

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

**Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL
im MAPKinase Signalweg**

vorgelegt von

Marc-Nicola Sommer
aus
Wilhelmshaven

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 selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.
Die benutzte Literatur sowie sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

München, am 20.06.2002

Marc-Nicola Sommer

Dissertation eingereicht am: 20. Juni 2002

1. Gutachter	Prof. Dr. Axel Ullrich
2. Gutachter	Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am: 04. Februar 2003

1	EINLEITUNG	1
1.1	Proteintyrosinphosphatasen	1
1.1.1	Rezeptorähnliche Proteintyrosinphosphatasen	3
1.1.2	Intrazelluläre Proteintyrosinphosphatasen	5
1.1.3	Regulation der Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen	7
1.2	Proteintyrosinkinasen	9
1.3	MAPKinasekaskaden	10
1.4	Zielsetzung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Bezugsquellennachweis	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Enzyme	15
2.1.3	Radiochemikalien	16
2.1.4	„Kits“ und Sonstiges	16
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Liganden	17
2.1.6	Medien und Puffer	17
2.1.7	Zellkulturmedien	17
2.1.8	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	18
2.1.9	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	20
2.1.9.1	Bakterienstämme	20
2.1.9.2	Zelllinien	20
2.1.9.3	Antikörper	21
2.1.10	Plasmide und Oligonukleotide	22
2.1.10.1	Ausgangsvektoren	22
2.1.10.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren	23
2.1.10.3	Wichtige Oligonukleotide	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	25
2.2.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	25
2.2.3	Enzymatische Behandlung von DNA	25
2.2.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	25
2.2.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	26
2.2.3.3	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	26

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	26
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	26
2.2.6	DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien	26
2.2.6.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	26
2.2.6.2	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	27
2.2.6.3	Dauerkulturen von <i>E.coli</i> Bakterien	27
2.2.7	Gezielte Mutagenese von DNA	27
2.2.7.1	Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3 DNA	27
2.2.7.2	Synthese des mutierten Stranges	28
2.2.8	Sequenzierung	28
2.2.8.1	Sequenzreaktion	28
2.2.8.2	Sequenzgele	29
2.2.9	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	30
2.2.9.1	PCR-Amplifikationen von DNA und cDNA Fragmenten	30
2.2.9.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	31
2.2.10	Arbeiten mit RNA	31
2.2.10.1	Präparation von RNA	31
2.2.10.2	Herstellung von cDNA	32
2.2.11	“Real-time” PCR	32
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	33
2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	33
2.3.2	Mykoplasmentest	33
2.3.3	Transfektion von Zellen	33
2.3.3.1	Kalziumphosphat-Transfektion	33
2.3.3.2	Lipofectamine®-Transfektion von COS-7 Zellen	34
2.3.3.3	Lipofectamine® plus-Transfektion von NIH-3T3 und PC12 Zellen	35
2.3.3.4	Polyfect®-Transfektion von CHO Zellen	35
2.3.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz	36
2.3.5	Retroviraler Gentransfer in PC12 Zellen	36
2.4	Proteinanalytische Methoden	36
2.4.1	Triton X-100-Lyse von Zellen	36
2.4.2	Proteinbestimmung	37
2.4.3	Immunpräzipitation von Proteinen	37
2.4.4	Präparation von pGEX-GST-Fusionsproteinen	38
2.4.5	GST-Bindungsassay	39
2.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.4.7	Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	40
2.4.8	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	40

2.4.9	Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	41
2.5	Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen	42
2.5.1	Stimulation von Zellen	42
2.5.2	Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAPKinase durch <i>in-vitro</i> Kinase-Test	42
2.5.3	<i>In-vitro</i> Phosphorylierung von PTP-SL durch PKA (PKA Assay)	43
2.5.4	Bestimmung der katalytischen Aktivität der PTP-SL mittels <i>in-vitro</i> Phosphatase-Test (pNPP Assay)	43
2.5.5	Bestimmung der katalytischen Aktivität unterschiedlicher PTP-SL Mutanten gegenüber der MAPK als Substrat	43
2.5.6	Untersuchung der Proliferation der stabilen PTP-SL PC12 Zelllinien	44
2.5.7	Untersuchung der Zellproliferation mittels Thymidineinbau	44
2.5.8	Messung der hunger-induzierten Apoptoserate (Apoptose Assay)	44
2.5.9	Zelladhäsionsassay	45
2.5.10	PC12 Differenzierungsassay	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	PTP-SL assoziiert mit den MAPKinasen ERK1/2	46
3.1.1	GST-Fusionsproteine der PTP-SL binden ERK1 und ERK2	46
3.1.2	Coimmunpräzipitation von PTP-SL und ERK1/2	47
3.2	PKA inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2 durch Phosphorylierung des Serin 231 in der KIM-Domäne der Phosphatase	49
3.2.1	<i>In-vitro</i> Phosphorylierung der KIM-Domäne durch PKA	49
3.2.2	Die Phosphorylierung der KIM-Domäne inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2	50
3.2.3	Der Phosphorylierungszustand des Serin 231 innerhalb der KIM-Domäne ist entscheidend für die Assoziation von PTP-SL mit ERK1/2	51
3.2.4	Forskolin Stimulation reduziert die Coimmunpräzipitation von PTP-SL und ERK2 in COS-7 Zellen	54
3.2.5	Hyperphosphorylierung der PTP-SL nach Inhibition von Ser/Thr-Phosphatasen durch Calyculin A und nachfolgender Stimulation mit Forskolin in COS-7 Zellen	55
3.3	Die Phosphorylierung des Serin 231 führt zu einem veränderten Enzym-Substrat-Verhalten der PTP-SL	57
3.3.1	Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 auf die PTP-SL vermittelte Inhibition der MAPKinase Aktivierung	57

3.3.2	Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 auf die Dephosphorylierung von ERK1/2	59
3.4	Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der PKA vermittelten PTP-SL/ERK1/2 Bindungsmodulation	60
3.4.1	Herstellung von stabil exprimierenden PC12 Zelllinien mit unterschiedlichen PTP-SL Konstrukten	60
3.4.2	Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL in verschiedenen Signalwegen	62
3.4.2.1	PTP-SL reduziert die ERK/MAPK Aktivierung nach Forskolin und aFGF Stimulation	62
3.4.2.2	PTP-SL reduziert die ERK/MAPKinase Aktivierung nach Bradykinin Stimulation	64
3.4.3	Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL bei der Zellproliferation	66
3.4.3.1	Untersuchung zum Wachstumsverhalten der monoklonalen PC12 Zelllinien	66
3.4.3.2	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von transient transfizierten NIH-3T3 und CHO Zellen	67
3.4.4	Rolle der PTP-SL bei der hunger-induzierten Apoptose der monoklonalen PC12 Zellen	68
3.4.5	Bedeutung der PTP-SL im Adhäsionsverhalten der monoklonalen PC12 Zellen	70
3.4.6	Untersuchungen zum Einfluss der PTP-SL auf die Differenzierung der monoklonalen PC12 Zellen	71
3.4.7	PTP-SL reduziert die Bradykinin induzierte c-fos Transkription	79
4	DISKUSSION	80
4.1	PTP-SL assoziiert mit den MAPKinasen ERK1/2	80
4.2	PKA inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2 durch Phosphorylierung des Serin 231 in der KIM-Domäne der Phosphatase	81
4.3	Die Phosphorylierung des Serin 231 führt zu einem veränderten Enzym-Substrat-Verhalten der PTP-SL	82
4.4	Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der PKA vermittelten PTP-SL/ERK1/2 Bindungsmodulation	83
4.4.1	Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL in verschiedenen Signalwegen	83
4.4.2	Effekt der PTP-SL auf die Zellproliferation	85
4.4.3	Rolle der PTP-SL bei der hunger-induzierten Apoptose	87
4.4.4	Bedeutung der PTP-SL im Adhäsionsverhalten von PC12 Zellen	87

Inhaltsverzeichnis

4.4.5	Untersuchungen zum Einfluss der PTP-SL auf die Differenzierung von PC12 Zellen	89
4.4.6	Effekt der PTP-SL bei der Bradykinin induzierten c-fos Transkription	90
4.5	Ausblick	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	95
7	ABKÜRZUNGEN	110

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Isaac Newton

1 Einleitung

Für die Entwicklung und Erhaltung eines multizellulären Organismus ist die Fähigkeit zur Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen eine essentielle Voraussetzung. Hierbei reagieren die Zellen auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen mit der Aktivierung stimuluspezifischer zellulärer Programme, wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion oder Apoptose. Den ersten Schritt bei der Signalübertragung stellt meist die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren durch extrazelluläre Liganden dar. Durch den aktivierten Rezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden stimuliert, welche letztendlich zur zellulären Antwort führen. Hierbei spielt häufig die Regulation der Genexpression mit den daraus resultierenden biochemischen und physiologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation von Proteinfunktionen und somit zur Signalübertragung ist die Phosphorylierung von Proteinen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Obwohl die Tyrosinphosphorylierung nur 0,01 bis 0,05 Prozent zur Gesamtphosphorylierung zellulärer Proteine beiträgt, stellt diese reversible Proteinmodifikation ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der Steuerung von intrazellulären Signalkaskaden und den daraus resultierenden physiologischen Vorgängen dar (Hunter, 1995; Hunter and Sefton, 1980). Hierbei ist auch die Dauer und das Ausmaß der Phosphorylierung entscheidend, da die Regulation dieser Parameter für so unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung essentiell ist. So bewirkt in PC12 Zellen die transiente Aktivierung der sogenannten MAPKinasen (Mitogen Activated Protein Kinase) die Proliferation, während eine langanhaltende Aktivierung zur Differenzierung dieser Zellen führt (Marshall, 1995). Die zelluläre Antwort auf einen bestimmten Stimulus ergibt sich somit unter anderem aus dem Zusammenspiel von Proteintyrosinkinassen (PTKn) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) (Streuli, 1996; Sun and Tonks, 1994).

1.1 Proteintyrosinphosphatasen

Die Mitglieder der Familie der Proteintyrosinphosphatasen zeichnen sich durch den Besitz der etwa 240 AS umfassenden katalytischen Phosphatasedomäne aus. Die Homologie dieser Domäne liegt zwischen den einzelnen PTPn bei 30 bis 40% (Tonks, 1996). Innerhalb dieses Motivs liegt das katalytische Zentrum mit der hochkonservierten Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G (Kurzform: CX₅R), welche die für die katalytische Reaktion essentiellen Cystein- und Argininreste enthält (Barford *et al.*, 1998). Die enzymatische Reaktion der PTPn (Abb. 1) beginnt mit einem nukleophilen Angriff auf das Phosphat eines Phosphotyrosinrestes durch den als Thiolat vorliegenden Cysteinrest. Dabei wird das Thiolat durch den positiv geladenen Argininrest stabilisiert. Der Tyrosinrest wird durch einen sogenannten „in-line“ Angriff durch das Thiolat verdrängt, wodurch es zur Bildung eines enzymgebundenen Cysteinylphosphats kommt. Durch die Abgabe eines Protons durch einen

katalytisch essentiellen Aspartatrest an das Tyrosinphenolat, wird der Abgang des Tyrosin aus dem Thyrosinphenolat erleichtert. Zur Stabilisierung des Phosphatanions im Cysteinylphosphat trägt der Argininrest sowie das positive Dipolende einer benachbarten α -Helix bei. Der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls auf das intermediär gebildete enzymgebundene Cysteinylphosphat bewirkt die Freisetzung des Phosphats (Krauss, 1997).

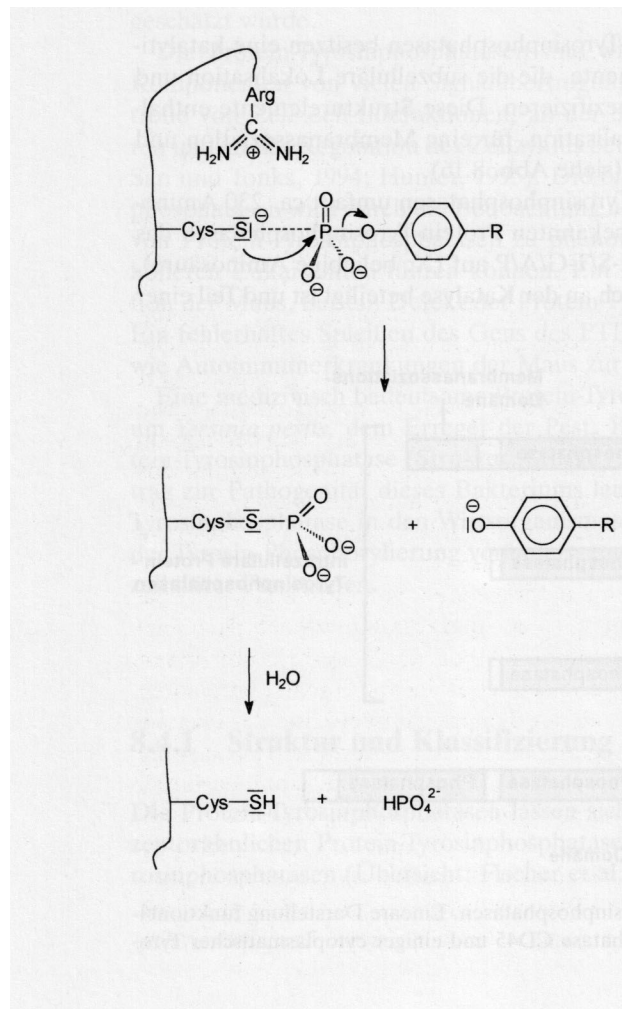


Abb. 1: Mechanismus der Hydrolyse von Phosphotyrosinresten durch Tyrosinphosphatasen. Erklärungen siehe Text. R: Substratprotein. Nach (Krauss, 1997).

Bei der Familie der Phosphotyrosinphosphatasen wird unterschieden zwischen den „klassischen“ PTPn, welche ausschließlich Tyrosinreste dephosphorylieren, und den dualspezifischen Phosphatasen (DSPn), welche sowohl Tyrosin- als auch Threonin- und Serinreste dephosphorylieren können (Hooft van Huijsduijnen, 1998). Hierbei verläuft die Hydrolyse des Tyrosinphosphats zwischen 40 und 500 mal schneller als bei Phosphothreonin oder Phosphoserin (Zhang *et al.*, 1995). Zusätzlich gibt es noch eine dritte Gruppe von PTPn, die „low-molecular-weight“ PTPn (LMW-PTP), welche jedoch keinerlei Sequenzhomologien zu den anderen beiden Gruppen aufweisen, mit Ausnahme des CX₅R-Motifs (Hooft van Huijsduijnen, 1998). Die „klassischen“ PTPn lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen, die

rezeptorähnlichen PTPn sowie die zytoplasmatischen PTPn (Barford *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1991).

1.1.1 Rezeptorähnliche Proteintyrosinphosphatasen

Die rezeptorähnlichen Proteintyrosinphosphatasen (RPTPn) enthalten eine variable extrazelluläre Domäne, ein Transmembranelement und einen intrazellulären Bereich mit zwei, in manchen Fällen jedoch nur einer Phosphatasedomäne. Katalytische Aktivität zeigt im allgemeinen nur die membrandistale PTP-Domäne (NT; D1 Domäne), während für die carboxyterminale PTP-Domäne keine bzw. bestenfalls sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden konnte (Hooft van Huijsduijnen, 1998; Streuli *et al.*, 1990; Wang and Pallen, 1991). Die exakte Funktion der carboxyterminalen PTP-Domäne (D2 Domäne) ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Für CD45 konnte gezeigt werden, dass die D2 Domäne die Aktivität der D1 Domäne beeinflussen kann (Streuli *et al.*, 1990). Ebenso besteht die Vermutung, dass die D2 Domäne wichtig ist für die Substratbindung. In diesem Zusammenhang konnte ein Protein identifiziert werden, dass nur in Abhängigkeit von der D2 Domäne an PTP-LAR bindet (Streuli *et al.*, 1990).

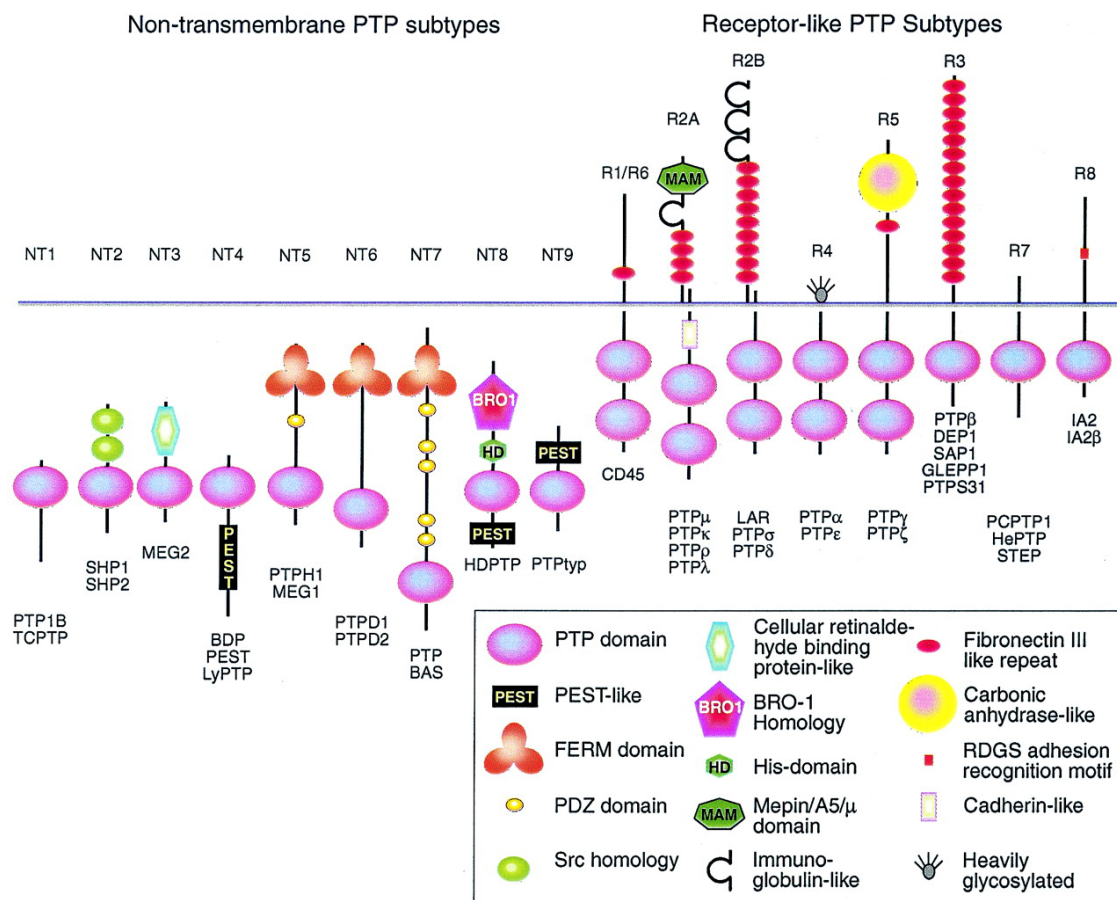


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteintyrosinphosphatasen. Die Abbildung zeigt die Einteilung der Familie der Proteintyrosinphosphatasen in neun nicht-transmembrane PTP Unterklassen (NT) und acht RPTP Unterklassen (R). Nach (Andersen *et al.*, 2001).

Derzeit werden die RPTPn in acht Unterklassen aufgeteilt (Abb. 2). Fünf dieser Unterklassen beinhalten RPTPn mit zwei PTP-Domänen (R1/R6, R2A, R2B, R4 und R5), während die restlichen drei Unterklassen RPTPn mit nur einer katalytischen Domäne enthalten (R3, R7 und R8). Die Mitglieder der Unterklasse R8 scheinen katalytisch inaktiv zu sein (Andersen *et al.*, 2001).

Ein typischer Vertreter der Unterklasse R1/R6 ist CD45. Diese RPTP wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Thomas, 1989; Thomas *et al.*, 1985). Der extrazelluläre Bereich dieser Phosphatase beinhaltet zwei spektrinähnliche Domänen, sowie eine FibronectinIII ähnliche Domäne (FNIII Domäne), welche cysteinreich und N-glykosyliert ist (Fang *et al.*, 1994).

RPTPn der Unterklasse R2A besitzen als charakteristisches Kriterium eine sogenannte MAM-Domäne (Mepin/A5/ μ -Domäne) am aminoterminalen Ende der extrazellulären Region. Zusätzlich weisen sie noch eine Immunglobulin-ähnliche (Ig) und vier FNIII-ähnliche Domänen auf. MAM-Motive finden sich auch in der extrazellulären Domäne von Zinkmetallproteasen der Meprinfamilie und dem Oberflächenantigen A5 Protein. Sie werden zu den Strukturelementen gezählt, welche die Zelladhäsion vermitteln (Beckmann and Bork, 1993). Als repräsentative Vertreter dieser Gruppe gelten PTP μ (Gebbink *et al.*, 1991) und PTP κ (Jiang *et al.*, 1993). Die homophilen Wechselwirkungen dieser beiden RPTPn können eine Rolle bei der Aggregation von Zellen spielen (Brady-Kalnay *et al.*, 1993; Sap *et al.*, 1994).

Als Vertreter der Unterklasse R2B gelten PTP-LAR, PTP σ und PTP δ (Andersen *et al.*, 2001). Diese Gruppe ist im extrazellulären Bereich gekennzeichnet durch den Besitz von FNIII-ähnlichen Domänen und bis zu drei Ig-ähnliche Strukturelemente. Diese Domänen finden sich auch bei Zelladhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule) (Ruoslahti, 1988; Williams and Barclay, 1988). Es existieren mehrere verschiedene Isoformen dieser drei RPTPn, welche durch alternatives Spleißen zustande kommen (Pulido *et al.*, 1995). Mit acht FNIII-ähnlichen und drei Ig-ähnlichen Domänen gilt PTP-LAR als Prototyp dieser Unterklasse. Diese Phosphatase wird an der Zelloberfläche als ein Protein bestehend aus zwei nicht kovalent verbundenen Untereinheiten exprimiert, die durch intrazelluläre Proteolyse eines Vorläuferproteins entstehen (Streuli *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992). Die extrazelluläre Domäne einer spezifischen LAR Isoform dient als Rezeptor für den Laminin/Nidogen Komplex. Die Bindung an LAR resultiert in zellmorphologischen Veränderungen und scheint somit Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett zu haben (O'Grady *et al.*, 1998).

Zu den Mitgliedern der Unterklasse R3 gehören unter anderem PTP β , DEP1, SAP1, GLEPP1 und PTPS31 (Andersen *et al.*, 2001). Diese Klasse zeichnet sich durch das Vorkommen einer unterschiedlichen Anzahl an FNIII-ähnlichen Domänen innerhalb des extrazellulären Bereichs aus. Zudem besitzen die Mitglieder dieser Unterklasse in der Regel nur eine Phosphatasedomäne. Eine Ausnahme ist jedoch die Phosphatase DPTP99A aus *Drosophila*,

da diese zwei PTP-Domänen in ihrem intrazellulären Teil enthält (Hariharan *et al.*, 1991). Eine weitere Besonderheit dieser Unterklasse ist das Vorkommen von transmembranen und nicht transmembranen Vertretern, wie es auch in den Unterklassen R4 und R7 der Fall ist. Durch alternatives Spleißen der GLEPP1 mRNA (mPTP Φ) werden sowohl zytoplasmatische als auch transmembrane Isoformen dieser Phosphatase produziert (Pixley *et al.*, 1995).

Die Unterklasse R4 wird durch PTP α und PTP ϵ repräsentiert (Andersen *et al.*, 2001). Ihre kurze extrazelluläre Domäne ist stark glykosyliert, weist aber ansonsten keine bisher bekannten charakteristischen Motive auf. Für PTP ϵ konnten jedoch sowohl zytoplasmatische als auch transmembrane Isoformen nachgewiesen werden (Elson and Leder, 1995).

Die RPTPn der Unterklasse R5 verfügen über eine große extrazelluläre Domäne, in der sich eine FNIII-ähnliche Domäne befindet. Zusätzlich enthält der Aminoterminus einen Sequenzbereich der homolog zum Enzym Carboanhydrase ist, jedoch bei den Mitgliedern dieser Gruppe PTP γ und PTP ζ keine katalytische Aktivität aufweist (Barnea *et al.*, 1993; Kaplan *et al.*, 1990; Krueger and Saito, 1992; Levy *et al.*, 1993). Die bisherigen Daten aus der Literatur deuten darauf hin, dass die carboanhydrase-ähnliche Domäne Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen und dem extrazellulären Matrixprotein Tenascin vermittelt (Barnea *et al.*, 1994; Maurel *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit behandelte PTP-SL (hPCPTP1) bildet zusammen mit den Phosphatasen He-PTP und STEP die Unterklasse R7 (Andersen *et al.*, 2001). Die PTP-SL wurde aus neuronalen Zellen der Maus, der Ratte und vom Menschen kloniert (Hendriks *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 1995; Sharma and Lombroso, 1995; Shiozuka *et al.*, 1995)(P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Es existieren zytoplasmatische und transmembrane Isoformen dieser Phosphatase, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Augustine *et al.*, 2000; Van Den Maagdenberg *et al.*, 1999). Für die anderen beiden Gruppenmitglieder, der He-PTP und der Phosphatase STEP, konnten bisher noch keine transmembranen Isoformen nachgewiesen werden (Andersen *et al.*, 2001). Charakteristisch für diese Gruppe ist die sogenannte KIM-Domäne (Kinase Interaktionsmotiv), welche für Protein-Protein Bindungen wichtig ist (Szedlaczek *et al.*, 2001). Zudem besitzen diese Phosphatasen nur eine PTP-Domäne.

Ein repräsentativer Vertreter der Unterklasse R8 ist die PTP-IA2. Diese Phosphatase hat extrazellulär ein RDGS Adhäsionserkennungsmotiv und intrazellulär eine Phosphatasedomäne. Die Mitglieder dieser Gruppe besitzen keine katalytische Aktivität (Andersen *et al.*, 2001).

1.1.2 Intrazelluläre Proteintyrosinphosphatasen

Im Gegensatz zur Mehrzahl der RPTPn besitzen alle bisher bekannten zytoplasmatischen PTPn nur eine katalytische Domäne. Die intrazellulären PTPn können derzeit in neun Unterklassen aufgeteilt werden (Abb. 2) (Andersen *et al.*, 2001). Die Einteilung kommt wie bei den RPTPn über die strukturelle Vielfalt der nicht katalytischen Segmente der PTPn

zustande. Diese Strukturelemente, die häufig Homologien zu anderen gut charakterisierten Proteinen und Domänen aufweisen, können die subzelluläre Lokalisation und die Assoziation mit Effektormolekülen spezifizieren (Krauss, 1997).

Zur Unterklasse NT1 (nicht transmembran) gehören PTP-1B und TC-PTP. Beide verfügen über einen vergleichbaren Aufbau aus einer aminoterminalen katalytischen Domäne und einer carboxyterminalen Sequenz, welche für die subzelluläre Lokalisation entscheidend ist (Brown-Shimer *et al.*, 1990; Chernoff *et al.*, 1990; Cool *et al.*, 1989; Guan *et al.*, 1990). Hydrophobe Sequenzelemente im C-terminalen Bereich der PTP-1B sind für die Bindung der Phosphatase an die intrazelluläre Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) essentiell (Frangioni *et al.*, 1992). Zwischen der PTP-Domäne und dem Carboxyterminus befindet sich ein Bereich von etwa 100 Aminosäuren. Dieser enthält zum einen mehrere Phosphorylierungsstellen (Flint *et al.*, 1993; Schievella *et al.*, 1993) und zum anderen eine prolinreiche Sequenz, welche die Bindung an SH3 Domänen anderer Proteine ermöglicht (Liu *et al.*, 1996). Die TC-PTP existiert in zwei Isoformen, TC48 und TC45, welche durch alternatives Spleißen produziert werden. Interessant ist hierbei, dass die Isoformen unterschiedlich lokalisiert sind und somit auch unterschiedliche lokalisationspezifische Substrate haben können (Tonks and Neel, 2001). Ähnlich wie PTP-1B besitzt die Isoform TC48 einen hydrophoben Carboxyterminus und ist wie diese an der Membran des ER lokalisiert. Bei der Isoform TC45 ist dieser hydrophobe Teil durch die Aminosäuren Pro-Arg-Leu-Thr-Asp-Thr ersetzt. Dies bewirkt, dass die zuvor maskierte carboxyterminal liegende nukleäre Lokalisationssequenz zum tragen kommt und daher befindet sich die TC45 im Kern (Tonks and Neel, 2001).

Als Mitglieder der Unterklasse NT2 gelten SHP1 und SHP2. Charakteristisch für die Vertreter dieser Gruppe sind die beiden aminoterminal gelegenen SH2 (Src Homologie 2) Domänen und zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen, welche am Carboxyterminus liegen. SH2 Domänen bestehen aus etwa 100 Aminosäuren und sind wichtig für Protein-Protein-Interaktionen, die gerade in der Signaltransduktion unerlässlich sind. SH2 Domänen binden an Phosphotyrosinreste, dadurch können zum Beispiel zytosolische Proteine an Rezeptortyrosinkinasen binden (Li and Dixon, 2000). Im Falle von SHP1 und SHP2 dienen diese Strukturelemente auch zur Regulation der katalytischen Aktivität. In Abwesenheit von geeigneten Phosphotyrosinliganden bindet die N-terminal gelegene SH2 Domäne an die PTP-Domäne und bedingt dadurch die Inhibition der katalytischen Aktivität (Barford and Neel, 1998).

Als Prototyp der Unterklasse NT3 gilt PTP-MEG2. Das besondere Merkmal von PTP-MEG2 ist die sogenannte CRALBP (Cellular Retinaldehyde Binding Protein) ähnliche Domäne. Die genaue Funktion dieses Strukturelementes ist derzeit noch nicht bekannt.

PTP-PEST, BDP und Ly-PTP zeichnen sich durch den Besitz der PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) Domäne aus und bilden somit die Unterklasse NT4. Diese PEST Motive können zum beschleunigten Abbau von Proteinen beitragen (Matthews *et al.*, 1992), andererseits ist jedoch

die Halbwertszeit von Phosphatasen mit PEST Domäne nicht auffallend gering (Charest *et al.*, 1995). Für PTP-PEST konnte gezeigt werden, dass das PEST Motiv wichtig ist für die Bindung an die LIM (Lin11, Isl1, Mec3) Domäne vom Hic5 Protein (Nishiya *et al.*, 1999). Letztendlich ist die Funktion dieses Motivs noch nicht eindeutig geklärt.

Der Besitz einer FERM (Bande 4.1-Familie, Ezrin, Radixin, Moesin) Domäne und einer PDZ (Post synaptic density Disc-large Zo-1) Domäne dient als Unterscheidungsmerkmal bei der Unterklasse NT5. Zu ihren Mitgliedern gehören PTP-H1 und PTP-MEG1. Die etwa 320 Aminosäuren umfassende FERM Domäne liegt am Aminoterminus der Phosphatasen und weist Homologien zu den zytoskelettassoziierten Proteinen der Bande 4.1-Familie auf. Mitglieder der Bande 4.1-Familie sind verantwortlich für die Assoziation von Aktinfilamenten mit Proteinkomplexen an der Zellmembran (Luna and Hitt, 1992). Zu ihnen zählen unter anderem Ezrin (Gould *et al.*, 1989), Talin (Rees *et al.*, 1990) und Radixin (Wilgenbus *et al.*, 1993). Die PDZ Domäne liegt zwischen der FERM und der katalytischen Domäne und spielt bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle (Ranganathan and Ross, 1997).

Die Repräsentanten der Unterklasse NT6 sind PTP-D1 und PTP-D2. Sie haben aminoterminal eine FERM Domäne und carboxyterminal die PTP-Domäne. Dazwischen liegt ein großer Bereich von bis zu 580 Aminosäuren (PTP-D1), welcher keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzmotiven aufweist (Moller *et al.*, 1994).

PTP-BAS ist der Prototyp der Unterklasse NT7. Zwischen der aminoterminalen FERM Domäne und der carboxyterminalen katalytischen Domäne finden sich fünf PDZ Domänen, deren Funktion oben schon erwähnt worden ist.

Ein vielseitiger struktureller Aufbau findet sich bei HD-PTP als Vertreter für die Unterklasse NT8. Am Aminoterminus befindet sich eine BRO1 ähnliche Domäne, es folgt eine His Domäne (HD), die PTP-Domäne und am Carboxyterminus eine PEST Domäne. Die BRO1 Domäne ist benannt aufgrund der Homologie zu dem Hefeprotein BRO1, welches eine Rolle im MAPKinase Signalweg spielt (Cao *et al.*, 1998).

Den Abschluss der Klassifizierung der intrazellulären Phosphatasen bildet die Unterklasse NT9. PTPtyp steht stellvertretend für diese Gruppe. Im Gegensatz zu den bisherigen PTPn mit PEST Domäne liegt hier dieses Motiv nicht am Carboxyterminus sondern am Aminoterminus. Derzeit ist noch nicht viel über diese Phosphatase bekannt, außer dass ihre Expression auf den Testis beschränkt ist (Ohsugi *et al.*, 1997).

1.1.3 Regulation der Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen

Es existieren verschiedene Mechanismen um die katalytische Aktivität von PTPn zu regulieren. Ein wichtiger Aspekt der Funktion von PTPn ist deren subzelluläre Lokalisation. Wie im vorherigen Abschnitt schon dargestellt, weisen zytoplasmatische PTPn häufig Sequenzen auf, die ihre subzelluläre Lokalisation spezifizieren. Das beste Beispiel für einen

solchen Fall ist die TC-PTP. Wie oben bereits erwähnt, entstehen durch alternatives Spleißen zwei Isoformen, wobei die Isoform TC48 an der Membran des ER lokalisiert ist, während die Isoform TC45 im Kern zu finden ist (Tonks and Neel, 2001). Auch durch proteolytische Spaltung kann die Lokalisation und letztendlich die Aktivität von Phosphatasen beeinflusst werden. So führt die proteolytische Spaltung von PTP-1B zur Loslösung der Phosphatase von der Membran des ER und zum Übergang ins Zytoplasma. Neben einer Erhöhung der *in-vitro* Aktivität korreliert die Prozessierung mit einer Veränderung des Phosphotyrosingehaltes zellulärer Proteine (Shattil and Brugge, 1991).

Ein anderer Weg zur Regulation der PTPn ist die Ser/Thr-Phosphorylierung. Die zytoplasmatische PTP-PEST ist diesbezüglich ein gutes Beispiel. Sie kann *in-vitro* an zwei Serinresten, Ser39 und Ser435, sowohl von PKA als auch von PKC phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung kann *in-vivo* in HeLa Zellen durch Stimulation mit TPA oder Forskolin, welche PKC bzw. PKA Aktivatoren sind, erzeugt werden. Die Phosphorylierung am Ser39 bewirkt hierbei eine Reduktion der Phosphataseaktivität. Dieser Effekt kommt durch eine Reduktion der Substrataffinität zustande (Garton and Tonks, 1994).

PTPn können auch selbst das Substrat von PTKn sein und durch diese an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Die Phosphatase SHP2 kann mit einer ihrer beiden SH2 Domänen an das autophosphorylierte Tyrosin 1009 des aktivierten PDGF-Rezeptors binden. Die Assoziation von SHP2 mit dem aktivierten Rezeptor hat einen zweifachen Effekt. Zum einen phosphoryliert der Rezeptor durch seine Tyrosinkinaseaktivität die Phosphatase am Tyrosin 542. An das Phosphotyrosin 542 bindet wiederum die SH2 Domäne des Adapterproteins Grb2, das nun weitere Signalproteine in die Signalübertragung mit einbeziehen kann (Bennett *et al.*, 1994). Zum anderen wird durch die Bindung von SHP2 an den Rezeptor deren Autoinhibition (siehe 1.1.2) aufgehoben und die Phosphatase somit aktiviert. Sie ist nun in der Lage phosphorylierte Signalproteine zu dephosphorylieren und kann auf diesem Weg ein Signal weitergeben (Krauss, 1997). Dies zeigt, dass PTPn nicht nur durch ihre katalytische Aktivität ein Signal modulieren können, sondern bestimmte Motive der Phosphatase zur Ausbildung von Proteinkomplexen beitragen, deren Bildung für die Weitergabe eines Signals notwendig sind.

Die Regulation von PTPn kann auch auf Transkriptionsebene erfolgen. So zeigen die PTPn DEP1 (Ostman *et al.*, 1994), LAR (Longo *et al.*, 1993) und PTP σ (Celler *et al.*, 1995) einen von der Zelldichte abhängigen Anstieg der Expression, der möglicherweise die Kontaktinhibition des weiteren Zellwachstums vermittelt. Bei der Aktivierung von Lymphozyten durch verschiedene Faktoren steigt die Expression der ausschließlich in hematopoetischen Zellen exprimierten He-PTP signifikant an (Zanke *et al.*, 1992). Auch die Expression des Rattenhomologs der PTP-SL (PC12-PTP1/PCPTP1) kann durch Stimulation mit NGF verändert werden. Eine maximale Induktion der Phosphataseexpression wird hierbei nach acht stündiger Stimulation erreicht, während anschließend die Expression unter den Ausgangswert abfällt (Sharma and Lombroso, 1995; Shiozuka *et al.*, 1995).

1.2 Proteintyrosinkinasen

Proteintyrosinkinasen (PTKn) sind wie die Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen ein entscheidendes Element der intrazellulären Signalweiterleitung. Die Aktivierung von PTKn wird vor allem durch Signale ausgelöst, die das Wachstum und die Differenzierung einer Zelle steuern (Krauss, 1997). Die Familie der PTKn lässt sich ebenso wie die PTPn in Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) und intrazelluläre PTKn aufteilen.

Der Aufbau der RTKn umfasst eine glykosylierte, extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielfalt von unterschiedlichen Sequenzmotiven aus. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede lassen sich die über 50 bisher bekannten RTKn in 19 verschiedene Unterfamilien einteilen (van der Geer *et al.*, 1994). Der zytoplasmatische Bereich der RTKn setzt sich aus der Juxtamembranregion, der Kinasedomäne und dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Ullrich and Schlessinger, 1990). Die Kinasedomäne umfasst etwa 250-300 Aminosäuren und gilt als hoch konserviert. Sie beinhaltet die ATP-Bindungsstelle und katalysiert die intermolekulare Transphosphorylierung des Rezeptors sowie die Tyrosinphosphorylierung von RTK Substraten (Yarden and Ullrich, 1988). Im wenig konservierten carboxyterminalen Bereich der RTKn befinden sich häufig Autophosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung dieser Tyrosinreste kann zum einen zur Bildung von Proteinbindestellen führen oder zur Modulation der katalytischen Aktivität der RTKn beitragen (Margolis *et al.*, 1990; Margolis *et al.*, 1989). RTKn liegen im nicht aktivierten Zustand in der Regel als Monomer vor. Zur Aktivierung von RTKn ist die Bildung von Rezeptordimeren erforderlich, die durch die Bindung des Liganden begünstigt wird. Für den EGFR (Epidermal Growth Faktor Rezeptor) konnte die Dimerisierung nach Stimulation mit dem monomeren EGF Liganden schon Ende der achtziger Jahre beschrieben werden (Yarden and Schlessinger, 1987), trotzdem ist der exakte Mechanismus dieses entscheidenden Schrittes derzeit noch nicht vollständig geklärt. Die liganden-induzierte Dimerisierung bewirkt Konformationsänderungen, so daß es aufgrund der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptormoleküle zu einer gegenseitigen intermolekularen Transphosphorylierung an zytoplasmatischen Tyrosinresten kommt (Lemmon and Schlessinger, 1994; Ullrich and Schlessinger, 1990). Hierbei kommt es nicht nur zur Bildung von Homodimeren, sondern innerhalb einer Unterfamilie auch zur Ausbildung von Heterodimeren (Lemmon and Schlessinger, 1994), wie es zum Beispiel innerhalb der EGFR-Familie der Fall ist (Wallasch *et al.*, 1995). Zur EGFR-Familie zählen der EGFR (HER1/ErbB1) (Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu) (Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3; katalytisch inaktiv) (Guy *et al.*, 1994; Kraus *et al.*, 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman *et al.*, 1993). In dieser Familie nimmt HER2, für den bisher noch kein eigener Ligand bekannt ist, eine zentrale Rolle ein, da diese RTK den bevorzugten Partner zur Bildung von Heterodimeren mit anderen EGFR Familienmitgliedern darstellt (Graus-Porta *et*

al., 1997; Tzahar *et al.*, 1996). Die Mitglieder dieser Familie sind häufig mit der Entstehung von Krebs beim Menschen in Zusammenhang gebracht worden (Di Marco *et al.*, 1989; Lemoine *et al.*, 1992; Ullrich *et al.*, 1984).

Neben den RTKn enthält die Zelle eine Reihe von intrazellulären Proteintyrosinkinasen (PTKn), die nicht integraler Bestandteil von Transmembranrezeptoren sind. Sie haben eine essentielle Funktion bei der Signalübertragung durch Transmembranrezeptoren ohne eigene Tyrosinkinaseaktivität, wie zum Beispiel die Zytokinrezeptoren. Sie sind jedoch auch an den Signalwegen von RTKn und G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) beteiligt (Porter and Vaillancourt, 1998). Die Aktivierung intrazellulärer PTKn durch extrazelluläre Signale ist jedoch nicht auf die Bindung von Wachstumsfaktoren und Hormonen an entsprechende Rezeptoren beschränkt, sondern beinhaltet auch Effekte der Zelladhäsion und der Interaktion mit der extrazellulären Matrix. So spielt die an fokalen Adhäsionspunkten lokalisierte Kinase FAK (Focal Adhäsion Kinase) eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Zelladhäsionsmolekülen der Integrin-Familie (Clark and Brugge, 1995; Juliano and Haskill, 1993; Schaller and Parsons, 1994). Die zytoplasmatischen PTKn lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in verschiedene Familien einteilen. So finden sich neben der katalytischen Domäne häufig noch funktionelle Sequenzabschnitte wie SH2 und SH3 Domänen (Src-Homologie 2 und 3), welche für Protein-Protein-Interaktionen oder die subzelluläre Lokalisation wichtig sind. Zu den am besten charakterisierten PTKn gehört die Familie der Src-Kinasen. Diese Familie umfasst derzeit neun Mitglieder, wobei die PTKn Src, Fyn und Yes in fast allen Geweben exprimiert werden. Src-Kinasen sind prototypisch für die nach ihnen benannten SH2 und SH3 Domänen und setzen sich zusätzlich aus einer Tyrosinkinasedomäne, eine aminoterminal vorliegende für die Membranlokalisation essentielle Myristylierungsstelle, sowie einem regulatorisch wichtigen Carboxyterminus zusammen (Erpel and Courtneidge, 1995). Die Tyrosinphosphorylierung spielt bei der Regulation der Src-Kinase Aktivität eine wichtige Rolle. Die inhibitorisch wirkende PTK Csk phosphoryliert Src an einem bestimmten carboxyterminalen Tyrosinrest, worauf dieser mit der SH2-Domäne intermolekular interagiert. Diese Konformationsänderung blockiert die Bindung von Src an zelluläre Substratproteine (Superti-Furga *et al.*, 1993). Aufgehoben wird diese Inhibition unter anderem durch PTP α , indem diese Phosphatase spezifisch den Phosphotyrosinrest am Carboxyterminus von Src dephosphoryliert (Ponniah *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000). Hiermit zeigt sich, dass PTPn auch stimulierend auf Signaltransduktionvorgänge wirken können.

1.3 MAPKinasekaskaden

Bei den MAPKinase Signalwegen (Mitogen Activated Protein Kinase) handelt es sich um Proteinkaskaden, welche durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden. Sie sind involviert in solch essentiellen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und

(Anti-)Apoptose (Kolch, 2000). Das Kernmodul eines MAPKinase Signalweges besteht aus drei hintereinander geschalteten Kinasen. Hierbei phosphoryliert und aktiviert eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) eine MAPK Kinase (MAPKK), welche nun ihrerseits eine MAPK phosphoryliert und somit aktiviert (Abb. 3). Derzeit sind sechs verschiedene MAPKinase Module bekannt (Saxena and Mustelin, 2000). Zu den am besten charakterisierten MAPKinasen gehören ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase), p38 und JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase).

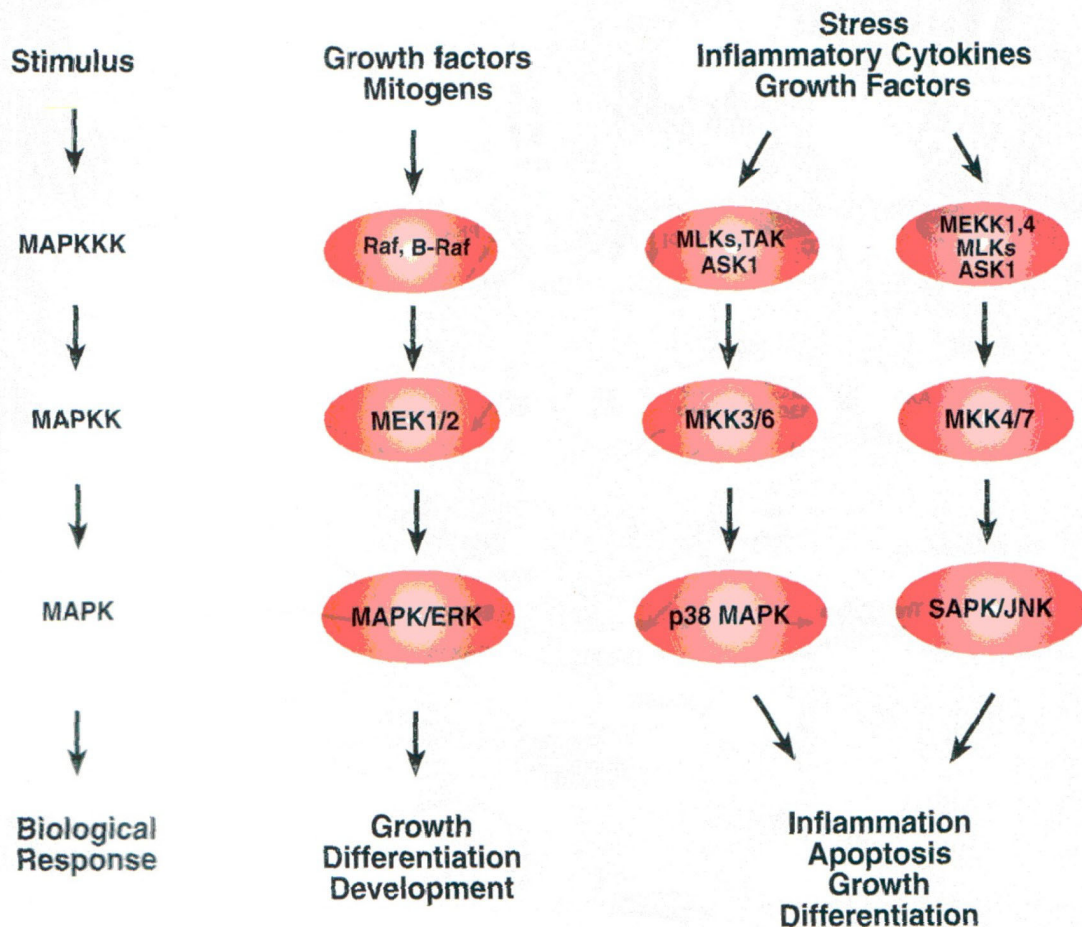


Abb. 3: Kernmodule von MAPKinase Signalwegen. Ganz links ist das allgemeine Schema eines MAPKinase Signalweges dargestellt. Von links nach rechts folgen der ERK Signalweg, der p38 Signalweg und der JNK Signalweg. Aus dem Katalog von Cell Signaling Technology 2000-2001.

Der Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 geht häufig die Stimulation einer RTK voraus. So führt zum Beispiel die Stimulation von RTKn mittels Wachstumsfaktoren zur Ausbildung des Grb2/Sos-Komplexes, welcher durch Stimulation des GDP/GTP Austausches zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras führt (Downward, 1997). Die GTP-gebundene Form von Ras bindet die MAPKKK Raf, welche dadurch an die Membran rekrutiert und dadurch aktiviert wird (Moodie *et al.*, 1993; Morrison and Cutler, 1997; Vojtek *et al.*, 1993; Warne *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993). Raf aktiviert daraufhin die dualspezifischen MAPKK MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK-Kinase 1 und 2) durch Phosphorylierung zweier Serinreste (Derijard *et al.*,

1995; Zheng and Guan, 1994). Diese Kinasen aktivieren nun hochspezifisch die MAPKinasen ERK1 und ERK2 durch Threonin- und Tyrosinphosphorylierung des regulatorisch wichtigen Thr-Glu-Tyr-Motivs (Robinson and Cobb, 1997). Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt zur Bildung von Homodimeren und auch zur Translokation in den Zellkern, wo diese Kinasen durch Serin-/Threoninphosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Elk1, die Transkription regulieren können (Cobb *et al.*, 1994; Khokhlatchev *et al.*, 1998; Treisman, 1996). Außerhalb des Zellkerns sind diese Kinasen in der Lage eine Vielzahl von zytosolischen und membrangebundenen Proteinen zu phosphorylieren (Cobb *et al.*, 1991).

Ein derzeit noch nicht ganz verstandenes Phänomen ist die Sicherstellung der Spezifität innerhalb des MAPKinase Signalweges. Wie kann die Zelle zwischen zwei unterschiedlichen Stimuli, welche verschiedene zelluläre Antworten hervorrufen, unterscheiden, wenn beide Stimuli zur Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 führen? Zum einen kann dies scheinbar über die Dauer der ERK Aktivierung geregelt werden, wie es in PC12 Zellen bei EGF und NGF Stimulation der Fall ist (Marshall, 1995), zum anderen scheinen hierbei sogenannte Gerüstproteine eine Rolle zu spielen. So interagiert das Gerüstprotein MP1 (MEK Partner 1) bevorzugt mit MEK1 und ERK1, während KSR (Kinase Suppressor of Ras) mit Raf, MEK, und ERK1 oder ERK2 assoziiert (Kolch, 2000).

Wie zuvor schon erwähnt, ist eine duale Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten notwendig, um ERK zu aktivieren (Canagarajah *et al.*, 1997). Hingegen reicht die Dephosphorylierung eines dieser beiden Reste zur Inaktivierung dieser Kinasen aus (Keyse, 1998). Für die Dephosphorylierung von ERK stehen drei unterschiedliche Klassen von Phosphatasen zur Verfügung. Die dualspezifischen Phosphatasen wie MKP1, welche sowohl den Threonin- als auch den Tyrosinrest dephosphorylieren können, die Serin-/Threoninphosphatasen wie PP2A und die Proteintyrosinphosphatasen (Keyse, 1998). Die Dephosphorylierung von MAPKinasen durch PTPn war zu Beginn dieser Arbeit nur in Hefen genauer untersucht worden (Millar *et al.*, 1995; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997; Zhan *et al.*, 1997). Es gab jedoch schon erste Hinweise darauf, dass auch in Vertebraten die PTPn zur Regulation der MAPKinasen beitragen können, wobei jedoch diesbezüglich noch keine PTP identifiziert werden konnte (Alessi *et al.*, 1995). Die Regulation durch Phosphatasen erfolgt sowohl im Zytosol als auch im Zellkern (Saxena and Mustelin, 2000). Der ERK/MAPKinase Signalweg kann auch durch andere Signalwege zelltypspezifisch beeinflusst werden. In vielen Fibroblasten und in Zellen der glatten Muskulatur bewirkt die Anhebung des cAMP-Spiegels eine Verringerung der durch Wachstumsfaktoren induzierten ERK Aktivierung (Burgering *et al.*, 1993; Cook and McCormick, 1993; Graves *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). In neuronalen Zellen hingegen bewirkt cAMP eine Verstärkung der ERK Aktivierung (Frodin *et al.*, 1994; Frodin *et al.*, 1995; Khoo and Cobb, 1997). Die Expression von B-Raf und die dadurch mögliche Aktivierung des Rap1/B-Raf Signalweges scheinen den Ausschlag für einen positiven Effekt von cAMP auf den ERK Signalweg zu geben (Vossler *et al.*, 1997).

1.4 Zielsetzung

Die Bedeutung des MAPKinase Signalweges für verschiedene, essentielle zelluläre Prozesse ist im vorherigen Kapitel eingehend dargelegt worden. Dies bedingt die Notwendigkeit einer genauen Regulation dieser Kinasen, um den Ablauf der normalen zellulären Vorgänge zu gewährleisten und pathologische Zustände zu vermeiden. So konnten bei den Untersuchungen verschiedener Krankheitsbilder, wie akute Leukämie und Brustkrebs, eine erhöhte MAPKinase Aktivierung nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 1999; Sivaraman *et al.*, 1997). Im Falle der akuten Leukämie spielt diesbezüglich die verringerte Expression von PAC1 (Phosphatase of Activated Cells) eine Rolle. PAC1 ist eine in hematopoetischen Zellen vorkommende, ERK spezifische Phosphatase (Kim *et al.*, 1999). Die Aufklärung der regulatorischen Komponenten des MAPK Signalweges trägt somit auch zum besseren Verständnis bestimmter Krankheiten bei.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste noch unveröffentlichte Hinweise über eine Assoziation der Proteintyrosinphosphatase PTP-SL mit den MAPKinasen ERK1/2 vor. Dabei wurde spekuliert, ob die MAPKinasen ERK1/2 Substrate für die PTP-SL sein könnten (R. Pulido und A. Ullrich, persönliche Mitteilung). Um die Bedeutung der PTP-SL näher zu charakterisieren, sollte der Effekt dieser Phosphatase auf den ERK/MAPKinase Signalweg analysiert werden. Anhand dieses potentiellen Enzym-Substrat Verhältnisses sollte versucht werden, die PTP-SL einem zellulären Prozess, wie z.B. Proliferation und Differenzierung, zuzuordnen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Calyculin A	Alexis, Grünberg
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Enzyme Dilution Buffer	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Forskolin	Alexis, Grünberg
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
MBP (myelin basic protein)	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-	Sigma, Taufkirchen

2,5vDiphenyltetrazoliumbromid)	
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Poly-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Szintillationscocktails (Rotiszint®ecoplus)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N'N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
TPA (tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
W-7	Calbiochem, Bad Soden
Xylol	Merck, Darmstadt

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

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, England
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
Reverse Transkriptase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	>5000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$	>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
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Poly Prep [®] Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Dowex AG1-X8	Bio-Rad, München
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Pharmacia, Freiburg
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
T7 Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

Bradykinin	Sigma, Taufkirchen
EGF (Maus)	Toyoba, Japan
aFGF	Pepto Tech, USA
Heparin	Sigma, Taufkirchen
NGF	Becton Dickenson, Heidelberg

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
2xYT-Medium	1,6	%	Trypton
	1,0	%	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 wurde dem LB-Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2.1.7 Zellkulturmedien

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

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

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

Nutrient Mixture F12 (HAM) mit L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin

Einfriermedium: 90% hitzeinaktiviertes 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 ₂ HPO ₄
			pH 6,96 (NaOH)
HBS (2x)	46	mM	HEPES pH 7,5
	274	mM	NaCl
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄
			pH 7,0
Denhardt (100x)	2,0	%	Polyvinylpyrrolidon
	2,0	%	Ficoll
	2,0	%	BSA
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glyzerin
	100,0	mM	EDTA pH 8,0
Laemmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β-Mercaptoethanol

NET (10x)	150,0	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	50	mM	Tris
	0,05	%	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
"Strip"-Puffer	62,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	2,0	%	SDS
	100	mM	β-Mercaptoethanol
SSC (20x)	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
TAE (10x)	400	mM	Tris/Acetat
	10	mM	EDTA
			pH 8,0 (Eisessig)
TE10/1	10,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	1,0	mM	EDTA pH 8,0
TE10/0,1	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
	1918,0 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 von Referenzen tabellarisch aufgeführt.

2.1.9.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> DH5 α F'	F'/endA1 hsd17 (rk-mk-),supE44,recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Genentech, San Francisco
<i>E.coli</i> CJ236	dut-, ung-, thi-, relA-	Kunkel, 1985

2.1.9.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
CHO-K1	ovary cells vom Hamster	Sugen
COS-7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
HEK-293	humane embryonale Nierenfibroblasten Transformiert mit Adenovirus Typ V DNA	ATCC CRL-1573
NIH3T3 cl7	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
PC12	Ratten-Phäochromozytomazellen	P. Cohen, Dundee
Phoenix E	modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, trophen Retroviren	Nolan Lab, Stanford

2.1.9.3 Antikörper

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

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz, California
ERK2 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Unterdomäne XI der Ratten-ERK2	Santa Cruz, California
Phospho-ERK	Kaninchen, polyklonal, gegen Phosphoryliertes Threonin 202 und Thyrosin 204 des humanen ERK2	NEB, Schwalbach
Pan-ERK	Maus, monoklonal, gegen die c-terminalen AS 219-358 des humanen ERK2	Transduction Lab., Lexington
GFP	Kaninchen, polyklonal gegen GFP	diese Arbeitsgruppe
GST	Kaninchen, polyklonal gegen die Glutathion-S-Transferase	diese Arbeitsgruppe
HA	Maus, monoklonal, gegen die 12 AS des influenza hemagglutinin Epitops	Babco, California
p38 (C-20)	Kaninchen polyklonal gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Maus-p38	Santa Cruz, California

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

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1 : 20.000	BioRad (München)
Ziege gegen Maus	1 : 10.000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 20.000	BioRad (München)

2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.10.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (+) IG, SK (MCS)	Stratagene, Kalifornien
pcDNA3	Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Ampr, Neor, ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman, 1989
pRK5	Expressionsvektor, Ampr, CMV Promoter, SV 40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, San Francisco
pGEX	Prokaryotischer Expressionsvektor zur Produktion von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> , pBR322 ori	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pGEX-PTP-SL (AS 147-549)	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der PTP-SL	R. Pulido, d AG
pGEX-PTP-SL (AS 147-288)	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der PTP-SL ohne die Phosphatase Domäne	R. Pulido, d AG
pGEX-PTP-SL (AS 147-288; Δ 224-239)	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der PTP-SL ohne die Phosphatase Domäne und ohne die KIM-Domäne	R. Pulido, d AG
pGEX-PTP-STEP	GST-Fusionsprotein der PTP-STEP	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTP-SL WT	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, HA markiert	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTP-SL CS	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Cys480 zu Ser, HA markiert	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTP-SL SE	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Glu, HA markiert	diese Arbeit
pRK5-HA-PTP-SL SE/SE	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Glu und Ser234 zu Glu, HA markiert	diese Arbeit
pRK5-HA-PTP-SL SE	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser234 zu Glu, HA markiert	diese Arbeit
pRK5-HA-PTP-SL SA	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Ala, HA markiert	diese Arbeit

pcDNA3-HA-PTP-SL WT	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, HA markiert	diese Arbeit
pcDNA3-HA-PTP-SL CS	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Cys480 zu Ser, HA markiert	diese Arbeit
pcDNA3-HA-PTP-SL SE	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Glu, HA markiert	diese Arbeit
pcDNA3-HA-PTP-SL SA	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Ala, HA markiert	diese Arbeit
pLXSN-HA-PTP-SL WT	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, HA markiert	diese Arbeit
pLXSN-HA-PTP-SL CS	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Cys480 zu Ser, HA markiert	diese Arbeit
pLXSN-HA-PTP-SL SE	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Glu, HA markiert	diese Arbeit
pLXSN-HA-PTP-SL SA	zytoplasmatische Isoform der PTP-SL, mit dem AS-Austausch Ser231 zu Ala, HA markiert	diese Arbeit

2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide

Sequenz	Name
ACTCATGTCCAGCGTAAGAGATACATTCTCACC TCGTCGCTCCTG	Ser231 zu Glu
Primer zur Mutagenese des Ser231 der PTP-SL zu Glu	
GCTACTCATGTCCAGCGTAAGCTCTACATTGGA ACCTCGTCGCTC	Ser234 zu Glu
Primer zur Mutagenese des Ser234 der PTP-SL zu Glu	

GCTACTCATGTCCAGCGTAAGCTCTACATTCTC ACCTCGTCGCTCCTG	Ser231/Ser234 zu Glu
Primer zur Mutagenese des Ser231 und des Ser234 der PTP-SL zu Glu	
ACTCATGTCCAGCGTAAGAGATACATTTCGCACC TCGTCGCTCCTG	Ser231 zu Ala
Primer zur Mutagenese des Ser231 der PTP-SL zu Ala	
CGTCTTCCTTTGTCTTCACCT	fos1
c-fos Primer für die „real-time“ PCR	
CCTGCCTTCTCTGACTGCTC	fos2
c-fos Primer für die „real-time“ PCR	
CCGCGTTCTCCTTTGAGCT	cycloF
Cyclophylin A Primer für die „real-time“ PCR	
CACCACATGCTTGCCATCC	cyclob
Cyclophylin A Primer für die „real-time“ PCR	

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

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

2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion der verschiedenen Zelllinien wurden größere und reinere DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

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. 1-4µg gespaltene Vektor DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20µl in 1x Phosphatasepuffer (50mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

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 100ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments, 1µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66M Tris/HCl pH 7,5, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM ATP) und 1µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10µl) 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 kBp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2h. Danach wurde das Gel für 10min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2µg/ml) gefärbt und 10min in 1x TAE entfärbt.

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (50) 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 (Chung and Miller, 1988). Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20µl 5x KCM (500mM KCl, 150mM CaCl₂, 250mM MgCl₂), 70µl H₂O und 100µl kompetente, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert und 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10min bei RT inkubiert, dann mit 1.000µl LB-Medium versetzt und 1h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/ Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.2.6.3 Dauerkulturen von *E.coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

Mit Hilfe dieser Methode (Kunkel, 1985; Messing, 1983) ist es möglich, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in eine bekannte DNA-Sequenz einzuführen.

2.2.7.1 Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger *pcDNA3 DNA*

CJ236 Bakterien wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben mit der gewünschten DNA transfiziert. Mit den so erhaltenen Kolonien wurden 2ml 2xYT-Medium mit angeimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde mit 2×10^7 Phagen/ml infiziert und weitere 1,5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde Kanamycin (Endkonzentration 70µg/ml) zur Kultur gegeben und diese dann über Nacht bei 37°C weiter inkubiert. Danach enthielten die zur Infektion verwendeten M13 Phagen die einzelsträngige DNA, an der die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren (13.000 rpm, 5min) von 1,5ml Kulturmedium gründlich aus dem Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 200µl 2,5M NaCl/20% PEG6000 bei RT für 15min präzipitiert. Der Ansatz wurde zweimal abzentrifugiert um den Überstand vollständig zu entfernen. Das Phagensediment wurde in 100µl TE10/0,1-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 50µl puffergesättigtem Phenol (TE gesättigt) mehrfach extrahiert. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase wurde die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 10µl 8M LiCl und 250µl absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde

10min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und anschließend mit 1ml 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 15µl TE10/0,1 aufgenommen. Die Qualität der einzelsträngigen DNA wurde auf einem 1,5%igem Agarosegel ermittelt. Als Kontrolle auf Kontamination mit doppelsträngiger DNA wurde 100ng unverdautes Plasmid mit auf das Agarosegel aufgetragen.

2.2.7.2 *Synthese des mutierten Stranges*

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids zum uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen: 200ng einzelsträngige DNA, 2-3pmol phosphoryliertes Oligomer, 1µl 10x Hybridisierungspuffer (20mM Tris/HCl pH 7,4, 2mM MgCl₂, 50mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10µl wurden mit 50µl Mineralöl überschichtet und in einem 90°C warmen Heizblock 2min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von 30°C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1µl 10x Synthesepuffer (5mM dNTP-Mix, 100mM Tris/HCl pH 7,5, 50mM MgCl₂, 20mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1µl), 1µg T4-Gen 32 Protein (0,5µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5min auf Eis, 5min bei 25°C und anschließend 90min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 66µl TE gestoppt. 10µl Aliquots wurden zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien genutzt.

2.2.8 Sequenzierung

2.2.8.1 *Sequenzreaktion*

Zur Denaturierung wurden 5µg Plasmid-DNA mit 2,5µl 10xDenaturierungspuffer (2M NaOH, 2mM EDTA versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 25µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert, anschließend die denaturierte DNA durch Zusatz von 2,5µl 4M Ammoniumacetat und 75µl absolutem Ethanol für 20min bei -80°C gefällt. Nach der Zentrifugation (10min, 13000 rpm) wurde das Pellet getrocknet und in einem Mix aus 11µl TE10/0,1-Puffer, 2µl Annealingpuffer (280mM Tris/HCl pH 7,5; 100mM MgCl₂; 350mM NaCl) und 1µl Primer (Konzentration 1pmol/µl) aufgenommen. Zur Anlagerung der Primer an die denaturierte DNA wurde der Ansatz 5min bei 69°C inkubiert und dann langsam auf RT abgekühlt.

Zusammensetzung des Enzym-Premix (für zwei Sequenzieransätze):

5 min Reaktionszeit: 3,0 µl Enzyme Dilution Buffer
 2,0 µl Labeling Mix (7,5µM dGTP, dCTP, dTTP)
 1,0 µl [³⁵S]-α-ATP (10µCi/µl)
 0,5 µl 1 M DTT
 4,0 µl H₂O
 1,0 µl T7 DNA Polymerase

10 min Reaktionszeit: 1,5 µl Enzyme Dilution Buffer
 5,0 µl Labeling Mix (7,5µM dGTP, dCTP, dTTP)
 1,5 µl [³⁵S]-α-ATP (10µCi/µl)
 0,5 µl 1 M DTT
 2,0 µl H₂O
 1,5 µl T7 DNA Polymerase

Je 6µl des entsprechenden Enzym-Premix wurden zu den kurz abzentrifugierten Ansätzen gegeben und 5min (10min) bei RT inkubiert. Währenddessen wurden jeweils 2,5µl der vier Didesoxynukleotidlösungen (5mM NaCl, je 80µM dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 8µM ddNTP –G,-A,-T,-C) auf eine Mikrotiterplatte (Nunc) pipettiert und auf 50°C erwärmt. Nach der Inkubation der Synthese-Reaktion (Labeling) wurden jeweils 4,5µl des Ansatzes in die vorgewärmten Terminationslösungen pipettiert und für weitere 5min bei 50°C gehalten. Anschließend wurden die Ansätze mit 5µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20mM EDTA, je 0,05% Bromphenolblau und Xylencyanolblau) versetzt, 5min bei 95°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt.

2.2.8.2 Sequenzgele

Die Glasplatten (50 x 20cm) wurden gereinigt und mit Ethanol entfettet. Die Ohrenplatte wurde mit einer Dichlordimethylsilan abgerieben und mit Ethanol nachpoliert. Durch dieses „Silanisieren“ ist es leicht möglich, das Sequenzgel nach der Elektrophorese von der silanisierten Platte abzulösen. Seitliche Abstandshalter (Dicke 0,35mm) wurden mit jeweils 3 Klammern fixiert und die Gellösung (siehe unten) langsam zwischen die leicht schräg gestellten Glasplatten unter Vermeidung von Luftblasen gegossen. Danach wurden die Platten horizontal gelegt, und ein Probenkamm („Haiﬂischzahnkamm“) mit seiner Rückseite 5mm tief in die Gellösung eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikalkammer eingespannt. Zur gleichmäßigen Wärmeverteilung während der Elektrophorese wurde auf der vorderen Glasplatte eine Metallplatte befestigt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwandt. Nachdem der Kamm mit den Spitzen nach unten etwa 1mm tief in das Gel eingesetzt wurde, folgte zum Vorwärmen des Gels ein Vorlauf von 20-30min bei 55

Watt. Nach Säuberung der Taschen mit einer Spritze wurden je 1,7µl der denaturierten Sequenzreaktionen (5min, 95°C) pro Spur in der Reihenfolge G-A-T-C aufgetragen und bei 55 Watt aufgetrennt.

Für ein 5%iges Sequenzgel wurde folgende Lösung verwendet:

40% (w/v)Acrylamid/ Bisacrylamid (20:1)	6,25 ml
10 x TBE	5 ml
Harnstoff	2.0 g
H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml

Das Gel wurde mit einem 3MM-Whatman Papier von der nicht silanisierten Glasplatte abgezogen, mit einer Haushaltsfolie blasenfrei abgedeckt und 2-3h bei 80°C an einer Vakuumpumpe getrocknet. Je nach Signalstärke wurde das Gel für 12-48h bei RT auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™, Amersham) exponiert.

2.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

2.2.9.1 PCR-Amplifikationen von DNA und cDNA Fragmenten

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in-vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis and Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50µl angesetzt:

- 1 µl Matrizen-DNA
- 1 µl "sense" Oligomer, 10pmol
- 1 µl "antisense" Oligomer, 10pmol
- 5 µl 10x Taq Polymerase Puffer
(20mM Tris/Cl, pH 8,0, 0.1mM KCl, 20mM DTT, 0,1mM
EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))
- 1 µl dNTP-Mix, 10mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
- 1 µl Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)
- ad 50 µl H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt. Die Synthesereaktion in dem

Thermocycler „Progene“ der Fa. Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min 94°C
Amplifikation 25-30 Zyklen:	1 min 94°C (Denaturierung)
	1 min 52°C (Hybridisierung)
	1 min 72°C (Synthese)
letzte Synthese:	3 min 72°C

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.2.9.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.2.9.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.2.10 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore™-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 Stunden bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

2.2.10.1 Präparation von RNA

Die Präparation von zytoplasmatischer RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits nach Herstellerprotokoll. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sogenannten Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics).

PC12 Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Platten kultiviert. Hierzu wurden die Platten mit Kollagen (in Ethanol gelöst, isoliert aus Ratten-Schwänzen, Sigma) beschichtet und für 2h im Brutschrank inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Platten 3x mit sterilem PBS gewaschen.

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 von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

2.3.3 Transfektion von Zellen

2.3.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK293 Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit CaCl₂ und einer BES gepuffereten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos

and Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde in Polyprenröhrchen zusammenpipettiert. Hierbei wurde die entsprechende Menge an reiner Plasmid DNA mit sterilem Wasser verdünnt und mit 2,5M CaCl₂ versetzt (Mengenangaben siehe nachfolgende Tabelle). Nach der Zugabe des 2x BBS wurde die Lösung mit Hilfe eines Vortex-Gerätes durchmischt und 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die durch Bildung der Kalzium-DNA-Präzipitate leicht getrübe Lösung tropfenweise auf die Zellen verteilt und 12 bis 16 Stunden bei 3% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24h gehungert.

Schalengröße	6 Loch Schale	6 cm Schale	10 cm Schale
Schalenfläche	10 cm ²	21 cm ²	57 cm ²
Medienvolumen	1 ml	2 ml	4 ml
DNA in H ₂ O _{bidest}	2 µg in 90 µl	5 µg in 180 µl	10 µg in 360 µl
2.5 M CaCl ₂	10 µl	20 µl	40 µl
2 x BBS (pH 6.96)	100 µl	200 µl	400 µl
Gesamtvolumen	200 µl	400 µl	800 µl
Hungermedium	2.0 ml	3.0 ml	5.0 ml

Für die Transfektion von Phönix E Zellen wurde das eben beschriebene Protokoll leicht modifiziert. Anstelle von BBS wurde HBS verwendet und die Konzentration der CaCl₂-Lösung war 2,0M.

2.3.3.2 *Lipofectamine®-Transfektion von COS-7 Zellen*

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine® bildet mit DNA nichtkovalente Wechselwirkungen und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen.

Die Zellen wurden 24h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von 150.000 Zellen/Loch (6-Loch-Schalen) ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 5µl Lipofectamine® und 95µl serumfreien Medium sowie eine Lösung B mit 1.5µg Plasmid-DNA in 100µl serumfreiem Medium angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 30-45min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden zu den Transfektionsansätzen noch 800µl serumfreies Medium zugegeben und gemischt. Die Transfektionsansätze wurden nun auf die Zellen pipettiert, deren Medium kurz davor abgesaugt wurde. Nach 4 Stunden im Brutschrank bei 7% CO₂ wurden jeweils 1ml Medium mit 20% FCS auf die Zellen gegeben und für weitere 20 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

2.3.3.3 *Lipofectamine® plus-Transfektion von NIH-3T3 und PC12 Zellen*

Die Lipofectamine® Plus Transfektionsmethode ist eine modifizierte Form der Lipofectamine® Transfektion und basiert auf dem selben Prinzip. Die DNA wird jedoch im Unterschied zur einfachen Lipofectamine® Transfektion in Wasser und Lipoplus Reagenz gelöst, welche die DNA präkomplexiert, was eine höhere DNA Stabilität und somit eine höhere Transfektionsrate unter weniger DNA Einsatz zur Folge hat.

Die Zellen wurden 24h vor Transfektionsbeginn in einer 12 Loch Schale (NIH-3T3) oder 10cm Schale (PC12) mit einer Zellzahl von 10.000 (NIH-3T3) beziehungsweise 1.400.000 (PC12) ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 2µg (NIH-3T3) bzw. 4µg (PC12) Plasmid-DNA und 20µl Lipofectamine®-plus in 750µl serumfreien Medium sowie eine Lösung B mit 30µl Lipofectamine® und 5.000µl serumfreien Medium angesetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und nochmals 15min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit serumfreien Medium gewaschen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 500µl (NIH-3T3) bzw. 5ml des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben, deren Medium kurz davor abgesaugt wurde. Nach 3-5 Stunden im Brutschrank bei 7% CO₂ wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

Zur Herstellung stabiler PC12 Zelllinien wurden die transfizierten Zellen in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion erfolgte mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

2.3.3.4 *Polyfect®-Transfektion von CHO Zellen*

Die Zellen wurden 24h vor Transfektionsbeginn in einer 12 Loch Schale mit einer Zellzahl von 15.000 ausgesät. Für die Transfektion wurde 2,5µg DNA in ein Polyprenröhrchen pipettiert und mit serumfreien Medium auf ein Volumen 150µl aufgefüllt. Hierzu wurden 15µl Polyfect® Transfektionsreagenz gegeben, vorsichtig gemischt und 10min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit serumfreien Medium gewaschen. Nach Ablauf der 10 minütigen Inkubationszeit wurden 4ml frisches Medium zum Ansatz gegeben und je 500µl auf die Zellen gegeben, deren Medium kurz zuvor abgesaugt wurde. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der β -Galaktosidase wie unter 2.3.3 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, und 10min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blaufärbung transfizierter Zellen 60min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4mg/ml) inkubiert.

2.3.5 Retroviraler Gentransfer in PC12 Zellen

Zur Herstellung von PC12 Zellen, welche bestimmte Konstrukte der PTP-SL stabil exprimieren, wurden jeweils 2.000.000 Phoenix E Zellen auf 6cm Kulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit den entsprechenden retroviralen pLXSN-Konstrukten nach der unter 2.3.3 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert, wobei 5min vor der Transfektion 4 μ l Chloroquine (Endkonzentration 50 μ M) pro 4ml Medium hinzugegeben wurde. 8 Stunden nach der Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um das Chloroquine wieder zu entfernen. Am selben Tag wurden die zu infizierenden PC12 Zellen mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen/6cm Schale ausgesät. 24h nach der Transfektion wurden die transfizierten Phoenix E Zellen zum Sammeln von Virusüberstand mit 1,5ml Medium kultiviert. Nach 3 Stunden wurde das die Viren enthaltende Medium abgenommen und durch einen 0,45 μ m Filter sterilfiltriert. 1ml des so behandelten Mediums wurde mit 1ml frischem PC12 Medium gemischt und 1,5ml auf die zu infizierenden PC12 Zellen gegeben, deren Medium kurz zuvor abgenommen wurde. Nach 3 Stunden wurde die zweite Infektionsrunde durchgeführt. Nach weiteren 3 Stunden wurde erneut infiziert, aber diesmal verblieb der virale Überstand über Nacht auf den PC12 Zellen. Nach Abschluss der Infektionen wurde das Medium gewechselt und die Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgte, wie unter 2.3.3.3 beschrieben, mit Geneticin (G418).

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Triton X-100-Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens 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 (50mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Glycerin,

5mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100mM Natriumfluorid, 20mM Natriumpyrophosphat, 2mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10min auf Eis wurde das Zelllysat gesammelt und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10min, 13.000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzelllysat weiterverarbeitet.

2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1200µg Protein/ml) eingesetzt.

2.4.3 Immunpräzipitation von Proteinen

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

Protein A und Protein G sind Membranproteine des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, die spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermögen. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-/G-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Antikörper und Protein, erleichtert (Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30µl Protein A-/G-Sepharose und 1-5µg monoklonaler Antikörper oder 3-10µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50mM Hepes, pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Glycerin, 5mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zelllysaten gegeben und für 2-3h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6.500 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-/G-Sepharose zu lösen.

2.4.4 Präparation von pGEX-GST-Fusionsproteinen

Die Bakterien wurden wie unter Punkt 2.2.6.2 transformiert und nachfolgend mit 50ml LB-Medium plus dem entsprechenden Antibiotikum eine Übernacht-Kultur angelegt. Mit dieser Vorkultur wurden 1000ml LB-Medium plus Antibiotikum angeimpft. Diese wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 500µl IPTG (Stammkonzentration: 1M; Endkonzentration: 500µM) wurde die Expression des GST-Fusionsproteins induziert und die Bakterien für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Bakterien mittels 10 minütiger Zentrifugation bei 5.500 rpm im GS-3 Rotor bei 4°C. Das Pellet wurde in 20ml eiskaltem TS-Puffer resuspendiert und in SS34 Röhrchen überführt. Die Lyse der Bakterien erfolgte mittels Ultraschall (2x 1min 70%; 1x 2min 70%). Das Lysat wurde anschließend für 45 Minuten bei 4°C mit 20.000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt und nachfolgend 1ml Glutathion-Sepharose (50%ige Lösung) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Glutathion-Sepharose Pellet wurde dreimal mit 40ml PBS plus Proteaseinhibitoren (200 µl Aprotinin, 4 ml 0,5 M EDTA) gewaschen. Im Anschluß daran wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfhütchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 6.500 rpm für 10 Sekunden und der Überstand wurde verworfen. Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte durch fünfmaliges wiederholen folgender Schritte:

- Zugabe von 1ml Elutionspuffer
- Inkubation für 10min auf dem Drehrad bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 10sek mit 6.500 rpm
- Abnahme des Überstandes und Überführung in ein neues 1,5ml Eppendorfhütchen

Der somit erhaltene Überstand enthält das GST-Fusionsprotein. Jeweils 10µl der fünf Eluate wurden zur Kontrolle auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die GST-Fusionsprotein enthaltenen Eluate wurde vereinigt und mit ihnen über Nacht bei 4°C eine Dialyse gegen den Dialysepuffer durchgeführt. Die Proteinkonzentration des so erhaltenen GST-Fusionsproteins wurde zum einen mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Reagent Kits und zum anderen durch Coomassie-Färbung eines 10%iges SDS-Gels, auf dem eine BSA Konzentrationsreihe mit aufgetragen wurde, bestimmt.

TS-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
25% Saccharose
zu 20ml dieses Puffers wurden noch 2ml 0,5M EDTA, 200µl Aprotinin und
200 µl 100mM PMSF hinzugegeben

Elutionspuffer:

Stamm-Lösung	Aliquot	Endkonzentration
1 M Tris-HCl pH 8,0	500 µl	50 mM
1 M DTT	100 µl	10 mM
reduziertes Glutathion	0,0461 g	15 mM
H ₂ O	9,4 ml	

Dialysepuffer: 1x PBS
 30% Glyzerin

2.4.5 GST-Bindungsassay

Zur Durchführung eines GST-Bindungsassays wurden je 30µl Glutathion-Sepharose und 4µg GST oder GST-PTP-SL 147-288 oder GST-PTP-SL 147-549 zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50mM Hepes, pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Glyzerin, 5mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zelllysaten (500µg) gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6.500 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein 10%iges SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5min bei 100°C gekocht, um den Proteinkomplex von der Glutathion-Sepharose zu lösen.

2.4.6 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, sodass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1990). Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein:	MG (in kD):	Protein:	MG (in kD):
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

Verwendete Pufferzusammensetzungen :

Trenngel	7.5%	10.0%	12.5%
<i>4 x lower Tris</i>	10 ml	10 ml	10 ml
<i>H₂O</i>	20 ml	16.7 ml	13.3 ml
<i>Acrvlamid (30%/0.8%)</i>	10 ml	13.3 ml	16.7 ml
<i>100% TEMED</i>	25 μ l	25 μ l	25 μ l
<i>10% APS</i>	270 μ l	270 μ l	270 μ l
Sammelgel	4.0%		
<i>4 x unner Tris</i>	3.25 ml		
<i>H₂O</i>	9.6 ml		
<i>Acrvlamid (30%/0.8%)</i>	1.8 ml		
<i>100% TEMED</i>	25 μ l		
<i>10% APS</i>	270 μ l		

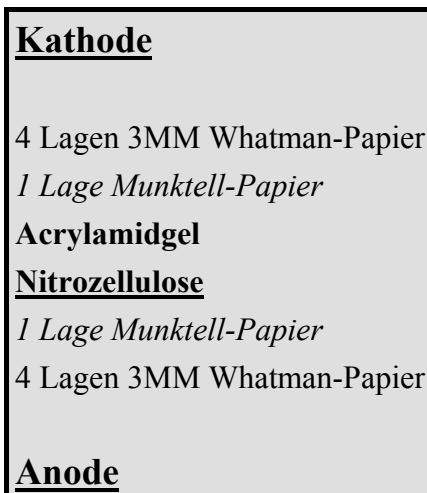
2.4.7 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 30min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.4.8 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2h bei 0,8mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

Blotaufbau :



Um Luftblasen zu vermeiden, welche die Qualität des Blots stark vermindern können, wurden die zuvor in Transblot SD eingelegten Lagen an Filterpapier nach Auflegen stets geglättet und exakt übereinander geschichtet.

2.4.9 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1.000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Die Membran wurde 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach sechsmal 10min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60-90min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde die Membran erneut sechsmal 10min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5mM Tris/HCl pH 6,8, 100mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 2h entfernt werden.

2.5 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

2.5.1 Stimulation von Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und der damit verbundene Einfluss auf den MAPK Signalweg in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 18 bis 24h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.1) wurden die Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G Protein-gekoppelter Rezeptoren oder anderen Substanzen stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Phosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 30min vorbehandelt. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (2.4.3) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.4) aufgetrennt und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Immunoblot (2.4.7) analysiert.

2.5.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAPKinase durch *in-vitro* Kinase-Test

Die endogene MAPKinase wurde aus 30 bis 90 μ g Zellysat immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,25ml HNTG-Puffer und einmal mit 0,4ml Äquilibriumspuffer (20mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1mM DTT, 10mM MgCl₂, 200 μ M Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 μ l Reaktionspuffer (20mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1mM DTT, 10mM MgCl₂, 200 μ M Orthovanadat, 5mM p-Nitrophenylphosphat, 0.5mg/ml MBP, 50 μ M ATP) mit 1 μ Ci [γ -³²P]-ATP gegeben und 10min bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 30 μ l 2x Lämmli-puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel wie unter 2.4.6 beschrieben geblottet und mit Ponceau S gefärbt. Die untere Hälfte der Nitrozellulosemembran, in denen sich das MAPKinase Substrat MBP befand, wurde mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert bzw. mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet. Die obere Membranhälfte wurden wie unter 2.4.7 beschrieben auf Expression der MAPKinasen hin analysiert.

2.5.3 *In-vitro* Phosphorylierung von PTP-SL durch PKA (PKA Assay)

Für die *in-vitro* Phosphorylierung von PTP-SL durch PKA wurden GST-Fusionsproteine der Phosphatase verwendet. 5µg der entsprechenden Fusionsproteine wurden mit H₂O auf ein Volumen von 7µl gebracht. Hierzu wurden 1µl 10x Reaktionspuffer, 0,25µl [γ -³²P]-ATP (2,5µCi) und 1µl PKA gegeben. Der Ansatz wurde für 10min bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von 25µl 2x Lämmli wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel wie unter 2.4.6 beschrieben gebロットet und die Nitrozellulosemembran mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt. Die Membran wurde auf einem Röntgenfilm exponiert.

Zusammensetzung für 2 ml 10x Reaktionspuffer:

2 µl	10 mM	ATP
400 µl	1,0 M	Tris/HCl pH 7,5
100 µl	0,2 M	EGTA
100 µl	1,0 M	MgCl ₂
1398 µl		H ₂ O

2.5.4 Bestimmung der katalytischen Aktivität der PTP-SL mittels *in-vitro* Phosphatase-Test (pNPP Assay)

Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben lysiert und die Phosphatase über ihre HA-Markierung per Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,75ml HNTG-Puffer und einmal mit 0,75ml Äquilibriumspuffer (25mM Hepes pH 7,5; 5mM EDTA; 10mM DTT) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 150µl Reaktionspuffer (25mM Hepes pH 7,5; 5mM EDTA; 10mM DTT; 5mM pNPP) gegeben und 2 Stunden bei RT im Schüttler inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405nm.

2.5.5 Bestimmung der katalytischen Aktivität unterschiedlicher PTP-SL Mutanten gegenüber der MAPK als Substrat

Hierzu wurden HEK293 Zellen, wie unter 2.3.3.1 beschrieben, mit verschiedenen Konstrukten der PTP-SL transfiziert. Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben lysiert und die Phosphatase über ihre HA-Markierung per Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,75ml HNTG-Puffer gewaschen. Zu den gewaschenen Immunpräzipitaten wurde je 180µl Lysat von nicht transfizierten jedoch mit EGF (20ng/ml; 7min) stimulierten HEK293 Zellen und 180µl Reaktionspuffer (25mM Hepes pH 7,5; 5mM EDTA; 10mM DTT) gegeben und die der Ansätze für 10min bei RT auf einem Drehrad

inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze auf Eis gestellt und dann bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine entsprechende Menge 3x Lämmli hinzugegeben. Das Pellet wurde erneut dreimal gewaschen und anschließend wurde 40µl 3x Lämmli hinzupipettiert. Je 35µl vom Überstand und vom Pellet wurden mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel wie unter 2.4.6 beschrieben geblottet und mittels Immunoblot (2.4.7) analysiert.

2.5.6 Untersuchung der Proliferation der stabilen PTP-SL PC12 Zelllinien

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen PTP-SL Konstrukte auf das Wachstum von PC12 Zellen zu untersuchen, wurden 50.000 Zellen/Loch (6-Loch Schalen) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und durch serumreduziertes Medium (0,5%HS/0,5%FCS) oder Medium mit 10%HS/5%FCS ersetzt. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml neuem Medium von der Platte gelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counter (Coulter Electronics) bestimmt.

2.5.7 Untersuchung der Zellproliferation mittels Thymidineinbau

Die Zellen wurden, wie unter 2.3.3.3 und 2.3.3.4 beschrieben, ausgesät und transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend 24h im serumfreien Medium gehungert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium erneut gewechselt, wobei die eine Hälfte der Zellen weiterhin im serumfreien Medium gehalten wurde, die andere Hälfte hingegen zur Stimulation Medium mit 10% FCS erhielten. Nach 18 Stunden wurde 0,5µCi ³H-Thymidin/Loch zu den Zellen gegeben und diese nun weitere 4 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit je 1ml/Loch PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1ml 10% TCA/Loch für 20min auf Eis fixiert. Nach dem Absaugen der 10%igen TCA-Lösung erfolgte bei RT die erste Lyse mit 200µl 0,2N NaOH/1% SDS pro Loch für 10min. Das Lysat wurde in Szintillationsröhrchen überführt, in denen 5ml eines Szintillationscocktails (Rotiszint®ecoplus, Roth) vorgelegt waren. Die zweite Lyse mit 200µl 0,2N HCl für 10min, diente auch zur Neutralisation. Auch dieses Lysat wurde in die Szintillationsröhrchen überführt. Die Messung, der von den Zellen eingebauten Radioaktivität, erfolgte in einem Szintillationscounter (Beckman Coulter™) und diente als Maß für die proliferative Aktivität der Zellen.

2.5.8 Messung der hunger-induzierten Apoptoserate (Apoptose Assay)

Hierbei wurden 50.000 Zellen/Loch (12-Loch Schale) ausgesät. 24h später wurde das Medium abgenommen und durch serumfreies Medium oder Medium mit 10%HS/5%FCS

ersetzt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen im Medium resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1.600 rpm (5min) abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 500µl eines hypotonischen Puffers (10% Na-Citrat, 10% Triton X-100, 20µg/ml Propidiumjodid) aufgenommen. Das Propidiumjodid dient zum Anfärben der DNA. Die Messung erfolgte mit einem FACScalibur-Gerät (Becton & Dickson).

2.5.9 Zelladhäsionsassay

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen PTP-SL Konstrukte auf das Adhäsionsvermögen von PC12 Zellen zu untersuchen, wurden 200.000 Zellen/Loch (6-Loch Schalen) ausgesät. Nach 30min wurde das Medium abgesaugt und die Zellen sehr vorsichtig mit Medium gewaschen, um restliche noch nicht adhärenierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die adhärenierten Zellen mit 1ml neuem Medium von der Platte gelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counter (Coulter Electronics) bestimmt.

2.5.10 PC12 Differenzierungsassay

Es wurden 50.000 PC12 Zellen/Loch (6-Loch Schale) ausgesät. 24 Stunden nach dem Aussäen wurden die Liganden (NGF 50ng/ml, EGF 20ng/ml, Forskolin 10µM) in DMEM/0,5% HS + 0,5% FCS zu den Zellen gegeben und das Medium mit den Liganden am zweiten Tag erneuert. Um das Ausmaß der neuronalen Differenzierung, d.h. Anzahl und Länge der Neuriten, zu bestimmen, wurden die nach 48 und 72h fotografiert (Nikon-F-301-Kamera montiert an einem Phasenkontrast-Mikroskop).

3 Ergebnisse

3.1 PTP-SL assoziiert mit den MAPKinasen ERK1/2

3.1.1 GST-Fusionsproteine der PTP-SL binden ERK1 und ERK2

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste noch unveröffentlichte Hinweise über eine Assoziation der PTP-SL mit den MAPKinasen ERK1/2 vor (R. Pulido und A. Ullrich, persönliche Mitteilung). Um diese Assoziation zu bestätigen und zur Identifikation weiterer spezifischer Interaktionspartner wurden GST-Fusionsproteine generiert, welche die Juxtamembrandomäne (GST-PTP-SL 147-288) beziehungsweise die Juxtamembrandomäne und die Phosphatasedomäne von PTP-SL (GST-PTP-SL 147-549) enthielten (Abb. 4A).

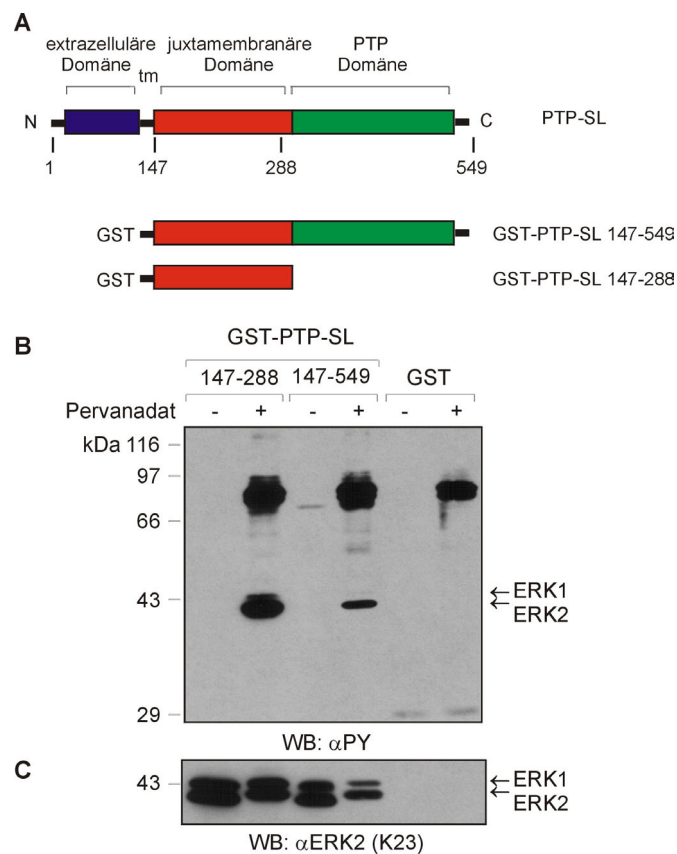


Abb. 4: GST-Fusionsproteine und GST-Bindungsassay mit Capan-1 Zelllysaten. (A) Schematische Darstellung der Struktur der PTP-SL und der im GST-Bindungsassay verwendeten GST-PTP-SL-Fusionsproteine. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf Hendricks *et al.* (1995); tm = transmembranärer Bereich. **(B)** In serumfreiem Medium kultivierte Capan-1 Zellen wurden 15 Minuten in An- oder Abwesenheit von 1mM Pervanadat inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mit jeweils 4µg GST-Fusionsprotein GST-PTP-SL 147-288 oder GST-PTP-SL147-549 über Nacht inkubiert und ein GST-Bindungsassay durchgeführt. Als Kontrolle dienten 4µg GST. Die Proteine wurden mit 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und einer Immunoblotanalyse mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) unterzogen. **(C)** Nach Entfernen des αPY-Antikörpers wurde mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (αERK2) immundetektiert.

Diese Fusionsproteine wurden in GST-Bindungsassays eingesetzt, für die Zelllysate unterschiedlicher Zelllinien verwendet wurden. Die Zelllysate wurden aus Pervanadat stimulierten bzw. unstimulierten Zellen gewonnen. Pervanadat bewirkt durch die Inhibition von PTPn den Anstieg von Proteintyrosinphosphorylierungen innerhalb der Zelle (Krady *et al.*, 1997). Die mittels der GST-PTP-SL-Fusionsproteine präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem monoklonalen Anti-PY-Antikörper detektiert. Die Abbildung 4B zeigt beispielhaft einen solchen Bindungsassay mit Lysaten der Zelllinie Capan-1.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Pervanadat Stimulation verschiedene tyrosinphosphorylierte Proteine mit den Fusionsproteinen präzipitiert werden konnten. Die Banden zwischen dem 66 kDa und 97,4 kDa Marker weisen auf eine unspezifische Bindung hin, da diese auch in der GST Kontrolle vorhanden waren. Spezifisch hingegen sind die tyrosinphosphorylierten Banden bei 42 kDa und 44 kDa. Diese Molekulargewichtsrößen entsprechen denen der MAPKinasen ERK1 und ERK2. Die Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper, der sowohl ERK1 als auch ERK2 erkennt, bestätigte die Präzipitation dieser beiden MAPKinasen durch die GST-PTP-SL-Fusionsproteine (Abb. 4C). Da ERK1/2 auch aus Lysaten unstimulierter Zellen durch die Fusionsproteine der Phosphatase präzipitiert wurden, scheint die Wechselwirkung zwischen der PTP-SL und ERK1/2 unter den gewählten Versuchsbedingungen konstitutiv zu erfolgen. Die Stärke der ERK1/2 Phosphotyrosinsignale war bei der Präzipitation mit GST-PTP-SL 147-549 im Vergleich zu GST-PTP-SL 147-288 deutlich abgeschwächt. Da nur GST-PTP-SL 147-549 die PTP-SL Phosphatasedomäne enthält, scheint eine Dephosphorylierung der MAPKinasen durch dieses PTP-SL Fusionsprotein stattgefunden zu haben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass GST-Fusionsproteine der PTP-SL die MAPKinasen ERK1/2 aus unstimulierten und Pervanadat stimulierten Zelllysaten präzipitieren können..

3.1.2 Coimmunpräzipitation von PTP-SL und ERK1/2

Um zu prüfen, ob die PTP-SL auch in intakten Zellen mit den beiden MAPKinasen ERK1 und ERK2 assoziiert, wurden HEK293 Zellen mit cDNA einer HA markierten PTP-SL transfiziert. Nach der Zelllyse wurde eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Anti-HA-Antikörper durchgeführt und ERK2 durch Immunoblotanalyse nachgewiesen. Wie in Abb. 5 gezeigt, wurde endogenes ERK2 mit transfizierter HA-PTP-SL coimmunpräzipitiert. Der Reblot gegen die HA-Markierung zeigt die immunpräzipitierte PTP-SL.

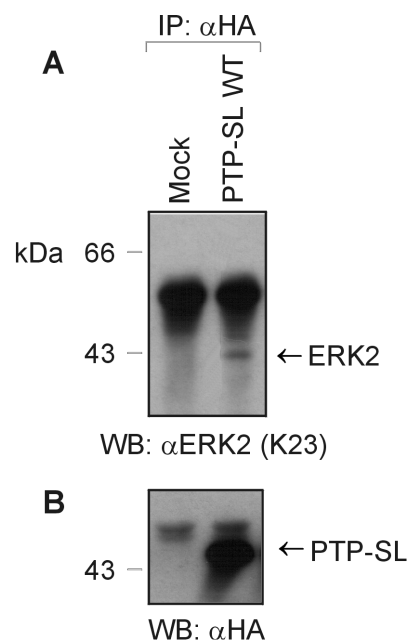


Abb. 5: In HEK293 Zellen überexprimierte PTP-SL assoziiert mit ERK2. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor pcDNA3 (Mock) oder mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT transfiziert und anschließend 48h in Nährmedium kultiviert. **(A)** Nach der Zellyse wurde HA-PTP-SL mit einem Anti-HA-Antikörper (α HA) coimmunpräzipitiert, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. ERK2 wurde nachfolgend mit einem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper (α ERK2) immundetektiert. **(B)** Nach Entfernen des Anti-ERK2-Antikörpers wurde die PTP-SL mit dem monoklonalen Anti-HA Antikörper von Babco (α HA) nachgewiesen.

Der Versuch die überexprimierte HA-PTP-SL mit einer Immunpräzipitation gegen endogenes ERK2 cozipitieren misslang (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen hierfür könnten zum einen in der eher geringen Menge an immunpräzipitierter ERK2 liegen oder im Erkennungsbereich des verwendeten Antikörpers. Tanoue *et al.* zeigten, dass eine der Hauptbindungsstellen für Proteine an ERK2 im C-terminalen Bereich der Kinase liegt (Tanoue *et al.*, 2000). Der für die Immunpräzipitation verwendete Antikörper ist gegen einen Bereich im C-Terminus von ERK2 gerichtet. Somit könnte die an die MAPKinase gebundene PTP-SL den Erkennungsbereich des Antikörpers blockieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden HEK293 Zellen mit HA-markierter ERK2 (HA-ERK2) und GFP-markierter PTP-SL (GFP-PTP-SL) cotransfiziert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit einem Anti-HA-Antikörper durchgeführt. Der Immunoblot mit einem polyklonalen GFP-Antikörper zeigt die copräzipitierte GFP-PTP-SL (Abb. 6). Als Kontrolle für die Expression der GFP-PTP-SL Konstrukte wurde jeweils eine Immunpräzipitation gegen die GFP-Markierung durchgeführt. Diese Ergebnisse lieferten den Nachweis, dass die PTP-SL mit den ERK/MAPKinasen assoziieren kann.

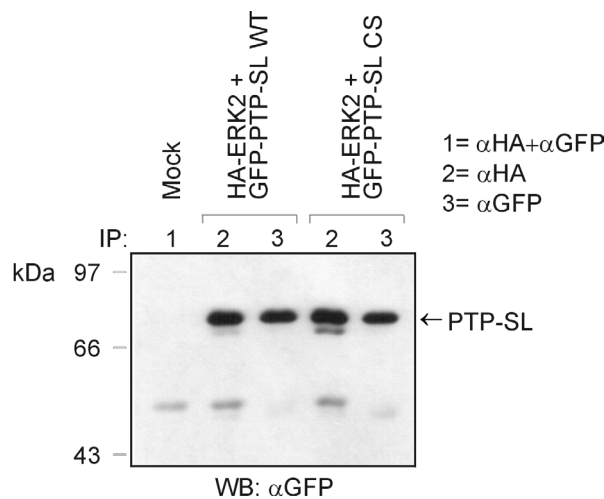


Abb. 6: ERK2 assoziiert mit der PTP-SL in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor pcDNA3 (Mock) oder mit pcDNA3-GFP-PTP-SL WT und pcDNA3-HA-ERK2 transfiziert und anschließend 48h in Nährmedium kultiviert. Nach der Zellyse wurden Immunpräzipitationen wie oben im Bild angegeben mit monoklonalen Antikörper gegen die HA-Markierung von ERK2 (α HA) oder gegen die GFP-Markierung der PTP-SL (α GFP) durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und im Immunoblot mit polyklonalem Anti-GFP Antikörper (α GFP) analysiert.

3.2 PKA inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2 durch Phosphorylierung des Serins 231 in der KIM-Domäne der Phosphatase

Ergebnisse von Pulido *et al.* (1998) zeigten, dass ein spezieller Bereich der PTP-SL für die Bindung an die MAPKinasen verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich um die KIM-Domäne (Kinase-Interaktions-Motiv). Dieser Bereich besteht aus den Aminosäuren 224-239 und enthält eine PKA-Phosphorylierungssequenz (RRXS). Aus diesem Grund wurde im folgenden Abschnitt untersucht, ob die Protein Kinase A (PKA) in der Lage ist die PTP-SL zu phosphorylieren und welche Auswirkungen eine solche Phosphorylierung auf die Bindung an die MAPKinasen besitzt.

3.2.1 *In-vitro* Phosphorylierung der KIM-Domäne durch PKA

Hierzu wurde ein radioaktiver PKA Assay durchgeführt, bei dem zum einen ein GST-Fusionsprotein der PTP-SL mit KIM-Domäne (GST-PTP-SL 147-288) und zum anderen ein GST-Fusionsprotein der Phosphatase ohne KIM-Domäne (GST-PTP-SL Δ KIM) als Substrate dienten. Wie dem Autoradiogramm (Abb. 7) eindeutig zu entnehmen ist, wurde das PTP-SL Fusionsprotein mit der KIM-Domäne phosphoryliert. Das Gleiche gilt für die verwandte

Phosphatase STEP, die ebenfalls eine KIM-Domäne besitzt. Hingegen ist keine Phosphorylierung bei der GST-PTP-SL KIM-Deletionsmutante zu erkennen.

Diese *in-vitro* Daten konnten in COS-7 Zellen durch eine [$\gamma^{32}\text{P}$] *in-vivo* Markierung bestätigt werden (Eickhoff, persönliche Mitteilung).

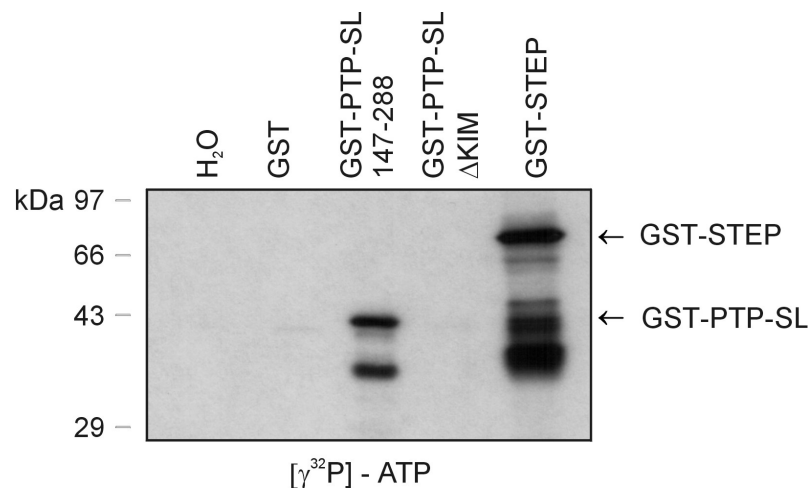


Abb. 7: PKA phosphoryliert *in-vitro* nur die Fusionsproteine mit KIM Domäne. Mit 5 μg der im Bild angegebenen Fusionsproteine wurde ein *in-vitro* PKA Assay durchgeführt und nach 10 Minuten die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels 15%iger SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran überführt und die phosphorylierten Proteine autoradiographisch sichtbar gemacht. H₂O und GST dienen hierbei als Negativkontrollen.

3.2.2 Die Phosphorylierung der KIM-Domäne inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die PTP-SL in der KIM-Domäne durch die PKA phosphoryliert werden kann. Im folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss diese Phosphorylierung auf die Bindung zwischen der PTP-SL und den MAPKinasen hat. Dazu wurde ein GST-Fusionsprotein der PTP-SL nicht radioaktiv mittels PKA phosphoryliert und anschließend in einem GST-Bindungsassay mit Lysaten der Zelllinie Ovar-3 eingesetzt. Der nachfolgende Immunoblot (Abb. 8) gegen ERK2 macht deutlich, dass im Gegensatz zum nicht phosphorylierten GST-PTP-SL Fusionsprotein mit dem phosphorylierten GST-PTP-SL Fusionsprotein keine MAPKinasen präzipitiert werden konnten. Folglich inhibiert die PKA vermittelte Phosphorylierung von PTP-SL die Bindung der Phosphatase an die MAPKinasen.

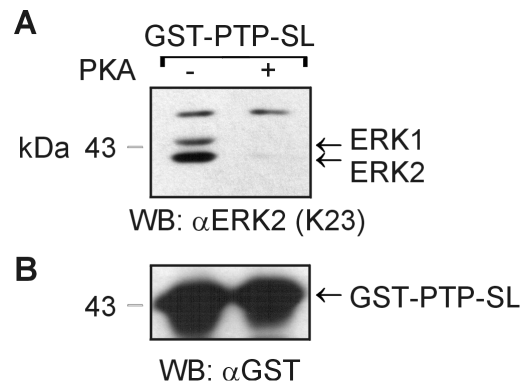


Abb. 8: Die von PKA phosphorylierte PTP-SL bindet nicht mehr ERK1/2. (A) 5 µg GST-Fusionsproteine wurden in An- oder Abwesenheit von PKA (PKA -/+) 10 Minuten in Reaktionspuffer inkubiert und daraufhin ein GST-Bindungsassay mit Ovar-3 Zelllysaten durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und mit polyklonalem Anti-ERK2 Antikörper K23 (αERK (K23)) immunodetektiert. **(B)** Nach Entfernen des αERK2-Antikörpers wurde der Einsatz gleicher Mengen an GST-PTP-SL Fusionsprotein mit dem polyklonalen Anti-GST-Antikörper (αGST) im Immunoblot nachgewiesen.

3.2.3 Der Phosphorylierungszustand des Serin 231 innerhalb der KIM-Domäne ist entscheidend für die Assoziation von PTP-SL mit ERK1/2

Innerhalb der KIM-Domäne liegen zwei Serine (Position 231 und 234) die potentiell als Phosphorylierungsstellen dienen können. Die PKA-Erkennungssequenz (RRXS) beinhaltet das Serin 231. Um zu überprüfen, ob nur dieses Serin von der PKA phosphoryliert wird, wurden Mutationsstudien durchgeführt. Dazu wurden folgende Mutationen in das Expressionskonstrukt der HA-PTP-SL eingeführt:

- S 231 ⇒ E
- S 234 ⇒ E
- S 231/234 ⇒ E
- S 231 ⇒ A

Die Glutamat-Mutante imitiert hierbei den phosphorylierten Zustand des Serin 231, während die Alanin-Mutante den unphosphorylierten Zustand nachahmt. Diese Mutanten wurden in HEK293 Zellen überexprimiert und nach der Zellyse eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen HA-Antikörper durchgeführt. Der Immunoblot erfolgte mit einem Antikörper gegen ERK2.

Aus Abb. 9 geht deutlich hervor, dass ERK1/2 mit dem Wildtyp der PTP-SL copräzipitierte, während dies bei der PTP-SL SE231 Mutante nicht der Fall war. Die Stimulation mit EGF hatte im Vergleich zu den unstimulierten Zellen keinen Einfluss auf die Assoziation von PTP-SL WT mit den ERK/MAPKinasen. Der Reblot gegen die HA-Markierung bestätigte die

Immunpräzipitation von HA-PTP-SL. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung von PTP-SL am Ser231 eine Interaktion mit ERK1/2 verhindert.

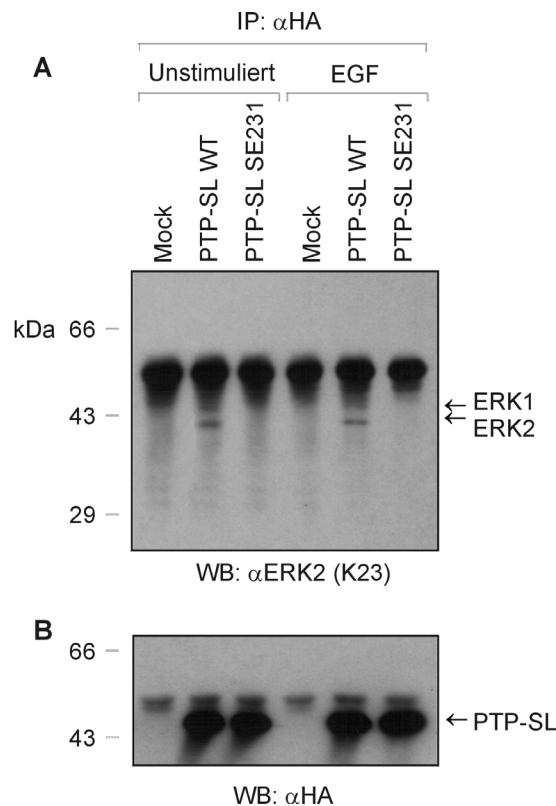


Abb. 9: Die Mutation des Serin 231 zu Glutamat inhibiert die Bindung der PTP-SL an ERK1/2. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder pcDNA3-HA-PTP-SL SE231 transfiziert, 24h in Serum freien Medium kultiviert und wenn oben angegeben 7min mit 20ng/ml EGF stimuliert. **(A)** Nach der Zellyse wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte (α HA) durchgeführt, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Anschließend wurde coimmunpräzipitiertes ERK1/2 mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (α ERK2 (K23)) im Immunoblot nachgewiesen. **(B)** Nach Entfernen des α ERK2-Antikörpers wurde mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) immundetektiert.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob der Phosphorylierungsstatus des Ser234 ebenfalls eine Auswirkung auf die Bindung von PTP-SL mit ERK2 hat. Wie in der Abb. 10 zu erkennen ist, konnte ERK2 mit der Glutamat-Mutante dieses Serins (234) copräzipitiert werden. War hingegen zusätzlich noch das Serin 231 zu Glutamat mutiert (SE231+234), fand wiederum eine Blockierung der Assoziation statt. Hieraus ging hervor, dass nur die Phosphorylierung des Ser231 nicht aber des Ser234 die Bindung von PTP-SL mit ERK2 moduliert.

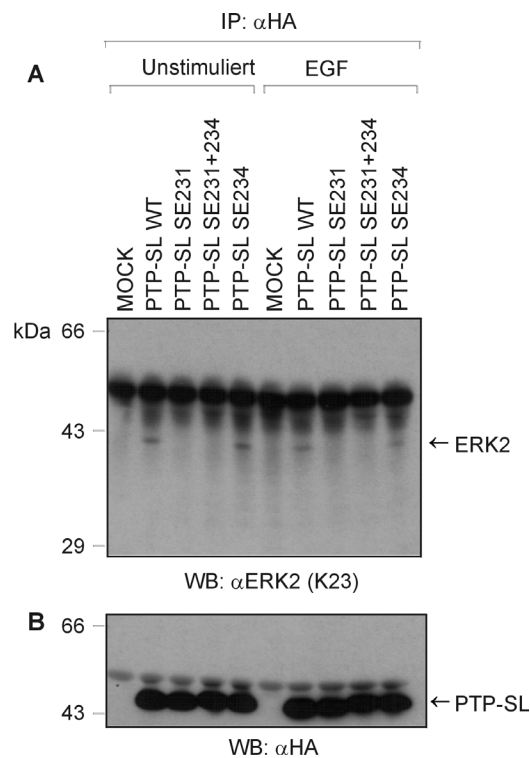


Abb. 10: Die Mutation des Serin 234 zu Glutamat inhibiert nicht die Bindung der PTP-SL an ERK1/2. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, 24h in Serum freien Medium kultiviert und wenn oben angegeben 7min mit 20ng/ml EGF stimuliert. **(A)** Nach der Zellyse wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Anti-HA-Antikörper (α HA) gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte durchgeführt, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Anschließend wurde coimmunpräzipitiertes ERK2 mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (α ERK2 (K23)) im Immunoblot nachgewiesen. **(B)** Nach Entfernen des α ERK2-Antikörpers wurde mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) immundetektiert.

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit sich eine Mutation des Ser231 zu Alanin auf die Interaktion von PTP-SL mit ERK2 auswirkt. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, erhöhte die Ser \rightarrow Ala Mutation der PTP-SL die Menge an coimmunpräzipitierter ERK2 im Vergleich zum Wildtyp der Phosphatase. Der Immunoblot mit einem monoklonalen HA Antikörper bestätigte, dass gleiche Mengen der Phosphatase präzipitiert worden waren.

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass der Phosphorylierungszustand des Serin 231 einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung zwischen PTP-SL und den MAPKinasen nimmt.

Dabei scheint die Bindung zwischen ERK2 und PTP-SL unabhängig von der Aktivierung der MAPKinasen zu sein, da nach Stimulation mit EGF in etwa gleich viel ERK2 copräzipitiert wurde (Abb. 9-11).

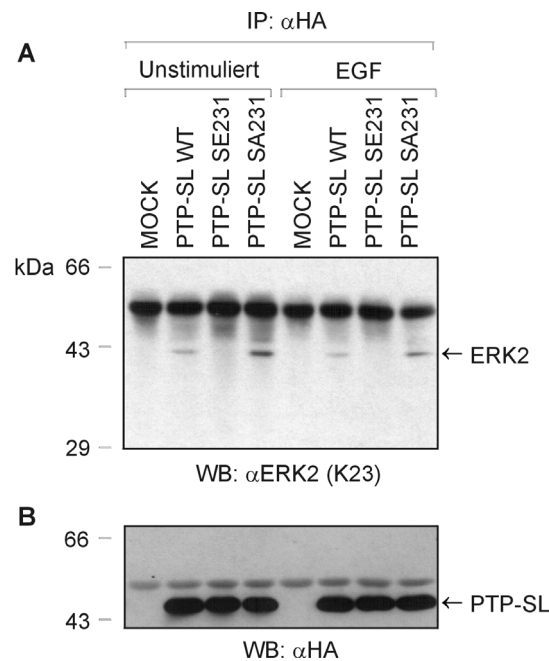


Abb. 11: Die Mutation des Serin 231 zu Alanin verstärkt die Bindung der PTP-SL an ERK1/2. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, 24h in Serum freien Medium kultiviert und wenn oben angegeben 7min mit 20ng/ml EGF stimuliert. **(A)** Nach der Zellyse wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte (α HA) durchgeführt, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Anschließend wurde coimmunpräzipitiertes ERK2 mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (α ERK2 (K23)) im Immunoblot nachgewiesen. **(B)** Nach Entfernen des α ERK2-Antikörpers wurde mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) immundetektiert.

3.2.4 Forskolin Stimulation reduziert die Coimmunpräzipitation von PTP-SL und ERK2 in COS-7 Zellen

Im Anschluss sollte geprüft werden, ob die oben dargestellte Modulation der Bindung durch PKA auch *in-vivo* nachgewiesen werden kann. Um die Protein Kinase A zu aktivieren, ist es notwendig ein cAMP Signal zu erzeugen. Dies kann durch Stimulation mit Forskolin, welches die Adenylat-Cyclase aktiviert (Gyles *et al.*, 2001), erreicht werden. Als Zellsystem wurde für diese Experimente COS-7 gewählt, da bei diesen Zellen die Protein Kinase A (PKA) die MAPKinasen ERK1/2 aktivieren kann (Daten nicht gezeigt).

COS-7 Zellen wurden mit Leervektor, HA-PTP-SL, HA-PTP-SL SE231 und HA-PTP-SL SA231 transfiziert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit einem Anti-HA-Antikörper durchgeführt. Der Immunoblot erfolgte mit einem Antikörper gegen ERK2. In der Abb. 12 ist deutlich zu erkennen, dass nach Forskolin Stimulation weniger ERK2 mit dem Wildtyp der PTP-SL copräzipitierte (Spuren 2 und 6). Bei der Alanin-Mutante (HA-PTP-SL SA231; Spuren 4 und 8) hingegen hatte die Stimulation keine Auswirkungen auf die

Copräzipitation von ERK2. Da die Glutamat-Mutante (HA-PTP-SL SE231) den phosphorylierten Zustand nachahmt, war hier in beiden Fällen keine Copräzipitation der MAPKinase zu beobachten (Spuren 3 und 7). Der Reblot gegen die HA-Markierung zeigt gleiche Mengen der verschiedenen immunpräzipitierten HA-PTP-SL Konstrukte.

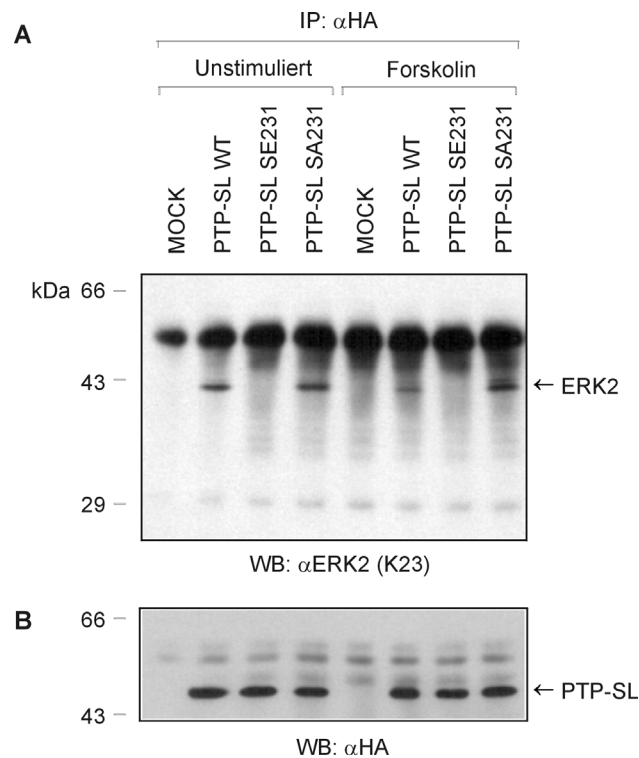


Abb. 12: Verminderte Coimmunpräzipitation von ERK2 durch den PTP-SL Wildtyp nach Forskolin Stimulation in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, 24h in Serum freien Medium kultiviert und wenn oben angegeben 10min mit 10 μ M Forskolin stimuliert. **(A)** Nach der Zellyse wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte (α HA) durchgeführt, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Anschließend wurde coimmunpräzipitiertes ERK2 mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (α ERK2 (K23)) im Immunoblot nachgewiesen. **(B)** Nach Entfernen des α ERK2-Antikörpers wurde mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) immundetektiert.

Mit diesen Ergebnissen konnte der Nachweis erbracht werden, dass auch *in-vivo* das Serin 231 der PTP-SL durch PKA phosphoryliert wird, welches die Inhibition der Bindung zwischen der PTP-SL und ERK2 zur Folge hat.

3.2.5 Hyperphosphorylierung der PTP-SL nach Inhibition von Ser/Thr-Phosphatasen durch Calyculin A und nachfolgender Stimulation mit Forskolin in COS-7 Zellen

Im folgenden Abschnitt wurde die Frage behandelt, ob die Forskolin Stimulation spezifisch zur Phosphorylierung des Serin 231 führt. Um das Ausmaß der Serinphosphorylierung zu erhöhen, wurden die Zellen vor der Stimulation mit Forskolin mit dem Serin-

/Threoninphosphatase Inhibitor Calyculin A vorbehandelt. Erfolgt die Serin-Phosphorylierung spezifisch so hätte dies ein verlangsamtes Laufverhalten des PTP-SL Wildtyps und der PTP-SL CS Mutante in der SDS-PAGE zur Folge, hervorgerufen durch die zusätzlichen negativen Ladungen der Phosphatgruppe. Die Mutanten PTP-SL SE231 und PTP-SL SA231 hingegen sollten das normale Laufverhalten zeigen, da hier die Phosphorylierungsstelle mutiert ist.

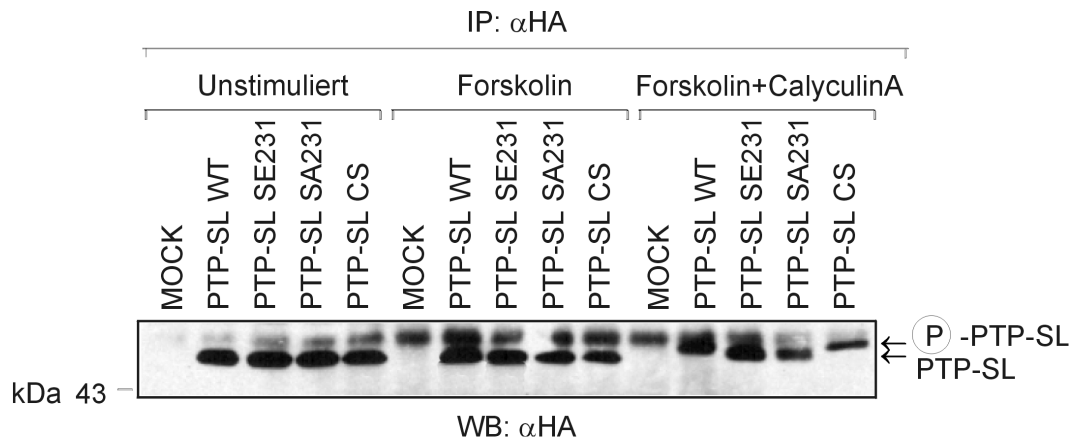


Abb. 13: Phosphorylierungsstatus des PTP-SL Wildtyps und seiner Mutanten nach Forskolin Stimulation und unter Inhibition von Serin-/Threoninphosphatasen durch Calyculin A in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, 24h im Serum freien Medium kultiviert, anschließend unter An- oder Abwesenheit von 20nM Calyculin A 30min vorinkubiert und wenn oben angegeben 10min mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Nach der Zelllyse wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte (α HA) durchgeführt, die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Anschließend wurde mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) immundetektiert.

Um dies zu untersuchen wurden COS-7 Zellen mit Leervektor, HA-PTP-SL, HA-PTP-SL SE231, HA-PTP-SL SA231 und HA-PTP-SL CS transfiziert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit einem HA-Antikörper durchgeführt. Der Immunoblot erfolgte mit einem Antikörper gegen die HA-Markierung. Zwischen den unstimulierten und den mit Forskolin stimulierten Zellen war kein Unterschied im Laufverhalten der verschiedenen PTP-SL Konstrukte erkennbar (Abb. 13). Hingegen trat nach Vorbehandlung mit Calyculin A und anschließender Stimulation mit Forskolin der oben beschriebene Bandensprung bei dem Wildtyp und der CS Mutante der Phosphatase auf. Im Vergleich dazu veränderte sich das Laufverhalten der SE und der SA Mutante nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der PTP-SL spezifisch am Serin 231 erfolgte.

3.3 Die Phosphorylierung des Serin 231 führt zu einem veränderten Enzym-Substrat-Verhalten der PTP-SL

Die vorherigen Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass die PTP-SL mit den MAPKinasen ERK1/2 assoziiert und dass diese Bindung durch PKA reguliert werden kann. Von Pulido *et al.* (1998) wurde zeitgleich zu dieser Arbeit nachgewiesen, dass die MAPKinasen ERK1/2 Substrate für die PTP-SL sind und somit dephosphoryliert und inaktiviert werden können (Pulido *et al.*, 1998). Somit ergab sich die Frage, ob die Modulation der Bindung zwischen PTP-SL und den MAPKinasen durch PKA auch Auswirkungen auf die Substraterkennung der PTP-SL hat.

3.3.1 Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 auf die PTP-SL vermittelte Inhibition der MAPKinase Aktivierung

Im folgenden Experiment sollte der Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL auf die PTP-SL vermittelte Inhibition der MAPK Aktivierung untersucht werden. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den verschiedenen PTP-SL Konstrukten transfiziert. Nach der Stimulation mit EGF wurde die Aktivierung der MAPKinasen mit Hilfe eines *in-vitro* Kinaseassays analysiert. Dazu wurde nach der Immunpräzipitation mit einem spezifischen Anti-ERK2-Antikörper die katalytische Aktivität von ERK2 an Hand der Phosphorylierung des exogenen Substrates MBP (myelin basic protein) bestimmt. Die bei der Kinasereaktion auf MBP übertragene radioaktive γ -[PO₄³⁻]-Gruppe von [γ -³²P]-ATP wurde nach SDS-PAGE autoradiographisch sichtbar gemacht. Abbildung 14A zeigt beispielhaft eine solche Autoradiographie, auf der die Phosphorylierung von MBP zu beobachten ist. Der Reblot auf ERK2 (Abb. 14B) zeigt, dass für diesen MAPKinase Assay annähernd gleiche Mengen von ERK2 präzipitiert wurden. Die Quantifizierung dieser Aktivitätsmessung ist als Balkendiagramm in Abbildung 15 zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Wildtyp der PTP-SL und die SA231 Mutante in der Lage waren, die Aktivierung von ERK2 nach EGF Stimulation zu reduzieren (um etwa 74% bzw. 78%). Hingegen war bei der SE231 Mutante, welche die Serinphosphorylierung nachahmt und ERK2 nicht mehr copräzipitieren kann, in etwa die gleiche Aktivierung wie bei den kontrolltransfizierten Zellen zu beobachten. Die katalytisch inaktive CS Mutante ließ im Vergleich zu Mock sogar eine fast doppelt so hohe Aktivierung von ERK2 nach EGF Stimulation zu (194%). Dieses Experiment zeigt, dass die Serinphosphorylierung in der KIM-Domäne von PTP-SL den inhibitorischen Einfluss der Phosphatase auf ihr Substrat ERK2 wesentlich verringert.

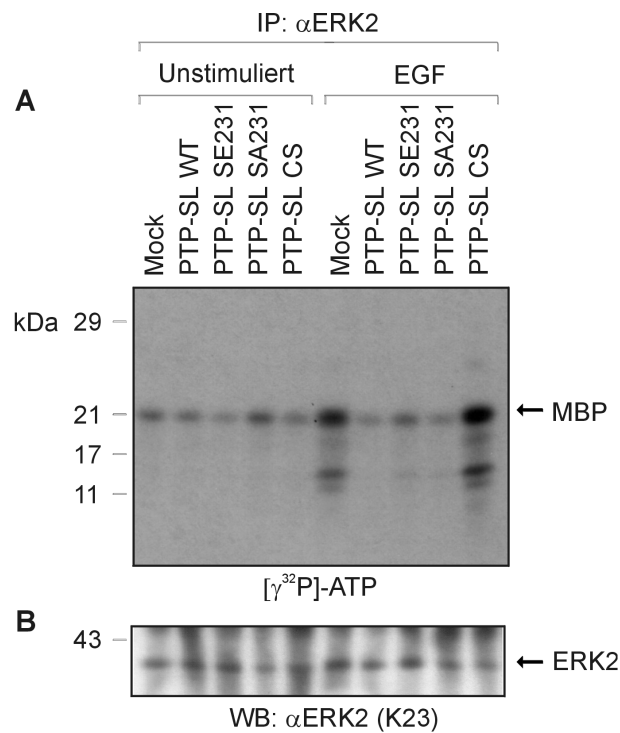


Abb. 14: Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 auf die PTP-SL vermittelte Inhibition der MAPKinase Aktivierung. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, 24h im Serum freien Medium kultiviert und wenn oben angegeben 7min mit 20ng/ml EGF stimuliert. **(A)** Nach der Zellyse wurde endogenes ERK2 mit polyklonalem Anti-ERK2-Antikörper (α ERK2) immunpräzipitiert und ein *in-vitro* Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt. Die Proteine wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Phosphoryliertes MBP wurde anschließend autoradiographisch sichtbar gemacht. **(B)** ERK2 wurde parallel dazu mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (α ERK2 (K23)) immundetektiert.

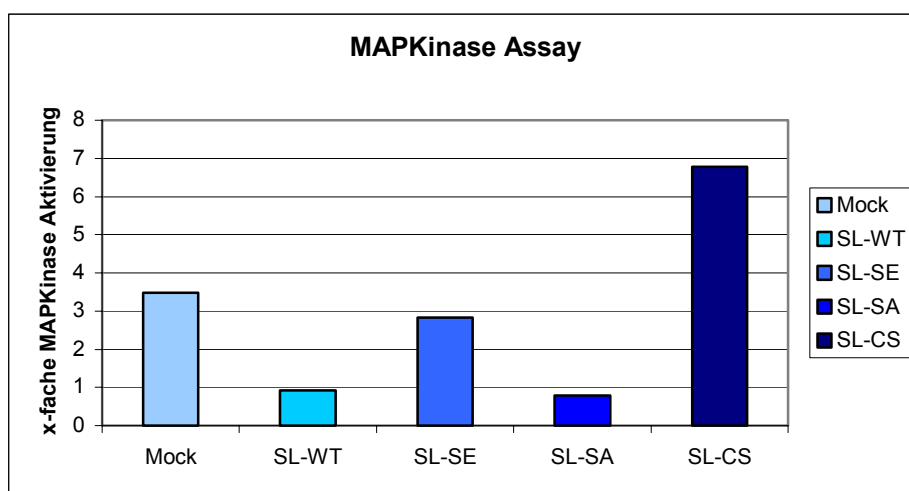


Abb. 15: Quantifizierung des MAPKinase Assays von Abbildung 14

3.3.2 Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 auf die Dephosphorylierung von ERK1/2

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, dass die PTP-SL SE231 Mutante eine höhere Aktivierung von ERK2 im Vergleich zum Wildtyp und der SA231 Mutante zulässt, sollte nun herausgefunden werden, ob sich dies auch im Grad der Dephosphorylierung von ERK2 durch PTP-SL widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurde ein Phosphatase Assay durchgeführt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den verschiedenen HA-PTP-SL Konstrukten transfiziert und nach der Zelllyse mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Zu diesen Präzipitaten wurde Lysat von nicht transfizierten HEK293 Zellen, welche zuvor zur Aktivierung der MAPKinasen mit EGF stimuliert worden waren, gegeben. Der Phosphotyrosin-Blot des Überstandes ist in Abbildung 16A dargestellt.

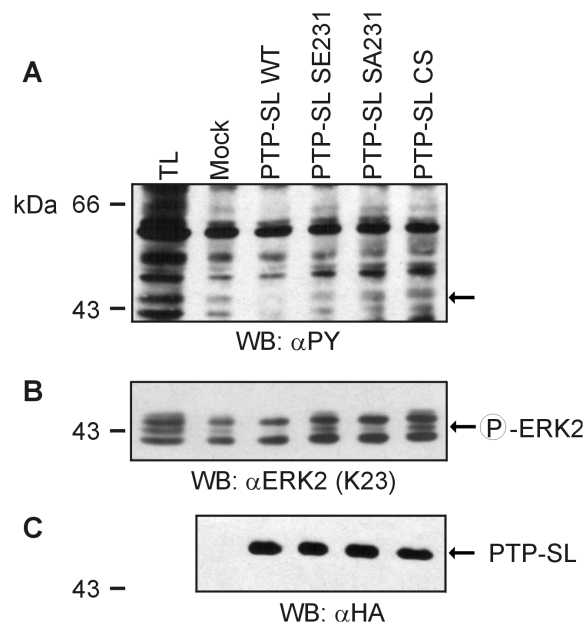


Abb. 16: Effekt der verschiedenen PTP-SL Mutanten auf die Phosphorylierung von ERK1/2. HEK293 Zellen wurden entweder mit Leervektor (Mock), mit pcDNA3-HA-PTP-SL WT oder mit den oben im Bild angegebenen Mutanten transfiziert, nach 48h lysiert und die entsprechenden PTP-SL Mutanten mit Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurde zu diesen Präzipitaten Lysat von mit 20ng/ml EGF (7min) stimulierten HEK293 Zellen gegeben und ein Phosphatase Assay durchgeführt. Die Proteine in Überstand (A) und Pellet (C) wurden jeweils in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. (A) Im Anschluss erfolgte eine Immunoblotanalyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (αPY). Tyrosinphosphorylierte ERK1/2 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Nach dem Entfernen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde ERK2 mit dem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper K23 (αERK2 (K23)) immundetektiert. (C) Die Expression der PTP-SL Konstrukte wurde im Immunoblot des Pellets mit Anti-HA-Antikörper (αHA) analysiert.

Der Wildtyp der Phosphatase rief im Vergleich zu Mock, PTP-SL SE231 und PTP-SL CS eine deutliche Verringerung der MAPK Phosphorylierung hervor. Auch die SA231 Mutante reduzierte die MAPK Phosphorylierung, jedoch nicht so stark wie dies beim Wildtyp der

Phosphatase der Fall war. Deutlicher wird dieser Unterschied im ERK2 Reblot (Abb. 16B). Die phosphorylierten Formen der MAPKs ERK1/2 laufen bei der Gelelektrophorese langsamer als die nicht phosphorylierten Formen, wodurch ein Bandensprung zustande kommt. Der stärkste MAPK Bandensprung trat bei der Durchführung des Phosphatase Assays mit der PTP-SL SE231 und der katalytisch inaktiven PTP-SL CS Mutante auf. Dies ließ auf eine Hemmung der Dephosphorylierung der MAPKinasen schließen. Zur Bestätigung des Einsatz gleicher Mengen an Phosphatase wurden die verschiedenen PTP-SL Konstrukte mit einem Anti-HA-Antikörper immunodetektiert (Abbildung 16C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die PKA vermittelte Serinphosphorylierung der PTP-SL das Enzym-Substrat-Verhalten der Phosphatase drastisch beeinflusst. Sie erlaubt letztendlich eine längere Aktivierung der MAPKinasen, da diese nun nicht mehr von der Phosphatase gebunden und dephosphoryliert werden können.

3.4 Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der PKA vermittelten PTP-SL/ERK1/2 Bindungsmodulation

Die MAPKinasen ERK1/2 werden durch eine Reihe verschiedener extrazellulärer Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, aktiviert (Marshall, 1995; Zwick-Wallasch, 1999). Aus diesem Grund sollte im folgenden Abschnitt der Frage nachgegangen werden, bei welchen biologischen Vorgängen die PKA vermittelte PTP-SL/ERK1/2 Bindungsmodulation eine Rolle spielt. Zusätzlich sollte untersucht werden, in welchen Signalwegen die PTP-SL als Negativregulator der MAPKinasen ERK1/2 fungiert. Als Zellsystem für diese Untersuchungen wurden PC12 Zellen gewählt, da hier bestimmte biologische Effekte auf die unterschiedliche Dauer der MAPKase Aktivierung zurückzuführen sind (Marshall, 1995).

3.4.1 Herstellung von stabil exprimierenden PC12 Zelllinien mit unterschiedlichen PTP-SL Konstrukten

Da die zuvor bestimmte Transfektionseffizienz (β -Gal Test) bei PC12 Zellen mit Lipofectamine® Plus nur bei etwa 30% lag (Daten nicht gezeigt), wurden zuerst stabile PC12 Zelllinien mit den verschiedenen PTP-SL Konstrukten hergestellt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum einen wurden die Zellen mit pcDNA3 Kontrollvektor, HA-PTP-SL Wildtyp, HA-PTP-SL SE231, HA-PTP-SL SA231 oder HA-PTP-SL CS transfiziert und anschließend mit Geneticin (G418) selektioniert. Zum anderen wurden die Zellen mit pLXSN Kontrollvektor, HA-PTP-SL Wildtyp, HA-PTP-SL SE231, HA-PTP-SL SA231 oder HA-PTP-SL CS viral infiziert und anschließend mit Geneticin (G418) selektioniert. Nachfolgend wurden jeweils einzelne Zellklone isoliert und weiterhin in Anwesenheit von Geneticin (G418) selektioniert. Um die so generierten monoklonalen

Zelllinien auf die Expression der verschiedenen PTP-SL Konstrukte zu testen, wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation gegen die HA-Markierung durchgeführt. Die positiven Klone wurden durch den Immunoblot mit einem monoklonalen HA-Antikörper identifiziert.

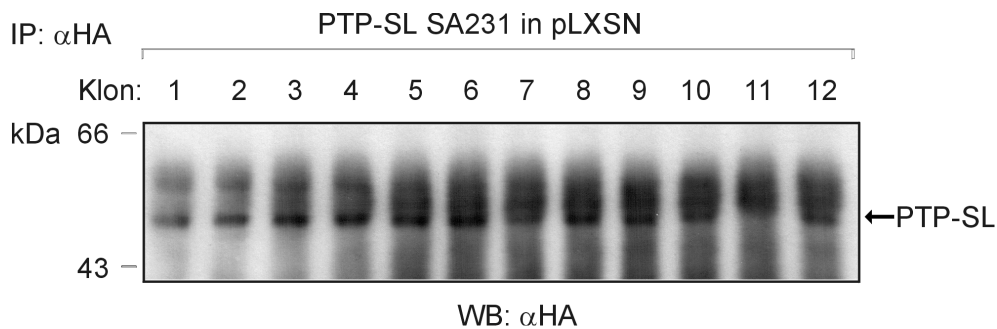


Abb. 17: Stabile Expression von PTP-SL SA231 (Vektor pLXSN) in PC12 Zellen. PC12 Zellen wurden mit PTP-SL SA231/pLXSN infiziert, mehrere Wochen mit G418 selektioniert und einzelne Klone isoliert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen lysiert und stabil exprimierte HA-PTP-SL SA231 mit einem monoklonalen Antikörper gegen die HA-Markierung immunpräzipitiert. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und nachfolgend mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) analysiert.

Die Abb. 17 zeigt repräsentativ für die PC12/pLXSN Zelllinien 12 Klone der HA-PTP-SL SA231 PC12 Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur der Klon 11 keine Expression zeigte. Bei allen anderen Klonen konnte die HA markierte PTP-SL nachgewiesen werden. Die Signalintensität war bei den positiven Klonen in etwa gleich. Dies ließ auf eine relativ einheitliche Expressionsstärke der PTP-SL/pLXSN Konstrukte schließen (Daten für HA-PTP-SL WT, HA-PTP-SL SE231 und HA-PTP-SL CS nicht gezeigt).

Ein etwas anderes Bild bietet sich bei der Betrachtung der PTP-SL/pcDNA3 Klone (Abb. 18).

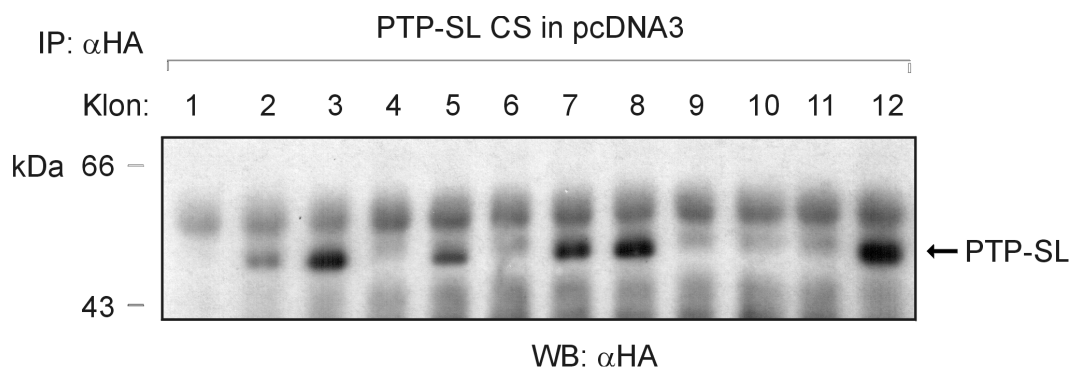


Abb. 18: Stabile Expression von PTP-SL CS (Vektor pcDNA3) in PC12 Zellen. PC12 Zellen wurden mit PTP-SL CS/pcDNA3 transfiziert, mehrere Wochen mit G418 selektioniert und einzelne Klone isoliert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen lysiert und stabil exprimierte HA-PTP-SL CS mit einem monoklonalen Antikörper gegen die HA-Markierung immunpräzipitiert. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und nachfolgend mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (α HA) analysiert.

Als Beispiel dienen hier die HA-PTP-SL CS Klone. Von den 12 Klonen waren nur 6 Klone positiv und diese unterschieden sich zusätzlich im Expressionsniveau. Auch für die anderen HA-PTP-SL/pcDNA3 Konstrukte wurden in gleicher Weise mehrere positive Klone identifiziert (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Experimente wurden die monoklonalen PTP-SL/pcDNA3 Zellen verwendet, da hier der CMV-Promoter des pcDNA3 Vektors höhere Kopienzahlen der PTP-SL Konstrukte ermöglicht. Diese stärkere Expression ließ konsistente Ergebnisse erwarten, da die Expression der endogenen PTP-SL überspielt wurde. Die Funktionalität der Phosphatase in den stabil exprimierenden PC12 Zelllinien wurde durch einen *in-vitro* Phosphatase Assay bestätigt.

3.4.2 Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL in verschiedenen Signalwegen

Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, in welchen Signalwegen die PTP-SL eine Rolle spielt. Zusätzlich wurde die Frage gestellt, in wieweit die Phosphorylierung des Serin 231 die regulatorischen Aufgaben der Phosphatase beeinflussen kann. Hierzu wurden die unter 3.4.1 generierten monoklonalen Mock, HA-PTP-SL Wildtyp und HA-PTP-SL SA231 PC12 Zelllinien verwendet. Diese wurden mit verschiedenen Liganden und Aktivatoren stimuliert. Vor der Stimulation wurden die Zellen 30min mit IBMX vorinkubiert. IBMX ist ein Phosphodiesterasehemmer und reduziert dadurch den Abbau von cAMP. Da cAMP für eine PKA Aktivierung essentiell ist, erhöht sich somit die Möglichkeit der Phosphorylierung der PTP-SL durch PKA.

3.4.2.1 *PTP-SL reduziert die ERK/MAPK Aktivierung nach Forskolin und aFGF Stimulation*

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL die Bindung zu den MAPKinasen ERK1 und ERK2 inhibiert. Dies konnte unter anderem *in-vivo* durch Stimulation von COS-7 Zellen und der darauffolgenden reduzierten Coimmunpräzipitation von ERK2 durch die PTP-SL nachgewiesen werden. Um Hinweise auf Signalwege, in denen die PTP-SL eine Rolle spielt, zu bekommen, sollte überprüft werden, in wieweit diese Bindungsmodulation auch in den stabilen HA-PTP-SL PC12 Zelllinien zu finden ist. Zu diesem Zweck wurden stabile Mock, HA-PTP-SL Wildtyp und HA-PTP-SL SA231 PC12 Zelllinien 30min mit IBMX vorinkubiert und anschließend 60min mit NGF, EGF, Forskolin oder FGF stimuliert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit DMSO durchgeführt, welches als Lösungsmittel für den Phosphodiesterasehemmer IBMX diente. Nach der Lyse der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit einem HA-Antikörper durchgeführt. Der Immunoblot (Abbildung 19A) erfolgte mit einem Antikörper gegen ERK2. Bei der Betrachtung der Abbildung 19A fallen als erstes die Signale von coimmunpräzipitierten ERK1/2 auf, die sich im Falle des HA-PTP-SL WT und der SA

anschließend mit TPA und Bradykinin für 60min stimuliert. Auch bei diesen beiden Stimuli konnte keine Reduktion der Coimmunpräzipitation der MAPK mit dem Wildtyp der HA-PTP-SL festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der Effekt der Phosphatase auf die ERK Phosphorylierung wurde wiederum im Totallysat untersucht. Der Immunoblot gegen phosphoryliertes ERK in Abb. 21A zeigt, dass die PTP-SL in der Lage ist, die Bradykinin vermittelte ERK Phosphorylierung zu reduzieren. Hierbei erscheint der Effekt der HA-PTP-SL SA231 Mutante ein wenig stärker zu sein als beim Wildtyp der PTP-SL. Somit könnte die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL hierbei eine Rolle spielen. Bei Stimulation mit TPA hingegen ist kein großer Unterschied im Bezug auf die ERK Phosphorylierung zu erkennen. Der Reblot mit einem pan-ERK Antikörper verdeutlicht den Einsatz gleicher Mengen an MAPKinase (Abb. 21B). Die gleichmäßige Expression der HA-PTP-SL Konstrukte wurde anhand einer Immunpräzipitation gegen die HA-Markierung und anschließendem Immunoblot nachgewiesen (Abb. 21C).

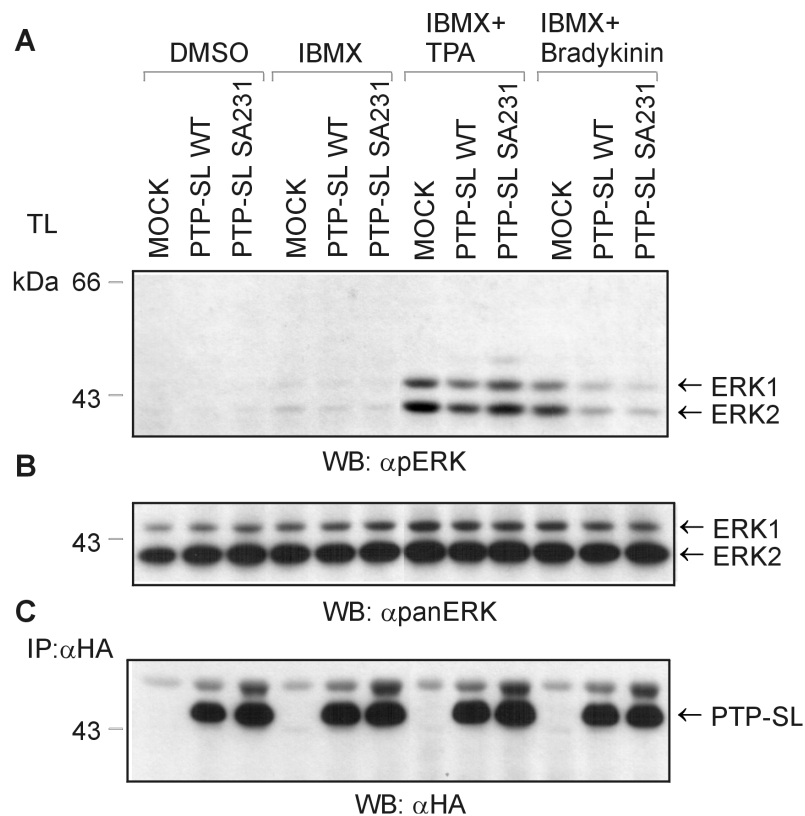


Abb. 21: Reduzierte ERK1/2 Phosphorylierung in stabilen PC12 Klonen nach Bradykinin Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT und PC12/PTP-SL SA231 Klone wurden 30min mit 1mM IBMX vorinkubiert und 60min mit 1μM TPA oder 5μM Bradykinin stimuliert. Nach der Zellyse wurden die Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. **(A)** Anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus von endogenem ERK2 mit dem polyklonalen Anti-PhosphoERK-Antikörper (αpERK) analysiert. **(B)** Nach Entfernen des Anti-PhosphoERK-Antikörpers wurde mit dem monoklonalen Anti-ERK2-Antikörper (αpanERK) immundetektiert. **(C)** Zur Kontrolle der Expression wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung der PTP-SL Konstrukte (αHA) durchgeführt und die aufgetrennten Proteine in einem Immunoblot mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper (αHA) sichtbar gemacht.

3.4.3 Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL bei der Zellproliferation

Da die MAPKinasen eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Zellen spielen (Fisher *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001), sollte nun überprüft werden, in wieweit die PTP-SL in der Lage ist, regulatorisch auf diesen physiologischen Prozess einzuwirken. Dazu wurde zum einen das Wachstum der bereits beschriebenen monoklonalen PC12 Zelllinien untersucht und zum anderen das Wachstum von transient transfizierten NIH-3T3 und CHO Zellen.

3.4.3.1 Untersuchung zum Wachstumsverhalten der monoklonalen PC12 Zelllinien

In diesem Experiment wurden die Zellen auf unbeschichteten (Plastik) oder zur besseren Zelladhäsion auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen ausgesät und 48 Stunden in serumhaltigem bzw. serumfreiem Medium kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics). Die so erhaltenen Daten sind im folgendem Balkendiagramm (Abb. 22) zusammengefasst.

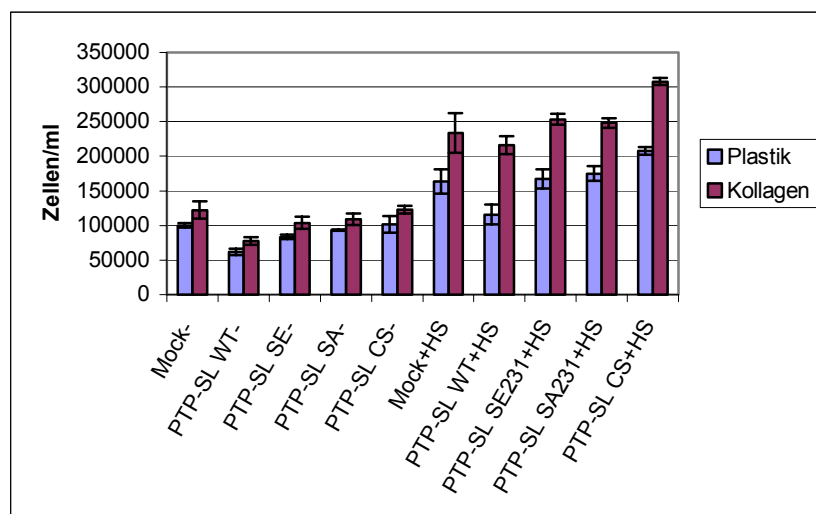


Abb. 22: Wachstumsverhalten der verschiedenen PC12 Klone auf Kollagen und Plastik. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden auf Kollagen oder Plastik beschichteten Kulturschalen ausgesät, 48h in normalen (+HS) oder serumreduziertem (-) Medium inkubiert und anschließend im Coulter Counter ausgezählt.

Aus dem Diagramm geht hervor, dass das Zellwachstum auf den unbeschichteten Kulturschalen bei allen HA-PTP-SL Konstrukten und unabhängig von der HS-Zugabe (Horse Serum) geringer war als bei den mit Kollagen beschichteten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die durch Kollagen aktivierten integrinabhängigen Signalwege einen Beitrag zur schnelleren Proliferation von PC12 Zellen leisten. Bei Wachstum in serumreduzierten

Medium verringerte der Wildtyp der PTP-SL die Wachstumsrate der Zellen auf Plastik und Kollagen im Vergleich zu den Mock Zellen um mehr als 30%. Die Mutanten der PTP-SL (SE231, SA231, CS) zeigten in etwa das gleiche Wachstum wie die Mock Zellen. Dies traf sowohl für das Wachstum auf unbeschichteten wie auch auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen zu. Bei der Proliferation im normalen Kulturmedium (10%HS/5%FCS) bot sich ein etwas anderes Bild. Beim Wachstum auf Plastik führte auch der Wildtyp der PTP-SL zur Reduktion des Wachstums (-29%). Diesmal zeigten jedoch zusätzlich die Zellen der CS Mutante der PTP-SL ein schnelleres Wachstum im Vergleich zu den Mock Zellen, so dass hier letztendlich 27% mehr Zellen gezählt wurden. Hingegen war bei den Zellen der SE231 und SA231 Mutanten der Phosphatase wiederum kein Unterschied zu Mock auszumachen. Die Proliferation auf Kollagen konnte weder vom Wildtyp noch von der SE231 und SA231 Mutante der PTP-SL beeinflusst werden. Die Expression der katalytisch inaktiven PTP-SL CS hingegen ermöglichte erneut ein schnelleres Wachstum der Zellen im Vergleich zu Mock (+32%). Somit bleibt als Ergebnis festzuhalten, dass die PTP-SL in der Lage ist das Wachstum unter suboptimalen Bedingungen (Plastik, serumreduziertes Medium) zu reduzieren. Die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL scheint hierbei keine Rolle zu spielen, da keine der beiden Serin Mutanten einen Effekt auf das Wachstum der Zellen ausübt.

3.4.3.2 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von transient transfizierten NIH-3T3 und CHO Zellen

Eine weitere Möglichkeit mitogene Antworten von Signaltransduktionswegen zu untersuchen, bietet der Thymidineinbau. Hierbei wird nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren radioaktiv markiertes Thymidin (^3H) zu den Zellen gegeben und diese nun noch weitere vier Stunden inkubiert. Das von den Zellen aufgenommene Thymidin wird im Verlauf der S-Phase des Zellzyklus in die sich replizierende DNA eingebaut. Die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin ist dabei ein Maß für das Zellwachstum. NIH-3T3 Zellen wurden mit Leervektor, HA-PTP-SL Wildtyp, HA-PTP-SL SE231, HA-PTP-SL SA231 und HA-PTP-SL CS transfiziert, stimuliert und anschließend der Thymidineinbau durchgeführt. Die gemessenen Werte für das Wachstum unter Hungerbedingungen waren bei den mit den verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen in etwa gleich hoch (Abb. 23). Dies stellte eine notwendige Voraussetzung für die Messung eines möglichen Effektes der PTP-SL auf das stimulierte Wachstum von NIH-3T3 dar.

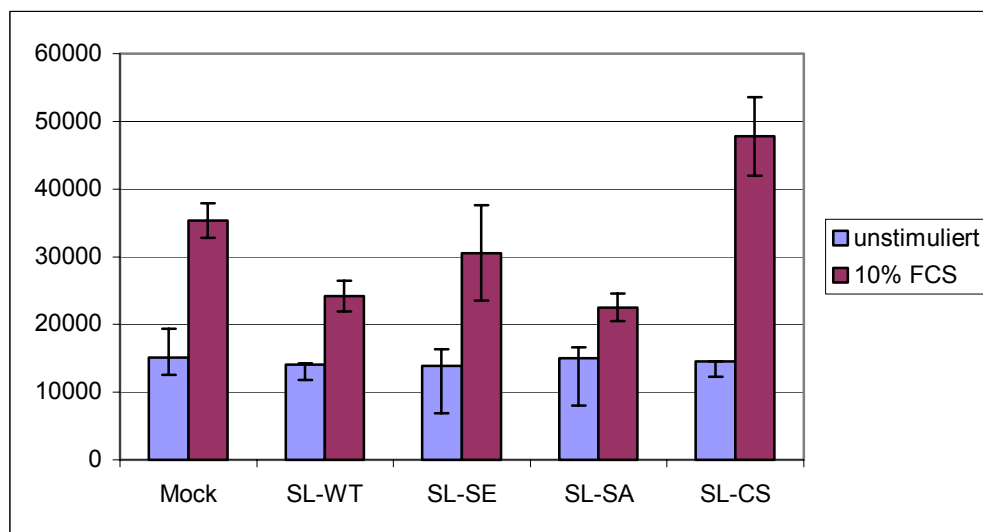


Abb. 23: Thymidineinbau in transient transfizierte NIH-3T3 Zellen. NIH-3T3 Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Mock), HA-PTP-SL Wildtyp, HA-PTP-SL SE231, HA-PTP-SL SA231 und HA-PTP-SL CS transfiziert und nach 48h die zuvor gehungerten Zellen teilweise stimuliert (unstimuliert/10%FCS). Anschließend wurden ein Thymidineinbau durchgeführt und die von den Zellen eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl der Wildtyp als auch die SA231 Mutante der PTP-SL im Vergleich zu Mock in der Lage waren, das FCS induzierte Wachstum der NIH-3T3 Zellen zu reduzieren (-32% bzw. -36%). Für die mit der SE231 Mutante transfizierten Zellen konnten im Vergleich zum Wildtyp und der SA231 Mutante tendenziell höhere Werte gemessen werden. Aufgrund der höheren Standardabweichung war aber kein signifikanter Unterschied auszumachen. Die mit der CS Mutante transfizierten Zellen zeigten eindeutig das meiste Wachstum. Die bei dieser Mutante gemessenen Werte für die eingebaute Radioaktivität lagen etwa 35% über denen der Mock transfizierten Zellen. Als Fazit dieses Experiment bleibt festzuhalten, dass die transiente Expression vom PTP-SL Wildtyp zur Reduktion des FCS stimulierten Wachstums von NIH-3T3 Zellen führte. Die CS Mutante erleichterte hingegen das Zellwachstum. Die Wiederholung des Experimentes in CHO Zellen bestätigte die in NIH-3T3 erhaltenen Daten (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Rolle der PTP-SL bei der hunger-induzierten Apoptose der monoklonalen PC12 Zellen

Das Kultivieren von PC12 Zellen in serumfreiem Medium induziert Apoptose und führt somit innerhalb weniger Tage zum Absterben der Zellen (Greene, 1978). Da für die MAPKinasen ERK1/2 eine anti-apoptotische Wirkung beschrieben ist (Kim *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 1995), stellte sich die Frage, ob die stabile Expression der PTP-SL einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der PC12 Zellen besitzt. Dazu wurden die verschiedenen HA-PTP-SL PC12 Zelllinien ausgesät und nach 24 Stunden durch Serumentzug Apoptose induziert. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammengefasst. Um die widersprüchlichen Daten besser wiedergeben zu können, wurden jeweils zwei Klone von jedem Konstrukt in das Diagramm aufgenommen.

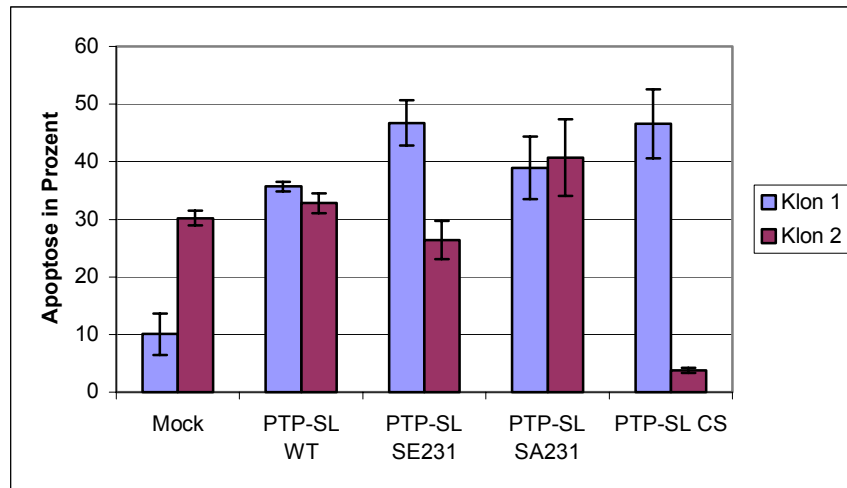


Abb. 24: Apoptoseverhalten von ausgewählten PC12 Klonen in 0% Hungermedium. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h durch Inkubation in serumfreiem Medium die Apoptose induziert. Nach 72h wurde die Zahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe einer FACS-Analyse quantifiziert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der prozentuale Anteil der Apoptose bei den beiden Mock Klonen sich klar um ca. 20% unterschied. Auch bei den beiden PTP-SL SE231 betrug die Differenz etwa 20%. Am größten war der Unterschied jedoch zwischen den PTP-SL CS Klonen. Bei diesen lag die Differenz sogar bei ca. 40%. Die beiden Klonpaare vom PTP-SL-WT und vom PTP-SL SA231 hingegen verhielten sich recht einheitlich. Somit lassen sich letztendlich nur die Apoptosewerte dieser beiden PTP-SL Konstrukte miteinander vergleichen. Die PTP-SL-WT Klone zeigten tendenziell weniger Apoptose als die PTP-SL SA231 Klone, wobei dieser geringe Unterschied jedoch nicht signifikant ist. Da die Werte für die PTP-SL SE231 Mutante so stark voneinander abwichen, lässt sich leider keine Aussage über einen Effekt der potentiellen Phosphorylierung des Serins 231 der PTP-SL machen. Ebenso bleibt unklar, ob die PTP-SL die Apoptose von PC12 Zellen beeinflussen kann, da wie bereits erwähnt kein Vergleich zu den Mock Zellen möglich war.

3.4.5 Bedeutung der PTP-SL im Adhäsionsverhalten der monoklonalen PC12 Zellen

Im Abschnitt 3.4.3.1 über das Wachstum der monoklonalen PC12 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die PTP-SL CS Mutante das schnellste Wachstum aufweist. Da bei der Proliferation von Zellen auch die Adhäsion eine Rolle spielt (Assoian and Schwartz, 2001), könnte sich das schnellere Wachstum in einem veränderten Adhäsionsverhalten widerspiegeln. Aus diesem Grund sollte im folgenden Abschnitt das Adhäsionsverhalten der verschiedenen monoklonalen PC12 Zelllinien untersucht werden. Den Zellen wurde 30min die Gelegenheit zur Adhäsion gegeben, anschließend wurde das Medium abgesaugt und die noch nicht adhärenierten Zellen durch einen Waschschrift beseitigt. Die Bestimmung der Anzahl der angehafteten Zellen erfolgte mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics).

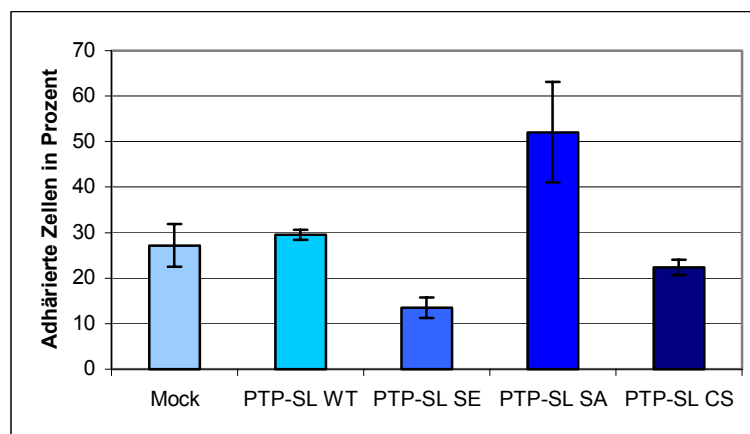


Abb. 25: Adhäsionsverhalten der monoklonalen PC12 Zellen. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 30 Minuten die Anzahl der adhärenierten Zellen mit Hilfe eines Coulter Counters bestimmt.

Dem Balkendiagramm in Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass die Zellen der PTP-SL SA231 Mutante das höchste Maß an Adhäsion zeigten. Im Mittel waren hier bereits ca. 50% der Zellen nach Ablauf der 30min adhäreniert. Am schwächsten war die Fähigkeit zur Adhäsion bei den Zellen der PTP-SL SE231 Mutante ausgeprägt (etwa 14%). Das schnelle Wachstum der Zellen der PTP-SL CS Mutante spiegelte sich hingegen nicht im Adhäsionsverhalten wider, da kaum ein Unterschied zu den Mock und PTP-SL WT Zellen bestand (22% im Vergleich zu 27% und 30%). Beachtenswert bleibt letztendlich der Unterschied zwischen den beiden Mutanten des Serin 231 der Phosphatase. Die PKA vermittelte Phosphorylierung des Serins 231 der PTP-SL scheint das Adhäsionsvermögen von PC12 Zellen zu vermindern.

3.4.6 Untersuchungen zum Einfluss der PTP-SL auf die Differenzierung der monoklonalen PC12 Zellen

Ein gut zu untersuchendes Merkmal von PC12 Zellen ist ihre Fähigkeit zur Differenzierung (Marshall, 1995). Diese lässt sich morphologisch anhand der Ausbildung von Neuriten nachweisen. Bei der Differenzierung der PC12 Zellen sind viele verschiedene Proteine beteiligt, unter anderem auch die MAPKinasen ERK1/2. Inhibition der MAPKinasen wirkt sich auch inhibitorisch auf den Prozess der Differenzierung aus (Levkovitz *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 1995). Die Dauer der MAPKinasen Aktivität scheint ebenfalls ein entscheidender Faktor bei der Differenzierung zu sein. EGF führt nur zu einer kurzzeitigen Aktivierung der MAPKinasen, wodurch keine Ausbildung von Neuriten erfolgt (Marshall, 1995; Traverse *et al.*, 1994). Nur in Verbindung mit den kollagen-induzierten Integrinsignalwegen stimuliert EGF die Neuritenausbildung (Ivankovic-Dikic *et al.*, 2000). NGF hingegen vermittelt eine langanhaltende Aktivierung der MAPKinasen und induziert dadurch das Neuritenwachstum (Marshall, 1995; Traverse *et al.*, 1994). Es stellt das bekannteste Differenzierungsagens für PC12 Zellen dar. Zudem führt die Stimulation von PC12 Zellen mit NGF zur Induktion der endogenen PC12-PTP1 Transkription, einem Rattenhomolog der PTP-SL (Sharma and Lombroso, 1995). In diesem Abschnitt sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die PTP-SL in der Lage ist, die Differenzierung von PC12 Zellen zu modulieren. Hierzu wurden die monoklonalen PC12 Zellen ausgesät, stimuliert und anschließend zur Bestimmung des prozentualen Anteils an differenzierten Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Die Abbildung 26 zeigt die Aufnahmen für die mit NGF stimulierten Zellen. Im Vergleich zum unstimulierten Zustand der verschiedenen Zelllinien induzierte NGF überall deutlich die Ausbildung von Neuriten. Zwischen den verschiedenen PC12 Zelllinien (Mock, PTP-SL WT, PTP-SL SE231, PTP-SL SA231 und PTP-SL CS) war kein wesentlicher Unterschied im Bezug auf die Neuritenausbildung zu erkennen.

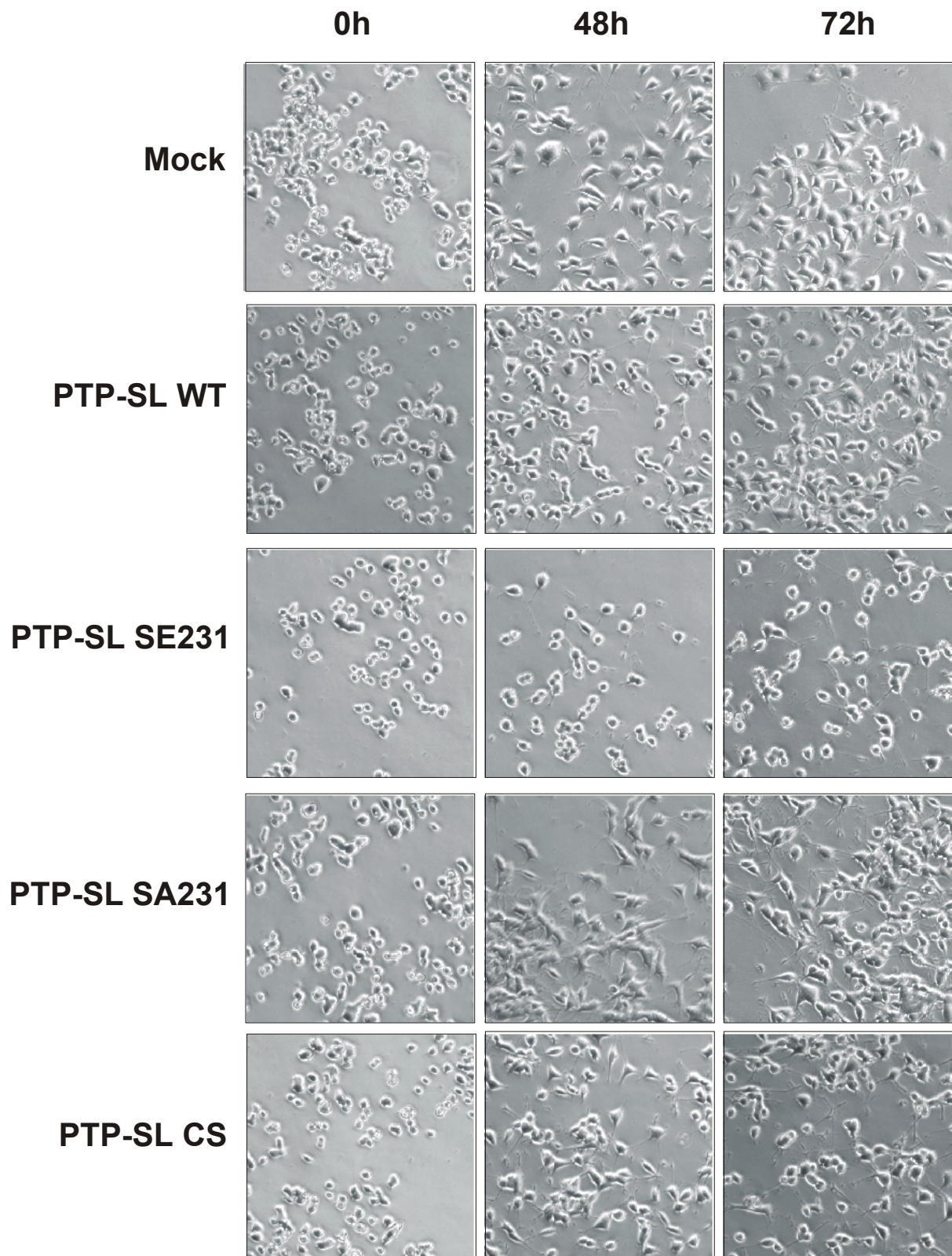


Abb. 26: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach NGF Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 50ng/ml NGF stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert.

Die Auswertung dieses Experimentes ist als Balkendiagramm in Abbildung 27 dargestellt. Nach 48 Stunden Stimulation mit NGF war im Vergleich zu den Mock Zellen unter Berücksichtigung der Fehlerbalken kein signifikanter Unterschied auszumachen. Stattdessen waren nur Tendenzen zu erkennen. So bildeten die Zellen der PTP-SL SE231 und SA231 Mutante weniger Neuriten aus als die Mock oder PTP-SL WT Zellen. Die Expression der PTP-SL CS Mutante hingegen schien die Ausbildung von Neuriten zu erleichtern. Ein anderes Bild ergab sich jedoch nach 72 Stunden NGF Stimulation. Während der prozentuale Anteil an Zellen mit Neuriten bei den Mock Zellen mit gut 30% und bei den Zellen mit der PTP-SL CS Mutante mit annähernd 50% in etwa gleich blieb, erhöhte sich dieser bei den PTP-SL WT, SE231 und SA231 Zellen. Bei den PTP-SL WT Zellen stieg die Anzahl der neuritentragenden Zellen um gute 10%, während sich der Prozentsatz bei der SE231 und SA231 Mutante sogar zum Teil mehr als verdoppelte (von 28% auf 55% bzw. von 26% auf 62%). Dies bedeutet, dass die Zellen der PTP-SL SA231 Mutante nach 48 Stunden NGF Stimulation tendenziell die geringste Anzahl an neuritentragenden Zellen aufweist, nach 72 Stunden hingegen die höchste Anzahl.

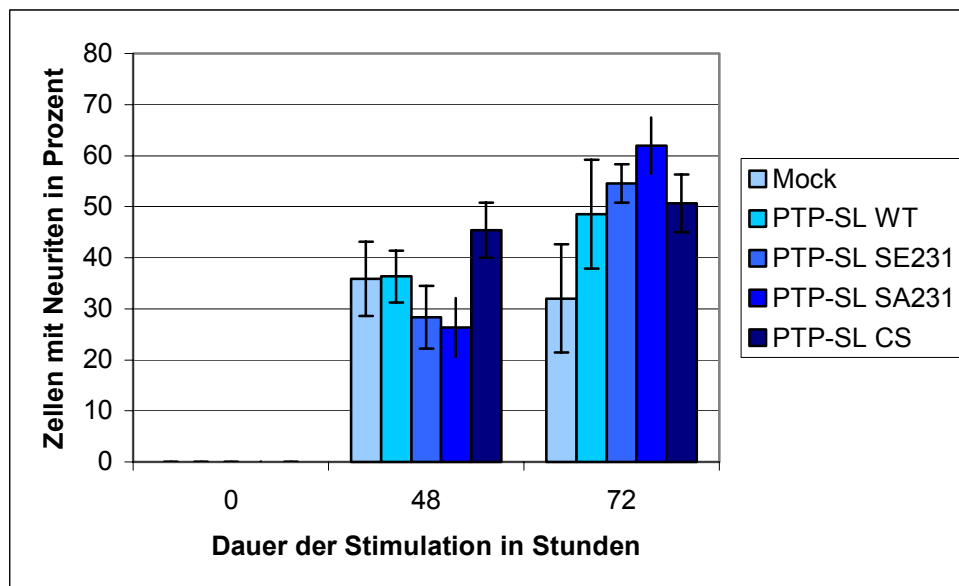


Abb. 27: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach NGF Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 50ng/ml NGF stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert und der Prozentsatz an Zellen mit Neuriten anhand dieser Bilder bestimmt.

Wie zuvor erwähnt, ist auch EGF in der Lage das Wachstum von Neuriten zu induzieren, sofern die Zellen auf Kollagen wachsen und somit die integrinabhängigen Signalwege zusätzlich zu einer Aktivierung der MAPKinasen beitragen (Ivankovic-Dikic *et al.*, 2000). Die Abbildung 28 zeigt Bilder der mit EGF stimulierten Zellen. Bei der Betrachtung fällt auf, dass hier weniger Neuriten im Vergleich zur NGF Stimulation ausgebildet wurden.

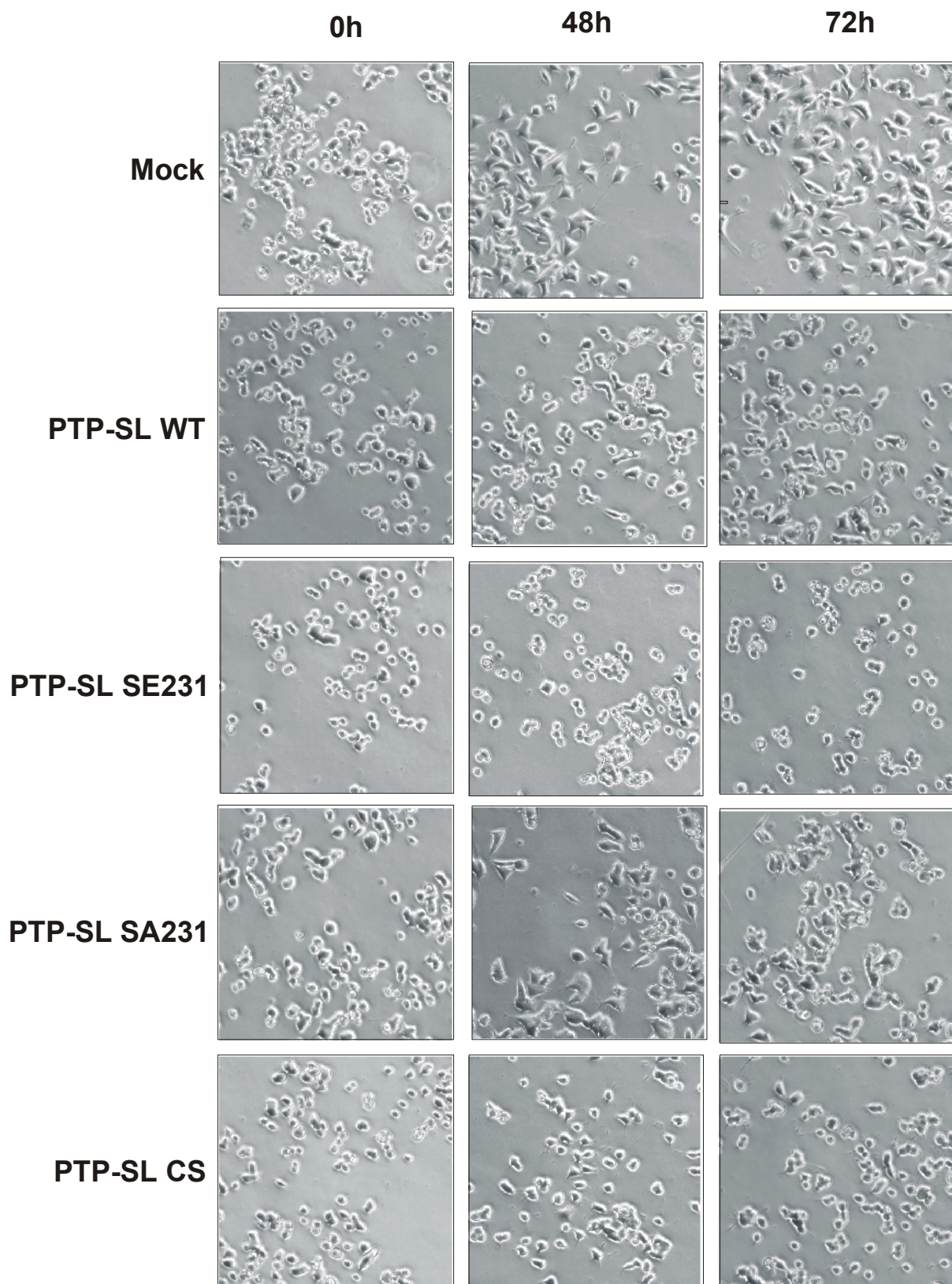


Abb. 28: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach EGF Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 20ng/ml EGF stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert.

Deutlicher macht dies der Blick auf das entsprechende Balkendiagramm (Abb. 29). Ebenso ist sofort ersichtlich, dass im Gegensatz zur NGF Stimulation kaum Schwankungen im Bezug auf den prozentualen Anteil an neuritenträgenden Zellen zwischen 48 und 72 Stunden Stimulation vorhanden sind. Nur für die PTP-SL SA231 Zellen war diesbezüglich im Mittel eine Abnahme von 14% auf 6% nachzuweisen. Zudem konnte im Vergleich zu den Mock Zellen eine deutliche Reduktion der Neuritenbildung nach 48 bzw. 72 Stunden bei den PTP-SL SE231 und SA231 Zellen beobachtet werden. Nach 72 Stunden EGF Stimulation zeigten nur noch 6% dieser Zellen Neuriten, im Vergleich zu 26% bei den Mock Zellen. Auch der WT der PTP-SL war in der Lage die Neuritenbildung zu beeinflussen. Nach 72 Stunden bildeten nur noch 13% dieser Zellen Neuriten aus. Im Vergleich zu den Mock Zellen bewirkte somit die Expression des PTP-SL WT eine 50%ige Abnahme der Neuritenausbildung. Die PTP-SL CS Zelllinie lag im Mittel mit gut 20% an neuritenträgenden Zellen nur geringfügig unter den Werten der Mock Zellen. Somit könnte die katalytische Aktivität der PTP-SL einen Einfluss auf die Ausbildung von Neuriten ausüben. Die Phosphorylierung des Serin 231 hingegen scheint hierbei keine Rolle zu spielen.

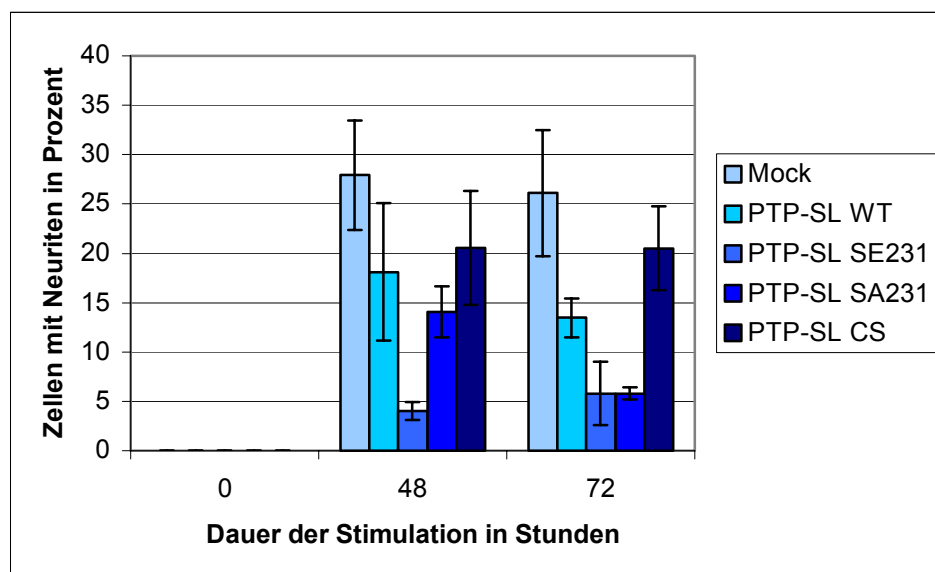


Abb. 29: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach EGF Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 20ng/ml EGF stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert und der Prozentsatz an Zellen mit Neuriten anhand dieser Bilder bestimmt.

Die Auswirkungen der PTP-SL auf das cAMP induzierte Neuritenwachstum wurde in gleicher Weise untersucht. Die entsprechenden Zellfotos sind in Abbildung 30 zu sehen.

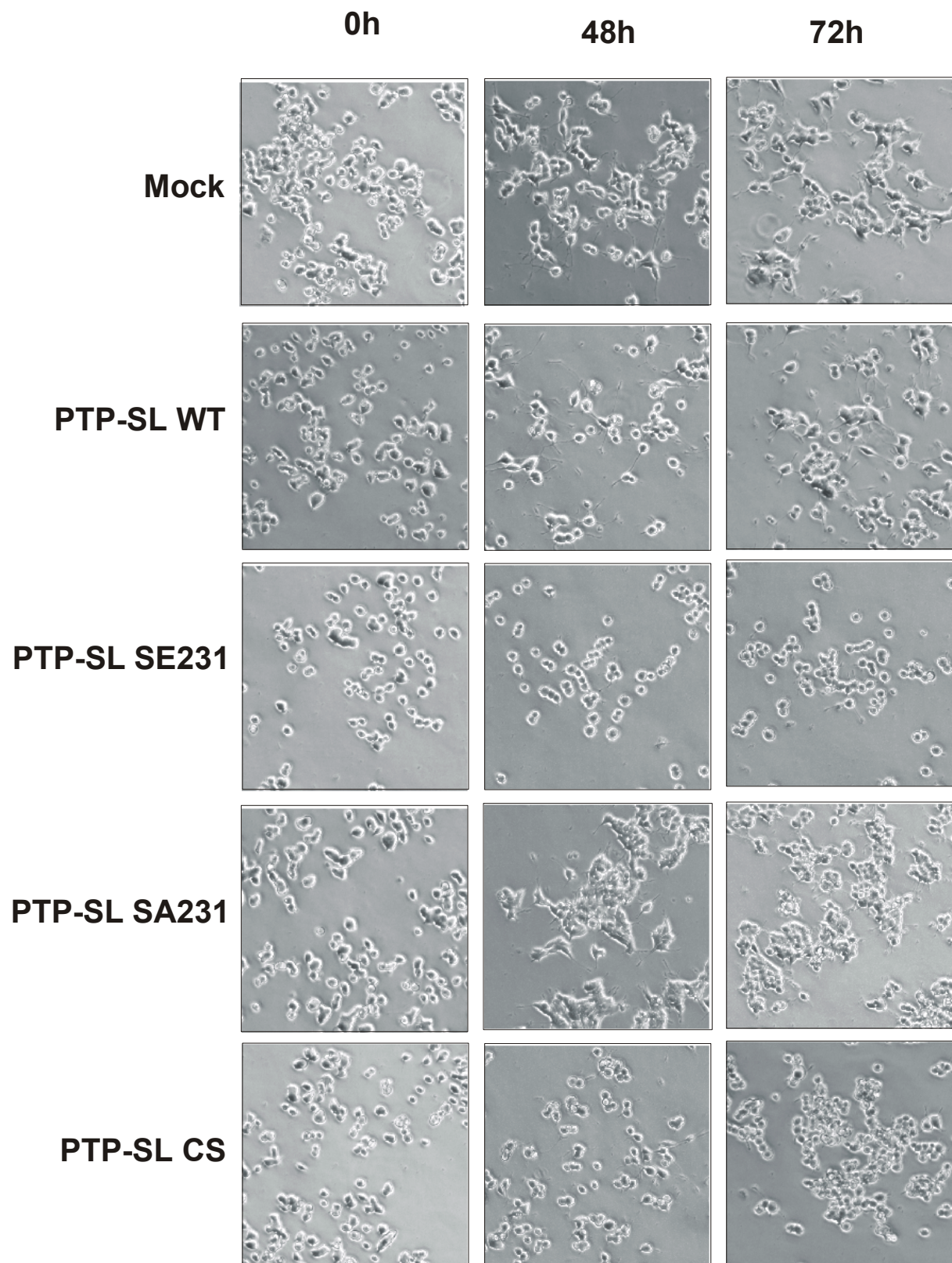


Abb. 30: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach Forskolin Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert

Auffällig war hierbei die Ausbildung von Zellaggregaten nach Forskolin Stimulation bei den Zellen der PTP-SL SA231. Dies war sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden Stimulation zu beobachten. Interessanterweise fanden sich nach 72 stündiger Stimulationsdauer auch bei den Zellen der CS Mutante solche Zellaggregate. Bezüglich der Ausbildung von Neuriten konnten hier wieder größere Unterschiede zwischen 48 und 72 Stunden Stimulation beobachtet werden.

Die Unterschiede sind im Balkendiagramm (Abb. 31) deutlicher zu erkennen. So zeigten knapp 40% der Mock Zellen nach 48 Stunden die Ausbildung von Neuriten, womit dieser Wert ca. in der Größenordnung der vorherigen beiden Stimuli liegt. Nach 72 Stunden besaßen bei diesen Zellen jedoch nur noch 16% aller Zellen Neuriten. Somit ging die Zahl der Zellfortsätze um die Hälfte zurück. Hingegen blieb der prozentuale Anteil an Zellen mit Neuriten bei den PTP-SL WT Zellen bei beiden Zeitpunkten mit einem hohen Wert von ca. 50% relativ konstant. Somit zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Mock und den WT Zellen nach 72 Stunden Forskolin Stimulation ab. Zu diesem Zeitpunkt zeigten über 30% mehr WT Zellen Neuriten als die Mock Zellen. Während die PTP-SL CS Zellen bei den vorherigen beiden Stimuli annähernd gleiche oder höhere Prozentanteile neuritentragender Zellen aufwiesen, bietet sich bei der Behandlung mit Forskolin ein etwas anderes Bild. Nach 48 Stunden Stimulation mit Forskolin konnten nur bei etwa 21% der Zellen Neuriten gezählt werden. Das sind fast 50% weniger als bei den Mock Zellen. Dieser Prozentsatz verringerte sich auf 37% nach 72 Stunden Forskolin Stimulation. Die Verringerung der Anzahl neuritentragender Zellen ist auch bei Expression der PTP-SL SA231 zu beobachten. So fiel der Prozentsatz von 31% bei 48 Stunden auf 15% bei 72 Stunden Stimulation. Die Werte für die Zellen der PTP-SL SE231 Mutante blieben in etwa gleich (8% bzw. 12%).

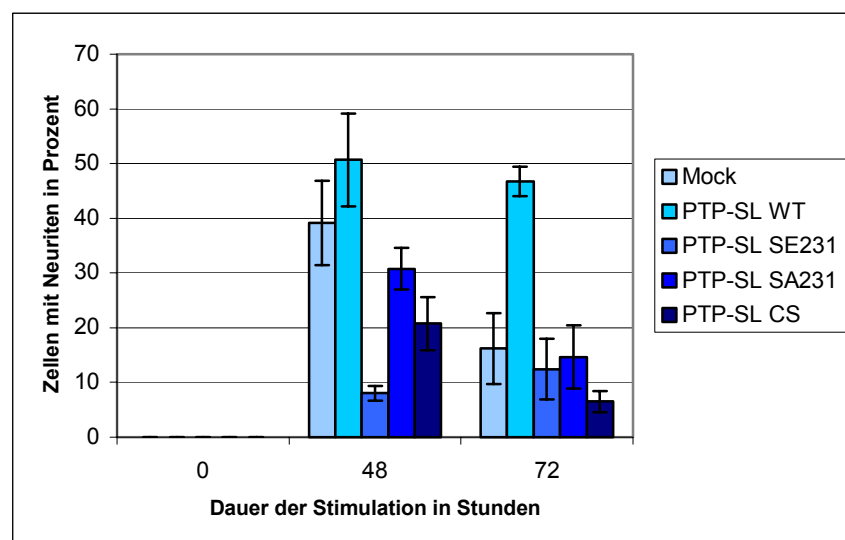


Abb. 31: Effekt von PTP-SL auf das Neuritenwachstum nach Forskolin Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert und der Prozentsatz an Zellen mit Neuriten anhand dieser Bilder bestimmt.

Letztendlich bleiben somit zwei deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen PC12 Zelllinien. Nach 48 Stunden zeigten die Zellen der PTP-SL SE231 Mutante eindeutig die wenigsten Zellfortsätze und nach 72 Stunden konnten für die WT Zellen eindeutig am meisten neuritentragende Zellen gezählt werden.

Diese Ergebnisse spiegeln jedoch kein eindeutiges Bild der Rolle der PTP-SL in der PC12 Differenzierung wider, da in anderen Experimenten mit dem selben Stimuli komplett gegensätzliche Ergebnisse erarbeitet wurden (Daten nicht gezeigt). Während in dem eben beschriebenen Experiment die Zellen der PTP-SL SA231 Mutante den geringsten Einfluss auf das NGF induzierte Neuritenwachstum nach 72 Stunden Stimulation zeigte, so war das Gegenteil bei anderen Experimenten der Fall (Daten nicht gezeigt). Zur Verdeutlichung dieser Problematik ist in Abbildung 32 der Vergleich von drei Unterschiedlichen Mock Klonen dargestellt.

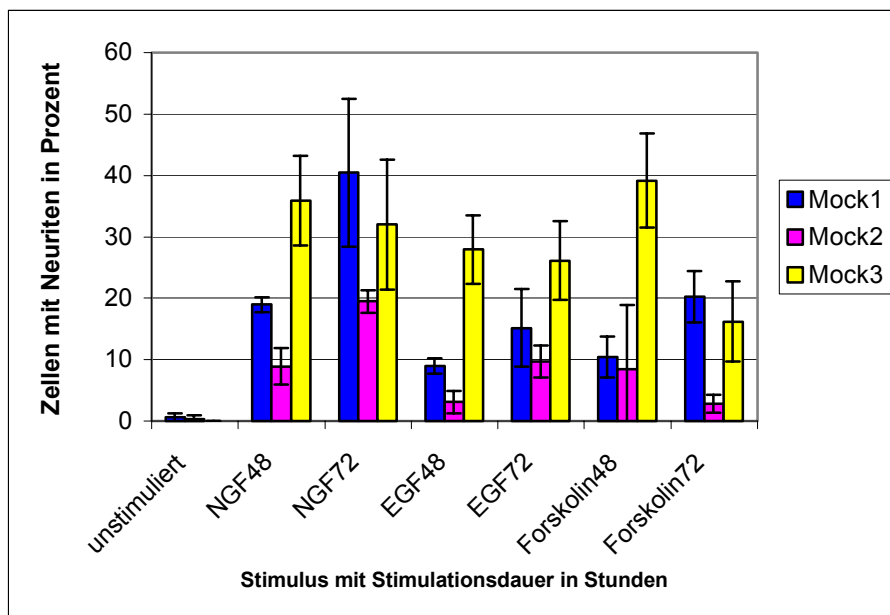


Abb. 32: Vergleich von Neuritenwachstum verschiedener Klone nach unterschiedlicher Stimulation. PC12/pcDNA3 (Mock) Klone wurden ausgesät und nach 24h mit 50ng/ml NGF, 20ng/ml EGF oder 10 μ M Forskolin stimuliert. Das Neuritenwachstum wurde unstimuliert (0h), nach 48h und 72h fotografisch dokumentiert und der Prozentsatz an Zellen mit Neuriten anhand dieser Bilder bestimmt.

Das Diagramm zeigt eindeutig, dass sich die einzelnen Klone im Bezug auf die Fähigkeit zur Neuritenausbildung deutlich unterscheiden. Da somit die Schwankungen bei den Referenzzellen schon sehr groß sind, konnten natürlich auch keine einheitlichen Effekte der Phosphatase auf die Differenzierung nachgewiesen werden.

3.4.7 PTP-SL reduziert die Bradykinin induzierte c-fos Transkription

Im Abschnitt 3.4.4.2 konnte gezeigt werden, dass die PTP-SL in der Lage ist, die Bradykinin vermittelte Aktivierung der ERK/MAPKinasen zu reduzieren. Die Aktivierung dieser Kinasen ist jedoch ein wichtiger Schritt für die Induktion von sogenannten „immediate-early“ Genen wie c-fos und c-jun, deren Aktivität zur Zellproliferation und zum Eintritt von Zellen in die S-Phase beiträgt (Pagés *et al.*, 1993). Da Bradykinin die c-fos Transkription induzieren kann (Zwick, 1999), sollte im folgenden Experiment analysiert werden, inwieweit die PTP-SL diesen Signalweg beeinflussen kann. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor beschrieben ausgesät, 24 Stunden gehungert und darauffolgend 60min mit Bradykinin stimuliert. Anschließend wurde aus den Zellen die zytoplasmatische RNA präpariert und aus dieser die cDNA hergestellt. Die Analyse der c-fos Induktion erfolgte mittels „real-time“ PCR, wobei Cyclophylin A als Kontrolle diente. Abbildung 33 zeigt die Auswertung dieses Experimentes als Balkendiagramm.

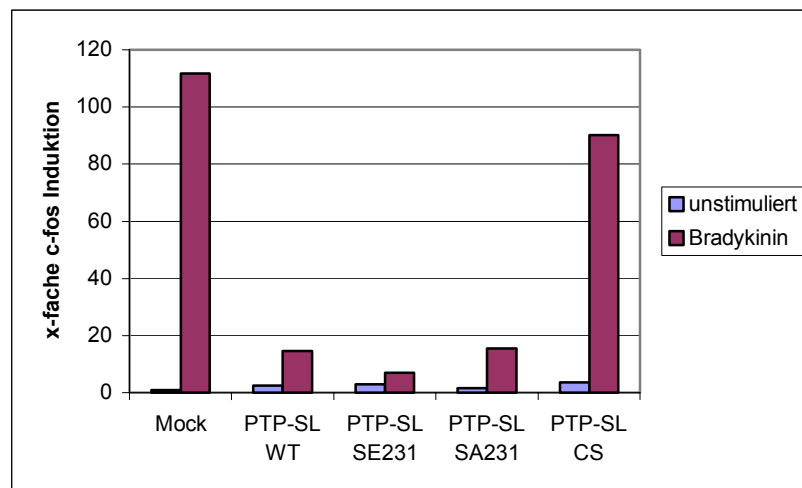


Abb. 33: PTP-SL reduziert die Bradykinin induzierte c-fos Transkription. PC12/pcDNA3 (Mock), PC12/PTP-SL WT, PC12/PTP-SL SE231, PC12/PTP-SL SA231 und PC12/PTP-SL CS Klone wurden 24h gehungert und anschließend 60min mit 1 μ M Bradykinin stimuliert. Nach der Zelllyse wurde die zytoplasmatische RNA extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels „real-time“ PCR analysiert.

Es ist klar zu erkennen, dass der Wildtyp der PTP-SL als auch die ebenfalls katalytisch aktiven SE231 und SA231 Mutanten die c-fos Transkription reduzieren konnten (-87%, -94% bzw. -86%). Zwar führte auch die Expression der PTP-SL CS Mutante zu einer gewissen Reduktion der c-fos Transkriptionsinduktion, doch diese fällt mit etwa 20% im Vergleich zu den anderen Phosphatase Konstrukten relativ gering aus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zuvor nachgewiesene Reduktion der Bradykinin induzierten ERK/MAPKase Aktivierung sich auch in einer deutlichen Verringerung der c-fos Transkription widerspiegelt.

4 Diskussion

Die Familie der MAPKinasen spielt in der zellulären Signaltransduktion eine große Rolle. Aktivierung der MAPKinasen führt unter anderem zur Proliferation, Differenzierung oder Apoptose (Ip and Davis, 1998; Marshall, 1995). Die MAPKinasen ERK1 und ERK2 können durch eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aktiviert werden und sind somit in so unterschiedlichen zellulären Antworten wie Proliferation und Differenzierung involviert (Cobb *et al.*, 1991; Cobb and Goldsmith, 1995; Cobb *et al.*, 1996; Davis, 1993). Um die Spezifität unterschiedlicher Stimuli zu gewährleisten, ist eine genaue Regulation des MAPKinase Signalweges notwendig. Diese wird erreicht durch funktionelle Interaktionen mit Regulator- und Effektorproteinen, wie Rezeptoren, GTP bindende Proteine, Adapterproteine, Kinasen und Phosphatasen (Robinson and Cobb, 1997; Whitmarsh and Davis, 1998). Vermittelt werden diese Interaktionen durch spezifische Bindungsmotive, wobei dieselbe Bindestelle in einem Protein sowohl von Substraten und Aktivatoren als auch von Regulatoren benutzt werden kann (Tanoue *et al.*, 2000). Für die Bindung der PTP-SL an die MAPKinasen ERK1/2 ist die sogenannte KIM-Domäne (Kinase-Interaktions-Motiv) verantwortlich (Pulido *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit die PTP-SL in der Lage ist den ERK/MAPKinase Signalweg zu beeinflussen. Hierbei lag das Augenmerk besonders auf der Modulation der Bindung zwischen der PTP-SL und den ERK/MAPKinasen und deren Auswirkungen auf die MAPKinase Aktivität.

4.1 PTP-SL assoziiert mit den MAPKinasen ERK1/2

Wie oben bereits erwähnt, wird die Spezifität des MAPKinase Signalweges durch Assoziation mit Regulator- und Effektorproteinen erzielt (Robinson and Cobb, 1997; Whitmarsh and Davis, 1998). So konnte für ERK2 demonstriert werden, dass eine einzige Bindestelle (CD-Domäne) verantwortlich ist für die Interaktion mit dem Aktivator MEK1 (MAPK Kinase), dem Substrat MNK1 (MAPK-activated Protein Kinase) und dem Regulator MKP3 (MAPK Phosphatase) (Tanoue *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die PTP-SL mit den MAPKinasen ERK1/2 assoziieren kann (siehe 3.1). Dies steht im Einklang mit Daten von Zuniga *et al.*, in denen die Interaktion von PTP-SL mit ERK1/2 und p38/HOG beschrieben wird. Hingegen konnte keine Bindung an die JNK/MAPKinasen festgestellt werden (Zuniga *et al.*, 1999). Die Assoziation der PTP-SL mit p38 konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die PTP-SL gehört zusammen mit der STEP und der HE-PTP/LC-PTP zu einer Familie von Phosphatasen deren charakteristisches Merkmal die KIM-Domäne darstellt (Szedlacsek *et al.*, 2001). Dieser besondere Bereich der Phosphatasen ist entscheidend für die Bindung an die MAPKinasen

(Pulido *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 1999). Die KIM-Domäne besteht aus 16 Aminosäuren. Innerhalb der KIM-Domäne befinden sich zwei Argininreste (AS 228 und 229). Die Mutation dieser beiden Aminosäuren bewirkt eine deutliche Reduktion der Bindung zwischen der PTP-SL und ERK1/2 (Zuniga *et al.*, 1999). Interessanterweise tritt derselbe Effekt bei MKP3 und MNK1 auf. Die Mutation der Argininreste in der für die Bindung an ERK2 beteiligten Region führt auch hier zu einem Verlust der Interaktion (Tanoue *et al.*, 2000). Da diese beiden Proteine an die CD-Domäne von ERK2 binden, besteht somit die Möglichkeit, dass auch die PTP-SL in dieser Region an ERK2 bindet. Entscheidend für die Bindungskapazität der ERK2 CD-Domäne sind zwei Aspartatreste. Die Mutation dieser Aspartatreste führt zum Verlust der Bindung mit MKP3 und MNK1 (Tanoue *et al.*, 2000). Somit scheint es sich hier um eine ionische Bindung zu handeln, bei der die negativen Ladungen auf der Seite von ERK2 und die positiven Ladungen auf der Seite des andockenden Proteins liegen.

4.2 PKA inhibiert die Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2 durch Phosphorylierung des Serin 231 in der KIM-Domäne der Phosphatase

Die für die Bindung der PTP-SL wichtige KIM-Domäne enthält eine potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle (RRXS).

KIM-Domäne (AS 224-239): GLQERRGSNVSLTLDM

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die PKA in der Lage ist, die PTP-SL spezifisch innerhalb der KIM-Domäne zu phosphorylieren (siehe 3.2.1). Durch die Phosphorylierung wird die Bindung zwischen der PTP-SL und ERK2 inhibiert (siehe 3.2.2). Die Inhibition wird durch die, im Rahmen der Phosphorylierung eingebrachten, negativen Ladungen der Phosphatgruppe erzeugt. Wie zuvor (siehe 4.1) schon beschrieben, sind die Ladungsverhältnisse enorm wichtig für die Bindung zwischen der PTP-SL und ERK2. Der bindende Bereich der Phosphatase ist normalerweise positiv geladen und der Bereich der Kinase negativ. Durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppe hingegen könnten die positiven Ladungen der Phosphatase quasi maskiert werden. Somit wäre keine ionische Bindung zur MAPKinase mehr möglich. Durch Mutationsstudien konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Einführung einer negativen Ladung allein noch nicht zur Inhibition der Bindung ausreicht, sondern die Position innerhalb der KIM-Domäne auch noch einen entscheidenden Faktor darstellt. Mit Hilfe von Glutamatmutanten wurde die Phosphorylierung innerhalb der KIM-Domäne nachgeahmt. Dabei zeigte sich, dass nur die Glutamatmutante des Serin 231 zum Verlust der Bindung führt, nicht jedoch die Mutante des Serin 234 (siehe 3.2.3). Hierbei ist anzumerken, dass nur das Serin 231 innerhalb der PKA-Erkennungssequenz liegt. Die in dieser Arbeit festgestellte Hyperphosphorylierung des

Wildtyps und der CS Mutante der PTP-SL, nicht jedoch der SE231 und SA231 Mutante, lassen den Schluss zu, dass auch *in-vivo* nur das Serin 231 durch PKA phosphoryliert wird. Diese Ergebnisse werden durch Daten von Zuniga *et al.* und Blanco-Aparicio *et al.* bestätigt, welche zeitgleich zu dieser Arbeit veröffentlicht wurden (Blanco-Aparicio *et al.*, 1999; Zuniga *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung innerhalb der KIM-Domäne durch PKA ist auch für die Phosphatasen STEP und He-PTP nachgewiesen worden. Für die He-PTP konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls die Inhibition der Bindung zu den MAPKinasen festgestellt werden, während für die Phosphatase STEP diesbezüglich keine Untersuchungen vorliegen (Paul *et al.*, 2000; Saxena *et al.*, 1999). Somit scheint es sich bei der PKA vermittelten Phosphorylierung der KIM-Domäne um einen generellen Mechanismus zur Regulation von Proteininteraktionen zu handeln.

4.3 Die Phosphorylierung des Serin 231 führt zu einem veränderten Enzym-Substrat-Verhalten der PTP-SL

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL durch PKA den Verlust der spezifischen Substraterkennung zur Folge hat. Die SE231 Mutante der PTP-SL war im Gegensatz zur SA231 Mutante und zum Wildtyp nicht in der Lage, die EGF vermittelte ERK2 Aktivierung zu inhibieren (siehe 3.3). Gegenüber dem unspezifischen Substrat pNPP konnten hingegen keine Änderungen der Phosphataseaktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit läuft die Regulation der Phosphataseaktivität von PTP-SL gegenüber den MAPKinasen nicht über eine Inhibition der Aktivität, sondern über die Modulation der Substraterkennung. Diese Ergebnisse stehen erneut im Einklang mit den zeitgleich ermittelten Daten von Blanco-Aparicio *et al.* (1999), welche zur Durchführung ihrer Phosphatase Assays GST-Fusionsproteine der PTP-SL verwendeten. Auch für die verwandte Phosphatase He-PTP konnte die Modulation der Bindung an die MAPKinasen durch die PKA vermittelte Phosphorylierung innerhalb der KIM-Domäne gezeigt werden (Saxena *et al.*, 1999). Die Bedeutung der Bindung an die MAPKinasen für deren Regulation wird zusätzlich aus Daten über die dualspezifische Phosphatase MKP3 deutlich. Bei dieser Phosphatase erhöht sich die katalytische Aktivität durch die Interaktion mit ERK2 (Camps *et al.*, 1998). Diese bindungsinduzierte Aktivitätsregelung konnte jedoch für die PTP-SL nicht nachgewiesen werden (Zuniga *et al.*, 1999). Dass allein die Bindung an die ERK2 ein wichtiger regulatorischer Aspekt sein kann, zeigt ein Blick auf die Kerntranslokation von ERK2. Nach Aktivierung von ERK1/2 durch mitogen oder differenzierend wirkende Stimuli translozieren diese Kinasen in den Kern, wo sie ihre Substrate, wie zum Beispiel Elk1, phosphorylieren (Brunet *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand *et al.*, 1993; Seth *et al.*, 1992). Zuniga *et al.* konnten nachweisen, dass die PTP-SL in der Lage ist ERK2 im Zytosol zurückzuhalten und somit die Kerntranslokation zu inhibieren. Hierfür ist die KIM-Domäne entscheidend und nicht die katalytische Aktivität, da eine entsprechende

KIM-Deletionsmutante die Wanderung von ERK2 in den Kern nicht beeinflussen konnte, während die PTP-SL CS Mutante den selben Effekt wie der Wildtyp zeigt (Zuniga *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL durch PKA hingegen gewährleistet die Translokation von ERK2 in den Nukleus, so dass diesbezüglich der PKA eine wichtige regulatorische Funktion zugeordnet werden kann (Blanco-Aparicio *et al.*, 1999). Interessanterweise ist auch die Phosphatase MKP3 in der Lage, ERK1 und ERK2 im Zytosol zurückzuhalten und somit deren Eintritt in den Kern zu verhindern (Brunet *et al.*, 1999). Folglich scheinen verschiedene Negativregulatoren der MAPKinasen einen ähnlichen Mechanismus zur Verhinderung der ERK1/2 Kerntranslokation zu benutzen.

4.4 Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der PKA vermittelten PTP-SL/ERK1/2 Bindungsmodulation

Die neuronale Zelllinie PC12 eignet sich hervorragend, um die Auswirkungen der PKA vermittelten Phosphorylierung der PTP-SL zu untersuchen. Für diese Zelllinie ist eine Aktivierung der ERK/MAPKinasen durch cAMP beschrieben (Frodin *et al.*, 1994). Des Weiteren lassen sich hier bestimmte biologische Effekte auf die Dauer der MAPKinase Aktivierung zurückführen. Die EGF Stimulation von PC12 Zellen führt durch die kurzzeitige Aktivierung der MAPKinasen zur Zellproliferation. NGF hingegen bewirkt eine langanhaltende MAPKinase Aktivierung und induziert dadurch die Differenzierung der PC12 Zellen. (Marshall, 1995). Aus diesen Gründen wurden die nachfolgenden Teile dieser Arbeit hauptsächlich mit monoklonalen PC12 Zellen durchgeführt, welche verschiedene Konstrukte der PTP-SL exprimierten.

4.4.1 Untersuchungen zur Rolle der PTP-SL in verschiedenen Signalwegen

Die bisherigen Daten zur PTP-SL zeigten, dass die transiente Überexpression der Phosphatase in den nicht neuronalen Zellen COS-7 die EGF induzierte ERK1/2 Aktivierung reduziert. Ebenso führte die stabile Expression der PTP-SL in NIH-3T3 zu einer Reduktion der basalen und der FCS induzierten ERK1/2 Aktivität (Pulido *et al.*, 1998). PTP-BR7-M4 ist eine Isoform der zytoplasmatischen PTP-SL, deren C-Terminus jedoch um 34 AS verkürzt ist. Die Überexpression dieser Phosphatase in PC12 Zellen bewirkte die Inhibition der NGF induzierten ERK Aktivierung welches durch einen Promotor Assay nachgewiesen wurde (Ogata *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde die NGF induzierte ERK1/2 Aktivierung mittels Antikörperdetektion der phosphorylierten MAPKinasen untersucht. Hierbei konnte hingegen kein Effekt der PTP-SL auf die ERK1/2 Aktivierung festgestellt werden. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken der Phosphatase zustande kommen. Der von Ogata *et al.* verwendete Vektor (pEF-BOS) erlaubt aufgrund des EF-1 α Promotors weit höhere Proteinexpressionen als der in dieser Arbeit benutzte pcDNA3 Vektor

mit seinem CMV Promotor (Goldman *et al.*, 1996). Auch die von Pulido *et al.* beobachtete Reduktion der ERK1/2 Aktivität nach EGF Stimulation in COS-7 Zellen konnte in dieser Arbeit für PC12 Zellen nicht gezeigt werden. Hingegen konnte nach Transfektion der PTP-SL in HEK293 Zellen, Stimulation mit EGF und anschließender Durchführung eines *in-vitro* MAPKinase Assays eine inhibitorische Wirkung der PTP-SL bestätigt werden (siehe 3.3.1). Die gegensätzlichen Ergebnisse könnten auf zelltypspezifische Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität gegenüber EGF zurückzuführen sein. Auch die Stärke der Expression der Phosphatase kann innerhalb der verschiedenen Zelltypen variieren. So konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass trotz Verwendung geringerer Zellzahlen der transient transfizierten HEK293 Zellen gegenüber den stabilen PC12 Zellen letztendlich mehr PTP-SL mittels Antikörper detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), was auf eine höhere Expression schließen lässt.

Des weiteren wurde nachgewiesen, dass die PTP-SL in der Lage ist, die Forskolin und FGF vermittelte ERK Aktivierung zu reduzieren (siehe 3.4.2.1). Hierbei war jedoch kein Unterschied zwischen dem Wildtyp der PTP-SL und der SA231 Mutante detektierbar. Somit konnte unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen in PC12 Zellen trotz der Forskolin induzierten PKA Aktivierung keine Phosphorylierung der PTP-SL am Serin 231 nachgewiesen werden, welche zuvor schon in COS-7 Zellen demonstriert wurde (siehe 3.2.4 und 3.2.5). Die Lokalisation von PKA ist ein entscheidender Faktor für die Phosphorylierung eines spezifischen Substrat (Skalhegg and Tasken, 2000). Sie wird unter anderem durch die unterschiedliche zelluläre Verteilung von verschiedenen AKAP's (A Kinase Anchoring Proteins) bestimmt (Skalhegg and Tasken, 2000). Somit könnte es sein, dass in PC12 Zellen die Stimulation mit Forskolin nicht ausreicht, um die PTP-SL und die PKA in dasselbe zelluläre Kompartiment zu bringen. Dadurch würde trotz Aktivierung der PKA keine Phosphorylierung der Phosphatase möglich sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Daten von Rich *et al.* (2001), welche belegen, dass ein extrazellulärer Stimulus die Ausbildung unterschiedlicher cAMP Signale in verschiedenen Kompartimenten einer einzelnen Zelle induzieren kann (Rich *et al.*, 2001).

Bei der Stimulation mit Bradykinin hingegen war ein Unterschied zwischen dem Wildtyp der PTP-SL und der SA231 Mutante im Bezug auf die ERK1/2 Dephosphorylierung erkennbar. Die SA231 Mutante ermöglichte eine stärkere Dephosphorylierung als der Wildtyp (siehe 3.4.2.2). Dies lässt den Schluss zu, dass hierbei der Phosphorylierungsstatus des Serin 231 eine Rolle spielen könnte. Bradykinin führt zur Stimulation der Phospholipase C. Hierdurch wird Inositol-3-phosphat produziert, wodurch nachfolgend die Öffnung von Kalziumkanälen bewirkt wird. Diese Bradykinin induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zur Erhöhung des cAMP Spiegels und letztlich zur Aktivierung von PKA (Graness *et al.*, 1997). Somit sind die Grundvoraussetzungen für eine Phosphorylierung der PTP-SL geschaffen. Im Bezug auf die Bindung zwischen der PTP-SL und ERK1/2 konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden, da nach

Bradykininstimulation gleichviel ERK2 vom Wildtyp der Phosphatase und der SA231 Mutante copräzipitiert wurde (siehe 3.4.2.2). Es stellt sich hierbei jedoch die Frage, inwieweit feine Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der PTP-SL sich in einer Copräzipitation widerspiegeln. Um genaue Aussagen über das Ausmaß der Phosphorylierung machen zu können, wären weitere Experimente, wie zum Beispiel ein *in-vivo* labeling, nötig. In diesem Zusammenhang muss erneut erwähnt werden, dass die Bradykinin induzierte Erhöhung des cAMP-Spiegels ein Ca^{2+} /Calmodulin vermittelter Effekt ist (Graness *et al.*, 1997). Die Analyse der KIM-Domäne der PTP-SL nach potentiellen Phosphorylierungsstellen mit Hilfe des Programms NetPhos 2.0 ergab, dass das Serin 231 auch durch die CaMKinase II (Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase) phosphoryliert werden könnte. Somit besteht die Möglichkeit, dass die verringerte ERK Dephosphorylierung durch den Wildtyp der PTP-SL nicht durch eine PKA vermittelte Phosphorylierung verursacht wurde, sondern durch die CaMKinase II. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.4.2 Effekt der PTP-SL auf die Zellproliferation

Den MAPKinasen wird eine wichtige Rolle in der Zellproliferation zugeschrieben (Fisher *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001). Ebenso wichtig ist deren Regulation, um krankhaftes Wachstum der Zellen zu vermeiden. Hierbei sind die MAPKinase Phosphatasen von entscheidender Bedeutung. So bewirkt die Überexpression von MKP1 (MAPKinase Phosphatase) die Inhibition der Proliferation von VSMC Zellen (Vascular Smooth Muscle Cells) (Li *et al.*, 1999). Der Verlust der PTPPBS gamma (-), einer zytoplasmatischen Isoform der PTP-SL, führt zu einem veränderten Wachstumsverhalten von Chondroblasten. Daher wird vermutet, dass diese Isoform die Proliferation dieser Zellen regulieren kann (Augustine *et al.*, 2000). Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Strategien zur Untersuchung des Einflusses der PTP-SL auf die Zellproliferation angewendet. Zum einen wurde das Wachstum stabiler PC12 Zellen analysiert und zum anderen die Proliferation von transient transfizierten NIH-3T3 Zellen untersucht. Bei der Auswertung des Wachstumsverhaltens der PC12 Zellen fiel auf, dass die durch Kollagen aktivierten integrinabhängigen Signalwege die Zellteilungsrate positiv beeinflussten (siehe 3.4.3.1). Der Einfluß von Integrinen auf die Zellproliferation ist auch in der Literatur beschrieben (Coppolino and Dedhar, 2000). Innerhalb dieser Versuche war die PTP-SL nur beim Zellwachstum unter suboptimalen Bedingungen (Plastik, serumreduziertes Medium) in der Lage, dasselbige zu reduzieren (siehe 3.4.3.1). Hingegen ermöglichte die katalytisch inaktive CS Mutante der PTP-SL unter normalen Serumbedingungen eine Erhöhung der Proliferationsrate. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bindung der CS Mutante an ERK2 die Dephosphorylierung der Kinase durch endogene Phosphatasen verhindert, was letztendlich ein schnelleres Wachstum ermöglicht. Der positive Effekt der CS Mutante auf die ERK2 Aktivität konnte auch von Pulido *et al.* nachgewiesen werden (Pulido *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL

scheint keine Rolle bei der Proliferation zu spielen, da kein Unterschied zwischen den stabilen PC12 Zellen der PTP-SL SE231 und der PTP-SL SA231 Mutante zu erkennen war (siehe 3.4.3.1). Dies würde bedeuten, dass die Kerntranslokation von ERK1/2 für die Proliferation der Zellen nicht essentiell ist. Dies steht im Einklang mit Daten aus der Literatur in denen beschrieben wird, dass die transiente ERK Aktivierung, die in PC12 Zellen die Proliferation bewirkt, nicht zur Wanderung von ERK in den Kern führt. Hingegen ermöglicht die dauerhafte Aktivierung die Kerntranslokation von ERK und letztendlich die Differenzierung von PC12 Zellen (Marshall, 1995).

Auch das Wachstum der transient transfizierten NIH-3T3 Zellen wurde durch die Expression der katalytisch inaktiven PTP-SL CS Mutante verstärkt (siehe 3.4.3.2). Die vermutliche Ursache für diese proproliferative Wirkung wurde bereits oben diskutiert. Die Expression des Wildtyps der PTP-SL führte in diesem Fall zu einer eindeutigen Reduktion des stimulierten Wachstums (siehe 3.4.3.2). Der inhibierende Effekt der PTP-SL in den NIH-3T3 Zellen ist somit größer als in den stabilen PC12 Zellen, da hier die Reduktion des Wachstums nur unter suboptimalen Bedingungen (Plastik, serumreduziertes Medium) zu beobachten war. Für diesen Unterschied könnten unter anderem die verschiedenen Testsysteme verantwortlich sein, Zellzählung bei den PC12 Zellen gegenüber Thymidineinbau bei den NIH-3T3 Zellen. Zudem ist anzunehmen, dass zelltypspezifische Varianzen vorhanden sind. Für die NIH-3T3 Zellen ist im Gegensatz zu den neuronalen PC12 Zellen bisher noch keine endogene PTP-SL Isoform beschrieben. Somit könnten in PC12 Zellen derzeit noch nicht identifizierte Regulationsmechanismen vorhanden sein, die die Aktivität und/oder zelluläre Lokalisation der PTP-SL stimulusspezifisch beeinflussen. Möglicherweise fehlen diese Regulatoren in den NIH-3T3 Zellen, wodurch der beobachtete Unterschied in der Wachstumsregulation durch PTP-SL zustande kommen könnte. Diesbezüglich liegen jedoch keine Daten aus der Literatur vor, so dass hierzu weitere Untersuchungen notwendig wären. Im Bezug auf einen potentiellen Effekt der PKA Phosphorylierung bleibt zu erwähnen, dass für die mit der PTP-SL SE231 Mutante transfizierten Zellen zwar tendentiell eine stärkere Proliferation im Vergleich zur PTP-SL SA231 Mutante festgestellt wurde, dies jedoch keine Signifikanz aufweist. Die Regulationsmechanismen, mit deren Hilfe cAMP in das Zellwachstum von NIH-3T3 Zellen eingreift, liegen zudem wohl weiter oberhalb in der Signalkette. cAMP aktiviert das kleine G Protein Rap1 und bewirkt somit die Assoziation zwischen Rap1 und Raf1. Dieses inhibiert die Ras-abhängige Aktivierung von ERK1/2 und letztendlich die Zellproliferation (Schmitt and Stork, 2001). Da cAMP bzw. PKA dadurch einen negativen Effekt auf den ERK Signalweg in den NIH-3T3 Zellen ausübt, ist dieses Zellsystem nicht geeignet, um weitere Untersuchungen über Effekte der PKA vermittelten PTP-SL Phosphorylierung durchzuführen.

4.4.3 Rolle der PTP-SL bei der hunger-induzierten Apoptose

Aufgrund der Literatur zum Thema Apoptose in PC12 Zellen konnte vermutet werden, dass die PTP-SL einen Einfluß auf den Ablauf des programmierten Zelltodes haben könnte. Für die MAPKinasen ERK1/2 ist eine anti-apoptotische Wirkung im Bezug auf die hunger-induzierte Apoptose (kultivieren der Zellen im serumfreien Medium) beschrieben (Kim *et al.*, 2000). Die Aktivierung von JNK und p38 bei gleichzeitiger Inhibition von ERK1/2 ist ein kritischer Schritt für die Induktion von Apoptose (Xia *et al.*, 1995). Auch PKA scheint eine anti-apoptotische Wirkung zu haben. Die Stimulation von A(2A)-Adenosin-Rezeptoren bewahrt die Zellen vor der hunger-induzierten Apoptose. Dieser Effekt wird durch PKA Inhibitoren blockiert (Huang *et al.*, 2001). Hingegen erzeugt die Stimulation von AT2-Rezeptoren einen pro-apoptotischen Effekt. Dies geschieht unter anderem durch die Induktion von MKP1 und der damit verbundenen MAPKinase Inhibition (Horiuchi *et al.*, 1998). Trotz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Apoptose lässt sich keine Aussage über eine mögliche Rolle der PTP-SL in diesem zellulären Prozess machen. Dazu waren die Unterschiede im Apoptoseverhalten zwischen verschiedenen Klonen der monoklonalen PTP-SL PC12 Zelllinien zu groß. Die Ursache hierfür könnte im langen Selektionsprozeß zur Erlangung der monoklonalen Zelllinien liegen. Da bei der Selektion für die Zelle das Überleben im Vordergrund steht, könnten hier zelluläre Veränderung geschehen, die ein verändertes Apoptoseverhalten zur Folge haben. Dadurch würde die Vergleichbarkeit zwischen den Klonen im Bezug zum programmierten Zelltod nicht mehr gewährleistet sein. Für die Frage, ob die PTP-SL die Apoptose modulieren kann, wäre ein Zellsystem notwendig, das gut transient transfizierbar ist. Dies ist bei PC12 Zellen leider nicht der Fall. Eine weitere Möglichkeit wäre die transiente virale Infektion, um eine möglichst hohe Zahl von PTP-SL exprimierenden Zellen zu erzielen.

4.4.4 Bedeutung der PTP-SL im Adhäsionsverhalten von PC12 Zellen

Die Aktivierung der ERK/MAPKinasen stellt einen wichtigen Schritt bei der Zelladhäsion dar. Durch Expression von dominant-negativer ERK1 konnte die essentielle Bedeutung dieser Kinase für die Adhäsion von Osteoblasten nachgewiesen werden (Lai *et al.*, 2001). Auch der Einfluß von MAPKinase Phosphatasen ist in der Literatur beschrieben. So führt die Transfektion von NR-6 Zellen mit einer katalytisch-inaktiven Mutante der zytoplasmatischen MKP3 zur Verankerung von ERK im Zytoplasma. Dies hat eine Reduktion der EGF induzierten Deadhäsion zur Folge (Glading *et al.*, 2001). Die Integrin vermittelte Adhäsion von Endothelzellen (HUVEC) bewirkt die Induktion der MKP1 Expression. Dieser Prozess ist abhängig von der ERK/MAPKinase Aktivität und kann als negativer Rückkopplungsmechanismus angesehen werden (Kim and Corson, 2000). Auch bei der

Zelladhäsion spielt somit die Regulation der Aktivität und der Lokalisation von ERK1/2 eine entscheidende Rolle.

Im Zuge dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung der PTP-SL am Serin 231 einen Einfluß auf die Adhäsion hat. So zeigten die Zellen mit der PTP-SL SA231 Mutante eindeutig das höchste Maß an Adhäsion, während für die Zellen mit der PTP-SL SE231 Mutante die geringsten Zellzahlen ermittelt wurden. Die Expression des Wildtyps und der CS Mutante der Phosphatase erhöhten die Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zu den Mock Zellen nur geringfügig (siehe 3.4.5). Dabei ist der Prozentsatz an adhären Zellen bei der CS Mutante höher als beim Wildtyp der PTP-SL. Dies lässt den Schluß zu, dass für die Modulation des Adhäsionsverhaltens der PC12 Zellen durch die PTP-SL die Phosphataseaktivität keine wesentliche Rolle spielt. Stattdessen erscheint die Verankerung der ERK/MAPKinasen durch die zytoplasmatische PTP-SL im Zytosol von entscheidender Bedeutung zu sein. Nur so ist es zu erklären, dass die SA Mutante der PTP-SL das höchste Maß an Adhäsion zeigte. Bei dieser Mutante ist die Bindung an ERK1/2 nicht mehr regulierbar und sie kann als konstitutiv bindend bezeichnet werden. Die SE Mutante, die ERK1/2 nicht mehr binden kann, zeigte dann dementsprechend auch das geringste Maß an Adhäsion. Da sowohl der Wildtyp als auch die CS Mutante in der Lage sind, ERK1/2 zu binden, können beide in Abhängigkeit einer potentiellen Serinphosphorylierung (Serin 231) die MAPKinasen im Zytosol zurückhalten. Diese Ergebnisse sind konform mit den oben beschriebenen MKP3 Daten von Glading *et al.* (2001) (Glading *et al.*, 2001). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine regulatorische Rolle für die PTP-SL in der Zelladhäsion hin, wobei die Phosphorylierung des Serin 231 von entscheidender Bedeutung ist. Ob in diesem Kontext diese Phosphorylierung durch PKA durchgeführt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig aufgeklärt werden. Aus der Literatur geht hervor, dass die Stimulation von PC12 Zellen mit cAMP die Adhäsion der Zellen fördert (Schubert and Whitlock, 1977; Schulze and Perez-Polo, 1982). Im Bezug auf die Phosphorylierung der PTP-SL durch PKA würde das bedeuten, dass die Zellen der PTP-SL SE231 Mutante am besten adhären sollten. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Fraglich bleibt jedoch, welche Kinase dann die PTP-SL phosphorylieren könnte, da der Unterschied zwischen der PTP-SL SE231 und der SA231 Mutante eindeutig ist. Eine Abschwächung der Adhäsion nach cAMP Stimulation ist hingegen für zwei humane neuroblastoma Zelllinien (KA und SY5Y) beschrieben (Schulze and Perez-Polo, 1982). Die Wiederholung der Experimente bei gleichzeitiger Stimulation mit Forskolin oder di-bromo-cAMP könnten weitere Hinweise liefern, inwieweit der bei den Mutanten beobachtete Effekt auf eine PKA vermittelte Phosphorylierung zurückzuführen ist. Wie unter Punkt 4.4.1 schon erwähnt sind auch andere Kinasen in der Lage das Serin 231 der PTP-SL zu phosphorylieren. Zu diesen Kinasen gehören die CaMKinase II (Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase) und die cGMP abhängige PKG (Programm NetPhos 2.0). Interessant im Hinblick auf den oben beschriebenen Effekt der SE und SA Mutanten ist hierbei die durch Kalzium aktivierbare

CaMKinase II. In der Literatur wird in den meisten Fällen eine Verstärkung der PC12 Zelladhäsion durch Ca^{2+} beschrieben (Kozak and Yavin, 1992; Masse and Kelly, 1997). Hierbei ist jedoch zu beachten, auf welchem Untergrund die PC12 Zellen ausgesät wurden, da dies die Wirkung von Ca^{2+} auf die Zelladhäsion wesentlich beeinflusst. Mit Ca^{2+} als einzigem divalenten Kation im Medium adhären PC12 Zellen normal auf WGA (Weizenkeim-Agglutinin) und Poly-Lysin, nicht jedoch auf Kollagen oder Laminin (Turner *et al.*, 1987). Bei dem von Masse und Kelly beschriebenen positiven Einfluss von Kalzium auf die Zelladhäsion wurden mit Poly-L-Ornithin beschichtete Kulturschalen verwendet (Masse and Kelly, 1997). Hingegen wurden die Experimente in dieser Arbeit mit Kollagen beschichteten Kulturschalen durchgeführt. Eine potentielle Phosphorylierung der PTP-SL am Serin 231 durch die CaMKinase II könnte somit die Adhäsion auf Kollagen negativ beeinflussen. Dies wäre ein Ansatzpunkt für nachfolgende Experimente.

4.4.5 Untersuchungen zum Einfluss der PTP-SL auf die Differenzierung von PC12 Zellen

Die bisher publizierten Daten zur Differenzierung von PC12 Zellen gaben Anlass zur Annahme, dass die PTP-SL diesen Prozess modulieren könnte. So ist der MEK1 Inhibitor PD98059 in der Lage, die NGF induzierte Neuritenausbildung komplett zu blockieren. Dies zeigt, daß der MAPKinase Signalweg essentiell für die NGF induzierte PC12 Differenzierung ist (Pang *et al.*, 1995). Die Infektion von PC12 Zellen mit konstitutiv aktiver MEK1 bewirkt die Differenzierung der Zellen ohne weitere Stimuli, wie z.B. NGF. Hingegen führt die Expression von dominant negativer MEK1 oder ERK2 zur Inhibition der Differenzierung (Klesse *et al.*, 1999). Auch der Einfluß von MAPKinase Phosphatasen auf die Differenzierung ist in der Literatur beschrieben. So führt die Coinjektion von CL100 (MKP1) zur Inhibition von N-STE11 oder S222E-MAPKK induzierter Neuritenausbildung. N-STE11 ist eine konstitutiv aktive Mutante einer Hefe MAPKK Kinase, während S222E-MAPKK eine moderat aktive Mutante einer *Xenopus* MAPK Kinase darstellt (Fukuda *et al.*, 1995). Auch die Frage der ERK1/2 Kerntranslokation wird im Zusammenhang mit der PC12 Differenzierung diskutiert. Die Expression geringer Mengen an dominant negativem Ha-Ras Asn-17 Protein erlaubt die transiente Aktivierung von ERK1/2 nach NGF Stimulation, verhindert aber die Kerntranslokation der beiden MAPKs und inhibiert das NGF induzierte Neuritenwachstum (Boglari *et al.*, 1998). Das bedeutet, daß die dauerhafte Aktivierung von ERK1/2 und deren Translokation in den Kern wichtig für die Ausbildung von Neuriten ist. Interessanterweise ist die Wanderung von ERK1 in den Kern PKA abhängig. Die Inhibition von PKA blockt die NGF induzierte Kerntranslokation von ERK1 (Yao *et al.*, 1998). Hierbei könnte die PKA vermittelte Phosphorylierung der PTP-SL eine entscheidende Rolle spielen, da diese zur Inhibition der PTP-SL/ERK1/2 Bindung führt und somit die PTP-SL nicht mehr in der Lage wäre, die ERK/MAPKinasen im Zytosol zurückzuhalten. Leider dienen die in

dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur PC12 Differenzierung nicht zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluß der PTP-SL auf diesen zellulären Prozeß (siehe 3.4.6). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen waren zu groß, als dass spezifische Aussagen getroffen werden könnten. Der Selektionsdruck während der Herstellung der monoklonalen PC12 Zelllinien scheint tiefgreifende zelluläre Veränderungen mit sich zu ziehen, welche die Vergleichbarkeit der generierten Klone im Bezug auf zellbiologische Vorgänge wie die Differenzierung unmöglich machen. Die Konsequenz hieraus wäre die Wiederholung der Experimente unter transienten Bedingungen. Da die Transfektionseffizienz bei PC12 Zellen jedoch ein Problem darstellt, wäre es sinnvoll, diese Versuche mit GFP markierter PTP-SL durchzuführen. Anhand der farblichen Markierung könnten so spezifisch nur die Zellen auf ihr Differenzierungsverhalten untersucht werden, welche auch die PTP-SL DNA aufgenommen haben. Leider können diese durchaus sinnvoll erscheinenden Versuche aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.4.6 Effekt der PTP-SL bei der Bradykinin induzierten c-fos Transkription

Die Aktivierung der ERK/MAPKinasen stellt einen wichtigen Schritt für die Induktion von sogenannten „immediate-early“ Genen wie c-fos und c-jun dar, deren Aktivität zur Zellproliferation und zum Eintritt von Zellen in die S-Phase beiträgt (Pages *et al.*, 1993). In PC12 Zellen kann die c-fos Transkription unter anderem durch Stimulation mit Bradykinin hervorgerufen werden (Zwick *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die PTP-SL in der Lage ist, die Bradykinin induzierte c-fos Transkription deutlich um etwa 90% zu reduzieren (siehe 3.4.7). Dieser Effekt ist abhängig von der katalytischen Aktivität der Phosphatase, da die Expression der PTP-SL CS Mutante nur zu einem sehr geringen inhibitorischen Effekt führte, der durch das Zurückhalten von ERK1/2 im Zytosol hervorgerufen sein könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch Daten aus der Literatur. Hierbei wurden ERK1/2 Fusionsproteine hergestellt, die eine Farnesylierungssequenz enthielten und somit zur Membranverankerung von ERK1/2 führten. Dies resultierte in einer Inhibition der c-fos Transkription, wodurch die essentielle Bedeutung der ERK1/2 Kerntranslokation hervorgehoben wurde (Hochholdinger *et al.*, 1999). Auch bei Arbeiten von Saxena *et al.* mit der PTP-SL verwandten Phosphatase He-PTP wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Die Expression des Wildtyps der He-PTP und der SA23 Mutante in Jurkat T-Zellen verringerten in einem c-fos Promotor Assay die c-fos Aktivierung, während die CS Mutante der He-PTP nur sehr geringe Effekte zeigte. Die Stimulation mit cAMP führte hierbei zu einer Reduktion der inhibitorischen Wirkung des He-PTP Wildtyps, während die SA23 Mutante unbeeinflusst blieb. Dies deutet auf eine wichtige Rolle für die PKA vermittelte Phosphorylierung der KIM-Domäne dieser Phosphatase hin, wobei jedoch keine Glutamatmutante als „positiv“ Kontrolle eingesetzt wurde (Saxena *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein essentieller Effekt einer potentiellen Phosphorylierung der

KIM-Domäne der PTP-SL für die Bradykinin induzierte c-fos Transkription nachgewiesen werden, da die Mutation des Serin 231 zu Glutamat oder Alanin diesbezüglich keinerlei Auswirkung hatte (siehe 3.4.7). Die in Abschnitt 3.4.2.2 festgestellte geringfügig stärkere ERK1/2 Dephosphorylierung der PTP-SL SA231 Mutante im Vergleich zum Wildtyp spiegelte sich somit nicht bei der Reduktion der c-fos Transkription wider. Die Ursache hierfür könnte die MAPKinase ERK5 sein. So ist in der Literatur beschrieben, daß die Serum-induzierte c-fos Expression durch dominant-negative ERK5 deutlich inhibiert wird (Kamakura *et al.*, 1999). Die PTP-SL ist in der Lage an ERK5 zu binden und diese Kinase zu dephosphorylieren (Buschbeck, persönliche Mitteilung). Für die Bindung an ERK5 ist nicht nur die KIM-Domäne verantwortlich, wie das hingegen bei der Bindung an ERK1/2 der Fall ist, sondern auch die Phosphatase-Domäne (Buschbeck, persönliche Mitteilung). Somit könnte der Einfluß der Phosphorylierung der KIM-Domäne allein nicht mehr ausreichen, um die Bindung zwischen der PTP-SL und ERK5 zu blockieren. In diesem Fall könnte die PTP-SL trotz phosphorylierter KIM-Domäne weiterhin die ERK5 Aktivität inhibieren. Dies wäre eine Erklärung dafür, warum in dieser Arbeit kein Effekt der Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL auf die c-fos Transkription nachzuweisen war. Da die MEK1 und somit letztendlich ERK1/2 Inhibitoren PD98059 und U0126 auch die ERK5 Aktivität inhibieren können (Kamakura *et al.*, 1999), ist eine genaue Untersuchung bezüglich der Involvierung von ERK5 in der Bradykinin induzierten c-fos Transkription derzeit nur mittels Expression einer dominant-negativen MEK5 oder mit Antisense-Oligos möglich. Dies ist aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchführbar.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAPKinasen ERK1/2 Substrate für die PTP-SL darstellen. Zudem wurde nachgewiesen, dass die PTP-SL durch PKA phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung in der KIM-Domäne der Phosphatase resultiert in einer Inhibition der Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2. Sie dient somit der Veränderung des Enzym-Substrat-Verhaltens der PTP-SL, da diese die ERK/MAPKinasen nun nicht mehr inaktivieren kann. Die Bedeutung der ERK1/2 MAPKinasen für etliche zelluläre Vorgänge ist in dieser Arbeit bereits häufig erwähnt worden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer genauen Regulation der katalytischen Aktivität dieser Kinasen. Hierfür steht der Zelle eine ganze Familie von MAPKinase Phosphatasen zur Verfügung. Hierzu gehören Serin-/Threoninproteinphosphatasen, Proteintyrosinphosphatasen und dualspezifische Phosphatasen, die sowohl Serin-/Threoninreste als auch Tyrosinreste dephosphorylieren können. Diese Vielzahl an regulatorisch wirkenden Phosphatasen macht die Zuordnung einer bestimmten MAPK Phosphatase zu einem bestimmten zellulären Prozeß sehr schwierig. Dies wird innerhalb dieser Arbeit zum Beispiel bei den Untersuchungen zum Einfluß der PTP-SL auf das Apoptoseverhalten und die Differenzierung von PC12 Zellen deutlich. Auch innerhalb

der Literatur findet sich dieses Phänomen der Kompensation, da für MKP1 defiziente Mäuse kein Phänotyp beschrieben werden konnte und diese eine normale Entwicklung zeigten (Dorfman *et al.*, 1996). Auch He-PTP (-/-) Mäuse wiesen keinerlei Entwicklungsstörungen auf (Gronda *et al.*, 2001). Der Wegfall einer regulatorischen Komponente kann also in einigen Fällen durch die Zelle bzw. den Organismus kompensiert werden.

Dennoch bietet diese Arbeit hoffnungsvolle Ansätze für die Involvierung der PTP-SL in bestimmten Stoffwechselwegen bzw. zellulären Prozessen. Gerade im Hinblick auf die Bradykinin aktivierten Signalwege scheint die PTP-SL eine Rolle zu spielen. Die Reduktion der ERK1/2 Aktivierung und der c-fos Transkription gibt dies bezüglich klare Hinweise. Das Zellsystem PC12 erscheint hierbei eine gute Wahl zu sein, da diese Zellen zum einen kontinuierlich Bradykinin produzieren (Dendorfer *et al.*, 1997) und zum anderen Bradykinin Stimulation zur „Ausbreitung“ (cell spreading) von PC12 Zellen führt (van Leeuwen *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung des Serin 231 der PTP-SL einen Einfluß auf das Adhäsionsverhalten von PC12 Zellen hat. Somit wäre es interessant zu untersuchen, ob die PTP-SL die Bradykinin induzierte Zellausbreitung modifizieren kann. Die Modulation des Phosphorylierungsstatus des Serin 231 der PTP-SL könnte hierbei von Bedeutung sein, da zum einen Bradykinin Stimulation von PC12 Zellen zur Aktivierung von PKA führt (Graness *et al.*, 1997) und zum anderen der Adenylatcyclase Aktivator Forskolin in der Lage ist Auswirkungen der Bradykinin Stimulation zu verstärken (Etscheid *et al.*, 1991).

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der PTP-SL als Regulator des ERK/MAPKinase Signalweges näher zu charakterisieren.

Mittels GST-Fusionsproteinen und Coimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die PTP-SL mit ERK1/2 assoziiert. Entscheidend für die Assoziation ist ein spezieller Bereich der Phosphatase, die sogenannte KIM-Domäne (Kinase-Interaktions-Motiv). Durch *in-vitro* Studien konnte eine Phosphorylierung des Serin 231, welches innerhalb der KIM-Domäne liegt, durch die Protein Kinase A (PKA) nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung führte zur Inhibition der Bindung zwischen PTP-SL und ERK1/2. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsstudien bestätigten die Bedeutung des Phosphorylierungszustandes des Serin 231 der PTP-SL für die Assoziation mit den MAPKinasen. Die Reduktion der Coimmunpräzipitation von ERK1/2 mit der PTP-SL nach Forskolin Stimulation bestätigte die Bedeutung der Serinphosphorylierung *in-vivo*. Durch Inhibition von Ser-/Thr-Phosphatasen und anschließender Forskolin Stimulation konnte eine Hyperphosphorylierung des Wildtyps und der CS-Mutante der PTP-SL erreicht werden, nicht jedoch der Glutamat- und Alanin-Mutante des Serin 231 der Phosphatase. Dies lässt eindeutig den Schluss zu, dass nur dieses Serin durch PKA phosphoryliert wird.

Mit Hilfe von *in-vitro* Phosphatase und Kinase Assays konnte nachgewiesen werden, dass die PTP-SL die MAPKinasen ERK1/2 dephosphoryliert und somit inaktivieren kann. Somit wurden ERK1/2 eindeutig als Substrate der PTP-SL identifiziert. Durch Glutamat- und Alanin-Mutanten des Serin 231 der PTP-SL konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibition der Bindung an die MAPKinasen ERK1/2 zu einem veränderten Enzym-Substrat-Verhalten der PTP-SL führt. So war die PTP-SL SE231 Mutante, welche die Phosphorylierung des Serin 231 nachahmt, nicht mehr in der Lage die MAPKinasen ERK1/2 zu dephosphorylieren und somit zu inaktivieren. Dies deutet auf eine neue Art der Quervernetzung zwischen dem PKA Signalweg und dem ERK/MAPKinase Signalweg hin, der unterhalb der bisher bekannten Rap1/B-Raf Modulation liegt.

Zur Untersuchung der biologischen Bedeutung der PTP-SL und ihrer Serinphosphorylierung wurden PC12 Zelllinien hergestellt, welche den PTP-SL Wildtyp, die PTP-SL CS Mutante, die PTP-SL SE231 Mutante oder die PTP-SL SA231 Mutante stabil exprimierten.

Mit Hilfe der PTP-SL Wildtyp und PTP-SL SA231 PC12 Zellen konnte gezeigt werden, dass die PTP-SL in der Lage ist, die Forskolin, aFGF und Bradykinin vermittelte ERK1/2 Aktivierung zu reduzieren. Dabei ergab sich im Fall der Bradykinin Stimulation, dass die PTP-SL SA231 Mutante eine stärkere Reduktion der ERK1/2 Phosphorylierung bewirkte als der Wildtyp der Phosphatase. Somit scheint der Phosphorylierungsstatus des Serin 231 bei diesem Stimulus eine Rolle spielen.

Bei den Untersuchungen zum Wachstum der stabilen PC12 Zellen konnte eine Reduktion des Wachstum um rund 30% durch den Wildtyp der Phosphatase nur unter suboptimalen

Wachstumsbedingungen (Plastik, serumreduziertes Medium) nachgewiesen werden. Die katalytisch inaktive CS Mutante beschleunigt hingegen das Wachstum der Zellen (normales Medium), so dass hier sowohl bei der Verwendung von unbeschichteten (Plastik) als auch bei mit Kollagen beschichteten Platten etwa 30% mehr Zellen gezählt werden konnten. Die Phosphorylierung des Serin 231 scheint hierbei keine Rolle zu spielen, da keine der beiden Serin-Mutanten einen Effekt auf das Wachstum der Zellen ausübten. Der mit transient transfizierten NIH-3T3 Zellen durchgeführte Thymidineinbau unterstreicht die wachstumsfördernde Wirkung der PTP-SL CS Mutante (+35%) und die prinzipiell reduzierende Wirkung des Wildtyps (-32%). Es konnte zwar in diesen Experimenten auch eine wachstumsreduzierende Wirkung der PTP-SL SA231 Mutante festgestellt werden, jedoch lagen die Werte für die PTP-SL SE231 Mutante nur tendenziell und nicht signifikant höher, so dass letztendlich auch hier kein Effekt für die Serinphosphorylierung der PTP-SL herausgearbeitet werden konnte.

Zur Rolle der PTP-SL bei der hunger-induzierten Apoptose und bei der Differenzierung von PC12 Zellen können trotz der durchgeführten Experimente keine Aussagen getroffen werden. Mit denen in dieser Arbeit hergestellten PC12 Zelllinien konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus des Serin 231 der PTP-SL Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten dieser Zellen hat. Die Zellen der PTP-SL SA231 Mutante zeigten das höchste Maß an Adhäsion (50% adhärierte Zellen nach 30 min), während die geringsten Werte für die Zellen der PTP-SL SE231 Mutante nachgewiesen wurden (14%).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die PTP-SL die Bradykinin induzierte c-fos Transkription reduzieren kann. Hierzu sind sowohl der Wildtyp der Phosphatase (-87%) als auch die PTP-SL SE231 Mutante (-94%) und die PTP-SL SA231 Mutante (-86%) in der Lage.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen die PTP-SL nicht nur als ein Negativregulator der MAPKinasen ERK1/2 aus, sondern eröffnen durch die Identifizierung der PTP-SL als neuer Punkt der Quervernetzung zwischen dem PKA Signalweg und dem ERK/MAPKinase Signalweg neue Perspektiven hinsichtlich der intrazellulären Zellkommunikation.

6 Literaturverzeichnis

- Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S.M. und Cohen, P. (1995) Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol*, **5**, 283-95.
- 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. und Moller, N.P. (2001) Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 7117-36.
- Assoian, R.K. und Schwartz, M.A. (2001) Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 48-53.
- Augustine, K.A., Rossi, R.M., Silbiger, S.M., Bucay, N., Duryea, D., Marshall, W.S. und Medlock, E.S. (2000a) Evidence that the protein tyrosine phosphatase (PC12,Br7,S1) gamma (-) isoform modulates chondrogenic patterning and growth. *Int J Dev Biol*, **44**, 361-71.
- Augustine, K.A., Silbiger, S.M., Bucay, N., Ulias, L., Boynton, A., Trebasky, L.D. und Medlock, E.S. (2000b) Protein tyrosine phosphatase (PC12, Br7,S1) family: expression characterization in the adult human and mouse. *Anat Rec*, **258**, 221-34.
- Barford, D., Das, A.K. und Egloff, M.P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 133-64.
- Barford, D. und Neel, B.G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure*, **6**, 249-54.
- Barnea, G., Grumet, M., Milev, P., Silvennoinen, O., Levy, J.B., Sap, J. und Schlessinger, J. (1994) 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., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A.M., Canoll, P.D., D'Eustachio, P., Morse, B., Levy, J.B., Laforgia, S., Huebner, K. 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.
- Beckmann, G. und 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. und 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.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J. und 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.

- Boglari, G., Erhardt, P., Cooper, G.M. und Szeberenyi, J. (1998) Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur J Cell Biol*, **75**, 54-8.
- Brady-Kalnay, S.M., Flint, A.J. und Tonks, N.K. (1993) Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J Cell Biol*, **122**, 961-72.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K.A., Lawrence, J.B., Johnson, C., Bruskin, A., Green, N.R. und 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.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S. und Pouyssegur, J. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J*, **18**, 664-74.
- Burgering, B.M., Pronk, G.J., van Weeren, P.C., Chardin, P. und Bos, J.L. (1993) cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *Embo J*, **12**, 4211-20.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. und Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science*, **280**, 1262-5.
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90**, 859-69.
- Cao, L., Zhang, L., Ruiz-Lozano, P., Yang, Q., Chien, K.R., Graham, R.M. und Zhou, M. (1998) A novel putative protein-tyrosine phosphatase contains a BRO1-like domain and suppresses Ha-ras-mediated transformation. *J Biol Chem*, **273**, 21077-83.
- Celler, J.W., Luo, X., Gonez, L.J. und 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.
- Charest, A., Wagner, J., Shen, S.H. und Tremblay, M.L. (1995) Murine protein tyrosine phosphatase-PEST, a stable cytosolic protein tyrosine phosphatase. *Biochem J*, **308**, 425-32.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752.
- Chen, R.H., Sarnecki, C. und Blenis, J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, **12**, 915-27.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. und Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immunocomplexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J. Immunol. Meth.*, **18**, 183-192.
- Chernoff, J., Schievella, A.R., Jost, C.A., Erikson, R.L. und 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.

- Chung, C.T. und Miller, R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucl. Acids. Res.*, **16**, 3580.
- Clark, E.A. und Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, **268**, 233-9.
- Cobb, M.H., Boulton, T.G. und Robbins, D.J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul*, **2**, 965-78.
- Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, **270**, 14843-6.
- Cobb, M.H., Xu, S., Cheng, M., Ebert, D., Robbins, D., Goldsmith, E. und Robinson, M. (1996) Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways. *Adv Pharmacol*, **36**, 49-65.
- Cobb, M.H., Xu, S., Hepler, J.E., Hutchison, M., Frost, J. und Robbins, D.J. (1994) Regulation of the MAP kinase cascade. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 253-6.
- Cook, S.J. und McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, **262**, 1069-72.
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. und 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.
- Coppolino, M.G. und Dedhar, S. (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 171-88.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. und et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-9.
- Davis, R.J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **268**, 14553-6.
- Dendorfer, A., Wellhoner, P., Braun, A., Roscher, A.A. und Dominiak, P. (1997) Synthesis of kininogen and degradation of bradykinin by PC12 cells. *Br J Pharmacol*, **122**, 1585-92.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. und Davis, R.J. (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, 682-5.
- Di Marco, E., Pierce, J.H., Fleming, T.P., Kraus, M.H., Molloy, C.J., Aaronson, S.A. und Di Fiore, P.P. (1989) Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene*, **4**, 831-8.
- Dorfman, K., Carrasco, D., Gruda, M., Ryan, C., Lira, S.A. und Bravo, R. (1996) Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene*, **13**, 925-31.

- Downward, J. (1997) Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol*, **7**, R258-60.
- Elson, A. und Leder, P. (1995) Identification of a cytoplasmic, phorbol ester-inducible isoform of protein tyrosine phosphatase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12235-9.
- Erpel, T. und Courtneidge, S.A. (1995) Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 176-82.
- Etscheid, B.G., Ko, P.H. und Villereal, M.L. (1991) Regulation of bradykinin receptor level by cholera toxin, pertussis toxin and forskolin in cultured human fibroblasts. *Br J Pharmacol*, **103**, 1347-50.
- Fang, K.S., Barker, K., Sudol, M. und Hanafusa, H. (1994) A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J Biol Chem*, **269**, 14056-63.
- Fischer, E.H., Charbonneau, H. und Tonks, N.K. (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, **253**, 401-6.
- Fisher, M., Liu, B., Glennon, P.E., Southgate, K.M., Sale, E.M., Sale, G.J., Lewis, M.J. und Groves, P.H. (2001) Downregulation of the ERK 1 and 2 mitogen activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits proliferation of porcine vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **156**, 289-95.
- Flint, A.J., Gebbink, M.F., Franza, B.R., Jr., Hill, D.E. und 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.
- Frangioni, J.V., Beahm, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A. und 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.
- Frodin, M., Peraldi, P. und Van Obberghen, E. (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem*, **269**, 6207-14.
- Frodin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C.B. und Van Obberghen, E. (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem*, **270**, 7882-9.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., Tachibana, T., Dell, K., Hattori, S., Yoneda, Y. und Nishida, E. (1995) Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene*, **11**, 239-44.
- Garton, A.J. und Tonks, N.K. (1994) PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *Embo J*, **13**, 3763-71.
- Gebbink, M.F., van Etten, I., Hateboer, G., Suijkerbuijk, R., Beijersbergen, R.L., Geurts van Kessel, A. und Moolenaar, W.H. (1991) Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett*, **290**, 123-30.

- Gershoni, J.M. und Palade, G.E. (1983) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.*, **124**, 396-405.
- Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A. und Wells, A. (2001) Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, **276**, 23341-8.
- Goldman, L.A., Cutrone, E.C., Kottenko, S.V., Krause, C.D. und Langer, J.A. (1996) Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *Biotechniques*, **21**, 1013-5.
- Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S. und Davis, R.J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*, **122**, 1089-101.
- Gould, K.L., Bretscher, A., Esch, F.S. und Hunter, T. (1989) cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *Embo J*, **8**, 4133-42.
- Graness, A., Adomeit, A., Ludwig, B., Muller, W.D., Kaufmann, R. und Liebmann, C. (1997) Novel bradykinin signalling events in PC-12 cells: stimulation of the cAMP pathway leads to cAMP-mediated translocation of protein kinase Cepsilon. *Biochem J*, **327**, 147-54.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M. und Hynes, N.E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*, **16**, 1647-55.
- Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Raines, E.W., Potts, B.C., Macdonald, S.G., Ross, R. und Krebs, E.G. (1993) Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10300-4.
- Greene, L.A. (1978) Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J Cell Biol*, **78**, 747-55.
- Gronda, M., Arab, S., Iafrate, B., Suzuki, H. und Zanke, B.W. (2001) Hematopoietic protein tyrosine phosphatase suppresses extracellular stimulus-regulated kinase activation. *Mol Cell Biol*, **21**, 6851-8.
- Guan, K.L., Haun, R.S., Watson, S.J., Geahlen, R.L. und Dixon, J.E. (1990) Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1501-5.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. und Carraway, K.L., 3rd. (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8132-6.
- Gyles, S.L., Burns, C.J., Whitehouse, B.J., Sugden, D., Marsh, P.J., Persaud, S.J. und Jones, P.M. (2001) ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem*, **276**, 34888-95.

- Hariharan, I.K., Chuang, P.T. und Rubin, G.M. (1991) Cloning and characterization of a receptor-class phosphotyrosine phosphatase gene expressed on central nervous system axons in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11266-70.
- Hendriks, W., Schepens, J., Brugman, C., Zeeuwen, P. und Wieringa, B. (1995) A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase with a single catalytic domain is specifically expressed in mouse brain. *Biochem J*, **305**, 499-504.
- Hochholdinger, F., Baier, G., Nogalo, A., Bauer, B., Grunicke, H.H. und Uberall, F. (1999) Novel membrane-targeted ERK1 and ERK2 chimeras which act as dominant negative, isotype-specific mitogen-activated protein kinase inhibitors of Ras-Raf-mediated transcriptional activation of c-fos in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, **19**, 8052-65.
- Hooft van Huijsduijnen, R. (1998) Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. *Gene*, **225**, 1-8.
- Horiuchi, M., Akishita, M. und Dzau, V.J. (1998) Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res*, **24**, 307-14.
- Huang, N.K., Lin, Y.W., Huang, C.L., Messing, R.O. und Chern, Y. (2001) Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by A(2A) adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J Biol Chem*, **276**, 13838-46.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-36.
- Hunter, T. und Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1311-5.
- Ip, Y.T. und Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 205-19.
- Ivankovic-Dikic, I., Gronroos, E., Blaukat, A., Barth, B.U. und Dikic, I. (2000) Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nat Cell Biol*, **2**, 574-81.
- Jiang, Y.P., Wang, H., D'Eustachio, P., Musacchio, J.M., Schlessinger, J. und Sap, J. (1993) Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region. *Mol Cell Biol*, **13**, 2942-51.
- Jones, N.C., Fedorov, Y.V., Rosenthal, R.S. und Olwin, B.B. (2001) ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J Cell Physiol*, **186**, 104-15.
- Juliano, R.L. und Haskill, S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, **120**, 577-85.
- Kamakura, S., Moriguchi, T. und Nishida, E. (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem*, **274**, 26563-71.

- Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M. und 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.
- Keyse, S.M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 143-52.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. und Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-15.
- Khoo, S. und Cobb, M.H. (1997) Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5599-604.
- Kim, F. und Corson, M.A. (2000) Adhesion to fibronectin enhances MKP-1 activation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 539-45.
- Kim, M.S., So, H.S., Park, J.S., Lee, K.M., Moon, B.S., Lee, H.S., Kim, T.Y., Moon, S.K. und Park, R. (2000) Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. *Gen Pharmacol*, **34**, 227-35.
- Kim, S.C., Hahn, J.S., Min, Y.H., Yoo, N.C., Ko, Y.W. und Lee, W.J. (1999) Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood*, **93**, 3893-3899.
- Klesse, L.J., Meyers, K.A., Marshall, C.J. und Parada, L.F. (1999) Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene*, **18**, 2055-68.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **351**, 289-305.
- Kozak, A. und Yavin, E. (1992) Isolation and characterization by cell density adjustment of a PC12 pheochromocytoma variant with altered Ca²⁺ homeostasis. *J Mol Neurosci*, **3**, 203-12.
- Krady, M.M., Freyermuth, S., Rogue, P. und Malviya, A.N. (1997) Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in the nucleus. *FEBS Lett*, **412**, 420-4.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. und Aaronson, S.A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9193-7.
- Krauss, G. (1997) *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH.

- Krueger, N.X. und 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.
- Kunkel, T.A. (1985) Mutational specificity of depurination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9193-9197.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, C.F., Chaudhary, L., Fausto, A., Halstead, L.R., Ory, D.S., Avioli, L.V. und Cheng, S.L. (2001) Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, **276**, 14443-50.
- Lee, S.Y. und Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques*, **9**, 676-679.
- Lemmon, M.A. und Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **19**, 459-63.
- Lemoine, N.R., Barnes, D.M., Hollywood, D.P., Hughes, C.M., Smith, P., Dublin, E., Prigent, S.A., Gullick, W.J. und Hurst, H.C. (1992) Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer*, **66**, 1116-21.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. und Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, **122**, 1079-88.
- Levkovitz, Y., O'Donovan, K.J. und Baraban, J.M. (2001) Blockade of NGF-induced neurite outgrowth by a dominant-negative inhibitor of the egr family of transcription regulatory factors. *J Neurosci*, **21**, 45-52.
- 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. und 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, C., Hu, Y., Mayr, M. und Xu, Q. (1999) Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem*, **274**, 25273-80.
- Li, L. und Dixon, J.E. (2000) Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol*, **12**, 75-84.
- Liu, F., Hill, D.E. und 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.
- Longo, F.M., Martignetti, J.A., Le Beau, J.M., Zhang, J.S., Barnes, J.P. und Brosius, J. (1993) Leukocyte common antigen-related receptor-linked tyrosine phosphatase. Regulation of mRNA expression. *J Biol Chem*, **268**, 26503-11.

- Luna, E.J. und Hitt, A.L. (1992) Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science*, **258**, 955-64.
- Margolis, B., Bellot, F., Honegger, A.M., Ullrich, A., Schlessinger, J. und Zilberstein, A. (1990) Tyrosine kinase activity is essential for the association of phospholipase C-gamma with the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, **10**, 435-41.
- Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. und Schlessinger, J. (1989) EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell*, **57**, 1101-7.
- Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-85.
- Masse, T. und Kelly, P.T. (1997) Overexpression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in PC12 cells alters cell growth, morphology, and nerve growth factor-induced differentiation. *J Neurosci*, **17**, 924-31.
- Matthews, R.J., Bowne, D.B., Flores, E. und 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.
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R.K. und 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.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-79.
- Millar, J.B., Buck, V. und Wilkinson, M.G. (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev*, **9**, 2117-30.
- Moller, N.P., Moller, K.B., Lammers, R., Kharitonov, A., Sures, I. und 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.
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J. und Wolfman, A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, **260**, 1658-61.
- Morrison, D.K. und Cutler, R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 174-9.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Nishiya, N., Iwabuchi, Y., Shibamura, M., Cote, J.F., Tremblay, M.L. und Nose, K. (1999) Hic-5, a paxillin homologue, binds to the protein-tyrosine phosphatase PEST (PTP-PEST) through its LIM 3 domain. *J Biol Chem*, **274**, 9847-53.

- Ogata, M., Oh-hora, M., Kosugi, A. und Hamaoka, T. (1999) Inactivation of mitogen-activated protein kinases by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 52-6.
- Ogata, M., Sawada, M., Fujino, Y. und Hamaoka, T. (1995) cDNA cloning and characterization of a novel receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed predominantly in the brain. *J Biol Chem*, **270**, 2337-43.
- O'Grady, P., Thai, T.C. und Saito, H. (1998) The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *J Cell Biol*, **141**, 1675-84.
- Ohsugi, M., Kuramochi, S., Matsuda, S. und Yamamoto, T. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase that is specifically expressed in spermatocytes. *J Biol Chem*, **272**, 33092-9.
- Ostman, A., Yang, Q. und 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.
- Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S. und Pouyssegur, J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8319-23.
- Pang, L., Sawada, T., Decker, S.J. und Saltiel, A.R. (1995) Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem*, **270**, 13585-8.
- Paul, S., Snyder, G.L., Yokakura, H., Picciotto, M.R., Nairn, A.C. und Lombroso, P.J. (2000) The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *J Neurosci*, **20**, 5630-8.
- Pixley, F.J., Lee, P.S., Dominguez, M.G., Einstein, D.B. und Stanley, E.R. (1995) A heteromorphous protein-tyrosine phosphatase, PTP phi, is regulated by CSF-1 in macrophages. *J Biol Chem*, **270**, 27339-47.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G. und Shoyab, M. (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1746-50.
- Ponniah, S., Wang, D.Z., Lim, K.L. und 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. und Vaillancourt, R.R. (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*, **17**, 1343-52.

- Pulido, R., Serra-Pages, C., Tang, M. und 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. und 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.
- Ranganathan, R. und Ross, E.M. (1997) PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol*, **7**, R770-3.
- Rees, D.J., Ades, S.E., Singer, S.J. und Hynes, R.O. (1990) Sequence and domain structure of talin. *Nature*, **347**, 685-9.
- Rich, T.C., Fagan, K.A., Tse, T.E., Schaack, J., Cooper, D.M. und Karpen, J.W. (2001) A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13049-54.
- Robinson, M.J. und Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 180-6.
- Ruoslahti, E. (1988) Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem*, **57**, 375-413.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1990) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D., Grumet, M. und Schlessinger, J. (1994) Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol Cell Biol*, **14**, 1-9.
- Saxena, M. und Mustelin, T. (2000) Extracellular signals and sources of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol*, **12**, 387-96.
- Saxena, M., Williams, S., Tasken, K. und Mustelin, T. (1999) Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol*, **1**, 305-11.
- Scangos, G. und Ruddle, F.H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells. *Gene*, **14**, 1-10.
- Schaller, M.D. und Parsons, J.T. (1994) Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 705-10.
- Schievella, A.R., Paige, L.A., Johnson, K.A., Hill, D.E. und Erikson, R.L. (1993) Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine. *Cell Growth Differ*, **4**, 239-46.
- Schmitt, J.M. und Stork, P.J. (2001) Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol*, **21**, 3671-83.

- Schubert, D. und Whitlock, C. (1977) Alteration of cellular adhesion by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 4055-8.
- Schulze, I. und Perez-Polo, J.R. (1982) Nerve growth factor and cyclic AMP: opposite effects on neuroblastoma-substrate adhesion. *J Neurosci Res*, **8**, 393-411.
- Seth, A., Gonzalez, F.A., Gupta, S., Raden, D.L. und Davis, R.J. (1992) Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **267**, 24796-804.
- Sharma, E. und Lombroso, P.J. (1995) A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor. *J Biol Chem*, **270**, 49-53.
- Shattil, S.J. und Brugge, J.S. (1991) Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets. *Curr Opin Cell Biol*, **3**, 869-79.
- Shiozuka, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Hashimoto, S. und Kawashima, H. (1995) Cloning and expression of PCPTP1 encoding protein tyrosine phosphatase. *Gene*, **162**, 279-84.
- Sivaraman, V.S., Wang, H.Y., Nuovo, G.J. und Malbon, C.C. (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest*, **99**, 1478-1483.
- Skalhegg, B.S. und Tasken, K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, **5**, D678-93.
- Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 182-8.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Ariniello, P.D., Tang, M., Munro, J.M., Blattler, W.A., Adler, D.A., Disteche, C.M. und 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., Thai, T., Tang, M. und 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.
- Sun, H. und Tonks, N.K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, **19**, 480-5.
- Superti-Furga, G., Fumagalli, S., Koegl, M., Courtneidge, S.A. und Draetta, G. (1993) Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *Embo J*, **12**, 2625-34.
- Szedlacsek, S.E., Aricescu, A.R., Fulga, T.A., Renault, L. und Scheidig, A.J. (2001) Crystal structure of ptp-sl/ptpbr7 catalytic domain: implications for map kinase regulation. *J Mol Biol*, **311**, 557-68.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. und Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-6.
- Thomas, M.L. (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol*, **7**, 339-69.

- Thomas, M.L., Barclay, A.N., Gagnon, J. und 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.
- Thomas, S.M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S. und Brugge, J.S. (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell*, **68**, 1031-40.
- Tonks, N.K. (1996) Protein tyrosine phosphatases. In Heldin, C.-H., and Purton, Mary (ed.) *Signal Transduction*. Chapman & Hall, pp. 253-269.
- Tonks, N.K. und Neel, B.G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 182-95.
- Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P. und Ullrich, A. (1994) EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol*, **4**, 694-701.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 205-15.
- Turner, D.C., Flier, L.A. und Carbonetto, S. (1987) Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC12 cells on collagen and laminin substrata. *Dev Biol*, **121**, 510-25.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J. und Yarden, Y. (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 5276-87.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. 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. und Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-12.
- Van Den Maagdenberg, A.M., Bachner, D., Schepens, J.T., Peters, W., Fransen, J.A., Wieringa, B. und Hendriks, W.J. (1999) The mouse Ptprr gene encodes two protein tyrosine phosphatases, PTP-SL and PTPBR7, that display distinct patterns of expression during neural development. *Eur J Neurosci*, **11**, 3832-44.
- van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- van Leeuwen, F.N., van Delft, S., Kain, H.E., van der Kammen, R.A. und Collard, J.G. (1999) Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol*, **1**, 242-8.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. und Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-14.

- Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S. und Stork, P.J. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, **89**, 73-82.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. und Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J*, **14**, 4267-75.
- Wang, Y. und Pallen, C.J. (1991) The receptor-like protein tyrosine phosphatase HPTP alpha has two active catalytic domains with distinct substrate specificities. *Embo J*, **10**, 3231-7.
- Warne, P.H., Viciano, P.R. und Downward, J. (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, **364**, 352-5.
- Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci*, **23**, 481-5.
- Wilgenbus, K.K., Milatovich, A., Francke, U. und Furthmayr, H. (1993) Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal assignment of the human radixin gene and two dispersed pseudogenes. *Genomics*, **16**, 199-206.
- Williams, A.F. und Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J. und Sturgill, T.W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, **262**, 1065-9.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A. und Saito, H. (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol*, **17**, 1289-97.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. und Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-31.
- Yao, H., York, R.D., Misra-Press, A., Carr, D.W. und Stork, P.J. (1998) The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem*, **273**, 8240-7.
- Yarden, Y. und Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, **26**, 1443-51.
- Yarden, Y. und Ullrich, A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 443-78.
- Yu, Q., Lenardo, T. und 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.

- Zanke, B., Suzuki, H., Kishihara, K., Mizzen, L., Minden, M., Pawson, A. und Mak, T.W. (1992) Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase). *Eur J Immunol*, **22**, 235-9.
- Zhan, X.L., Deschenes, R.J. und Guan, K.L. (1997) Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **11**, 1690-702.
- Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R. und Avruch, J. (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, **364**, 308-13.
- Zhang, Z.Y., Wu, L. und Chen, L. (1995) Transition state and rate-limiting step of the reaction catalyzed by the human dual-specificity phosphatase, VHR. *Biochemistry*, **34**, 16088-96.
- Zheng, C.F. und Guan, K.L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J*, **13**, 1123-31.
- Zheng, X.M., Resnick, R.J. und Shalloway, D. (2000) A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *Embo J*, **19**, 964-78.
- Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J. und Pulido, R. (1999) Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem*, **274**, 21900-7.
- Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H. und Ullrich, A. (1999) Distinct calcium-dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *J Biol Chem*, **274**, 20989-96.
- Zwick-Wallasch, E. (1999) Untersuchungen zum Mechanismus der EGF Rezeptor Transaktivierung. Julius-Maximilian-Universität, Würzburg, pp. 1-107.

Veröffentlichung

- Buschbeck, M., Eickhoff, J., Sommer, M.N. und Ullrich, A. (2002) Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway. *J Biol Chem*, in press

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKAP	A Kinase Anchoring Protein
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaM Kinase	Ca ²⁺ -calmodulin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
c-fos	zelluläres Homolog zu v-fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene)
c-jun	zelluläres Homolog zu v-jun (avian sarcoma virus 17 oncogene)
CRALBP	Cellular Retinaldehyde Binding Protein
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	dominant negativ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Elk	ets related Protoonkogen 1
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FNIII	FibronectinIII
g	Gramm
Gab1	Grb2-associated binder-1
Gab2	Grb2-associated binder-2
G-418	Genetecin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR(n)	G protein-coupled receptor(s)

Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HS	Horse Serum
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
JAK(n)	Januskinase(n)
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIM	Kinase Interaktionsmotiv
KSR	Kinase Suppressor of Ras
l	Liter
LMW-PTP	Low Molecular Weight-PTP
LPA	Lysophosphatidylsäure
μ	micro
m	milli
M	Molar
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MEK	MAPK/ERK Kinase
min	Minute
MKP1	MAPKinase Phosphatase 1
MNK1	MAPKinase activated Protein Kinase
MP1	MEK Partner 1
n	nano
N-CAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NGF	Neuronal Growth Factor
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PAC1	Phosphatase of Activated Cells 1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDZ Domäne	Post synaptic density Disc-large Zo-1
PEG	Polyethylenglykol
PH Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKA	Protein Kinase A

PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTB	Phosphotyrosine binding
PTK(n)	Proteintyrosinkinase(n)
PTP(n)	Proteintyrosinphosphatase(n)
PTP-SL	Proteintyrosinphosphatase-Step Like
PY	Phosphotyrosin
Raf	Homolog zu v-raf (murine sarcoma viral oncogene)
Rap1	Ras-associated protein 1
Ras	Homolog zu v-ras (rat sarcoma viral oncogene)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SH2,3 Domäne	Src Homologie 2,3 Domäne
SHP-2	SH2-containing PTP-2
sog.	sogenannt
Sos	Son of sevenless
Src	Homolog zu v-src (sarcoma viral oncogene)
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TM	Transmembranhelix
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tTA	Tetrazyklin induzierbarer Transaktivator
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymaktivitätseinheit (Units)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für seine Unterstützung und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen (inklusive etlicher unvergesslicher Party's) bedanken. Zudem gebührt Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich mein besonderer Dank für die Freiräume beim Bearbeiten des vorliegenden Projektes.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Ludwig-Maximilian-Universität München zu betreuen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt „meinem“ Labor G32/33, indem eine einzigartige Arbeitsatmosphäre herrschte, welche ich nie vergessen werde. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Andreas Gschwind und Jan Eickhoff, welche ich heute zu meinen Freunden zähle.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung, welche die Seminare auf Schloß Ringberg nicht nur zu einem wissenschaftlichen Diskussionsforum, sondern zu einem Erlebnis werden ließen.

Ich danke Christian Büchner für seine Freundschaft, die seit der Schulzeit besteht und die ich nicht missen möchte.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken. Ihr Glaube an mich und die Gewissheit, dass ich immer auf sie zählen kann, haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Mein größter Dank gebührt meiner Freundin Alexandra Baumgartner und meiner Tochter Jana Maria. Ihr Anteil an dieser Arbeit ist nicht in Worte zu fassen.

Lebenslauf

Marc-Nicola Sommer

geboren am 13.05.1969 in Wilhelmshaven
deutsche Staatsangehörigkeit

ledig, eine Tochter

Beruflicher Werdegang

Seit Nov. 2001 angestellt bei Axxima Pharmaceuticals AG

Promotion

Juli 1997-
Sept. 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Molekularbiologie
Prof. Dr. Axel Ullrich

Studium

Oktober 1991-
April 1997 Studium der Biologie an der
Georg-August-Universität Göttingen

Schwerpunkte:

- Zoologie
- Biochemie
- Organische Chemie

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie bei
Prof. Dr. Rüdiger Hardeland mit dem Thema:
Chronobiologische Untersuchungen über Komponenten des
antioxidativen Protektionssystems von *Drosophila melanogaster*

Schulbildung und Wehrdienst

1976-1980 Grundschule in Wilhelmshaven
1980-1989 Integrierte Gesamtschule in Wilhelmshaven
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Jan. 1990-
Dez. 1991 Wehrdienst bei der Bundesmarine im Marineführungsdienst
Bereich Navigation