspiegeln. Ferner kann die Proteinsynthese durch Mutationen beeinträchtigt werden. Des Weiteren sagen die Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Filtern und „Real Time PCR“ nichts darüber aus, ob das Protein in verschiedenen Isoformen vorliegen kann. Daher wurde in einer Reihe Zelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft die Expression von PTP-Meg2 auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde PTP-Meg2 aus den verschiedenen Lysaten immunpräzipitiert und anschließend mittels Immunblot nachgewiesen. Hierbei wird deutlich, dass die Expression auf Proteinebene nicht zwangsläufig der nachgewiesenen Transkriptmenge entspricht (Abb. 7).



#### Abb. 7: Expression der PTP-Meg2 in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene

Gleiche Proteinmengen der verschiedenen Zelllysate wurden einer Immunpräzipitation mit anti-Meg2-Antikörper unterzogen. Nach Auftrennung über ein SDS-Gel und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte eine Immunblotanalyse mit polyklonalem anti-Meg2-Antiserum.

Zwar zeigen MDA-MB 361, ZR75-1 und HBL-100 analog zur höchsten Genexpression auch die höchste Proteinkonzentration, jedoch besitzen z.B. BT 20, SKBr 3, MDA-MB 468 und MCF 7 eine ähnlich hohe Proteinkonzentration, obwohl sie sich in ihrer Genexpression kaum von

A431 und A172 unterscheiden (Abb. 7), welche aber deutlich weniger Protein besitzen. Zudem ist PTP-Meg2 in MCF 10A auf Proteinebene kaum zu detektieren, obwohl mRNA nachgewiesen wurde. Interessanterweise handelt es sich bei MCF 10A um die einzige Zelllinie die nicht karzinogenen Ursprungs ist. Ferner lässt sich feststellen, dass PTP-Meg2 nicht in verschiedenen Isoformen vorliegt.

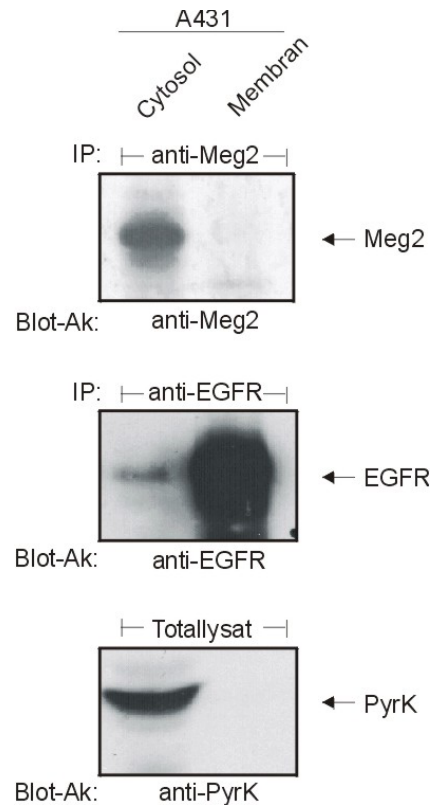
### 3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von PTP-Meg2

PTP-Meg2 sollte auf Grund fehlender Lokalisationsmotive und des Hydrophobizitätsblots ein zytosolisches Protein sein. Jedoch besitzt PTP-Meg2 mit der N-terminalen CRALBP-Domäne eine Region, die wegen ihrer starken Homologie zu Sec14p, einem Lipidaustauscher der Hefe *S. cerevisiae*, als putative Lipidbindungsdomäne diskutiert wird. Somit könnte PTP-Meg2 zumindest partiell oder unter gewissen Bedingungen an Membranstrukturen assoziiert sein.

Um die subzelluläre Lokalisation von PTP-Meg2 zu untersuchen, wurden A431-Zellen zunächst in ihre Membran- und Zytosolanteile aufgetrennt und die Fraktionen anschließend mittels Immunblot analysiert. Dabei konnte PTP-Meg2 nur in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden, jedoch nicht im Membrananteil (Abb. 8). Pyruvatkinase und EGFR dienen als zytosolischer bzw. Membranmarker und zeigen eine effiziente Fraktionierung. Ein entsprechendes Ergebnis wurde mit der Zelllinie A172 erhalten (Daten nicht gezeigt). Da die auf diese Art abgetrennte Zytosolfraktion jedoch auch Membranstrukturen wie z.B. Endosomen, Transportvesikel o.ä. enthält, kann es durchaus möglich sein, dass zumindest ein geringer Anteil der PTP-Meg2 in solchen Strukturen lokalisiert ist. Daher ist auch eine geringe Menge des Membranproteins EGF-Rezeptor in der zytosolischen Fraktion nachzuweisen.

Für eine genauere Analyse der zellulären Lokalisation der PTP-Meg2 wurden zudem Immunfluoreszenzfärbungen an Zellen durchgeführt. Die Lokalisation endogener PTP-Meg2 wurde in HBL-100 (Abb. 9 A-E) sowie MCF 7 (Daten nicht gezeigt) untersucht. Dabei ergab die Färbung, dass PTP-Meg2 überwiegend im Zytosol lokalisiert ist, jedoch teilweise in einer granulären Struktur vorliegt (Abb. 9 A, C; Pfeilspitzen).

Um zu untersuchen, inwieweit die beiden Domänen der PTP-Meg2 zu deren Lokalisation beitragen, wurden Vsv-Fusionsproteine der PTP-Meg2, der Phosphatasedomäne und der CRALBP-Domäne transient in COS7-Zellen exprimiert (Abb. 9 F-M). Hierbei zeigte sich, dass Meg2, wie auch endogen, überwiegend im Zytosol vorliegt und zwar in einer definierten, strukturierten Weise, welche zudem häufig zytoskelettartig erscheint (Abb. 9 F, Pfeile).

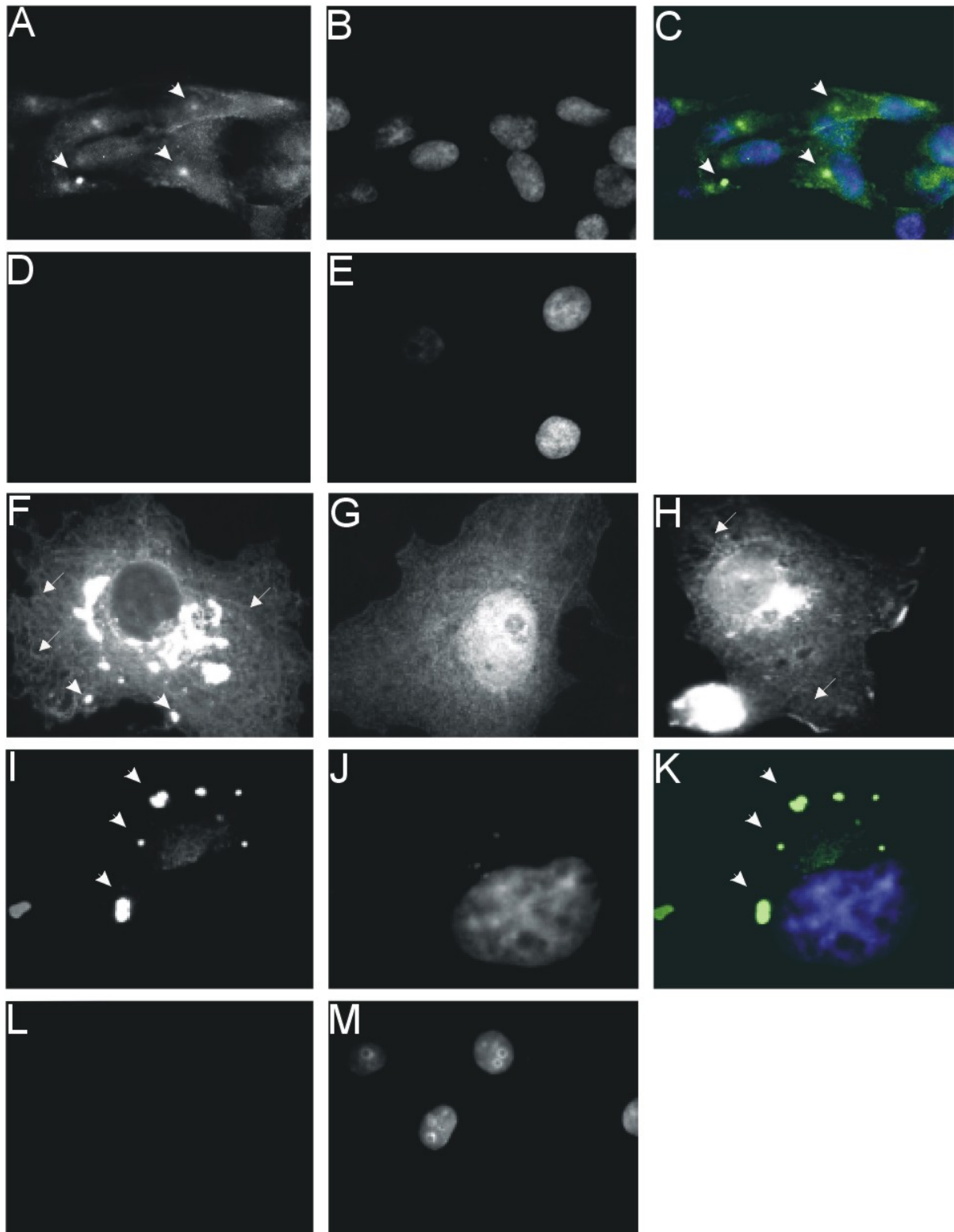


**Abb. 8: Subzelluläre Lokalisation von PTP-Meg2 in A431-Zellen nach Zellfraktionierung**

A431-Zellen wurden in hypotonischem Puffer von den Kulturschalen abgeschabt und anschließend in einem Homogenisator aufgeschlossen. Die Fraktionierung in zytosolischen und Membrananteil erfolgte mittels Ultrazentrifugation (s. Material und Methoden). Die Fraktionen wurden zur Immunpräzipitation von Meg2 bzw. EGFR verwendet. Äquivalente Mengen Totallysat wurden zum Nachweis der Pyruvat-Kinase verwendet. EGFR und Pyruvat-Kinase dienen als Membran- bzw. zytosolischer Marker zur Kontrolle der Fraktionierung. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Auftrennung über ein SDS-Gel mittels Immunblot.

Außerdem liegt Meg2 in sehr hohen Konzentrationen in vesikulären Strukturen vor (Abb 9 F, I, K, Pfeilspitzen), deren Natur nicht genauer zuzuordnen war. Die starke perinukleäre Expression dürfte auf die Überexpression zurückzuführen sein. Im Vergleich dazu ist die Phosphatasedomäne allein zwar weiterhin zytosolisch lokalisiert, jedoch nicht mehr in der strukturierten Art, sondern eher diffus (Abb. 9 G). Auffällig ist die starke nukleäre Lokalisation der Phosphatasedomäne, welche aber auf passive Diffusion auf Grund der Proteingröße und Überexpression zurückzuführen sein dürfte. Exprimiert man die CRALBP-Domäne der PTP-Meg2 (Abb. 9 H), kann eine ähnlich strukturierte zytosolische Lokalisation beobachtet werden, wie bei Meg2.

Die gezeigten Daten führen zu dem Schluss, dass PTP-Meg2 hauptsächlich im Zytosol in einer strukturierten Weise lokalisiert ist und zudem partiell in vesikulären, granulären Strukturen angereichert ist. Ferner wird die genaue subzelluläre Lokalisation überwiegend durch die CRALBP-Domäne vermittelt.



**Abb. 9: Zelluläre Lokalisation von endogener und transient exprimierter PTP-Meg2**

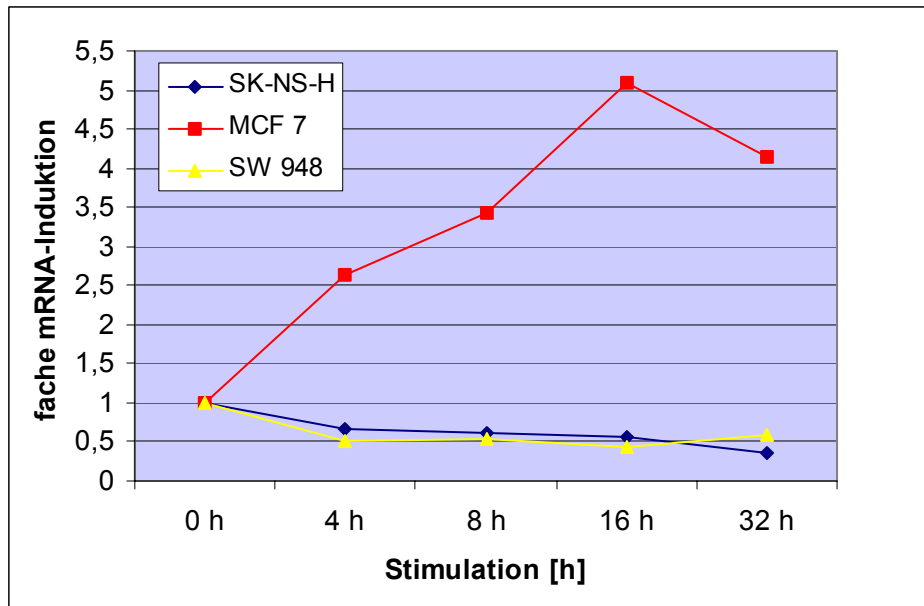
HBL-100-Zellen (A-E) wurden auf Deckgläsern fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit rattenmonoklonalem anti-Meg2-Antikörper (A) bzw. IgG (D) und sekundärem, FITC-gekoppeltem, anti-Ratte-Antikörper unterzogen. COS7-Zellen (F-M) wurden mit PTP-Meg2-Vsv (F,I-K), PTP-Meg2PD-Vsv (G), CRALBP-Vsv (H) bzw. dem Leervektor pcDNA3-Vsv (L, M) transient transfiziert, auf Deckgläsern fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit mausmonoklonalem anti-Vsv- und sekundärem, FITC-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper unterzogen. (B, E, J, M) Zellkern-Färbung. (C, K) Überlagerung FITC/DAPI.

### **3.3 Regulation der Expression und Aktivität von PTP-Meg2**

Die Aktivität von Enzymen kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Während eine entwicklungs- und gewebsspezifische Regulation häufig über die Transkription erfolgt, wird die unmittelbare Enzymaktivität im Rahmen von Signaltransduktionswegen meist durch stimulusabhängige Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, reguliert. Im folgenden Abschnitt sollte die Regulation der Expression und Phosphataseaktivität der PTP-Meg2 näher charakterisiert werden.

#### **3.3.1 Die Expression der PTP-Meg2 kann durch Differenzierungsagenzien beeinflusst werden**

Für einige PTPasen ist bekannt, dass sie eine Rolle bei Differenzierungsprozessen spielen und ihre Expression während der Differenzierung reguliert werden kann. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression von PTP-Meg2 in adhären Ten Tumorzellen durch Differenzierung reguliert werden kann. Dabei wurde auf Zelllinien zurückgegriffen, deren induzierbare Differenzierung durch Stimulanzen bereits gut charakterisiert worden war. So lassen sich die Mammarkarzinom-Linie MCF 7 mit Natriumbutyrat, die Colonkarzinom-Linie SW948 mit TPA (Phorbol-12-Myrisat-13-Acetat) und die neuronale Zelllinie SK-N-SH mit Retinolsäure differenzieren. Die Differenzierung der Zelllinien erfolgte über 32 Stunden, da sich die Expression der meisten PTPasen bereits innerhalb der ersten Stunden nach Zugabe der induzierenden Agenzien verändert. Die Expression der PTP-Meg2 wurde nach 0, 4, 8, 16 und 32 Stunden der Induktion mit den entsprechenden Agenzien mittels „Real Time PCR“ analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Induktion der Differenzierung von MCF7 zu einem fünffachen Anstieg der mRNA-Menge der PTP-Meg2 führt. Dagegen wird bei SW948 und SK-N-SH die Expression der PTP-Meg2 durch Differenzierung nicht induziert, sondern reprimiert (Abb. 10). Die Differenzierung der Zellen wurde parallel unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach 48 Stunden zeigten alle Zelllinien für Differenzierung charakteristische Morphologieänderungen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten sprechen für eine funktionelle Beteiligung von PTP-Meg2 an zellulären Vorgängen der Differenzierung.



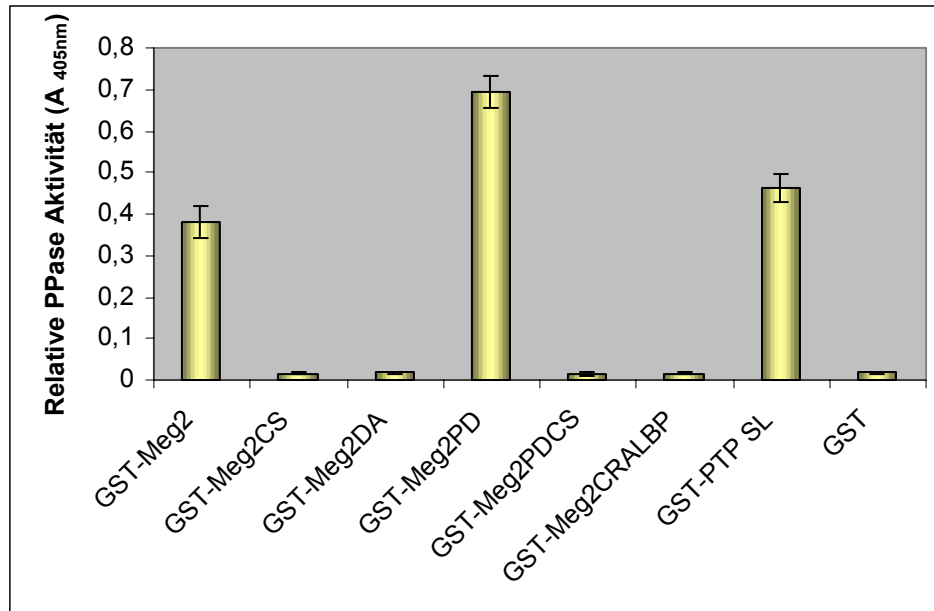
**Abb. 10: Die PTP-Meg2 Expression kann durch Differenzierungsagenzien beeinflusst werden**

SW948-, SK-N-SH- und MCF 7-Zellen wurden in 15 cm Schalen zu je 4, 6 bzw. 2,7 Mio. Zellen/Schale ausgesät und mit 1 mM TPA, 0,5  $\mu$ M Retinolsäure bzw. 1 mM Natriumbutyrat stimuliert. Zytoplasmatische RNA wurde präpariert, mit DNaseI verdaut und in cDNA umgeschrieben. Je 0,2  $\mu$ l cDNA (entspricht 150 ng gesamt-RNA) wurden für eine „Real Time PCR“-Reaktion eingesetzt (s. Material und Methoden). Die Normalisierung der Meg2-Expressionswerte erfolgte über das „Haushaltsgen“ Zyklophilin A.

### 3.3.2 Untersuchung der Meg2-Phosphataseaktivität mit rekombinanten Proteinen

PTP-Meg2 besitzt eine typische katalytische PTPase-Domäne, die 30-40% Homologie zu bekannten PTPasen aufweist. Ferner wurde für PTP-Meg2 *in vitro* eine Tyrosin-, jedoch keine Serin- bzw. Threonin-Phosphataseaktivität nachgewiesen (Gu et al., 1992). Um die Meg2-PTPase-Aktivität weiter zu charakterisieren, wurden zunächst bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine verwendet, so unter anderem Meg2, die C515S und D470A Meg2-Mutanten, die C-terminale katalytische Domäne und die N-terminale CRALBP-Domäne. Die Phosphataseaktivität dieser Fusionsproteine wurde mit p-Nitrophenylphosphat, einem synthetischen Phosphat analog, als Substrat untersucht (Abb. 11). Dabei wird deutlich, dass Meg2 *in vitro* eine Phosphataseaktivität ungefähr vergleichbar zu der von PTP-SL aufweist. Im Gegensatz dazu besitzt die C515S-Mutante, bei der das invariante, katalytisch aktive Cystein mutiert ist, erwartungsgemäß keine Aktivität. Ferner ist bei PTPasen ein konserviertes Aspartat in der katalytischen Domäne für die Katalyse von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation dieser Aminosäure zu einer Beeinträchtigung der Aktivität führt (Flint et al., 1997; Garton et al., 1996), die je nach PTPase unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Die entsprechende D470A-Mutante der PTP-Meg2 zeigt unter den Versuchsbedingungen, ähnlich

zur CS-Mutante, ebenfalls keine Aktivität mehr. Ebenso besitzt die CRALBP-Domäne wie erwartet keine PTPase-Aktivität.



**Abb. 11.: *In vitro* Phosphataseaktivität von Meg2-Fusionsproteinen**

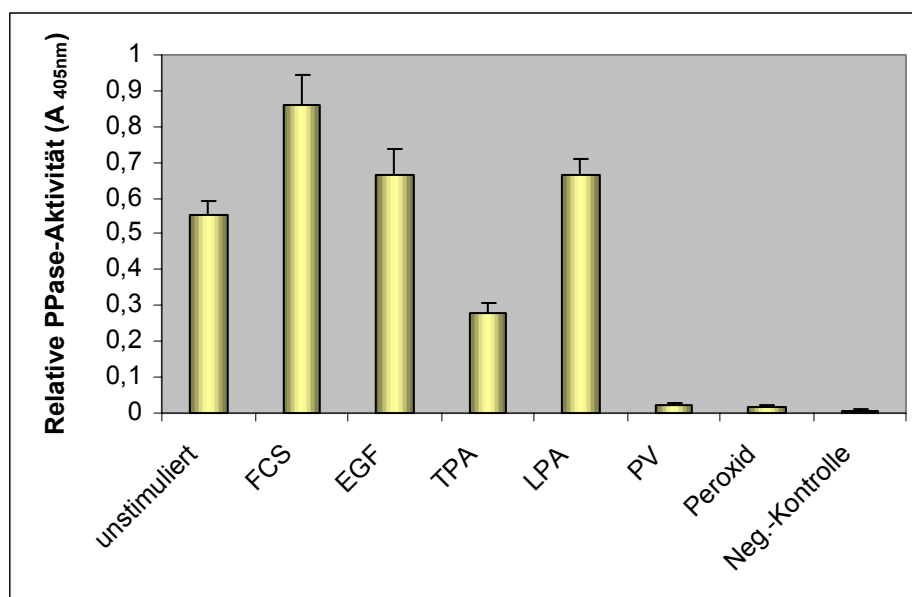
Äquimolare Mengen GST-Fusionsprotein wurden mit 10 mM pNPP-Lösung versetzt und bei 37°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Absorption der Proben bei 405 nm gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

Für einige PTPasen, wie z.B. Shp-1 und Shp-2, ist bekannt, dass nicht-katalytische Domänen zur Regulation der PTPase-Aktivität beitragen können (Dechert et al., 1994; Lechleider et al., 1993; Pluskey et al., 1995; Zhao et al., 1994a). Auch die CRALBP-Domäne könnte so eine Funktion besitzen. Daher wurde die Aktivität eines Fusionsproteins der PTPase-Domäne von Meg2 untersucht (Meg2PD). Wie Abb. 11 zeigt, besitzt die katalytische Domäne von Meg2 die annähernd doppelte Phosphataseaktivität des gesamten Enzyms. Ferner führt auch hier die Mutation des invarianten Cysteins zum Aktivitätsverlust. Dies kann bedeuten, dass die N-terminale Domäne der PTP-Meg2 eine Rolle bei der Negativregulation der Meg2-Aktivität, eventuell durch eine intramolekulare Inhibition, spielen kann.

### 3.3.3 Die Meg2-Phosphataseaktivität kann durch Stimuli reguliert werden

Um zu untersuchen, ob die katalytische Aktivität der PTP-Meg2 durch externe Stimuli moduliert wird, wurde die Phosphataseaktivität von endogener PTP-Meg2 quantifiziert. Hierzu wurden A431-Zellen mit verschiedenen Agonisten stimuliert. Nach

Immunpräzipitation gleicher Mengen endogener PTP-Meg2 wurde anschließend die PTPase-Aktivität mittels pNPP-Test gemessen (Abb. 12). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von PTP-Meg2 nach Stimulation der A431-Zellen mit TPA (Phorbol-12-Myrisat-13-Acetat) um ca. 50% inhibiert wird. Die stärkste Inhibition von Meg2 resultierte erwartungsgemäß nach Behandlung der Zellen mit Pervanadat und Peroxid, zweier potenter PTPase-Inhibitoren (Denu and Tanner, 1998; Huyer et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnte nach Stimulation mit Serum eine um ca. 50% erhöhte Aktivität gemessen werden. Nach Stimulation mit EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) sowie dem Mitogen LPA (Lysophosphatidsäure) konnte eine nur gering erhöhte Phosphataseaktivität detektiert werden. Die Aktivität der PTP-Meg2 kann demnach durch verschiedene Stimuli sowohl positiv als auch negativ moduliert werden. Die Präzipitation gleicher Mengen PTP-Meg2 wurde im Immunblot überprüft (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12: Die *in vivo* Meg2-Phosphataseaktivität wird durch verschiedene Stimuli moduliert**

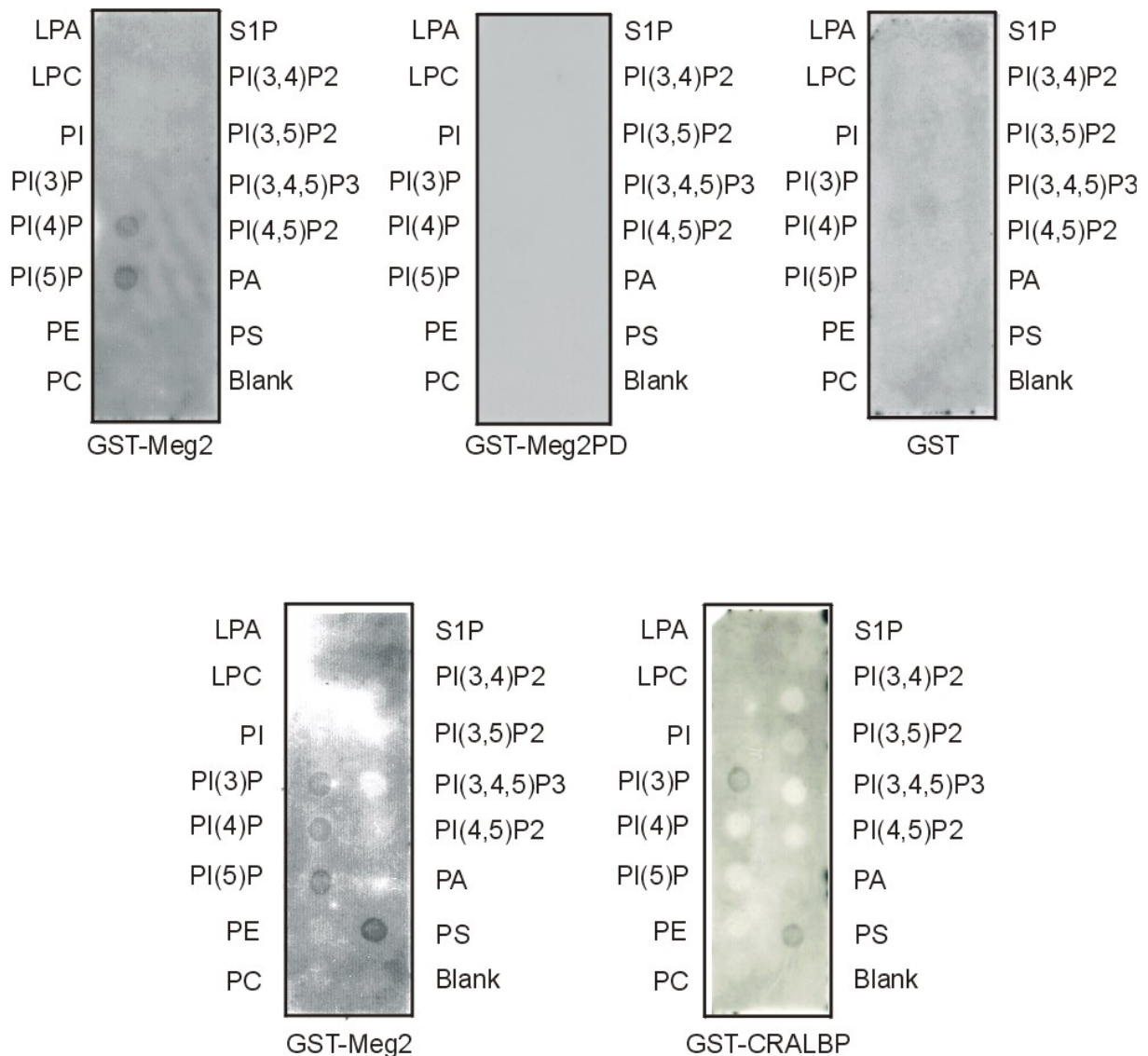
A431-Zellen wurden mit verschiedenen Liganden stimuliert, in Triton X-100-Lysepuffer ohne PPase-Inhibitoren lysiert und einer Immunpräzipitation mit monoklonalem anti-Meg2-Antikörper unterzogen. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präzipitate mit 10 mM pNPP-Lösung versetzt und bei 37°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Absorption der Proben bei 405 nm gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus 3 bis 5 voneinander unabhängigen Experimenten.

### 3.3.4 PTP-Meg2 bindet an Phospholipide und kann dadurch aktiviert werden

Die N-terminale CRALBP-Domäne der PTP-Meg2 besitzt eine Homologie zu verschiedenen Proteinen, die Lipide binden können. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Eliminierung dieser Domäne durchaus einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von



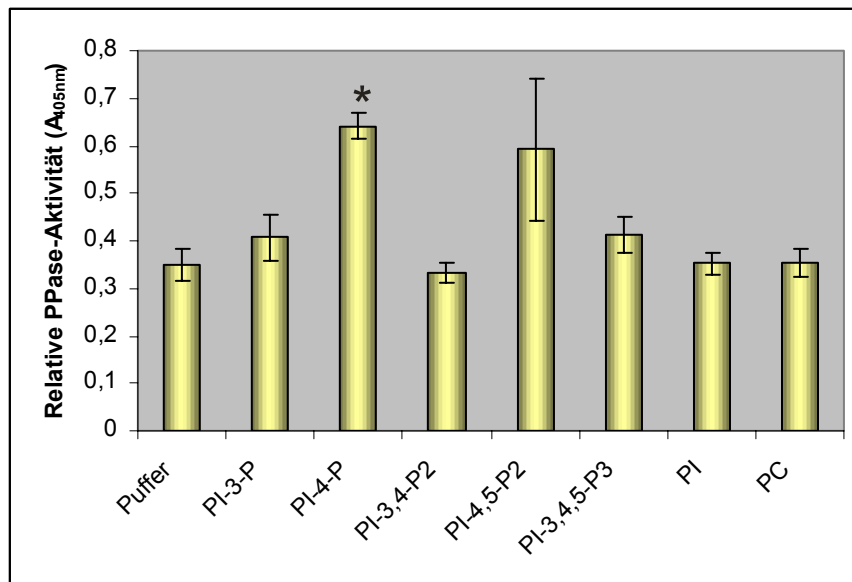
PTP-Meg2 hat. Dies gab Anlass, genauer zu untersuchen, ob PTP-Meg2 mit Lipiden interagieren kann. Hierzu wurde ein sogenannter „Protein-Lipid-Overlay“ durchgeführt. Diese qualitative Methode wurde in der Literatur bereits für die Identifikation vieler Protein-Lipid-Interaktionen beschrieben, wobei die Ergebnisse mit denen aus anderen Bindungsanalysen



### Abb. 13: PTP-Meg2 bindet an Phospholipide

Nitrozellulose-Membranen, auf die verschiedene Phospholipide (100 pmol) immobilisiert worden waren (Echelon), wurden mit verschiedenen GST-Fusionsproteinen (0,5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Immunblotanalyse mit monoklonalem anti-GST-Antikörper durchgeführt. LPA = Lysophosphatidsäure, LPC = Lysophosphocholin, PI = Phosphatidylinositol, PI(3)P = Phosphatidylinositol-3-phosphat, PI(4)P = Phosphatidylinositol-4-phosphat, PI(3,4)P2 = Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat, PI(3,5)P2 = Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat, PI(4,5)P2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PI(3,4,5)P2 = Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, PA = Phosphatidsäure, PS = Phosphatidylserin, Blank = Negativkontrolle.

korrelieren. Nitrozellulosemembranen, auf denen je 100 pmol verschiedener Lipide immobilisiert worden waren, wurden mit GST-Meg2, GST-Meg2PD, GST-CRALBP bzw. GST inkubiert. Anschließend wurde die Bindung der verschiedenen Fusionsproteine mittels Immunblot analysiert. Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigt GST-Meg2 eine Affinität zu verschiedenen Phospholipiden. So bindet GST-Meg2 an PI(4)P sowie an PI(5)P. Inkubiert man die Membrane mit der doppelten Konzentration GST-Meg2, so ist zudem noch eine Bindung an PI(3)P und Phosphatidylserin zu beobachten. Nach Inkubation der Membran mit GST-CRALBP konnte dagegen eine Bindung an PI(3)P sowie Phosphatidylserin nachgewiesen werden. Hier wurden auch mit höherer Konzentration des Fusionsproteins keine weiteren Signale erhalten. Das GST-Fusionsprotein der Phosphatase-Domäne (GST-Meg2PD) sowie GST allein zeigten keine Bindung an Lipide.



**Abb. 14:** Die *in vitro* Phosphataseaktivität von Meg2-Fusionsproteinen kann durch PIPs stimuliert werden. 100 pmol der entsprechenden Lipide wurden an Octyl-Sepharose gekoppelt, extensiv gewaschen und mit 2 µg GST-Meg2 für 40 Min. bei 37°C in pNPP-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit pNPP-Lösung (10 mM Endkonzentration) versetzt und bei 37°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Absorption der Proben bei 405 nm gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Werte sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Da die Deletion der CRALBP-Domäne die Aktivität von GST-Meg2 *in vitro* stark erhöht (Abb. 11) und die CRALBP-Domäne zudem eine Affinität von PTP-Meg2 zu bestimmten Phospholipiden bewirkt, lag die Annahme nahe, dass die Aktivität der PTP-Meg2 durch Bindung von Phospholipiden moduliert werden kann. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden verschiedene zur Verfügung stehende Phospholipide sowie Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin als Kontrolle an Octyl-Sepharose gebunden und anschließend mit GST-

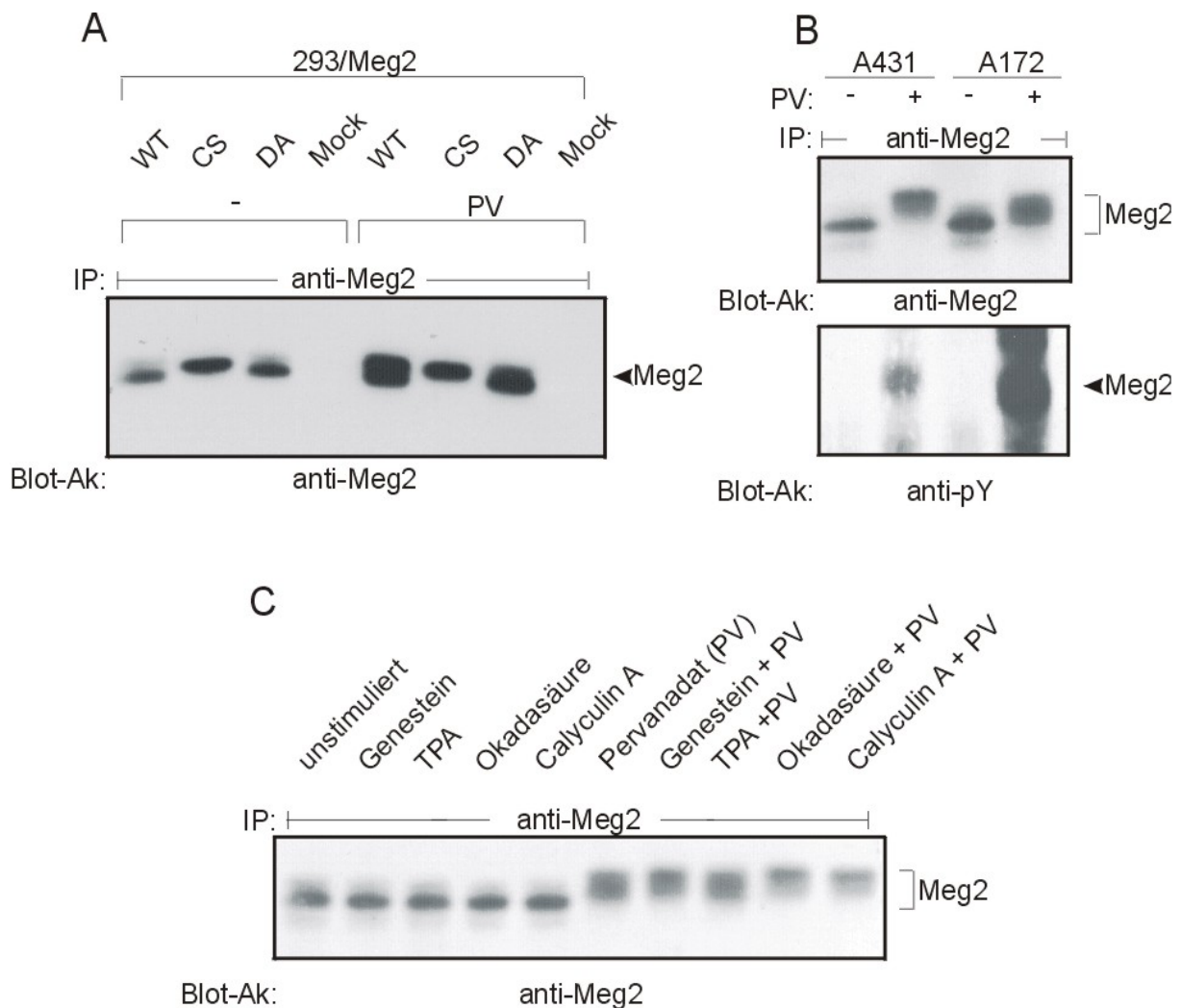
Meg2 zur Ermöglichung einer Interaktion inkubiert. Letztendlich wurde die Phosphataseaktivität der präinkubierten Fusionsproteine in einem pNPP-Test analysiert. Wie in Abb. 14 dargestellt, war die Aktivität von GST-Meg2 in Anwesenheit von PI(4)P nahezu zweifach erhöht. Dies deutet darauf hin, dass eine Bindung spezifischer Phospholipide an die CRALBP-Domäne zu einer positiven Modulation der Meg2-Aktivität beiträgt. Im Vergleich dazu war die Aktivität nach Präinkubation mit allen anderen Lipiden im Vergleich zur Kontrolle (Puffer) nicht signifikant verändert. S1P sowie PI(5)P, für die eine Interaktion mit PTP-Meg2 im „Protein-Lipid-Overlay“ nachgewiesen wurde, waren für einen Test des Einflusses auf die Meg2-Phosphataseaktivität nicht verfügbar.

### **3.3.5 PTP-Meg2 wird unter bestimmten Bedingungen modifiziert**

In einigen Experimenten konnte auffälligerweise beobachtet werden, dass PTP-Meg2 in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität unterschiedliche Mobilitätseigenschaften aufweist. Exprimiert man PTP-Meg2, die katalytisch inaktive Form PTP-Meg2C515S bzw. die katalytisch beeinträchtigte Mutante PTP-Meg2D470A in HEK 293-Zellen, so stellt man fest, dass die CS-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich geringere Mobilität im Gel besitzt, wogegen die DA-Mutante nur leicht höher als der Wildtyp läuft (Abb. 15 A). Behandelt man die Zellen mit Pervanadat, einem irreversiblen und hoch potenten PTP-Inhibitor, so tritt PTP-Meg2 als Doppelbande auf, wobei die untere Bande der Mobilität des Wildtyps und die obere Bande der geringeren Mobilität der CS-Mutante entspricht. Die Mobilität der DA-Mutante wird durch Pervanadat in geringerer Weise beeinflusst (Abb. 15 A). Dies lässt vermuten, dass PTP-Meg2 in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität modifiziert wird.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein Artefakt auf Grund der Überexpression der Proteine handelt, wurde das Laufverhalten endogener PTP-Meg2 in A431- und A172-Zellen in Abhängigkeit von Pervanadat untersucht (Abb. 15 B). Ähnlich wie nach transienter Expression konnte beobachtet werden, dass die Mobilität endogener PTP-Meg2 nach Behandlung der Zellen mit Pervanadat stark reduziert ist und die Bande im Gel deutlich höher läuft. Da es sich bei Pervanadat um einen PTP-Inhibitor handelt, lag die Vermutung nahe, dass das Laufverhalten von PTP-Meg2 auf Grund einer unterschiedlichen Tyrosinphosphorylierung verändert ist. Eine Immunblotanalyse ergab, dass die nach Pervanadat-Stimulation höher laufende PTP-Meg2-Bande Tyrosin-phosphoryliert ist, nicht dagegen die in der Mobilität unveränderte Bande (Abb. 15 B). Eine entsprechende

Phosphorylierung der in HEK 293-Zellen exprimierten CS-Mutante konnte jedoch nicht einwandfrei nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 15: PTP-Meg2 kann in modifizierter Form vorliegen**

(A) HEK 293-Zellen wurden transient mit PTP-Meg2, PTP-Meg2C515S, PTP-Meg2D470A bzw. dem pcDNA3-Leervektor transfiziert und nicht oder mit Pervanadat (1mM; 10 Min.) stimuliert. Nach Lyse, Immunpräzipitation mit monoklonalem anti-Meg2-Antikörper und Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte eine Immunblotanalyse mit polyklonalem anti-Meg2-Antikörper. (B) A431- und A172-Zellen wurden nicht oder mit Pervanadat (1mM; 10 Min.) stimuliert und lysiert. Nach Immunpräzipitation mit monoklonalem anti-Meg2-Antikörper und Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte eine Immunblotanalyse mit polyklonalem anti-Meg2-Antikörper bzw. anti-Phosphotyrosin-Antikörper. (C) A431-Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitoren wie angegeben behandelt und lysiert. Nach Immunpräzipitation mit monoklonalem anti-Meg2-Antikörper und Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte eine Immunblotanalyse mit polyklonalem anti-Meg2-Antikörper

Um eine mögliche Phosphorylierung der PTP-Meg2 genauer zu untersuchen, wurden A431-Zellen zunächst mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und anschließend die Mobilität der PTP-Meg2 untersucht. Abb. 15 C zeigt, dass weder eine Behandlung der Zellen mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Genestein, noch mit den PP1- und PP2-Inhibitoren Okadasäure bzw.

Calyculin A einen Einfluss auf die Mobilität von PTP-Meg2 besitzen. Eine Stimulation der Zellen mit TPA, das die katalytische Aktivität der PTP-Meg2 wie gezeigt um die Hälfte reduziert, hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Mobilität. Lediglich Pervanadat führt, wie vorher beobachtet, zu einer reduzierten Mobilität. Jedoch konnte nach Kostimulation der Zellen mit Pervanadat und Okadasäure bzw. Calyculin A eine leicht stärkere Reduktion der Meg2-Mobilität beobachtet werden (Abb. 15 C).

Zu einer weiteren Analyse wurden Meg2-Immünpräzipitate in einem analogen Experiment sowie nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten mit Phosphotyrosin-, Phosphothreonin- und Phosphoserin-spezifischen Antikörpern analysiert. Eine Tyrosinphosphorylierung konnte hierbei lediglich nach Pervanadat-Stimulation, eine Phosphorylierung an Serin- bzw. Threoninresten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.4 Assoziierte Proteine und Substrate**

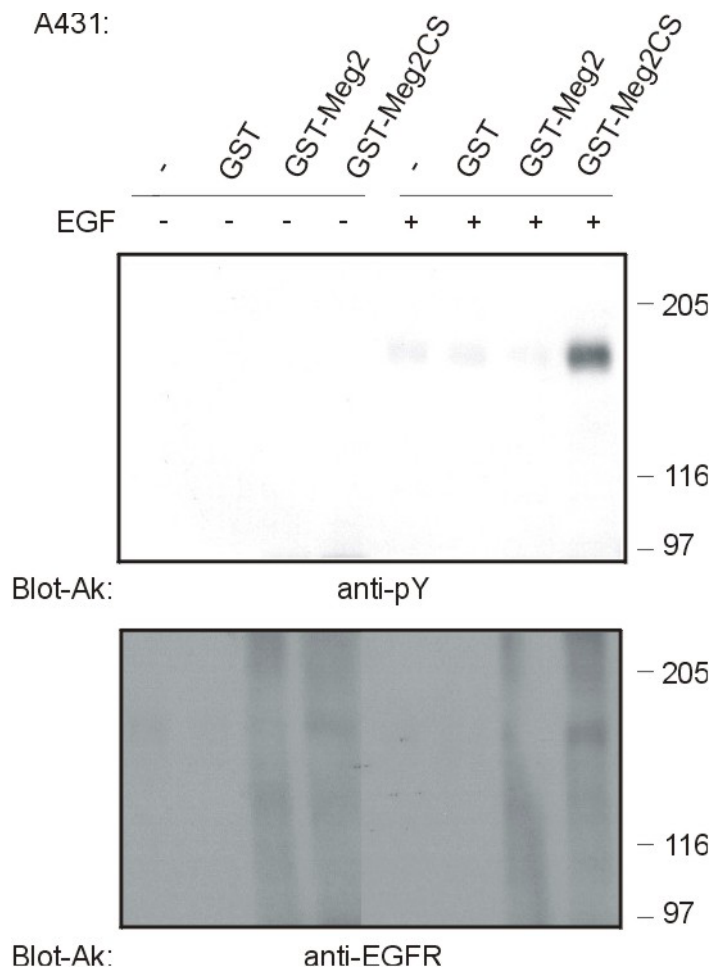
Ein Ziel der Charakterisierung von PTP-Meg2 war es, mögliche Bindungspartner und Substrate zu identifizieren. Dies kann letztendlich zu weiteren Hinweisen auf eine biologische Funktion dienen.

#### **3.4.1 PTP-Meg2 assoziiert mit dem EGF-Rezeptor *in vitro***

Um Proteine zu identifizieren, die mit PTP-Meg2 assoziieren, wurden Präzipitationen mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Hierzu wurde sowohl GST-Meg2 als auch die katalytisch inaktive Mutante GST-Meg2C515S verwendet. Katalytisch inaktive CS-Mutanten von PTPasen können als sogenannte „Substratfänger“ verwendet werden (Bliska et al., 1992; Milarski et al., 1993; Sun et al., 1993), da die Substratbindungseigenschaften der Mutanten unverändert sind, auf Grund der Katalysedefizienz jedoch das Substrat nicht umgesetzt werden kann. Dies führt zu einer Stabilisierung des ansonsten sehr kurzlebigen PTP-Substrat-Komplexes und erhöht somit die Möglichkeit einer Präzipitation.

Wechselwirkungen zwischen an Signaltransduktionsprozessen beteiligten Proteinen werden meist durch exogene Stimuli reguliert, welche Phosphorylierungskaskaden aktivieren. Da es sich bei PTP-Meg2 zudem um eine Tyrosin-Phosphatase handelt, wurden zunächst A431-Zellen mit EGF stimuliert. Die Lysate wurden mit Meg2-GST-Fusionsproteinen präzipitiert und mittels Immunblot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper hinsichtlich kopräzipitierender Proteine analysiert (Abb. 16, oben). Dabei konnte mit GST-Meg2C515S,

jedoch nicht mit GST-Meg2, ein Tyrosin-phosphoryliertes Protein von 170 kDa präzipitiert werden. Diese Bande wurde nicht in den Negativkontrollen ohne Fusionsprotein bzw. mit GST detektiert. Außer der 170 kDa Bande konnten keine weiteren Tyrosin-phosphorylierten Proteine kopräzipitiert werden. Ferner wurde ein ähnliches Ergebnis mit der Zelllinie MDA-MB 468 erhalten (Daten nicht gezeigt).

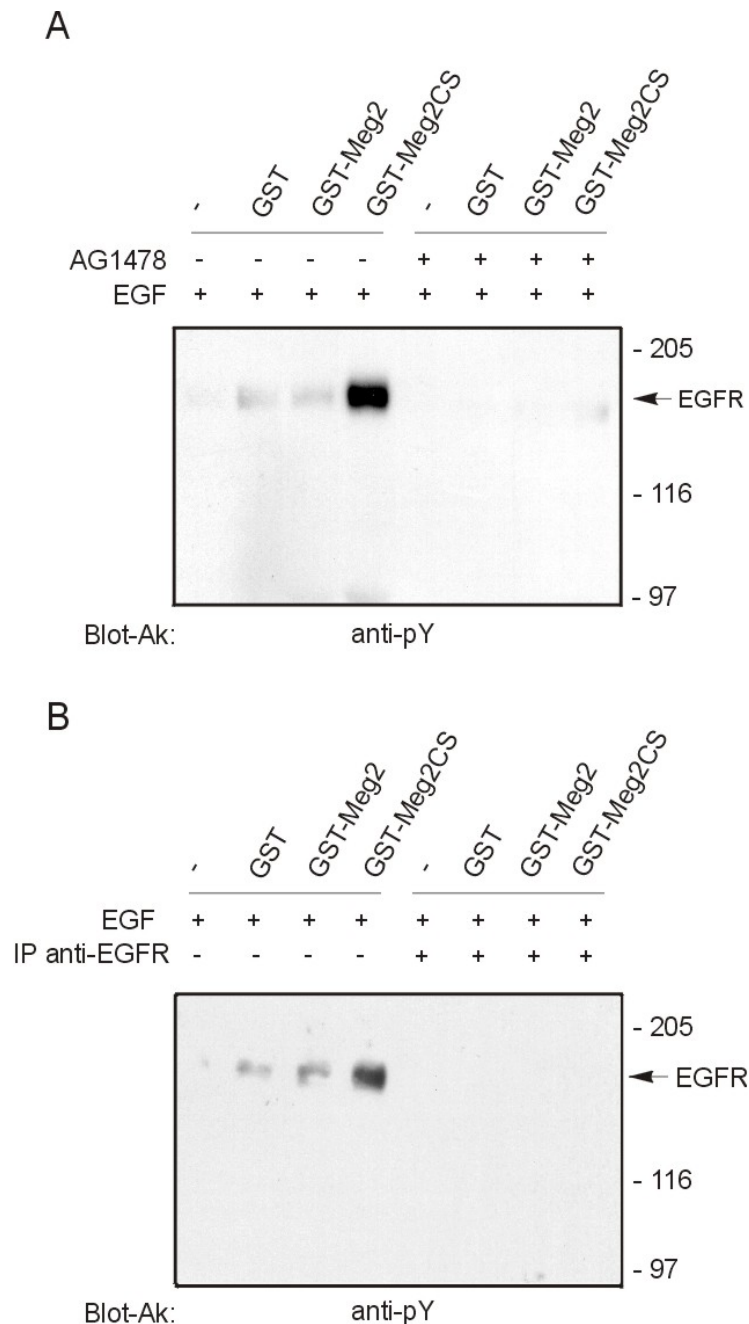


**Abb. 16: PTP-Meg2 assoziiert mit dem EGF-Rezeptor in GST-„pull-down“ Experimenten**

A431-Zellen wurden für 5 Min. mit EGF (50 ng/ml) stimuliert und einer Präzipitation mit äquimolaren Mengen GST-Fusionsproteinen wie angegeben unterzogen. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot mit einem mausmonoklonalem anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Anschließend wurde der Phosphotyrosin-Antikörper entfernt und eine Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen EGF-Rezeptor durchgeführt. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angegeben.

Da es sich bei A431 um eine Zelllinie handelt, welche eine hohe Expression des EGF-Rezeptors besitzt (Ullrich et al., 1984), und die Assoziation der 170 kDa Phosphotyrosin-Bande mit GST-Meg2CS nach EGF-Stimulation detektiert wurde (Abb. 16, oben), lag es nahe, dass es sich bei diesem Protein um den EGF-Rezeptor handelt. Daher wurde der Phosphotyrosin-Antikörper von der Membran entfernt und diese eine weiteres Mal mit einem

anti-EGFR-Antikörper inkubiert (Abb. 16, unten). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem präzipitierten Protein tatsächlich um den EGF-Rezeptor handelt. Außerdem wird deutlich, dass der EGF-Rezeptor ausschließlich mit GST-Meg2C515S und nicht mit dem



**Abb. 17: Tyrphostin und Depletion des EGFR verhindern die Detektion des p170-Proteins**

A431-Zellen wurden für 5 Min. mit EGF (50 ng/ml) stimuliert und einer Präzipitation mit GST-Fusionsproteinen wie angegeben unterzogen. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. (A) Zellen wurden vor der Stimulation mit Tyrphostin AG1478 präinkubiert. (B) Zellen wurden lysiert und die Lysate vor der Präzipitation mit GST-Fusionsproteinen einer Immunpräzipitation mit anti-EGFR-Antikörper wie angegeben unterzogen. Anschließend wurden die Lysate durch mehrmalige Inkubation mit Protein A-Sepharose von dem Antikörpers befreit. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angegeben.

Wildtyp-Fusionsprotein assoziiert, d.h. der EGFR nicht etwa durch Meg2 dephosphoryliert wird und deshalb keine Bande im Phosphotyrosin-Blot zu sehen wäre. Des Weiteren scheint die Assoziation zwischen GST-Meg2C515S und dem EGF-Rezeptor durch eine Stimulation des Rezeptors mit EGF induziert zu werden, da aus unstimulierten Zelllysaten nur eine sehr schwache EGFR-Bande präzipitiert wird (Abb. 16, unten). Die durch EGF-Stimulation induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde im Immunblot kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

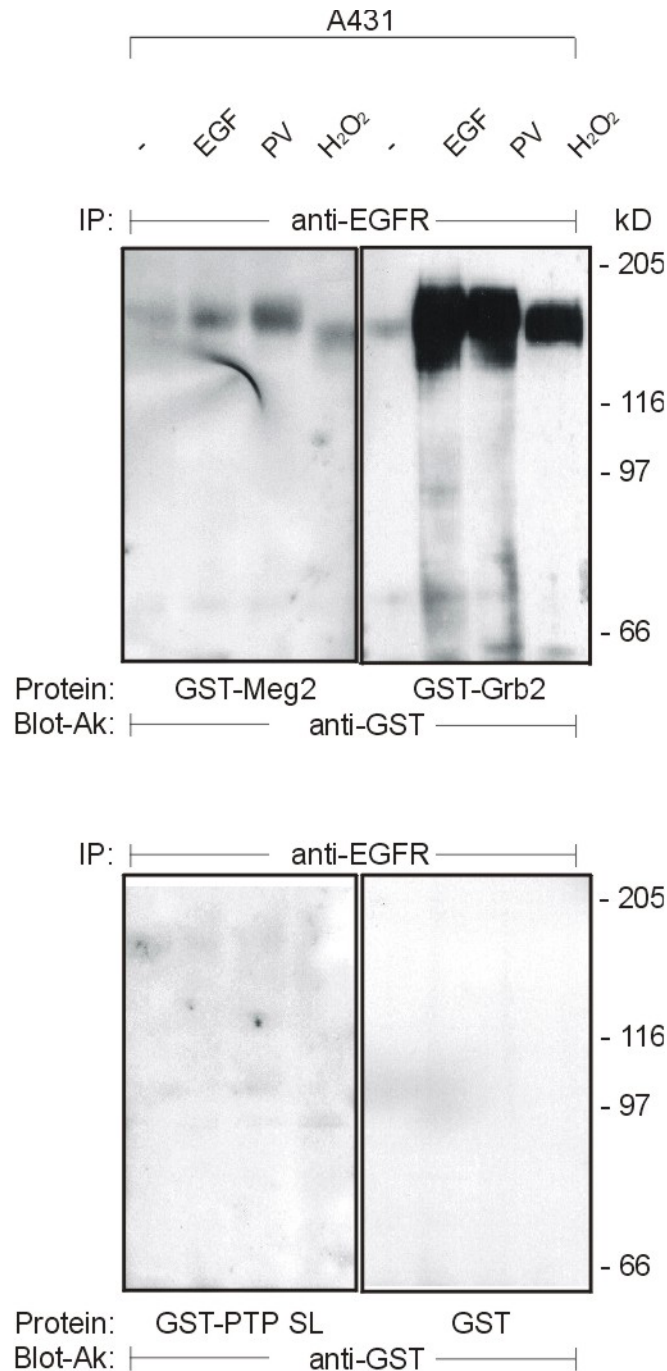
Eine analoge Präzipitation mit GST-Fusionsproteinen wurde ebenfalls mit SKBr3-Zellen durchgeführt, die eine große Menge HER2 besitzen. Sowohl mit Lysaten nicht stimulierter Zellen als auch nach Heregulin-Stimulation konnte keine HER2-Bande präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Da HER2 und EGF-Rezeptor der gleichen Familie angehören und nahe verwandt sind, spricht dies für eine gewisse Spezifität der Assoziation zwischen PTP-Meg2 und dem EGF-Rezeptor.

Die Tatsache, dass es sich bei der 170 kDa Bande um den EGF-Rezeptor handelt wurde durch zwei weitere experimentelle Ansätze bestätigt. Zum einen wurden A431-Zellen vor der Stimulation mit EGF mit Tyrphostin AG1478 präinkubiert (Abb. 17 A). Dieser spezifische Inhibitor bindet die ATP-Bindungsstelle des EGF-Rezeptors und blockiert dadurch dessen Autophosphorylierung und Aktivierung. Zum anderen wurde aus EGF-stimulierten A431-Zelllysaten vor der Präzipitation mit den GST-Fusionsproteinen der EGF-Rezeptor durch Inkubation mit einem an Protein A-Sepharose gebundenen, spezifischen anti-EGFR-Antikörper immunodepletiert (Abb. 17 B). Anschließend erfolgte wiederum eine Analyse mittels Phosphotyrosin-Blot. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mit GST-Meg2CS präzipitierende 170 kDa Phosphotyrosin-Bande sowohl nach Präinkubation mit Tyrphostin AG1478 als auch nach Immundepletion des EGF-Rezeptors nicht mehr detektierbar ist. Diese Daten sowie der direkte Immunblot gegen den EGF-Rezeptor (Abb. 17 B) zeigen, dass PTP-Meg2 nach EGF-Stimulation mit dem EGF-Rezeptor assoziiert.

### **3.4.2 PTP-Meg2 bindet den EGF-Rezeptor nach dessen Aktivierung**

Aus Abb. 16 wird deutlich, dass die Assoziation von PTP-Meg2 mit dem EGF-Rezeptor durch Stimulation des Rezeptors mit EGF induziert wird. Um die Assoziation in Abhängigkeit der Aktivierung des EGF-Rezeptors näher zu untersuchen, wurde ein „Far Western Protein Overlay“ durchgeführt. Hierzu wurden A431-Zellen mit EGF, Pervanadat bzw. Peroxid





**Abb. 18: PTP-Meg2 bindet an den aktivierten EGF-Rezeptor im „Far Western Protein Overlay“**

A431-Zellen wurden mit EGF (50 ng/ml; 5 Min), Pervanadat (1 mM; 10 Min.) und Peroxid (1 mM; 3 Min.) stimuliert. Die Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit anti-EGFR-Antikörpern unterzogen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden mit äquimolaren Mengen der angegebenen GST-Fusionsproteine inkubiert und anschließend einer Immunblotanalyse mit anti-GST-Antikörper unterzogen. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angegeben.

stimuliert. Sowohl der Ligand EGF als auch die PTP-Inhibitoren Pervanadat und Peroxid führen zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des EGF-Rezeptors. Aus den Zelllysaten wurde anschließend der EGF-Rezeptor präzipitiert. Nach Transfer auf Nitrozellulosemembran wurde diese mit verschiedenen GST-Fusionsproteinen (Meg2, Grb2, PTP-SL) inkubiert und

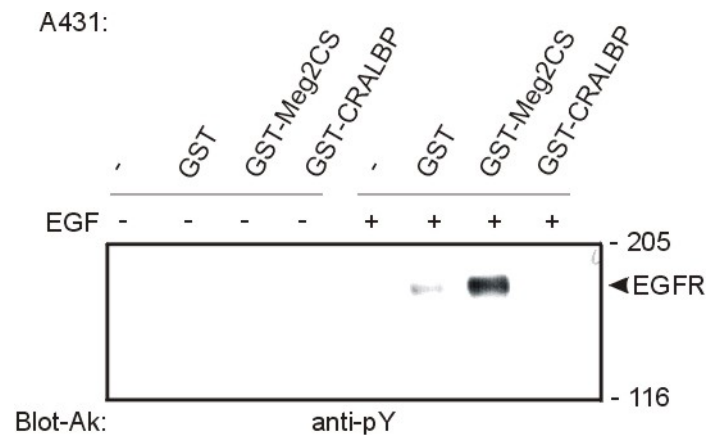
anschließend gebundenes Protein mittels Immunblot detektiert (Abb. 18). Es konnte gezeigt werden, dass GST-Meg2 nur in sehr geringer Menge an unstimulierten EGF-Rezeptor bindet. Nach dessen Phosphorylierung und Aktivierung durch Stimulation mit EGF, Pervanadat bzw. Peroxid nimmt jedoch die Bindung von GST-Meg2 deutlich zu.

Bei Grb2 handelt es sich um ein Adapterprotein, welches zum EGF-Rezeptor nach dessen Phosphorylierung rekrutiert wird, um das Signal über Sos und Ras an die MAPK-Kaskade weiterzuleiten. Dementsprechend bindet GST-Grb2, in ähnlicher Weise wie GST-Meg2, kaum an den unstimulierten EGF-Rezeptor, jedoch stark nach dessen Aktivierung durch die Agonisten. Als Negativkontrolle wurde sowohl GST als auch GST-PTP-SL verwendet, eine zytosolische Phosphatase von ähnlichem Molekulargewicht wie PTP-Meg2, die nicht mit dem EGF-Rezeptor assoziiert. Mit beiden Proteinen konnte kein Signal in Höhe des EGF-Rezeptors detektiert werden, was für die Spezifität der GST-Meg2-Assoziation spricht.

Die in Abb. 16 und 18 gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass die Assoziation von PTP-Meg2 mit dem EGF-Rezeptor nicht konstitutiv ist, sondern durch dessen Phosphorylierung und Aktivierung induziert wird.

### **3.4.3 Die CRALBP-Domäne der PTP-Meg2 vermittelt nicht die Assoziation mit dem EGF-Rezeptor**

Neben einer möglichen Rolle als Lipidbindungsdomäne wird für die CRALBP-Domäne auch eine Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen diskutiert. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die CRALBP-Domäne ausreichend ist, um die beschriebene Interaktion zwischen PTP-Meg2 und dem EGF-Rezeptor zu vermitteln. Hierzu wurde erneut eine Präzipitation von nicht oder EGF-stimulierten A431-Lysaten durchgeführt, wobei neben GST-Meg2 ein GST-CRALBP Fusionsprotein eingesetzt wurde. Die Präzipitate wurden anschließend im Phosphotyrosin-Blot analysiert. Aus Sensitivitäts- und Qualitätsgründen wurde dies einer Detektion mit einem anti-EGFR-Antikörper vorgezogen. Es konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zu GST-Meg2 mit dem GST-Fusionsprotein der CRALBP-Domäne der EGF-Rezeptor nicht präzipitiert werden konnte (Abb. 19). Dies führt zu der Annahme, dass die CRALBP-Domäne allein nicht für eine Assoziation von PTP-Meg2 mit dem EGF-Rezeptor verantwortlich ist.



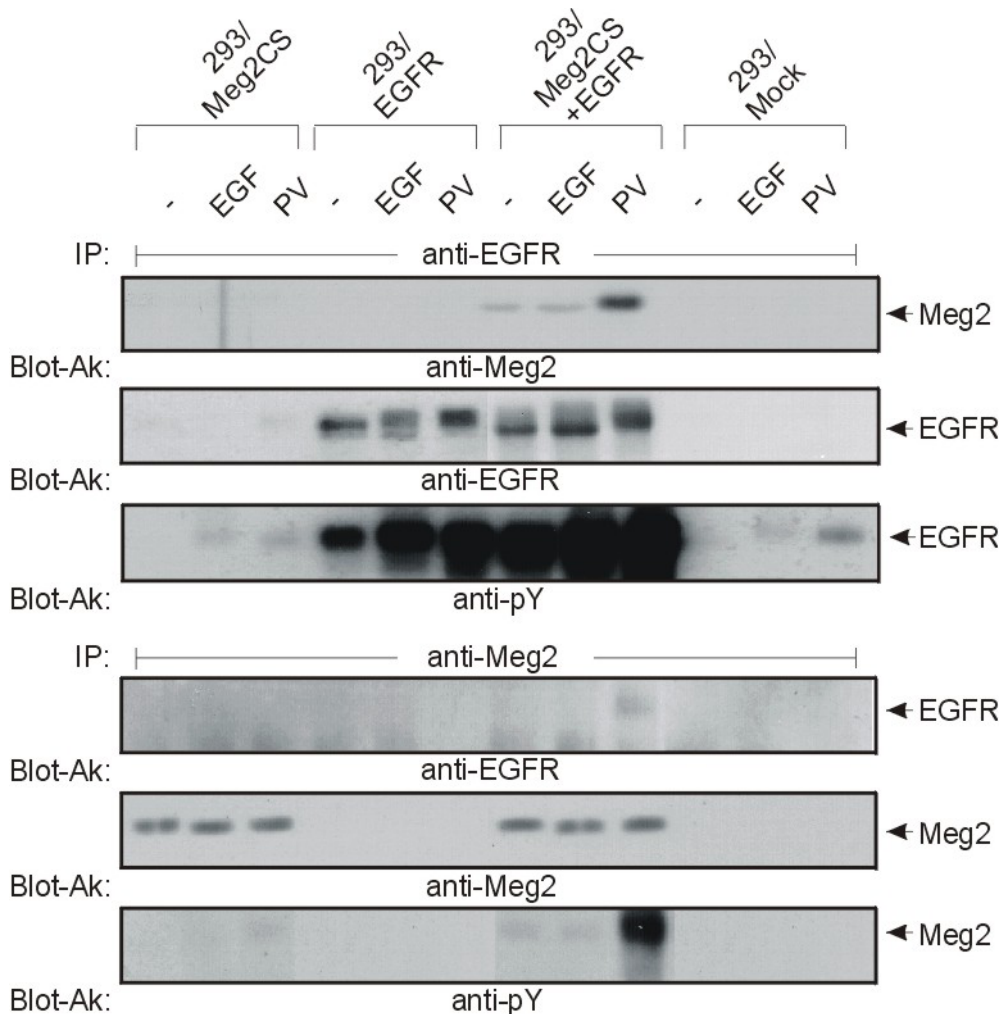
**Abb. 19: Der EGF-Rezeptor assoziiert nicht mit der CRALBP-Domäne der PTP-Meg2**

A431-Zellen wurden für 5 Min. mit EGF (50 ng/ml) stimuliert und einer Präzipitation mit GST-Fusionsproteinen wie angegeben unterzogen. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angegeben.

### 3.4.4 Koimmunpräzipitation von PTP-Meg2 und EGF-Rezeptor in HEK 293-Zellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass PTP-Meg2 *in vitro* mit dem EGF-Rezeptor nach dessen Aktivierung assoziiert. Im folgenden wurde diese Assoziation im zellulären Kontext, d.h. unter physiologischeren Bedingungen untersucht. Hierzu wurde eine Koimmunpräzipitationsanalyse mit monoklonalem anti-EGFR-Antikörper und transfizierten HEK 293-Zelllysaten, die nicht bzw. mit EGF oder Pervanadat stimuliert worden waren, durchgeführt. Abb. 20 (oben) zeigt eine Assoziation von PTP-Meg2C515S mit dem EGF-Rezeptor in Zellen, welche beide Proteine exprimieren. Die Assoziation beider Proteine konnte auffälligerweise schon bei unstimulierten Zellen beobachtet werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass der EGF-Rezeptor auf Grund der Überexpression schon bei unstimulierten Zellen, in einer nach EGF-Stimulation vergleichbaren Stärke, basal Tyrosin-phosphoryliert ist (Abb. 20, dritter Blot). Nach Stimulation der Zellen mit Pervanadat konnte zudem mehr PTP-Meg2C515S mit dem EGF-Rezeptor kopräzipitiert werden als vergleichsweise nach Stimulation mit EGF. Da die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors nach Pervanadat-Stimulation ebenfalls höher ist als nach EGF-Stimulation, lässt sich folgern, dass eine stärkere Tyrosinphosphorylierung die Assoziation beider Proteine begünstigt. Obwohl exprimiert, konnten in dem Experiment aus Sensitivitätsgründen kein endogener EGF-Rezeptor bzw. PTP-Meg2 detektiert werden (Abb. 20, zweiter u. fünfter Blot). Dementsprechend war der endogene EGF-Rezeptor nicht für eine Kopräzipitation der alleine überexprimierten Phosphatase ausreichend.

Die Interaktion von PTP-Meg2CS und dem EGF-Rezeptor wurde zudem durch das reziproke Experiment bestätigt. Nach Präzipitation der PTP-Meg2CS aus den gleichen Lysaten konnte bei Stimulation der Zellen mit Pervanadat der EGF-Rezeptor detektiert werden (Abb. 20, vierter Blot). Da das Signal relativ schwach ist, dürfte eine verfehlte Kopräzipitation aus nicht stimulierten bzw. EGF-stimulierten Lysaten ein Sensitivitätsproblem des sekundären anti-EGFR-Antikörpers sein.



**Abb. 20: Koimmunpräzipitation von PTP-Meg2 und EGF-Rezeptor in transfizierten HEK 293-Zellen**

HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten von PTP-Meg2C515S, EGFR oder dem pcDNA3-Leervektor transient transfiziert. Nach Stimulation mit EGF (50 ng/ml; 3 Min.) bzw. Pervanadat (1 mM; 10 Min.) wurden die Zellen lysiert und einer Immunpräzipitation mit monoklonalen anti-EGFR- bzw. anti-Meg2 Antikörpern unterzogen. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte eine Immunblotanalyse mit anti-Meg2-, anti-EGFR- bzw. anti-Phosphotyrosin-Antikörpern.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die beschriebene, nach Pervanadat-Stimulation auftretende Tyrosinphosphorylierung der PTP-Meg2 nach Koexpression mit dem EGF-Rezeptor stark verstärkt ist (Abb. 20, unten). Zudem führt die Koexpression beider

Proteine auch zu einer schwachen Tyrosinphosphorylierung nach EGF-Stimulation. Die bereits vorliegende Meg2-Phosphorylierung bei unstimulierten Zellen dürfte wiederum auf die basale Phosphorylierung und Aktivität des EGF-Rezeptors zurückzuführen sein. Somit könnte eine Rekrutierung der PTP-Meg2 an den EGF-Rezeptor möglicherweise zu deren Phosphorylierung führen.

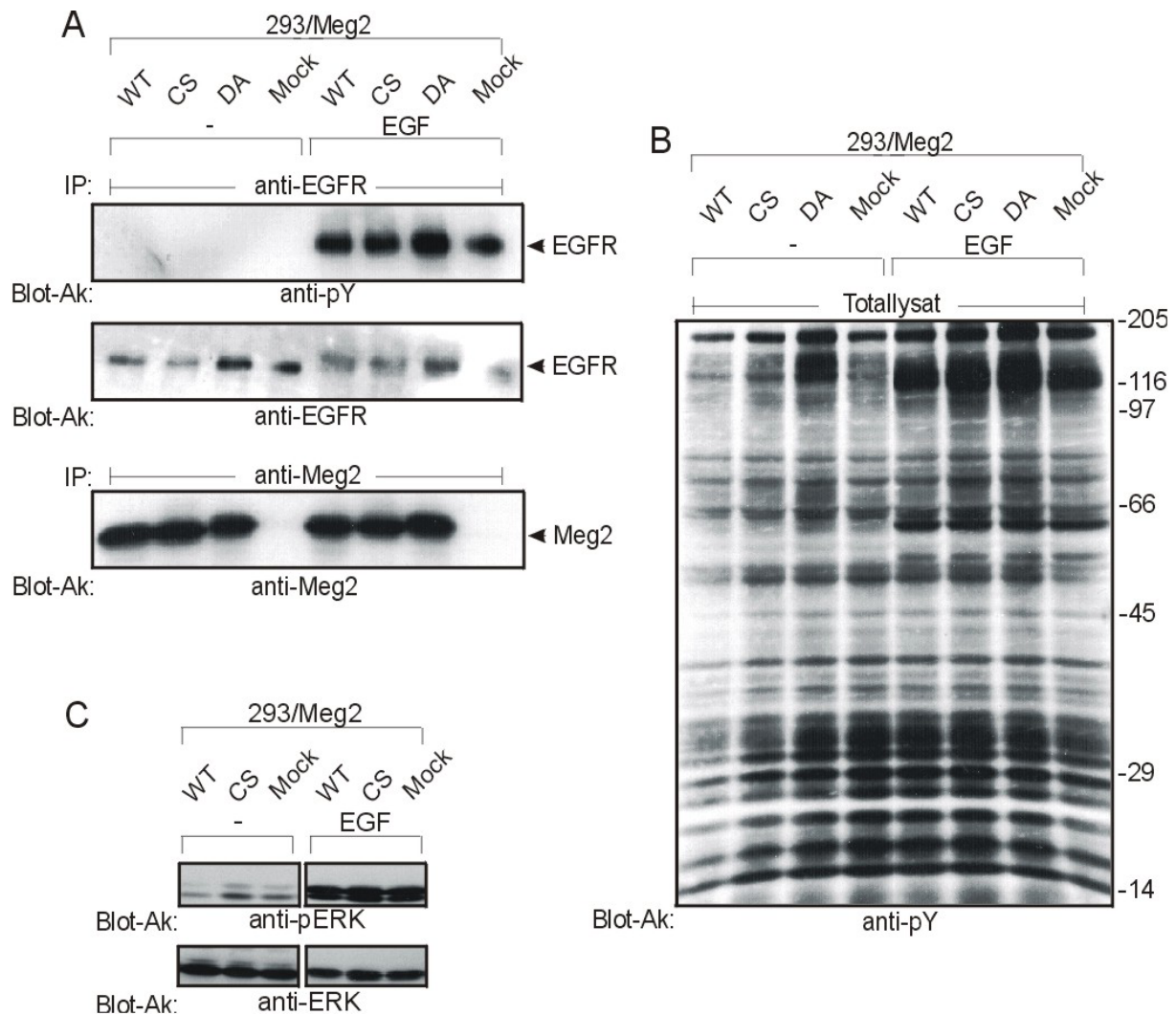
Letztendlich wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen versucht, eine Assoziation von endogenem EGF-Rezeptor und endogener PTP-Meg2 in A431-Zellen nachzuweisen. Dabei konnte in Meg2-Präzipitaten nicht eindeutig der EGF-Rezeptor nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch im reziproken Experiment konnte nach Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors keine assoziierte PTP-Meg2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.5 Der EGF-Rezeptor ist kein Substrat der PTP-Meg2**

Es konnte gezeigt werden, dass PTP-Meg2 zumindest unter bestimmten Bedingungen mit dem EGF-Rezeptor nach dessen Aktivierung assoziieren kann. Eine Tyrosinphosphorylierung der PTP-Meg2 konnte lediglich nach Pervanadat-Stimulation, nicht jedoch nach EGF-Stimulation detektiert werden. Dieser Effekt von Pervanadat dürfte zudem auch eher auf die Inhibition von PTPasen, welche direkt eine Phosphorylierung von PTP-Meg2 regulieren, als auf die mit der Inhibition von PTPasen verbundenen Aktivierung des EGF-Rezeptors zurückzuführen sein. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob PTP-Meg2 die durch EGF induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors bzw. des Gesamtzelllysats beeinflusst.

Hierzu wurden Meg2 bzw. die katalytisch inaktiven Mutanten Meg2C515S und Meg2D470A in HEK 293-Zellen transient exprimiert. Nach Stimulation mit EGF und Immunpräzipitation des endogenen EGF-Rezeptors wurde dessen Tyrosinphosphorylierung mittels Immunblot analysiert (Abb. 21 A). Dabei zeigte weder die Expression von PTP-Meg2 noch die der CS- bzw. DA-Mutanten einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors. Totalllysate der gleichen Zellen wurde ebenfalls hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus untersucht (Abb. 21 B). Auch hier konnte kein Einfluss auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine nach Expression von PTP-Meg2 bzw. der katalytisch inaktiven Mutanten beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass PTP-Meg2 den EGF-Rezeptor nicht direkt dephosphoryliert bzw. nicht die EGF-induzierte Phosphorylierung zellulärer Proteine reguliert. In einem weiteren Experiment wurde zudem die ERK-Phosphorylierung der gleichen Lysate mit einem Antikörper untersucht, welcher

spezifisch die zur Aktivierung führende Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 erkennt. Auch hier konnte kein Einfluss der verschiedenen Meg2-Proteine auf die ERK1/2-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation beobachtet werden. Jedoch war eine leicht erhöhte basale Phosphorylierung von ERK1/2 in HEK 293-Zellen, die mit PTP-Meg2C515S transfiziert worden waren, detektierbar (Abb. 21 C).



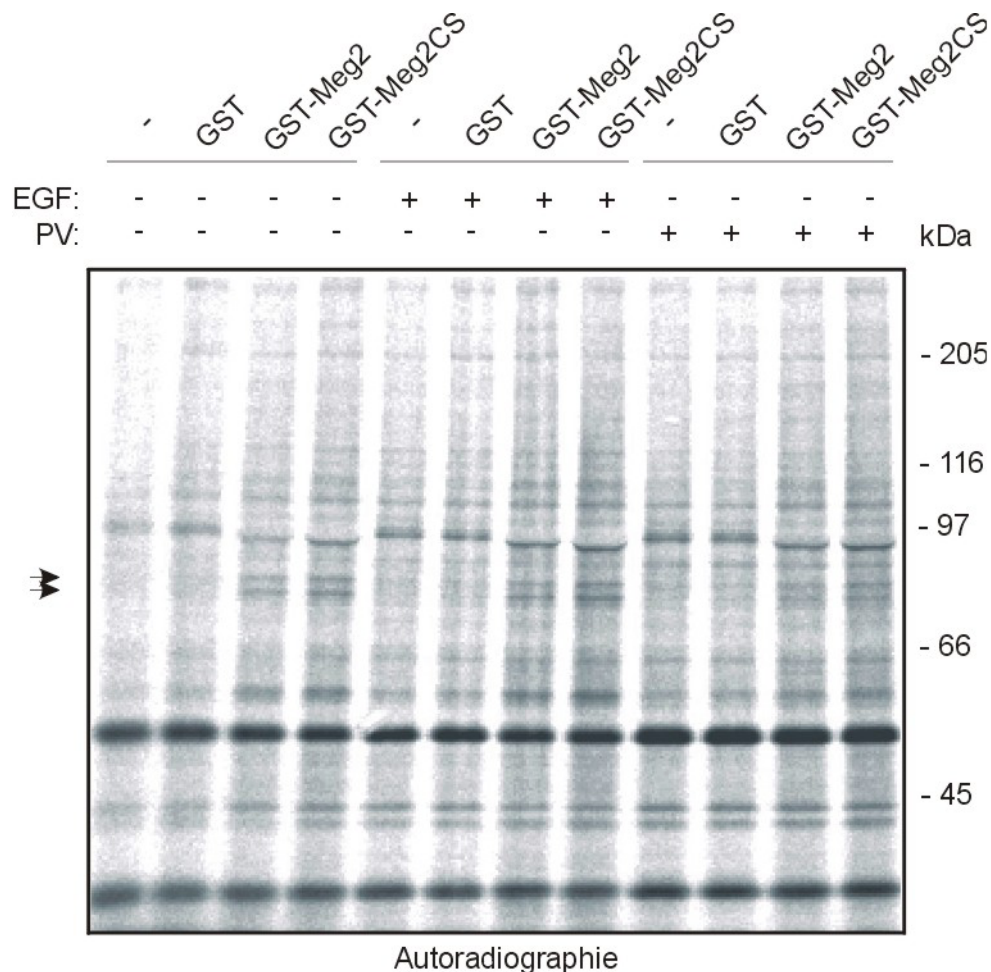
**Abb. 21: PTP-Meg2 hat keinen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors und des Gesamtzelllysats**

HEK 293-Zellen wurden transient mit Leervektor bzw. Meg2, Meg2C515S sowie Meg2D470A im pcDNA3-Vektor transfiziert. Nach Stimulation mit EGF (50 ng/ml; 5 Min.) wurde der EGF-Rezeptor immunpräzipitiert und mittels 7.5%iger SDS-PAGE aufgetrennt (A). Anschließend erfolgte eine Immunblotanalyse mit anti-Phosphotyrosin-, anti-EGFR- bzw. anti-Meg2-Antikörpern. Totallysate der gleichen Zellen wurde in einem 10%igem SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (B) bzw. einem Phospho-Erk- sowie ERK-Antikörper (C) analysiert.



### 3.4.6 Weitere mit PTP-Meg2 assoziierende Proteine

Um weitere Proteine zu identifizieren, die mit PTP-Meg2 assoziieren, wurden A431-Zellen mit radioaktivem [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Um gleichzeitig Informationen über eine Regulation der Wechselwirkung potentieller Assoziationspartner mit PTP-Meg2 zu erhalten, wurden die Zellen vor der Lyse mit verschiedenen Agonisten stimuliert, welche eine Reihe



**Abb. 22: Präzipitation von [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierten Zelllysaten mit GST-Meg2-Fusionsproteinen**

A431-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert, mit EGF (50 ng/ml; 5 Min.) bzw. Pervanadat (1 mM; 10 Min.) stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden einer Präzipitation mit äquimolaren Mengen der jeweiligen Fusionsproteine unterzogen, die Präzipitate mittels SDS-PAGE (7,5-12%) aufgetrennt und die Proteine über Autoradiographie detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts in kDa angegeben.

spezifischer Signaltransduktionswege aktivieren. Anschließend wurden die Lysate, ähnlich wie auch unter 3.4.1, für eine Präzipitation mit GST-Meg2 und der PTPase-inaktiven Mutante GST-Meg2C515S verwendet. So können alle Proteine, welche mit PTP-Meg2 präzipitieren, unabhängig von möglichen Modifikationen über Autoradiographie detektiert werden. Dabei

konnten sowohl mit GST-Meg2 als auch mit GST-Meg2C515S zwei Proteine von ca. 80-90 kDa Molekulargewicht präzipitiert werden (Abb. 22). Beide Proteine wurden nicht mit GST alleine bzw. der Kontrolle ohne Fusionsprotein präzipitiert. Auffällig war, dass beide Proteine sowohl aus Lysaten unstimulierter Zellen, sowie nach Stimulation mit EGF bzw. Pervanadat (Abb. 22), als auch Serum und LPA (Daten nicht gezeigt) präzipitiert wurden. Somit lässt sich auf eine konstitutive Assoziation dieser Proteine mit Meg2 schließen.

Im weiteren Verlauf wurde versucht, die *in vitro*-Assoziation im präparativen Maßstab zu wiederholen, um die präzipitierten Proteine anzureichern und über Edman-Sequenzierung zu identifizieren. Der Ansatz war jedoch nicht erfolgreich, da die Proteine nicht stark und sauber genug angereichert werden konnten und so nicht eindeutig in der Coomassie-Färbung zu erkennen waren.

### **3.5 Biologische Funktion der PTP-Meg2**

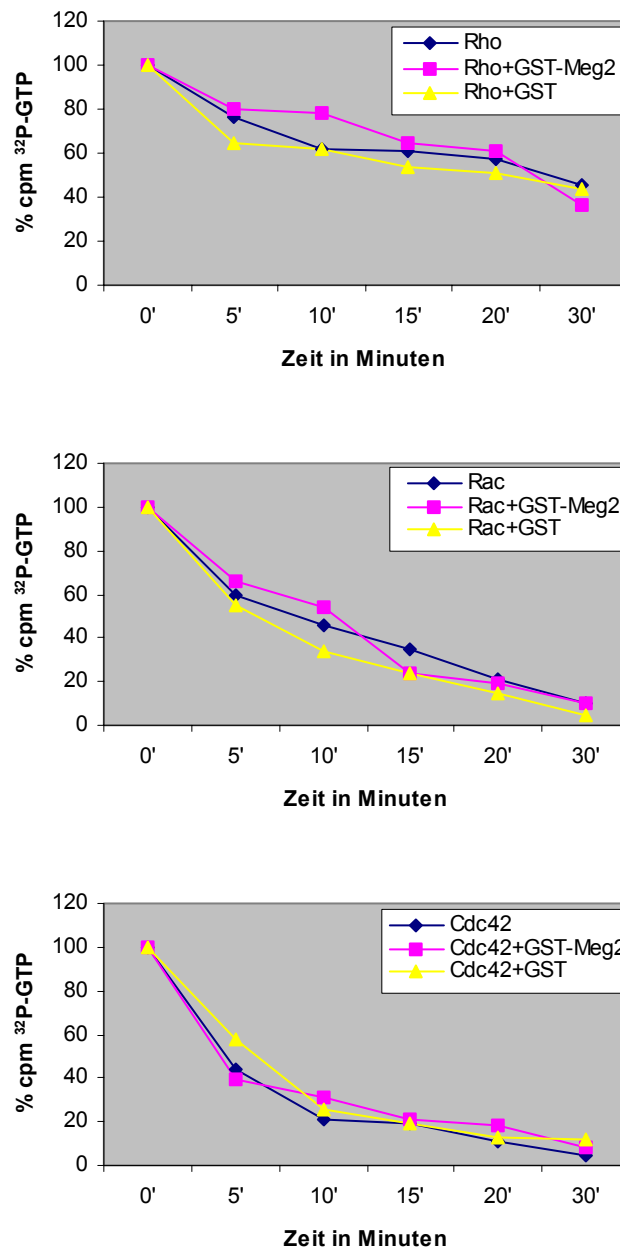
Neben der Identifikation von Assoziationspartnern sind Informationen über die biologische, zelluläre Funktion eines Proteins interessant. Die Signaltransduktionswege an denen PTPasen regulatorisch beteiligt sind, können vielfältiger Natur sein. Ihre Beteiligung reicht von entwicklungsspezifischen Prozessen bis hin zur Steuerung komplexer zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Migration (Angers-Loustau et al., 1999b; Arregui et al., 2000; Avraham et al., 2000; den Hertog, 1999; Van Vactor, 1998). Eine deregulierte Proliferation bzw. Migration stellen zudem wichtige Faktoren dar, die zur Tumorentstehung und -progression beitragen. Bei der Untersuchung der biologischen Funktion von PTP-Meg2 wurde daher ein besonderes Augenmerk auf solche Prozesse gelegt.

#### **3.5.1 PTP-Meg2 hat keine GAP-Aktivität bezüglich Rho-GTPasen**

Kürzlich wurde veröffentlicht, dass eine Reihe humaner Proteine, ähnlich wie die N-terminale CRALBP-Domäne der PTP-Meg2, Sequenzhomologien zu Sec14p, einem Lipidtransferprotein der Hefe *S. cerevisiae*, besitzen (Aravind et al., 1999). Bei diesen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um GAPs (GTPase Activating Protein), welche die Aktivität kleiner GTPasen der Rho- und Ras-Familie stimulieren. Es wurde diskutiert, dass solche Proteine mit Sec14p-homologen Domänen zur Regulation von Ras- oder Rho- Proteinen beitragen. Dies gab Anlass, in einem relativ einfachen Experiment zu untersuchen, ob PTP-Meg2 als GAP für



GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) fungieren kann. Hierzu wurden GST-Fusionsproteine von Rho, Rac und Cdc42 mit radioaktivem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  beladen und anschließend zusammen mit GST bzw. GST-Meg2 für verschiedenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulosefilter immobilisiert, gewaschen und die



**Abb. 23: PTP-Meg2 besitzt keine GAP-Aktivität bezüglich Rho, Rac und Cdc42**

GST-Rho, -Rac, und -Cdc42 wurden mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  beladen und anschließend allein oder mit GST-Meg2 bzw. GST für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert (siehe Material und Methoden). Alle Proben wurden danach durch Nitrozellulosefilter gesaugt und gewaschen. Die Radiaktivität des verbleibenden  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ s der auf den Filtern immobilisierten GTPasen wurde in einem Scintillator gemessen. Die Radioaktivität zum Zeitpunkt  $t = 0$  Min. wurde gleich 100% gesetzt.

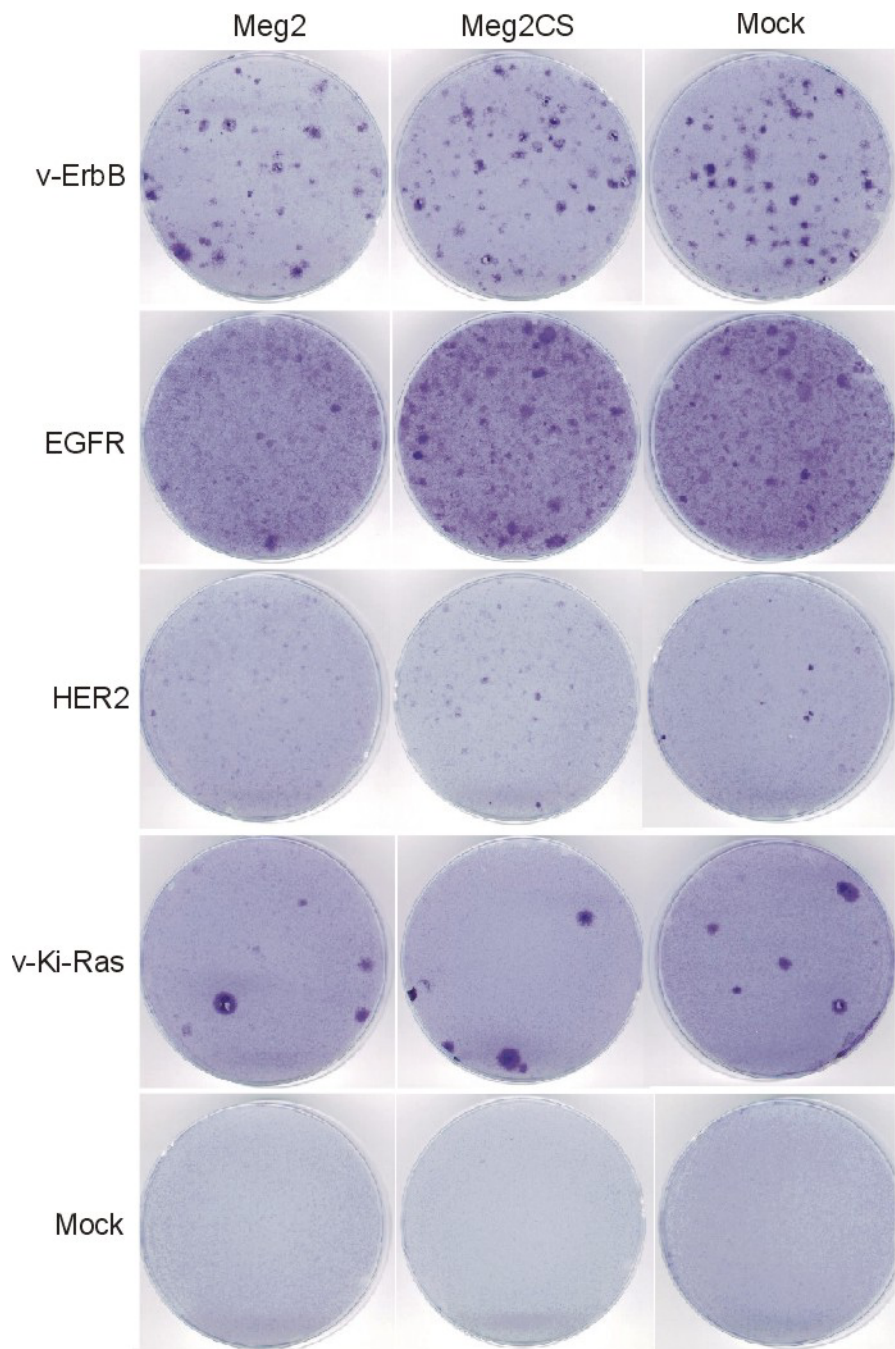
Radioaktivität des durch die jeweiligen GTPasen nicht umgesetzten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  scintillatorisch gemessen. Aus Abb. 23 geht hervor, dass der Umsatz des  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  zu GDP, d.h. die GTPase-Aktivität von Rho, Rac sowie Cdc42, weder durch GST noch durch GST-Meg2 beeinflusst wurde. Dementsprechend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass PTP-Meg2 keine GAP-Aktivität bezüglich GTPasen der Rho-Familie besitzt.

### **3.5.2 PTP-Meg2 inhibiert die von v-ErbB und dem EGF-Rezeptor vermittelte Transformation von Zellen im Focusbildungstest**

Normale Zellen proliferieren nur solange, bis sie in Kontakt zueinander treten und ringsherum von anderen Zellen umgeben sind. Der Verlust dieser sogenannten Kontaktinhibition ist eines der charakteristischen Merkmale von transformierten Zellen. In der Nagerfibroblastenzelllinie NIH3T3 kann man durch Infektion mit Onkogenen eine Transformation durch Verlust der Kontaktinhibition herbeiführen. Dadurch wachsen die transformierten Zellen in mehreren Schichten übereinander und bilden sogenannte Foci, welche sich mit Kristallviolett anfärben lassen.

Um den Einfluss von PTP-Meg2 auf diesen Prozess zu untersuchen wurden zunächst stabile polyklonale NIH3T3-Zellen generiert, welche das Meg2-Wildtypprotein bzw. die katalytisch inaktive C515S-Mutante konstitutiv exprimieren. Anschließend wurden diese Zellen mit verschiedenen Onkogenen infiziert. Hierzu wurden der EGF-Rezeptor, HER2, ein sehr häufig in Tumoren überexprimiertes Mitglied der EGFR-Familie, v-ErbB, ein Onkogen aus dem Avian-Erythroblastosis-Virus, und das konstitutiv aktive v-Ki-Ras verwendet. Dabei konnte beobachtet werden, dass PTP-Meg2 sowohl die von v-ErbB als auch vom EGF-Rezeptor induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen deutlich unterdrückt, was an der stark reduzierten Anzahl der hervorgerufenen Foci im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle zu erkennen ist (Abb. 24). Vergleicht man dagegen die Leervektor-Kontrolle mit den Zellen, welche die katalytisch inaktive Meg2C515S-Mutante exprimieren, lässt sich ein entgegengesetzter Effekt feststellen. So ist hier die Anzahl der durch v-ErbB bzw. den EGF-Rezeptor induzierten Foci erhöht. Sowohl PTP-Meg2 als auch PTP-Meg2C515S zeigen keinen Einfluss auf eine durch HER2 oder durch v-Ki-Ras hervorgerufene Transformation der NIH3T3-Zellen.

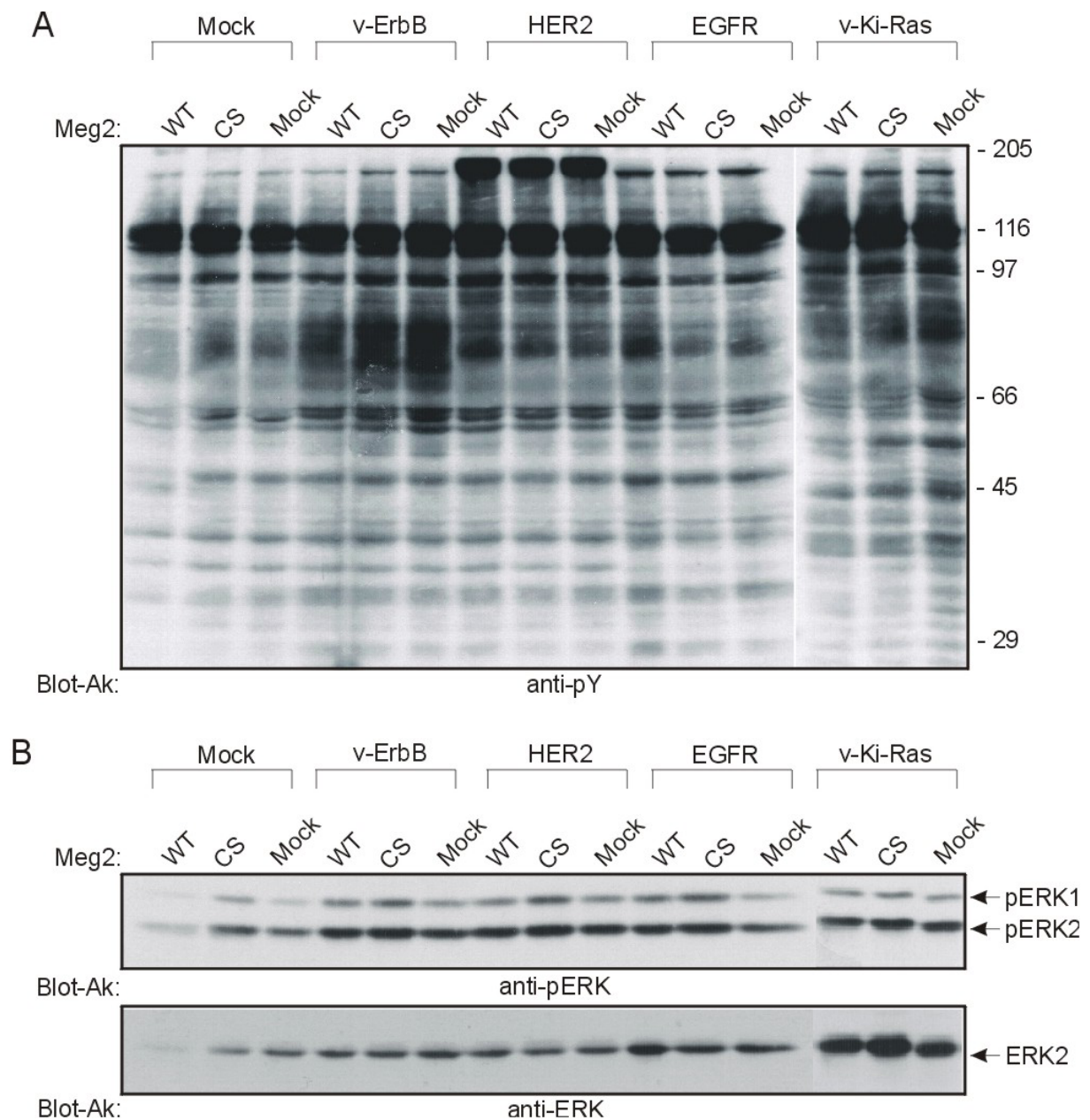
Die Expression der Onkogene sowie der PTP-Meg2 Proteine wurde in einem parallelen Ansatz mittels Immunblotanalyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde die Gesamttyrosinphosphorylierung der Zellen mittels Immunblot analysiert (Abb. 25 A). Hierbei war zu



**Abb. 24: PTP-Meg2 kann die durch v-ErbB und EGFR induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen supprimieren**

Polyklonale NIH3T3-Mausfibroblasten, die stabil mit PTP-Meg2, PTP-Meg2C515S bzw. dem Leervektor transfiziert worden waren, wurden mit  $2 \times 10^5$  Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät, mit viralen Überständen der Onkogene v-ErbB, EGFR, HER2 und v-Ki-Ras infiziert und 14 Tage in DMEM mit 4% FCS gehalten. Bei EGFR-infizierten Zellen wurde dem Medium 10 ng/ml EGF zugegeben. Anschließend wurden die Foci mit Kristallviolett-Lösung fixiert und angefärbt.

beobachten, dass die stabile Expression der Meg2-Proteine keine Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung der Totallysate verursacht, wodurch unspezifische Effekte ausgeschlossen werden können. Da alle verwendeten Onkogene letztendlich auch zu einer



**Abb. 25: PTP-Meg2C515S erhöht die basale und durch Onkogene induzierte ERK-Phosphorylierung**

Polyklonale, stabil mit PTP-Meg2, PTP-Meg2C515S bzw. dem Leervektor transfizierte NIH3T3-Zellen wurden mit  $2 \times 10^5$  Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät, mit viralen Überständen der Onkogene v-ErbB, EGFR, HER2 und v-Ki-Ras infiziert, 14 Tage in DMEM mit 4% FCS gehalten und lysiert. Die Lysate wurden über ein 10%iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper (A) bzw. anti-phosphoERK-Antikörper und anti-ERK-Antikörper (B) analysiert.

Aktivierung von ERK1/2 führen, wurde zudem die ERK-Phosphorylierung mit einem Antikörper untersucht, welcher spezifisch die zur Aktivierung führende Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 erkennt (Abb. 25 B). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Expression von PTP-Meg2C515S zu einer leichten Erhöhung der von v-ErbB, EGFR und HER2 induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Dagegen wird die durch v-Ki-Ras induzierte

Phosphorylierung nicht beeinflusst. Ferner war zu beobachten, dass PTP-Meg2C515S bereits bei nicht infizierten Zellen zu einer Erhöhung der basalen ERK-Phosphorylierung führt.

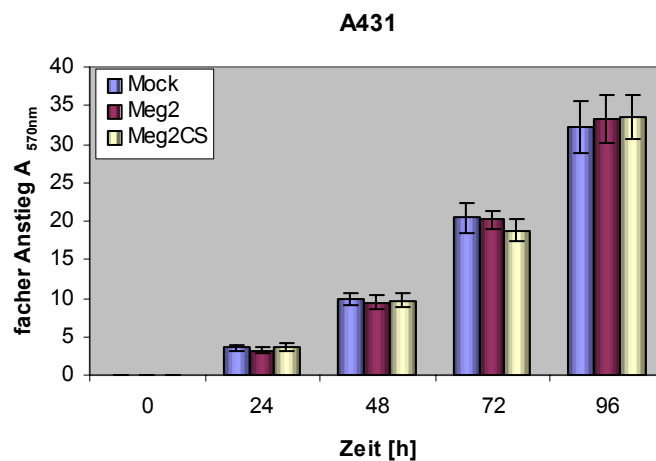
### **3.5.3 PTP-Meg2 hat keinen Einfluss auf die Zellproliferation**

Die Kontrolle der Proliferation ist für die Integrität eines Organismus von eminent wichtiger Bedeutung. Unkontrollierte Proliferation ist ein Hauptmerkmal bei der Transformation von Zellen und der Entstehung von Tumoren. Um zu untersuchen, ob PTP-Meg2 einen Einfluss auf die Proliferationsrate hat, wurden mit A431- sowie NIH3T3-Zellen, welche den Leervektor, PTP-Meg2 bzw. die katalytisch inaktive C515S-Mutante stabil exprimieren, MTT-Wachstumstests durchgeführt.

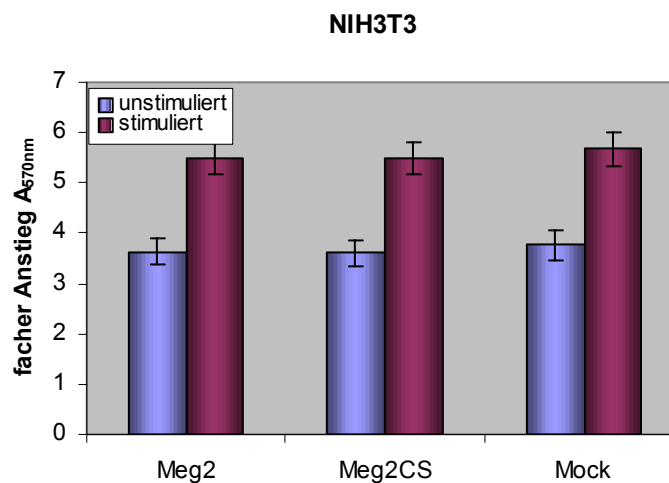
Um zu untersuchen, ob PTP-Meg2 einen Einfluss auf die basale Proliferation hat, wurden A431-Zellen, die stabil mit Meg2, Meg2C515S bzw. dem Leervektor transfiziert worden waren, für 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden in 96-Loch-Platten kultiviert und die Proliferationsrate mittels MTT-Test ermittelt (Abb. 26 A). Hierbei zeigte sich, dass die Zellen unabhängig von dem stabil exprimierten Meg2-Protein mit der gleichen Rate proliferieren. In ähnlicher Weise ist nach 48 Stunden auch kein Unterschied bei NIH3T3-Zellen, welche die gleichen Meg2-Proteine stabil exprimieren, zu erkennen (Abb. 26 B, blaue Balken). Demnach hat PTP-Meg2 keinen Einfluss auf die basale Proliferation.

Die Proliferation von Zellen wird durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren stark induziert. Um den Einfluss von PTP-Meg2 auf diesen Prozess zu testen, wurden NIH3T3-Zellen, die stabil mit Meg2, Meg2C515S bzw. dem Leervektor transfiziert worden waren, in Medium mit niedriger Serumkonzentration kultiviert und für 48 Stunden mit PDGF stimuliert. Anschließend wurde die Proliferationsrate in einem MTT-Test bestimmt (Abb 26 B). Wie schon bei der Analyse der basalen Proliferation konnte auch kein Einfluss der PTP-Meg2 auf das durch PDGF induzierte Wachstum von NIH3T3 beobachtet werden.

A



B



#### Abb. 26: PTP-Meg2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation

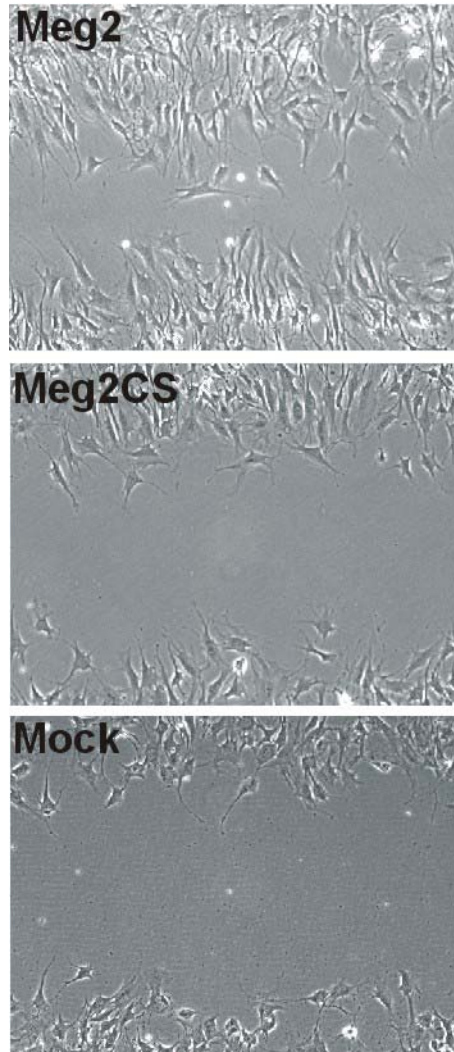
Polyklonale Zellen, die stabil mit PTP-Meg2, PTP-Meg2C515S bzw. dem Leervektor stabil transfiziert worden waren, wurden in 96-Loch-Platten zu 1000 Zellen pro Loch ausgesät. (A) Die Zahl der lebenden A431-Zellen wurde durch Zugabe von MTT an den angegebenen Zeitpunkten gemessen. (B) NIH3T3-Zellen wurden in DMEM/4% FCS kultiviert und 12 h nach dem Aussäen mit 5 ng/ml PDGF stimuliert. Nach 48 h wurde die Anzahl der Zellen durch Zugabe von MTT bestimmt. Die Proliferationsrate ist durch das Verhältnis aus Absorption bei 570 nm des jeweiligen Messpunktes zu  $t = 0$  gegeben.

#### 3.5.4 PTP-Meg2 erhöht die Migration von Zellen im Wundheilungsexperiment

Für eine Reihe von PTPasen konnte eine Beteiligung bei der Regulation der Zellmigration nachgewiesen werden (Angers-Loustau et al., 1999b). Um zu untersuchen, ob PTP-Meg2 einen Einfluss auf Migrationsprozesse hat, wurde ein Wundheilungsexperiment durchgeführt. Hierzu wurden NIH3T3-Fibroblasten, die PTP-Meg2 bzw. die katalytisch inaktive Form Meg2C515S stabil exprimieren, nach Erreichen eines konfluenten Monolayers, d.h. nach vollständiger Bedeckung des Schalenbodens mit Zellen, in Form eines Kanals abgelöst. Als



Kontrolle dienten NIH3T3, die stabil mit dem pLXSN-Leervektor infiziert worden waren. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit suboptimaler Serumkonzentration, bei der die Zellteilungsrate nahezu Null ist, weiter kultiviert. Bei diesem sogenannten Wundheilungsexperiment bewegen sich die Zellen anhand eines Wachstumsgradienten vom konfluenten in den freigelegten Bereich hinein, in dem weniger Wachstumsfaktoren verbraucht werden. Die Zellen wurden 16 h später unter dem Mikroskop analysiert.



**Abb. 27: PTP-Meg2 erhöht die Migration von NIH3T3-Zellen im Wundheilungsexperiment**

Polyklonale NIH3T3-Fibroblasten, die stabil mit Meg2, Meg2C515S bzw. dem Leervektor infiziert worden waren, wurden mit  $4 \times 10^5$  Zellen pro Loch auf 6-Loch-Platten ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde Zellen des Monolayers mit einem Pipettenaufsatz in Form eines geraden Kanals abgelöst, zweimal mit DMEM/4% FCS gewaschen und in dem gleichen Medium weiter kultiviert. Nach 16 h wurde die Wanderung der Zellen in den freigelegten Kanal mit einem Axiovert S100 Mikroskop und der Software OpenLab 2.1 dokumentiert. Für jede Zelllinie ist ein repräsentatives Bild gezeigt .

Bei den Kontrollzellen ist die beginnende Migration deutlich zu erkennen (Abb. 27, unten). Es ist eine leichte Auflockerung des konfluenten Bereichs an den Wundrändern erkennbar.

Zudem zeigen einzelne Zellen stark ausgeprägte Filopodien und wandern in den freigelegten Kanal ein. Ein ähnliches Verhalten zeigen NIH3T3-Zellen, die PTP-Meg2C515S exprimieren (Abb. 27, Mitte). Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die PTP-Meg2 exprimieren, eine verstärkte Migration (Abb. 27, oben). Der Bereich an den Wundrändern ist stärker aufgelockert und der Anteil der Zellen, welche Filopodien aufweisen, ist erhöht. Im Vergleich zu den Mock- und Meg2CS-Zellen sind zudem viel mehr Zellen in den Kanal eingewandert. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass PTP-Meg2 einen Einfluss auf die Regulation der Migration haben kann.

### **3.5.5 Analyse der PTP-Meg2 Funktion mittels siRNA**

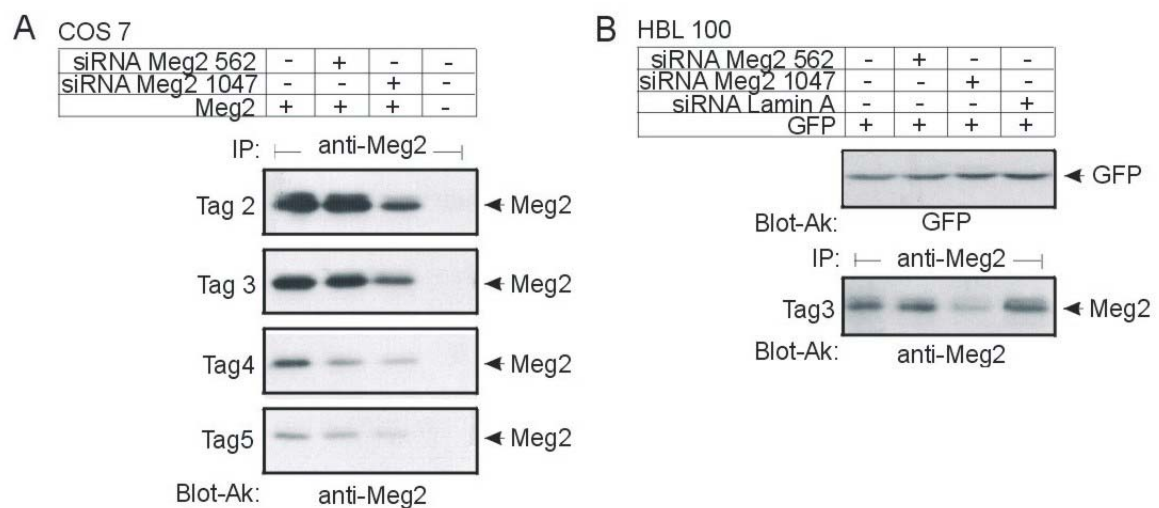
Mit der siRNAs-vermittelten, spezifischen Inhibition der Genexpression in somatischen Säugerzellen (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001) steht eine neuartige, zur traditionellen reversen Genetik alternative Methode zur Verfügung, die Funktion von Genen zu untersuchen. Bei der siRNA-Strategie handelt es sich um einen posttranskriptionellen Mechanismus zur Unterdrückung der Genexpression, der zu einer durch eine dsRNA induzierten spezifischen Degradation der sequenzhomologen mRNA eines Gens führt (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998). Dies resultiert letztendlich in einer Depletion des entsprechenden Proteins. Mit Hilfe dieser Methode sollten im Folgenden weitere Informationen über die Funktion der PTP-Meg2 erhalten werden.

#### ***3.5.5.1 Generierung und Test PTP- Meg2 spezifischer siRNAs auf Funktionalität***

Bei der Auswahl der siRNA-Sequenzen sowie der experimentellen Anwendung wurde im Wesentlichen auf publizierte Kriterien zurückgegriffen (Elbashir et al., 2002). Für PTP-Meg2 wurden zwei unterschiedliche siRNAs, welche zu den Nukleotidsequenzen 562-581 bzw. 1047-1066 homolog sind, ausgewählt. Die Funktion der Duplices wurde zunächst in COS7-Zellen nach Kotransfektion von PTP-Meg2-cDNA mit der jeweiligen siRNA in einer Zeitreihe getestet. Dabei wurden die Zellen 48, 72, 96 und 120 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Expression von PTP-Meg2 analysiert (Abb. 28 A). Es konnte beobachtet werden, dass die siRNA1047 zu jedem Zeitpunkt die Expression von PTP-Meg2 deutlich reduziert. Eine Unterdrückung der Expression von PTP-Meg2 durch die siRNA562 konnte dagegen nur nach 96 Stunden beobachtet werden. Ferner wurde die Funktion der siRNAs auf



die Expression endogener PTP-Meg2 analysiert (Abb. 28 B). Hierzu wurden HBL-100-Zellen mit den siRNAs 562 bzw. 1047 transfiziert und die Menge endogener PTP-Meg2 nach 96 Stunden analysiert. Um unspezifische Effekte auf die Expression von PTP-Meg2 auszuschließen, erfolgte als Kontrolle eine Transfektion mit einer für Lamin A spezifischen siRNA. Zudem wurde die Transfektionseffizienz durch Kotransfektion eines GFP-Expressionskonstrukts überprüft. Dabei wurde gezeigt, dass die siRNA1047 die Expression endogener PTP-Meg2 deutlich unterdrückt, wogegen die siRNA562 keinen Effekt hat. Da die Expression der Lamin A spezifischen siRNA ebenfalls keine Auswirkung auf die Menge endogener PTP-Meg2 zeigt, ist die Depletion des Proteins durch die siRNA1047 auf einen spezifischen Effekt zurückzuführen. Eine Betrachtung der GFP-Expression lässt auf eine vergleichbare Transfektionseffizienz aller siRNAs schließen. Eine annähernd gleiche Transfektionseffizienz wurde auch bei der vorherigen Kontrolle der Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop festgestellt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Analyse wurde für weitere Experimente die siRNA1047 zur Inhibition der Meg2-Expression verwendet.



**Abb. 28: Test der PTP-Meg2 spezifischen siRNAs auf Funktionalität**

COS7-Zellen (A) wurden mit siRNAs und einem Meg2-Expressionskonstrukt, HBL-100 (B) mit siRNAs und einem GFP-Expressionskonstrukt wie angegeben kotransfiziert. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Nach Präzipitation überexprimierter bzw. endogener Meg2 erfolgte eine Immunblotanalyse mit anti-Meg2-Antikörper (A/B). HBL-100-Totallysate wurden zudem mit anti-GFP-Antikörper analysiert (B).

### 3.5.5.2 Analyse der Tyrosinphosphorylierung nach siRNA induzierter Meg2-Depletion

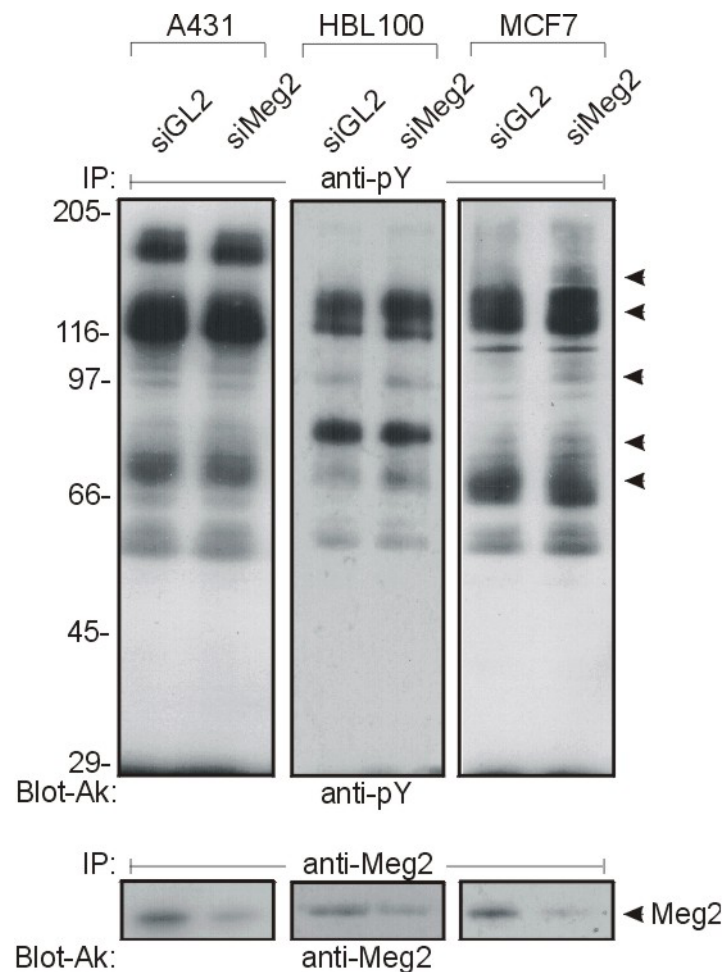
Die Depletion einer Tyrosin-Phosphatase kann zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine führen. Um weitere Hinweise auf Substrate bzw. eine mögliche Funktion der PTP-Meg2 zu erhalten, wurde daher zunächst der Phosphotyrosin-Status verschiedener Zellen nach siRNA-induzierter Depletion der PTP-Meg2 untersucht. Dabei wurden die Zelllinien A431, mit welcher eine Vielzahl der vorherigen Experimente durchgeführt worden ist, HBL-100, welche die höchste Meg2-Expression aufweist, sowie MCF 7, eine weitere Brustkrebszelllinie, verwendet.

Im Vorfeld der eigentlichen Experimente wurden Transfektionsparameter und Zeitpunkt des „Knockdown“-Phänotyps bestimmt. Die Transfektionseffizienz, welche mit Hilfe eines GFP-Konstrukts bestimmt wurde, lag zwischen 60% (HBL 100) und 80% (MCF 7, A431) (Daten nicht gezeigt). Der „Knockdown“-Phänotyp, der sich in der maximalen Depletion des Meg2-Proteins äußert, konnte bei A431 und MCF 7 nach zwei Tagen, bei HBL-100 nach drei Tagen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse des Phosphotyrosin-Status wurden die Zellen mit der Meg2-spezifischen siRNA1047 bzw. als Kontrolle mit einer für GL2-Luziferase spezifischen siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen bis zum zweiten bzw. dritten Tag vom Zeitpunkt der Transfektion kultiviert und die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine analysiert (Abb. 29). Dabei scheint in A431-Zellen die Depletion der PTP-Meg2 keinen nachweisbaren Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung der zellulären Proteine zu haben (Abb. 29, links). In HBL-100-Zellen (Abb. 29, Mitte) konnte dagegen nach Transfektion der Meg2-spezifischen siRNA eine stärker phosphorylierte Bande von ca. 70 kDa beobachtet werden. Zudem wurde eine leicht erhöhte Phosphorylierung einer Bande von ca. 130 kDa detektiert. Die größten Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine konnte nach Expression der Meg2-spezifischen siRNA in MCF 7-Zellen beobachtet werden (Abb.29, rechts). Im Vergleich zu den mit GL2-siRNA transfizierten Zellen konnten verstärkt Tyrosinphosphorylierte Banden von ca. 140, 98 und 75 kDa detektiert werden.

Sowohl die Tyrosinphosphorylierung als auch die Aktivität vieler Proteine wird durch die Stimulation bestimmter Signalkaskaden beeinflusst. Daher wurde der Einfluss der siRNA vermittelten Meg2-Depletion auf die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine in den gleichen Zellen nach deren Stimulation untersucht. Mögliche Änderungen im Phosphotyrosin-Status von Proteinen, die durch PTP-Meg2 direkt oder indirekt reguliert werden könnten, sollten somit deutlicher in Erscheinung treten. Um eine möglichst weitreichende Aktivierung

von Signalkaskaden zu erreichen, wurden die Zellen mit FCS stimuliert. Dabei zeigte sich ein zu Abb. 29 korrespondierendes Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 29: Analyse der Tyrosinphosphorylierung nach siRNA-induzierter Meg2-Depletion**

A431-, HBL-100- und MCF 7-Zellen wurden mit spezifischer siRNA für Meg2 bzw. für GL2-Luziferase zur Kontrolle transfiziert. Zwei Tage (A431; MCF 7) bzw. drei Tage (HBL-100) nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde der Phosphotyrosingehalt nach Immunpräzipitation und Western-Blot mit monoklonalem anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Die Depletion von Meg2 wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot mit monoklonalem anti-Meg2-Antikörper überprüft.

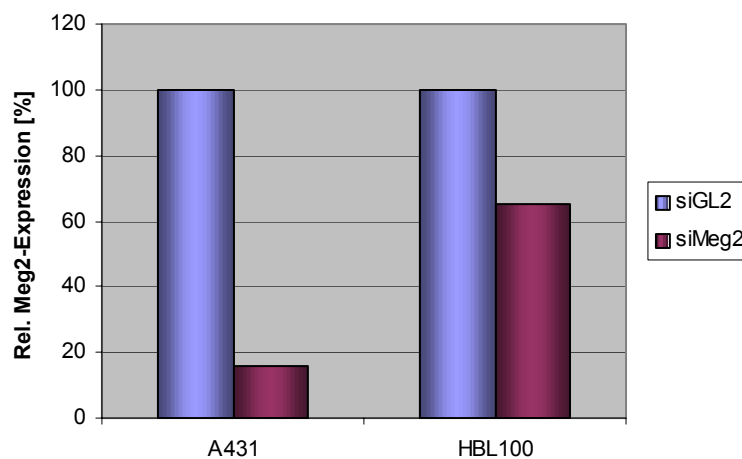
### 3.5.5.3 Analyse der Genexpression nach siRNA induzierter Meg2-Depletion

Die Depletion eines Proteins und eine dadurch eventuell modulierte Signaltransduktion kann unter Umständen zu einer Änderung der Genexpression führen. Dies kann wiederum Aufschluss über Rolle und Funktion des betreffenden Proteins geben. Um die Funktion der PTP-Meg2 weiter zu analysieren, wurde daher die Genexpression verschiedener Zellen nach Transfektion der Meg2-spezifischen siRNA analysiert. Als Vergleich dienten die

entsprechenden Zellen, die zur Kontrolle mit GL2-Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert wurden.

Die Transfektion der A431- und HBL-100-Zellen wurde in einem parallelen Ansatz hinsichtlich der Effizienz überprüft. Dabei lag die Transfektionseffizienz im Bereich der in vorangegangenen Experimenten erzielten Werte von ca. 80% bzw. 50% (Daten nicht gezeigt). Zwei Tage (A431) bzw. drei Tage (HBL-100) nach der Transfektion der Zellen mit den siRNAs wurde aus der Gesamt-RNA die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit  $^{33}\text{P}$  radioaktiv markiert und zur Hybridisierung von Filtern verwendet.

Zu Beginn der Datenauswertung wurde als erstes überprüft, ob die Transfektion der Zellen mit der Meg2-spezifischen siRNA zu der erwarteten Degradation der Meg2-mRNA geführt hat. Hierzu wurden die normalisierten Durchschnittswerte der Filter der A431- bzw. HBL-100-Zellen, die als Kontrolle mit der siRNA für GL2-Luciferase transfiziert worden waren (siGL2-Filter), gleich 100% Expression gesetzt. Dazu wurden die Durchschnittswerte der siMeg2-Filter der entsprechenden Zelllinien in Relation gesetzt (Abb. 30). Hieraus wurde deutlich, dass die Meg2-Expression in A431-Zellen nach Transfektion der Meg2-spezifischen siRNA um 84% reduziert war. Die Meg2-Expression in HBL-100-Zellen zeigte lediglich eine Reduktion von ca. 35%.

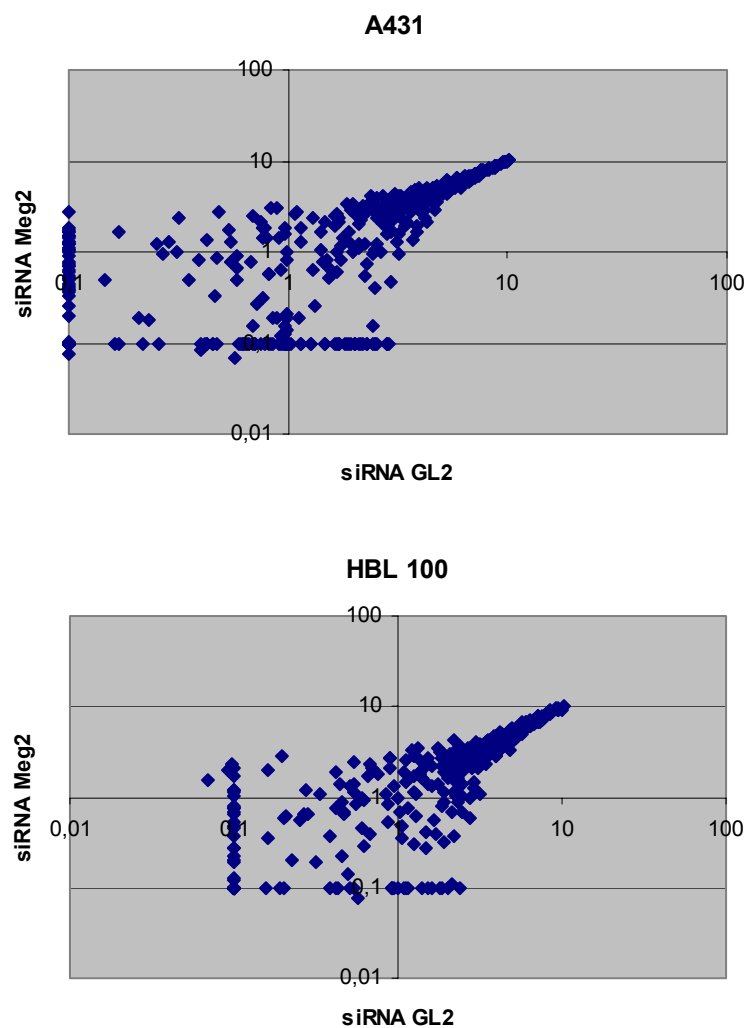


**Abb. 30: Depletion der Meg2-RNA durch spezifische siRNA**

Die normalisierten Werte Meg2-Expression der siGL2- und siMeg2-Filter sind als relative Expression dargestellt. Die Meg2-Expression in den si-GL2-Kontrollzellen wurden gleich 100% gesetzt.

Anschließend wurden für jede der Zelllinien die  $\text{Log}_2$ -transformierten Werte der siMeg2-Filter gegen die  $\text{Log}_2$ -transformierten Werte der siGL2-Filter in einem Punkt-Diagramm dargestellt. Diese Darstellung ermöglicht einen Überblick über die unterschiedliche

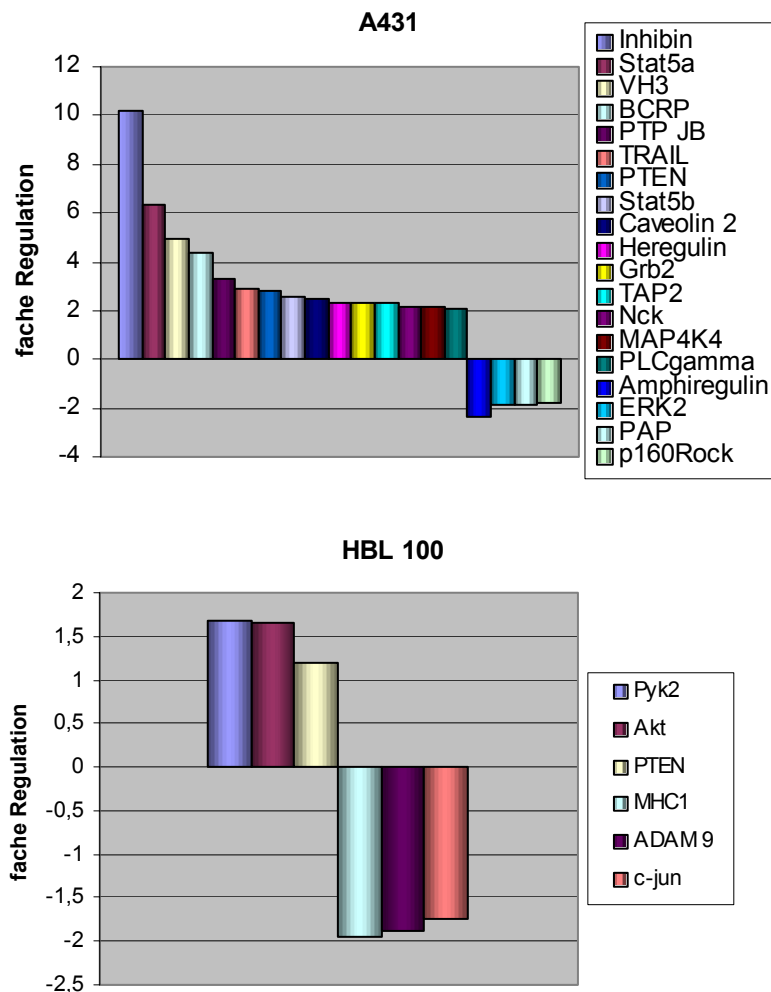
Expression der Gene der gleichen Zelllinie nach Transfektion der Meg2-siRNA im Vergleich zu der siGL2-Referenz. Würden die Werte der Gene auf beiden Filtern übereinstimmen, d.h. wäre die Genexpression gleich, so würde sich in dem Diagramm eine Winkelhalbierende ergeben. Je größer aber die Expressionsunterschiede, also die Unterschiede der Werte einzelner Gene auf beiden Filtern sind, desto mehr weichen diese Gene von der Winkelhalbierenden ab. Das Ergebnis dieser Auswertung für die A431- und HBL-100-Zellen ist in Abb. 31 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Datenpunkte bei beiden Zelllinien nur in geringem Maße abseits der Winkelhalbierenden liegen. Dies lässt bereits vor der kompletten Auswertung der Daten darauf schließen, dass die Depletion von PTP-Meg2 weder in A431- noch in HBL-100-Zellen einen besonders großen Einfluss auf die Genexpression haben dürfte.



**Abb. 31: Punkt-Diagramme der siGL2- und siMeg2-Filter**

Die normalisierten Werte der siGL2- und siMeg2-Filter der A431- bzw. HBL-100-Zellen sind in einer  $\log_2$ -Transformation dargestellt.

Die Daten der cDNA-Filter wurden mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Macros in Microsoft Excel, wie in Material und Methoden beschrieben, komplett ausgewertet. Dazu muss angemerkt werden, dass dieses Auswerteverfahren nach sehr stringenten Bedingungen verfährt. So wird der Hintergrund subtrahiert, Daten deren Durchschnitt eine mehr als 30%-ige Standardabweichung aufweisen werden ausgesondert und der Grenzwert, der von den



**Abb. 32: Änderung der Expression einzelner Gene nach siRNA-induzierter Meg2-Depletion**

Darstellung der induziert und reduziert exprimierten Gene der Meg2-siRNA Zellen im Vergleich zur siGL2-Kontrolle. Auswertungsverfahren siehe Text.

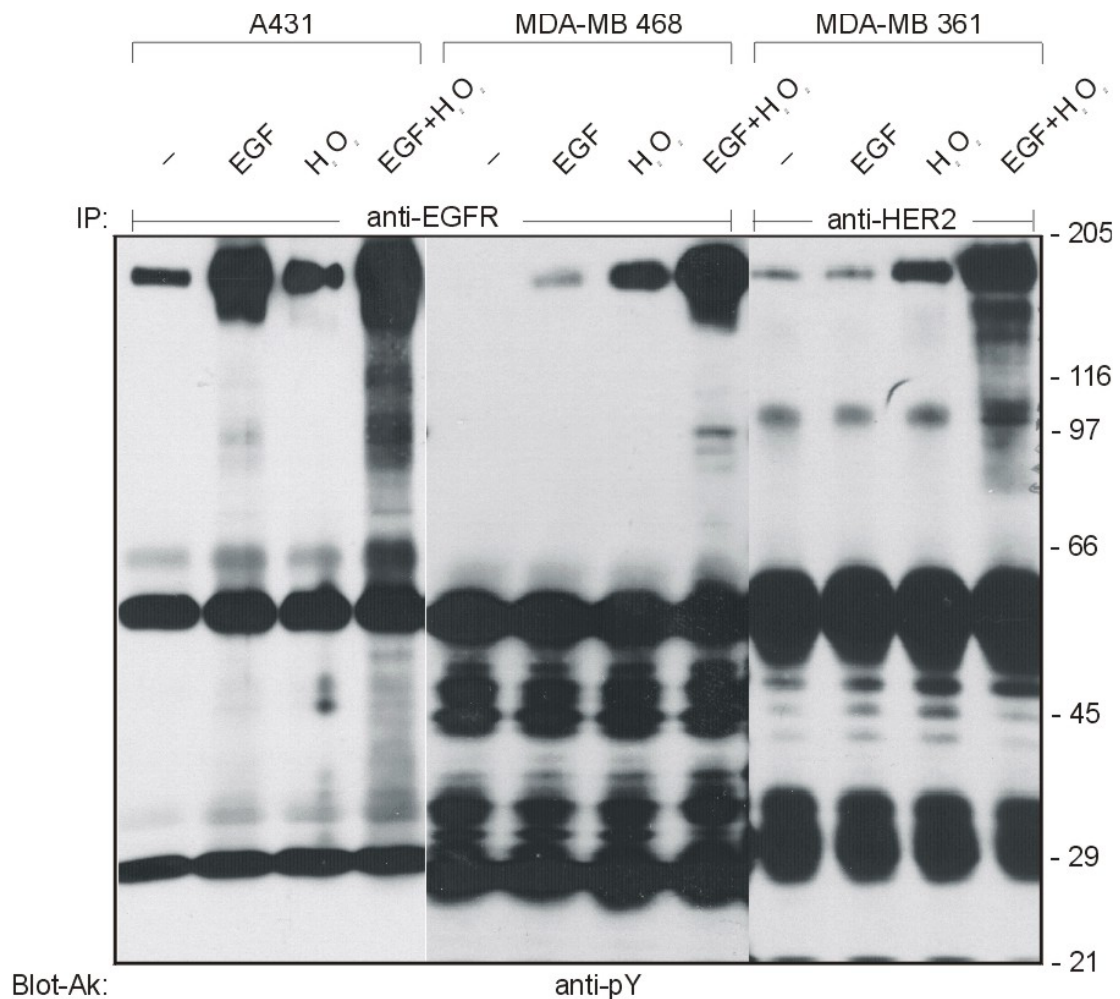
letztendlich erhaltenen Werten abgezogen wird, ist sehr hoch angesetzt. Dadurch wird eine hohe Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten gewährleistet. Die durch die Meg2-Depletion in ihrer Expression induzierten oder reduzierten Gene sind in Abb. 32 dargestellt. Die Regulation der Gene erfolgt lediglich relativ schwach. Die meisten Gene sind 2-3fach reguliert. Auffällig ist dabei, dass in A431-Zellen nach Depletion von PTP-Meg2 weitaus mehr Gene in ihrer Expression induziert als reduziert werden. So wird z.B. die Expression

einiger Liganden beeinflusst. Inhibin, ein Protein aus der TGF $\beta$ -Familie, Heregulin  $\beta$  und TRAIL, ein Apoptose-Faktor, zeigen eine erhöhte Expression, Amphiregulin, ein Ligand des EGF-Rezeptors dagegen eine reduzierte Expression. Interessant ist die Induktion des Tumorsuppressors PTEN, welche ebenfalls, wenn auch weitaus schwächer, in HBL-100 zu beobachten ist. Die Tatsache, dass bei HBL-100 nur sechs Gene reguliert sind, kann daran liegen, dass die Meg2-mRNA nur zu ca. 35% depletiert ist.

### **3.6 Versuch der Identifikation mit dem EGF-Rezeptor bzw. HER2 assoziierender Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein weiterer experimenteller Ansatz dazu dienen, PTPasen, die an den EGF-Rezeptor binden, und somit die von diesem ausgehenden Signaltransduktionskaskaden regulieren können, zu identifizieren. Hierzu sollte die Tatsache ausgenutzt werden, dass PTPasen durch Peroxid reversibel inhibiert werden können (Denu and Tanner, 1998) und zudem auch *in vivo* eine Regulation der Aktivität durch Sauerstoffradikale erfolgt (Meng et al., 2002). Der Mechanismus der Inhibition von PTPasen durch Peroxid beruht auf der Oxidation des katalytischen Cysteins. Im Gegensatz zu Ortho- oder Pervanadat, welche Phosphatanaloga darstellen, wird die Substratbindungstasche nicht durch den Inhibitor blockiert. Wie bereits erwähnt führt die Inhibition von PTPasen zu einer Stabilisierung des Intermediats und erhöht somit die Möglichkeit der Kopräzipitation des PTP-Substrat-Komplexes.

Als System wurden humane Krebszelllinien verwendet, welche durch eine hohe Expression des entsprechenden Rezeptors gekennzeichnet sind. So wurden A431-, MDA-MB 468- und BT20-Zellen verwendet, die eine hohe Expression des EGF-Rezeptors aufweisen, sowie MDA-MB 361-Zellen, welche HER2 überexprimieren. Die Zellen wurden mit Peroxid zur Inhibition von PTPasen, sowie EGF zur Liganden-spezifischen Aktivierung der Rezeptor-Dimere, kostimuliert. Zudem erfolgte eine Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Agonisten alleine. Nach Lyse der Zellen wurden der EGF-Rezeptor bzw. HER2 immunpräzipitiert und kopräzipitierende Proteine im Phosphotyrosin-Blot analysiert. Abb. 33 zeigt, dass nach Kostimulation mit Peroxid und EGF eine Vielzahl an Proteine mit dem EGF-Rezeptor bzw. HER2 kopräzipitiert werden konnten. Da die Stimulation mit den jeweiligen



**Abb. 33: Analyse von mit EGFR- und HER2- kopräzipitierenden Tyrosin-phosphorylierten Proteinen**

A431-, MDA-MB 468- und MDA-MB-361-Zellen wurden mit EGF (50 ng/ml; 3 Min.), Peroxid (1 mM; 3 Min.) bzw. EGF und Peroxid stimuliert und lysiert. Nach Immunpräzipitation mit anti-EGFR-Antikörper bzw. anti-HER2-Antikörper wurden die Präzipitate in einem 7,5-12%igem PAA-Gradientengel aufgetrennt und anschließend kopräzipitierende Proteine im Immunblot mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper analysiert.

Agonisten allein kaum zur Kopräzipitation dieser Proteine führt, kann man annehmen, dass die Assoziation durch Liganden-spezifische Aktivierung des Rezeptors und der Inhibition von PTPasen durch Peroxid induziert wird. Da mögliche mit den Rezeptoren unter den experimentellen Bedingungen kopräzipitierenden PTPasen nicht unbedingt Tyrosin-phosphoryliert sein müssen, erfolgte in ähnlichen Experimenten eine Detektion der Proteine durch Coomassie bzw. Silberfärbung. Hierbei konnte ebenfalls eine Vielzahl von assoziierten Proteinen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Tab. 1 sind die kopräzipitierten Tyrosin-phosphorylierten Proteine nochmals nach ihrer Größe zusammengefasst.

Zur Identifikation der unter diesen Bedingungen mit dem EGF-Rezeptor assoziierenden Proteine wurden die Präzipitate über SDS-PAA-Gele aufgetrennt und anschließend mit



A431 anti-EGFR	MDA-MB 468 anti-EGFR	MDA-MB 361 anti-HER2	BT20 anti-EGFR
150	145	150	150
112	122	128	
112	111	110	
108			
105	106	106	
102	102		
95	95		95
90	87	90	
		85	
		80	
70	72		70
	64		
	62		
60	60		

**Tab. 1: Zusammenfassung verschiedener mit EGFR- und HER2- kopräzipitierender Tyrosin-phosphorylierter Proteinen**

Die Molekulargewichte der nach Kostimulation von A431- MDA-MB 468-, MDA-MB 361- und BT 20-Zellen mit EGF und Peroxid kopräzipitierenden Proteine sind in kDa angegeben.

Coomassie G250 angefärbt (in Zusammenarbeit mit K. König-Hoffmann). Banden wurden ausgeschnitten und mit Proteinase K verdaut, die Fragmente über HPLC aufgereinigt und mittels Edmann-Abbau sequenziert. Die Mikrosequenzierung der Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Lottspeich am MPI für Biochemie (Martinsried). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der EMBL-Proteindatenbank zur Ermittlung der Proteine verglichen. Wie in Tab. 2 zusammengefasst, konnte eine Anzahl von Proteinen identifiziert werden, bei denen es sich jedoch nicht um PTPasen handelt. Zwei Proteine von 103 und 90 kDa konnten über den Sequenzvergleich keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden.

MW (kDa)	Protein
200	Myosin
105	Nucleolin
103	unbekanntes Protein
98	Elongationsfaktor 2
90	unbekanntes Protein
84	Hsp90 $\beta$
78	GRP Vorläuferprot.
67	Serumalbumin
60	IgG
55	Vimentin
43	Actin

**Tab. 2: Zusammenfassung durch Edmann-Sequenzierung identifizierter EGFR-assoziierter Proteine**

Zellen wurden mit EGF und Peroxid kostimuliert. Nach Präzipitation des EGF-Rezeptors erfolgte eine Auftrennung der Komplexe mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels. Banden wurden ausgeschnitten und mittels Edmann-Abbau sequenziert. GRP = Glucose Regulated Protein; Hsp = Heat Shock Protein.

## 4 Diskussion

Ein weit verbreiteter Mechanismus zur Weiterleitung zellulärer Signale ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der beteiligten Proteine an Tyrosinresten. Eine Störung des dabei durch PTKen und PTPasen aufrecht erhaltenen Gleichgewichts trägt häufig zur Entstehung und Progression von Tumoren bei (Hunter, 1998; Kolibaba and Druker, 1997; Patarca, 1996).

Über die Protein-Tyrosin-Phosphatase Meg2 war zu Beginn dieser Arbeit lediglich bekannt, dass das Gen für ein Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 68 kDa codiert und keine potentiellen Signal- oder Transmembransequenzen enthält. Ferner besitzt PTP-Meg2 zwei Domänen, eine C-terminale PTP-Domäne und eine N-terminale CRALBP-Domäne, welche zu dem Lipidtransferprotein Sec17p aus Hefe homolog ist (Gu et al., 1992). In dieser Arbeit wurde die Funktion der PTP-Meg2 untersucht. Dabei wurde besonders auf Expression, Regulation, Substrate und Bindungspartner sowie die biologische Funktion eingegangen. Bei diesen Untersuchungen wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, ob PTP-Meg2 eine eventuelle Rolle bei Prozessen der Tumorentstehung besitzt.

### 4.1 Verbreitung und Vorkommen

Aus der Literatur lagen Daten zur Expression der PTP-Meg2 lediglich aus einer Northern-Blot-Analyse von wenigen, meist hämopoetischen Zelllinien vor. Ferner war bekannt, dass eine Expression in lymphoiden Organen nicht erfolgt (Gjorloff-Wingren et al., 2000; Gu et al., 1992). Bislang lagen keine Expressionsdaten auf Proteinebene vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst genauer die Expression der PTP-Meg2 auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei war besonders interessant, ob Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Gewebespezifität bzw. -art oder der Tumorigenität auftreten. Daten aus cDNA-Filteranalysen von Brustkrebszelllinien zeigten, dass PTP-Meg2 in allen Linien exprimiert wird. Dabei konnte kein spezielles Expressionsmuster hinsichtlich Parameter wie Invasivität oder Metastasierung festgestellt werden. Auch die nicht-transformierten Zelllinien MCF 10A und Ac745 unterscheiden sich nicht im Vergleich zu den Tumorzelllinien. Auffällig war lediglich eine erhöhte Expression in HBL-100, MDA-MB 361 und Hs578T. Da die Expressionsunterschiede in den einzelnen Zelllinien relativ gering sind, wurde zudem auf eine weitaus sensitivere Methode der Expressionsanalyse, die „Real Time PCR“, zurückgegriffen.

In diese Analyse wurden zudem Zelllinien anderer Gewebeherkunft mit einbezogen. Im wesentlichen entsprechen sich die Ergebnisse aus cDNA-Filtern und „Real Time PCR“ hinsichtlich der Expression in Brustkrebszelllinien. Ferner zeigte sich ein ähnliches Expressionsniveau der PTP-Meg2 in Zelllinien anderer Gewebeherkunft (Glioblastom, Hepatokarzinom, epitheliales Gewebe). Erwähnenswert ist jedoch, dass die mRNA-Menge der PTP-Meg2 in den „Real Time PCR“-Experimenten um ca. drei Größenordnungen unter der des Kontrollgens Zyklophilin A lag. Auch in der cDNA-Filteranalyse war PTP-Meg2 im Vergleich zu anderen Genen sehr gering exprimiert. Dies entspricht der Tatsache, dass die meisten PTPasen schwach exprimiert werden, da auf Grund ihrer hohen Aktivität geringe Proteinmengen für die Dephosphorylierung wichtiger Schlüsselenzyme ausreichen. Die erhaltenen Daten lassen zum einen darauf schließen, dass PTP-Meg2 ubiquitär exprimiert wird. Zum anderen ist die Expression scheinbar nicht mit einer Transformation assoziiert. Dies ist jedoch nicht unerwartet, da eine Vielzahl von Proteinen auf translationeller Ebene reguliert werden. Zudem ist letztendlich die Aktivität eines Enzyms für dessen Auswirkungen innerhalb der Zelle verantwortlich. Die Expression in Geweben unterschiedlicher Herkunft auf ähnlichem Niveau könnte bedeuten, dass PTP-Meg2 an der Regulation eines vom Gewebetyp unabhängigen, zentralen und für das Überleben und Wachstum von Zellen wichtigen Prozesses beteiligt ist.

Bei der Analyse der Meg2-Expression auf Proteinebene in den gleichen Zelllinien wurde eine 68 kDa Bande detektiert. Diese Größe entspricht sowohl dem berechneten Molekulargewicht der PTP-Meg2 (Gu et al., 1992) als auch dem kürzlich in Neutrophilen nachgewiesenen Protein (Kruger et al., 2002). Der Nachweis von nur einer Proteinbande sowie die damit korrelierende Beobachtung nur eines mRNA-Transkripts (Gu et al., 1992) lassen darauf schließen, dass PTP-Meg2 weder in unterschiedlichen Spleißformen vorliegt noch posttranslationell modifiziert wird. Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Expression von PTP-Meg2 auf Proteinebene nicht gänzlich mit der auf mRNA-Ebene korreliert. So zeigten MDA-MB 361, ZR75-1 und HBL-100 analog zur höchsten Genexpression auch die höchste Proteinmenge. Jedoch wurde z.B. für BT 20, SKBr 3, MDA-MB 468 und MCF 7 eine ähnlich hohe Proteinmenge nachgewiesen, obwohl sie sich in ihrer Genexpression kaum von A431 und A172 unterscheiden, welche aber deutlich weniger Protein besitzen. Bemerkenswerterweise wurde PTP-Meg2 in MCF 10A, der einzigen Zelllinie nicht karzinogenen Ursprungs, auf Proteinebene nur schwach detektiert, obwohl deutlich mRNA nachgewiesen wurde. Die Ursache für diese Beobachtungen kann in einer unterschiedlichen Translationseffizienz der mRNA bzw. Proteinstabilität in den verschiedenen Zelllinien liegen.

Mittels zweier verschiedener Techniken, Immunfluoreszenz und Zellfraktionierung, wurde beobachtet, dass PTP-Meg2 primär im Zytosol lokalisiert ist, und zwar in einer strukturierten, gesprenkelten Weise, welche zudem häufig zytoskelettartig erscheint. Jedoch wurde PTP-Meg2 auch in vesikulären Strukturen unbekanntem Ursprungs beobachtet. Die vesikuläre Lokalisation war unerwartet, da PTP-Meg2 weder Lokalisationssequenzen noch längere hydrophobe Bereiche aufweist, was auf eine zytosolische Lokalisation hindeutet (Gu et al., 1992). Da aber im Vergleich dazu die Phosphatasedomäne allein ausschließlich im Zytosol beobachtet wurde, zudem in einer eher diffusen und nicht mehr strukturierten Art, kann angenommen werden, dass diese Lokalisation zu einem gewissen Teil durch die N-terminale CRALBP-Domäne bedingt wird. Die so vermittelte Lokalisation dürfte aber indirekt, z.B. durch Interaktion mit Lipiden (s. unten) oder membranassoziierten Proteinen, vermittelt werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass PTP-Meg2 sowohl in Phagosomen von Neutrophilen als auch in sekretorischen Vesikeln von Mast- und T-Zellen lokalisiert ist (Kruger et al., 2002; Wang et al., 2002). Da auch in dieser Arbeit eine teilweise granuläre Lokalisation beobachtet wurde, könnte PTP-Meg2 generell zu einem bestimmten Anteil in endocytotischen und sekretorischen Vesikeln vorliegen und dort eine Funktion bei der Regulation der Vesikel oder der Tyrosinphosphorylierung darin enthaltener Proteine spielen.

## **4.2 Regulation der Expression und Aktivität**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Niveau der PTP-Meg2 mRNA in humanen Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben durch differenzierungsauslösende Stimuli reguliert werden kann. In MCF 7 Mammakarzinom-Zellen konnte eine Steigerung der Transkription der PTP-Meg2 nach Zugabe von Natriumbutyrat detektiert werden. Dagegen wurde bei der Colonkarzinom-Linie SW948 und der Neuroblastom-Linie SK-N-SH die Expression der PTP-Meg2 durch Differenzierung mit TPA bzw. Retinolsäure reprimiert. Die Induktion der Differenzierung dieser Zelllinien äußerte sich in charakteristischen Morphologieänderungen während des experimentellen Zeitraums. Dementsprechend könnte PTP-Meg2 bei der Regulation biologischer Prozesse während der Differenzierung funktionell beteiligt sein. Für die Spezifität der Beobachtungen spricht, dass die Expression der PTP-SL in den gleichen Zelllinien nach Induktion der Differenzierung im Vergleich zu PTP-Meg2 in anderer Weise reguliert wird. So wird PTP-SL in SW948 und MCF 7 um das 5- bzw. 3-fache induziert, während die Expression in SK-N-SH reduziert wird (J. Eickhoff, pers. Mitteilung). Für eine Vielzahl von PTPasen wurde eine Regulation ihrer Expression während Differenzierungs-

prozessen gezeigt. Dies gilt insbesondere für neuronal exprimierte PTPasen (den Hertog, 1999; den Hertog et al., 1999; Van Vactor, 1998). Ebenso kann in hämatopoetischen Krebszelllinien die Expression von PTPasen durch Differenzierungsagenzien induziert werden, was häufig zu terminaler Differenzierung mit nachfolgender Apoptose führt (Bhoola and Hammond, 2000; Seimiya and Tsuruo, 1998; Taniguchi et al., 1999). Die differentielle Regulation der PTP-Meg2 in den verschiedenen Zelllinien bzw. von PTP-Meg2 und PTP-SL in den gleichen Zelllinien spricht für eine unterschiedliche funktionelle Beteiligung.

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie die PTPase-Aktivität der PTP-Meg2 reguliert wird. PTP-Meg2 besteht aus der katalytisch nicht aktiven CRALBP-Domäne und der PTP-Domäne. Bei einem Vergleich der Aktivitäten von PTP-Meg2 GST-Fusionsproteinen konnte eine nahezu doppelte Aktivität der PTP-Domäne allein gegenüber des gesamten PTP-Meg2 Proteins festgestellt werden. Somit scheint die CRALBP-Domäne eine Funktion bei der Regulation der Meg2-Aktivität zu besitzen. Für eine Reihe von Phosphatasen wurde bereits gezeigt, dass nicht-katalytische Domänen zur Regulation der Aktivität beitragen können. So werden z.B. Shp-1 und Shp-2 durch eine intramolekulare Interaktion zwischen der PTP- und der SH2-Domäne reguliert (Dechert et al., 1994; Lechleider et al., 1993; Pluskey et al., 1995; Zhao et al., 1994a). Auch die TC-PTP wird durch Deletion des nicht-katalytischen Bereichs aktiviert (Cool et al., 1990).

Auf Grund der Homologie der CRALBP-Domäne zu Sec14p der Hefe und dem humanen *cis*-Retinaldehyd-Bindungsprotein, welche beide Lipide bzw. hydrophobe Komponenten binden, wird diskutiert, dass PTP-Meg2 über die CRALBP-Domäne mit Lipiden interagieren kann (Gu et al., 1992). In dieser Arbeit konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass PTP-Meg2 mit PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P und Phosphatidylserin interagiert. Die Tatsache, dass mit der CRALBP-Domäne nur eine Bindung an PI(3)P und Phosphatidylserin beobachtet werden konnte und außerdem die PTP-Domäne keine Interaktion mit PIPs zeigte, deutet darauf hin, dass beide Domänen zu einer Vermittlung der Bindung an PI(4)P und PI(5)P beitragen. Eine Analyse der PTPase-Aktivität in Abhängigkeit der Phospholipide zeigte zudem, dass PI(4)P die Aktivität der PTP-Meg2 fast um das Zweifache steigert. Diese Beobachtungen unterstützen eine funktionelle Rolle der CRALBP-Domäne bei der Regulation der Meg2-Aktivität. Kürzlich haben Kruger et al. (2002) eine Stimulation der PTPase-Aktivität von PTP-Meg2 durch PI(4,5)P<sub>2</sub> um das 5-8fache sowie PI(3,4,5)P<sub>3</sub> und PI(4)P gezeigt, ohne jedoch eine Bindung direkt nachzuweisen. Eine Bindung von PTP-Meg2 an PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Da in dem verwendeten „Protein-Lipid-Overlay“ die Bindung an PI(3)P aber im Gegensatz zu PI(4)P und PI(5)P erst

mit einer deutlich erhöhten Meg2-Proteinmengen beobachtet werden konnte und die Interaktion, wie auch bei dem von Kruger et al. verwendeten experimentellen Ansatz direkt sein muss, könnte die Ursache hierfür in einem Sensitivitätsproblem liegen. So ist wohl auch die Ursache dafür, dass hier im Gegensatz zu Kruger et al. keine Stimulation der Meg2-Aktivität durch  $PI(4,5)P_2$  und  $PI(3,4,5)P_3$  nachweisbar war, in den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen zu sehen. Letztendlich muss auch darauf hingewiesen werden, dass Di- und Triphosphate der Lipide wesentlich instabiler sind als Monophosphate. Auch der GST-Anteil von Fusionsproteinen könnte eine Auswirkung auf experimentelle Resultate haben. So konnten Qi et al. (2002) keinen Einfluss von PI oder dessen Phospho-Derivaten auf die Aktivität eines aus Adenovirus-infizierten HEK 293-Zellen aufgereinigten Meg2-Proteins beobachten. In Übereinstimmung mit Kruger et al. konnte in dieser Arbeit ebenfalls kein Einfluss von  $PI(3)P$  und Phosphatidylserin auf die Meg2-Aktivität gezeigt werden, obwohl sie an die CRALBP-Domäne binden. Dies und die Tatsache, dass verschiedene Phospholipide die Aktivität von PTP-Meg2 unterschiedlich stark negativ modulieren, lässt darauf schließen, dass die Bindung der CRALBP-Domäne durch Liganden zusätzliche Funktionen, z.B. die Regulation der Lokalisation, besitzen könnte. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Lipide unter den experimentellen Bedingungen nicht in der Form binden, wie es für einen inhibitorischen Effekt erforderlich wäre.

In Analogie zu Kruger et al. unterstützen die gezeigten Daten ein Modell, bei dem PTP-Meg2 überwiegend in einer nicht oder lediglich wenig aktiven Form vorliegt, welche durch eine intramolekulare Interaktion der CRALBP-Domäne mit der PTP-Domäne vermittelt wird. Durch Bindung hydrophober Liganden an die CRALBP-Domäne kann diese inhibitorische Interaktion aufgehoben werden und PTP-Meg2 ihre Aktivität entfalten. Eine Regulation dieses Mechanismus könnte unter anderem durch unterschiedliche Aktivität bestimmter Signalwege erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit FCS, EGF sowie LPA zu einer Stimulation der Meg2-Aktivität führt, wogegen TPA inhibierend wirkt. Eine Modulation der Meg2-Aktivität durch bestimmte Agonisten ist vorstellbar, da die Liganden-abhängige Stimulation vieler RTKs und GPCRs unter anderem zur Aktivierung der PI3-Kinase führt (Holgado-Madruga et al., 1997; Rodrigues et al., 2000; Zachary et al., 1992), welche wiederum bei der Synthese bestimmter Phosphatidylinositole eine Rolle spielt. Zudem wurde für EGF, TPA und Serum ein direkter Einfluss auf den Phosphatidylinositol-Gehalt von Zellen beschrieben (Kanba et al., 1986; Raben and Cunningham, 1985; Vicentini and Villereal, 1984; Wahl et al., 1987).

Einige Phosphatasen, wie z.B. Shp-1, Shp-2 und PTP1B werden durch Serin/Threonin- bzw. Tyrosinphosphorylierung reguliert (Li et al., 1995; Liu and Chernoff, 1997; Uchida et al., 1994; Zhao et al., 1994a; Zhao et al., 1994b). Für PTP-Meg2 konnte keine Serin- bzw. Threonin-Phosphorylierung beobachtet werden. Eine Tyrosinphosphorylierung wurde lediglich nach Stimulation der Zellen mit Pervanadat nachgewiesen. Eine Ausnahme wurde jedoch nach Koexpression der PTP-Meg2 mit dem EGF-Rezeptor beobachtet. So wurde hier eine Phosphorylierung nach EGF-Stimulation sowie eine stark erhöhte Phosphorylierung nach Pervanadat-Stimulation beobachtet. Da Pervanadat ein allgemeiner und sehr potenter PTP-Inhibitor ist und somit auch PTP-Meg2 inhibiert, lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, ob diese Phosphorylierung deren Aktivität beeinflusst bzw. überhaupt eine physiologische Bedeutung hat. Zudem konnte nach Pervanadat-Stimulation eine verlangsamte Mobilität von PTP-Meg2 festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung bei der katalytisch inaktiven C515S-Mutante lässt darauf schließen, dass PTP-Meg2 in Abhängigkeit ihrer Aktivität modifiziert wird. Überraschenderweise konnte jedoch weder nach einer partiellen Inhibition der PTP-Meg2 mit TPA noch mit dem PTP-Inhibitor Peroxid eine Veränderung der Mobilität beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen Mechanismen der Inhibition liegen. So ist die katalytische Inaktivierung durch eine CS-Mutation bzw. mit Pervanadat irreversibel und absolut (Flint et al., 1997; Garton et al., 1996; Huyer et al., 1997), während Peroxid das katalytische Cystein nur reversibel oxidiert (Denu and Tanner, 1998). Die durch TPA verminderte Phosphataseaktivität ist ein indirekt vermittelter Effekt. Es wäre durchaus vorstellbar, dass eine nicht irreversible Inhibition von PTP-Meg2 während der Versuchsdurchführung eine zumindest partielle Rekonstitution der Phosphataseaktivität nicht vollständig unterbinden kann und daher die Modifikation und der Mobilitätsunterschied nicht deutlich wird. So ist bei PTPasen der Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung auf Grund einer möglichen Autodephosphorylierung generell problematisch. Die Behandlung von Zellen mit Calyculin A sowie Okadasäure, zweier Inhibitoren für die S/T-Phosphatasen PP1 und PP2, haben zu keiner Änderung der Mobilität geführt. Jedoch konnte nach Kostimulation der Zellen mit diesen Inhibitoren und Pervanadat eine leicht stärkere Änderung der Mobilität beobachtet werden als mit Pervanadat allein. Da keine Serin- bzw. Threoninphosphorylierung beobachtet wurde, könnte es sich hierbei um einen Rückkopplungseffekt eines durch PTP-Meg2 regulierten Proteins handeln.

### 4.3 Assoziierte Proteine und Substrate

Für eine Reihe PTPasen wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktivität von RTKEn bzw. deren Substrate und Signalwege besitzen (Ostman and Bohmer, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter bestimmten Bedingungen eine Bindung der PTP-Meg2 an den EGF-Rezeptor gezeigt werden. Dabei wird diese Bindung anscheinend nicht durch die CRALBP-Domäne, sondern durch die PTP-Domäne oder beide Domänen zusammen vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass ein GST-Fusionsprotein der CRALBP-Domäne im Gegensatz zu GST-Meg2 nicht mit dem EGF-Rezeptor assoziiert. Diese Tatsache unterstreicht die Funktion der CRALBP-Domäne als Lipidbindungsdomäne. Zudem wurde aus „GST-pulldown“-Experimenten sowie einem „Far Western Protein Overlay“ deutlich, dass die Assoziation beider Proteine direkt und von der Aktivität des Rezeptors abhängig ist. Während eine Assoziation der PTP-Meg2 mit dem unstimulierten EGF-Rezeptor kaum detektiert werden konnte, führte dagegen eine Aktivierung des Rezeptors mit EGF, Peroxid bzw. Pervanadat zu einer verstärkten Bindung. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Rekrutierung der PTP-Meg2 zum EGF-Rezeptors nach dessen Aktivierung erfolgt. Diese Annahme wird außerdem dadurch unterstützt, dass in HEK 293-Zellen, die mit dem EGF-Rezeptor und PTP-Meg2 kotransfiziert worden waren, und bei denen auf Grund der ektopischen EGFR-Expression dieser bereits im unstimulierten Zustand schwach basal Tyrosin-phosphoryliert vorlag, eine Assoziation ohne Stimulation beobachtet wurde. Durch diese Koexpression des EGF-Rezeptors mit PTP-Meg2 in HEK 293-Zellen konnte neben den beiden *in vitro*-Experimenten die Assoziation beider Proteine zudem im zellulären Kontext nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass endogen eine Tyrosinphosphorylierung der PTP-Meg2 lediglich nach Pervanadat-Stimulation beobachten werden konnte, spricht eher dafür, dass PTP-Meg2 kein Substrat des EGF-Rezeptors ist. Die nach Koexpression von PTP-Meg2 und dem EGF-Rezeptor auftretende EGF-induzierte Phosphorylierung der PTP-Meg2 sowie die Verstärkung der Pervanadat-induzierten Phosphorylierung spricht dagegen sehr wohl für die Möglichkeit, dass PTP-Meg2, zumindest unter bestimmten Bedingungen, ein Substrat des EGF-Rezeptors sein könnte. Allerdings muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass ein Koexpressionssystem weitaus artifizierter ist, als die endogene Situation.

Eine Interaktion mit RTKEn wurde für eine Reihe von PTPasen berichtet. Dies resultiert häufig in einer Dephosphorylierung der RTKEn oder einer indirekten Regulation der entsprechenden Signalwege. So wurde z.B. beschrieben, dass PTP1B mit dem EGF-Rezeptor



assoziiert, was zu einer reduzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors führt. Die durch diesen aktivierten Signalwege werden dagegen aber nicht beeinflusst (Flint et al., 1997). Auch die Aktivität der LAR scheint Auswirkungen auf den Phosphotyrosingehalt des EGF-Rezeptors zu haben (Kulas et al., 1996). Für TC45 wurde berichtet, dass sie PI3-Kinase-abhängige Signalwege des EGF-Rezeptors reguliert, jedoch nicht den ERK-Signalweg (Tiganis et al., 1999). Ein Einfluss der PTP-Meg2 bzw. deren katalytisch inaktiven Mutanten auf die basale oder EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung konnte in dieser Arbeit hingegen nicht beobachtet werden. Zudem konnte kein Unterschied im Tyrosinphosphorylierungsstatus der Zelle sowie in der EGF-vermittelten MAPK-Aktivierung in HEK 293- sowie A431-Zellen in Abhängigkeit der Expression verschiedener Meg2-Proteine festgestellt werden. Beide Tatsachen sprechen gegen eine Vorstellung, dass der EGF-Rezeptor ein direktes Meg2-Substrat darstellt. Neben einer Enzym-Substrat-Wechselwirkung zwischen PTP-Meg2 und dem EGF-Rezeptor ist auch denkbar, dass die Assoziation einer Rekrutierung der Phosphatase dient und dieser dadurch erst eine Interaktion mit anderen Substraten oder auch Membranlipiden ermöglicht. So wird in ähnlicher Weise PTP-PEST über Grb2 an den EGF-Rezeptor rekrutiert. Diese Relokalisation führt zu der Dephosphorylierung eines potentiellen Substrats von 120 kDa, welches nach EGF-Stimulation Tyrosin-phosphoryliert wird (Charest et al., 1997).

Da eine Assoziation zwischen PTP-Meg2 und dem EGF-Rezeptor nur *in vitro* sowie nach Koexpression beider Proteine gezeigt werden konnte und kein eindeutiger Effekt dieser Interaktion zu beobachten war, bleibt letztendlich deren physiologische Relevanz offen. Ein Grund für eine nicht beobachtete endogene Assoziation kann z.B. in der Lokalisation von PTP-Meg2 liegen. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PTP-Meg2 überwiegend zytosolisch und daneben partiell in vesikulären Strukturen vorliegt. Eine Membranlokalisierung konnte dagegen nicht beobachtet werden. Da ebenfalls gezeigt wurde, dass die CRALBP-Domäne an Phospholipide bindet und dadurch die Meg2-Aktivität moduliert werden kann (diese Arbeit und Kruger et al., 2002), ist denkbar, dass PTP-Meg2 durch die CRALBP-Domäne in bestimmte zelluläre Kompartimente dirigiert wird und nur dort eine biologische Aktivität entfalten kann. So könnte PTP-Meg2 in der Zelle lediglich in endocytotischen oder sekretorischen Vesikeln mit dem EGF-Rezeptor bzw. anderen Substraten interagieren. In ähnlicher Weise wird auch eine Interaktion der PTP1B mit RTKs während deren Synthese und Transport durch das ER vorgeschlagen (Frangioni et al., 1992; Moller et al., 1995). Als andere Variante wird eine Interaktion von PTP1B mit RTKs in Endosomen in Betracht gezogen (Drake and Posner, 1998). In Analogie dazu wurde in Zellen des Immunsystems

gezeigt, dass PTP-Meg2 in Phagosomen bzw. sekretorischen Vesikeln lokalisiert ist (Kruger et al., 2002; Wang et al., 2002). Aus T-Zellen liegt auch die einzige bisherige Information über eine mögliche physiologische Funktion der PTP-Meg2 vor. So führt dort deren Überexpression zu einer Vergrößerung sekretorischer Vesikel und einer verminderten Sekretion von IL-2 (Wang et al., 2002). Generell ist aber auch eine Rolle der PTP-Meg2 bei der Bildung oder dem Transport sekretorischer bzw. endocytotischer Vesikel vorstellbar.

#### **4.4 Biologische Funktion**

Um einen möglichen Einfluss von PTP-Meg2 auf die Zelltransformation zu untersuchen, wurde die Wirkung der Überexpression der PTP-Meg2 sowie ihrer katalytisch inaktiven C515S-Mutante auf die durch diverse Onkogene induzierte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten analysiert. Als Kriterium für die Transformation diente dabei der Verlust der Kontaktinhibition, also ein fortwährendes Zellwachstum trotz dichter Einbettung in eine Schicht von Nachbarzellen, was sich in der Bildung sogenannter Foci äußert. PTP-Meg2 konnte sowohl die durch v-ErbB sowie den EGF-Rezeptor vermittelte Transformation von NIH3T3 vermindern. In Zellen, die die katalytisch inaktive Form der PTP-Meg2 exprimieren, konnte dagegen eine verstärkte Transformationen durch v-ErbB sowie den EGF-Rezeptor beobachtet werden. Sowohl PTP-Meg2 als auch PTP-Meg2C515S hatten jedoch keinen Einfluss auf die durch v-Ki-Ras bzw. HER2 vermittelte Transformation von NIH3T3. Zudem wurde in den gleichen PTP-Meg2C515S exprimierenden NIH3T3, außer in den v-Ki-Ras transformierten Zellen, eine leichte Erhöhung der durch die Onkogene induzierten Aktivierung von ERK1/2 beobachtet. Interessanterweise wurde in PTP-Meg2C515S exprimierenden Mock-infizierten Zellen bereits ebenfalls eine erhöhte basale ERK1/2-Phosphorylierung nachgewiesen. Dies wiederum korreliert mit der Feststellung, dass auch in HEK 293-Zellen, die PTP-Meg2C515S transient exprimieren, eine Erhöhung der basalen ERK1/2-Phosphorylierung vorlag.

Die gezeigten Daten sprechen dafür, dass PTP-Meg2 über das Potential verfügt, der durch v-ErbB bzw. den EGF-Rezeptor induzierten Transformation von Zellen entgegenzuwirken. Die Fähigkeit der dominant negativen Mutante PTP-Meg2C515S die zelluläre Transformation durch diese Onkogene zu steigern, lässt sogar darauf schließen, dass PTP-Meg2 eine generelle Funktion bei der Negativregulation beteiligter Signalwege besitzt könnte. Zudem muss die regulatorische Funktion der PTP-Meg2 oberhalb von Ras liegen, da weder die katalytisch aktive noch die inaktive Form der PTP-Meg2 einen Einfluss auf die durch v-Ki-Ras

ausgelöste Transformation hatte. Die Beobachtung, dass PTP-Meg2C515S zu einer erhöhten basalen sowie durch v-ErbB, EGF-Rezeptor, und HER2 induzierten ERK1/2-Aktivität, nicht aber einer Änderung der durch v-Ki-Ras induzierten Aktivität von ERK1/2 führt, spricht ebenfalls für eine Funktion von Meg2 oberhalb von Ras. Ferner wird jedoch deutlich, dass die regulative Wirkung der PTP-Meg2 auf die Transformation von Zellen nicht oder zumindest nicht nur auf einem möglichen Einfluss auf die ERK1/2-Aktivität beruht. So ist die Aktivität von ERK1/2 zwar in PTP-Meg2C515S exprimierenden Zellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle leicht erhöht, ist aber in PTP-Meg2 exprimierenden Zellen diesbezüglich unverändert. Für einen v-ErbB vermittelten Verlust der Kontaktinhibition ist zudem die Aktivität der Kinase zwar erforderlich, die dadurch bedingte ERK1/2-Aktivierung aber nicht ausreichend (Meyer et al., 1994). Ferner wurde kein Effekt auf die HER2 vermittelte Transformation beobachtet, obwohl auch hier die Aktivität von ERK1/2 durch Expression der CS-Mutante der PTP-Meg2 erhöht ist. In vielen Fällen ist zwar eine ERK1/2-Aktivierung für die Transformation von Zellen erforderlich, aber nicht unbedingt ausreichend.

Bei v-ErbB handelt es sich um eine verkürzte, konstitutiv aktive Form des EGF-Rezeptors. Der EGF-Rezeptor und HER2 sind Mitglieder der gleichen RTK-Familie und aktivieren ähnliche Signalwege (Gullick, 1998). Interessant ist daher, dass PTP-Meg2 die Transformation von NIH3T3-Zellen durch v-ErbB und den EGF-Rezeptor vermindert und die katalytisch inaktive CS-Mutante diesen Transformationsprozess verstärkt, beide Meg2-Formen jedoch keinen Einfluss auf die HER2 induzierte Transformation haben. Bemerkenswerterweise konnte eine damit korrelierende Assoziation eines GST-Meg2-Fusionsproteins mit dem EGF-Rezeptor, nicht aber mit HER2 beobachtet werden, was für eine Selektivität der Meg2-Funktion spricht.

Eine erhöhte Proliferationsrate ist neben dem Verlust der Kontaktinhibition ein weiteres Merkmal der Transformation von Zellen. Um festzustellen, ob PTP-Meg2 einen Einfluss auf die Zellproliferation hat, wurde die Wirkung der Überexpression der PTP-Meg2 sowie der PTP-Meg2C515S-Mutante auf das Wachstum von Zellen untersucht. Sowohl PTP-Meg2 als auch die katalytisch inaktive CS-Mutante konnten weder die basale noch die PDGF-induzierte Proliferation von NIH3T3-Fibroblasten beeinflussen. Diese Beobachtung war insofern unerwartet, da im Focusbildungstest bei NIH3T3-Zellen, welche die CS-Mutante der PTP-Meg2 exprimieren, eine leicht erhöhte ERK1/2-Aktivität nachgewiesen werden konnte. MAP-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation. So stimuliert ERK1/2 die DNA-Synthese durch Phosphorylierung der Carbamoylphosphat-Synthetase II und erhöht die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1, was z.B. zu einer Induktion von Cyclin D1,

autokriner Wachstumsfaktoren sowie anderer Gene führt (Chang and Karin, 2001). Auch für die Stimulation der Proliferation von NIH3T3 durch PDGF ist in gewissem Maße eine ERK1/2-Aktivierung notwendig. Jedoch muss die ERK1/2-Aktivität nicht zwangsläufig für die Entscheidung, ob Zellen in erhöhtem Maße proliferieren oder nicht, limitierend sein. Für die Proliferation von Zellen sind neben MAP-Kinasen noch eine Reihe weiterer Faktoren notwendig. So ist z.B. die ERK1/2 vermittelte Induktion von Cyclin D1 für eine Initiation der DNA-Synthese nicht ausreichend, sondern benötigt zusätzlich die Aktivität der PI3K, welche über autokrine Faktoren aktiviert wird (Treinies et al., 1999). Auch mit A431-Zellen, die PTP-Meg2 bzw. deren katalytisch inaktive Mutante exprimieren, konnte kein Unterschied in der Zellproliferation beobachtet werden. Zwischen diesen Zellen konnte jedoch auch kein Unterschied in der ERK1/2-Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür dürfte hauptsächlich in der auch nach 48 Stunden Serumentzug noch sehr hohen Basalaktivität der ERK1/2, die durch die starke Amplifikation des EGF-Rezeptors bedingt ist, liegen. Somit könnte auch eine geringe, durch Expression der PTP-Meg2C515S bedingte Erhöhung der ERK1/2-Aktivität leicht durch andere Stimuli kompensiert werden.

Ein weiterer in dieser Arbeit beobachteter Effekt der Überexpression von PTP-Meg2 ist eine erhöhte Migration von NIH3T3-Fibroblasten im Wundheilungsexperiment. Im Gegensatz dazu hatte die Expression der CS-Mutante der PTP-Meg2 keine Auswirkungen auf die Migration. Auch hier würde man erwarten, dass der Effekt der verstärkten Migration eher durch die CS-Mutante vermittelt wird als durch PTP-Meg2. So ist eine Aktivierung des ERK1/2-Signalweges für die Migration von Zellen von Bedeutung (Anand-Apte et al., 1997; Krueger et al., 2001; Rikitake et al., 2000). Zudem wurde, wie bereits erwähnt, eine erhöhte ERK1/2-Aktivität der NIH3T3/PTP-Meg2C515S-Zellen im Focusbildungstest beobachtet. Jedoch können Wundheilungs- und Focusbildungstest hinsichtlich experimenteller Parameter nicht unbedingt miteinander verglichen werden. MAPK-Kaskaden sind zwar an Migrationsprozessen beteiligt, jedoch für diese nicht generell limitierend. So spielen verschiedene Signaltransduktionsmoleküle, wie z.B. kleine GTPasen, PKC, Ca<sup>2+</sup>-regulierte Proteine, Phospholipase C und D, Proteine der Zell-Matrix-Kontakte sowie Tyrosin-Kinasen eine wichtige Rolle. Dabei stellen Rho-GTPasen sowie der Auf- und Abbau der Zell-Matrix-Kontakte Hauptregulationspunkte der Zellmigration dar (Ridley, 2001a). Dementsprechend kann der Effekt der durch PTP-Meg2-Expression erhöhten Migration von NIH3T3-Zellen auf eine Funktion dieser PTPase bei der Regulation eines oder mehrerer der erwähnten Proteine zurückzuführen sein. Ein Einfluss der Expression der PTP-Meg2-Proteine z.B. auf die Phosphorylierung von FAK konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Es muss darauf hingewiesen werden, dass das Wundheilungsexperiment kein reiner Migrationstest ist, sondern eine Heilung der Wunde auch mehr oder weniger stark durch Proliferation erfolgen kann. Auf Grund der Sensibilität der NIH3T3-Zellen konnte dieses Experiment zudem nicht unter Serumentzug sondern lediglich mit einer suboptimalen Serumkonzentration (4% FCS) durchgeführt werden. Da für PTP-Meg2 bzw. deren CS-Mutante jedoch kein Einfluss auf die Proliferation nachweisbar war und die in die Wunde einwandernden Zellen für eine Migration charakteristische morphologische Veränderungen wie Ausstülpungen und Filopodien aufwiesen, kann eine Verfälschung des Effekts durch Proliferation weitgehend ausgeschlossen werden. Erwähnenswert ist auch, dass der durch PTP-Meg2 vermittelte Effekt auf die Migration von NIH3T3-Zellen mit steigender Anzahl an Zellkulturpassagen zunehmend vermindert wurde. Die Ursache hierfür ist im polyklonalen Ursprung der Zellen zu sehen.

Es ist bekannt, dass eine ganze Reihe weiterer humaner Proteine, wie auch die N-terminale CRALBP-Domäne der PTP-Meg2, Sequenzhomologien zu dem Phosphatidylinositol-Transferprotein Sec14p aus der Hefe *S. cerevisiae* besitzen (Aravind et al., 1999). Bei diesen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) sowie GAPs (GTPase Activating Protein), welche die Aktivität kleiner GTPasen der Rho und Ras-Familie regulieren. Es wurde diskutiert, dass solche Proteine mit Sec14p-homologen Domänen zur Regulation von Ras- oder Rho- Proteinen bzw. derer Signalwege beitragen. Auf Grund fehlender Dbl- und Pleckstrin-Homologie-Domänen ist es eher unwahrscheinlich, dass PTP-Meg2 eine Funktion als GEF besitzen könnte. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Proteine unterschiedlichster katalytischer Aktivitäten auch als GAPs fungieren können. So wurde z.B. berichtet, dass Phospholipase C eine GTPase-aktivierende Eigenschaft bezüglich trimerer G-Proteine besitzt (Montell, 2000). Auch für die Tyrosin-Phosphatase SptP aus *Salmonella* konnte klar eine GTPase-Aktivität für Rac und Cdc42 demonstriert werden (Fu and Galan, 1999). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob PTP-Meg2 eine GAP-Aktivität für GTPasen der Rho-Familie besitzt. Dies war jedoch in dem gewählten experimentellen Ansatz nicht der Fall. Es ist dennoch vorstellbar, dass PTP-Meg2 Signalwege, an denen kleine GTPasen beteiligt sind, auf andere Weise regulieren kann. So ist PTP-Meg2 zumindest partiell in vesikulären Strukturen lokalisiert (s. Abb. 9). Kürzlich publizierte Daten deuten zudem darauf hin, dass PTP-Meg2 eine Funktion bei der Regulation von Phagosomen und sekretorischen Vesikeln besitzt (Kruger et al., 2002; Wang et al., 2002). Für GTPasen der Rho-Familie wurde ebenfalls eine Beteiligung bei phago-, endo- und exocytotischen Wegen nachgewiesen (Ridley, 2001b). Wie bereits erwähnt, spielen Rho-GTPasen auch bei der

Regulation der Migration eine Rolle. Da PTP-Meg2 ebenfalls einen Effekt auf die Migration hat, könnten sie auch hier auf durch GTPasen kontrollierte Signalwege einwirken.

Mit Hilfe der siRNA-Strategie, mit der die Expression eines Gens weitgehend unterdrückt werden kann, was zu einem sogenannten „knockdown“-Phänotyp führt, konnte ein weiterer Einblick in die mögliche Funktion der PTP-Meg2 erhalten werden. Im Gegensatz zu Strategien mit dominant negativen Mutanten können dabei auch Effektoren, die durch eine Interaktion unabhängig von der katalytischen Aktivität reguliert werden, erfasst werden. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die siRNA induzierte Depletion der PTP-Meg2 in HBL-100- und MCF 7-Zellen im Gegensatz zur Überexpression der CS- bzw. DA-Mutanten eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung einiger zellulärer Proteine zur Folge hatte. Allerdings war die Phosphorylierung nur schwach erhöht. Bei den Proteinen, welche nach Depletion der PTP-Meg2 eine erhöhte Phosphorylierung aufwiesen, kann es sich sowohl um direkte als auch indirekte Substrate handeln. Um genauere Aussagen darüber zu treffen, ob es sich bei diesen Proteinen um mögliche Substrate der PTP-Meg2 handelt, müssen diese angereichert und identifiziert werden.

Ein generelles Problem bei der Identifizierung von Substraten mittels siRNA kann in der Wahl des Zeitfensters liegen, in dem die Analysen durchgeführt werden. So kann man zwar gut den Zeitpunkt bestimmen, zu dem PTP-Meg2 maximal depletiert ist, jedoch ist keine Aussage darüber möglich, wie lange es dann dauert, bis daraus resultierende Effekte auftreten, oder ob diese durch andere Signalproteine kompensiert werden. Darin könnte z.B. die Ursache liegen, dass in A431-Zellen kein Effekt der Meg2-siRNA auf die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine beobachtet wurde. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Transfektionseffizienz der siRNA. Zwar konnte diese in den Experimenten annähernd gleich gehalten werden, jedoch lässt sich durch Verwendung eines kürzlich publizierten Vektors, der eine transienten oder stabilen Expression von siRNAs erlaubt (Brummelkamp et al., 2002), die Transfektionseffizienz sowie die Reproduzierbarkeit sicherlich noch erhöhen.

Die Funktion eines Proteins bei der Regulation zellulärer Prozesse kann auch Auswirkungen auf die Expression anderer Gene haben. In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Suppression der PTP-Meg2-Expression in A431- und HBL-100-Zellen zu einer induzierten bzw. reprimierten Expression einiger Gene führt. Jedoch wird aus der Betrachtung der Punkt-Diagramme der siGL2- und siMeg2-cDNA-Filter deutlich, dass zum einen die Regulation von nur wenigen Genen betroffen ist und zum anderen die Expressionsänderungen relativ gering sind. Dies lässt darauf schließen, dass PTP-Meg2 nicht unmittelbar an der Regulation von Proteinen beteiligt ist, die direkt Auswirkungen auf die Genregulation haben.

Ferner konnten in A431-Zellen ca. dreimal soviel Gene identifiziert werden, wie in HBL-100-Zellen. Die Ursache dafür ist sehr wahrscheinlich die unterschiedliche Effizienz des Meg2-„knockdowns“. Während die Meg2-Expression in A431 um ca. 84% reduziert war, war dies bei HBL-100 lediglich um 35% der Fall. Als Ursache hierfür könnte wiederum, wie bereits oben diskutiert, die Wahl des richtigen Zeitfensters sowie die Transfektionseffizienz in Betracht kommen.

Unter den in A431-Zellen nach Meg2-Depletion in ihrer Expression veränderten Genen befinden sich z. B. einige Liganden. So wurde eine induzierte Expression von TRAIL, einem Apoptose auslösenden Agonisten, sowie dem HER2-Liganden Heregulin beobachtet. Die Expression von Amphiregulin, einem Liganden für den EGF-Rezeptor, war hingegen reduziert. Da Liganden häufig über einen Rückkopplungsmechanismus durch den von ihnen stimulierten Signalweg in ihrer Expression reguliert werden, könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der PTP-Meg2 an der Sekretion von Proteinen sein, wie sie analog in T-Zellen gezeigt wurde. Dort führte eine Überexpression von PTP-Meg2 zu einer reduzierten Sekretion von Interleukin-2 (Wang et al., 2002). Auch Inhibin, ein Mitglied der TGF $\beta$ -Familie und das am stärksten induzierte Gen, spielt bei der Sekretion einiger Proteine, wie z.B. Insulin, eine Rolle. Vorstellbar ist aber auch eine Funktion von PTP-Meg2 bei endocytotischen Vorgängen. Hiermit kann auch eine erhöhte Expression von Caveolin 2 in Verbindung gebracht werden, einem Protein, das an der Endocytose sowie dem Vesikel-abhängigen und -unabhängigen Transport von Proteinen beteiligt ist (Matveev et al., 2001). Interessant ist auch die Meg2-abhängige Regulation von Genen, die an Signalwegen kleiner GTPasen beteiligt sind. So wird das Adapterprotein Nck induziert, das eine wichtige Funktion bei der durch Rho-GTPasen vermittelten Organisation des Zytoskeletts und der Zellmotilität besitzt (Li et al., 2001). Grb2, ein ebenfalls induziertes Adapterprotein, ist für die Aktivierung von Ras und somit für mitogene Signalwege essentiell (Tari and Lopez-Berestein, 2001). Auch das reprimierte Gen ROCK, ein Rho-Effektor, ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Leung et al., 1996). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist PTP-Meg2 durchaus an Prozessen beteiligt, welche ebenfalls durch Rho-GTPasen reguliert werden. Ein weiteres induziertes Gen codiert für den Tumorsuppressor PTEN. Hauptsächlich agiert PTEN als Lipidphosphatase und reduziert dadurch die Konzentration an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> in der Zelle. Dies führt unter anderem zu einer verminderten Aktivität von PKB/Akt, einem Überlebensfaktor, sowie RacGEF, was zu einer reduzierten Zellmotilität führt (Leslie and Downes, 2002). Neben TRAIL ist somit ein zweiter proapoptotischer Faktor induziert. Erwähnenswert ist, dass PTEN auch in HBL-100 induziert ist. Eine Reihe anderer identifizierter Gene lässt sich

nicht ohne weiteres mit einer Funktion von PTP-Meg2 in Einklang bringen. Um einen Kausalzusammenhang sowie funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen PTP-Meg2 und den Genen zu verifizieren, die nach einer Depletion von PTP-Meg2 eine veränderte Expression aufweisen, sind letztendlich noch weitere Untersuchungen notwendig. Generell zeigt sich die kombinierte Strategie aus siRNA-Technologie und cDNA-Filteranalyse aber als nützlich, Gene zu identifizieren, die mit einem Zielprotein in funktionellem Zusammenhang stehen.

#### **4.5 Ausblick**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die CRALBP-Domäne der PTP-Meg2 sowohl an der Lokalisation als auch der Negativregulation der Phosphataseaktivität beteiligt ist. Weitere Daten deuten darauf hin, dass diese Regulation durch die Interaktion mit Phospholipiden erfolgt. Die teilweise beobachtete Lokalisation der PTP-Meg2 in Vesikeln könnte somit zu einer ausreichenden Aktivierung erforderlich sein. Es ist notwendig zu untersuchen, inwieweit die zytosolisch lokalisierte PTP-Meg2 überhaupt eine physiologische Funktion besitzt, oder ob ihr Wirkungsbereich auf bestimmte Zellkompartimente, wie z.B. Vesikel, beschränkt ist. Ferner ist es notwendig, ihre genaue Beteiligung bei der Regulation endocytotischer und sekretorischer Vesikel oder darin enthaltener Proteine, so eventuell auch dem EGF-Rezeptor, aufzudecken, wodurch letztendlich auf relevante Signalwege rückgeschlossen werden kann. Ferner wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PTP-Meg2 einen Einfluss auf Zelltransformationsprozesse haben kann. Während eine Reduzierung des durch bestimmte Onkogene bedingten Verlusts der Kontaktinhibition festgestellt wurde, war der Einfluss auf die Migration von Zellen jedoch positiv. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig um diese auf den ersten Blick konträren Funktionen als Tumorsuppressor bzw. -promotor näher zu untersuchen. Da das Expressionsniveau der PTP-Meg2 in Krebszelllinien bis auf wenige Ausnahmen keine nennenswerten Unterschiede aufweist, wäre in diesem Zusammenhang auch eine Analyse der Expression in Primär- und Tumorgewebe erstrebenswert. Neben weiteren nötigen Aspekten, die zur Identifizierung von Substraten führen, zeichnet sich eine kombinierte siRNA-Strategie und cDNA-Analyse als ein nützlicher Ansatz zur Identifikation von Signalwegen ab, bei denen PTP-Meg2 eine Rolle spielt.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die biologische Funktion der PTP-Meg2 in der zellulären Signaltransduktion untersucht. Analysen mittels c-DNA-Filter, „Real Time PCR“ und Immunblot zeigen eine ubiquitäre Expression der PTP-Meg2 auf ähnlichem, jedoch geringem Niveau in fast allen untersuchten Krebszelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft, wobei die Expressionsstärke nicht in direktem Zusammenhang mit krebsrelevanten Eigenschaften wie Invasivität und Metastasierung steht. Die induzierte Differenzierung von MCF 7-Zellen durch Natriumbutyrat steigert die Meg2-Expression um das 5-fache, wogegen die Differenzierung von SW948- und SK-N-SH-Zellen mit TPA bzw. Retinolsäure die Meg2-Expression reprimiert. Zellfraktionierung und Immunfluoreszenz zeigen eine primär zytosolische, aber partiell auch vesikuläre bzw. strukturierte Lokalisation der PTP-Meg2, für welche die CRALBP-Domäne der PTP-Meg2 mitverantwortlich ist. Untersuchungen der endogenen Meg2-Aktivität nach Immunpräzipitation und *in vitro* Phosphatasetests zeigen eine erhöhte Phosphataseaktivität nach Stimulation von Zellen mit FCS, EGF und LPA, wogegen TPA stark inhibierend wirkt. Aktivitätsstudien mit GST-Meg2-Fusionsproteinen zeigen, dass die CRALBP-Domäne die Meg2-Phosphataseaktivität negativ reguliert. Im Protein-Lipid-Overlay interagiert PTP-Meg2 mit PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P und Phosphatidylserin. Eine Interaktion mit PI(4)P führt zu einer erhöhten Meg2-Aktivität. Pervanadat-Stimulation von Zellen führt zu einer Tyrosinphosphorylierung sowie einer Mobilitätsänderung der PTP-Meg2, was auch mit einer katalytisch inaktiven Meg2-Mutante beobachtet wurde. PTP-Meg2 interagiert *in vitro* und in Koexpressionsstudien mit dem EGF-Rezeptor in Abhängigkeit von dessen Aktivierung. Eine physiologische Relevanz konnte nicht gezeigt werden. Die Depletion der PTP-Meg2 durch spezifische siRNA führt zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung einiger, noch zu identifizierender Proteine. PTP-Meg2 vermindert, die inaktive PTP-Meg2CS-Mutante erhöht die durch v-ErbB und EGF-Rezeptor, nicht aber die durch HER2 und v-Ki-Ras induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen im Focusbildungstest. Zudem bewirkt PTP-Meg2CS, mit Ausnahme der v-Ki-Ras infizierten Zellen, eine leicht erhöhte ERK1/2-Aktivität. Ferner stimuliert PTP-Meg2 die Migration von NIH3T3-Zellen im Wundheilungsexperiment. Ein Einfluss auf die basale und durch Stimuli induzierte Proliferation von Zellen in Wachstumstests wurde nicht beobachtet. Ein durch siRNA-vermittelter Meg2-„knockdown“ führte zur Induktion bzw. Repression der Expression von Genen, wie z.B. einiger Liganden, Caveolin-2, Nck und Rock, was auf eine Beteiligung der PTP-Meg2 an der Regulation von Signalwegen kleiner GTPasen bzw. von endo- sowie exocytotischen Prozessen schließen lässt.

## 6 Literaturverzeichnis

Abram, C. L., and Courtneidge, S. A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling, *Exp Cell Res* 254, 1-13.

Adachi, M., Sekiya, M., Isobe, M., Kumura, Y., Ogita, Z., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of a human protein-tyrosine phosphatase LC-PTP, *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1607-15.

Ahmad, F., and Goldstein, B. J. (1997). Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells, *J Biol Chem* 272, 448-57.

Anand-Apte, B., Zetter, B. R., Viswanathan, A., Qiu, R. G., Chen, J., Ruggieri, R., and Symons, M. (1997). Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways, *J Biol Chem* 272, 30688-92.

Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K., and Moller, N. P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains, *Mol Cell Biol* 21, 7117-36.

Angers-Loustau, A., Cote, J. F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L. A., and Tremblay, M. L. (1999a). Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts, *J Cell Biol* 144, 1019-31.

Angers-Loustau, A., Cote, J. F., and Tremblay, M. L. (1999b). Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion, *Biochem Cell Biol* 77, 493-505.

Aravind, L., Neuwald, A. F., and Ponting, C. P. (1999). Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling, *Curr Biol* 9, R195-7.

Arregui, C. O., Balsamo, J., and Lilien, J. (1998). Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B, *J Cell Biol* 143, 861-73.

Arregui, C. O., Balsamo, J., and Lilien, J. (2000). Regulation of signaling by protein-tyrosine phosphatases: potential roles in the nervous system, *Neurochem Res* 25, 95-105.

Avraham, H., Avraham, S., and Taniguchi, Y. (2000). Receptor protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells, *J Hematother Stem Cell Res* 9, 425-32.

Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., and Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem* 272, 217-21.

Bae, Y. S., Sung, J. Y., Kim, O. S., Kim, Y. J., Hur, K. C., Kazlauskas, A., and Rhee, S. G. (2000). Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *J Biol Chem* 275, 10527-31.

- Banville, D., Ahmad, S., Stocco, R., and Shen, S. H. (1994). A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases, *J Biol Chem* *269*, 22320-7.
- Barnea, G., Grumet, M., Milev, P., Silvennoinen, O., Levy, J. B., Sap, J., and Schlessinger, J. (1994a). Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin, *J Biol Chem* *269*, 14349-52.
- Barnea, G., Grumet, M., Sap, J., Margolis, R. U., and Schlessinger, J. (1994b). Close similarity between receptor-linked tyrosine phosphatase and rat brain proteoglycan, *Cell* *76*, 205.
- Barnea, G., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A. M., Canoll, P. D., D'Eustachio, P., Morse, B., Levy, J. B., Laforgia, S., Huebner, K., and et al. (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases, *Mol Cell Biol* *13*, 1497-506.
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., and Chock, P. B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J Biol Chem* *274*, 34543-6.
- Beckmann, G., and Bork, P. (1993). An adhesive domain detected in functionally diverse receptors, *Trends Biochem Sci* *18*, 40-1.
- Bennett, A. M., Tang, T. L., Sugimoto, S., Walsh, C. T., and Neel, B. G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7335-9.
- Bhoola, R., and Hammond, K. (2000). Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells, *Cell Biol Int* *24*, 539-47.
- Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T., and Noel, J. P. (1996). Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization, *Nature* *382*, 555-9.
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A., and Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase, *Oncogene* *19*, 5620-35.
- Blanchetot, C., Tertoolen, L. G., and den Hertog, J. (2002). Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress, *Embo J* *21*, 493-503.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J., and Pulido, R. (1999). A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase, *J Cell Biol* *147*, 1129-36.
- Bliska, J. B., Clemens, J. C., Dixon, J. E., and Falkow, S. (1992). The Yersinia tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage, *J Exp Med* *176*, 1625-30.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling, *Nature* *411*, 355-65.
- Brady-Kalnay, S. M., and Tonks, N. K. (1994). Identification of the homophilic binding site of the receptor protein tyrosine phosphatase PTP mu, *J Biol Chem* *269*, 28472-7.

- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Lawrence, J. B., Johnson, C., Bruskin, A., Green, N. R., and Hill, D. E. (1990). Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B, *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 5148-52.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science* *296*, 550-3.
- Burridge, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling, *Annu Rev Cell Dev Biol* *12*, 463-518.
- Buschbeck, M., Eickhoff, J., Sommer, M. N., and Ullrich, A. (2002). Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signalling pathway, *J Biol Chem* *31*, 31.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9742-7.
- Cary, L. A., Han, D. C., and Guan, J. L. (1999). Integrin-mediated signal transduction pathways, *Histol Histopathol* *14*, 1001-9.
- Celler, J. W., Luo, X., Gonez, L. J., and Bohmer, F. D. (1995). mRNA expression of two transmembrane protein tyrosine phosphatases is modulated by growth factors and growth arrest in 3T3 fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun* *209*, 614-21.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature* *410*, 37-40.
- Charbonneau, H., Tonks, N. K., Kumar, S., Diltz, C. D., Harrylock, M., Cool, D. E., Krebs, E. G., Fischer, E. H., and Walsh, K. A. (1989). Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 5252-6.
- Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A., and Fischer, E. H. (1988). The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 7182-6.
- Charest, A., Wagner, J., Kwan, M., and Tremblay, M. L. (1997). Coupling of the murine protein tyrosine phosphatase PEST to the epidermal growth factor (EGF) receptor through a Src homology 3 (SH3) domain-mediated association with Grb2, *Oncogene* *14*, 1643-51.
- Chen, B., Bronson, R. T., Klamann, L. D., Hampton, T. G., Wang, J. F., Green, P. J., Magnuson, T., Douglas, P. S., Morgan, J. P., and Neel, B. G. (2000). Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis, *Nat Genet* *24*, 296-9.
- Chernoff, J., Schievella, A. R., Jost, C. A., Erikson, R. L., and Neel, B. G. (1990). Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 2735-9.
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated, *J Biol Chem* *270*, 14843-6.

- Cobb, M. H., Robbins, D. J., and Boulton, T. G. (1991). ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases, *Curr Opin Cell Biol* 3, 1025-32.
- Cool, D. E., Tonks, N. K., Charbonneau, H., Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1990). Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7280-4.
- Cool, D. E., Tonks, N. K., Charbonneau, H., Walsh, K. A., Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1989). cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5257-61.
- Cote, J. F., Charest, A., Wagner, J., and Tremblay, M. L. (1998). Combination of gene targeting and substrate trapping to identify substrates of protein tyrosine phosphatases using PTP-PEST as a model, *Biochemistry* 37, 13128-37.
- Cunningham, B. A. (1995). Cell adhesion molecules as morphoregulators, *Curr Opin Cell Biol* 7, 628-33.
- Dechert, U., Adam, M., Harder, K. W., Clark-Lewis, I., and Jirik, F. (1994). Characterization of protein tyrosine phosphatase SH-PTP2. Study of phosphopeptide substrates and possible regulatory role of SH2 domains, *J Biol Chem* 269, 5602-11.
- den Hertog, J. (1999). Protein-tyrosine phosphatases in development, *Mech Dev* 85, 3-14.
- den Hertog, J., Blanchetot, C., Buist, A., Overvoorde, J., van der Sar, A., and Tertoolen, L. G. (1999). Receptor protein-tyrosine phosphatase signalling in development, *Int J Dev Biol* 43, 723-33.
- den Hertog, J., Pals, C. E., Peppelenbosch, M. P., Tertoolen, L. G., de Laat, S. W., and Kruijer, W. (1993). Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation, *Embo J* 12, 3789-98.
- den Hertog, J., Tracy, S., and Hunter, T. (1994). Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on Tyr789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 in vivo, *Embo J* 13, 3020-32.
- Denu, J. M., Lohse, D. L., Vijayalakshmi, J., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1996). Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2493-8.
- Denu, J. M., and Tanner, K. G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation, *Biochemistry* 37, 5633-42.
- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras, *Curr Biol* 7, R258-60.
- Drake, P. G., and Posner, B. I. (1998). Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): role in insulin action, *Mol Cell Biochem* 182, 79-89.

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* *411*, 494-8.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs, *Methods* *26*, 199-213.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., *et al.* (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene, *Science* *283*, 1544-8.
- Fang, K. S., Barker, K., Sudol, M., and Hanafusa, H. (1994). A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain, *J Biol Chem* *269*, 14056-63.
- Feng, G. S., Hui, C. C., and Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases, *Science* *259*, 1607-11.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* *391*, 806-11.
- Flint, A. J., Gebbink, M. F., Franza, B. R., Jr., Hill, D. E., and Tonks, N. K. (1993). Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation, *Embo J* *12*, 1937-46.
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D., and Tonks, N. K. (1997). Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1680-5.
- Flores, E., Roy, G., Patel, D., Shaw, A., and Thomas, M. L. (1994). Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase, *Mol Cell Biol* *14*, 4938-46.
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A., and Neel, B. G. (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence, *Cell* *68*, 545-60.
- Freeman, R. M., Jr., Plutzky, J., and Neel, B. G. (1992). Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew, *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 11239-43.
- Fu, Y., and Galan, J. E. (1999). A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion, *Nature* *401*, 293-7.
- Garton, A. J., Flint, A. J., and Tonks, N. K. (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST, *Mol Cell Biol* *16*, 6408-18.
- Garton, A. J., and Tonks, N. K. (1994). PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation, *Embo J* *13*, 3763-71.

- Garton, A. J., and Tonks, N. K. (1999). Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST, *J Biol Chem* 274, 3811-8.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., and Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2, *Cell* 67, 197-211.
- Gebbink, M. F., van Etten, I., Hateboer, G., Suijkerbuijk, R., Beijersbergen, R. L., Geurts van Kessel, A., and Moolenaar, W. H. (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase, *FEBS Lett* 290, 123-30.
- Gebbink, M. F., Zondag, G. C., Wubbolts, R. W., Beijersbergen, R. L., van Etten, I., and Moolenaar, W. H. (1993). Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase, *J Biol Chem* 268, 16101-4.
- Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M., Han, S., Wang, X., Alonso, A., Renedo, M., Oh, P., Williams, S., Schnitzer, J., and Mustelin, T. (2000). Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells, *Eur J Immunol* 30, 2412-21.
- Gu, M., Warshawsky, I., and Majerus, P. W. (1992). Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC14p, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2980-4.
- Gu, M. X., York, J. D., Warshawsky, I., and Majerus, P. W. (1991). Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5867-71.
- Guan, K. L., and Dixon, J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*, *Science* 249, 553-6.
- Guan, K. L., and Dixon, J. E. (1991). Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate, *J Biol Chem* 266, 17026-30.
- Guan, K. L., Haun, R. S., Watson, S. J., Geahlen, R. L., and Dixon, J. E. (1990). Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1501-5.
- Gullick, W. J. (1998). Type I growth factor receptors: current status and future work, *Biochem Soc Symp* 63, 193-8.
- Hager, G., Eckert, E., and Schwaiger, F. W. (1999). Semiquantitative analysis of low levels of mRNA expression from small amounts of brain tissue by nonradioactive reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *J Neurosci Methods* 89, 141-9.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *Faseb J* 9, 576-96.
- Harder, K. W., Moller, N. P., Peacock, J. W., and Jirik, F. R. (1998). Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion, *J Biol Chem* 273, 31890-900.

- Hashimoto, N., Zhang, W. R., and Goldstein, B. J. (1992). Insulin receptor and epidermal growth factor receptor dephosphorylation by three major rat liver protein-tyrosine phosphatases expressed in a recombinant bacterial system, *Biochem J* 284, 569-76.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emler, D. R., Dieterich, R., and Wong, A. J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12419-24.
- Hooft van Huijsduijnen, R. (1998). Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest, *Gene* 225, 1-8.
- Hunter, T. (1989). Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin, *Cell* 58, 1013-6.
- Hunter, T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 583-605.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. J., and Ramachandran, C. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate, *J Biol Chem* 272, 843-51.
- Ibarra-Sanchez, M. J., Simoncic, P. D., Nestel, F. R., Duplay, P., Lapp, W. S., and Tremblay, M. L. (2000). The T-cell protein tyrosine phosphatase, *Semin Immunol* 12, 379-86.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J., and Tonks, N. K. (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B, *Science* 268, 1754-8.
- Jiang, G., den Hertog, J., and Hunter, T. (2000). Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface, *Mol Cell Biol* 20, 5917-29.
- Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J., Sap, J., and Hunter, T. (1999). Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha, *Nature* 401, 606-10.
- Kanba, S., Kanba, K. S., and Richelson, E. (1986). The protein kinase C activator, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), inhibits muscarinic (M1) receptor-mediated inositol phosphate release and cyclic GMP formation in murine neuroblastoma cells (clone N1E-115), *Eur J Pharmacol* 125, 155-6.
- Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7000-4.
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H., *et al.* (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice, *Mol Cell Biol* 20, 5479-89.
- Klingler-Hoffmann, M., Fodero-Tavoletti, M. T., Mishima, K., Narita, Y., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., Huang, H. J., and Tiganis, T. (2001). The protein tyrosine phosphatase TCPTP suppresses the tumorigenicity of glioblastoma cells expressing a mutant epidermal growth factor receptor, *J Biol Chem* 276, 46313-8.



- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., and Lodish, H. F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals, *Cell* *80*, 729-38.
- Kolibaba, K. S., and Druker, B. J. (1997). Protein tyrosine kinases and cancer, *Biochim Biophys Acta* *1333*, F217-48.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res* *15*, 8125-48.
- Kozak, M. (1988). Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress, *Mol Cell Biol* *8*, 2737-44.
- Krueger, J. S., Keshamouni, V. G., Atanaskova, N., and Reddy, K. B. (2001). Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion, *Oncogene* *20*, 4209-18.
- Krueger, N. X., and Saito, H. (1992). A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases, *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 7417-21.
- Krueger, N. X., Streuli, M., and Saito, H. (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases, *Embo J* *9*, 3241-52.
- Kruger, J. M., Fukushima, T., Cherepanov, V., Borregaard, N., Loeve, C., Shek, C., Sharma, K., Tanswell, A. K., Chow, C. W., and Downey, G. P. (2002). Protein-tyrosine phosphatase MEG2 is expressed by human neutrophils. Localization to the phagosome and activation by polyphosphoinositides, *J Biol Chem* *277*, 2620-8.
- Kulas, D. T., Goldstein, B. J., and Mooney, R. A. (1996). The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases, *J Biol Chem* *271*, 748-54.
- Kulas, D. T., Zhang, W. R., Goldstein, B. J., Furlanetto, R. W., and Mooney, R. A. (1995). Insulin receptor signaling is augmented by antisense inhibition of the protein tyrosine phosphatase LAR, *J Biol Chem* *270*, 2435-8.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol Rev* *81*, 807-69.
- LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Cannizzaro, L. A., Li, F., Nowell, P. C., Boghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A., and et al. (1991). Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21, *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5036-40.
- Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., and Notkins, A. L. (1994). Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma, *DNA Cell Biol* *13*, 505-14.

- Lechleider, R. J., Sugimoto, S., Bennett, A. M., Kashishian, A. S., Cooper, J. A., Shoelson, S. E., Walsh, C. T., and Neel, B. G. (1993). Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor, *J Biol Chem* 268, 21478-81.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., and Rhee, S. G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor, *J Biol Chem* 273, 15366-72.
- Leslie, N. R., and Downes, C. P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling, *Cell Signal* 14, 285-95.
- Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton, *Mol Cell Biol* 16, 5313-27.
- Levy, J. B., Canoll, P. D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A. M., Huang, J. T., Cannizzaro, L. A., Park, S. H., Druck, T., and et al. (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system, *J Biol Chem* 268, 10573-81.
- Li, P. M., Zhang, W. R., and Goldstein, B. J. (1996). Suppression of insulin receptor activation by overexpression of the protein-tyrosine phosphatase LAR in hepatoma cells, *Cell Signal* 8, 467-73.
- Li, R. Y., Gaits, F., Ragab, A., Ragab-Thomas, J. M., and Chap, H. (1995). Tyrosine phosphorylation of an SH2-containing protein tyrosine phosphatase is coupled to platelet thrombin receptor via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G-protein, *Embo J* 14, 2519-26.
- Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T. (2001). Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton, *Oncogene* 20, 6403-17.
- Liu, F., and Chernoff, J. (1997). Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor, *Biochem J* 327, 139-45.
- Liu, F., Hill, D. E., and Chernoff, J. (1996). Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas), *J Biol Chem* 271, 31290-5.
- Liu, F., Sells, M. A., and Chernoff, J. (1998). Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling, *Curr Biol* 8, 173-6.
- Lombroso, P. J., Murdoch, G., and Lerner, M. (1991). Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7242-6.
- Longo, F. M., Martignetti, J. A., Le Beau, J. M., Zhang, J. S., Barnes, J. P., and Brosius, J. (1993). Leukocyte common antigen-related receptor-linked tyrosine phosphatase. Regulation of mRNA expression, *J Biol Chem* 268, 26503-11.

- Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K., Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C., and et al. (1994). Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers, *J Biol Chem* *269*, 2075-81.
- Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E., and Thomas, M. L. (1992). Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences, *Mol Cell Biol* *12*, 2396-405.
- Matthews, R. J., Cahir, E. D., and Thomas, M. L. (1990). Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4444-8.
- Matveev, S., Li, X., Everson, W., and Smart, E. J. (2001). The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking, *Adv Drug Deliv Rev* *49*, 237-50.
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R. K., and Margolis, R. U. (1994). Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2512-6.
- Meng, T. C., Fukada, T., and Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo, *Mol Cell* *9*, 387-99.
- Meyer, S., LaBudda, K., McGlade, J., and Hayman, M. J. (1994). Analysis of the role of the Shc and Grb2 proteins in signal transduction by the v-ErbB protein, *Mol Cell Biol* *14*, 3253-62.
- Milarski, K. L., Zhu, G., Pearl, C. G., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., MacLean, D., Thieme-Seffler, A., Zhang, Z. Y., Sawyer, T., Decker, S. J., and et al. (1993). Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B, *J Biol Chem* *268*, 23634-9.
- Mizuno, K., Hasegawa, K., Katagiri, T., Ogimoto, M., Ichikawa, T., and Yakura, H. (1993). MPTP delta, a putative murine homolog of HPTP delta, is expressed in specialized regions of the brain and in the B-cell lineage, *Mol Cell Biol* *13*, 5513-23.
- Moller, N. P., Moller, K. B., Lammers, R., Kharitononkov, A., Hoppe, E., Wiberg, F. C., Sures, I., and Ullrich, A. (1995). Selective down-regulation of the insulin receptor signal by protein-tyrosine phosphatases alpha and epsilon, *J Biol Chem* *270*, 23126-31.
- Moller, N. P., Moller, K. B., Lammers, R., Kharitononkov, A., Sures, I., and Ullrich, A. (1994). Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7477-81.
- Montell, C. (2000). PLC fills a GAP in G-protein-coupled signalling, *Nat Cell Biol* *2*, E82-3.
- Montgomery, M. K., Xu, S., and Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15502-7.

- Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation, *Curr Opin Cell Biol* 9, 174-9.
- Neel, B. G., and Tonks, N. K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction, *Curr Opin Cell Biol* 9, 193-204.
- Nguyen, T. H., Paul, S., Xu, Y., Gurd, J. W., and Lombroso, P. J. (1999). Calcium-dependent cleavage of striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP), *J Neurochem* 73, 1995-2001.
- Oh, E. S., Gu, H., Saxton, T. M., Timms, J. F., Hausdorff, S., Frevert, E. U., Kahn, B. B., Pawson, T., Neel, B. G., and Thomas, S. M. (1999). Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2, *Mol Cell Biol* 19, 3205-15.
- Ostman, A., and Bohmer, F. D. (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases, *Trends Cell Biol* 11, 258-66.
- Ostman, A., Yang, Q., and Tonks, N. K. (1994). Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9680-4.
- Pannifer, A. D., Flint, A. J., Tonks, N. K., and Barford, D. (1998). Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography, *J Biol Chem* 273, 10454-62.
- Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M., and Weed, S. A. (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement, *Oncogene* 19, 5606-13.
- Patarca, R. (1996). Protein phosphorylation and dephosphorylation in physiologic and oncologic processes, *Crit Rev Oncog* 7, 343-432.
- Pluskey, S., Wandless, T. J., Walsh, C. T., and Shoelson, S. E. (1995). Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains, *J Biol Chem* 270, 2897-900.
- Ponniah, S., Wang, D. Z., Lim, K. L., and Pallen, C. J. (1999). Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTPalpha leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn, *Curr Biol* 9, 535-8.
- Porter, A. C., and Vaillancourt, R. R. (1998). Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis, *Oncogene* 17, 1343-52.
- Pot, D. A., Woodford, T. A., Remboutsika, E., Haun, R. S., and Dixon, J. E. (1991). Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase, *J Biol Chem* 266, 19688-96.
- Pulido, R., Serra-Pages, C., Tang, M., and Streuli, M. (1995). The LAR/PTP delta/PTP sigma subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP delta, and PTP sigma isoforms are expressed in a tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11686-90.
- Pulido, R., Zuniga, A., and Ullrich, A. (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif, *Embo J* 17, 7337-50.

- Qi, Y., Zhao, R., Cao, H., Sui, X., Krantz, S. B., and Zhao, Z. J. (2002). Purification and characterization of protein tyrosine phosphatase PTP-MEG2, *J Cell Biochem* 86, 79-89.
- Qu, C. K., Yu, W. M., Azzarelli, B., and Feng, G. S. (1999). Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8528-33.
- Raben, D. M., and Cunningham, D. D. (1985). Effects of EGF and thrombin on inositol-containing phospholipids of cultured fibroblasts: stimulation of phosphatidylinositol synthesis by thrombin but not EGF, *J Cell Physiol* 125, 582-90.
- Ravetch, J. V., and Lanier, L. L. (2000). Immune inhibitory receptors, *Science* 290, 84-9.
- Resh, M. D. (1994). Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter, *Cell* 76, 411-3.
- Ridley, A. J. (2001a). Rho GTPases and cell migration, *J Cell Sci* 114, 2713-22.
- Ridley, A. J. (2001b). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking, *Traffic* 2, 303-10.
- Rikitake, Y., Kawashima, S., Yamashita, T., Ueyama, T., Ishido, S., Hotta, H., Hirata, K., and Yokoyama, M. (2000). Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1006-12.
- Rodrigues, G. A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S. H., and Schlessinger, J. (2000). A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling, *Mol Cell Biol* 20, 1448-59.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science* 234, 364-8.
- Ruivenkamp, C. A., van Wezel, T., Zanon, C., Stassen, A. P., Vlcek, C., Csikos, T., Klous, A. M., Tripodis, N., Perrakis, A., Boerrigter, L., *et al.* (2002). Ptpnj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers, *Nat Genet* 31, 295-300.
- Sap, J., Jiang, Y. P., Friedlander, D., Grumet, M., and Schlessinger, J. (1994). Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding, *Mol Cell Biol* 14, 1-9.
- Saras, J., Franzen, P., Aspenstrom, P., Hellman, U., Gonez, L. J., and Heldin, C. H. (1997). A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1, *J Biol Chem* 272, 24333-8.
- Saxton, T. M., Ciruna, B. G., Holmyard, D., Kulkarni, S., Harpal, K., Rossant, J., and Pawson, T. (2000). The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development, *Nat Genet* 24, 420-3.
- Saxton, T. M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D. J., Shalaby, F., Feng, G. S., and Pawson, T. (1997). Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2, *Embo J* 16, 2352-64.

- Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers, *Mol Cell Biol* 19, 2435-44.
- Schievella, A. R., Paige, L. A., Johnson, K. A., Hill, D. E., and Erikson, R. L. (1993). Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine, *Cell Growth Differ* 4, 239-46.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R., and Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase, *Prog Biophys Mol Biol* 71, 435-78.
- Schlaepfer, D. D., and Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?, *Trends Cell Biol* 8, 151-7.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103, 211-25.
- Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases, *Neuron* 9, 383-91.
- Seimiya, H., and Tsuruo, T. (1998). Functional involvement of PTP-U2L in apoptosis subsequent to terminal differentiation of monoblastoid leukemia cells, *J Biol Chem* 273, 21187-93.
- Serra-Pages, C., Kedersha, N. L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A., and Streuli, M. (1995). The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions, *Embo J* 14, 2827-38.
- Sharma, E., and Lombroso, P. J. (1995). A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor, *J Biol Chem* 270, 49-53.
- Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I., and Chretien, P. (1991). A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases, *Nature* 352, 736-9.
- Shi, Z. Q., Lu, W., and Feng, G. S. (1998). The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases, *J Biol Chem* 273, 4904-8.
- Shifrin, V. I., Davis, R. J., and Neel, B. G. (1997). Phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signaling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells, *J Biol Chem* 272, 2957-62.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences, *Cell* 72, 767-78.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., and et al. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav, *Mol Cell Biol* 14, 2777-85.

- Sorby, M., Sandstrom, J., and Ostman, A. (2001). An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1, *Oncogene* 20, 5219-24.
- Sparks, J. W., and Brautigan, D. L. (1985). Specificity of protein phosphotyrosine phosphatases. Comparison with mammalian alkaline phosphatase using polypeptide substrates, *J Biol Chem* 260, 2042-5.
- Streuli, M., Krueger, N. X., Ariniello, P. D., Tang, M., Munro, J. M., Blattler, W. A., Adler, D. A., Disteche, C. M., and Saito, H. (1992). Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region, *Embo J* 11, 897-907.
- Streuli, M., Krueger, N. X., Hall, L. R., Schlossman, S. F., and Saito, H. (1988). A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen, *J Exp Med* 168, 1523-30.
- Streuli, M., Krueger, N. X., Thai, T., Tang, M., and Saito, H. (1990). Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR, *Embo J* 9, 2399-407.
- Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression, *Curr Opin Immunol* 8, 402-11.
- Su, J., Batzer, A., and Sap, J. (1994). Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-alpha is tyrosine-phosphorylated and associated with the adaptor protein Grb2, *J Biol Chem* 269, 18731-4.
- Su, J., Muranjan, M., and Sap, J. (1999). Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts, *Curr Biol* 9, 505-11.
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., and Tonks, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo, *Cell* 75, 487-93.
- Taniguchi, Y., London, R., Schinkmann, K., Jiang, S., and Avraham, H. (1999). The receptor protein tyrosine phosphatase, PTP-RO, is upregulated during megakaryocyte differentiation and is associated with the c-Kit receptor, *Blood* 94, 539-49.
- Tari, A. M., and Lopez-Berestein, G. (2001). GRB2: a pivotal protein in signal transduction, *Semin Oncol* 28, 142-7.
- Thomas, M. L., Barclay, A. N., Gagnon, J., and Williams, A. F. (1985). Evidence from cDNA clones that the rat leukocyte-common antigen (T200) spans the lipid bilayer and contains a cytoplasmic domain of 80,000 Mr, *Cell* 41, 83-93.
- Tiganis, T., Bennett, A. M., Ravichandran, K. S., and Tonks, N. K. (1998). Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase, *Mol Cell Biol* 18, 1622-34.

- Tiganis, T., Kemp, B. E., and Tonks, N. K. (1999). The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling, *J Biol Chem* *274*, 27768-75.
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. (1988). Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta, *J Biol Chem* *263*, 6731-7.
- Tonks, N. K., and Neel, B. G. (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases, *Curr Opin Cell Biol* *13*, 182-95.
- Traish, A., Kim, N. N., Huang, Y. H., Goldstein, I., and Moreland, R. B. (2000). Cyclic AMP regulates mRNA expression of alpha-1d and alpha-2a adrenergic receptors in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells, *Int J Impot Res* *12*, S41-47.
- Treinin, I., Paterson, H. F., Hooper, S., Wilson, R., and Marshall, C. J. (1999). Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis, *Mol Cell Biol* *19*, 321-9.
- Tsui, F. W., and Tsui, H. W. (1994). Molecular basis of the motheaten phenotype, *Immunol Rev* *138*, 185-206.
- Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C., and Kasuga, M. (1994). Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains, *J Biol Chem* *269*, 12220-8.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, *Nature* *309*, 418-25.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell* *61*, 203-12.
- van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways, *Annu Rev Cell Biol* *10*, 251-337.
- Van Vactor, D. (1998). Protein tyrosine phosphatases in the developing nervous system, *Curr Opin Cell Biol* *10*, 174-81.
- Vicentini, L. M., and Villereal, M. L. (1984). Serum, bradykinin and vasopressin stimulate release of inositol phosphates from human fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun* *123*, 663-70.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation, *Science* *259*, 1611-4.
- Wahl, M. I., Sweatt, J. D., and Carpenter, G. (1987). Epidermal growth factor (EGF) stimulates inositol trisphosphate formation in cells which overexpress the EGF receptor, *Biochem Biophys Res Commun* *142*, 688-95.



- Walton, K. M., Martell, K. J., Kwak, S. P., Dixon, J. E., and Largent, B. L. (1993). A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase is expressed during neurogenesis in the olfactory neuroepithelium, *Neuron* *11*, 387-400.
- Wang, X., Huynh, H., Gyorloff-Wingren, A., Monosov, E., Stridsberg, M., Fukuda, M., and Mustelin, T. (2002). Enlargement of secretory vesicles by protein tyrosine phosphatase PTP-MEG2 in rat basophilic leukemia mast cells and Jurkat T cells, *J Immunol* *168*, 4612-9.
- Wang, Y., Guo, W., Liang, L., and Esselman, W. J. (1999). Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis, *J Biol Chem* *274*, 7454-61.
- Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals, *Trends Biochem Sci* *23*, 481-5.
- Wiggins, R. C., Wiggins, J. E., Goyal, M., Wharram, B. L., and Thomas, P. E. (1995). Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13, *Genomics* *27*, 174-81.
- Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition, *Annu Rev Immunol* *6*, 381-405.
- Woodford-Thomas, T. A., Rhodes, J. D., and Dixon, J. E. (1992). Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts, *J Cell Biol* *117*, 401-14.
- Yan, H., Grossman, A., Wang, H., D'Eustachio, P., Mossie, K., Musacchio, J. M., Silvennoinen, O., and Schlessinger, J. (1993). A novel receptor tyrosine phosphatase-sigma that is highly expressed in the nervous system, *J Biol Chem* *268*, 24880-6.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J., and Tonks, N. K. (1993). Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, *J Biol Chem* *268*, 17650.
- Yang, Q., and Tonks, N. K. (1991). Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin, *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5949-53.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network, *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127-37.
- Yi, T., Zhang, J., Miura, O., and Ihle, J. N. (1995). Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites, *Blood* *85*, 87-95.
- Yi, T. L., Cleveland, J. L., and Ihle, J. N. (1992). Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13, *Mol Cell Biol* *12*, 836-46.

- Yu, D. H., Qu, C. K., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G. S. (1998). Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion, *J Biol Chem* *273*, 21125-31.
- Yu, Q., Lenardo, T., and Weinberg, R. A. (1992). The N-terminal and C-terminal domains of a receptor tyrosine phosphatase are associated by non-covalent linkage, *Oncogene* *7*, 1051-7.
- Zachary, I., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (1992). Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate, *J Biol Chem* *267*, 19031-4.
- Zander, N. F., Cool, D. E., Diltz, C. D., Rohrschneider, L. R., Krebs, E. G., and Fischer, E. H. (1993). Suppression of v-fms-induced transformation by overexpression of a truncated T-cell protein tyrosine phosphatase, *Oncogene* *8*, 1175-82.
- Zhang, W. R., Hashimoto, N., Ahmad, F., Ding, W., and Goldstein, B. J. (1994a). Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphate family, *Biochem J* *302*, 39-47.
- Zhang, W. R., Li, P. M., Oswald, M. A., and Goldstein, B. J. (1996). Modulation of insulin signal transduction by eutopic overexpression of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR, *Mol Endocrinol* *10*, 575-84.
- Zhang, Z. Y., Wang, Y., Wu, L., Fauman, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1994b). The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis, *Biochemistry* *33*, 15266-70.
- Zhang, Z. Y., Zhou, G., Denu, J. M., Wu, L., Tang, X., Mondesert, O., Russell, P., Butch, E., and Guan, K. L. (1995). Purification and characterization of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase, Stp1, from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemistry* *34*, 10560-8.
- Zhao, Z., Larocque, R., Ho, W. T., Fischer, E. H., and Shen, S. H. (1994a). Purification and characterization of PTP2C, a widely distributed protein tyrosine phosphatase containing two SH2 domains, *J Biol Chem* *269*, 8780-5.
- Zhao, Z., Shen, S. H., and Fischer, E. H. (1994b). Phorbol ester-induced expression, phosphorylation, and translocation of protein-tyrosine-phosphatase 1C in HL-60 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5007-11.
- Zheng, X. M., Resnick, R. J., and Shalloway, D. (2000). A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha, *Embo J* *19*, 964-78.
- Zheng, X. M., Wang, Y., and Pallen, C. J. (1992). Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase, *Nature* *359*, 336-9.
- Zondag, G. C., Koningstein, G. M., Jiang, Y. P., Sap, J., Moolenaar, W. H., and Gebbink, M. F. (1995). Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain, *J Biol Chem* *270*, 14247-50.

## 7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cDNA	komplementäre DNA
c-jun	zelluläres Homolog zu v-jun (avian sarcoma virus 17 oncogene)
CRALBP	Cellular Retinaldehyde Binding Protein
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	dominant negativ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FNIII	FibronectinIII
g	Gramm
G-418	Genetecin
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR(en)	G protein-coupled receptor(s)
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER2, 3, 4	humaner EGFR 2, 3, 4
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
IR	Insulin-Rezeptor
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIM	Kinase Interaktionsmotiv
l	Liter
LMW-PTP	Low Molecular Weight-PTP
LPA	Lysophosphatidylsäure
μ	micro
m	milli
M	Molar
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
Min.	Minute
MKP1	MAPKinase Phosphatase 1
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	nano
N-CAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NGF	Neuronal Growth Factor
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Phosphatase-Domäne
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDZ Domäne	Post synaptic density Disc-large Zo-1
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat

PP1, 2	Protein Phosphatase 1, 2
PTB	Phosphotyrosine binding
PTK(n)	Proteintyrosinkinase(n)
PTPase(n)	Proteintyrosinphosphatase(n)
PTP-SL	Proteintyrosinphosphatase-Step Like
pY	Phosphotyrosin
Ras	Homolog zu v-ras (rat sarcoma viral oncogene)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK(en)	Rezeptortyrosinkinase(n)
s.	siehe
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SH2,3 Domäne	Src Homologie 2,3 Domäne
Shp-1, 2	SH2-containing PTP-1,2
siRNA	small interfering RNA
sog.	sogenannt
Sos	Son of sevenless
Src	Homolog zu v-src (sarcoma viral oncogene)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TK(en)	Tyrosinkinase(n)
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
E	Enzymaktivitätseinheit (Units)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-ErbB	avian erythroblastosis virus oncogene
v-Ki-Ras	Kirsten murine sarcoma viruses oncogene
WT	Wildtyp
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel



Mein besonderer Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. Ullrich, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

...Herrn Prof. Dr. Domdey, für die Bereitschaft diese Arbeit an der LMU München als Doktorvater zu betreuen.

...allen Mitgliedern der AG Ullrich, besonders in meinem Labor und Office, für die Zusammenarbeit und das stets heitere Arbeitsklima.

...meinen Eltern, für all ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

...meiner Freundin Geri, für ihre Liebe und dafür, dass sie stets für mich da ist.