

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

**Untersuchungen  
zur pathophysiologischen Funktion der  
Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR  
in Mammakarzinomzellen**

**Jens Ruhe**

**aus**

**Coburg**

**2003**

**Erklärung:**

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

**Ehrenwörtliche Versicherung:**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20. Januar 2003

Jens Ruhe

Dissertation eingereicht am 1. Februar 2003

1. Gutachter Prof. Dr. Axel Ullrich

2. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 17. Juni 2003

Meinen Eltern



Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich in der Abteilung für Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt.



INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Signaltransduktion durch Tyrosinphosphorylierung	1
1.2	Tyrosinkinasen	4
1.2.1	Rezeptortyrosinkinasen (RTK <sub>n</sub> )	4
1.2.2	Intrazelluläre Tyrosinkinasen	6
1.3	Tyrosinphosphatasen	7
1.3.1	Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTP <sub>n</sub> )	8
1.3.2	Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen	9
1.3.3	Der katalytische Mechanismus von Proteintyrosinphosphatasen	12
1.3.4	Regulation der Aktivität von Tyrosinphosphatasen	13
1.3.5	Physiologische Funktion von Tyrosinphosphatasen	17
1.4	Die Rezeptortyrosinphosphatase PTP-LAR	20
1.5	Zielsetzung	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Bezugsquellennachweise	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Enzyme	25
2.1.3	Radiochemikalien	25
2.1.4	„Kits“ und Sonstiges	26
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Liganden	26
2.1.6	Medien und Puffer	26
2.1.7	Zellkulturmedien	27
2.1.8	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	27
2.1.9	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	29
2.1.9.1	Bakterienstämme	29
2.1.9.2	Zelllinien	29
2.1.9.3	Antikörper	31
2.1.10	Plasmide und Oligonukleotide	33
2.1.10.1	Ausgangsvektoren	33
2.1.10.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren	34
2.1.10.3	Wichtige Oligonukleotide	37
2.2	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	38
2.2.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	38
2.2.3	Enzymatische Behandlung von DNA	38
2.2.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	38
2.2.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	38
2.2.3.3	Phosphorylierung von 5'-Enden	39
2.2.3.4	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	39
2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	39
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	39
2.2.6	DNA-Transfer in E.coli Bakterien	39
2.2.6.1	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	39
2.2.6.2	Transformation von kompetenten E.coli Bakterien	40
2.2.6.3	Dauerkulturen von E.coli Bakterien	40
2.2.7	Gezielte Mutagenese von DNA	40
2.2.7.1	Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pRK5 DANN	40

2.2.7.2	Synthese des mutierten Stranges	40
2.2.8	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	41
2.2.8.1	PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten	41
2.2.8.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	42
2.2.9	Sequenzierung von DNA	42
2.2.10	Arbeiten mit RNA	42
2.2.10.1	Präparation von Gesamt-RNA	42
2.2.10.2	Präparation von poly-A <sup>+</sup> RNA	43
2.2.10.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	43
2.2.10.4	Northern-Analyse	44
2.2.10.5	Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran	44
2.2.10.6	Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA	44
2.2.11	Arbeiten mit cDNA-Arrays	44
2.2.11.1	Konstruktion der cDNA-Arrays	44
2.2.11.2	Prähybridisation der cDNA-Arrays	45
2.2.11.3	Radioaktive Markierung der cDNA	45
2.2.11.4	Hybridisation	45
2.2.11.5	Waschen der cDNA-Arrays	46
2.2.12	Auswertung der cDNA-Arrays	46
2.2.12.1	Einlesen der cDNA-Arrays und Ermittlung der Expressionsdaten	46
2.2.12.2	Gruppieren der Gene	46
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	47
2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	47
2.3.2	Mykoplasmentest	47
2.3.3	Transfektion von Säugerzellen	48
2.3.3.1	Kalziumphosphat-Transfektion	48
2.3.3.2	Lipofectamine <sup>®</sup> -Transfektion	48
2.3.3.3	Bestimmung der Transfektionseffizienz	48
2.3.4	Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen	49
2.3.5	Induzierbare Expression eines Zielgens mittels des modifizierten Tet-induzierbaren Genexpressionssystem	49
2.3.6	Stimulation von Zellen	50
2.3.7	Nachweis der Transformation eukaryontischer Zellen durch Bildung von Zellfoci („focus formation assay“)	50
2.3.8	Radioaktive Markierung von Zellen	50
2.4	Proteinanalytische Methoden	51
2.4.1	Triton X100-Lyse von Zellen	51
2.4.2	Expression und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins	51
2.4.2.1	Expression eines GST-Fusionsproteins in Bakterien	51
2.4.2.2	Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose	52
2.4.3	Proteinbestimmung	52
2.4.4	Immunpräzipitation von Proteinen	52
2.4.5	In vitro-Assoziation mit GST-Fusionsproteinen	53
2.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.4.7	Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	53
2.4.8	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	54
2.4.9	Immundetektion (Immunoblotanalyse)	54
2.5	Zellbiochemische Untersuchungen	54
2.5.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine sowie der Prozessierung von PTP-LAR	54
2.5.2	Bestimmung der in vitro-Phosphataseaktivität gegenüber pNPP	55

3	ERGEBNISSE	56
3.1	Modifikation des Tetrazyklin-induzierbaren Systems	56
3.1.1	Klonierung des retroviralen Transaktivator-Plasmids SFG-tcITE1-Neo	57
3.1.2	Erzeugung stabiler Transaktivator-exprimierender Zelllinien unter Verwendung von SFG-tcITE1-Neo	58
3.1.3	Klonierung des retroviralen Transaktivator-regulierten Expressionsplasmids SFG-t7EC3M-PHS	59
3.1.4	Klonierung des Transaktivator-Plasmids pcDNA3-tTA-Puro	63
3.2	Assoziation der Proteintyrosinphosphatase LAR mit dem EGFR	64
3.2.1	Assoziation von LAR und EGFR bei transienter Koexpression in HEK-293	64
3.2.2	Herstellung verschiedener zur Untersuchung der Assoziation geeigneter EGFR-Derivate	66
3.2.3	Assoziation von LAR mit dem zytoplasmatischen Teil des EGFRs	67
3.3	Tyrosinphosphorylierung der Proteintyrosinphosphatase LAR	69
3.3.1	Tyrosinphosphorylierung von LAR nach transienter Transfektion verschiedener EGFR-Derivate in HEK-293	69
3.3.2	Tyrosinphosphorylierung endogener LAR in verschiedenen Brustkrebslinien nach EGFR-Stimulation	70
3.3.3	Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von PTP-LAR durch Tyrphostin AG1478	72
3.4	Prozessierung der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR	74
3.4.1	Prozessierung von PTP-LAR nach Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen	74
3.4.1.1	Prozessierung von LAR nach transienter Überexpression des EGFRs in HEK-293	74
3.4.1.2	Prozessierung von LAR nach transienter Überexpression von HER2 in HEK-293	76
3.4.2	Prozessierung von PTP-LAR nach Stimulation von EGFR und HER2	78
3.4.2.1	Prozessierung endogener LAR nach Stimulation mit EGF	78
3.4.2.2	Prozessierung von LAR nach Endothelin-Stimulation in mit ETNR transfizierten HEK-293	79
3.4.2.3	Prozessierung von LAR nach Carbachol-Stimulation in mit M <sub>1</sub> R transfizierten Cos-7-Zellen	80
3.4.2.4	Prozessierung von LAR nach $\beta$ -Heregulin-Stimulation in HER2-stabilen MCF-7 Zellen	81
3.5	Auswirkung verschiedener Inhibitoren auf die Prozessierung von PTP-LAR	82
3.5.1	Inhibition der Prozessierung von LAR durch Tyrphostin AG1478	82
3.5.2	Inhibition der Prozessierung von LAR durch MEK-Inhibitoren	84
3.5.2.1	Inhibition der Prozessierung von LAR durch PD98059	84
3.5.2.2	Inhibition der Prozessierung von LAR durch U01236	86
3.5.3	Inhibition der Prozessierung von LAR durch Batimastat	87
3.6	Prozessierung von PTP-LAR durch die Metalloproteinase ADAM-17	88
3.7	Assoziation von PTP-LAR und ADAM-17	90
3.7.1	Assoziation von PTP-LAR und ADAM-17 bei transienter Koexpression in HEK-293	90
3.7.2	Assoziation von ADAM-17 mit verschiedenen LAR-Derivaten bei transienter Koexpression in HEK-293	91
3.7.3	Assoziation von PTP-LAR mit verschiedenen ADAM-17-GST-Fusionsproteinen	93
3.8	Prozessierungsabhängige Assoziation von PTP-LAR und EGFR	95
3.9	Einfluß der Prozessierung auf die Phosphataseaktivität von PTP-LAR	97
3.10	Phosphorylierung verschiedener Catenine nach EGF-induzierter Prozessierung von PTP-LAR	98
3.11	Biologische Relevanz von PTP-LAR im Rahmen der Zelltransformation	101

3.11.1	Generierung stabiler NIH3T3-Fibroblasten zur Tetrazyklin-induzierbaren Expression verschiedener LAR-Derivate	101
3.11.2	Der Einfluß verschiedener LAR-Derivate auf die HER2-vermittelte Zelltransformation von NIH3T3 Fibroblasten	103
3.12	Untersuchung von PTP-LAR auf der Basis von mRNA-Expressionsprofilen	106
3.12.1	Erstellung von Korrelationsanalysen zu PTP-LAR	106
3.12.2	Gruppierung von Genen mit ähnlichem Expressionsprofil wie PTP-LAR	107
4	DISKUSSION	110
4.1	Modifikation des Tetrazyklin-induzierbaren Systems	110
4.2	Assoziation von PTP-LAR und EGFR	113
4.3	Tyrosinphosphorylierung von PTP-LAR	114
4.4	Stimulierbare proteolytische Prozessierung von PTP-LAR	115
4.5	Mechanismus der Prozessierung von PTP-LAR	119
4.6	Konsequenzen der LAR-Prozessierung	122
4.7	Biologische Bedeutung von PTP-LAR	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	ABKÜRZUNGEN	151

# 1 Einleitung

Der Entwicklung eines vielzelligen Organismus sowie der Aufrechterhaltung seiner Integrität und Funktionalität liegen komplexe Kommunikationsprozesse zugrunde, welche vielfältigste Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Adhäsion von Zellen als auch deren Stoffwechselfvorgänge koordinieren und kontrollieren. Die Kommunikation zwischen Zellen kann dabei durch Kontakt von Zelloberflächen untereinander oder durch Interaktion mit Komponenten der Extrazellulären Matrix vermittelt werden. Ferner nehmen im Rahmen dieses interzellulären Kommunikationssystems lösliche Komponenten eine wichtige Rolle ein. Sie werden als Hormone, Zytokine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sezerniert. Ihre Bindung an spezifische Rezeptoren initiiert die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Reaktionskaskaden, die unterschiedlichste biochemische und zellphysiologische Vorgänge auslösen oder beeinflussen und somit in einer spezifischen Antwort der Zelle resultieren. Obwohl der Anteil an Proteintyrosinphosphorylierung nur etwa 0,05 - 0,1% der Gesamtphosphorylierung zellulärer Proteine beträgt, kommt der gezielten Tyrosinphosphorylierung der an der Signalübertragung beteiligten Proteine eine sehr wesentliche Rolle zu (Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995). Das Ausmaß und die Dauer der Tyrosinphosphorylierung einzelner Signalübertragungskomponenten wird durch ein dynamisch reguliertes Gleichgewicht von Proteintyrosinkinasen (PTKn) und Proteinryrosinphosphatasen (PTPn) bestimmt und reguliert (Sun, 1994; Streuli, 1996). Die durch eine spezifische Tyrosinkinase vermittelte Phosphorylierung eines Proteins wird durch die enzymatische Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen somit zu einem kontrollierten, reversiblen Prozeß.

## 1.1 Signaltransduktion durch Tyrosinphosphorylierung

Die Gegenwart externer Stimuli wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wird über Rezeptortyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermittelt. Die Bindung eines spezifischen Faktors an die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle führt aufgrund dessen homodimerer (z.B. VEGF, PDGF) oder bivalenter (z.B. GH, EPO) Struktur zur Dimerisierung dieser Rezeptoren (Wiesmann et al., 1997; Kossiakoff und De Vos, 1998; Jiang und Hunter, 1999), wobei verschiedene Liganden mit unterschiedlicher Affinität an denselben Dimertyp binden können (Prigent und Lemoine, 1992; Alroy und Yarden, 1997). Die Dimerisierung zwischen den Rezeptoren ist dabei nicht nur auf die Bildung von Homodimeren beschränkt, sondern konnte auch als Interaktion zweier verschiedener Vertreter einer RTK-Unterklasse oder RTK-Familie zu Heterodimeren beobachtet werden (Carraway und Cantley, 1994; Lemmon und Schlessinger, 1994; Wallasch et al., 1995; Olayioye et al., 2000). Folge der Dimerisierung ist die Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität, die in einer gegenseitigen, intermolekularen Phosphorylierung

von Tyrosinresten, der sogenannten Autophosphorylierung, führt (Yarden et al., 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990; Van der Geer et al., 1994; Schlessinger, 1995). Der phosphorylierte und damit aktivierte Rezeptor assoziiert mit spezifischen Proteinen intrazellulärer Signalkaskaden und gibt durch deren Phosphorylierung den externen Stimulus an zytoplasmatische oder kernlokalisierte Zielproteine weiter. Die Interaktion zwischen aktiviertem Rezeptor und den damit assoziierenden Proteinen wird dabei häufig durch spezifische Phosphotyrosinreste vermittelt, die durch SH2- (Src Homologie 2; Koch et al., 1991; Mayer und Baltimore, 1993) oder PTB- (Phosphotyrosin-Bindungs; Kavanaugh und Williams, 1994; Blaikie et al., 1994) Domänen erkannt und gebunden werden. Die Spezifität der Wechselwirkung wird dabei sowohl durch die SH2- bzw. PTB-Domäne als auch durch die den Phosphotyrosinrest umgebenden Aminosäuren determiniert (Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1994; Van der Geer und Pawson, 1995; Margolis, 1999). Neben diesen beiden Bindungsdomänen kann die Assoziation von Signalproteinen an entsprechende Rezeptoren jedoch auch über andere Interaktionsmotive und -mechanismen vermittelt werden (Castagnino et al., 1995). So besitzen viele Signalproteine auch SH3- (Src Homologie 3) Domänen, die spezifisch die Prolin-reiche Sequenz PXXP binden können (Yu et al., 1994; Kuriyan und Cowburn, 1997), sowie PH- (Pleckstrin Homologie) Bindungsmotive, welche mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> oder Produkten stimulierter PI3- (Phosphatidylinositol-3-) Kinase wechselwirken (Ferguson et al., 1995; Lemmon et al., 1995; Czech, 2000). Viele Signalproteine enthalten verschiedene dieser Bindungsmodule, können daher mit mehreren Proteinen interagieren und somit zur Bildung multimerer Signalkomplexe beitragen (Kuriyan und Cowburn, 1997; Pawson und Scott, 1997; Margolis, 1999).

Die an aktivierte Rezeptoren bindenden Proteine lassen sich grundsätzlich in solche mit und solche ohne enzymatische Aktivität unterteilen. Zu Signaltransduktionsmolekülen mit intrinsischer enzymatischer Aktivität gehören unter anderem Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ; Margolis et al., 1989; Meisenhelder et al., 1989; Burgess et al., 1990), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K; Sheperd et al., 1996) und die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 (Vogel et al., 1993). Translokation jener Proteine und die mit der Assoziation mit aktiviertem Rezeptor einhergehende Tyrosinphosphorylierung haben deren enzymatische Aktivierung und infolgedessen die Weiterleitung des Signals zur Folge. Dem stehen Signaltransduktionsmoleküle ohne intrinsische Enzymaktivität gegenüber. Hierzu zählen beispielsweise das drei Isoformen (46, 52 und 66 kDa) aufweisende Protein SHC mit seiner terminalen SH2- und PTB-Domäne und einem zentralen Kollagen-homologen Bereich (Pelicci et al., 1992; Migliaccio et al., 1997), das Insulinrezeptor-Substrat 1 (IRS-1; White, 1994) oder das SH2- und SH3-Domänen umfassende Adaptermoleküle Grb2 (growth factor receptor binding protein 2; Lowenstein et al., 1992; Matuoka et al., 1992). Über spezifische Wechselwirkungen mit anderen Mittlerproteinen tragen auch sie zur Signalweiterleitung bei. So interagiert letzteres über seine SH2-Domäne mit autophosphorylierten RTKs wie beispielsweise dem EGFR, aber auch mit Phosphotyrosinresten von Adapterproteinen wie

SHC oder Gab1 (Grb2-associated binder 1). Es vermittelt dort die Translokation von Sos (son of sevenless) zur Zellmembran in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras (Rozakis-Adcock et al., 1993; Holgado-Madruga et al., 1996), dessen Aktivierung durch GTP/GDP-Austausch zentrale Bedeutung in der Regulation der RTK-kontrollierten Zellproliferation hat (Downward, 1997). Die Translokation der Serin/Threoninkinase Raf-1 hat die Phosphorylierung und damit einhergehend deren Aktivierung zur Folge (Morrison und Cutler, 1997; Barnard et al., 1998). Unter Vermittlung durch die Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/Erk Kinasen 1 und 2) führt dies zur Tyrosin- und Threoninphosphorylierung der MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) Erk1 und Erk2 am regulatorisch wichtigen TEY-Motiv (Robinson und Cobb, 1997) und zu deren Translokation in den Zellkern, wo sie durch Serin/Threoninphosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Elk entscheidend zur Zellproliferation beitragen (Treisman, 1996; Robinson und Cobb, 1997).

Nicht alle Oberflächenrezeptoren, so beispielsweise die Mitglieder der Familie der Zytokinrezeptoren, weisen intrinsische Kinaseaktivität auf. Dennoch induziert deren Stimulation mit spezifischen Liganden sowohl die rasche Tyrosinphosphorylierung zahlreicher intrazellulärer Proteine als auch die des Rezeptors selbst (Kishimoto et al., 1994, Taniguchi, 1995). Diese Rezeptormoleküle rekrutieren und aktivieren zyttoplasmatische Tyrosinkinasen und ermöglichen auf diese Weise die Initiation einer ebenfalls über Phosphorylierung von Tyrosinresten vermittelten Signaltransduktion.

Spezifität für die von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen ausgehenden Signalkaskaden und damit für die Diversität der zellulären Antworten wird auf verschiedenen Ebenen realisiert. Zum ersten wird sie auf der Ebene der Rezeptor-Liganden-Interaktion durch die Einschränkung auf die an den Rezeptor bindenden Liganden erreicht. Weiterhin wird Spezifität durch das Repertoire an Substraten und Signaltransduktionsmolekülen, die mit dem jeweiligen aktivierten Rezeptor assoziieren können, ermöglicht. Hier kommt dem Vorhandensein auch gewebespezifischer Signalmoleküle eine wichtige Bedeutung zu. Schließlich tragen Intensität und Dauer des biochemischen Signals zur Spezifität der jeweiligen RTK-Signalkaskade bei.

In diesem Zusammenhang kommt den Proteintyrosinphosphatasen eine wichtige regulatorische Rolle zu, da sie in vielen Fällen als Antagonisten der Tyrosinkinasen zur Termination der von jenen initiierten Signalkaskaden beitragen und damit einen wichtigen Beitrag zu diesem komplexen Signalnetzwerk leisten. Während sich die Zahl der bislang identifizierten Proteintyrosinphosphatasen ständig erweitert, konnte in vergleichsweise wenigen Fällen deren physiologische Funktion eindeutig ermittelt werden. Die bisher untersuchten Beispiele machen jedoch deutlich, daß Phosphatasen sowohl negativ, aber auch positiv regulatorisch auf phosphorylierungsabhängige Signalübertragungswege einwirken können. Vor der ausführlicheren Diskussion dieser Proteine soll jedoch die Familie der Tyrosinkinasen kurz vorgestellt werden.

## 1.2 Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen bilden neben Serin- und Threoninkinasen eine der größten bislang bekannten Familien homologer Proteine und Gene. Allen Tyrosinkinasen gemeinsam ist die enzymatische Reaktion, nämlich die Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste unter Verbrauch von ATP. Strukturelle Vielfalt begründet die Spezifität und die unterschiedlichen Funktionen verschiedener Tyrosinkinasen. Prinzipiell unterscheidet man zwischen membranständigen Rezeptortyrosinkinasen und zytoplasmatischen Tyrosinkinasen.

### 1.2.1 Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)

Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) nehmen als Transmembranproteine Rezeptorfunktion für Wachstumsfaktoren und Neutrophine wahr und sind als solche maßgeblich in der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Stoffwechselvorgängen involviert (van der Geer et al., 1994). Sie verfügen über eine extrazelluläre glykosylierte Domäne, eine einzelne Transmembranregion sowie über einen intrazellulären Teil mit der Kinasedomäne. Entsprechend bestimmter Strukturmerkmale innerhalb der Extrazellulärdomäne wurden die bislang etwa 50 bekannten Rezeptortyrosinkinasen in 19 verschiedenen Unterfamilien eingeteilt (van der Geer et al., 1994; Plowman et al., 1994). Eine Zusammenfassung ist in Abb. 1 dargestellt. So weisen der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGFR (HERc, ErbB1; Ullrich et al., 1984) oder der ihm verwandte Rezeptor HER2 (ErbB2/neu; Coussens et al., 1985) eine monomere Struktur auf und enthalten zwei cysteinreiche Sequenzen in ihrer Ligandenbindungsdomäne. Desweiteren umfaßt die EGFR-Familie die beiden Rezeptoren HER3 (ErbB3; Kraus et al., 1989) und HER4 (ErbB4; Plowman et al., 1994), wobei HER3 aufgrund einer Punktmutation in der katalytischen Domäne eine Sonderstellung innerhalb der EGFR-Familie einnimmt (Guy et al., 1994). Der Insulinrezeptor und der Rezeptor für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-1 (IGF-1R) zeigen hingegen eine heterotetramere Struktur. Die Untereinheiten gehen dabei aus der proteolytischen Prozessierung eines Vorläuferproteins hervor und sind durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (Ullrich et al., 1985, 1986). Rezeptortyrosinkinasen einer weiteren Unterfamilie zeichnen sich durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen im extrazellulären Teil aus und sind im intrazellulären Teil durch eine Insertion in der Kinasedomäne gekennzeichnet. Die wichtigsten Vertreter hiervon sind die Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren aus Blutplättchen PDGF-AA und PDGF-BB ( $\alpha/\beta$ -PDGFR; Yarden et al., 1986), der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Wachstumsfaktor CSF-1 (CSF-1R; Coussens et al., 1986) sowie der als c-Kit bezeichnete Rezeptor für den Stammzellfaktor SCF (Yarden et al., 1987). Bei anderen RTK-Familien finden sich unter anderem Discoidin- und Cadherin-ähnliche Domänen sowie „Kringel-Motive“ im Bereich der Extrazellulärdomäne.

Trotz struktureller Vielfalt der Rezeptortyrosinkinasen erfolgt deren Aktivierung nach einem ihnen gemeinsamen Mechanismus, demzufolge die Bindung des jeweils spezifischen Liganden über eine Konformationsänderung die Dimerisierung der Rezeptoren induziert und zur bereits erwähnten Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne führt (Greenfield et al., 1989; Ullrich und Schlessinger, 1990; Lemmon und Schlessinger, 1994). Letztere umfaßt neben der Juxtamembranregion die circa 250-300 Aminosäuren lange, hochkonservierte Kinasedomäne mit der ATP-Bindungsstelle sowie den carboxyterminalen Bereich (Ullrich und Schlessinger, 1990). Am Carboxyterminus finden sich häufig zahlreiche Tyrosinreste, die im Zuge der Aktivierung des Rezeptors autophosphoryliert werden und die anschließende Rekrutierung zellulärer Substrate und damit deren Tyrosinphosphorylierung durch die Rezeptorkinase vermitteln (Yarden und Ullrich, 1988; Schlessinger, 1988).

Der gemeinsame Mechanismus zur Aktivierung von RTKs ist unter anderem durch die Funktionalität von Rezeptorchimären - Fusionen aus von verschiedenen RTKs stammenden extra- und intrazellulären Domänen - belegt. So lassen sich Chimärenmoleküle aus der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors und den intrazellulären Domänen von HER2 (HER-1/2), c-Kit (EK-R) und  $\beta$ -PDGFR (EP-R) mit EGF stimulieren, weisen jedoch im wesentlichen die Signaltransduktionseigenschaften desjenigen Rezeptors auf, dessen intrazelluläre Domäne sie enthalten (Lee et al., 1989; Lehvälaiho et al., 1989; Seedorf et al., 1991).

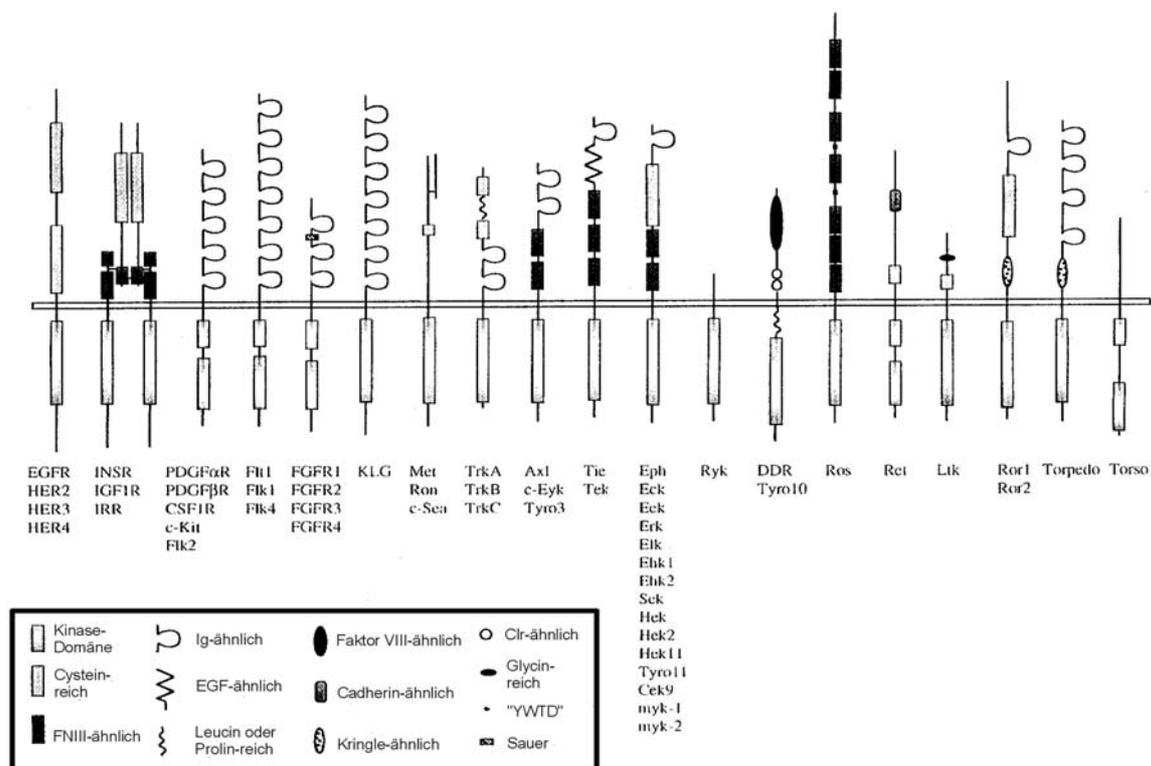


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen RTK-Familien

Die Abbildung zeigt die derzeit 19 Unterfamilien, in die die Rezeptortyrosinkinasen aufgrund von Sequenzvergleichen in der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (nach Sugan Inc.).

## 1.2.2 Intrazelluläre Tyrosinkinasen

Intrazelluläre Tyrosinkinasen enthalten in vielen Fällen neben der Kinasedomäne zusätzliche Strukturelemente, die die Wechselwirkung mit anderen Proteinen und/oder die Lokalisation innerhalb der Zelle regulieren. So setzen sich Vertreter der Src-Kinasefamilie, von deren neun bekannten Mitgliedern die Kinasen Src (Takeja und Hanafusa, 1983), Fyn (Semba et al., 1986) und Yes (Sukegawa et al., 1987) in fast allen Geweben exprimiert werden, neben der Tyrosinkinasedomäne aus den nach ihnen benannten SH2- und SH3-Domänen sowie einem regulatorisch wichtigen Carboxyterminus zusammen (Erpel und Courtneidge, 1995). Auf die regulatorische Bedeutung dieser zusätzlichen Strukturelemente in Zusammenhang mit der inhibitorisch wirkenden Tyrosinkinase Csk (Carboxyterminale Src Kinase) wird im folgenden Absatz eingegangen. Neben dieser regulatorischen Funktion vermittelt die SH2-Domäne die Assoziation mit tyrosinphosphorylierten Proteinen, während SH3-Domänen über Bindung an Prolin-reiche Sequenzen die Lokalisation an der Plasmamembran oder dem Zytoskelett vermitteln (Mayer und Baltimore, 1993; Morton und Campbell, 1994; Cohen et al., 1995). Irreversible Modifikation des Aminoterminus durch Myristoylierung erlaubt den ansonsten größtenteils zytosolisch vorkommenden Kinasen der Src-Familie ebenfalls die Assoziation mit der Zellmembran (Resh, 1994). Darüberhinaus können Lck und Fyn an ihrem Aminoterminus palmitoyliert werden und infolgedessen mit Proteinen interagieren, die an der Außenseite der Plasmamembran durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker gebunden sind (Paige et al., 1993; Shenoy-Scaria et al., 1993).

Die Bedeutung der Lokalisation und damit der Kollokalisierung mit potentiellen Substraten für die gerichtete Aktivität dieser Enzyme wird desweiteren anhand der Kinase FAK (focal adhesion kinase) deutlich, die außer der Kinasedomäne keine signifikante Homologie zu bekannten Strukturelementen aufweist. FAK ist ausschließlich an fokalen Adhäsionspunkten der Zelle lokalisiert (Schaller und Parsons, 1993) und entsprechend in die Phosphorylierung dort lokalisierter Proteine wie Paxillin involviert (Schaller und Parsons, 1992, 1995). Die Kinase c-Abl hingegen ist, bedingt durch eine Lokalisationssequenz im Aminoterminus, größtenteils im Zellkern lokalisiert. Deletionen innerhalb dieser Sequenz haben zytoplasmatische Lokalisation der Kinase und Transformation der diese Mutanten exprimierenden Zellen zur Folge (van Elten et al., 1989; Jackson und Baltimore, 1989).

Vergleichbar zu den Rezeptortyrosinkinasen erfolgt die katalytische Aktivierung auch vieler intrazellulärer Kinasen durch intermolekulare oder autokatalytische Tyrosinphosphorylierung (Kmiecik et al., 1988; Guan und Shalloway, 1992; Calalb et al., 1995). Einem komplexen Mechanismus unterliegt die Regulation der Aktivität von Src-Kinasen. Hier bewirkt die inhibitorisch wirkende Tyrosinkinase Csk (Carboxyterminale Src Kinase) durch Phosphorylierung eines regulatorisch bedeutsamen Tyrosinrestes im Carboxyterminus der Src-Kinasen deren Fixierung in einer inaktiven Konformation (Okada und Makagawa, 1989; Okada et al., 1991; Bergman et al., 1992). Dieser liegt vermutlich eine intramolekulare Bindung des

Phosphotyrosinrestes an die SH2-Domäne desselben Moleküls zugrunde, wobei die SH3-Domäne eine konformationsstabilisierende Funktion wahrnimmt (Cooper und Howell, 1993; Superti-Furga et al., 1993). Nur bei Dephosphorylierung des negativ regulatorischen Tyrosinrestes im Carboxyterminus nehmen Src-Kinasen eine Konformation ein, die die Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes in der Kinasedomäne, damit die Aktivierung der Kinaseaktivität sowie den Zugang zellulärer Substrate ermöglicht (Kmiecik et al., 1988; Cooper und Howell, 1993). Dieser für die Regulation von Src-Kinasen postulierte Mechanismus fand in der Aufklärung der Röntgenstruktur von Src und Hck Unterstützung (Superti-Furga und Gonfloni, 1997; Featherstone, 1997; Xu et al., 1997; Sicheri et al., 1997).

Intrazelluläre Tyrosinkinase sind in der Signaltransduktion ebenfalls solcher Prozesse involviert, die durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst und durch Rezeptorproteine in das Zellinnere vermittelt werden. So können Src-Kinasen sowohl durch RTKs als auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden (Chen et al., 1994; Sadoshima und Izumo, 1996; Parsons und Parsons, 1997). Da diese Familie zytoplasmatischer Kinasen die Genexpression des für den Zellzyklus notwendigen Transkriptionsfaktors c-Myc vermitteln, sind sie für EGF- und PDGF-induzierte Zellproliferation von essentieller Bedeutung (Barone und Courtneidge, 1995; Erpel et al., 1996; Broome und Hunter, 1996). Daneben erfolgt die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zellinnere oftmals durch Transmembranrezeptoren, die im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinase selbst keine intrinsische Kinaseaktivität besitzen. Wie bereits erwähnt, assoziieren diese Rezeptoren stattdessen mit intrazellulären Tyrosinkinase und vermitteln ihre vielfältigen Effekte durch Aktivierung derselben. Die größte Klasse dieser Art von Rezeptoren stellen die Zytokinrezeptoren für Interferone, Interleukine, Erythropoietin oder Prolactin dar (Kishimoto et al., 1994; Ziemiecki et al., 1994; Taniguchi, 1995), aber auch die Aktivierung von T- und B-Zellen über T- und B-Zell-Rezeptorkomplex erfolgt nach diesem Mechanismus (Mustelin und Burn, 1993; Weiss und Littman, 1994).

Extrazelluläre Signale, die durch die Aktivierung intrazellulärer Kinasen vermittelt werden, beschränken sich dabei nicht nur auf lösliche Faktoren, sondern umfassen auch Effekte der Zelladhäsion und der Interaktion mit Komponenten der Extrazellulären Matrix. So kommt der an fokalen Adhäsionspunkten lokalisierten Kinase FAK eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion von Zelloberflächenmolekülen der Integrin-Familie zu (Schaller und Parsons, 1993; Juliano und Haskill, 1993).

### 1.3 Tyrosinphosphatasen

Sehr bald nach der Entdeckung der Tyrosinkinase gab es erste Hinweise auf die Existenz und Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen. Mit der vollständigen Aufreinigung und Sequenzanalyse der zytosolischen Phosphatase 1B wurde das erste Enzym einer neuen

Phosphatasefamilie entdeckt, die spezifisch die Dephosphorylierung von Tyrosinresten katalysiert (Tonks et al., 1988a, 1988b). Während ein Sequenzvergleich mit Serin-/Threoninspezifischen Phosphatasen oder Alkalischer Phosphatase keine wesentlichen Übereinstimmungen ergab, konnte eine deutliche Homologie zu dem in Leukozyten exprimierten, membranständigen Protein CD45 gezeigt und eine stark konservierte Proteintyrosinphosphatase-Domäne identifiziert werden (Charbonneau et al., 1988, 1989).

Diese Phosphatasedomäne besteht aus etwa 250 Aminosäuren und umfaßt verschiedene hochkonservierte Bereiche. Das hierbei zentrale Motiv - Teil des katalytischen Zentrums und für Proteintyrosinphosphatasen absolut charakteristisch - weist die Peptidsequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G auf, wobei X jeder beliebigen Aminosäure entsprechen kann (Zhang und Dixon, 1994).

Außerhalb der Phosphatase-Domäne weisen Phosphatasen eine starke strukturelle Vielfalt auf. Auf der Basis dieser verschiedenen Strukturmerkmale und der Lokalisation innerhalb der Zelle werden analog den Proteintyrosinkinase transmembranäre und zytoplasmatische Proteintyrosinphosphatasen einander gegenübergestellt.

### 1.3.1 Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTPn)

Membranständige, rezeptorähnliche Proteintyrosinphosphatasen bestehen aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Bereich mit einer oder zwei Phosphatasedomänen. Vor allem aufgrund der Diversität im extrazellulären Bereich werden auch Rezeptortyrosinphosphatasen in verschiedene Klassen unterteilt.

Die Klasse I umfaßt dabei die in hämatopoietischen Zellen exprimierte Phosphatase CD45 (Thomas et al., 1985; Charbonneau et al., 1988, 1989) sowie Ch-PTP1 (Fang et al., 1994). Neben zwei charakteristischen Phosphatasedomänen im zytoplasmatischen Teil weisen Klasse-I-Phosphatasen in ihrem extrazellulären Bereich zwei Spektrin-ähnliche Elemente und ein Fibronectin-ähnliches Motiv auf (Fang et al., 1994). CD45 kommt im Rahmen der Antigen-induzierten Aktivierung von B- und T-Zell-Rezeptoren eine zentrale Rolle zu (Trowbridge und Thomas, 1994).

Charakteristisch für die Klasse II membranständiger Phosphatasen ist das gemeinsame Vorkommen von Immunglobulin- und Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen innerhalb des extrazellulären Proteinbereichs. Hierbei handelt es sich um für Zelladhäsionsmoleküle typische Strukturelemente, wie sie beispielsweise in L1/Ng-CAM oder N-CAM (Williams und Barclay, 1988; Cunningham, 1995) zu finden sind. Dieser Untergruppe werden die Phosphatasen LAR (Streuli et al., 1988; Pot et al., 1991), PTP $\sigma$  (Yan et al., 1993; Walton et al., 1993; Zhang et al., 1994, Ogata et al., 1994), PTP $\delta$  (Krueger et al., 1990; Mizuno et al., 1993), PTP $\mu$  (Gebbink et al., 1991), PTP $\kappa$  (Fuchs et al., 1992; Jiang et al., 1993) sowie die in *Drosophila melanogaster* identifizierten Phosphatasen DLAR und DPTP (Streuli et al., 1989)

zugeordnet. Auf die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von PTP-LAR wird an späterer Stelle ausführlicher eingegangen.

Als extrazelluläres Strukturmerkmal weisen Klasse-III-Rezeptortyrosinphosphatasen charakteristischerweise ausschließlich Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen in unterschiedlicher Anzahl auf. Für die Mehrzahl der Mitglieder dieser Familie ist weiterhin das Vorhandensein von nur einer Phosphatasedomäne kennzeichnend. Entsprechend dieser Strukturmerkmale werden PTP $\beta$  (Krueger et al., 1990), DEP-1 (Östman et al., 1994), SAP-1 (Matozaki et al., 1994) sowie in *Drosophila* die Phosphatasen DPTP10D (Yang et al., 1991) und DPTP99A (Hariharan et al., 1991) dieser Familie zugeordnet. PTP99A stellt aufgrund des Vorhandenseins von zwei Phosphatasedomänen in gewissem Maße eine Ausnahme dar, wobei in der zweiten, carboxyterminalen Domäne der katalytisch essentielle Cysteinrest nicht konserviert ist (Hariharan et al., 1991).

Die Klasse IV der rezeptorähnlichen Phosphatasen wird von membranständigen Phosphatasen mit nur sehr kurzem extrazellulären Bereich gebildet. Dieser umfaßt für die beiden Vertreter PTP $\alpha$  (Krueger et al., 1990; Matthews et al., 1990; Sap et al., 1990; Kaplan et al., 1990) und PTP $\epsilon$  (Krueger et al., 1990) 27 bzw. 123 Aminosäuren und läßt keine Homologie zu bekannten Strukturmotiven erkennen.

Als charakteristisch für die Klasse-V-Phosphatasen PTP $\gamma$  und RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$  gilt neben einer Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domäne ein sogenanntes CAH-Motiv im aminoterminalen extrazellulären Bereich, das Homologie zu dem Enzym Carboanhydratase aufweist. Die für dessen katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren sind jedoch nicht konserviert. Eine lösliche Form des extrazellulären Bereiches der Phosphatase RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$  wurde im Gehirn als Phosphacan (3F8 Proteoglycan), einem Chondroitinsulfat-Proteoglycan, identifiziert (Barnea et al., 1994; Maurel et al., 1994; Shitara et al., 1994).

### 1.3.2 Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen

Ähnlich den Rezeptortyrosinphosphatasen werden auch die zytoplasmatischen Proteintyrosinphosphatasen auf der Basis zusätzlich zur Phosphatasedomäne vorhandener Struktur- und Funktionsmotive in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Die zytoplasmatischen Phosphatasen PTP1B (Charbonneau et al., 1989; Guan et al., 1990; Chernoff et al., 1990) und TC-PTP (Cool et al., 1989; Swarup et al., 1991; Mosinger et al., 1992) weisen am Carboxyterminus einen hydrophoben Sequenzbereich auf, dem für die Verankerung von PTP1B im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Frangioni et al., 1992; Woodford-Thomas et al., 1992) bzw. TC-PTP im perinukleären Raum (Cool et al., 1990) eine maßgebliche Rolle zukommt. Die unmittelbare Lokalisation von PTP1B am Endoplasmatischen Retikulum scheint für die Regulation der katalytischen Aktivität von Bedeutung zu sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die durch eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protease

vermittelte proteolytische Spaltung von PTP1B zu deren Freisetzung vom ER führt und dies mit einer Zunahme der katalytischen Aktivität einhergeht. Ähnlich wurde für TC-PTP eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Entfernung des carboxyterminalen Segmentes beobachtet (Cool et al., 1990).

Eine weitere Gruppe von intrazellulären Phosphatasen definiert sich durch das Vorhandensein einer sogenannten Ezrin-ähnlichen Domäne. Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Motiv mit Homologie zu Proteinen wie Bande4.1-Protein, Ezrin, Radixin oder Talin (Conboy et al., 1986; Sato et al., 1992), die am Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Die Untergruppe dieser Phosphatasen wird durch die Mitglieder MEG-1 (Gu et al., 1991), PTP-H1 (Yang et al., 1991), PTPD1 (Möller et al., 1994) sowie PTP-BAS (Maegawa et al., 1994; Saras et al., 1994; Banville et al., 1994, Sato et al., 1995) gebildet. Der Aufbau und die Umstrukturierung des Zytoskeletts geht in vielen Fällen mit der Tyrosinphosphorylierung verschiedener, mit dem Zytoskelett kolokalisierender und assoziierender Proteine einher (Luna und Hitt, 1992), wobei zahlreiche Komponenten der Zytoskeletts direkte Substrate für Tyrosinkinasen darstellen (Daniel und Reynolds, 1997). Die Identifizierung der Ezrin-ähnlichen Domäne deutet daher auf eine Interaktion dieser Phosphatase-Untergruppe mit Komponenten des Zytoskeletts und auf eine mögliche regulatorische Rolle im Rahmen des Aufbaus und der Organisation des Zytoskeletts hin. Desweiteren weisen MEG-1, PTP-H1 und PTPD1 ein, PTP-BAS fünf sogenannte GLGF-Motive auf. Eine derartige Struktur wurde in der an Zellverbindungen assoziierten Guanylat-Kinase (Kim und Wong, 1995) oder in Proteinen mit sogenannten PEST-Wiederholungen gefunden. Eines der fünf GLGF-Motive in PTP-BAS vermittelt die Bindung dieser Phosphatase an den Transmembranrezeptor FAS-1 (Sato et al., 1995).

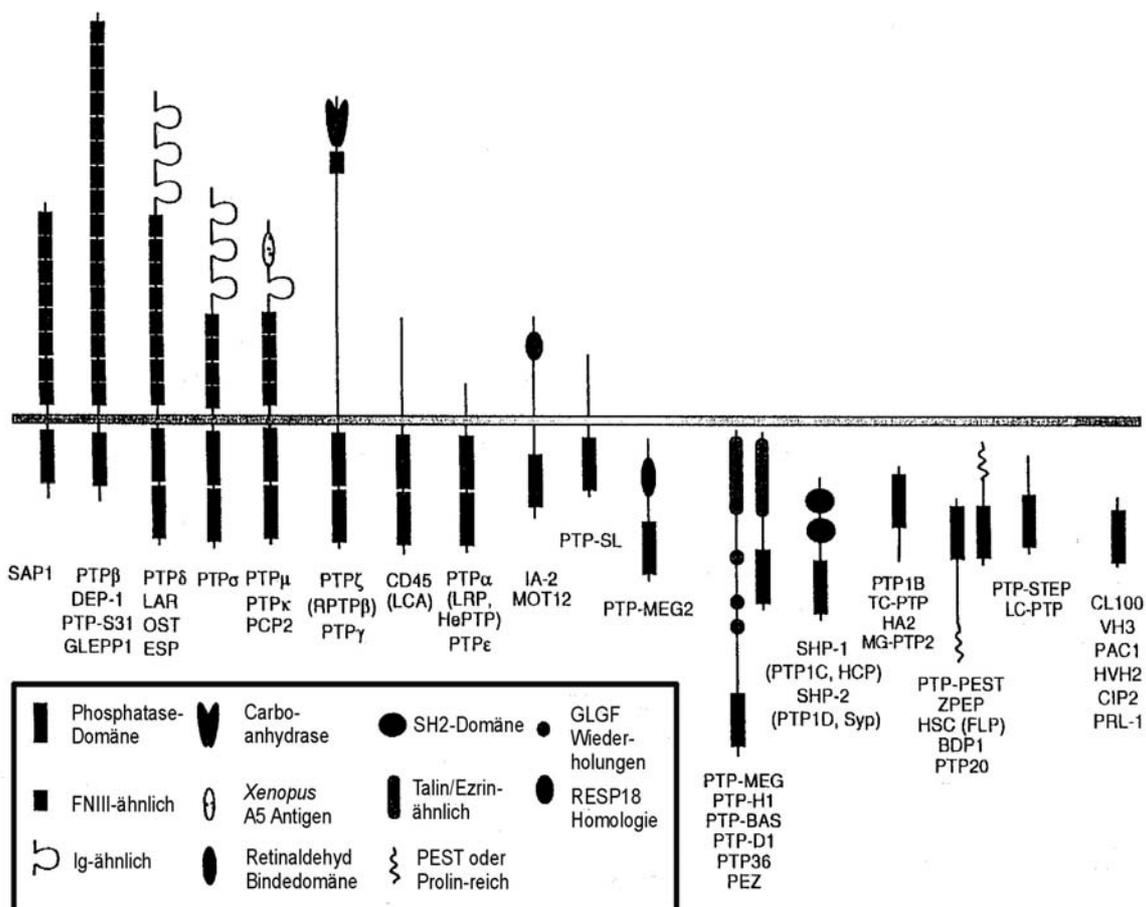
Als ein weiteres Strukturmerkmal finden sich in den Phosphatasen Corkscrew (Csw; Perkins et al., 1992), SHP-1 (Shen et al., 1991; Yi et al., 1992; Matthews et al., 1992) und SHP-2 (Freeman et al., 1992; Vogel et al., 1993; Feng et al., 1993) zwei N-terminale Src Homologie 2 (SH2)-Domänen. Diese für phosphorylierte Tyrosinreste spezifischen und hochaffinen Bindungsdomänen erlauben den Vertretern dieser Phosphataseuntergruppe die spezifische Interaktion mit aktivierten Rezeptortyrosinkinase und anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen. In Folge der durch diese Proteininteraktionsdomänen vermittelten Lokalisation üben jene Phosphatasen am Ort ihrer Rekrutierung sowohl positiv als auch negativ regulatorischen Einfluß auf diverse intrazelluläre Signalübertragungskaskaden aus.

Zytoplasmatische Phosphatasen wie PTP-PEST (Yang et al., 1993; Takegawa et al., 1992) und die verwandte, im Zellkern lokalisierte Phosphatase PEP (Matthews et al., 1992; Flores et al., 1994) zeichnen sich durch sogenannte PEST-Motive - carboxyterminale, etwa 500 Aminosäuren umfassende Bereiche - aus. Dieses Sequenzmotiv wurde in einer Reihe von Proteinen mit diversen Funktionen identifiziert und vermittelt deren schnelle Degradierung (Rogers et al., 1986). Ob dem PEST-Motiv auch in dieser Phosphatasegruppe ähnliche Funktion zukommt, ist noch ungeklärt.

In der Sequenz der zytoplasmatischen Phosphatase STEP (Lombroso et al., 1991) konnten bisher außerhalb der Phosphatasedomäne keine Strukturmerkmale oder Homologien zu bekannten Proteinmotiven identifiziert werden.

Eine Sonderstellung innerhalb der zytoplasmatischen Phosphatasen nehmen die „dual-spezifischen“ Phosphatasen ein, die die Abspaltung einer Phosphatgruppe sowohl von Tyrosin- als auch von Serin-/Threoninresten katalysieren können. Dieser Gruppe zugeordnete Phosphatasen weisen eine sehr geringe Homologie zu Mitgliedern der Familie der Tyrosin-spezifischen Phosphatasen auf. Gemeinsam ist ihnen im wesentlichen lediglich die für den katalytischen Mechanismus maßgebliche Sequenz, die den essentiellen Cystein- sowie den benachbarten Histidinrest einschließt (Guan und Dixon, 1991).

Die systematische Zusammenstellung der wesentlichen Gruppen der Proteintyrosinphosphatasen in Abbildung 2 macht die enorme Diversität und Vielfalt dieser Proteinklasse deutlich und weist auf ihre zentrale biologische Funktion in der Regulation der intra- und interzellulären Kommunikation hin.

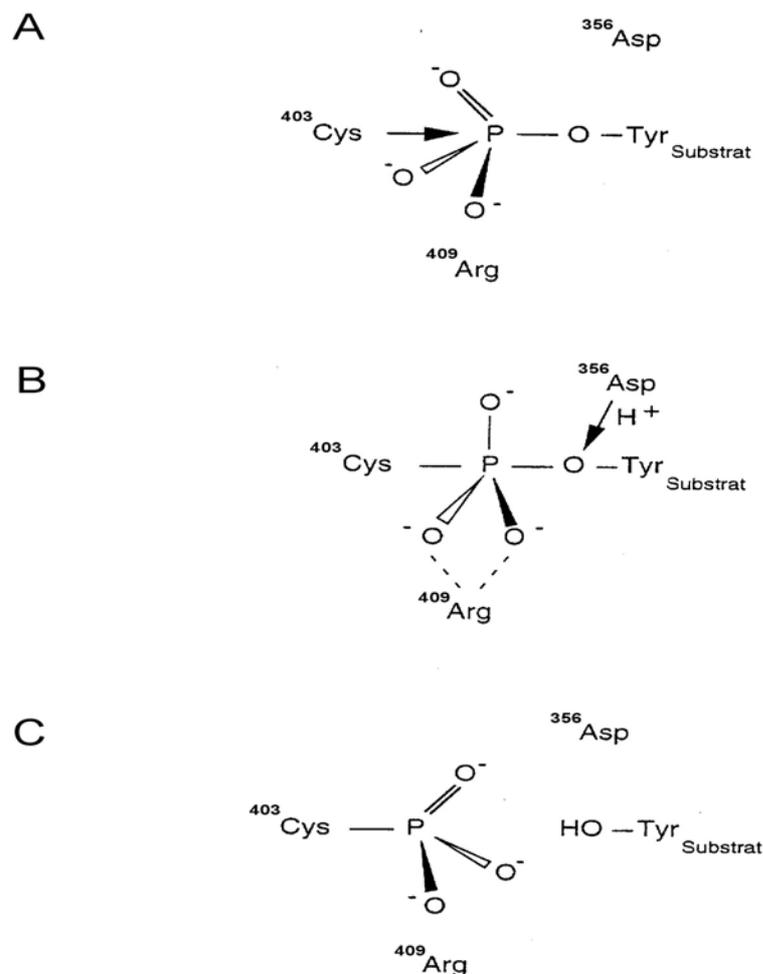


**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Familie der Proteintyrosinphosphatasen

Die Abbildung gibt einen Überblick über die Familie der Proteintyrosinphosphatasen mit den Unterfamilien der Rezeptortyrosinphosphatasen sowie den zytoplasmatischen Phosphatasen und den eine Sonderrolle einnehmenden „Dual-spezifischen“ Phosphatasen (nach Sugan Inc.).

### 1.3.3 Der katalytische Mechanismus von Proteintyrosinphosphatasen

Der ausgeprägten Homologie im Bereich des katalytischen Zentrums, das durch die Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G gekennzeichnet ist (Charbonneau et al., 1989; Krueger et al., 1990; Zhang und Dixon, 1994; Zhang et al., 1994a, 1994b), liegt der allen Tyrosinphosphatasen gemeinsame katalytische Mechanismus zugrunde. Von essentieller Bedeutung für die Phosphataseaktivität ist hierbei der im katalytischen Zentrum konservierte Cysteinrest. Der Austausch dieses Cysteins gegen Alanin oder Serin führt zur vollständigen Inhibition der Phosphataseaktivität (Streuli et al., 1989, 1990; Guan und Dixon, 1991; Pot et al., 1991). Die Bedeutung dieses hochkonservierten Aminosäurerestes erklärt sich aus dem Mechanismus der enzymatischen Reaktion von Phosphatasen, welcher mittels biochemischer Analysen insbesondere an der *Yersinia* PTPase aufgeklärt wurde (Zhang und Dixon, 1994; Zhang et al., 1994b).

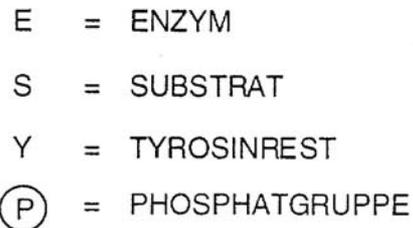


**Abb. 3: Der Katalysemechanismus von Proteintyrosinphosphatasen**

Die Numerierung der an der Reaktion beteiligten Aminosäuren entspricht der Position in der Tyrosinphosphatase von *Yersinia*. Weitere Erläuterungen zu dieser Abbildung finden sich im Text.

Nach der Bindung eines Substrats an das katalytische Zentrum der Phosphatase kommt es zu einem nukleophilen Angriff des subtrahierten Schwefelatoms des Cysteinrestes auf das Phosphoatom des phosphorylierten Tyrosinrestes (Abb. 3A). Daraus resultiert die Ausbildung eines pentakovalenten Übergangszustandes, der durch die Guanidinogruppe eines benachbart liegenden Argininrestes im katalytischen Zentrum stabilisiert wird (Abb. 3B). Die abgehende Gruppe, und damit das Substrat, wird anschließend von einem als katalytische Säure fungierenden Asparaginsäurerest protoniert (Abb. 3C; Zhang und Dixon, 1994; Zhang et al., 1994b; Denu et al., 1995, 1996; Hengge et al., 1995). Als Ergebnis resultiert aus dieser ersten Teilreaktion des Katalysemechanismus von PTPasen ein kovalentes Enzym-Thiophosphat-Intermediat (Zhang und Dixon, 1994; Zhang et al., 1994) und das freie, dephosphorylierte Substrat.

In einem zweiten Schritt wird die Phosphatase regeneriert. Hierbei findet eine Hydrolyse des kovalenten Enzym-Phosphat-Intermediats unter Freisetzung von organischem Phosphat als zweitem Reaktionsprodukt statt. Vereinfacht läßt sich die katalytische Reaktion von Proteintyrosinphosphatasen mit folgender Gleichung beschreiben:



Durch die Aufklärung der Tertiärstruktur von PTP1B (Barford et al., 1994; Jia et al., 1995) und *Yersinia* PTPase (Stuckey et al., 1994) konnten die Ergebnisse der biochemischen Studien zur Untersuchung des Katalysemechanismus von Proteintyrosinphosphatasen bestätigt werden.

### 1.3.4 Regulation der Aktivität von Tyrosinphosphatasen

Für die Regulation der Aktivität von Phosphatasen werden in der Literatur verschiedene Mechanismen diskutiert, die hier nur im Überblick wiedergegeben werden können. In Zusammenhang mit der Regulation von Rezeptortyrosinphosphatasen durch Bindung potentieller Liganden soll hier vor allem RPTPβ/PTPζ angeführt werden. Für diese Phosphatase konnte neben der Assoziation mit dem Adhäsionsmolekül Contactin (Peles et al.,

1998) auch die hochaffine Interaktion mit den Zytokinen Pleiotrophin und Midkin als lösliche Liganden (Maeda et al., 1998; Maeda et al., 1999) gezeigt werden. Letzteres übt dabei einen inhibitorischen Effekt auf die intrinsische Phosphataseaktivität seines Rezeptors aus und begründet damit sehr wahrscheinlich die aktivierende Wirkung Pleiotrophins auf die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin (Meng et al., 2000). Für die an späterer Stelle ausführlicher diskutierte Phosphatase PTP-LAR sei hier auf die Identifizierung des Laminin-Nidogen-Komplexes ebenfalls als Ligand hingewiesen (O'Grady et al., 1998).

Alternatives Spleißen ermöglicht als Regulationsprinzip auf Transkriptionsebene die Expression unterschiedlicher Isoformen mit unterschiedlichen Auswirkungen unter Umständen auf die Aktivität oder Lokalisation von Phosphatasen. Letzteres wird anhand der zytoplasmatischen *Drosophila*-Phosphatase DPTP61F deutlich, deren vollständige Form mit der Zytoplasmamembran assoziiert, wohingegen die am Carboxyterminus deletierte Spleißvariante ausschließlich nukleär lokalisiert ist (McLaughlin und Dixon, 1993). Im Falle der membranständigen Phosphatase PTP $\epsilon$  geht TPA-induzierte Differenzierung von HL-60 Zellen mit der Expression einer zytoplasmatischen Isoform einher, die auf der PKC-vermittelten Transkription eines alternativen, Isoform-spezifischen 5'-Exons und Promotors basiert (Elson und Leder, 1995). Obwohl Spleißvarianten der extrazellulären Domänen von CD45 (Chui et al., 1994), LAR (O'Grady et al., 1994, 1998; Zhang und Longo, 1995; Zhang et al., 1998; Honkaniemi et al., 1998), PTP $\delta$  (Pulido et al., 1995) und PTP $\sigma$  (Yan et al., 1993; Rotin et al., 1994; Ogata et al., 1994) gewebe- oder zellspezifische Expression zeigen, sind neben der Bedeutung für die Modulation der Laminin-Nidogen-Komplex-Bindung an PTP-LAR (O'Grady et al., 1998) die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Isoformen noch weitgehend unbekannt.

Als weitere Regulationsmöglichkeit rezeptorähnlicher Phosphatasen wird deren Inhibition durch Dimerisierung diskutiert. So hatte die antikörpervermittelte (Trowbridge und Thomas, 1994) bzw. chimärenbedingte (Desai et al., 1993) Homodimerisierung von CD45 deren katalytische Inhibition und die Unterdrückung TCR-vermittelter Signaltransduktion in entsprechenden Rekonstitutionssystemen zur Folge (Desai et al., 1993). Ursächlich hierfür ist eine gegenseitige Blockierung des aktiven Zentrums durch entsprechende Strukturelemente des jeweils anderen Dimerisierungspartners (Majeti et al., 1998). Strukturelle Grundlage für dimerisierungsbedingte Inhibition von RPTPn ergaben sich desweiteren aus der Kristallstrukturanalyse ebenfalls als Dimer vorliegender D1-Domänen von RPTP $\alpha$ . Hierbei wurde deutlich, daß sich ein N-terminales „Helix-Turn-Helix“-Motiv eines Monomers in das aktive Zentrum des jeweils anderen Monomers legte und damit ebenso die Zugänglichkeit für Substrat blockiert wurde (Bilwes et al., 1996). Mutationen innerhalb dieser inhibierenden Motive führten zur Revertierung der homodimerisierungsvermittelten Inhibition beider Phosphatasen (Majeti et al., 1998; Jiang et al., 1999). In transgenen Mäusen hatte eine inaktivierende Punktmutation (E613R) im Inhibitormotiv von CD45 die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten sowie spontane Autoimmunität und schließlich den Tod der

Tiere zur Folge (Majeti et al., 2000). Dieser Mechanismus scheint bisher jedoch nur für die beiden eben genannten Phosphatasen relevant zu sein. Die PTP-Domäne D1 von RPTP $\mu$  kristallisiert zwar ebenfalls als Dimer, eine Interferenz hinsichtlich der Substratzugänglichkeit wurde jedoch nicht beobachtet (Hoffmann et al., 1997). Auch im Falle von PTP-LAR wird der intrazelluläre Teil in einer für beide Phosphatasedomänen zugänglichen Form stabilisiert (Nam et al., 1999). Heterodimerisierung zwischen der PTP $\sigma$ -D1- und der PTP $\delta$ -D2-Phosphatasedomäne hatte eine Verringerung der *in vitro* Aktivität der PTP $\sigma$ -Domäne zur Folge und führte zu dem Modell, daß die Funktion der bei vielen Rezeptortyrosinphosphatasen katalytisch inaktiven membrandistalen Phosphatasedomäne in der Regulation der Aktivität der membranproximalen Domäne damit interagierender Phosphatasen liegt (Wallace et al., 1998).

Auf der Ebene posttranslationaler Modifikation wird die proteolytische Spaltung von Phosphatasen als regulierender Mechanismus diskutiert. So hat die Behandlung von Zellen mit TPA oder A23187 die Prozessierung von PTP-LAR und PTP $\sigma$  zur Folge, was mit einem Abdiffundieren deren extrazellulärer Domäne ins Medium und der Translokation der intrazellulären P-Untereinheit von der Zellmembran in das Zytoplasma einhergeht (Aicher et al., 1997). Dieselben Stimuli, aber auch die durch Fibrinogen und Thrombin induzierte Aggregation von Blutplättchen, haben die proteolytische Prozessierung der intrazellulären Phosphatase PTP1B zur Folge (Frangioni et al., 1993). Diese wird durch die durch Kalziumionen aktivierbare Protease Calpain vermittelt und führt über eine Abspaltung des Carboxyterminus von PTP1B zu deren Translokation von zellulären Membranen ins Zytoplasma. Die Erhöhung der *in vitro* Aktivität der prozessierungsbedingt löslichen Form von PTP1B korreliert dabei mit Änderungen des Phosphotyrosingehalts zellulärer Proteine, die typischerweise während der Aggregation von Blutplättchen auftreten (Clark et al., 1994). Wie für Tyrosinkinase stellt die Tyrosinphosphorylierung auch für Phosphatasen ein wichtiges Regulationselement dar. Sie erlaubt zum einen die Assoziation mit SH2-Domänenenthaltenden Proteinen, worauf beispielsweise die durch SHP-2 vermittelte Kopplung von RTK-Aktivierung mit der Aktivierung von Ras basiert (Feng und Pawson, 1994). Zum anderen hat sie unmittelbaren Einfluß auf die katalytische Aktivität verschiedener PTPn. Beide Phänomene sind mit der Tyrosinphosphorylierung beispielsweise der Rezeptortyrosinphosphatase RPTP $\alpha$  an der Position Y798 verknüpft. So bildet pY798 einerseits eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2, ohne dabei jedoch Sos zu rekrutieren (den Hertog et al., 1994; den Hertog und Hunter, 1996; Su et al., 1994, 1996). Eine vergleichbare Assoziation mit Grb2 wurde auch für die verwandte Phosphatase PTP $\epsilon$  beschrieben (Toledano-Katchalski und Elson, 1999). Andererseits hat die Phosphorylierung an dieser Position eine Erhöhung der Aktivität sowie der Spezifität gegenüber Phosphotyrosin pY527 in Src zur Folge (Zheng et al., 2000). Darüber hinaus vermittelt die Phosphorylierung von RPTP $\alpha$  an Y798 dessen Lokalisation an Fokalkontakten (Lammers et al., 2000) sowie die Interaktion mit Kv1.2 (Tsai et al., 1999). Ebenfalls gut untersucht ist die Phosphorylierung

von CD45 durch die Kinase Csk im Rahmen der T-Zellrezeptor-vermittelten Signaltransduktion (Autero et al, 1994). Die Tyrosinphosphorylierung erhöht dabei ebenfalls die *in vitro* Phosphataseaktivität von CD45 und vermittelt die Assoziation mit der T-Zellrezeptor-assoziierten Kinase Lck. Dies hat die Dephosphorylierung eines inhibitorischen Phosphotyrosins und damit die Aktivierung dieser Kinase zur Folge. Die Tyrosinphosphorylierung von SHP-1 nach Stimulation verschiedener RTKs wie Insulin-Rezeptor führt zu einer teilweisen Assoziation mit dem jeweiligen Rezeptor und/oder hat eine Erhöhung der Phosphataseaktivität (Yeung et al., 1992; Lorenz et al., 1994; Uchida et al., 1994; Li et al., 1995) zur Folge. Auch die Stimulation mit Somatostatin und davon abgeleiteten Analoga, die zur Behandlung verschiedener endokriner Tumore eingesetzt werden, führt zu einer Aktivierung und zur Membranlokalisation von SHP-1 (Lopez et al., 1996, 1997; Pages et al., 1999; Douziech et al., 1999). Ret-vermittelte Phosphorylierung und damit Aktivierung von SHP-1 hat eine Verringerung der Ret-Autophosphorylierung und eine Abschwächung des damit verknüpften Signalweges zur Folge (Hennige et al., 2001).

Auch die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten ist für verschiedene Phosphatasen mit unterschiedlicher Auswirkung auf deren Aktivität beschrieben. So geht Proteinkinase C-vermittelte Serinphosphorylierung der zytoplasmatischen Phosphatase PTP-PEST durch Behandlung von HeLa-Zellen mit TPA, Forskolin oder Isobutylmethylxanthin (IBMX) mit einer deutlichen Verminderung der Phosphataseaktivität einher (Garton und Tonks, 1994). TPA-induzierte Aktivierung von PKC hat die Serinphosphorylierung auch der rezeptor-ähnlichen Tyrosinphosphatase RPTP $\alpha$  an zwei Serinresten zur Folge (Tracy et al., 1995), führt im Gegensatz zu PTP-PEST jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der katalytischen Aktivität. (den Hertog et al., 1995). Bei Behandlung von T-Zellen mit dem Kalziumionophor Ionomycin korreliert eine Reduktion der Serinphosphorylierung mit einer verminderten Aktivität der Rezeptortyrosinphosphatase CD45 (Ostergaard und Trowbridge, 1991). Die Bedeutung der Serin-/Threoninphosphorylierung für die Regulation von Phosphatasen ist dabei nicht nur auf die Modulierung der Aktivität selbst beschränkt, sondern kann auch über eine hierdurch hervorgerufene Lokalisationsänderung Einfluß auf die Wirkung der Phosphatase nehmen. So läßt sich im Zuge Phorbolster-induzierter Differenzierung von HL-60 Zellen eine Translokation zytoplasmatischer SHP-1 zur Innenseite der Plasmamembran nachweisen, die sowohl mit der Serinphosphorylierung der Phosphatase als auch mit dem Zeitverlauf der Differenzierung korreliert (Zhao et al., 1994). Da eine Erhöhung der *in vitro* Phosphataseaktivität von SHP-1 nach Inkubation mit Phospholipiden gezeigt wurde, könnte die durch Serinphosphorylierung induzierte Assoziation mit der Zellmembran somit eine Möglichkeit zur Regulation der Phosphataseaktivität darstellen (Zhao et al., 1993, 1994).

Stimulation mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren hat in verschiedenen Zellen die transiente Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Folge (Sundaresan et al., 1995; Lo und Cruz, 1995; Bae et al., 1997). Dabei konnte hinsichtlich der Inaktivierung von PTP-1B durch Oxidation des katalytisch aktiven Cysteins-215 gezeigt werden, daß das Superoxid-

anion gegenüber Peroxid das kinetisch effizientere und chemisch spezifischere Oxidanz darstellt (Barrett et al., 1999). Desweiteren hatte die Aktivierung der NADPH-Oxidase und die daraus resultierende endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffintermediate in Neutrophilen die Inhibition der CD45-Phosphataseaktivität zur Folge (Fialkow et al., 1997). Die UV-Bestrahlung überexprimierender Zellen führt ebenfalls zur Verringerung oder Inhibition der Phosphataseaktivität von SHP-1, DEP-1, RPTP $\sigma$  und RPTP $\alpha$ . Dies hat die Inhibition der Dephosphorylierung koexprimierten PDGF $\beta$ -Rezeptors durch RPTP $\alpha$  zur Folge (Groß et al., 1999). Ob es sich bei den im Rahmen der UV-induzierten Signaltransduktion involvierten Intermediaten, die zur Oxidation des konservierten Cysteins im aktiven Zentrum von Phosphatasen führen, tatsächlich um reaktive Sauerstoffspezies handelt, ist zur Zeit jedoch noch nicht zweifelsfrei geklärt.

### 1.3.5 Physiologische Funktion von Tyrosinphosphatasen

Zahlreiche Untersuchungen belegen die essentielle Funktion der Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen sowie der Tyrosinphosphorylierung von zellulären Substraten für die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden (Honegger et al., 1988; Kazlauskas und Cooper, 1989; Segatto et al., 1990; Calaib et al., 1995). Die Dephosphorylierung der Kinasen durch Phosphotyrosinphosphatasen sollte daher zur Termination des durch den jeweiligen Rezeptor vermittelten Signals führen. Tatsächlich bekräftigen eine Reihe von Experimente eine negativ regulatorische Funktion von PTPasen in der Signaltransduktion von Tyrosinkinasen. So führt die Expression einer infolge einer carboxyterminalen Deletion frei im Zytoplasma diffundierenden Mutante der T-Zell-Phosphatase (TC-PTP) in BHK-Zellen nicht nur zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums (Cool et al., 1990), sondern verhindert auch die Transformation von Fibroblasten durch die onkogene Form des CSF-1-Rezeptors v-fms (Zander et al., 1993). Ein analoger Effekt läßt sich bei Koexpression von PTP1B auf die transformierende Aktivität des HER2-Onkogens neu beobachten (Brown-Shimer et al., 1992). Eine Rolle dieser Phosphatase im Rahmen der Insulin-vermittelten Signaltransduktion zeichnete sich bereits zu Beginn der Neunziger Jahre ab, als eine signifikante Verzögerung der insulinabhängigen Zellteilung nach Injektion gereinigter PTP1B in *Xenopus* Oozyten (Tonks et al., 1990) und damit einhergehend eine Reduktion der durch den Insulinrezeptor vermittelten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate beobachtet wurde (Cicerelli et al., 1990). Über kristallographische, kinetische und Peptidbindungsstudien wurden die im Aktivierungssegment des Insulin-Rezeptors lokalisierten Phosphotyrosinreste pY1162 und pY1163 als die an der Wechselwirkung maßgeblich beteiligten, aber auch von PTP1B dephosphorylierten Aminosäuren identifiziert (Salmeen et al., 2000). Bei der ebenfalls durch PTP1B vermittelten Dephosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats-1 (IRS-1) kommt Grb2 eine die Interaktion beider Proteine stabilisierende Rolle zu (Goldstein et al., 2000). Die

physiologische Relevanz dieser Phosphatase im Kontext der Insulinrezeptor-vermittelten Signaltransduktion wurde in PTP1B-„Knock-out“-Mäusen hervorgehoben, die sich sowohl durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin als auch durch eine verstärkte Resistenz gegenüber Fettleibigkeit auszeichnen (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000).

Verhältnismäßig gut ist desweiteren die Rolle der transmembranständigen Phosphatase CD45 im Rahmen der B- und T-Zellrezeptor-vermittelten Signaltransduktion charakterisiert. Die Kopplung der Aktivierung dieser Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden erfolgt über Aktivierung der der Src-Familie zugehörigen Kinasen Lck und Fyn (Koretzky et al., 1990; Mustelin et al., 1992; Biffen et al., 1994). Vermittelt wird die ligandenstimulierte Aktivierung dieser beiden zytoplasmatischen Kinasen durch CD45, die eine Dephosphorylierung negativ regulatorischer Tyrosinreste am Carboxyterminus beider Kinasen katalysiert und damit deren Aktivierung bewirkt (Kmieciak et al., 1988; Cooper und Howell, 1993). Konstitutive Aktivität von CD45 infolge einer inaktivierenden Punktmutation (E613R) im Inhibitormotiv dieser Phosphatase hatte in transgenen Mäusen die Aktivierung und Hyperproliferation von Lymphozyten sowie schwere Autoimmunreaktionen und schließlich den Tod der Tiere zur Folge (Majeti et al., 2000).

Die extrazelluläre Domäne der ebenfalls membranständigen Phosphatase RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$  umfaßt verschiedene Domänen, die die Wechselwirkung der Phosphatase mit unterschiedlichen Oberflächenproteinen von Neuronen oder Gliazellen vermitteln. So wirkt die CAH-Domäne als funktioneller Ligand für den neuronalen Rezeptor Contactin und induziert durch diese spezifische Interaktion Zelladhäsion, das Auswachsen von Neuriten spezifischer primärer Neuronen sowie die Differenzierung von Neuroblastomazellen (Peles et al., 1995). Hingegen bindet die Fibronectin Typ-III (FNIII)-ähnliche Domäne von RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$  an Tenascin C und vermittelt die RPTP $\beta$ -abhängige Zelladhäsion jene Phosphatase exprimierender Glioblastoma- oder Astrozytomazellen auf Tenascin C (Adamsky et al., 2001). Als neuronaler Rezeptor für Pleiotrophin/HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) ist RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$  desweiteren in die Migration von Neuronen entlang definierter Gliazellstränge involviert (Maeda und Noda, 1998).

Unter Verwendung katalytisch inaktiver, aber zur Bindung potentieller Substrate noch befähigter „Substrat-Trapping-Mutanten“ wurde das an mitogenen und adhäsionsvermittelten Signaltransduktionskaskaden beteiligte Protein p130cas als Substrat von PTP-PEST identifiziert (Garton et al., 1996, 1997). Hinsichtlich dieser Phosphatase homozygot negative Fibroblasten wiesen eine erhebliche Zunahme an Fokalkontakten bei gleichzeitig verringerter Zellmotilität auf, die zumindest zum Teil auf erhöhte Tyrosinphosphorylierung von p130cas, aber auch von Paxillin und FAK zurückzuführen ist (Angers-Loustau et al., 1999). Neben dieser Bedeutung für Zelladhäsion und Migration konnte für PTP-PEST eine regulatorische Funktion gegenüber der Tyrosinkinase c-Abl gezeigt werden. Unter Vermittlung durch das mit beiden Proteinen interagierende Molekül PSTPIP-1, selbst ein Substrat von c-Abl, wird PTP-PEST zu beispielsweise nach PDGF-Stimulation aktiviertem und damit phosphorylier-

tem c-Abl rekrutiert und hat durch Dephosphorylierung die Inaktivierung dieser Kinase zur Folge (Cong et al., 2000).

Eine funktionell relevante Interaktion konnte zwischen dem an der Induktion von Apoptose involvierten Zelloberflächenrezeptor FAS-1 und der zytoplasmatischen Phosphatase PTP-BAS/FAP-1 gezeigt werden (Sato et al., 1995). Letztere assoziiert dabei mit einem für die Initiation der Apoptose essentiellen Bereich, der sogenannten „death domain“ (Itoh und Nagata, 1993), und übt hierdurch unter Beteiligung ihrer Phosphataseaktivität einen inhibitorischen Effekt auf die FAS-1-vermittelte Induktion der Apoptose aus (Sato et al., 1995).

Deutliche Hinweise auf die physiologische Funktion der zytoplasmatischen Tyrosinphosphatase SHP-1 ergaben sich aus der Charakterisierung der sogenannten „Motheaten- und Viable Motheaten-Maus“, deren Phänotyp - Immunschwäche und zahlreiche Abnormalitäten im hämatopoietischen Zellsystem - auf verschiedene Mutationen in dem für SHP-1 kodierenden Genlokus zurückgeführt wird und die Bedeutung dieser Phosphatase im Rahmen der Hämatopoese unterstreicht (Shultz et al., 1993; Tsui et al., 1993). Insgesamt nimmt SHP-1 im Rahmen der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelten Signaltransduktion eine negativ regulatorische Rolle ein. So induziert der Erythropoietinrezeptor nach Ligandenstimulation die Aktivierung bestimmter Vertreter der JAK-Kinasefamilie und wird im Rahmen eines Rückkopplungsmechanismus von diesen ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert. SHP-1 bindet mittels der SH2-Domänen an den phosphorylierten Rezeptor, vermittelt dort die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der assoziierenden JAK-Kinasen und leitet somit die Termination des proliferativen Signals ein (Klingmüller et al., 1995). Eine analoge Funktion in der durch Ligandenbindung induzierten Signalkaskade wurde auch für den Interleukin-3-Rezeptor identifiziert (Yi et al., 1993). Weiterhin konnte für SHP-1 eine wesentliche Rolle in der Beendigung der durch Aktivierung des B-Zellrezeptors initiierten Signalkaskade gezeigt werden (C'Ambrosio et al., 1995). Die Tyrosinphosphorylierung von SHP-1 durch Aktivierung des CSF-1- (Yeung et al., 1992) und des T-Zellrezeptors (Lorenz et al., 1994) lassen eine Funktion von SHP-1 in der Signalübertragung auch dieser Rezeptoren vermuten. Deutlich ließ sich die Assoziation von SHP-1 mit der Rezeptortyrosinkinase Ret zeigen. Koexpression von SHP-1 führte zu einer verminderten Autophosphorylierung dieses Protoonkogens und hatte eine verringerte Aktivierung von Erk2 sowie die Inhibition der PKB/Akt-Phosphorylierung zur Folge (Hennige et al., 2001). Desweiteren konnte eine starke und direkte Assoziation von SHP-1 mit der phosphorylierten Rezeptortyrosinkinase Ros nachgewiesen werden, die durch die N-terminale SH2-Domäne von SHP-1 und dem Phosphotyrosinrest pY2267 der Kinase vermittelt wird. Überexpression dieser zytoplasmatischen Phosphatase führt zur Dephosphorylierung von Ros und zur starken Verringerung Ros-abhängiger Proliferation und Transformation (Keilhack et al., 2001).

Im Gegensatz zu SHP-1 kommt SHP-2 als dem zweiten Vertreter dieser Gruppe eine eher positiv regulatorische Funktion bei der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen zu

(Noguchi et al., 1994; Xiao et al., 1994; Milarski et al., 1994; Yamauchi et al., 1995; Tang et al., 1995; Rivard et al., 1995). SHP-2 ist dabei maßgeblich in die zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 führenden Signaltransduktionswege involviert. Die Überexpression von Deletionsformen oder katalytisch inaktiven Mutanten führte daher zu einer deutlichen Inhibition des Zellwachstums nach Ligandenstimulation. In Zusammenhang mit der positiven Funktion von SHP-2 bei der Signalübertragung steht die Beobachtung, daß SHP-2 als Adapter fungieren (Li et al., 1994; Bennet et al., 1994; Kharithonenkov et al., 1995) und als solcher die Bindung von Grb2 beispielsweise an den PDGF-Rezeptor vermitteln kann. Ebenfalls durch Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante konnte die Bedeutung von SHP-2 für die Aktivierung auch der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase JNK nach Stimulierung des Insulin- sowie des EGF-Rezeptors gezeigt werden, wobei SHP-2 oberhalb von Sos positiv regulatorisch auf den Ras-Signaltransduktionsweg Einfluß nimmt (Fukunaga et al., 2000). Die Assoziation von SHP-2 mit dem SHP-Substrat 1 (SHPS-1)/SIRP-1 alpha, der die spezifische Erkennung der SHPS-1-Phosphotyrosinreste pY449 bzw. pY473 durch die NH<sub>2</sub>- bzw. COOH-terminale SH2-Domänen zugrunde liegt (Takada et al., 1998), wurde unter anderem nach der Fibronectin-induzierten Vernetzung von Integrinen beobachtet und vermittelt hierbei die durch Integrin-Stimulation initiierte Aktivierung der MAP-Kinasen sowie Veränderungen der Zellmorphologie (Tsuda et al., 1998; Oh et al., 1999). Der Ausbildung des SHP-2/SHPS-1-Komplexes kommt auch im Rahmen der LPA-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase eine wichtige Rolle zu und wird hier sehr wahrscheinlich durch einen Rho-abhängigen Signalweg unter Beteiligung von FAK und Src-Kinasen vermittelt (Takeda et al., 1998).

#### 1.4 Die Rezeptortyrosinphosphatase PTP-LAR

Nach der Entdeckung von CD45 als membranständige Phosphatase wurde in einer anschließenden Suche nach homologen Molekülen PTP-LAR (leukocyte common antigen related) aus einer humanen Genbibliothek isoliert (Streuli et al., 1988). Das Gen für PTP-LAR wurde auf Chromosom 1p32-33 in einer Region mit verschiedenen Tumorsuppressorgenen identifiziert, die häufig in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs deletiert ist (Streuli et al., 1992; Jink et al., 1992). Zusammen mit den nahe verwandten Phosphatasen PTP $\delta$  und PTP $\sigma$  sowie dem *Drosophila*-Homologen DLAR bildet sie die LAR-Unterfamilie transmembranärer Phosphatasen (Streuli et al., 1989). Immunhistochemische Studien ergaben eine Expression von PTP-LAR insbesondere in verschiedenen Epithelien, desweiteren in glattem wie in Herzmuskelgewebe sowie Zellen neuronalen Ursprungs, nicht aber in gestreifter Muskulatur oder in hämatopoietischen Zellen (Streuli et al., 1992). Neben dem damit korrelierenden Nachweis von LAR-mRNA in ebenfalls unterschiedlichsten Geweben konnte deren regulierte Expression beispielsweise während der neuronalen (Sahin et al., 1995) oder der Lungenentwicklung (Katsura et al., 1995) in Ratten nachgewiesen werden.

PTP-LAR wird an der Zelloberfläche als ein Komplex aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten, der sogenannten P- und der E-Untereinheit, exprimiert. Diese gehen durch intrazelluläre Proteolyse aus einem Vorläuferprotein hervor (Streuli et al., 1992; Yu et al., 1992). Katalysiert wird diese Prozessierung durch Subtilisin-ähnliche Proteasen, die in der extrazellulären Domäne nahe der Transmembranregion eine Penta-Argininsequenz erkennen (Streuli, 1992; Serra-Pages, 1994). Die daraus hervorgehende E-Untereinheit von LAR enthält damit den größten Teil der extrazellulären Domäne, während die P-Untereinheit aus dem kurzen, membranahen Extrazellulärfragment, der Transmembrandomäne und dem gesamten intrazellulären Bereich besteht. Die glykosylierte Extrazelluläreinheit umfaßt dabei drei Immunglobulin- sowie acht Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen (Streuli und Saito, 1993). Diese Motive finden sich auch in vielen Adhäsionsmolekülen wieder, wo sie über homo- bzw. heterophile Wechselwirkung Zell-Zell-Adhäsion oder wie im Falle von Ng-CAM die Bindung mit Laminin vermitteln (Grumet et al., 1993). Neben lediglich vier Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen umfassenden LAR-Derivaten wird die Entstehung weiterer Isoformen durch gewebespezifisches alternatives Spleißen dreier Mini-Exons (meA, meB, meC) innerhalb dieser beiden Motive beschrieben (O'Grady et al., 1994; Zhang et al., 1995). Die Bedeutung des alternativen Spleißens liegt in der hierdurch herbeigeführten Modulation und damit Regulation der Interaktion eines potentiellen Liganden mit den verschiedenen Isoformen. So wurde als Ligand für die LAR-FNIII-Domäne 5 der der Extrazellulären Matrix zugehörige Laminin-Nidogen-Komplex identifiziert. Dessen Bindung an die Phosphatase wird durch alternatives Spleißen eines solchen kleinen Exons innerhalb der FNIII-5-Domäne reguliert, wobei dessen Expression die Inhibition der Interaktion zur Folge hat (O'Grady et al., 1998). Als möglichen Mechanismus zur Desensitivierung gegenüber einem LAR-Liganden wird die proteolytische Spaltung der Extrazellulären Domäne nahe der Transmembranregion und die damit einhergehende Freisetzung der Extrazelluläreinheit diskutiert. Dieser als „Shedding“ bezeichnete Prozeß wird in proliferierenden Zellen (Streuli et al., 1992) sowie nach Stimulation mit TPA oder dem Kalziumionophor A23178 beobachtet (Aicher et al., 1997).

Der intrazelluläre Teil der zytoplasmatischen P-Untereinheit umfaßt neben der katalytisch aktiven, membranproximalen Domäne D1 die membrandistale Phosphatase-Domäne D2. Letztere weist keinerlei katalytische Aktivität auf, obwohl alle konservierten Aminosäuren des katalytischen Zentrums vorhanden sind (Streuli et al., 1990). Die Kristallstrukturanalyse ergab, daß das katalytische Zentrum beider Phosphatasedomänen für Substrat zugänglich und eine Blockierung infolge Homodimerisierung wie für PTP $\alpha$  oder CD45 beschrieben nicht zutreffend ist (Nam et al., 1999). Maßgeblich für den Aktivitätsverlust der zweiten gegenüber der ersten Phosphatasedomäne scheinen zwei Aminosäuresubstitutionen zu sein. Hierbei handelt es sich einerseits um den Austausch einer Asparagin- (Asp1490) im WPD-Motiv zu einer Glutaminsäure (Glu1779). Andererseits hat die Substitution eines Tyrosins (Tyr1355) zu einem Leucin (Leu1644) eine Verlagerung des konservierten und dem katalytischen Cystein

benachbarten Serins in die Tasche des aktiven Zentrums zur Folge, was den Zugang des Phosphotyrosinrestes eines Substrats blockiert (Hengge et al., 1995, Nam et al., 1999). Für die membrandistale Phosphatasedomäne wird daher eine regulatorische Rolle angenommen, wobei eine die Lokalisation von PTP-LAR bzw. die Bildung höhermolekularer Komplexe vermittelnde Rolle aufgrund der Assoziation mit den beiden Proteinen LIP.1 und Trio vermutet wird. Die Interaktion der Phosphatase mit dem zytoskelettalen Protein LIP.1 (LAR interacting protein 1; Serra-Pages et al., 1995) erfolgt dabei an fokalen Adhäsionspunkten. Da LIP.1 jedoch nur an Serinresten phosphoryliert wird, scheint es selbst kein Substrat für PTP-LAR darzustellen. Ferner konnte kein Einfluß von LIP.1 auf die katalytische Aktivität von PTP-LAR nachgewiesen werden, so daß LIP.1 eine LAR zu potentiellen Substraten rekrutierende Rolle zugeordnet wird. Auch Trio wird nur serinphosphoryliert und kommt daher als LAR-Substrat nicht in Frage. Als Multidomänenprotein mit einer Rac1- und einer RhoA-spezifischen GDP/GTP-Austauschfaktor-Domäne, einem Serin-/Threoninkinase-Modul sowie zahlreichen Proteininteraktions- und Lokalisationsdomänen ist der LAR-Trio-Komplex als Konvergenzpunkt verschiedener Signaltransduktionswege prätestiniert (Debant et al., 1996). Hingegen deutet die Interaktion von PTP-LAR mit dem Cadherin-Catenin-Komplex, für die die aminoterminal Domäne von  $\beta$ -Catenin erforderlich ist, auf eine tatsächliche Enzym-Substrat-Interaktion hin (Kypta et al., 1996). Ektopische Expression von PTP-LAR verringert die Phosphorylierung und die Zunahme des freien Pools von  $\beta$ -Catenin und verhindert dadurch Migration epithelialer Zellen (Müller et al., 1999). Als weiteres Substrat wird das Protein p130cas diskutiert, das mit PTP-LAR entlang von Streßfasern und an Fokalkontakten kolokalisiert. Überexpression von PTP-LAR führt zur spezifischen Dephosphorylierung und Destabilisierung von p130cas, weshalb auf eine Rolle von PTP-LAR bei der Regulation Zelladhäsion-vermittelter Inhibition der Apoptose spekuliert wird (Weng et al., 1999).

Mäuse homozygot negativ für PTP-LAR (LAR<sup>-/-</sup>) entwickeln sich weitgehend normal und zeigen keine augenscheinlichen histologischen Abnormalitäten. Allerdings wurde ein Defekt in der Entwicklung und der Funktion der Milchdrüsen beobachtet, was zu dem Schluß führte, daß die der Brustepithelzelldifferenzierung und der Milchbildung zugrundeliegende Regulation durch Hormone und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen infolge fehlender LAR-Funktion gestört ist (Schaapveld et al., 1997). Im Unterschied zu Säugern wird DLAR in *Drosophila* nahezu ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert und spielt hier in der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle. DLAR-defiziente Mutanten zeigen Störungen in der Führung motorischer Axone (Krueger et al., 1996), ein Prozeß, der durch komplexe Zell-Zell-Adhäsionswechselwirkungen sowie anziehende und abstoßende Signale von Zielregionen bestimmt wird. Die Daten für DLAR sowie zwei weitere transmembranäre Phosphatasen, DPTP69D und DPTP99A (Desai et al., 1996), weisen darauf hin, daß diese Proteintyrosinphosphatasen bei den „Wegfindungsprozessen“ der migrierenden Axone eine wesentliche Rolle spielen.

## 1.5 Zielsetzung

Trotz der Vielzahl der bislang identifizierten Mitglieder der Familie der Proteintyrosinphosphatasen ist die biologische Funktion in nur verhältnismäßig wenig Fällen bekannt. Hierbei handelt es sich wie im Falle von CD45 oftmals um Phosphatasen mit einer zelltypspezifischen Expression, aus der bereits erste Hinweise auf die physiologische Bedeutung abgeleitet werden konnten. Für ubiquitär exprimierte Phosphatasen ist dies nicht möglich und die Untersuchung der Mechanismen zur Regulation der Phosphataseaktivität und -spezifität stellt einen zentralen Aspekt zum Verständnis der biologischen Funktion insbesondere dieser Proteintyrosinphosphatasen dar. In der extrazellulären Domäne von PTP-LAR und verschiedener anderer Transmembranphosphatasen finden sich mitunter Sequenzmotive mit Homologie zu Zelladhäsionsmolekülen, die zusätzlich zur Lokalisation an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontaktstellen einen Hinweis auf die Funktion im Rahmen der Zelladhäsion liefern.

Zentrale Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit war es, funktionelle Korrelationen von PTP-LAR zu Signaltransduktion-vermittelnden Proteinen zu identifizieren und Mechanismen zur Regulation dieser transmembranären Proteintyrosinphosphatase zu untersuchen. Hintergrund dessen war das Bestreben, diese Phosphatase physiologisch zuordnen zu können und deren biologische Bedeutung insbesondere im Kontext von Brustkrebs zu evaluieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bezugsquellennachweise

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG825	Calbiochem, Bad Soden
AG1478	Calbiochem, Bad Soden
Agar	Difco, Detroit
Agarose	Gibco, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Batimastat	British Biotech, Oxford
BES (N,N-Bis[2-Hydroxyl]2-aminoethansulfonsäure	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquine	Sigma, Taufkirchen
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
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Hygromycin B	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranidose)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Gibco, Eggenstein
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen

Penicillin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (para-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco, Eggenstein
TEMED (N,N,N'N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Sigma, Taufkirchen
TPA (tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
X-Gal	Diagnostik Chemicals, USA
Xylencyanol	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
Klenow-DNA-Polymerase	Biolabs, New England
Lysozym	Roche, Mannheim
Mung-Bean-Nuklease	Biolabs, New England
Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, New England
	Boehringer, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim

### 2.1.3 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-dATP	>5000 Ci/mmol
[ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]-dATP	>5000 Ci/mmol
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dATP, [ <sup>35</sup> S]-L-Methionin	>1000 Ci/mmol

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

### 2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

DNA-Längenstandards	Eurogentec, Belgien
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.
Mega Prime DNA Labelling Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

Carbachol	Sigma, Taufkirchen
EGF (human, rekombinant)	Intergen (San Francisco)
Endothelin-1	Calbiochem, Bad Soden
β-Heregulin	R&D Systems, USA
NGF	Becton Dickenson,
LPA	Sigma, Taufkirchen
Thrombin	Sigma, Taufkirchen
TPA	

### 2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E.coli* Bakterien

LB-Medium	1,0	%	Trypton	2 x YT-Medium	1,6	%	Trypton
	0,5	%	Hefeextrakt		0,5	%	Hefeextrakt
	1,0	%	NaCl		1,0	%	NaCl
	pH 7,2				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 Medium 1,5% Agar zugesetzt.

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein), fötales Kälberserum wurde von Sigma (Taufkirchen) bezogen. Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde letzteres vor Verwendung für 30 min auf 55°C erhitzt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glucose, 5%, 10% oder 20% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin

Dulbecco's MEM/Nut Mix F-12 (1:1), 10% FCS, 2 mM Glutamin

RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin

Modified Eagle Medium (MEM) mit Earle's Salzen, 10% FCS, 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM Glutamin

McCoy's 5a Medium, 10% oder 15% FCS

Methioninfreies Medium zur radioaktiven Markierung von Zellen: Modified Eagle Medium (MEM) mit Earle's Salzen, methioninfrei, 2 mM Glutamin, 40 µCi/ml [35S]-L-Methionin.

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO.

### 2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
			pH 6.96 (NaOH)
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
HBS (2x)	46,0	mM	HEPES pH 7,5
	274	mM	NaCl
	1,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
			pH 7,00 (NaOH)
HNTG-Puffer	20,0	mM	HEPES pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0,1	%	Triton X-100
	10,0	%	Glycerin
	10,0	mM	Tetra-Natrium-Pyrophosphat

KCM (5x)	500	mM	KCl
	150	mM	CaCl <sub>2</sub>
	250	mM	MgCl <sub>2</sub>
Laemmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β-Mercaptoethanol
MOPS (10x)	200,0	mM	Morphoinopropansulfonsäure
	80,0	mM	Natriumacetat
	10,0	mM	EDTA pH 8,0 pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	500,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	50,0	mM	EDTA pH8,0
	1,5	M	NaCl
	0,5	%	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
SSC (20x)	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
TAE (10x)	400	mM	Tris/Acetat
	10	mM	EDTA pH 8,0 (Eisessig)
TE	10,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1	mM	EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918,0	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> 298 F'	F <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup> , Lambda <sup>r</sup> , recA <sup>-</sup> , tonA <sup>-</sup> , lacI <sup>-</sup>	R. du Bridge, Genentech, USA
<i>E.coli</i> CJ236	dut <sup>-</sup> , ung <sup>-</sup> , thi <sup>-</sup> , relA <sup>-</sup> , (pCJ 105 Camr)	Kunkel, 1985
<i>E.coli</i> DH5α F'	F'/endA1, hsd17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Stratagene
<i>E.coli</i> XL-1 Blue F'	F'/Tn10proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacIq, d(lacZ), M15/recA1, endA1, gyrA69 (Nal <sup>r</sup> ), thi, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, relA1, lac	Bullock et al., 1987

### 2.1.9.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
Ac745	humane Brustepithelzellen	Sugen, USA
HBL100	humane Brustepithelzellen	ATCC HTB-124
MCF10A	humane Brustepithelzellen	ATCC CRL-10317
BT20	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-19
BT474	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-20
BT483	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-121
BT549	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-122
Dal	humane Brustkarzinomzellen	G. Natali, Italien
DU-4475	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-123
Hs578Bst	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-125
Hs578T	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-126
MCF7	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610030)
MCF7-tTA	MCF7-Klon stabil infiziert mit SFG-tcITE1-Neo	diese Arbeit

---

MCF7-tTA-LARwt-VSV	MCF7-tTA-Klon stabil infiziert mit SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV	diese Arbeit
MCF7-HER2	humane Brustadenokarzinomzellen	D. Slamon
MDA-MB-157	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-24
MDA-MB-175	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-25
MDA-MB-231	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-26
MDA-MB-231-tTA	MDA-MB-231-Klon stabil infiziert mit SFG-tcITE1-Neo	diese Arbeit
MDA-MB-361	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-27
MDA-MB-415	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610031)
MDA-MB-435S	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-129
MDA-MB-436	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-130
MDA-MB-453	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-131
MDA-MB-468	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-132
SK-BR-3	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-30
T47D	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-133
ZR-75-1	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1500
ZR-75-30	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1504
ACHN	humane Nierenadenokarzinomzellen	ATCC CRL-1611
SK-OV-8	humane Ovarialadenokarzinomzellen	U. Eichelsbacher
HEK-293	humane embryonale Nierenfibroblasten, mit Adenovirus transformiert	ATCC CRL-1573
Cos-7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
NIH3T3 cl.7	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
NIH3T3-tTA	NIH3T3 cl.7-Klon stabil transfiziert mit pcDNA3-tTA-Puro	diese Arbeit
NIH3T3-tTA-MOCK	NIH3T3-tTA-Klon stabil infiziert mit SFG-t7EC3M-PHS	diese Arbeit

NIH3T3-tTA-LARwt-VSV	NIH3T3-tTA-Klon stabil infiziert mit SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV	diese Arbeit
NIH3T3-tTA-LAR-CC1522/1813SS-VSV	NIH3T3-tTA-Klon stabil infiziert mit SFG-t7EC3M-PHS-LAR-CC1522/1813SS-VSV	diese Arbeit
NIH3T3-tTA-LAR-PD-VSV	NIH3T3-tTA-Klon stabil infiziert mit SFG-t7EC3M-PHS-LAR-PD-VSV	diese Arbeit
MF-tace <sup>ΔZnΔZn</sup>	aus tace <sup>ΔZnΔZn</sup> -knock-out-Maus abgeleitete Fibroblastenlinie, homozygot bzgl. der Deletion der Zink-Bindungsdomäne von TACE	R. Black, Immunex Corp., USA
MF-tace <sup>wt/wt</sup>	tace <sup>ΔZnΔZn</sup> -Zellen entsprechende Fibrolinie, jedoch homozygot bzgl. TACE-Wildtyp	R. Black, Immunex Corp., USA
Phoenix A	modifizierte HEK-293 Linie zur Erzeugung von helfervirusfreien, amphotrophen Retroviren	G. Nolan, Stanford, USA
Phoenix E	modifizierte HEK-293 Linie zur Erzeugung von helfervirusfreien, ecotrophen Retroviren	G. Nolan, Stanford, USA

### 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
α EGFR-108.1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne von humanem EGFR	Lax <i>et al.</i> , 1989
α EGFR-UBI	Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytosmatischen Domäne als Fusionsprotein	UBI, Lake Placid
α HER2-13D	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne von humanem HER2	Bühring, d. AG.
α HER2-JL	Kaninchen, polyklonal, gegen C-Terminus von HER2	J. Lee, Genentech, USA

$\alpha$ PTP-H1-NT	Kaninchen, polyklonal, gegen N-Terminus von PTP-H1	R. Lammers, d. AG.
$\alpha$ PTP-LAR-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-Terminus von PTP-LAR (AS 1868-1881)	B. Aicher, d. AG.
$\alpha$ SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 carboxyterminalen AS des humanem SHC als GST-Fusionsprotein	R. Lammers, d. AG.
$\alpha$ ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz, Biotech., Inc.
$\alpha$ Phospho-ERK1/ERK2	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphorylierte (Thr202/Tyr204) und damit aktivierte p44/42 MAP Kinase	New England Biolabs
$\alpha$ p38 (C-20)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich (AS 341-360) von p38	Santa Cruz Biotech., Inc.
$\alpha$ Phospho-p38	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphorylierte (Thr180/Tyr182) und damit aktivierte p38 MAP Kinase	New England Biolabs
$\alpha$ $\beta$ -Catenin	Maus, monoklonal, gegen die C-terminalen AS 571-781 von murinem $\beta$ -Catenin	Transduction Laboratories, Lexington, USA
$\alpha$ $\beta$ -Catenin-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen GST-Fusionsprotein mit den AS 374-781 von Humanem $\beta$ -Catenin	T. Müller, d. AG.
$\alpha$ Plakoglobin	Maus, monoklonal, gegen die C-terminalen AS 553-738 von humanen Plakoglobin	Transduction Laboratories, Lexington, USA
$\alpha$ TACE	Kaninchen, polyklonal	Chemicon,
$\alpha$ tTA	Kaninchen, polyklonal, gegen VP16- Domäne des Transaktivators, affinitätsgereinigt	Clontech, USA
$\alpha$ VP16 (1-21) sc-7545	Maus, monoklonal, gegen C-terminale Aktivierungsdomäne von VP16	Santa Cruz, USA
$\alpha$ GST	Kaninchen, polyklonal, gegen GST-Protein	T. Müller, d. AG.
$\alpha$ VSV p5d4	Maus, monoklonal, gegen VSV-Epitop (AS-Sequenz: YTDIEMNRLGL)	R. Lammers, Tübingen

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

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1 : 20000	BioRad, München
Ziege gegen Maus	1 : 10000	Sigma, Taufkirchen
Ziege gegen Kaninchen	1 : 20000	BioRad, München
Kaninchen gegen Schaf	1 : 20000	Dianova

## 2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.1.10.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBS II SK+	ColE1 ori, Amp <sup>r</sup> , LacZ, f1(+) <sub>IG</sub> , SK-MCS	Stratagene
pRK5	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , f1 ori, CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, San Francisco
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , f1 ori, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pUHD10-3	Tetrazyklin-sensitiver Expressionsvektor, colE1-Replikationsstart, CMV Promotor mit sieben Tet-Operatorsequenzen, SV40 poly A, pUC ori	Gossen und Bujard, 1992
pUHD15-1	Expressionsvektor für tTA, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , CMV Promotor, SV40 poly A, pUC ori	Gossen und Bujard, 1992
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman, 1989
SFG-t7EC3	Retroviraler, Teteazyklin-sensitiver Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , modifizierter 3'-LTR mit sieben Tet-Operatorsequenzen	Lindemann et al., 1997
SFG-tcITE1	Retroviraler, Teteazyklin-sensitiver Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , interner CMV-Minimalpromotor mit sieben Tet-Operatorsequenzen und IRES-Sequenz	Lindemann et al., 1997

pTK-Hyg	Selektionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup> , HSV TK-Promotor ohne Enhancer-Element, HSV TK poly A, pUC ori	Clontech, USA
pGEX-3	bakterieller Expressionsvektor für GST-Fusionsprotein, Amp <sup>r</sup>	Pharmacia, Freiburg

### 2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pRK5-HER1	in pRK5 klonierte cDNA von HER1	A. Chantrey, d. AG.
pRK5-EGFR-VSV/VSV-NT	in pRK5 klonierte cDNA des humanen, am N-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierten EGFRs	diese Arbeit
pRK5-EGFR-VSV/VSV-CT	in pRK5 klonierte cDNA des humanen, am C-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierten EGFRs	diese Arbeit
pRK5-EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV	in pRK5 klonierte cDNA des humanen EGFRs, dessen intrazelluläre Domäne durch zwei VSV-Epitope ersetzt wurde	diese Arbeit
pRK5-EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA	in pRK5 klonierte cDNA des humanen EGFRs, dessen extrazelluläre Domäne durch zwei VSV-Epitope ersetzt wurde	diese Arbeit
pRK5-LAR	in pRK5 klonierte cDNA der humanen PTP-LAR	B. Aicher, d. AG.
pRK5-LARwt-VSV	in pRK5 klonierte cDNA humaner, am C-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierter PTP-LAR	diese Arbeit
pRK5-LAR-C1522S-VSV	pRK5-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser	diese Arbeit
pRK5-LAR-C1813S-VSV	pRK5-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
pRK5-LAR-CC1522/1813SS-VSV	pRK5-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser sowie Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
pRK5-LAR-PD-VSV	pRK5-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch <sub>1221</sub> VVQVTPAQQQ EEP <sub>1233</sub> -> <sub>1221</sub> GTYPYDVPDYAGT <sub>1233</sub>	diese Arbeit

pcDNA3-ETNR	in pcDNA3 klonierte cDNA des humanen Endothelin-Rezeptors	M. Leserer, d. AG.
pcDNA3-M1R	in pcDNA3 klonierte cDNA des humanen M1Rs	M. Leserer, d. AG.
pcDNA3-TACE-HA	in pcDNA3 klonierte cDNA humaner, am C-Terminus mit einem HA-Epitop markierter TACE	S. Hart, d. AG.
pcDNA3-ESK	pcDNA3-Derivat, modifizierte MCS aus pBS II SK+	diese Arbeit
pcDNA3-EKS	pcDNA3-Derivat, modifizierte MCS aus pBS II KS+	diese Arbeit
pcDNA3-EKS-HER2	in pcDNA3-EKS klonierte cDNA von HER2	diese Arbeit
pcDNA3-tTA-Puro	pcDNA3-Derivat, Puro <sup>r</sup> anstelle Neo <sup>r</sup> , CMV-Minimalpromotor mit sieben Tet-Operator-Sequenzen anstelle CMV-Promotor, autoregulatorische tTA-Expression	diese Arbeit
pLXSN-HER2	in pLXSN klonierte cDNA von HER2	U. Weiß, d. AG.
pLXSN-ESK	pLXSN-Derivat, modifizierte MCS aus pBS II SK+	diese Arbeit
pLXSN-EKS	pLXSN-Derivat, modifizierte MCS aus pBS II KS+	diese Arbeit
pLXSN-ESK-LARwt-VSV	in pLXSN-ESK klonierte cDNA humaner, am C-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierter PTP-LAR	diese Arbeit
pLXSN-ESK-LAR-C1522S-VSV	pLXSN-ESK-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser	diese Arbeit
pLXSN-ESK-LAR-C1813S-VSV	pLXSN-ESK-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
pLXSN-ESK-LAR-CC1522/1813SS-VSV	pLXSN-ESK-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser sowie Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
pLXSN-ESK-LAR-PD-VSV	pLXSN-ESK-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch <sub>1221</sub> VVQVTPAQQQ EEP <sub>1233</sub> -> <sub>1221</sub> GTYPYDVPDYAGT <sub>1233</sub>	diese Arbeit

SFG-tcITE1-Neo	SFG-tcITE1-Derivat, Neo <sup>r</sup> , autoregulatorische tTA-Expression	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS	SFG-t7EC3-Derivat, erweiterte MCS, HygB <sup>r</sup> unter der Kontrolle eines HSV-TK- Promotors in Transkriptionsrichtung des Zielgens	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-SHP	SFG-t7EC3-Derivat, erweiterte MCS, HygB <sup>r</sup> unter der Kontrolle eines HSV-TK- Promotors entgegen der Transkriptions- richtung des Zielgens	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- PTP-H1	SFG-t7EC3M-PHS mit humaner PTP-H1 cDNA	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- LARwt-VSV	in SFG-t7EC3M-PHS klonierte cDNA humaner, am C-Terminus mit zwei VSV- Epitopen markierter PTP-LAR cDNA	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- LAR-C1522S-VSV	SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- LAR-C1813S-VSV	SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- LAR-CC1522/1813SS- VSV	SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch Cys <sub>1522</sub> ->Ser sowie Cys <sub>1813</sub> ->Ser	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-PHS- LAR-PD-VSV	SFG-t7EC3M-PHS-LARwt-VSV-Derivat mit dem AS-Austausch <sub>1221</sub> VVQVTPAQ QQEEP <sub>1233</sub> -> <sub>1221</sub> GTYPYDVPDYAGT <sub>1233</sub>	diese Arbeit
SFG-t7EC3M-SHP- PTP-H1	SFG-t7EC3M-SHP mit humaner PTP-H1 cDNA	diese Arbeit
pGEX-TACEi-wt	in pGEX klonierte cDNA der intrazellu- lären Domäne humaner TACE	A. Gschwind, d. AG.
PGEX-TACEi-YE	pGEX-TACEi-wt-Derivat mit dem AS-Austausch Y->E	A. Gschwind, d. AG.

**2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide**

Sequenz	Name
GGGACCCGTCACCCACAGCATCTCCGTCCCCGCGTAGTCCGGG ACATCATACGGGTAGGTACCGATCTCATCCGAGTAGGGGCTGG "primer" für die Mutagenese zur Herstellung der prozessierungsdefizienten Form von PTP-LAR	IVM-LAR-PD
CGGAATTCGGGAACAAAAGCTGGAGC "forward primer" für die PCR der pBS-SK+-MCS zur Generierung von pcDNA3-ESK, pLXSN-ESK und pUHD-ESK	pBS-ESK+-MCSse
CACTATAGGGCGAATTGG "reverse primer" für die PCR der pBS-SK+-MCS zur Generierung von pcDNA3-ESK, pLXSN-ESK und pUHD-ESK	pBS-ESK+-MCSas
CGGAATTCTACGACTCACTATAGGGC "forward primer" für die PCR der pBS-SK+-MCS zur Generierung von pcDNA3-EKS, pLXSN-EKS und pUHD-EKS	pBS-EKS+-MCSse
GGGAACAAAAGCTGGAGC "reverse primer" für die PCR der pBS-SK+-MCS zur Generierung von pcDNA3-EKS, pLXSN-EKS und pUHD-EKS	pBS-EKS+-MCSas
CCAGACATGTCATGATTGAACAAGATGGATTG "forward primer" für die PCR zur Umklonierung des Neomycin-Phosphotransferase-Gens aus pLXSN in SFG-tcITE1-Neo	Neose
CGCGGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG "reverse primer" für die PCR zur Umklonierung des Neomycin-Phosphotransferase-Gens aus pLXSN in SFG-tcITE1-Neo	Neoas
CGGGGATCCGCTGCTTCATCCCCGTGG "forward primer" für die PCR zur Umklonierung des HSV TK-Promotors und des Hygromycin-Resistenz-Gens aus pTK-Hyg in SFG-t7ECEM-PHS	HSVHyg-PHSse
GGAGATCTTCAGTTAGCCTCCCCCATC "reverse primer" für die PCR zur Umklonierung des HSV TK-Promotors und des Hygromycin-Resistenz-Gens aus pTK-Hyg in SFG-t7ECEM-PHS	HSVHyg-PHSas
GAAGATCTGCTGCTTCATCCCCGTGG "forward primer" für die PCR zur Umklonierung des HSV TK-Promotors und des Hygromycin-Resistenz-Gens aus pTK-Hyg in SFG-t7ECEM-SHP	HSVHyg-SHPse
CGCGGATCCTCAGTTAGCCTCCCCCATC "reverse primer" für die PCR zur Umklonierung des HSV TK-Promotors und des Hygromycin-Resistenz-Gens aus pTK-Hyg in SFG-t7ECEM-SHP	HSVHyg-SHPas

CATGGCGAATTCGGGCGCGCCATCGCGAAGGCCGGCCAC CGCGGAACGCGTTCCTGCAGGAGCGGCCGCAG	SFG-MCSse
"sense Oligonukleotid" für die Klonierung der erweiterten MCS in SFG-t7EC3	
GATCCTGCGGCCGCTCCTGCAGGAACGCGTTCGCGGGTG GCCGGCCTTCGCGATGGCGCGCCCGAATTCGC	SFG-MCSas
"antisense Oligonukleotid" für die Klonierung der erweiterten MCS in SFG-t7EC3	
CGCGTCCTGCAGGATACACCGACATCGAGATGAACCGGCTG GGCAAGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGTA AGC	VSV/VSVse
"sense Oligonukleotid" für die Klonierung deVSV/VSV-Dimers	
GGCCGCTTACTTGCCCAGCCGGTTCATCTCGATGTCGGTGTA CTTGCCCAGCCGGTTCATCTCGATGTCGGTGTATCCTGCAGGA	VSV/VSVas
"antisense Oligonukleotid" für die Klonierung deVSV/VSV-Dimers	

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

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

### 2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von verschiedener Zelllinien wurden größere 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 bei Temperaturoptimum des Enzyms.

#### 2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach

Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel aufgereinigt und eluiert.

### 2.2.3.3 Phosphorylierung von 5'-Enden

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide verfügen an ihrem 5' Ende meist über keine Phosphatgruppe. Um im Rahmen der *in vitro* Mutagenese eine Verknüpfung des Oligonukleotids mit dem neu synthetisierten DNA-Strang durch T4 DNA-Ligase zu ermöglichen, muß eine Phosphatgruppe mit Hilfe einer Polynukleotidkinase an das 5'-Ende des Oligonukleotids angefügt werden.

200 pmol des Oligonukleotids wurden hierzu in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in 1x Polynukleotidkinasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM Spermidin, 10 mM EDTA pH 8,0) in Anwesenheit von 0,5 mM ATP und 10 E Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3.4 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamt-volumen 10 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend 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 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

## 2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

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

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

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

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

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

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>), 70 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl kompetenter, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/Ampicillin-Agarplatten (Antibiotikum entsprechend des dem Vektor zugrundeliegenden Resistenzgens) ausplattiert.

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

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

## 2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

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

### 2.2.7.1 Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pRK5 DANN

Transformierte CJ236 Bakterien wurden in 3 ml LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin angeimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde mit  $1 \times 10^8$  M13KO7 Phagen (Pharmacia, Freiburg) infiziert (MOI 20) und für zunächst 3 h, nach anschließender Zugabe von Kanamycin (70 µg/ml) und für weitere 16 h bei 37°C geschüttelt. Danach enthielten die zur Infektion verwendeten M13 Phagen die einzelsträngige DNA, an der die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren von 1,2 ml Kulturmedium gründlich aus dem Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl 20% PEG/NaCl bei RT für 20 min präzipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Phagensediment wurde in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl puffergesättigtem Phenol/Chloroform mehrfach extrahiert. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase wurde die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 200 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac (pH 7,5) und 800 µl absolutem Äthanol gefällt und bei 4°C mit 13000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Qualität der einzelsträngigen DNA wurde auf einem 15%igem Agarosegel ermittelt. Als Kontrolle auf Kontamination mit doppelsträngiger DNA wurde 100 ng 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: 200 ng einzelsträngige DNA, 2-3 pmol phosphoryliertes Oligomer, 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM

NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem 90°C warmen Heizblock 2 min 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 1 µl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1µl), 1 µg T4-Gen 32 Protein (0,5 µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1 µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschließend 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl TE gestoppt. 10 µl Aliquots wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*. Bakterien genutzt.

## 2.2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

### 2.2.8.1 PCR-Amplifikation 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 und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA  
 1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol  
 1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol  
 5 µl 10x Taq Polymerase Puffer  
 (20 mM Tris/Cl, pH 8,0, 0.1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM  
 EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))  
 1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)  
 1 µl Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Ansätze wurden mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und die Synthesereaktion in einem "Thermal Reactor" der Fa. Biometra durchgeführt. Für die Amplifikation eines 1 kb langen Fragmentes wurde dabei das folgende Syntheseprotokoll verwendet, wobei die hier angeführte Hybridisierungstemperatur exemplarisch und grundsätzlich von den Oligomersequenzen abhängig ist.

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 2.2.11.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

### 2.2.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

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

## 2.2.9 Sequenzierung von DNA

DNA Sequenzanalysen wurden nach der Methode der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchreaktion (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Ausgehend von einem chemisch synthetisierten Sequenzier-Oligomer, das an die denaturierte "Template"-DNA hybridisiert (Annealing), wird in einer Polymerasereaktion in Gegenwart der Desoxynukleotide dGTP, dTTP, dCTP und [<sup>35</sup>S]- $\alpha$ -dATP ein Stück komplementären DNA-Stranges synthetisiert (Labelling). In der Abbruchreaktion wird die Strangsynthese durch Einbau von Didesoxynukleotiden beendet. Diese werden zwar von der Polymerase in den DNA-Strang eingebaut, führen jedoch zu einem Abbruch der Kettenverlängerung, da sie keine 3'-Hydroxylgruppen besitzen. Durch Einbau solcher Didesoxynukleotide an zufälligen Stellen im neusynthetisierten Strang kommen DNA-Fragmente zustande, die sich in ihrer Länge um nur je ein Nukleotid unterscheiden. Die Reaktionen werden nach einer bestimmten Zeit mit Formamid gestoppt, erhitzt, und die DNA-Fragmente werden entsprechend ihrer Größe über Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend können die Fragmente aufgrund der [<sup>35</sup>S]- $\alpha$ -dATP-Markierung durch Exposition des getrockneten Sequenzgels auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Dabei entspricht jede Bande einer Abbruchreaktion durch das entsprechende Didesoxynukleotid. Aus der Reihenfolge der Banden ergibt sich somit die DNA-Sequenz der analysierten DNA.

## 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<sup>TM</sup>-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h 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 Gesamt-RNA

Die Präparation der RNA erfolgte nach Puissant und Houdebine (Puissant and Houdebine, 1990) durch Extraktion der RNA mittels saurem Phenol.

Die Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen bis zu 80%iger Konfluenz wachsen gelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 2 ml Puffer GTC (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M Mercaptoethanol, 10 mM EDTA) pro Platte. Nach einigen Minuten wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Schabers abgelöst und mehrmals mit Hilfe einer Spritze durch eine Kanüle (0.9 x 95 mm) gepresst, um die DNA zu scheren. Es wurde 1 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0, 10 ml Wasser-gesättigtes Phenol und 2 ml

Chloroform hinzugeben, wobei nach Zugabe jeder einzelnen Lösung stark gemischt wurde (Vortex). Das Gemisch wurde für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 10 ml Isopropanol versetzt. Anschließend wurde wieder für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde durch sehr starkes Vortexen in 2 ml 4 M LiCl resuspendiert, wobei nicht das gesamte Pellet wieder aufgelöst werden konnte. Es wurde erneut wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS aufgenommen. 2 ml Chloroform wurden zugesetzt, und es wurde wiederum zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 3 Volumen Ethanol und 0.3 M Natriumacetat, pH 6.0 versetzt und für 30 min auf Ethanol/Trockeneis inkubiert. Abschließend wurde die RNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

### 2.2.10.2 Präparation von poly-A<sup>+</sup> RNA

Die Isolation von polyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte mit Hilfe von Oligo-dT-Cellulose über eine Säule. Hierbei kommt es zur Anreicherung der mit einem polyA<sup>+</sup>-Signal versehenen mRNA bei gleichzeitiger Abtrennung von anderen RNA-Spezies.

Oligo-dT-Cellulose wurde über Nacht bei 4°C in Puffer A (10 mM Tris/Cl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) bei einer Konzentration von 1g/40ml quellen gelassen. 1 ml dieser Suspension wurde in eine silikonisierte und mit silikonisierter Glaswolle verschlossene Pasteurpipette gegeben und die Säule mit 20 Volumen Puffer A gewaschen. 1 mg Gesamt-RNA wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt. Die RNA wurde auf 1 x Puffer A eingestellt und das Volumen auf 1 ml erhöht. Die RNA wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluß gesammelt. Der Durchfluß wurde nochmal auf die Säule gegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Die Säule wurde mit 5 x 1 ml Puffer A gewaschen und der Durchfluß gesammelt. Von dem Durchfluß wurde die OD bei 260 nm bestimmt. Wenn sie weniger als 0.05 betrug, wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA mit 2 x 0.8 ml Puffer B (10 mM Tris/Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% SDS) eluiert. Die OD bei 260 nm beider Fraktionen wurde bestimmt und die Fraktionen gegebenenfalls vereinigt. Die RNA wurde mit 3 Volumen Ethanol und 300 mM Natriumacetat pH 6.0 in einem silanisierten Corex-Zentrifugenröhrchen versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Ethanol/Trockeneis wurde die RNA 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in H<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 1 µg/µl aufgenommen.

### 2.2.10.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

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

Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 10 µg Gesamt-RNA wurde mit 5 µl 10x MOPS, 8,75 µl Formaldehyd (37%(v/v)) und 25 µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl gebracht. Die Proben wurden 10 min bei 65°C erhitzt, anschließend mit 10 µl RNA-Probenpuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm<sub>2</sub> Gelfläche wurden 0,8 Volt Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 200 ml Laufpuffer mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 30 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (λ=302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

#### 2.2.10.4 Northern-Analyse

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

#### 2.2.10.5 Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran

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

#### 2.2.10.6 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA

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

### 2.2.11 Arbeiten mit cDNA-Arrays

#### 2.2.11.1 Konstruktion der cDNA-Arrays

Die cDNA-Arrays wurden unter Verwendung eines Spotters (BioGrid) selbst hergestellt und waren Nylonmembranen von 12 x 8 cm Größe, auf denen Plasmide in Punktform aufgetragen wurden. Außer einiger Punkte mit Leervektor, die der Kontrolle dienten, enthielten alle Plasmide cDNA-Sequenzen, die der kodierenden Region eines bestimmten Gens entsprachen. Die Größe dieser Sequenzen variierte zwischen 200 bp und 4000 bp. Die Mehrheit der Sequenzen kodierte dabei für Proteinkinasen und -phosphatasen. Aber auch die Sequenzen von Proteasen und anderen Molekülen, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, befanden sich auf den Filtern. Für viele der Gene wurde mehr als eine Sonde auf die Filter gespottet. Diese Sonden repräsentierten zwar dasselbe Gen, die verwendeten Sequenzen

entstammten jedoch unterschiedlichen Bereichen des Gens und unterschieden sich hinsichtlich ihrer Länge. Jede Sonde war zweimal auf einem Filter aufgetragen.

### 2.2.11.2 Prähybridisation der cDNA-Arrays

Jede Membran wurde zuerst mit Puffer W1 benetzt, so daß die gesamte Membranfläche befeuchtet war. Die Membran wurde anschließend mit 15 ml Prähybridisierungspuffer mit 100 µg/ml tRNA in einem Hybridisierungsröhrchen verschlossen. Die Prähybridisation erfolgte unter Rotation in einem Hybridisierungsöfen (MWG-Biotech, Ebersbach) bei 68°C zumeist über Nacht, mindestens aber für 4 h.

### 2.2.11.3 Radioaktive Markierung der cDNA

Die cDNA-Proben wurden mit  $^{33}\text{P}$  markiert. Dieses Radioisotop hat den Vorteil, daß es nicht so stark überstrahlt wie  $^{32}\text{P}$ . Zur Markierung wurde der „Megaprime DNA Labeling Kit“ von Amersham-Pharmacia verwendet und leicht modifiziert.

Folgender Ansatz wurde 5-10 min bei 95°C inkubiert:

cDNA	5	µl (oder 300 ng)
Primer (aus dem Kit, Hexanukleotide, „random“ primer)	2.5	µl
H <sub>2</sub> O	2.5	µl

Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugegeben:

dGTP	2	µl
dCTP	2	µl
dTTP	2	µl
Reaktionspuffer	2.5	µl
Klenow-Enzym	1.5	µl
α- $^{33}\text{P}$ -ATP	5	µl (50 µCi)

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert, um Verdunstungen zu vermeiden. Anschließend wurde die markierte cDNA mittels des „PCR purification kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit 150 µl des Elutionspuffers von der Säule des Kits eluiert.

### 2.2.11.4 Hybridisation

Die gereinigte  $^{33}\text{P}$ -markierte cDNA wurde mit COT-DNA (Gibco, U.S.A.) inkubiert. Diese DNA bindet besonders stark an repetitive Sequenzen und blockiert somit jene Sequenzen der cDNA, die bei Hybridisation mit den Arrays unspezifische Signale verursachen könnten.

Hierzu wurde die 150 µl markierte cDNA mit 40 µl 20 x SSC, 2 µl 10% SDS und 10 µl COT-DNA (1 mg/ml) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 68°C inkubiert. Danach wurde der Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, der vorher auf 70°C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA versetzt wurde. Für den Beginn der Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer auf den cDNA-Arrays ohne Temperaturverlust gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C und Rotation der Hybridisierungsröhrchen für minimal 16 h.

### 2.2.11.5 Waschen der cDNA-Arrays

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Arrays folgendermaßen gewaschen:

- 1) W1, 20 min, 42 °C
- 2) W1, 20 min, 42 °C
- 3) W2, 20 min, 42 °C
- 4) W2, 60 min, 65 °C

Danach wurden die Arrays mit H<sub>2</sub>O abgespült, getrocknet und in Haushaltsfolie eingewickelt. Die Exposition erfolgte auf Phosphoimagerplatten (Fuji, Japan) für 48 h.

## 2.2.12 Auswertung der cDNA-Arrays

### 2.2.12.1 Einlesen der cDNA-Arrays und Ermittlung der Expressionsdaten

Die exponierten Phosphoimagerplatten wurden mittels eines Phosphoimagers (Fuji Bas2500, Fuji, Japan) eingelesen. Die so erhaltenen Computerdateien wurden weiterverarbeitet.

Die Schwärzung der einzelnen Punkte wurde mit Hilfe des Computerprogramms ArrayVision (RayTest, Kanada) ermittelt. Von den Schwärzungen der Punkte wurde der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden in das Computerprogramm Excel (Microsoft, U.S.A.) exportiert, wo sie weiter bearbeitet wurden. Dazu wurde eine von Reimar Abraham (diese Arbeitsgruppe) geschriebene Auswertungsroutine (in VisualBasic) verwendet, die die Werte automatisch normalisierte und die in den Klonen stärker oder schwächer exprimierte Gene identifizierte.

Zur Normalisierung wurde zuerst der Durchschnitt der Werte für den Leervektor pBluescript eines cDNA-Arrays von allen Werten desselben Arrays abgezogen. Auf diese Art wurde der Hintergrund, den jeder Punkt wegen unspezifischer Bindungen an den Plasmidvektor enthielt, in weiteren Berechnungen nicht mehr berücksichtigt. Anschließend wurde für jeden cDNA-Array die Summe aller Werte gebildet und jeder Punkt durch diese Summe geteilt. Dadurch konnten Schwankungen in der Gesamtintensität aller Punkte der cDNA-Arrays untereinander ausgeglichen werden. Jeder Wert wurde dann mit 10000 multipliziert, um handlichere Werte für die spätere Auswertung zu erhalten. Diese Rechenoperation änderte nicht das Verhältnis der Werte untereinander. Mit den normalisierten Werten wurde die Expression der den Filtern zugrundeliegenden Gene in den verschiedenen Brustkrebszelllinien verglichen.

### 2.2.12.2 Gruppieren der Gene

Durch Vergleich der Expressionsdaten können einzelne Gene entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile eingeteilt werden. Die Expressionsprofile zweier Gene ähneln sich, wenn sie in verschiedenen Zellpopulationen in vergleichbarem Maße stärker oder schwächer exprimiert werden. Ähnliche Expression könnte dabei eine funktionelle Gemeinsamkeit der entsprechenden Gene bedeuten. Wenn mehrere Gene beispielsweise mit Signaltransduktionsvermittelnder Rolle ähnliche Expressionsprofile aufweisen, so könnten sie in einem gemeinsamen Signalweg wirken oder in anderer Form funktionell miteinander verknüpft sein. Für das Gruppieren der Gene wurden die normalisierten Expressionsdaten mit dem Computerprogramm „Cluster“ (Eisen et al., 1998) analysiert. Es wurden nur diejenigen Gene berücksichtigt, die in wenigstens 80 % der cDNA-Arrays einen Wert von 1.0 oder größer

aufwiesen. Dadurch wurden jene Gene ausgeschlossen, deren Werte so klein und daher zu dicht am unspezifischen Hintergrund der Filter lagen. Für diese Eingrenzung wurde die Filterfunktion des Programms verwendet. Anschließend wurden die Daten im Programm logarithmiert und nochmals normalisiert. Das Gruppieren der Gene erfolgte durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus. Es wurde der „Average Linkage“ Modus mit der zentrierten Korrelation benutzt. Bei dieser Art des Gruppierens werden zuerst kleinere Gengruppen gefunden und die Ähnlichkeit der Gengruppen untereinander bestimmt, indem ein durchschnittliches Expressionsprofil aus den Genen in einer Gengruppe gebildet und dieses dann mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil der anderen Gengruppen verglichen wird. Die Ergebnisse des Gruppierens wurden in einem Ergebnisdatenfile abgelegt und mit dem Programm „TreeView“ (Eisen et al., 1998) visualisiert. Wie gut die Expressionsprofile der Gene und Gengruppen miteinander korrelieren, wurde durch den Korrelationsfaktor ausgedrückt, der von 1.0 für identische Profile bis -1.0 für genau entgegengesetzte Profile reichte. Für weitere Untersuchungen wurden nur Gengruppen verwendet, die einen Korrelationsfaktor von 0.7 oder größer besaßen.

## **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/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 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 sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Zellzählgerät (Coulter Electronics, USA).

PC12 Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Platten kultiviert. Hierzu wurden die Platten mit Kollagen (in Äthanol gelöst, isoliert aus Ratten-Schwänzen, Sigma) beschichtet und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Vor Verwendung wurden die Platten 3 x 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 6 cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

### 2.3.3 Transfektion von Säugerzellen

#### 2.3.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit  $\text{CaCl}_2$  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 und Ruddle, 1981) Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$ /3,5cm-Schale ausgesät. Pro Transfektion wurden 4  $\mu\text{g}$  DNA mit  $\text{H}_2\text{O}$  zu einem Volumen von 90  $\mu\text{l}$  verdünnt, mit 10  $\mu\text{l}$  einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 100  $\mu\text{l}$  BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert. Zur Transfektion von größeren Zellzahlen wurde die Menge des benötigten Präzipitats nach dem jeweiligen Medienvolumen und nicht nach der Wachstumsfläche berechnet. Die zu transfizierenden Zellen wurden in 4, 8 und 20 ml Medium auf eine 6cm-, 10cm- oder 15cm-Schale ausgesät, so daß jeweils das 2-, 4- und 10-fache des oben beschriebenen Ansatzes transfiziert wurde.

#### 2.3.3.2 Lipofectamine®-Transfektion

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine® lagert sich an DNA an und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen. Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$ /6-Loch-Schale ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine® und 90  $\mu\text{l}$  serumfreiem DMEM sowie eine Lösung B mit 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 100  $\mu\text{l}$  serumfreiem DMEM angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Zellen einmal mit 2 ml serumfreiem DMEM gewaschen. Anschließend wurden zu den Transfektionsansätzen 800  $\mu\text{l}$  serumfreies DMEM zugegeben, gemischt und die fertigen Transfektionsansätze auf die Zellen pipettiert, von welchen das Medium kurz davor abgesaugt wurde. Nach 4 h im Brutschrank wurden jeweils 1000  $\mu\text{l}$  DMEM mit 20% FCS auf die Zellen gegeben und für weitere 20 h inkubiert. Für Stimulationen wurde dann das Transfektionsmedium abgenommen und durch serumfreies DMEM ersetzt.

#### 2.3.3.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der  $\beta$ -Galaktosidase wie unter 2.3.3.2 und 2.3.3.3 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, 10 min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blaufärbung transfizierter Zellen 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert.

### 2.3.4 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen

Für die Gewinnung amphotropher bzw. ekotropher Retrovirus-Überstände wurden  $2 \times 10^6$  Phoenix A bzw. Phoenix E Fibroblasten/6-cm-Schale in 3 ml DMEM, 10% FCS ausgesät und nach dem Protokoll von G. Nolan transfiziert. Hierzu wurden 10 µg Plasmid-DNA in 439 µl Wasser mit 61 µl einer 2,0 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und tropfenweise unter gleichzeitigem Schütteln mit 500 µl HBS (2x, pH 7,0) versetzt. Während der 15 minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen mit 4 µl Chloroquinelösung (50 mM) vorbehandelt. Anschließend wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und 8 h bei 37°C und 7%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Hernach wurde der Transfektionsansatz gegen frisches, serumhaltiges Medium ersetzt. Nach weiteren 16 h wurde der Überstand abgenommen und mit einem Sterilfilter (0,45 µm) abfiltriert. Die Infektion der tags zuvor bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$ /6-Loch-Schale ausgesäten Zielzellen erfolgte in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei 37°C für 4-16 h. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 4 h erneut mit frischem Virusüberstand infiziert. Nach Abschluß der Infektionen wurde das Medium gewechselt und die Zellen im Falle Tetrazyklin-induzierbarer Zellen in Gegenwart des Antibiotikums (3 µl/ml) sowie zur Herstellung stabiler Zelllinien ab nächstem Tag in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 10 bis 14 Tagen in Gegenwart von 100 µg/ml Geneticin (G418; für Infektionen des Plasmids SFG-tcITE1-Neo) oder, je nach Zelllinie, 100-350 µg/ml Hygromycin B (im Falle von Infektionen des Plasmid SFG-t7EC3M-PHS).

### 2.3.5 Induzierbare Expression eines Zielgens mittels des modifizierten Tet-induzierbaren Genexpressionssystem

Zur induzierbaren Expression eines Proteins in eukaryontischen Zellen wurde das in dieser Arbeit modifizierte Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem verwendet. Diesem in seinen wesentlichen Elementen von Gossen und Bujard (1992) etablierten Expressionssystem liegen Kontrollelemente des im Transposon Tn10 von *E. Coli* kodierten Tetrazyklin-Resistenz-Operons zugrunde. Der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA) wurde durch Fusion des bakteriellen Tetrazyklin (Tet)-Repressors mit der aktivierenden Domäne des Virion Proteins 16 von *Herpes simplex* Virus generiert. Dieser Transaktivator bindet an das Tet-Responsive Element (TRE), das sich aus sieben Kopien der 42 Bp umfassenden Tet-Operatorsequenz zusammensetzt und einem humanen Cytomegalovirus-Minimalpromotor bzw. einem LTR-Promotor 5'-terminal vorgelagert ist. In Abwesenheit von Tetrazyklin (Tet) oder Tet-Derivaten wie Doxyzyklin bindet der tTA an das TRE und stimuliert die Transkription des den Transaktivator selbst kodierenden sowie des gewünschten Gens durch Aktivierung des jeweiligen Promotors. Hingegen hat die Zugabe von Tet das Abfallen des Transaktivators von den Operatorsequenzen zur Folge und resultiert in der Transkriptionssinhibition des Zielgens sowie, aufgrund des eingeführten Rückkopplungsmechanismus, auch des Transaktivatorprotein kodierenden Gens selbst.

Zur Herstellung einer Tetrazyklin (Tet)-induzierten Zelllinie wurde zuerst ein das Transaktivatorprotein stabil und induzierbar exprimierender Ausgangsklon generiert, wobei das hierfür kodierende Plasmid SFG-tcITE1-Neo über Infektion (2.3.4), der Vektor pcDNA3-tTA-Puro über Transfektion (2.3.3.1 und 2.3.3.2) eingeführt wurde. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde über ein entsprechendes SFG-t7EC3M-PHS-Derivat ebenfalls retroviral transferiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte unter den in 2.3.4 genannten Bedingungen. Die entstandenen Klone wurden isoliert, kultiviert und anschließend durch Entfernung von Tet auf Expression des Transaktivators sowie des Zielgens getestet.

### 2.3.6 Stimulation von Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen und deren Einfluß auf die Phosphorylierung sowie die Prozessierung von PTP-LAR untersucht werden.

Dazu wurden die Zellen für 24-48 h in serumfreiem Medium gehungert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Stimulationen mit den verschiedenen Faktoren für die angegebenen Endkonzentration bei 37 °C durchgeführt:

<u>Faktor:</u>	<u>Konzentration:</u>	
EGF	50	ng/ml
β-Heregulin	50	ng/ml
Carbachol	1	mM
Endothelin	100	nM
TPA	1	μM

Zur Inhibition von PTPn wurden die Zellen jeweils mit frisch hergestellter Peroxyvanadat-lösung (POV) behandelt. Dazu wurde 968 μl einer 100 mM Natriumorthovanadat-lösung mit 34 μl 30%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt, in einer Verdünnung von 1:100 auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.7 Nachweis der Transformation eukaryontischer Zellen durch Bildung von Zellfoci („focus formation assay“)

Dieser Test beruht auf dem Verlust der Kontaktinhibition von transformierten NIH3T3 Fibroblasten. Untransformierte NIH3T3 Zellen wachsen auf dem Untergrund einer Gewebekulturschale nur bis zur einschichtigen Konfluenz, während transformierte Zellen in mehreren Schichten wachsen und eine dreidimensionale Struktur (Zellfocus) ausbilden.

2x10<sup>5</sup> NIH3T3 Zellen wurden auf 6cm-Schalen ausgesät und mit verschiedenen Mengen eines HER2-Virusüberstandes infiziert. Die infizierten Zellen wurden nach der Infektion zwei Wochen in DMEM-Medium kultiviert, das mit 4% FCS supplementiert war. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die entstandenen Foci anschließend mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt.

### 2.3.8 Radioaktive Markierung von Zellen

Zur radioaktiven Methioninmarkierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ü.N. mit 40 μCi/ml [<sup>35</sup>S]-L-Methionin in methioninfreiem DMEM inkubiert. Dabei wird in alle neu synthetisierten Proteine das radiaktiv markierte [<sup>35</sup>S]-L-Methionin eingebaut.

## 2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.4.1 Triton X100-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 (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

### 2.4.2 Expression und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Systeme genutzt werden, um fremde, z.B. eukaryontische Proteine als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach der Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatografie mit Glutathion-Sepharose (Sigma) gereinigt werden. Die Elution der Proteine findet in Gegenwart von reduziertem Glutathion statt.

#### 2.4.2.1 Expression eines GST-Fusionsproteins in Bakterien

100 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusatz) wurden mit einer frischen pGEX-transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden mit dieser Bakterienkultur 900 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusatz) angeimpft. 1 ml Bakteriensuspension wurde zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> abgenommen und anschließend abzentrifugiert. Pro gemessene OD wurden die Bakterien in 50 µl 2 x Laemmli-Puffer lysiert und für eine spätere Gelelektrophorese auf Eis gestellt. Die Induktion der Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 100 mM IPTG (Endkonzentration: 1 mM) hervorgerufen. Die Bakterien wurden hierzu bei 37°C 3 bis 4 h geschüttelt, wobei die IPTG-Konzentration sukzessive in Schritten von 1 mM auf 5 mM erhöht wurde. Nach Beendigung der Inkubation wurde 1 ml induzierte Bakterienkultur entnommen und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Zur Proteinpräparation wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C, GS-3 Sorvall-Rotor), in 20 ml eiskaltem TS-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml Lysozym (20 mg/ml) 15 min auf Eis lysiert. Durch Zugabe von 2 ml EDTA (500 mM, pH 8,0), 3 ml PMSF (100 mM, in Äthanol gelöst) und 4 ml 10% Triton X-100 wurde der Ansatz

für 1 h auf Eis belassen. Hierauf schloß sich eine 30 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 20000 rpm an. Dabei wurden unerwünschte Zellbestandteile (DNA/RNA/wasserunlösliche Proteine) abgetrennt. 20 µl des geklärten Überstands wurden zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel entnommen und im selben Volumen 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

#### 2.4.2.2 Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose

Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurden die Überstände mit 1 ml Glutathion-Sepharose 30 min bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Während dieser Zeit binden die Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose. Anschließend wurde diese dreimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen, in Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert und das restliche PBS entfernt.

Zur Elution wurde die Glutathion-Sepharose mit 400 µl GST-Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) 5 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert, die Sepharose abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Drei weitere Elutionen mit 400 µl GST-Elutionspuffer mit 10, 20 und 30 minütiger Inkubation bei RT schlossen sich an.

Zur Kontrolle wurden 20 µl aus allen Eluatentnahmen entnommen und mit 20 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt. Alle Proben wurden dann mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Das gesamte Eluat wurde über Nacht gegen 30% Glycerin, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert. Anschließend wurde die Konzentration des eluierten Proteins bestimmt (2.4.3).

#### 2.4.3 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 (Redinbaugh und Turley, 1986). Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1200 µg Protein/ml) eingesetzt.

#### 2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen

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

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Antikörper und Protein, erleichtert (Hjelm et al., 1977; Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder 3-10 µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zellysaten gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem

Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

### 2.4.5 *In vitro*-Assoziation mit GST-Fusionsproteinen

Zunächst wurden 1-3 µg GST-Fusionsprotein und 30 µl Glutathion-Sepharose in 600 µl HNTG-Puffer 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden dann kurz bei 9000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und je 600 µl HNTG-Puffer und Zellysat auf die „Beads“ gegeben. Dann wurde für 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und die Proben wie in 2.4.4 gewaschen und weiterverarbeitet.

### 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 und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung bestimmt wird. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einen kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. 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

### 2.4.7 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5 min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einen Röntgenfilm aufgelegt und abhängig von der Signalstärke 12 h bis 1 Woche bei -80°C exponiert.

## 2.4.8 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

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

## 2.4.9 Immundetektion (Immunoblotanalyse)

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 1 h 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 Antikörper-lösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Anti-körper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach viermal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min 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 der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min 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 (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

## 2.5 Zellbiochemische Untersuchungen

### 2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine sowie der Prozessierung von PTP-LAR

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine und/oder die Prozessierung von PTP-LAR in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 24 bis 48 h in

serumfreiem Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.1) wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren oder Liganden G Protein-gekoppelter Rezeptoren stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine oder die Prozessierung von PTP-LAR getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 30 min 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 der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin ( $\alpha$ PY)-, das Maß der Prozessierung von PTP-LAR mit Hilfe eines LAR-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.4.7) analysiert.

### 2.5.2 Bestimmung der *in vitro*-Phosphataseaktivität gegenüber pNPP

Zur Bestimmung der *in vitro* Phosphataseaktivität wurde para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat verwendet. Das farblose pNPP wird von Proteintyrosinphosphatasen zu dem gelben p-Nitrophenolat umgesetzt, das sich anhand seiner Absorption bei 405 nm leicht nachweisen läßt.

pNPP Puffer: 25 mM NaOAc (pH 5,5)  
5 mM EDTA (pH 7,0)  
10 mM DTT  
5 mM pNPP

Die Zellyse erfolgte ohne die Phosphataseninhibitoren NaF und ortho-Vanadat. Erhaltene Zellysate wurden mit Phosphatase-spezifischen Antikörpern angereichert und mit 150  $\mu$ l des pNPP Puffers bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von NaOH wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption der Lösung bei 405 nm in einer Mikrotiterplatte mit einem Plattenphotometer (Dynatech MR 500) bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Modifikation des Tetrazyklin-induzierbaren Systems

Zu Beginn dieser Arbeit stand für induzierbare Expression von Genen das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem zur Verfügung (Gossen und Bujard, 1992, Gossen et al., 1995). Im Falle des Tet-Off-Zweikomponentensystems befindet sich dabei die von einem konstitutiv aktiven Promotor getriebene Kodierungssequenz des Transaktivatorproteins tTA auf einem Plasmid. Das zweite Plasmid trägt das Zielgen unter der Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors, dem zur Tetrazyklin-abhängigen Bindung von tTA sieben Tet-Operator-Sequenzen als Tetrazyklin-regulierbares Element vorgelagert sind. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Transaktivator an jenes Tetrazyklin-regulierbare Element, rekrutiert eukaryontische Polymerase II und initiiert damit die Transkription des dahinterliegenden Zielgens. Hingegen soll die Zugabe des Antibiotikums zum Kulturmedium infolge einer Konformationsänderung ein Abfallen des Transaktivators vom Promotor bewirken und somit die Expression des Zielgens unterdrücken.

Im Zuge der Etablierung in diversen Zelllinien wurden jedoch verschiedene, diesem System zugrundeliegende Nachteile deutlich. So erlaubte der Transfer der Komponenten über Transfektion die Etablierung dieses Systems lediglich in gut transfizierbaren Zielzellen. Insbesondere viele Tumorzelllinien mit oftmals nur sehr geringer Transfektionseffizienz konnten daher nicht berücksichtigt werden. Desweiteren war bei zahlreichen Klonen eine Instabilität, also eine mit zunehmender Kultivierungsdauer einhergehende Verringerung der Expressionsstärke des Zielgens, zu beobachten. Hauptproblem induzierbarer Klone war jedoch eine in vielen Fällen sehr starke Basalaktivität. Zwar ließ sich nach Entfernung von Tetrazyklin eine deutlich erhöhte Expression des Zielgens erreichen, jedoch war auch in Gegenwart des Antibiotikums eine unterschiedlich starke, konstitutive Expression detektierbar. Dies führt bei der Expression negativ regulatorischer oder toxischer Gene entweder zum Absterben oder zu einer Negativselektion zielgenexprimierender Klone (Weng et al., 1998).

Vorrangiges Ziel war es daher zunächst, ein geeignetes induzierbares Expressionssystem zu entwickeln und zu etablieren. Ein solches System sollte für ein möglichst breites Zielzellspektrum mit möglichst hoher Effizienz anwendbar sein und sich durch eine deutlich gesteigerte Stabilität auszeichnen. Beiden Aspekten wurde durch Modifikation auf retroviraler Basis beruhender Vektoren Rechnung getragen, deren Transfer durch Infektion die Etablierung auch in weniger gut transfizierbaren Zellen gestattet und aufgrund der Integration in das Wirtsgenom die erforderliche Stabilität des Systems bedingt. Im Fokus der Bemühungen stand jedoch die maßgebliche Verringerung der Basalaktivität des Systems. Hierauf wird im Zuge der Klonierung des Transaktivatorplasmids eingegangen.

### 3.1.1 Klonierung des retroviralen Transaktivator-Plasmids SFG-tcITE1-Neo

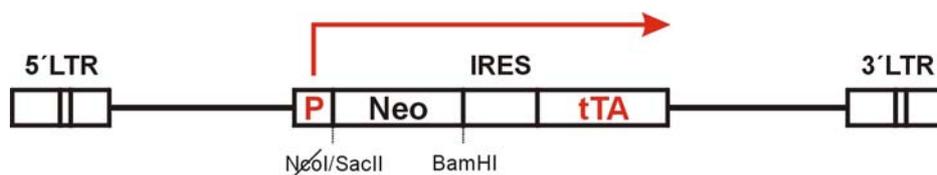
Ausgangspunkt für die Entwicklung eines verbesserten Tetrazyklin-induzierbaren Systems waren zwei auf dem retroviralen Plasmid SFG (Bueler und Mulligan, 1996) basierende Expressionssysteme. Das erste System entspricht dem oben beschriebenen Zwei-Komponenten-System. Es enthält auf dem einen Vektor die Kodierungssequenz für den Transaktivator, die von einem konstitutiv aktiven CMV-Promotor getrieben wird. Der andere Vektor trägt das Zielgen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren LTR-Promotors (Lindemann et al, 1997).

Das zweite System faßt als Ein-Komponenten-System die Kodierungssequenzen des Zielgens und des Transaktivatorproteins auf ein und demselben Plasmid zusammen. Beide Gene sind durch eine IRES-Sequenz miteinander verknüpft und werden unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren CMV-Minimalpromotor als bicistronische mRNA exprimiert. Keines der beiden Systemen zugrundeliegenden Plasmide verfügte dabei über ein Selektion ermöglichendes Resistenzgen (Lindemann et al, 1997).

Als ein wichtiger Grund für die Basalaktivität beider oben beschriebenen Zwei-Komponenten-Systeme kann die konstitutive Expression und damit die Akkumulation des Transaktivators vermutet werden, dessen Aktivität ausschließlich durch die aus der Bindung von Tetrazyklin resultierenden Konformationsänderung und damit Maskierung der DNA-Bindedomäne reguliert wird. Da die Bindung von Tetrazyklin an den Transkriptionsfaktor und damit dessen Inaktivierung den Gesetzen des chemischen Gleichgewichts unterliegt, wird grundsätzlich ein gewisser Teil des Proteins nicht mit dem Antibiotikum interagieren und daher in der aktiven Konformation verbleiben. Die absolute Zahl solcher nicht inhibierten und damit die Transkription des Zielgens initiiierenden Transaktivatormoleküle ist dabei umso größer, je stärker das Protein in der Zelle exprimiert wird. Grundidee zur Verminderung der Basalaktivität war daher die Einführung eines weiteren Regulationsprinzips, das die Kontrolle des Transaktivators zusätzlich auf Transkriptions- und damit auf Expressionsebene erlaubt. Es sollte daher ein System generiert werden, welches die Tetrazyklin-abhängige Transkription nicht nur des Zielgens, sondern auch des Transaktivatorproteins selbst erlaubt und somit eine Antibiotikum-vermittelte Regulation des Transaktivators auf Transkriptions- wie auch auf posttranslationaler Ebene gewährleistet. Hierdurch sollte die absolute Zahl nicht von Tetrazyklin gebundener und damit aktiver Moleküle insgesamt stark verringert werden.

Realisiert wurde dieser Ansatz durch Verknüpfung beider Systeme, indem das Ein-Komponenten-System nach Modifikation als Transaktivator-Plasmid in das Zwei-Komponenten-System integriert wurde. Aus dem Ein-Komponenten-Vektor SFG-tcLucITE1 (Lindemann et al, 1997) wurde das über NcoI und BamHI eingefügte Luciferase-Reportergen herausgeschnitten und durch die Kodierungssequenz für Neomycin-Phosphotransferase ersetzt. Diese wurde durch PCR unter Einführung entsprechender terminaler Klonierungs-

schnittstellen aus dem Plasmid pLXSN herausamplifiziert. Das in der NcoI-Erkennungssequenz enthaltene ATG-Triplett wurde anschließend über PCR-basierte Mutagenese entfernt und gegen die Erkennungssequenz für SacII ersetzt, um eine eventuelle Translation ausgehend von diesem, nicht im Leseraster zum Phosphotransferasegen stehenden Startcodon zu vermeiden. Das Ergebnis dieser Modifikationen war das retrovirale Plasmid SFG-tcITE1-Neo, in dem das Transaktivatorprotein tTA und die nun auch Selektion ermöglichende Neomycin-Phosphotransferase von einem Tetrazyklin-regulierbaren CMV-Minimalpromotor kontrolliert werden. Dieses Plasmid erlaubte somit eine induzierbare Expression des unter seiner eigenen Kontrolle stehenden Transaktivators in Form eines autoregulatorischen Loops. Aufbau und Regulationsprinzip dieses Vektors sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

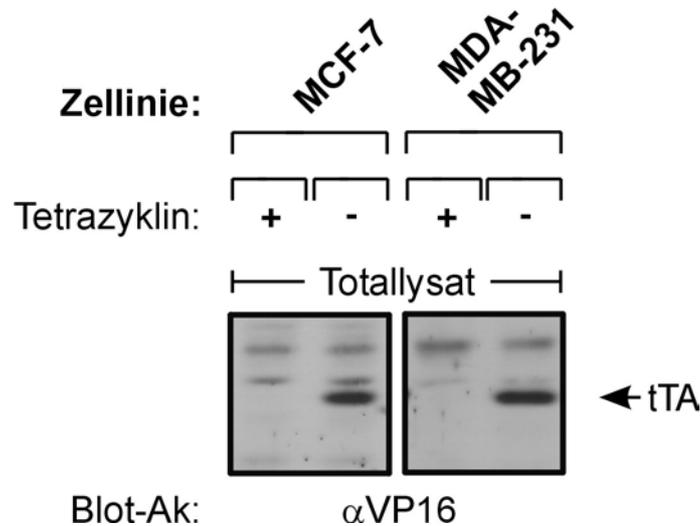


**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Aufbaus sowie des Regulationsprinzips des retroviralen Transaktivator-Plasmids SFG-tcITE1-Neo

Dargestellt ist die lineare Form des retroviralen Transaktivator-Plasmids SFG-tcITE1-Neo, das von den terminalen LTR-Regionen (long terminal repeat) eingerahmt ist. Die Kodierungssequenzen des Transaktivatorproteins tTA sowie der Neomycin-Phosphotransferase Neo sind über eine IRES-Sequenz (internal ribosomal entry site) miteinander verknüpft. Der positive Rückkopplungsmechanismus über den Transaktivator-kontrollierten CMV-Minimalpromotor P und die Transkription beider Gene als bicistronische mRNA ist durch den roten Pfeil angedeutet. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

### 3.1.2 Erzeugung stabiler Transaktivator-exprimierender Zelllinien unter Verwendung von SFG-tcITE1-Neo

Unter Verwendung des Vektors SFG-tcITE1-Neo wurden stabile, den Transaktivator induzierbar exprimierende Zelllinien entsprechend Kapitel 2.3.4 generiert. Die Induzierbarkeit der Transaktivator-Expression ist in Abbildung 5 exemplarisch für stabile Klone der beiden Brustkrebslinien MCF-7 und MDA-MB-231 gezeigt. Hierbei wurden die Zellen für fünf Tage in Ab- bzw. Anwesenheit von Tetrazyklin kultiviert und anschließend lysiert. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-Page aufgetrennt. Die nachfolgende Immundetektion erfolgte mit einem gegen die VP16-Domäne des Transaktivators gerichteten Antikörper. Bei beiden Zelllinien trat in Abwesenheit von Tetrazyklin auf der Höhe von 43 kDa ein deutliches Signal in Erscheinung. In Gegensatz hierzu war für die in Gegenwart von Tetrazyklin kultivierten Zellen keine Bande auf dieser Höhe detektierbar. Hiermit wurde deutlich, daß das erzeugte Plasmid SFG-tcITE1-Neo das gewünschte Autoregulationsprinzip erfüllte und der Transaktivator in detektierbaren Mengen nur in Abwesenheit von Tetrazyklin exprimiert wurde.



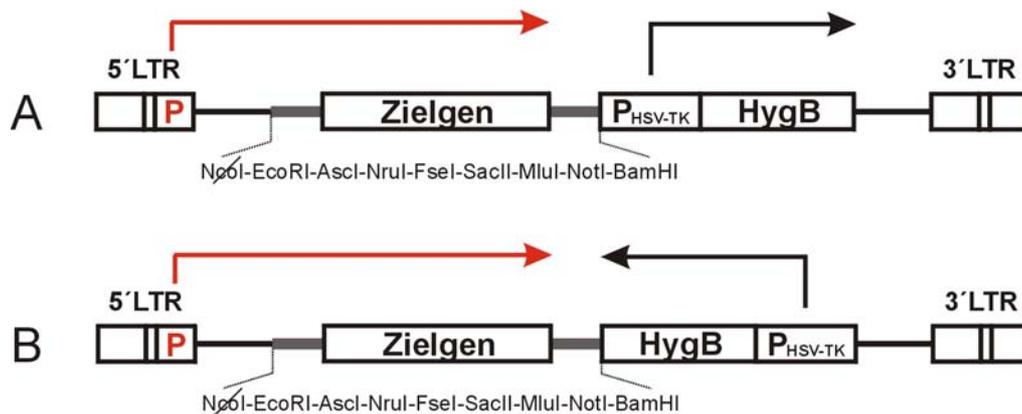
**Abb. 5:** Tetrazyklin-regulierbare Expression des Transaktivatorproteins tTA in SFG-tcITE1-Neo-stabilen MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien

SFG-tcITE1-Neo-stabile Klone der Brustkrebslinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden zu jeweils gleichen Zellzahlen ausgesät und für fünf Tage in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin (2  $\mu$ g/ml) kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteinkonzentrationen der gewonnenen Lysate bestimmt. Jeweils gleiche Mengen der Gesamtzellsate wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte mit einem polyklonalen, gegen die VP16-Domäne des Transaktivators gerichteten Antikörper ( $\alpha$ VP16). Die Position des Transaktivators ist am rechten Bildrand angegeben.

### 3.1.3 Klonierung des retroviralen Transaktivator-regulierten Expressionsplasmids SFG-t7EC3M-PHS

Um das Plasmid SFG-t7EC3 (Lindemann et al., 1997) effizienter für die Einklonierung verschiedenster Zielgene nutzen zu können, wurde zunächst eine „Multi-Cloning-Site“ mit den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NcoI, EcoRI, AscI, NruI, FseI, SacII, MluI, NotI und BamHI eingeführt. Diese Restriktionsschnittstellen wurden in zwei zueinander komplementären Oligonukleotiden zusammengefaßt und über die terminalen Schnittstellen anstelle des Luciferase-Reportergens einkloniert. Auch in diesem Plasmid mußte das in der NcoI-Erkennungssequenz vorliegende ATG-Triplett als vermeintlich zusätzliches Startcodon entfernt werden. In diesem Fall erfolgte dies durch Abdauen der nach NcoI-Verdau freigelegten Einzelstrangüberhänge mittels des Enzyms Mung-Bean-Nuklease. Um mit diesem Plasmid infizierte Zielzellen ebenfalls einer Selektion zuführen zu können, sollte entsprechend ein durch einen eigenen Promotor kontrolliertes Resistenzgen eingeführt werden. Dabei war unbedingt auszuschließen, daß die basale Transkription des eigentlichen Zielgens beispielsweise durch die konstitutive Aktivität oder durch Enhancer-Elemente des zusätzlichen Promotors erhöht wird und somit zu einer erhöhten Basalexpression des Zielgens führte. Aus diesem Grund wurde das Gen für die Hygromycin-B-Phosphotransferase unter die Kontrolle des schwachen HSV-TK-Promotors gestellt. Die Sequenz von HSV-TK-Promotor

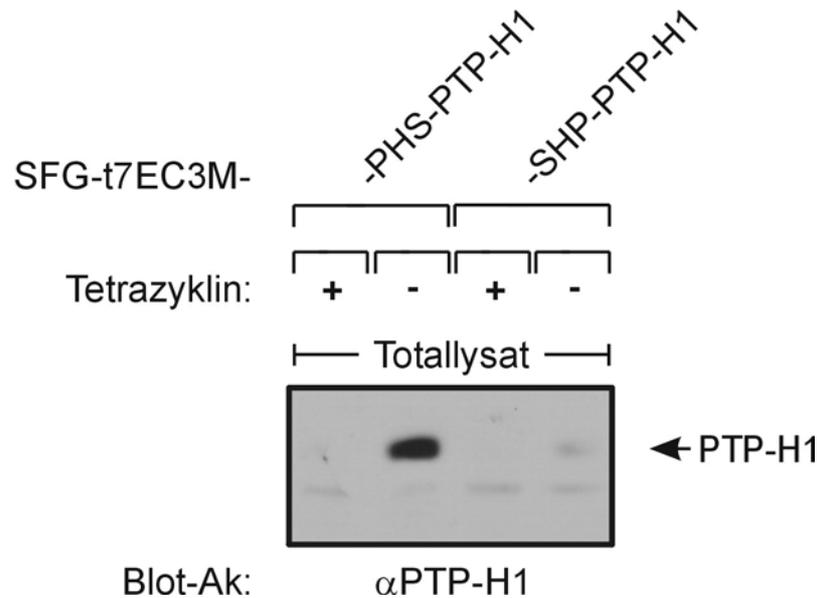
und Hygromycin-B-Resistenzgen wurde unter Einführung terminaler BamHI- bzw. BglIII-Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pTK-Hyg (CLONTECH) über PCR amplifiziert. Die Einklonierung in die BamHI-Schnittstelle der MCS erfolgte derart, daß die Transkription der Phosphotransferase der des Zielgens gleich- bzw. entgegengerichtet ist. Die hieraus entstandenen Konstrukte SFG-t7EC3M-PHS bzw. SFG-t7EC3M-SHP sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Aufbaus der retroviralen, Transaktivator-regulierten Expressionsplasmide SFG-t7EC3M-PHS bzw. SFG-t7EC3M-SHP

Zu sehen ist die lineare Form der retroviralen, Transaktivator-regulierten Expressionsplasmide SFG-t7EC3M-PHS (A) und SFG-t7EC3M-SHP (B), die von den terminalen LTR-Regionen (long terminal repeat) eingerahmt sind. Die eingeführte Multi-Cloning-Site mit den Erkennungssequenzen für die aufgeführten Restriktionsendonukleasen ist grau unterlegt. Die Transaktivator-kontrollierte Expression des Zielgens ausgehend von einem modifizierten LTR-Promotor P ist durch den roten Pfeil angedeutet. Die Transkriptionsrichtung der von dem HSV-TK-Minimalpromotor P<sub>HSV-TK</sub> kontrollierten Hygromycin-B-Kassette ist jeweils durch den schwarzen Pfeil angezeigt. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

Um den Einfluß der Orientierung des eingeführten Resistenzelementes auf die Expression des Zielgens zu untersuchen, wurde die Kodierungssequenz für die Phosphatase PTP-HI in beide Vektoren einkloniert. Nach Transfektion der hieraus hervorgegangenen Plasmide SFG-t7EC3M-PHS-PTP-HI bzw. SFG-t7EC3M-SHP-PTP-HI in die Verpackungszelllinie Phoenix E wurden mit den gesammelten Virusüberständen Transaktivator-positive NIH3T3 Fibroblasten infiziert. Durch Entfernung von Tetrazyklin wurde die Expression der Phosphatase induziert. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, ergab die Analyse gleicher Lysatmengen mit einem gegen den N-Terminus von PTP-HI gerichteten Antikörper für keines der beiden Konstrukte eine Expression der Phosphatase in Gegenwart von Tetrazyklin. Ein Einfluß des zusätzlichen, das Resistenzgen treibenden Promotors auf die basale Expression des Zielgens war daher nicht zu beobachten. Nach Entfernung des Antibiotikums war ausgehend von SFG-t7EC3M-PHS-PTP-HI eine deutliche, bei Verwendung von SFG-t7EC3M-SHP-PTP-HI eine hingegen erheblich abgeschwächte Expression von PTP-HI detektierbar. Für eine grundsätzlich stärkere Expression des Zielgens erwies sich das Plasmid SFG-t7EC3M-PHS somit als geeigneter.



**Abb. 7:** Vergleich der Tetrazyklin-induzierbaren Expression eines Zielgens durch die Expressionsplasmide SFG-t7EC3M-PHS bzw. SFG-t7EC3M-SHP anhand von PTP-H1

Transaktivator-exprimierende NIH3T3 Fibroblasten wurden mit Virusüberständen der beiden Plasmide SFG-t7EC3M-PHS-PTP-HI und SFG-t7EC3M-SHP-PTP-HI transient infiziert und für zwei Tage in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin (2 µg/ml) kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteinkonzentrationen der gewonnenen Lysate bestimmt. Jeweils gleiche Mengen der Gesamtzellsate wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte mit einem polyklonalen, gegen den N-Terminus von PTP-H1 gerichteten Antikörper (αPTP-H1). Die Position der Phosphatase PTP-H1 ist am rechten Bildrand angegeben.

Die Funktionalität dieses Systems soll anhand eines die Phosphatase PTP-LAR exprimierenden, stabilen Klons exemplarisch demonstriert werden. Durch Transfer von SFG-tcITE1-Neo über amphotrophe Viren wurden zunächst stabile, den Transaktivator induzierbar exprimierende Klone der Brustkrebszelllinie MCF-7 erzeugt. Von einem geeigneten Klon ausgehend wurde über Sekundärinfektion das Expressionsplasmid SFG-t7EC3M-PHS-LARwtVSV eingeführt, welches die Kodierungssequenz für VSV-markierte PTP-LAR-Wildtyp trägt. Anhand eines doppelt positiven Klons sollten der Zeitverlauf der Expression von Transaktivator und Zielgen miteinander verglichen werden. Dabei wurden jeweils gleiche Zellzahlen in zunächst Tetrazyklin-haltigem Medium ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Antibiotikum entfernt und damit die Expression von Transaktivator und Zielgen induziert. Nach fünf Tagen wurden alle Schalen lysiert und die Proteinkonzentration der gewonnenen Lysate bestimmt. VSV-markierte PTP-LAR wurde mit einem VSV-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert, Immunpräzipitate wie Gesamtzellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 8).

Die Analyse der Totallysate mit dem gegen die VP16-Domäne des Transaktivators gerichteten Antikörper ergab für diesem Klon eine Induktion des Transkriptionsfaktors erstmals sechzig Stunden nach Entfernung des Antibiotikums. Fortdauernde Kultivierung in



Die Untersuchung der LAR-Immunpräzipitate führte zu einem dem Transaktivator entsprechenden Expressionsprofil (Abbildung 8B). In Gegenwart von Tetrazyklin sowie in den ersten beiden Tagen nach dessen Entfernung war keinerlei Expression des Zielgen detektierbar. Einhergehend mit der Transaktivatorbildung trat PTP-LAR ebenfalls erstmals nach 60 Stunden in Erscheinung. Nach weiterer Zunahme stellte sich maximale Expressionsstärke auch der reifen LAR-P-Untereinheit (LAR-P) sowie deren Prozessierungsprodukt (LAR-PP) ab dem vierten Tag nach Tetrazyklinentfernung ein. Auf das Phänomen der LAR-Prozessierung wird an späterer Stelle intensiv eingegangen.

In jedem Falle war in Gegenwart des inhibierenden Antibiotikums weder die Expression des Transaktivators noch die des Zielgen detektierbar. Nach Erreichen eines gewissen Schwellenwertes, hier ab etwa sechzig Stunden, wurde hinreichend viel Transaktivatorprotein gebildet, um sowohl dessen eigene Expression als auch die des Zielgens in detektierbarem Maße zu treiben. Aus dieser Abhängigkeit beider Promotoren von der Expression des Transaktivators erklärt sich auch der zeitlich und quantitativ entsprechende Expressionsverlauf von Transaktivator und Zielgen.

### **3.1.4 Klonierung des Transaktivator-Plasmids pcDNA3-tTA-Puro**

Im Zuge der Generierung doppelt stabiler Zelllinien stellte sich heraus, daß eine Sekundärinfektion bereits Transaktivator-stabiler Klone mit dem das Zielgen tragenden Virus für manche Zelllinien schwierig ist. So erfolgte die Infektion beispielsweise der Brustkrebslinie MDA-MB-231 mit dem Transaktivator-Virus mit hoher Effizienz. Die Einführung des Expressionsplasmids über Sekundärinfektion war hingegen nicht mehr möglich. Weiterhin ist für verschiedene Fragestellungen die Erzeugung tripelstabiler Zelllinien erforderlich. Da die cDNA der meisten Gene in Expressionsvektoren mit Neomycin-Resistenz vorlagen, kollidierte deren Verwendung zur Erzeugung stabiler Linien mit der Nutzung des induzierbaren Systems. Aufgrund dieser beiden Aspekte wurde noch ein weiteres Transaktivator-Plasmid kloniert, das die Expression des Transaktivatorproteins ebenfalls in Form eines autoregulatorischen Loops ermöglichte. Im Gegensatz zu dem retroviralen Plasmid SFG-tcITE1-Neo sollte dieser Vektor jedoch über Transfektion in die Zielzellen eingebracht werden und damit die Nutzung des gesamten Infektionspotentials zum Transfer des Expressionsplasmids SFG-t7EC3-MCS-PHS erlauben. Ferner sollte das Plasmid über ein Puromycin-Resistenzgen verfügen und damit die gleichzeitige Verwendung anderer, Neomycinresistenz-vermittelnder Plasmide ermöglichen.

Zur Erzeugung dieses Plasmids wurden zunächst die Transaktivator-kodierende Sequenz aus dem Plasmid pUHD-15-1 (CLONTECH) sowie der Tetrazyklin-regulierbare CMV-Minimalpromotor aus SFG-tcITE1-Neo in pcDNA3-ESK, einem pcDNA3-Derivat mit erweiterter „Multi-Cloning-Site“, zusammengeführt. Parallel hierzu wurde aus dem Vektor

pcDNA3-Puro - ebenfalls ein pcDNA3-Derivat, das anstelle des Gens für Neomycin-Phosphotransferase ein Puromycinresistenzgen trägt - die „Multi-Cloning-Site“ sowie der ihr vorangestellte CMV-Promotor herausgeschnitten. An deren Stelle wurde schließlich die in pcDNA3-ESK entstandene Transaktivator-Expressionskassette eingefügt. Das Ergebnis ist ein auf pcDNA3 basierendes Plasmid, dem das autoregulatorische Expressionsprinzip des Transaktivators zugrunde liegt und das eine Selektion der damit transfizierten Zellen über Puromycin erlaubt. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des Aufbaus des auf pcDNA3 basierenden, Transaktivator-regulierten Expressionsplasmids pcDNA3-tTA-Puro

Dargestellt ist die lineare Form des auf pcDNA3 basierenden Transaktivator-Plasmids pcDNA3-tTA-Puro, das anstelle der Neomycin-Phosphotransferase über ein Puromycin-Phosphotransferase-Gen Puro verfügt. Die Transkription des Transaktivatorproteins über den von ihm selbst kontrollierten CMV-Minimalpromotor P ist durch den roten Pfeil angedeutet. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

## 3.2 Assoziation der Proteintyrosinphosphatase LAR mit dem EGFR

In der Abteilung von Herrn Prof. Ullrich vorliegende Expressionsdaten aus Northern-Blot- und Micro-Array-Analysen ergaben für zahlreiche Brustkrebslinien auffällige Korrelationen zwischen verschiedenen Vertretern der EGFR-Familie und der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR. Insbesondere der EGFR selbst wies in verschiedenen Linien eine der Phosphatase LAR ähnliche Transkriptionsrate auf. Diese Korrelation bestätigte sich auch in vielen Fällen auf Translationsebene. So zeichneten sich Brustkrebslinien wie beispielsweise MDA-MB-468 oder BT-20 durch starke Expression des EGFRs, aber auch von PTP-LAR aus. Geringere Expression des EGFRs wie in MCF-7, ZR-75-1 oder MDA-MB-361 ging mit ebenfalls schwächer detektierbaren Mengen von PTP-LAR einher (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte untersucht werden, ob der korrelierenden Expression beider Proteine ein funktioneller Zusammenhang zugrunde liegt. In einem ersten Schritt sollte dabei der Frage einer eventuellen Assoziation nachgegangen werden.

### 3.2.1 Assoziation von LAR und EGFR bei transienter Koexpression in HEK-293

Zur Untersuchung einer vermeintlichen Protein-Protein-Wechselwirkung wurden HEK-293-Zellen mit Leerplasmid, jeweils dem die cDNA von PTP-LAR oder EGFR tragenden Vektor

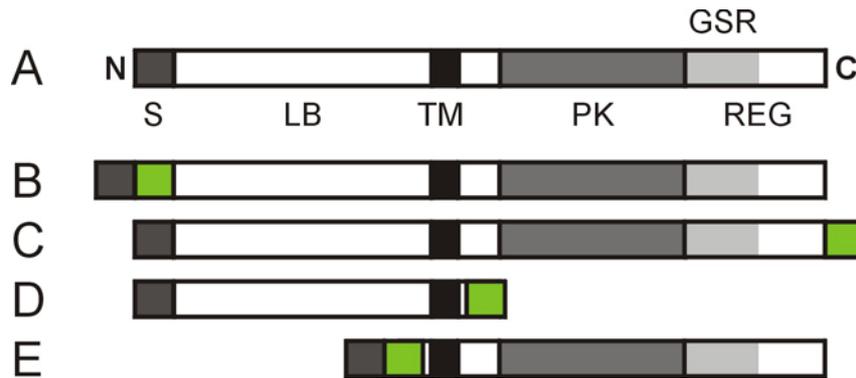


lediglich mit dem PTP-LAR-Expressionsplasmid transfizierten Zellen ein Signal auf der Höhe des EGFRs bei 170 kDa. Hingegen war in den ausschließlich die Rezeptortyrosinkinase exprimierenden Zellen eine schwache EGFR-Bande detektierbar, welches die Assoziation ektopischen EGFRs mit endogener LAR widerspiegelt. Ein sehr starkes Signal war im Falle beide Proteine koexprimierender Zellen zu beobachten, was zum Teil auf die recht lange Belichtungszeit des Films zurückzuführen ist, die für die Detektion des endogenen EGFRs in Spur 3 erforderlich war. Nach Ablösen des Antikörpers wurde derselbe Filter mit dem LAR-spezifischen Antikörper immunodetektiert (Abbildung 10A, unten). Dabei fiel auf, daß die Expression des EGFRs zu einer verringerten Detektierbarkeit sowohl der überexprimierten (Spuren 2, 4) wie auch der endogenen LAR-P-Untereinheit (Spuren 1, 3) führte. Ektopischer EGFR wird dabei in jeweils gleichem Maße exprimiert (Abbildung 10B).

Aus diesem Experiment war ersichtlich, daß unter den in HEK-293 gegebenen Bedingungen ektopischer EGFR mit koexprimierter, aber auch mit endogener PTP-LAR assoziiert.

### 3.2.2 Herstellung verschiedener zur Untersuchung der Assoziation geeigneter EGFR-Derivate

In Zusammenhang mit der beobachteten Assoziation von PTP-LAR und dem EGFR sollten nun die für die Assoziation maßgeblichen Bereiche des EGFRs näher charakterisiert werden. Zu diesem Zwecke wurden EGFR-Derivate erzeugt, die entweder die gesamte Kodierungssequenz umfassen oder eine Deletion der zytoplasmatischen bzw. der extrazellulären Domäne aufweisen (Abbildung 11). Beiden Deletionsformen blieb jedoch zur korrekten Lokalisation in der Zellmembran die Transmembrandomäne erhalten. Um alle Konstrukte mit ein und demselben Antikörper immunpräzipitieren bzw. immunodetektieren zu können, wurden diese mit einem Dimer des VSV-Epitops versehen. Das VSV-Epitop wurde dabei von zwei komplementären Oligonukleotiden gebildet, die nach Aneinanderlagerung zentral die Kodierungssequenz der beiden VSV-Epitope und terminal jeweils den Überhang einer geschnittenen MluI-Restriktionsschnittstelle enthielten. Nach Einführung von MluI-Schnittstellen in der Kodierungssequenz mittels *in vitro*-Mutagenese konnte dieses Oligonukleotid-Dimer an entsprechender Stelle inkloniert werden. So ließ die Einführung des VSV-Dimers nach der Signalsequenz das N-terminal markierte EGFR-Derivat pRK5-EGFR-VSV/VSV-NT (B), die Einklonierung unmittelbar vor dem STOP-Codon das Konstrukt pRK5-EGFR-VSV/VSV-CT (C) entstehen. Einführung jeweils zweier MluI-Restriktionsschnittstellen C-terminal der Transmembransequenz sowie vor dem STOP-Codon bzw. unmittelbar nach dem Signalpeptid und N-terminal der Transmembranregion führte bei Ersatz der dazwischen liegenden Sequenz durch das Oligonukleotid-Dimer zu den beiden Deletionsformen pRK5-EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV (D) und pRK5-EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA (E).



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der verschiedenen EGFR-Derivate zur Identifizierung der für die Assoziation mit LAR maßgeblichen Bereiche

Ausgehend von pRK5-EGFR-Wildtyp (A) entstanden über Substitution entsprechender Domänen durch ein VSV/VSV-Dimer (grün) die EGFR-Derivate pRK5-EGFR-VSV/VSV-NT (B), pRK5-EGFR-VSV/VSV-CT (C), pRK5-EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV (D) und pRK5-EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA (E).

Folgende Abkürzungen wurden verwendet: S: Signalpeptid; LB: Ligandenbindungsdomäne; TM: Transmembran-domäne; PK: Proteinkinasedomäne oder katalytische Domäne; REG: Regulatorische Domäne mit der GSR: Gewebespezifischen Region. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

### 3.2.3 Assoziation von LAR mit dem zytoplasmatischen Teil des EGFRs

Unter Verwendung dieser vier verschiedenen EGFR-Derivate sollte im folgenden weiterhin geklärt werden, ob für die Assoziation mit der Phosphatase PTP-LAR das gesamte EGFR-Protein erforderlich ist, oder ob diese in erster Linie von einzelnen Domänen der Rezeptortyrosinkinase vermittelt wird. Hierzu wurden die vier EGFR-VSV/VSV-Plasmide mit zwei verschiedenen Konzentrationen des die Phosphatase PTP-LAR kodierenden Expressionsplasmids in HEK-293 kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert, die Lysate jeweils zum einen mit dem gegen PTP-LAR gerichteten, zum anderen mit einem VSV-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert.

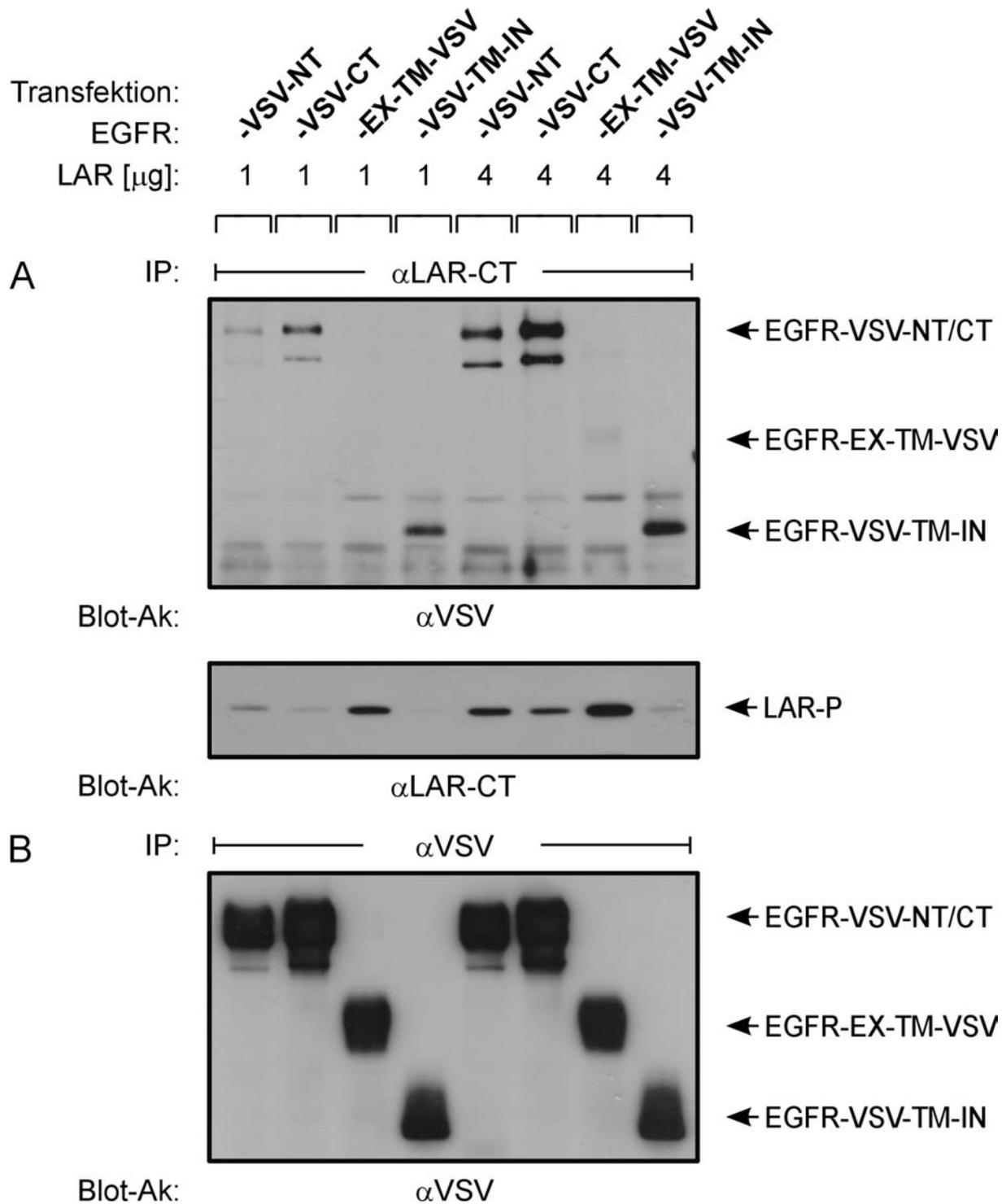
**Abb. 12:** Assoziation von PTP-LAR und verschiedenen EGFR-Derivaten bei Koexpression in HEK-293 Fibroblasten (Seite 68)

HEK-293 Fibroblasten wurden in 10cm-Schalen bei verschiedenen Konzentrationen des LAR-Wildtyp-Expressionsplasmids (1 µg/10cm-Schale und 4 µg/10cm-Schale) mit jeweils gleichen cDNA-Mengen der vier EGFR-Derivate EGFR-VSV/VSV-NT, EGFR-VSV/VSV-CT, EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV und EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA transient kotransfiziert. Die Lysate wurden geteilt und in Immunpräzipitationen eingesetzt. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immundetektion der Immunkomplexe wurde zunächst mit einem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper (αVSV), nach dessen Entfernung mit dem polyklonalen Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper (αLAR-CT) durchgeführt.

(B) Die EGFR-Derivate pRK5-EGFR-VSV/VSV-NT, pRK5-EGFR-VSV/VSV-CT, pRK5-EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV und pRK5-EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA wurden mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse erfolgte mit demselben Antikörper (αVSV).

Die Positionen der LAR-P-Untereinheit sowie der EGFR-Derivate sind am rechten Bildrand angegeben.



Die LAR-Immünpräzipitate wurden mit einem VSV-spezifischen Antikörper auf Assoziation mit den verschiedenen EGFR-Derivaten hin analysiert (Abbildung 12A, oben). Dabei ergab sich eine Assoziation beider EGFR-Wildtyp-Formen mit PTP-LAR (Spuren 1, 2 und 5, 6), wobei der C-terminal markierte Rezeptor bei beiden Phosphatasekonzentrationen zu einem deutlicheren Signal führte (vergleiche Spuren 2, 6 und 1, 5). Etwa gleichstark oder gar noch stärker als für EGFR-VSV/VSV-CT tritt jeweils das dem EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA

zuzuordnende Signal in Erscheinung (Spuren 4, 8). Hingegen ist bei Koexpression von LAR mit dem die Extrazellulär- und Transmembrandomäne umfassenden EGFR-EXTRA-TM-VSV/VSV-Derivat kein diesem Derivat entsprechendes VSV-Signal detektierbar (Spur 3). Lediglich bei höherer LAR-Expression tritt ein außerordentlich schwaches Signal in Erscheinung (Spur 7). Letzteres ist auf die Assoziation von LAR mit Heterodimeren bestehend aus endogen in HEK-293 Fibroblasten vorhandenem EGFR und diesem EGFR-Derivat zurückzuführen. Auf jener Heterodimerisierung mit endogenem EGFR basiert auch der inhibitorische Effekt dieses ebenfalls unter dem Namen HER-CD533 beschriebenen EGFR-Derivats auf die EGFR-Signaltransduktion (Kashless et al., 1991; Redemann et al., 1992). Die vergleichbare Expression der verschiedenen EGFR-VSV/VSV-Derivate ergab sich aus der Analyse deren Immunpräzipitate (Abbildung 10A, unten).

In diesem Experiment wurde die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Assoziation von PTP-LAR und EGFR bestätigt. Weiterhin konnte der zytoplasmatische Teil des EGFRs als die für die Interaktion mit PTP-LAR entscheidende Domäne identifiziert und die Beteiligung des extrazellulären Proteinanteils an der Assoziation ausgeschlossen werden.

### **3.3 Tyrosinphosphorylierung der Proteintyrosinphosphatase LAR**

Der Nachweis der Assoziation zwischen der EGFR-Rezeptortyrosinkinase und der Tyrosinphosphatase LAR ließ unweigerlich nach einer damit einhergehenden funktionellen Interaktion beider Proteine fragen. Denkbar wäre hierbei eine gegenseitige Enzym-Substrat-Wechselwirkung derart, daß die Phosphatase ein Substrat des EGFRs darstellt und von diesem phosphoryliert oder die Kinase ihrerseits - beispielsweise im Zuge der Signaltermination - von PTP-LAR dephosphoryliert wird.

#### **3.3.1 Tyrosinphosphorylierung von LAR nach transienter Transfektion verschiedener EGFR-Derivate in HEK-293**

Erste Hinweise für PTP-LAR als ein Substrat des EGFRs ergaben sich aus der Phosphotyrosinanalyse immunpräzipitierter PTP-LAR bei Koexpression mit den verschiedenen, in Kapitel 3.2.2 beschriebenen EGFR-VSV/VSV-Derivaten. Grundgedanke dieser Untersuchung ist die Beobachtung, daß bereits einfache Überexpression mancher Vertreter der EGFR-Familie wie der EGFR selbst oder HER2 infolge Di- oder Oligomerisierung zur gegenseitigen Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinasen führt. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, daß lediglich die Transmembran- und intrazelluläre Domäne umfassende Deletionsformen des EGFRs eine verglichen mit der Wildtyp-Form weitaus stärkere Kinaseaktivität und höheres Transformationspotential aufweisen. Im Gegensatz hierzu stellt das im intrazellulären Bereich deletierte CD533-Derivat eine inaktive Form dar, die durch

Dimerisierung mit Wildtyp-EGFR dessen Autoaktivierung verhindert und infolgedessen inhibitorisch auf die vom EGFR ausgehende Signaltransduktionskaskade wirkt (Kashless et al., 1991; Redemann et al., 1992). In Übereinstimmung mit der Aktivität dieser verschiedenen EGFR-Konstrukte konnte im Falle der Koexpression mit EGFR-VSV/VSV-NT-bzw.-CT-Konstrukten eine deutliche Phosphorylierung der P-Untereinheit von PTP-LAR detektiert werden. Gleichzeitige Expression mit der katalytisch stärker aktiven EGFR-VSV/VSV-TM-INTRA-Form hatte einen ebenfalls höheren Phosphorylierungsstatus von PTP-LAR zur Folge. Hingegen war bei Kotransfektion mit dem CD533-Konstrukt kein Phosphotyrosin-signal detektierbar (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Tyrosinphosphorylierung endogener LAR in verschiedenen Brustkrebslinien nach EGFR-Stimulation

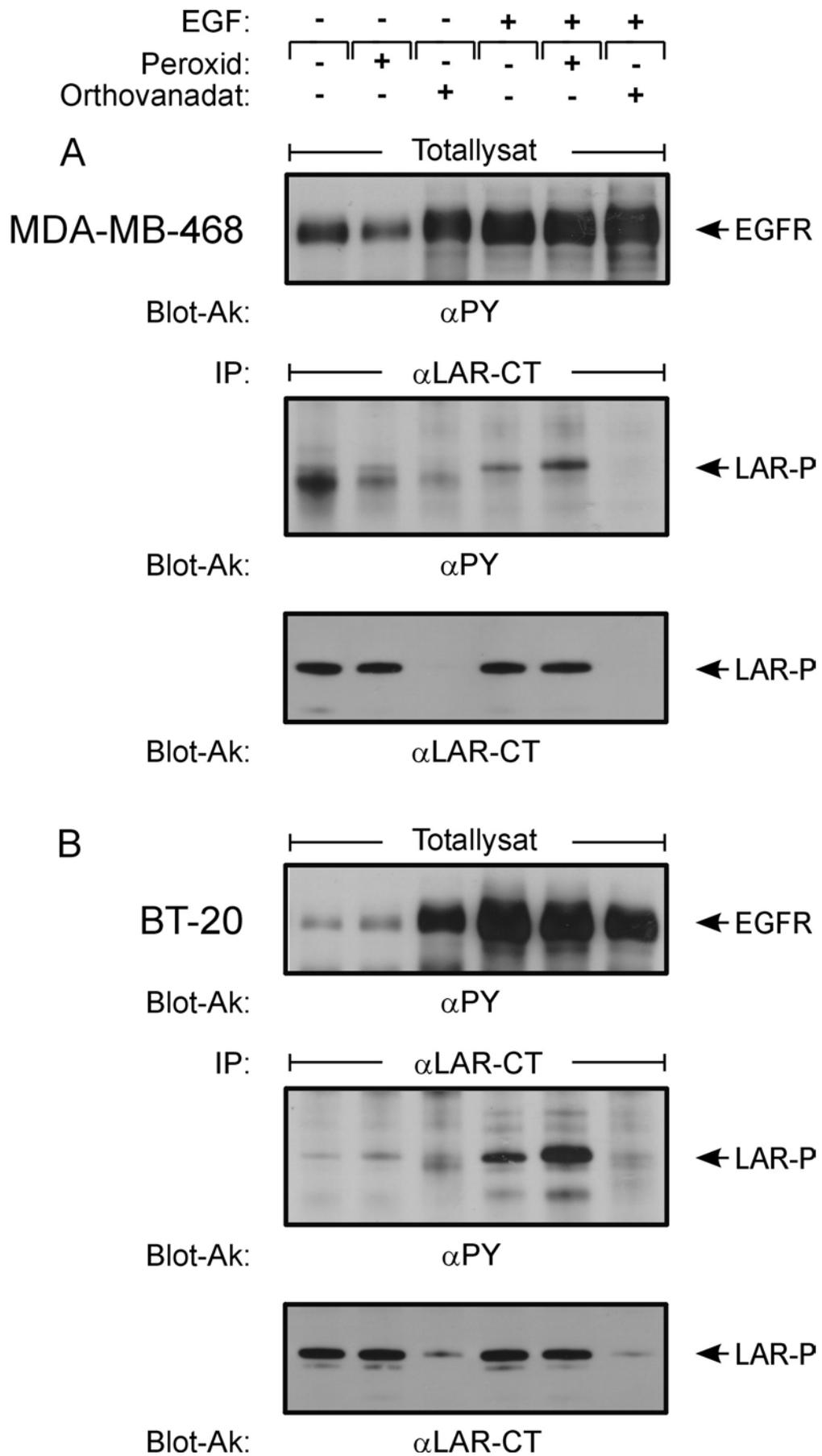
Im folgenden sollte untersucht werden, ob die nach Überexpression aktiver EGFR-Formen beobachtete Phosphorylierung von PTP-LAR auch in endogenen Systemen nach Stimulation des EGFRs durch entsprechende Liganden nachweisbar ist. Hierzu wurden die beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB-468 und BT-20, die sich durch eine vergleichsweise hohe endogene Expression des EGFRs auszeichnen, mit EGF stimuliert. Um einer eventuellen Dephosphorylierung durch LAR selbst oder andere Phosphatasen entgegenzuwirken, wurden die gehungerten Zellen zum Teil mit Wasserstoffperoxid, zum Teil mit Orthovanadat vorbehandelt. Ein Teil der gewonnenen Lysate wurde zur Analyse der Tyrosinphosphorylierung des Gesamtzellextraktes herangezogen, aus dem anderen Teil wurde PTP-LAR immunpräzipitiert. Totallysate und Immunpräzipitate wurden über Polyacrylamidgele aufgetrennt.

Die Totallysate gaben die stimulationsbedingte Phosphorylierung des EGFRs wieder (Abbildung 13A und 13B, oben). Dabei hatte Vorbehandlung mit Orthovanadat bereits in Abwesenheit von EGF eine erhebliche Verstärkung der EGFR-Aktivierung sowohl in MDA-MB-468 als auch in BT-20 zur Folge.

#### **Abb. 13: Tyrosinphosphorylierung endogener PTP-LAR nach Stimulation mit EGF in MDA-MB-468 und BT-20 Brustkrebszellen (Seite 71)**

Nach 48-stündigem Serumentzug wurden die Brustkrebslinien MDA-MB-468 und BT-20 entsprechend dem angegebenen Schema für 3 min mit EGF (50 ng/ml) allein, gleichzeitig mit Peroxid (1mM) oder nach 3-stündiger Vorinkubation mit Orthovanadat (1mM) ebenfalls für 3 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert. Der Hauptteil der gewonnenen Zellysate wurde zur Immunpräzipitation von PTP-LAR eingesetzt. Immunkomplexe wie auch Gesamtzellysate wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. (A) MDA-MB-468 und (B) BT-20: Gesamtzellysate wurden mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY) analysiert (oben). Die Immunpräzipitation von PTP-LAR erfolgte mit dem polyklonalen Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper. Deren Immunoblotanalyse wurde zunächst mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY; Mitte), nach dessen Entfernung ebenfalls mit dem polyklonalen Anti-LAR-CT-Antikörper ( $\alpha$ LAR-CT) durchgeführt (unten).

Die Positionen von EGFR sowie der LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.



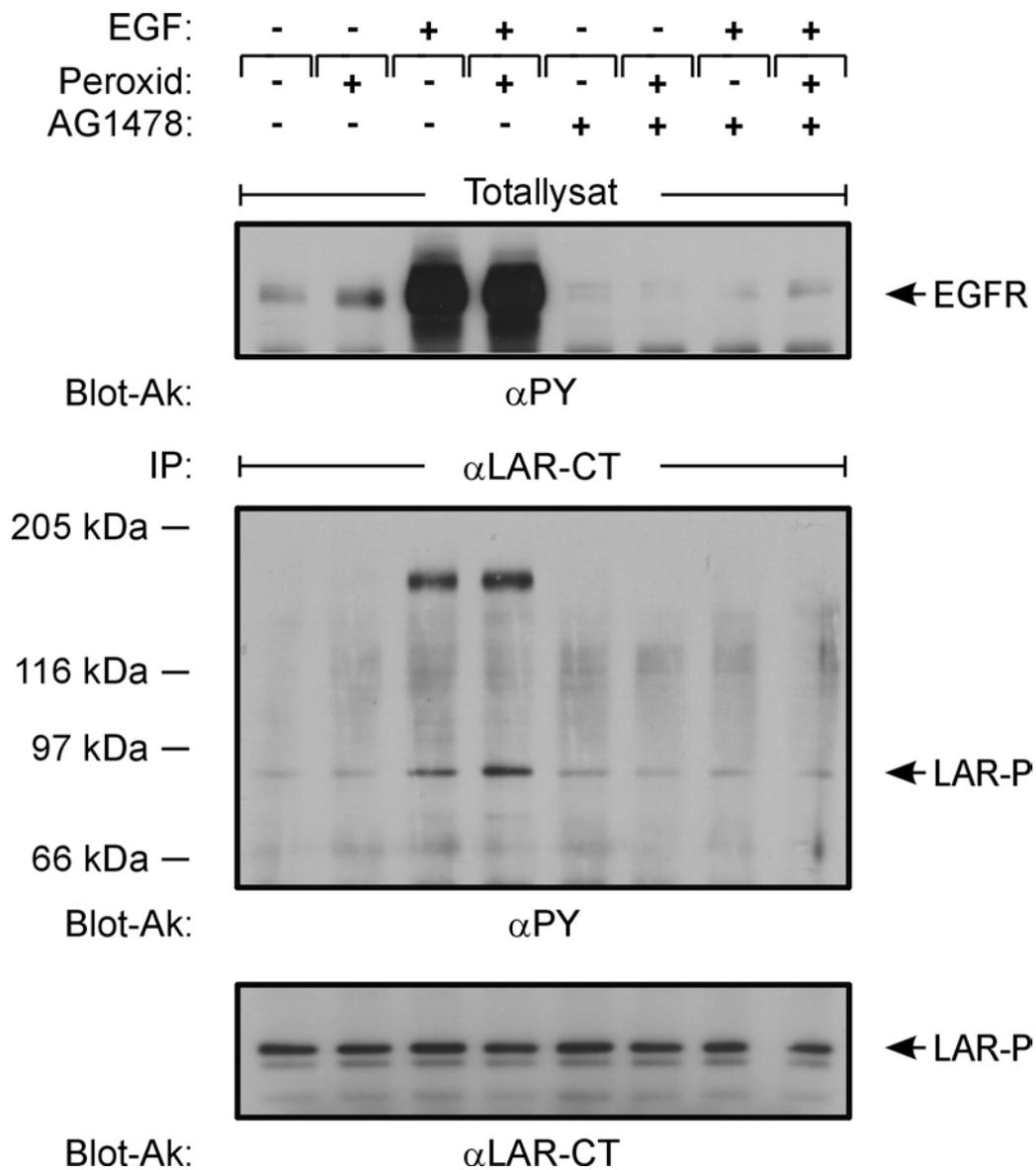
Die Analyse der LAR-Immunpräzipitate mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (Abbildung 13A und 13B, Mitte) ergab im Falle beider Zelllinien für unbehandelte Kontrollzellen ein kaum detektierbares, für lediglich mit Peroxid behandelte Zellen ein nur geringfügig stärkeres Signal. Nach dreiminütiger Stimulation mit EGF war hingegen bei beiden Linien eine deutliche, im Falle von BT-20 noch stärkere Phosphorylierung der P-Untereinheit von PTP-LAR zu beobachten. Kostimulation mit Wasserstoffperoxid resultierte bei beiden Zelllinien in einer nochmaligen Verstärkung der Tyrosinphosphorylierung. Eine Erklärung für die ausbleibende Tyrosinphosphorylierung nach Vorinkubation mit Orthovanadat ergab sich aus der Analyse derselben Membran mit dem LAR-spezifischen Antikörper (Abbildung 13A und 13B, unten). Dabei wurde ersichtlich, daß die Vorbehandlung der Zellen mit diesem Phosphataseinhibitor eine drastische Verringerung immunpräzipitierbarer PTP-LAR zur Folge hatte. Ein vergleichbares Phosphorylierungsprofil von PTP-LAR ergab sich auch nach Stimulation dieser Zelllinien mit anderen Liganden des EGFRs. So konnte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung auch nach Stimulation mit TGF $\alpha$  oder HB-EGF beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Experimenten ging hervor, daß die Stimulation endogener Systeme mit Liganden des EGFRs, wie hier anhand der Brustkrebslinien MDA-MB-468 und BT-20 gezeigt, zur Phosphorylierung der Rezeptortyrosinphosphatase LAR führt und der physikalischen Interaktion beider Membranproteine somit auch ein funktioneller Zusammenhang zugrunde liegt.

### **3.3.3 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von PTP-LAR durch Tyrphostin AG1478**

In jüngerer Zeit wurden neue Inhibitoren wie die Tyrphostine (tyrosine phosphorylation inhibitors) vor allem mit dem Ziel entwickelt, in späteren klinischen Anwendungen selektiv bestimmte Tyrosinkinasen zu inaktivieren. Tyrphostine interagieren mit der ATP-Bindungsstelle von bestimmten Tyrosinkinasen und unterdrücken dadurch deren katalytische Aktivität. Tyrphostin AG1478 inhibiert dabei hochspezifisch den EGFR und ist bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam (Levitzki und Gazit, 1995). In einem an das vorangehende Experiment angelehnten Versuch sollte die Auswirkung des EGFR-spezifischen Tyrphostins AG1478 auf die Phosphorylierung von PTP-LAR betrachtet werden.

Vorinkubation von BT-20 mit diesem Inhibitor blockierte erwartungsgemäß sowohl nach EGF-Stimulation als auch nach Kostimulation mit Peroxid die Phosphorylierung der P-Untereinheit von PTP-LAR. Beachtenswert ist die nach EGF bzw. EGF/Peroxid-Stimulation mit PTP-LAR koimmunpräzipitierende Bande auf der Höhe von 170 kDa. Hierbei handelte es sich um phosphorylierten, mit LAR assoziierenden EGFR. Insgesamt unterstrich dieses Experiment die Beteiligung aktiven EGFRs an der Phosphorylierung von PTP-LAR und bekräftigte die Vermutung, daß PTP-LAR ein direktes Substrat des EGFRs darstellt.



**Abb. 14: Inhibition der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung endogener PTP-LAR durch Tyrphostin AG1478**

BT-20 Brustkarzinomzellen wurden nach 48-stündigem Hungern in Serum-freiem Medium gar nicht oder für jeweils 3 min mit Peroxid (1mM) allein, mit EGF (50 ng/ml) allein bzw. mit Peroxid und EGF (1mM und 50 ng/ml) gleichzeitig stimuliert. Diese Stimulationsreihe wurde dabei in Abwesenheit oder nach 30-minütiger Vorinkubation mit Tyrphostin AG1478 (250 nM) durchgeführt. Die Lysate wurden geteilt und zur Immunpräzipitation mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper bzw. als Totallysat eingesetzt. Sowohl Immunkomplexe wie auch Gesamtzelllysate wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Letztere wurden mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY) analysiert (oben). Die Immundetektion der LAR-Immunpräzipitate erfolgte zunächst ebenfalls mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY; Mitte), nach dessen Entfernung wurde dieselbe Membran mit dem polyklonalen Anti-LAR-CT-Antikörper ( $\alpha$ LAR-CT) analysiert (unten). Die Positionen von EGFR sowie der LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

### 3.4 Prozessierung der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR

Als posttranslationale Modifikation wurde die Prozessierung von PTP-LAR bereits zu Beginn der neunziger Jahre beschrieben (Streuli et al., 1992, Serra-Pages et al., 1994). Hierbei handelt es sich um die proteolytische Spaltung der P-Untereinheit unmittelbar aminoterminal der Transmembranregion, was die Freisetzung des damit nahezu gesamten extrazellulären Teils der P- sowie der vollständigen E-Untereinheit in das umgebende Medium zur Folge hat. Diese Prozessierung konnte durch den Phorbolester TPA sowie durch das Kalziumionophor A23187 induziert werden (Serra-Pages et al., 1995; Aicher et al., 1997), physiologische Stimuli und der zugrundeliegende Mechanismus waren aber ebenso unbekannt wie die Identität der involvierten Protease.

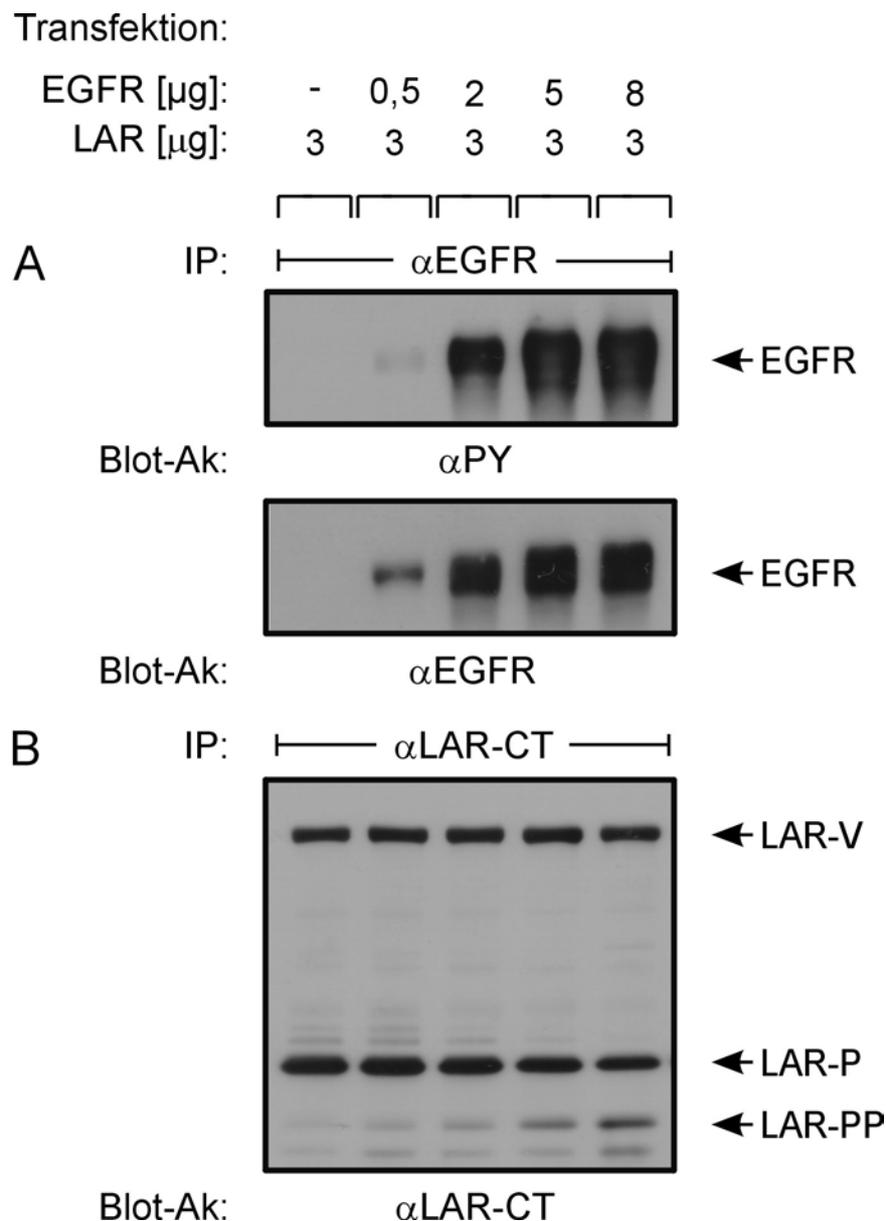
#### 3.4.1 Prozessierung von PTP-LAR nach Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen

Die Beobachtung der Prozessierung von PTP-LAR vor allem in wachsenden Zellen ließ nach der Bedeutung proliferationsvermittelnder Signaltransduktionswege für dieses Phänomen fragen. Aufgrund der oben ausgeführten Assoziation und der beobachteten Phosphorylierung rückten hierbei der EGFR, aber auch weitere Vertreter dieser Rezeptortyrosinkinase-Familie wie HER2, in den Fokus des Interesses.

##### 3.4.1.1 Prozessierung von LAR nach transients Überexpression des EGFRs in HEK-293

Die Überexpression des EGFRs wurde erstmals in A431 (Ullrich et al., 1984), daraufhin in zahlreichen anderen Tumorklinen und Tumoren beschrieben. Erste Hinweise bezüglich einer eventuellen Bedeutung überexprimierten EGFRs auf die Prozessierung von PTP-LAR ergab sich im Rahmen der Experimente, die zur Charakterisierung der für die Assoziation mit PTP-LAR maßgeblichen Domänen des EGFRs angelegt waren (siehe Kapitel 3.2.3). Trotz gleicher Mengen transfizierten LAR-Expressionsplasmids konnte bei Koexpression mit den beiden EGFR-Wildtyp-Formen signifikant, mit dem vergleichsweise aktiveren EGFR-TM-INTRA-VSV/VSV-Konstrukt nochmals deutlich weniger LAR-P-Untereinheit präzipitiert werden, als dies bei gleichzeitiger Expression der katalytisch inaktiven EGFR-CD533-Mutante der Fall war. Um den sich andeutenden Zusammenhang zwischen EGFR-Überexpression und Prozessierung von PTP-LAR genauer zu untersuchen, wurde PTP-LAR allein oder gemeinsam mit aufsteigenden Mengen an EGFR exprimiert (Abbildung 15). Zur Immunpräzipitation wurden die Lysate mit einem EGFR-spezifischen sowie mit dem gegen den Carboxyterminus von PTP-LAR gerichteten Antikörper versetzt.

Aus der Analyse der EGFR-Immunpräzipitate ging erwartungsgemäß hervor, daß die zunehmende Expression der Rezeptortyrosinkinase mit deren zunehmenden Phosphorylierung



**Abb. 15: Prozessierung von PTP-LAR nach transienter Überexpression des EGFRs in HEK-293 Fibroblasten**

HEK-293 Fibroblasten wurden in 10cm-Schalen entsprechend dem angegebenen Schema transient entweder mit Expressionsplasmid für LAR-Wildtyp allein oder zusammen mit aufsteigenden Mengen eines für EGFR-Wildtyp kodierenden Vektors in HEK-293 Fibroblasten transfiziert. Nach 24-stündigem Hungern wurden die Zellen lysiert, die gewonnenen Lysate geteilt und in Immunpräzipitationen eingesetzt. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha\text{PY}$ ). Nach Ablösen dieses Antikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha\text{EGFR}$ ) immundetektiert.

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert, die anschließende Immunoblotanalyse erfolgte mit demselben Antikörper ( $\alpha\text{LAR-CT}$ ).

Die Positionen von EGFR, des unreifen LAR-Vorläuferproteins (LAR-V) sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

und damit einer verstärkten Aktivierung korreliert (Abbildung 15A). Die Immundetektion der LAR-Präzipitate mit demselben Antikörper ließ Signale bei drei verschiedenen Größen erkennen (Abbildung 15B). Die bei etwa 205 kDa detektierbare LAR-Form entsprach dem noch nicht zu E- und P-Untereinheit gespaltenen LAR-Vorläuferprotein. Die Expression dieser noch unreifen Vorläuferform blieb unabhängig von der Menge kotransfizierten EGFR-Expressionsplasmids unverändert und stellte damit eine interne Kontrolle für die in allen Ansätzen gleichstarke LAR-Expression dar. Hingegen war eine Abnahme der bei 84 kDa laufenden reifen LAR-P-Untereinheit insbesondere bei höheren EGFR-Expressionen ab 5 µg kotransfizierten EGFR-Plasmids zu beobachten. Einher ging diese Abnahme mit der Zunahme einer etwa 70 kDa großen LAR-Form, die das Prozessierungsprodukt der P-Untereinheit darstellt.

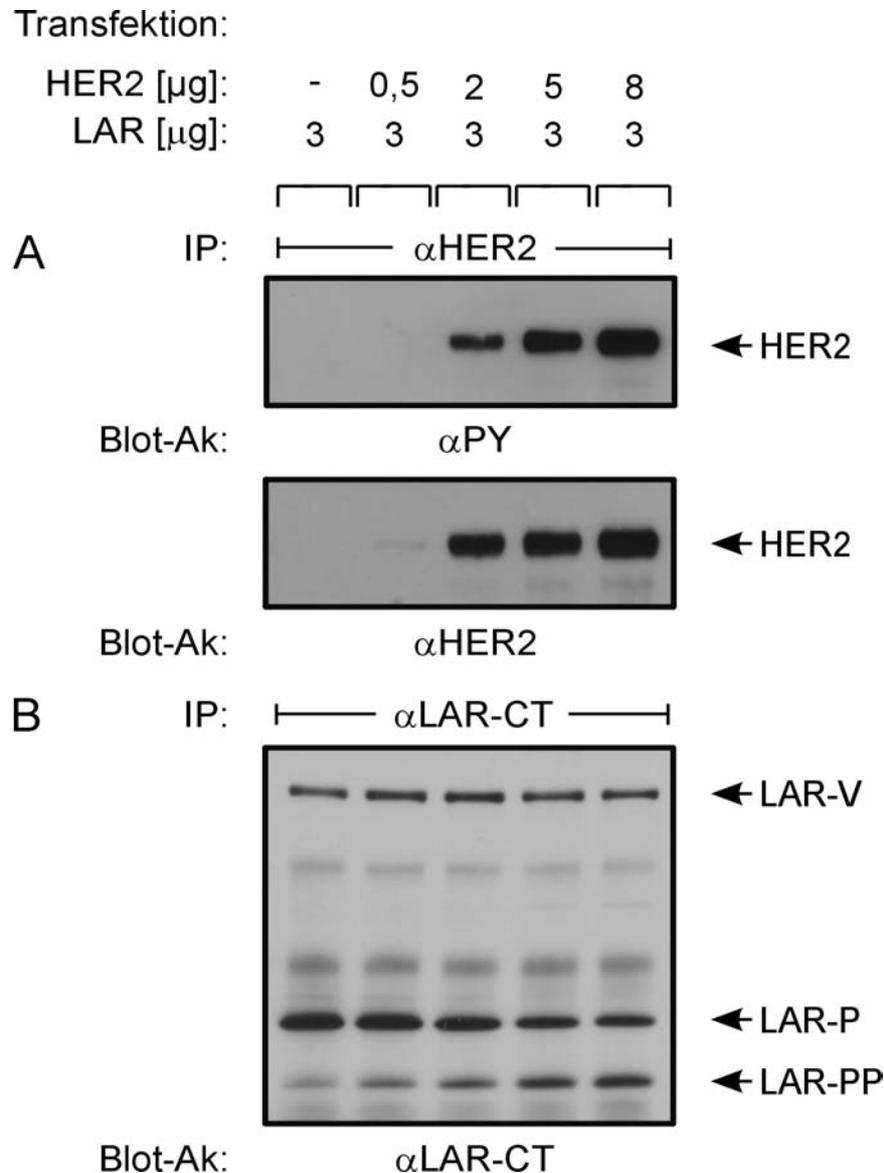
Aus diesem Experiment war zu schließen, daß zunehmende Expression und infolge Di- und Oligomerisierung zunehmende Aktivität des EGFRs zur Prozessierung spezifisch der reifen P-Untereinheit, nicht aber der Vorläuferform der Rezeptortyrosinphosphatase LAR führt.

#### **3.4.1.2 Prozessierung von LAR nach transients Überexpression von HER2 in HEK-293**

Amplifikation oder Überexpression von HER2 als einem weiteren Mitglied der EGFR-Familie wurde bei verschiedenen, stark malignen Tumoren sowie bei etwa 30 % aller Brusttumoren beobachtet (Slamon et al., 1987, 1989; Borg et al., 1991). Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesem Onkogen und PTP-LAR ergab sich aus der von Zhai et al. publizierten Beobachtung, daß die Tumorigenität humaner Brustepithelzellen, die das HER2-Rattenhomolog Neu exprimierten, durch Koexpression von PTP-LAR verringert werden konnte (Zhai et al., 1996). Der Frage, ob Überexpression auch von HER2 einen Einfluß auf die Prozessierung von PTP-LAR hat, sollte zunächst ebenfalls durch einfache Koexpression beider Proteine in HEK-293 nachgegangen werden. Analog dem vorausgegangenen Experiment wurde PTP-LAR erneut allein oder mit aufsteigenden Mengen an HER2 zur Expression gebracht, anschließend wurden beide Proteine immunpräzipitiert (Abbildung 16).

Die Immundetektion der HER2-Immünpräzipitate mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper bestätigte auch hier die mit ansteigender Expression einhergehende Zunahme der Phosphorylierung und damit der Aktivierung von HER2 (Abbildung 16A). Die Untersuchung der LAR-Präzipitate führte zu einem dem EGFR-Experiment ähnlichen Resultat (Abbildung 16B). Die Bildung des LAR-Vorläuferproteins blieb von der Expressionsstärke von HER2 unbeeinflusst und belegte wiederum die in allen Ansätzen gleiche Expression von PTP-LAR. Bezüglich der reifen P-Untereinheit war bei zunehmender Expression von HER2 eine verglichen mit EGFR deutlich stärkere und auch bereits bei geringerer Kinaseexpression einsetzende Abnahme zu beobachten. Einher ging dies mit einer entsprechend ausgeprägteren Akkumulation des Prozessierungsproduktes.

Diese Ergebnisse machten deutlich, daß neben der Amplifikation des EGFRs auch die in zahlreichen Tumoren beobachtete Überexpression von HER2 zu einer Prozessierung und damit zu einer Verringerung reifer LAR-P-Untereinheit führt.



**Abb. 16:** Prozessierung von PTP-LAR nach transienter Überexpression von HER2 in HEK-293 Fibroblasten

HEK-293 Fibroblasten wurden in 10cm-Schalen entsprechend dem angegebenen Schema transient entweder mit Expressionsplasmid für LAR-Wildtyp allein oder zusammen mit aufsteigenden Mengen des für HER2-Wildtyp kodierenden Vektors transfiziert. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen lysiert, die gewonnenen Lysate geteilt und in Immunpräzipitationen eingesetzt. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) HER2 wurde mit monoklonalem Anti-HER2-Antikörper 13D immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach dessen Entfernung wurde derselbe Filter mit dem polyklonalen Anti-HER2-JL-Antikörper ( $\alpha$ HER-2) immundetektiert.

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert, die anschließende Immunoblotanalyse mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ LAR-CT).

Die Positionen von HER2, des unreifen LAR-Vorläuferproteins (LAR-V) sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.



**Abb. 17: Prozessierung endogener PTP-LAR nach Stimulation mit EGF in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (Seite 78)**

Nach 48-stündigem Serumentzug wurden MDA-MB-468 Brustkrebszellen entweder nicht stimuliert oder für jeweils 20 bzw. 40 min mit TPA (1  $\mu$ M) oder EGF (50 ng/ml) behandelt. Nach der Zellyse wurde PTP-LAR mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse erfolgte mit demselben Antikörper ( $\alpha$ LAR-CT). Die Molekulargewichte von Standardproteinen sind am linken, die Position des unreifen LAR-Vorläuferproteins (LAR-V) sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit am rechten Bildrand angegeben.

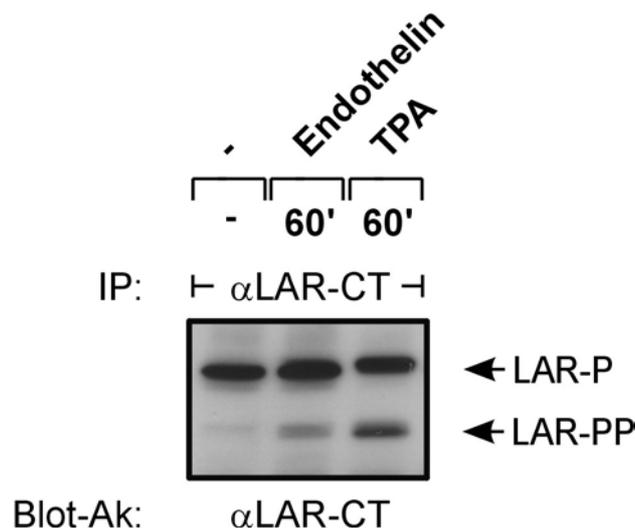
Aus der Analyse der Immunkomplexe ging klar hervor, daß die Stimulation von MDA-MB-468 mit EGF zur proteolytischen Spaltung endogener LAR führte. Bemerkenswert war dabei, daß das entstehende Prozessierungsprodukt bei Behandlung mit EGF deutlich stärker zu detektieren war als nach jeweils entsprechender Stimulation der Zellen mit TPA. Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Tumorklinien, in denen sich TPA als jeweils stärkster Stimulus erwies (Daten nicht gezeigt), hatte EGF in MDA-MB-468 offensichtlich eine deutlich stärkere LAR-prozessierende Wirkung. Stimulation des Zellen mit EGF führte dabei nicht zu Serin-/Threoninphosphorylierung der unprozessierten LAR-P-Untereinheit, wie dies anhand des verringerten Laufverhaltens nach TPA-Behandlung zu beobachten war.

**3.4.2.2 Prozessierung von LAR nach Endothelin-Stimulation in mit ETNR transfizierten HEK-293**

Aus der Literatur war bekannt, daß die Stimulation verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) über den als Transaktivierung bezeichneten Signaltransduktionsprozeß ebenfalls zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des EGFRs führte (Daub et al., 1996, 1997; Zwick et al., 1997). Es stellte sich daher die Frage, ob Aktivierung dieser Kinase nicht nur infolge Überexpression oder durch hierfür spezifische Liganden, sondern auch nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und damit nach Transaktivierung zur Prozessierung von PTP-LAR führt. Stellt also die Spaltung von LAR - beispielsweise neben der Aktivierung der MAP-Kinasen - ein weiteres, bisher nicht beschriebenes Ergebnis der Transaktivierung dar?

Zur Klärung dieser Frage wurde der Endothelin-Rezeptor transient in HEK-293 Fibroblasten exprimiert und anschließend für jeweils 60 Minuten mit Endothelin oder TPA stimuliert (Abbildung 18). Letzteres führte erwartungsgemäß zu einer starken Zunahme des bei 70 kDa laufenden LAR-Prozessierungsproduktes (Spur 3). Stimulation der Zellen mit Endothelin hatte ebenfalls eine verglichen mit dem Kontrollansatz (Spur 1) deutliche Prozessierung zur Folge, vermochte jedoch nicht das durch TPA hervorgerufene Ausmaß der LAR-Spaltung zu induzieren (Spur 2). Eine wie in den HER2- bzw. EGFR-Koexpressionsexperimenten detektierbare Abnahme der P-Untereinheit wurde durch keinen der beiden Stimuli herbeigeführt. Hingegen war insbesondere wieder nach Stimulation mit TPA, in geringerem Maße aber auch nach Endothelinbehandlung eine Mobilitätsverringering der P-Untereinheit

infolge Serin-/Threoninphosphorylierung zu beobachten. Dieses Experiment machte in jedem Falle deutlich, daß die Stimulation auch des Endothelinrezeptors durch den dafür spezifischen Liganden zur Prozessierung endogener PTP-LAR in HEK-293 führt.



**Abb. 18:** Prozessierung endogener PTP-LAR nach Stimulation mit Endothelin in Endothelin-Rezeptor exprimierenden HEK-293 Fibroblasten

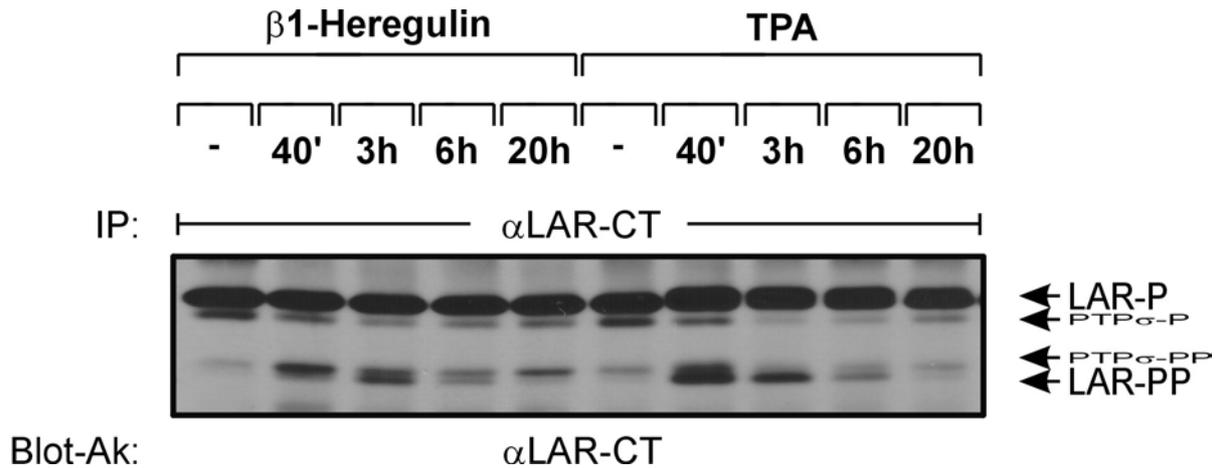
HEK-293 Fibroblasten wurden in 10cm-Schalen transient mit cDNA des Endothelin-Rezeptors (4µg/10cm-Schale) transfiziert. Nach 24-stündigem Serumentzug blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit Endothelin (100 nM) oder TPA (1 µM) für jeweils 60 min stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde PTP-LAR mit dem polyklonalen Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse erfolgte mit demselben Antikörper (αLAR-CT). Die Position der reifen (LAR-P) und der prozessierten (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit ist am rechten Bildrand angegeben.

### 3.4.2.3 Prozessierung von LAR nach Carbachol-Stimulation in mit M<sub>1</sub>R transfizierten Cos-7-Zellen

Die Prozessierung von PTP-LAR nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sollte noch anhand eines weiteren Vertreters dieser Rezeptorklasse, dem M<sub>1</sub>R, bestätigt werden. Hierzu wurden Cos-7 Zellen mit Expressionsplasmiden des M<sub>1</sub>Rs sowie PTP-LAR kotransfiziert (Abbildung 19). Behandlung der Zellen mit TPA hatte auch in Cos-7 Zellen die Spaltung der membranständigen LAR-Untereinheit insbesondere nach 50-minütiger, noch stärker nach 100-minütiger Stimulationsdauer zur Folge. Stimulation der Zellen mit Carbachol führte ebenfalls zur Prozessierung von LAR, wobei hier das Maximum 50 Minuten nach Ligandenzugabe erreicht wurde und nahezu dem Prozessierungsgrad von TPA bei gleicher Stimulationsdauer entsprach. Für beide Stimuli war eine leichte Abnahme der reifen P-Untereinheit über den Stimulationszeitraum hinweg zu beobachten.

Durch diese Ergebnisse wurde die Stimulierbarkeit der LAR-Prozessierung nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bekräftigt und damit die vermutliche Bedeutung der Transaktivierung in diesem Zusammenhang untermauert.





**Abb. 20: Prozessierung endogener PTP-LAR nach Stimulation mit  $\beta$ -Heregulin in MCF-7-HER2 Brustkrebszellen**

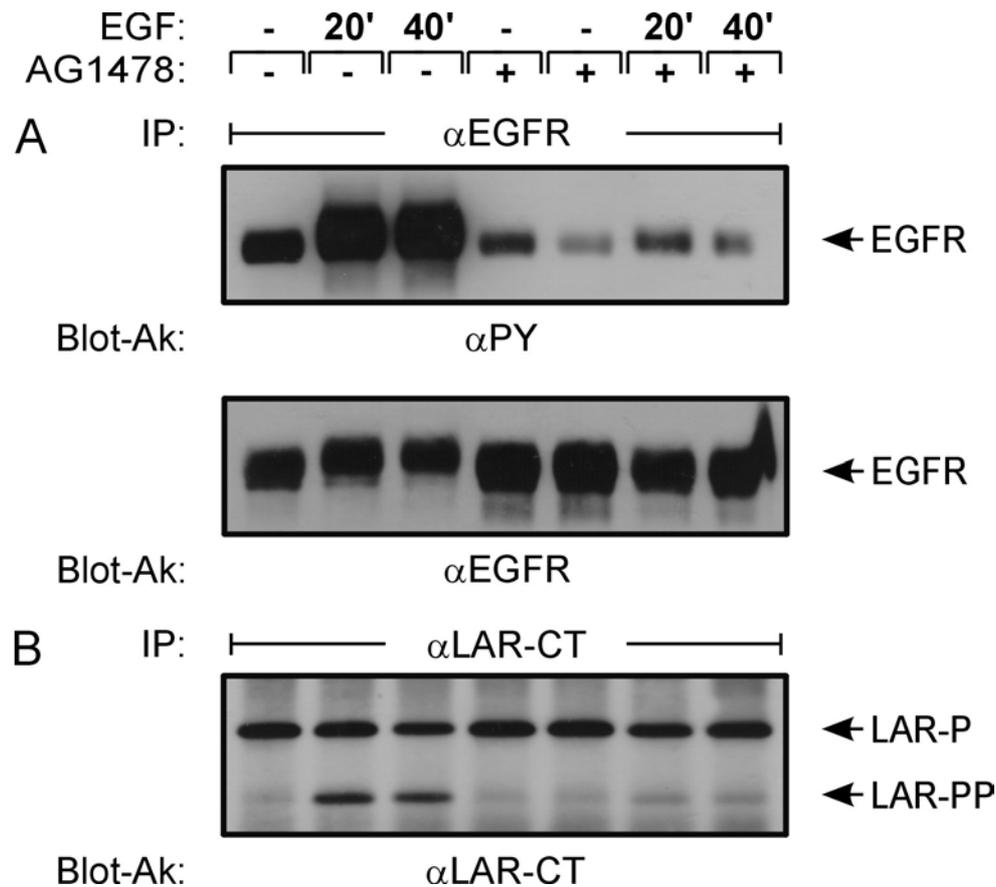
Nach 48-stündigem Serumentzug wurden MCF-7-HER-2 Brustkrebszellen entweder nicht stimuliert oder für jeweils 40 min, 3h, 6h sowie 20h mit  $\beta$ -Heregulin (50 ng/ml) oder TPA (1 mM) behandelt. Nach der Zellyse wurde PTP-LAR mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse erfolgte mit demselben Antikörper ( $\alpha$ PTP-LAR). Die Positionen von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sowie vermeintlicher reifer (PTP $\sigma$ -P) und prozessierter (PTP $\sigma$ -PP) PTP $\sigma$ -P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

### 3.5 Auswirkung verschiedener Inhibitoren auf die Prozessierung von PTP-LAR

Durch Einsatz verschiedener Inhibitoren und Untersuchung deren Einflusses auf die Prozessierung von PTP-LAR sollte der diesem Prozeß zugrundeliegende Signaltransduktionsweg näher charakterisiert werden. Das Ergebnis dieser Bemühungen ist in den folgenden Abschnitten wiedergegeben.

#### 3.5.1 Inhibition der Prozessierung von LAR durch Tyrphostin AG1478

Um zu bekräftigen, daß die Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität des EGFRs für die Prozessierung von PTP-LAR entscheidend ist, sollte der Einfluß des EGFR-spezifischen Inhibitors Tyrphostin AG1478 auf die proteolytische Umsetzung der Phosphatase untersucht werden (Abbildung 21). Wiederum wurden MDA-MB-468 Brustkrebszellen nicht, für 20 oder für 40 Minuten mit EGF (50 ng/ml) stimuliert. Dabei wurde ein Teil der Ansätze vor Ligandenzugabe für 30 Minuten mit dem Inhibitor vorinkubiert, der andere Teil blieb unvorbehandelt. Aus den Lysaten wurden der EGFR und PTP-LAR spezifisch immunpräzipitiert und nach Auftrennung mittels SDS-Page auf Nitrozellulosemembran transferiert.



**Abb. 21: Inhibition EGF-induzierter LAR-Prozessierung durch Tyrphostin AG1478 in MDA-MB-468 Brustkrebszellen**

48 Stunden serumgehungenen MDA-MB-468 Brustkrebszellen wurde entsprechend dem angegebenen Schema jeweils 30 min vor Ligandenzugabe 250 nM AG1478 zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach der Lyse wurden die Zellsate geteilt und zu Immunpräzipitationen herangezogen. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (αPY). Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper (αEGFR) immundetektet.

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt (αLAR-CT).

Die Positionen von EGFR sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

Immundetektion der EGFR-Immunpräzipitate mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (Abbildung 21A, oben) ergab ausgehend von einer Basalphosphorylierung (Spur 1) für beide Stimulationszeiten eine etwa gleichstarke Zunahme der EGFR-Phosphorylierung (Spuren 2, 3). Vorinkubation der Zellen mit Tyrphostin AG1478 verminderte den Phosphorylierungsstatus unstimulierter (Spuren 4, 5) wie EGF-behandelter Zellen (Spuren 6, 7) unter das Basalniveau unbehandelter Kontrollzellen in zeitabhängigem Maße. Die Vergleichbarkeit zugrundeliegender EGFR-Mengen geht aus Abbildung 21A, unten hervor.

Analog den in Abbildung 17 gezeigten Ergebnissen war auch in diesem Experiment die Prozessierung der LAR-P-Untereinheit bereits nach 20-minütiger EGF-Stimulation deutlich zu detektieren (Abbildung 21B, Spur 2). Die Verlängerung der Stimulationszeit auf 40 Minuten führte zu keiner nennenswerten Zunahme des Prozessierungsproduktes, wohl aber zu einer weiteren Abnahme der reifen P-Untereinheit (Spur 3). Im Gegensatz hierzu war im Falle der mit AG1478 vorbehandelten Zellen für beide Stimulationswerte eine wenn überhaupt nur sehr geringe Zunahme des Spaltproduktes gegenüber den Kontrollzellen zu beobachten (Spuren 6, 7). Lediglich mit Tyrphostin behandelte Zellen wiesen ein zum Kontrollansatz völlig identisches Bandenmuster auf (Spuren 4, 5).

Diese Experimente belegen die Notwendigkeit der Kinaseaktivität des EGFRs für die Prozessierung der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR.

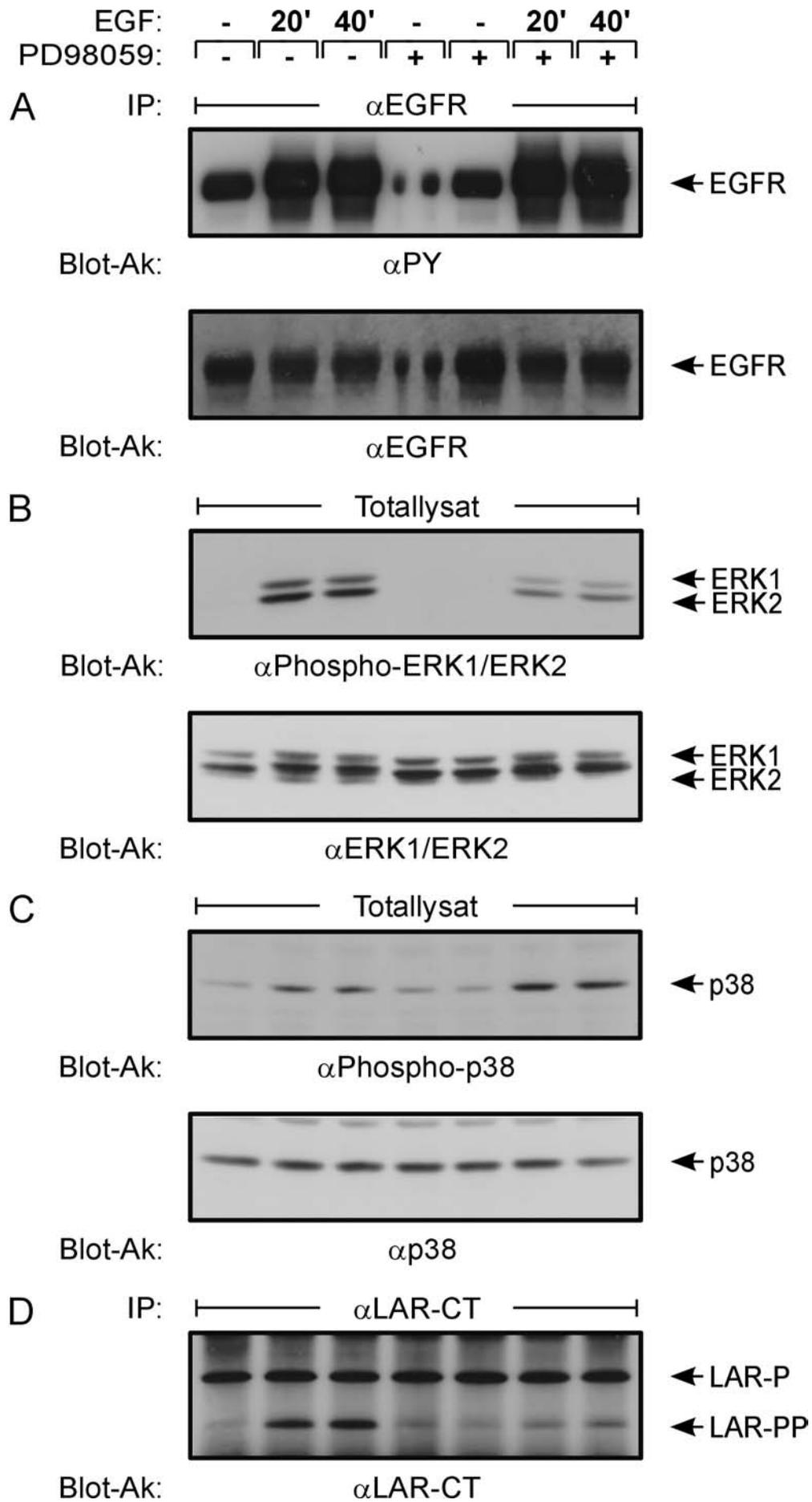
### **3.5.2 Inhibition der Prozessierung von LAR durch MEK-Inhibitoren**

In jüngerer Zeit wurde in einigen Veröffentlichungen die Beteiligung aktivierter MAPK-Kinasen an der ligandeninduzierten Prozessierung membranständiger Proteine wie TGF $\alpha$  (Fan und Derynck, 1999) oder Met-Rezeptor (Nath et al., 2000) beschrieben. Der eventuellen Rolle verschiedener MAP-Kinasen sollte daher auch im Zusammenhang mit der EGF-induzierten Prozessierung von PTP-LAR nachgegangen werden. Im Fokus des Interesses standen dabei insbesondere ERK1 und ERK2 bzw. p38, deren Bedeutung für Wachstumsfaktor-vermittelte bzw. konstitutive Abspaltung der Ektodomäne von TGF $\alpha$ , aber auch TNF $\alpha$  und L-Selektin bekannt ist (Fan und Derynck, 1999).

#### **3.5.2.1 Inhibition der Prozessierung von LAR durch PD98059**

Bei PD98059 handelt es sich um einen für die Serin/Threoninkinase MEK1 spezifischen Inhibitor. Durch die Inhibition dieser Kinase wird die Aktivierung der von MEK1 regulierten MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 unterbunden und damit der von ihnen vermittelte Signalweg unterbrochen. Hingegen werden andere Mitglieder der MAPK-Familie wie p38 und JNK aufgrund der Spezifität des Inhibitors nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt.

Der Einfluß dieses Inhibitors und damit die Bedeutung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 für die EGF-stimulierte Prozessierung endogener PTP-LAR wurde wiederum in der Tumorzelle MDA-MB-468 untersucht. Die Stimulation der Zellen erfolgte analog den bereits in Kapitel 3.5.1 geschilderten Bedingungen. Dabei wurden der Phosphorylierungsgrad des EGFRs, die Aktivierung von ERK1/ERK2 und p38 sowie das Auftreten des 70 kDA umfassenden Prozessierungsproduktes der LAR-P-Untereinheit durch Analyse entsprechender Immunkomplexe und Gesamtzelllysate untersucht und miteinander in Korrelation gesetzt (Abbildung 22).



**Abb. 22: Inhibition EGF-induzierter LAR-Prozessierung durch PD98059 in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (Seite 85)**

Nach 48-stündiger Inkubation mit serumfreiem Medium wurden MDA-MB-468 Brustkrebszellen entsprechend dem angegebenen Schema jeweils 30 min vor Ligandenzugabe mit 10  $\mu$ M PD98059 vorbehandelt. Hernach wurden die Zellen für jeweils 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach der Lyse wurden die Zellysate geteilt und zu Immunpräzipitationen herangezogen. Immunkomplexe wie auch Gesamtzellysate wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. (A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses Antikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR) immundetektiert. (B) Aktivierte Formen der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 wurden mit polyklonalem Anti-Phospho-ERK1/ERK2-Antikörper ( $\alpha$ Phospho-ERK1/ERK2), gesamtzelluläre ERK1 und ERK2 mit polyklonalem Anti-ERK1/ERK2-Antikörper ( $\alpha$ ERK1/ERK2) aus Gesamtzellysaten immundetektiert. (C) Aktivierte Form von p38 wurde mit polyklonalem Anti-Phospho-p38-Antikörper ( $\alpha$ Phospho-p38), gesamtzelluläre p38 mit polyklonalem Anti-p38-Antikörper ( $\alpha$ p38) aus Gesamtzellysaten immundetektiert. (D) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ LAR-CT). Die Positionen von EGFR, ERK1 und ERK2, p38 sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

Erwartungsgemäß hatte die Vorbehandlung der Zellen mit PD98059 keinen Einfluß sowohl auf die Basalphosphorylierung des EGFRs (Abbildung 22A, Spuren 1 und 4, 5) als auch auf dessen Aktivierungsstatus in EGF-stimulierten Zellen (Spuren 2, 3 und 6, 7). Immundetektion von Totallysaten mit einem Phospho-ERK-spezifischen Antikörper, der spezifisch gegen phosphorylierte und damit ausschließlich aktivierte Formen von ERK1 und ERK2 gerichtet ist, bestätigte die starke Inhibition dieser beiden MAP-Kinasen trotz EGFR-Aktivierung (Abbildung 22B, Spuren 2, 3 und 6, 7). Im Gegensatz hierzu wurde die Aktivierung anderer MAP-Kinasen wie p38 durch PD98059 nicht beeinträchtigt, was die Spezifität des Inhibitors unterstrich (Abbildung 22C). Die Analyse von Gesamtzellysaten mit einem für aktivierte p38 spezifischen Antikörper ergab sogar eine leichte Erhöhung der EGF-vermittelten Aktivierung dieser Kinase in Gegenwart von PD98059 (vergleiche Spuren 2, 3 und 6, 7). Untersuchung der LAR-Präzipitate ließ ein zu den Tyrphostin-Experimenten ähnliches Prozessierungsmuster erkennen (Abbildung 22D). EGF-induzierte Prozessierung der P-Untereinheit (Spuren 2, 3) wurde durch Inhibition von ausschließlich ERK1 und ERK2 nahezu vollständig unterdrückt (Spuren 6, 7).

Aus diesen Experimenten ging deutlich hervor, daß für die EGF-induzierte Prozessierung von PTP-LAR die Aktivierung von ERK1 und ERK2, nicht aber von p38 maßgeblich ist.

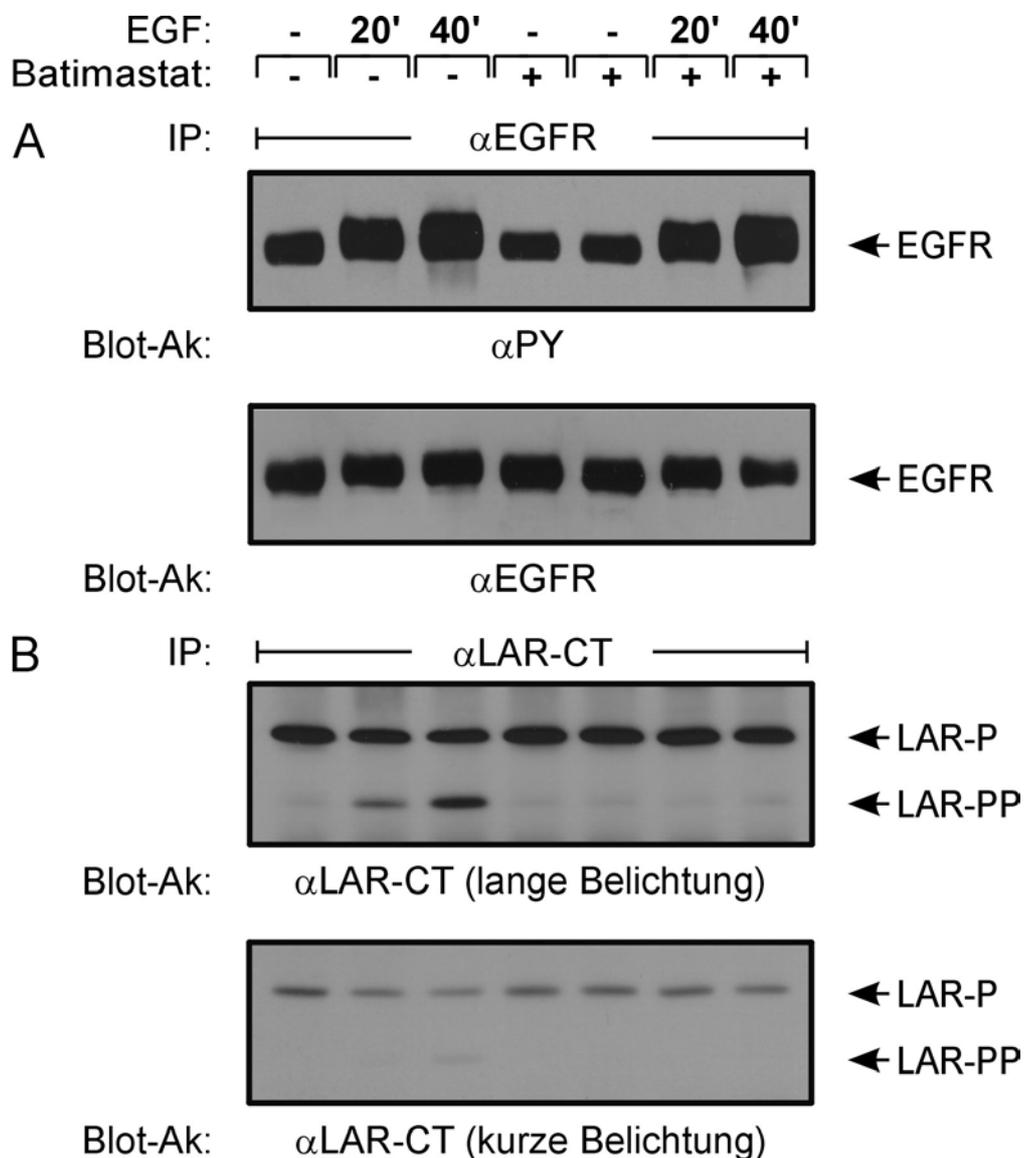
**3.5.2.2 Inhibition der Prozessierung von LAR durch U01236**

Die Substanz U0126 stellt einen weiteren, für die Serin-/Threoninkinase MEK1 hochspezifischen Inhibitor dar. Anwendung von U0126 in MDA-MB-468 in einer dem PD98059-Experiment analogen Weise führte bei starker Verringerung der ERK1- und ERK2-Aktivität ebenfalls zu einer nahezu vollständigen Inhibition der EGF-induzierten Prozessierung von PTP-LAR (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.3 Inhibition der Prozessierung von LAR durch Batimastat

Im Zusammenhang mit der proteolytischen Spaltung zahlreicher Transmembranproteine wie HER2 oder HB-EGF wurden in der Literatur zunehmend Metalloproteasen diskutiert (Codony-Servat et. al., 1999; Gechtman et al., 1999). Um die eventuelle Bedeutung dieser Proteasefamilie für die proteolytische Spaltung von PTP-LAR zu evaluieren, sollte der Einfluß Metalloprotease-spezifischer Inhibitoren wie Batimastat auf die EGF-induzierte LAR-Prozessierung untersucht werden.

Bei analogem Stimulationsmodus hatte die Vorbehandlung mit Batimastat keinerlei Einfluß auf die EGFR-Phosphorylierung unstimulierter (Abbildung 23A, Spuren 1 und 4, 5) wie EGF-behandelter Zellen (Spuren 2, 3 und 6, 7), wobei längere EGF-Stimulation in diesem Experiment eine nochmalige Verstärkung der EGFR-Aktivierung zur Folge hatte.



**Abb. 23: Inhibition EGF-induzierter LAR-Prozessierung durch Batimastat in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (Seite 87)**

Nach 48-stündigem Serumentzug wurden MDA-MB-468 Brustkrebszellen entsprechend dem angegebenen Schema jeweils 30 min vor Ligandenzugabe mit 5 mM Batimastat behandelt. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach der Lyse wurden die Zellysate geteilt und zu Immunpräzipitationen herangezogen. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR) immundetektiert.

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ LAR-CT).

Die Positionen von EGFR sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

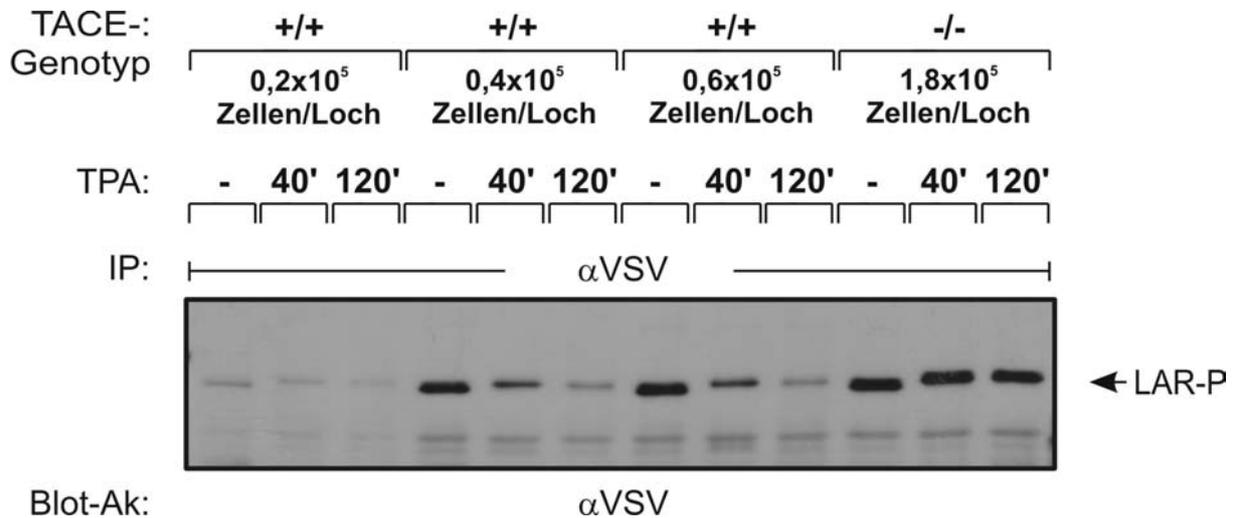
Die Analyse der LAR-Immunpräzipitate ergab eine vollständige Inhibition EGF-stimulierter Prozessierung von PTP-LAR durch Batimastat (Abbildung 23B, Spuren 6, 7). Für das Erscheinen des Prozessierungsproduktes in den Spuren 2 und 3 fiel auf, daß dieses, korrelierend mit dem Phosphorylierungsgrad des EGFRs, nach 20-minütiger Stimulation bereits gut detektierbar war, 40 Minuten nach Ligandenzugabe jedoch deutlich zunahm. Einher ging diese Zunahme des Spaltproduktes mit der gleichzeitigen Abnahme der unprozessierten P-Untereinheit, was insbesondere bei Betrachtung der kürzeren Exposition deutlich wurde.

Als eindeutig ging aus diesem Experiment somit die Erkenntnis hervor, daß die Prozessierung von PTP-LAR zumindest in MDA-MB-468 Brustkrebszellen durch Metalloproteinasen vermittelt wird.

### 3.6 Prozessierung von PTP-LAR durch die Metalloproteinase ADAM-17

Aus den oben beschriebenen Experimenten zeichnete sich für die Prozessierung von PTP-LAR eine Signalkaskade ab, die dem zur Spaltung von TGF $\alpha$  zugrunde liegenden Signalweg ähnlich ist: nämlich EGF als Stimulus, Vermittlung durch aktivierte MAP-Kinasen, Aktivierung einer Metalloprotease. Da letztere im Falle von TGF $\alpha$  als ADAM-17 identifiziert wurde, erhob sich die Frage, ob ADAM-17 auch die Prozessierung von PTP-LAR katalysiert. Um dieser Frage nachzugehen, sollte die Prozessierung von PTP-LAR in Maus-Fibroblasten, in denen das die Proteinase ADAM-17 kodierende Gen deletiert wurde (TACE-„Knock-out“-Fibroblasten), mit der in Wildtyp-Zellen verglichen werden. Da PTP-LAR in diesen Zellen endogen nur sehr schwach detektierbar war, mußte die Phosphatase ektopisch exprimiert werden. Hierzu wurde ein retrovirales Expressionsplasmid der humanen, am C-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierten PTP-LAR hergestellt (pLXSN-LARwt-VSV) und über Infektion in Wildtyp- bzw. TACE-„Knock-out“-Fibroblasten transferiert. Um zum Zeitpunkt

der Stimulation vergleichbare Zelldichten zu erreichen, wurden die schneller wachsenden Wildtyp-Zellen im Gegensatz zu den „Knock-out“-Fibroblasten vor der Infektion in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesät. Die infizierten Zellen wurden nach Serumentzug mit TPA entsprechend der angegebenen Zeiten stimuliert, ektopische PTP-LAR wurde aus den Zellysaten spezifisch immunpräzipitiert und analysiert (Abbildung 24).



**Abb. 24:** TPA-induzierte Prozessierung von PTP-LAR in Maus-Wildtyp-Fibroblasten und TACE-„Knock-out“-Fibroblasten

Maus-Wildtyp-Fibroblasten wurden zu  $0,2 \times 10^5$  Zellen/6-Loch-Schale,  $0,4 \times 10^5$  Zellen/6-Loch-Schale und  $0,6 \times 10^5$  Zellen/6-Loch-Schale, „Knock-out“-Fibroblasten zu  $1,8 \times 10^5$  Zellen/6-Loch-Schale ausgesät. Anschließend wurde mit Virus-Überstand von frisch mit pLXSN-LARwt-VSV transfizierten Phoenix-E-Zellen seriell für dreimal 3 h infiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit Serum-freiem Medium blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden für jeweils 40 bzw. 120 min mit TPA ( $1 \mu\text{M}$ ) stimuliert. Nach der Zellyse wurde PTP-LAR mit monoklonalem Anti-VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha\text{VSV}$ ). Die Positionen der reifen LAR-P-Untereinheit (LAR-P) ist am rechten Bildrand angegeben.

Die beobachteten Signalstärken korrelierten mit den jeweiligen Zelldichten, wobei die bei mittlerer und höchster Konzentration ausgebrachten Wild-Typ-Fibroblasten zum Zeitpunkt der Stimulation eine den „Knock-out“-Zellen vergleichbare Zelldichte aufwiesen. In den Wildtyp-Zellen führte zeitlich zunehmende Stimulation mit TPA erwartungsgemäß zu einer gegenüber Kontrollzellen zunehmenden Verringerung der LAR-P-Untereinheit (Spuren 1 bis 9). Im Gegensatz hierzu war im Falle der „Knock-out“-Zellen sowohl nach 40- als auch nach 120-minütiger Stimulation keinerlei Abnahme der LAR-P-Untereinheit, wohl aber die für TPA-Behandlung typische Mobilitätsverringering zu beobachten (Spuren 10 bis 12). Letztere entsprach in ihrem Ausmaß der in Wildtyp-Fibroblasten durch TPA-Behandlung herbeigeführten Laufstreckenverringering und bewies, daß „Knock-out“- wie Wildtyp-Zellen gleichermaßen stimuliert wurden. Dieses Experiment erlaubte die eindeutige Identifizierung von ADAM-17 als die/eine für die Prozessierung von PTP-LAR maßgebliche Protease.



**Abb. 25: Assoziation von PTP-LAR und ADAM-17 bei Koexpression in HEK-293 Fibroblasten (Seite 90)**

LAR-Wildtyp und humane ADAM-17/TACE wurden entweder allein oder gemeinsam in HEK-293 Fibroblasten transient überexprimiert. Die Lysate wurden Immunpräzipitationen zugeführt oder als Gesamtzellysate weiterbehandelt. Die Immunkomplexe wie auch Gesamtzellysate wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse der Immunkomplexe wurde zunächst mit einem polyklonalen Anti-TACE-Antikörper ( $\alpha$ TACE), nach dessen Entfernung mit dem polyklonalen Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper ( $\alpha$ LAR-CT) durchgeführt.

(B) Die Immunoblotanalyse der Gesamtzellysate erfolgte ebenfalls mit dem polyklonalen Anti-TACE-Antikörper ( $\alpha$ TACE).

Die Positionen von TACE sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

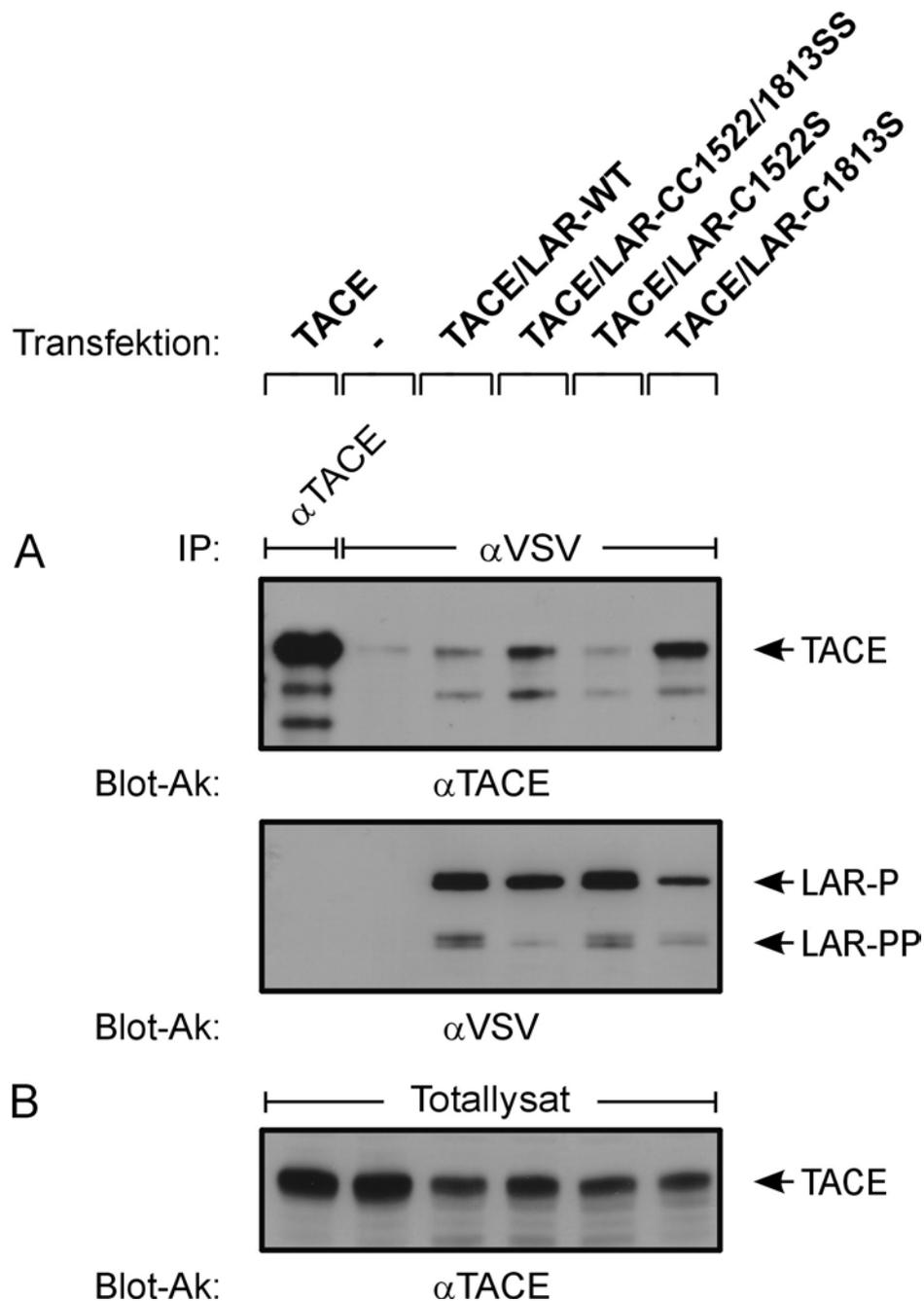
Dabei war bei Koexpression beider Proteine (Spur 4) ein deutliches Signal der bei etwa 118 kDa laufenden, noch die Prodomäne tragenden Vorläuferform humaner ADAM-17 detektierbar. Lange Exposition ergab eine Assoziation überexprimierter TACE auch mit endogener PTP-LAR (Daten nicht gezeigt). Desweiteren war bei Koexpression mit TACE eine schwache Prozessierung überexprimierter PTP-LAR und damit eine leichte Verschiebung von reifer zu prozessierter LAR-P-Untereinheit zu beobachten (Abbildung 25A, unten, vergleiche Spuren 3 und 4). Die Analyse der Gesamtzellysate bestätigte vergleichbare Menge überexprimierter ADAM-17 (Abbildung 25B).

In HEK-293 überexprimierte ADAM-17 assoziiert diesem Experiment zufolge mit ektoptischer wie auch mit endogener PTP-LAR.

**3.7.2 Assoziation von ADAM-17 mit verschiedenen LAR-Derivaten bei transienter Koexpression in HEK-293**

Nachdem die Assoziation von Wildtyp-LAR mit humaner ADAM-17 gezeigt werden konnte, war von Interesse, ob die Interaktion beider Proteine unter Umständen von der katalytischen Aktivität der Phosphatasedomänen abhängig sein könnte.

Hierfür wurde ausgehend von einem am C-Terminus mit zwei VSV-Epitopen markierten LAR-Wildtyp-Konstrukt (PTP-LAR-WT-VSV) durch *in vitro*-Mutagenese eine Serie verschiedener LAR-Mutanten erzeugt. Dabei wurde im aktiven Zentrum entweder nur der membranproximalen Phosphatasedomäne I (PTP-LAR-C1522S-VSV), nur der membran-distalen Domäne II (PTP-LAR-C1813S-VSV) oder im Reaktionszentrum beider PTP-Domänen gleichzeitig (PTP-LAR-CC1522/1813SS-VSV) der für die katalytische Reaktion essentielle Cystein- durch einen Serinrest ausgetauscht und die jeweilige Domäne damit inaktiviert (siehe Kapitel 1.3.3). In HEK-293 wurde humane ADAM-17 zur Kontrolle allein oder aber mit jeweils einem dieser vier LAR-Derivate zusammen zur Expression gebracht (Abbildung 26).



**Abb. 26: Assoziation von ADAM-17 mit verschiedenen LAR-Derivaten bei Koexpression in HEK-293 Fibroblasten**

Humane ADAM-17/TACE wurde zur Kontrolle allein oder zusammen mit LAR-Wildtyp-VSV, LAR-CC1522/1813SS-VSV, LAR-C1522S-VSV sowie LAR-C1813S-VSV transient in HEK-293 Fibroblasten überexprimiert. Die gewonnenen Lysate wurden für Immunpräzipitationen herangezogen oder als Totallysate weiterbehandelt. Die Immunkomplexe wie auch Gesamtzelllysate wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) ADAM-17 wurde mit einem dafür spezifischen polyklonalen Anti-TACE-Antikörper und die verschiedenen LAR-Derivate mit monoklonalem Anti-VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse der Immunkomplexe wurde zunächst mit einem polyklonalen Anti-TACE-Antikörper ( $\alpha$ TACE), nach dessen Entfernung mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper ( $\alpha$ VSV) durchgeführt.

(B) Die Immunoblotanalyse der Gesamtzelllysate erfolgte ebenfalls mit dem polyklonalen Anti-TACE-Antikörper ( $\alpha$ TACE).

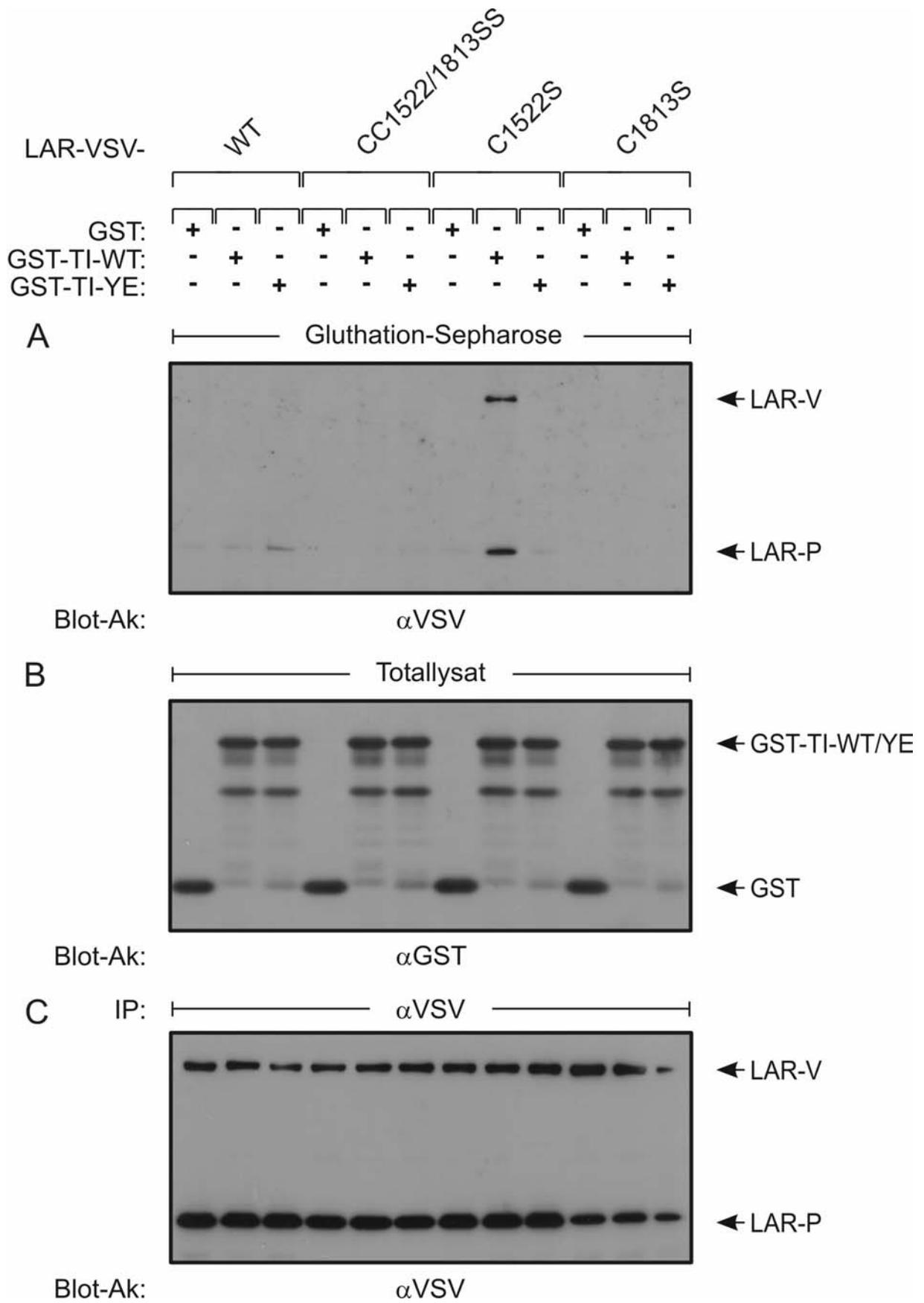
Die Positionen von TACE sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

In Anlehnung an das vorangegangene Experiment wurde die Interaktion von ADAM-17 auch mit dem VSV-markierten LAR-Wildtyp-Derivat reproduziert (Abbildung 26, oben, Spur 3). Verglichen mit LAR-Wildtyp-VSV assoziierte ADAM-17 mit der LAR-CC1522/1813SS-VSV-Doppelmutante (Spur 4) deutlich stärker, bei Koexpression mit LAR-C1522S-VSV (Spur 5) trat die Interaktion hingegen deutlich schwächer in Erscheinung. Am stärksten, nochmals bedeutend stärker als mit der LAR-CC/SS-Doppelmutante, wurde TACE mit dem LAR-C1813S-VSV-Derivat koimmunpräzipitiert (Spur 6). Dies ist umso bemerkenswerter, als insbesondere im Falle der C1813S-Einfach-, aber auch der CC/SS-Doppelmutante, weniger reife wie auch prozessierte P-Untereinheit direkt immunpräzipitierbar waren (Abbildung 26A, unten, vergleiche Spuren 4, 6 und 3, 5). Abbildung 26B bestätigte die etwa gleichstarke Expression von ADAM-17 für die Kotransfektionsansätze, in den Kontrollansätzen wurde TACE etwas stärker gebildet.

Dieses Experiment führte zu der Beobachtung, daß die Einführung einer C/S-Mutation in der membranproximalen PTP-Domäne von LAR eine verringernde, die Einführung derselben Mutation in der zweiten, membrandistalen Phosphatasedomäne eine deutlich verstärkende Wirkung auf die Assoziation mit ADAM-17 hat. Davon ausgehend ließ sich weiterhin mutmaßen, daß der intrazelluläre Bereich von PTP-LAR, und hierin insbesondere die Phosphatasedomäne II, für die Assoziation mit ADAM-17 von maßgeblicher Bedeutung ist.

### **3.7.3 Assoziation von PTP-LAR mit verschiedenen ADAM-17-GST-Fusionsproteinen**

Die Assoziation von PTP-LAR und ADAM-17 sollte durch *in vitro*-Bindungsassays mit GST-Fusionsproteinen verifiziert werden. Da sich aufgrund der unterschiedlichen Assoziation der lediglich im aktiven Zentrum ungleichen LAR-Derivate eine Wechselwirkung beider Proteine über deren zytoplasmatische Domänen abzeichnete (siehe Abschnitt 3.7.2), sollte die Interaktion der verschiedenen LAR-Derivate mit GST-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne von TACE untersucht werden. Hierbei handelte es sich einerseits um die Wildtyp-Form der intrazellulären ADAM-17-Domäne (GST-TI-WT), andererseits auch um eine in einem Phosphorylierungsmotiv substituierte YE-Mutante (GST-TI-YE). Diese GST-Fusionsproteine wurden mit Lysaten von HEK-293 Fibroblasten inkubiert, die LAR-WT-VSV, LAR-CC1522/1813SS-VSV, LAR-C1522S-VSV oder LAR-C1813S-VSV überexprimierten. Die an Gluthation-Sepharose gebundenen Proteinkomplexe wurden mit einem VSV-spezifischen Antikörper analysiert (Abbildung 27A). Dabei ergab sich eine deutliche Assoziation von Vorläuferform und reifer P-Untereinheit der LAR-C1522SVSV-Mutante mit dem GST-TI-WT-Protein. Deutliche Signale für die Interaktion beider GST-Fusionsproteine mit den anderen LAR-Derivaten konnten nicht detektiert werden. Vergleichbare Mengen an GST-Fusionsproteinen und LAR-Derivaten ergaben sich aus den Abbildungen 27B und 27C.



**Abb. 27: *in vitro*-Bindungsassay zur Assoziation verschiedener LAR-Derivate mit ADAM-17-GST-Fusionsproteinen (Seite 94)**

Zellysate aus LAR-WT-VSV, LAR-CC1522/1813SS-VSV, LAR-C1522S-VSV oder LAR-C1813S-VSV überexprimierenden HEK-293 Fibroblasten wurden mit jeweils 2 µg GST-Kontrollprotein sowie den Fusionsproteinen GST-TI-WT und GST-TI-YE in Gegenwart von Gluthation-Sepharose für 3 h bei 4°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein kleiner Teil der Lysate zu Immunpräzipitationen herangezogen oder als Gesamtzellextrakt weiterbearbeitet. GST-Präzipitations- und Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger, Totallysate über 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) GST-Präzipitationskomplexe wurden mit monoklonalem Anti-VSV-Antikörper immundetektiert ( $\alpha$ VSV).

(B) Die Immunoblotanalyse der Gesamtzellysate erfolgte mit einem polyklonalen Anti-GST-Antikörper ( $\alpha$ GST).

(C) Die verschiedenen LAR-VSV-Derivate wurden mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immundetektion erfolgte mit demselben Antikörper ( $\alpha$ VSV).

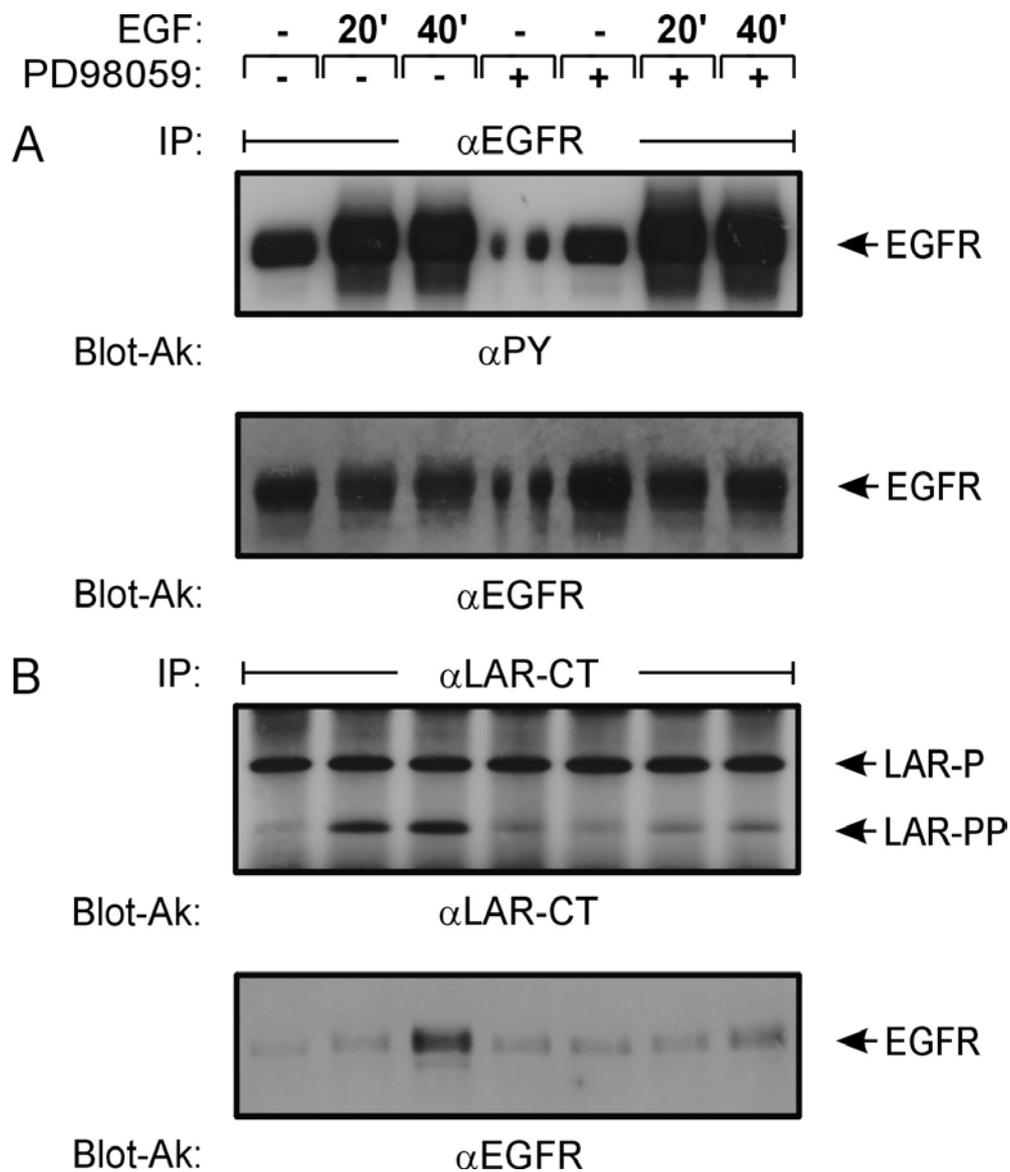
Die Positionen des LAR-Vorläuferproteins (LAR-V), deren reife P-Untereinheit (LAR-P) sowie von GST-Kontrollprotein und den GST-TI-Fusionsproteinen sind am rechten Bildrand angegeben.

### 3.8 Prozessierungsabhängige Assoziation von PTP-LAR und EGFR

Im Abschnitt 3.2 wurde bereits die Assoziation von LAR und dem EGFR bei Koexpression in HEK-293 gezeigt, wobei der intrazelluläre Teil der Tyrosinkinase als die die Wechselwirkung vermittelnde Domäne identifiziert werden konnte. Die Interaktion beider Proteine ließ sich auch endogen in den Brustkrebslinien MDA-MB-468 und BT-20 nachweisen, wo EGFR in den Immunkomplexen von PTP-LAR nachgewiesen und umgekehrt PTP-LAR auch mit dem EGFR koimmunpräzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). In Zusammenhang mit der durch EGFR-Aktivierung vermittelten Prozessierung von PTP-LAR stellte sich nun die Frage, ob diese Interaktion konstitutiv oder stimulations- und damit unter Umständen vom Prozessierungsstatus von PTP-LAR abhängig ist.

Zur Untersuchung dieses Aspektes wurde auf Membranen aus den in den Abschnitten 3.5.2.1 und 3.5.3 geschilderten Experimenten zurückgegriffen, in denen die EGF-stimulierte Prozessierung der LAR-P-Untereinheit nach Vorinkubation mit den Inhibitoren PD98059 oder Batimastat untersucht wurde. Nach Ablösen des LAR-spezifischen Antikörpers wurden dieselben Nitrozellulosemembranen mit EGFR-spezifischem Antikörper immundetektiert (Abbildung 28B, unten). Hierbei ergab sich für unbehandelte Kontrollzellen ein kaum (Spur 1), für 20 Minuten mit EGF stimulierte Zellen ein deutlicher detektierbares EGFR-Signal, (Spur 2). Maximale Kopräzipitation von EGFR mit immunpräzipitierter PTP-LAR wurde nach 40-minütiger EGF-Stimulation (Spur 3), also bei auch maximaler proteolytischer Spaltung der Phosphatase beobachtet (Abbildung 28B, oben, Spur 3). Vorbehandlung mit PD98059 führte bei nahezu vollständiger Inhibition der Prozessierung auch zu einer starken Verringerung der Assoziation beider Proteine (Spuren 6, 7). Das Zugrundeliegen vergleichbarer EGFR-Mengen geht aus Abbildung 28A, unten hervor.

Aus diesen Untersuchungen wie auch aus der Analyse des entsprechenden Blots des in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Experiments (Daten nicht gezeigt) ergab sich eine Korrelation zwischen der Prozessierung von PTP-LAR und deren Assoziation mit dem EGFR.



**Abb. 28: Prozessierungsabhängige Assoziation von PTP-LAR und EGFR in MDA-MB-468 Brustkrebszellen**

Nach 48-stündiger Inkubation mit serumfreiem Medium wurden MDA-MB-468 Brustkrebszellen entsprechend dem angegebenen Schema jeweils 30 min vor Ligandenzugabe mit 10  $\mu$ M PD98059 vorbehandelt. Hernach wurden die Zellen für jeweils 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach der Lyse wurden die Zellysate geteilt und zu Immunpräzipitationen herangezogen. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

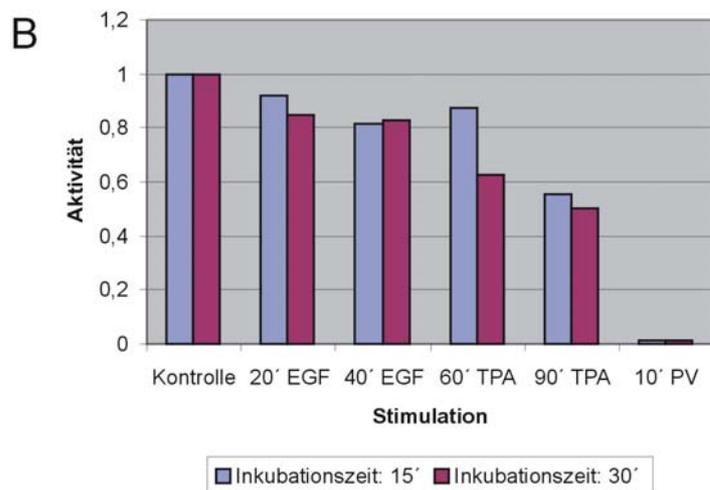
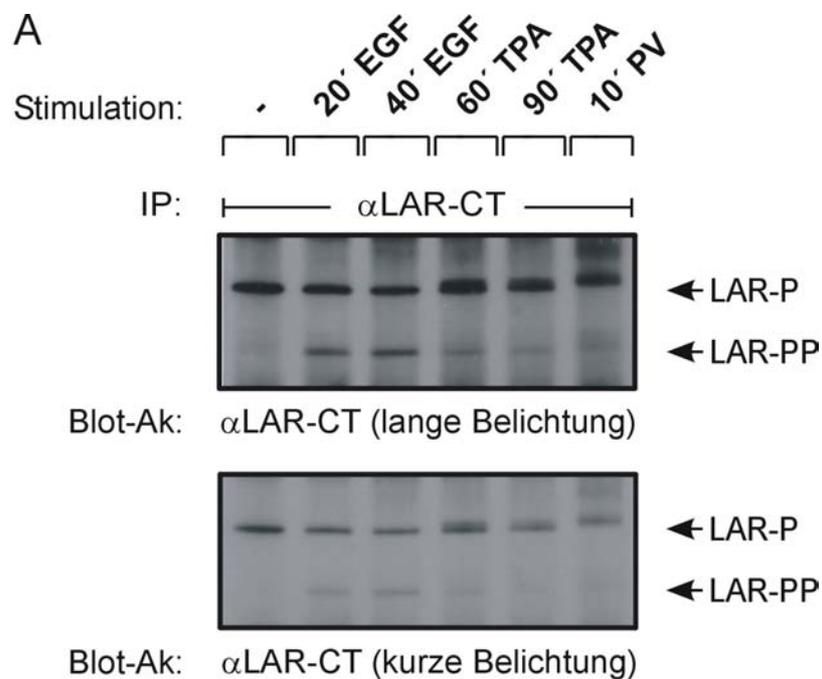
(A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses Antikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR) immundetektiert.

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert und zunächst mit demselben Antikörper immundetektiert ( $\alpha$ LAR-CT). Nach Ablösen des LAR-spezifischen Antikörpers erfolgte die erneute Immundetektion derselben Membran mit dem polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

Die Positionen des EGFRs sowie von reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

### 3.9 Einfluß der Prozessierung auf die Phosphataseaktivität von PTP-LAR

Eine allgemein mit der Prozessierung einhergehende und sich insbesondere mit der Beobachtung der prozessierungsabhängigen Assoziation von EGFR und PTP-LAR aufdrängende Frage war, ob die proteolytische Spaltung von PTP-LAR eine Änderung der katalytischen Aktivität dieser Phosphatase zur Folge hat. Erneut wurden MDA-MB-468 Zellen entsprechend der angegebenen Zeiten mit EGF, aber auch mit TPA und zur Negativkontrolle mit Pervanadat behandelt. Identische Immunpräzipitationen von PTP-LAR wurden zum einen zur Kontrolle des Prozessierungsgrades gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 29A), zum anderen einem *in vitro*-Phosphatase-Assay mit pNPP als Substrat zugeführt (Abbildung 29B).



**Abb. 29: Auswirkung ligandeninduzierter Prozessierung von PTP-LAR auf deren Phosphataseaktivität in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (Seite 97)**

Serumgehungerte MDA-MB-468 Brustkrebszellen blieben entweder unbehandelt, wurden für 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) sowie für 60 bzw. 90 min mit TPA (1  $\mu$ M) stimuliert oder aber für 10 min mit Pervanadat inkubiert. Nach der Zellyse in Phosphataseinhibitor-freiem Lysepuffer wurden die Lysate in drei gleiche Aliquots geteilt und jeweils der Immunpräzipitation von PTP-LAR mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper zugeführt.

(A) Die Immunkomplexe jeweils einer Präzipitation wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ LAR-CT). Die Positionen reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit sind am rechten Bildrand angegeben.

(B) Für die Immunkomplexe der jeweils beiden anderen Präzipitationen wurde die *in vitro*-Phosphataseaktivität gegenüber pNPP wie unter 2.5.2 beschrieben bestimmt. Die Reaktion wurde nach 15 bzw. 30 min gestoppt, die gemessenen Werte sind in dem Balkendiagramm dargestellt.

Immunpräzipitierte LAR aus unbehandelten MDA-MB-468-Zellen wies starke Aktivität gegenüber pNPP als Substrat auf (Kontrolle), angereicherte PTP-LAR aus mit Pervanadat vorbehandelten Zellen führte erwartungsgemäß zu keinem gegenüber der Spontandissoziation erhöhten Umsatz des Substrats. Stimulation der Zellen mit EGF für zwanzig Minuten hatte eine Verringerung der Phosphataseaktivität um etwa zehn Prozent zur Folge, für immunpräzipitierte PTP-LAR aus vierzig Minuten mit EGF behandelten Zellen ergab sich eine sogar um nahezu zwanzig Prozent verminderte Aktivität gegenüber dem Substrat. Einher ging diese Aktivitätsabnahme wiederum mit der Abnahme reifer LAR-P-Untereinheit bei gleichzeitigem Auftreten des Prozessierungsproduktes (Spuren 2, 3). Besonders auffällig und bedeutend stärker war die Verringerung der Phosphataseaktivität nach neunzigminütiger Stimulation mit TPA. Hier ließ sich eine Abnahme um etwa 45 Prozent messen. Damit korrelierend trat die reife P-Untereinheit hier am schwächsten in Erscheinung (Spur 5). Dies wurde insbesondere bei Betrachtung der kurzen Belichtung deutlich, bei der die durch Serin-/Threoninphosphorylierung bedingte Mobilitätsverringerng weniger stark hervortritt. Interessanterweise ließ sich die prozessierte Form der P-Untereinheit nach TPA- wie auch nach Pervanadat-Stimulation kaum mehr detektieren (Spuren 4, 5, 6).

Aus diesem Experiment war zu schließen, daß die Prozessierung von PTP-LAR eine Verringerung deren Phosphataseaktivität zur Folge hat, wobei die gemessene Aktivität wohl in erster Linie der reifen P-Untereinheit zuzuordnen ist. Die Entstehung des Prozessierungsproduktes führte jedenfalls nicht zu der in der Literatur mitunter vermuteten Aktivierung von PTP-LAR.

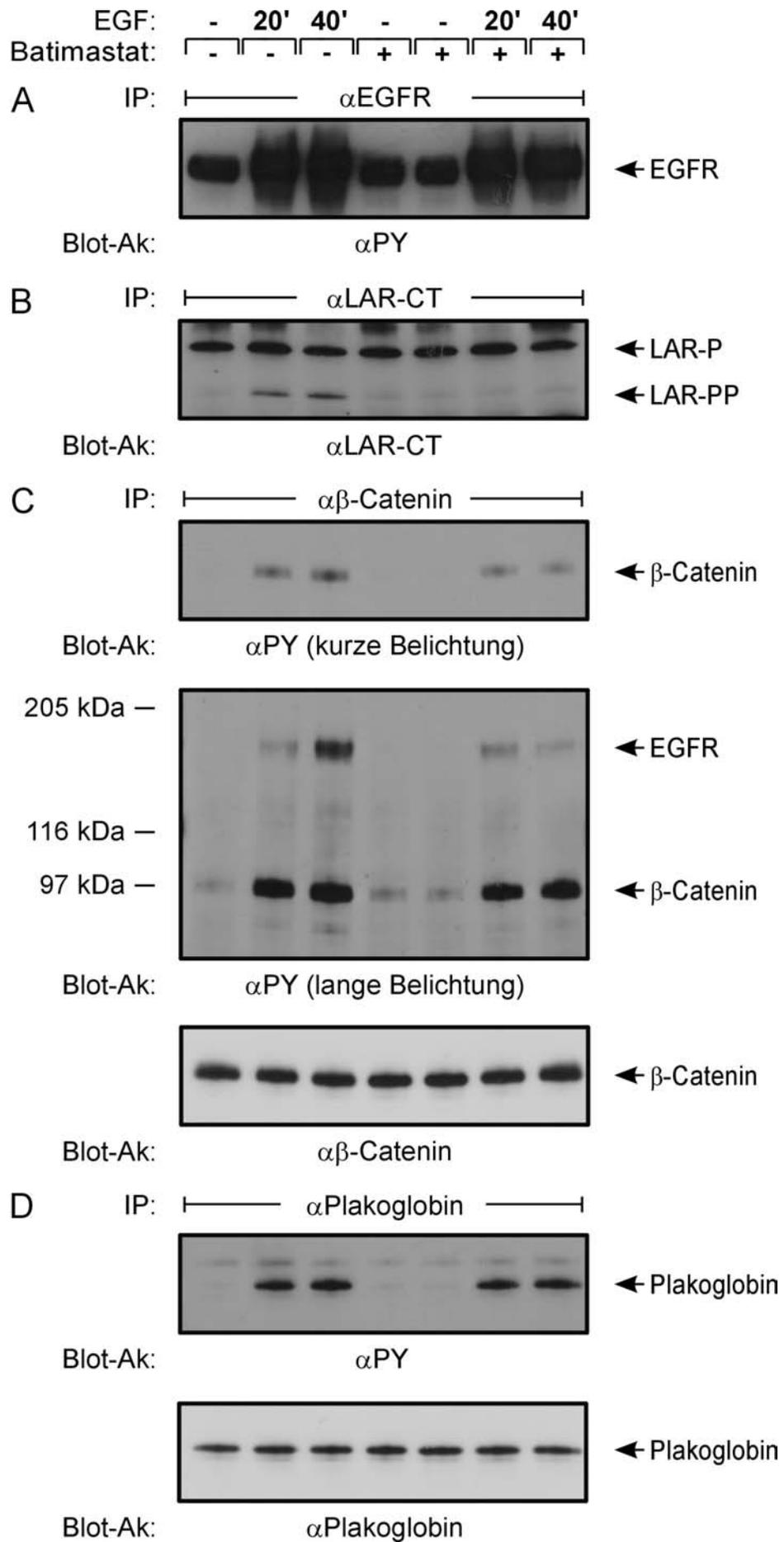
### 3.10 Phosphorylierung verschiedener Catenine nach EGF-induzierter Prozessierung von PTP-LAR

An die Beobachtungen zur *in vitro*-Phosphataseaktivität schloß sich unmittelbar die Frage an, ob die Prozessierung von PTP-LAR mit dem Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine

auch *in vivo* korreliert. Als potentiell Substrat für PTP-LAR wird in der Literatur das in Zell-Zell-Adhäsion involvierte Protein  $\beta$ -Catenin diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß  $\beta$ -Catenin unter *in vitro* Bedingungen von aktiver PTP-LAR dephosphoryliert wird (Müller et al., 1999). Der eventuelle Einfluß der Prozessierung und damit der Aktivität von LAR auf die Phosphorylierung von Cateninen wurde in MDA-MB-468-Zellen untersucht, die nach dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Stimulationsschema mit EGF und Batimastat behandelt wurden (Abbildung 30).

Bezüglich EGFR-Phosphorylierungsstatus und LAR-Prozessierung wurden die unter 3.5.3 geschilderten Ergebnisse reproduziert (Abbildungen 30A und 30B). Hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung ergab sich für das bei 97 kDa laufende Protein  $\beta$ -Catenin eine starke Zunahme zwanzig Minuten nach Zugabe von EGF (Abbildung 30C, oben/Mitte, Spur 2), vierzigminütige Stimulation führte zu einer nochmaligen Verstärkung dieses Signals (Spur 3). Behandlung der Zellen mit Batimastat alleine hatte für beide Inkubationszeiten eine sehr schwache Verstärkung der Basalphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zur Folge (Spuren 4, 5). Hingegen wurde die EGF-induzierte Phosphorylierung durch Vorbehandlung mit Batimastat gegenüber den unvorbehandelten Zellen erkennbar verringert. Quantifizierungen ergaben, daß die durch zwanzigminütige Stimulation hervorgerufene Phosphorylierung in Gegenwart von Batimastat um den Faktor 1,5 herabgesetzt war (Spur 6), die Präsenz des Inhibitors hatte im Falle der vierzigminütigen Stimulation eine zweifache Verringerung der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung zur Folge (Spur 7). Das Zugrundeliegen identischer Proteinnengen geht aus Abbildung 30C, unten hervor. Bemerkenswert war der Phosphorylierungsstatus eines bei 170 kDa laufenden, koimmunpräzipitierten Proteins, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um den EGFR handelt. Eine Assoziation beider Proteine wurde in der Literatur bereits mehrfach berichtet (Hoschuetzky et al., 1994; Müller et al., 1999). Hierbei stellte sich ein gut detektierbares Signal zwanzig (Spur 2), eine starke Phosphorylierung vierzig Minuten nach EGF-Zugabe ein (Spur 3). Die Vorbehandlung mit Batimastat hatte im Falle der zwanzigminütigen Stimulation keinen nennenswerten Einfluß (Spur 6), im Falle der längeren Stimulationsdauer führte sie hingegen zu einer 8-fachen Abschwächung des Phosphotyrosinsignals (Spur 7). Hierbei muß es sich um eine - möglicherweise nur mit  $\beta$ -Catenin assoziierende - Subfraktion zellulären EGFRs handeln, da, wie in Abbildung 30A gezeigt, auf der Ebene der Gesamtpopulation des EGFRs keine detektierbare Veränderung des Phosphorylierungsgrades zu beobachten war. Für Plakoglobin ergab sich ebenfalls eine starke EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung (Abbildung 30D, oben, Spuren 2, 3), die im Gegensatz zu  $\beta$ -Catenin nach Batimastat-Vorbehandlung jedoch nicht verringert wurde (Spuren 6, 7). Auch für Plakoglobin konnten übereinstimmende Proteinnengen bestätigt werden (Abbildung 30D, unten).

Als Ergebnis dieses Experiments war festzuhalten, daß die Inhibition der LAR-Prozessierung durch Batimastat mit dem verringerten Phosphorylierungsgrad von  $\beta$ -Catenin selbst sowie einer damit kopräzipitierenden Bande bei 170 kDa einherging.



**Abb. 30: Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin nach EGF-induzierter Prozessierung von PTP-LAR in MDA-MB-468 Brustkrebszellen (Seite 100)**

Serumdeprivierte MDA-MB-468 Brustkrebszellen wurden entsprechend dem angegebenen Schema jeweils 30 min vor Ligandenzugabe mit 5 mM Batimastat behandelt. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 20 bzw. 40 min mit EGF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach der Lyse wurden die Zellysate geteilt und zu Immunpräzipitationen herangezogen. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert.

(A) EGFR wurde mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY).

(B) PTP-LAR wurde mit polyklonalem Anti-PTP-LAR-CT-Antikörper immunpräzipitiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ LAR-CT).

(C) Die Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin erfolgte mit polyklonalem Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper. Die Membran wurde anschließend zunächst mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY), nach dessen Ablösen mit monoklonalem Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper ( $\alpha\beta$ -Catenin) immundetektiert.

(D) Plakoglobin wurde mit einem monoklonalen Anti-Plakoglobin-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunoblotanalyse erfolgte zunächst ebenfalls mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses Antikörpers wurde derselbe Filter mit monoklonalem Anti-Plakoglobin-Antikörper ( $\alpha$ Plakoglobin) immundetektiert.

Die Positionen von EGFR, reifer (LAR-P) und prozessierter (LAR-PP) LAR-P-Untereinheit, von  $\beta$ -Catenin sowie Plakoglobin sind am rechten Bildrand angegeben.

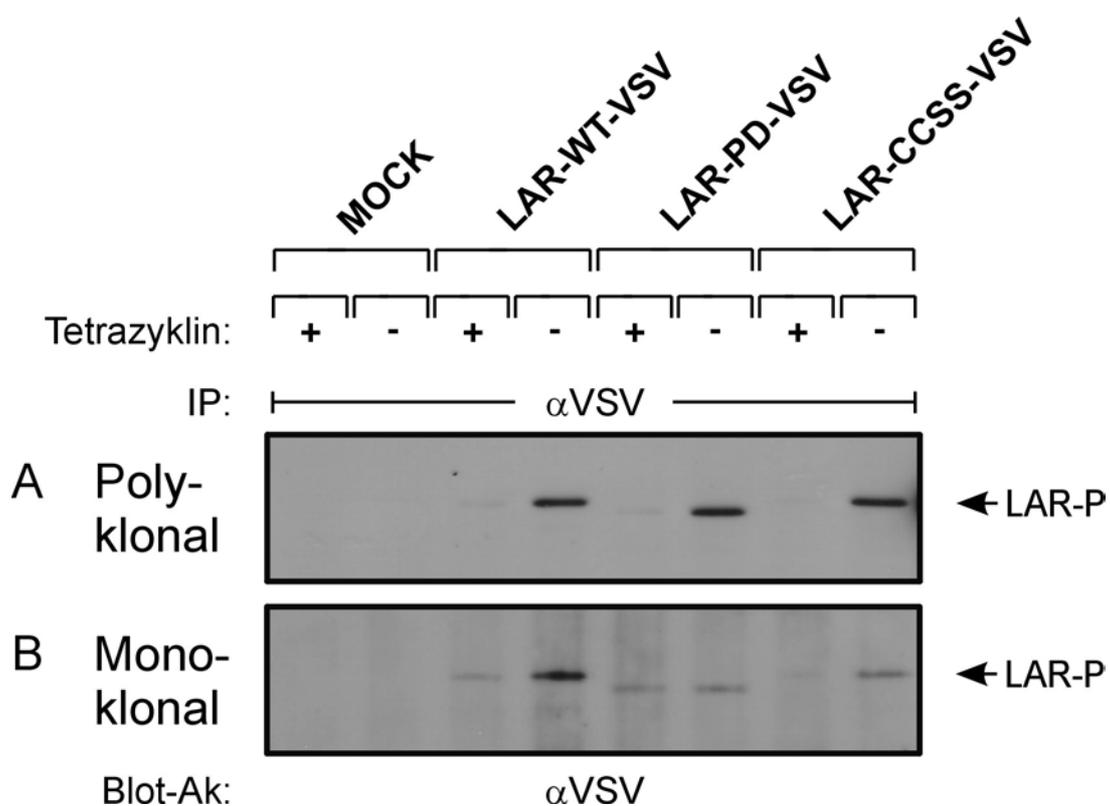
### **3.11 Biologische Relevanz von PTP-LAR im Rahmen der Zelltransformation**

Basierend auf der Tatsache, daß alle in dieser Arbeit ermittelten, die Prozessierung von PTP-LAR induzierenden Stimuli wie Überexpression und Ligandenstimulation von EGFR und HER2 auch in Zusammenhang mit Transformation beschrieben wurden, erhoben sich zwei Fragen. Zum einen, ob proteolytische Spaltung von PTP-LAR direkt mit Transformation einhergeht, und zum anderen, ob es sich in diesem Falle lediglich ein aus Transformation resultierendes oder aber um ein transformationsförderndes Phänomen handelt. Zur Klärung sollten Transformationsassays durchgeführt und hierin der Einfluß von PTP-LAR allgemein sowie der Prozessierung dieser Phosphatase auf die Transformation von NIH3T3 Fibroblasten untersucht werden.

#### **3.11.1 Generierung stabiler NIH3T3-Fibroblasten zur Tetrazyklin-induzierbaren Expression verschiedener LAR-Derivate**

Für die Tetrazyklin-induzierbare Expression entsprechender LAR-Derivate wurde in einem ersten Schritt das in Kapitel 3.1.4 beschriebene Plasmid pcDNA3-tTA-Puro stabil in NIH3T3-Fibroblasten eingebracht. Für die weitere Verwendung wurde ein den Transaktivator nach Induktion sehr schwach exprimierender Klon ohne detektierbare Basalaktivität gewählt. Als Zielgen wurden verschiedene am C-Terminus mit einem VSV-Epitop versehene LAR-Derivate in das retrovirale Expressionsplasmid SFG-t7EC3M-PHS (siehe Abschnitt 3.1.3)

einkloniert. Hierbei handelte es sich neben der Wildtyp-Form (LAR-WT-VSV) und der in beiden Phosphatasedomänen am katalytischen Cystein mutierten CC1522/1813SS-Doppelmutante (LAR-CCSS-VSV) um eine von der Wildtyp-Form abgeleitete, prozessierungsdefiziente LAR-Form (LAR-PD-VSV). In jener Mutante wurden über *in vitro*-Mutagenese im Bereich der vermeintlichen Proteaseerkennungssequenz aminoterminal der Transmembrandomäne (Serra-Pages et al., 1994) zehn Aminosäurereste substituiert, was eine Inhibition der Prozessierung zur Folge hatte. Diese drei Konstrukte sowie der Leervektor wurden über Infektion in den Transaktivator-positiven Klon eingeführt. Nach Selektion mit Hygromycin B wurde ein Teil der entstandenen Klone gepickt und vermehrt (Abbildung 31B), die übrigen Zellen wurden als polyklonale Populationen zusammengefaßt (Abbildung 31A).



**Abb. 31: Erzeugung stabiler poly- und monoklonaler NIH3T3-Populationen zur Tetrazyklin-induzierbaren Expression verschiedener LAR-Derivate**

Ein mit dem Transaktivator-Plasmid pcDNA3-tTA-Puro stabiler NIH3T3-Klon wurde mit frischem Überstand virusproduzierender Phoenix-E Zellen infiziert, die die Plasmide SFG-t7EC3M-PHS, SFG-t7EC3M-PHS-LAR-WT-VSV, SFG-t7EC3M-PHS-LAR-PD-VSV und SFG-t7EC3M-PHS-LAR-CC1522/1813SS-VSV verpackten. Nach 14-tägiger Selektion mit Hygromycin B wurde ein Teil der entstandenen Klone gepickt und vermehrt, die übrigen Zellen wurden als polyklonale Population zusammengefaßt. Zur Austestung der Expression wurden die verschiedenen Populationen für jeweils 6 Tage in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Nach der Zellyse wurden die verschiedenen LAR-Derivate mit monoklonalem Anti-VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ VSV). Abbildung (A) zeigt die Expression der verschiedenen polyklonalen Populationen. Bei den monoklonalen Linien (B) wurden je Konstrukt die beiden besten Klone vereinigt und hinsichtlich ihrer Expression getestet. Die Position der reifen LAR-P-Untereinheit (LAR-P) ist am rechten Bildrand angegeben.

Bezüglich letzterer ergab sich für die drei LAR-Derivate eine deutliche und untereinander vergleichbare Expression nach Induktion (Abbildung 31A). Allerdings war auch in Gegenwart des Antibiotikums ein jeweils schwaches Signal detektierbar, was für polyklonale Populationen nicht überraschend war. Das Verhältnis von supprimierter zu induzierter Expression war jedoch sehr vielversprechend und ließ die Generierung gut induzierbarer Klone mit geringer oder nicht detektierbarer Basalaktivität erwarten.

Überraschenderweise spiegelten die getesteten Klone jedoch nicht die in den polyklonalen Populationen beobachteten Expressionsverhältnisse wider (Abbildung 31B). Für die LAR-Wildtyp-Klone ergab sich bei detektierbarer Basalaktivität die nach Induktion insgesamt stärkste Expression des Zielgens (Spuren 3, 4). Bei vergleichbarer Basalexpression ließen sich die spaltungsdefiziente Mutante exprimierenden Klone bedeutend schwächer induzieren (Spuren 5, 6). Die geringste Grundaktivität ergab sich für die die katalytisch inaktive CCSS-Mutante exprimierenden Klone (Spur 7), Kultivierung in Tetrazyklin-freiem Medium führte hier zu einer der prozessierungsdefizienten Mutante vergleichbaren Expression (Spur 8). In den Kontrollzellen war kein Signal detektierbar (Spuren 1, 2).

### **3.11.2 Der Einfluß verschiedener LAR-Derivate auf die HER2-vermittelte Zelltransformation von NIH3T3 Fibroblasten**

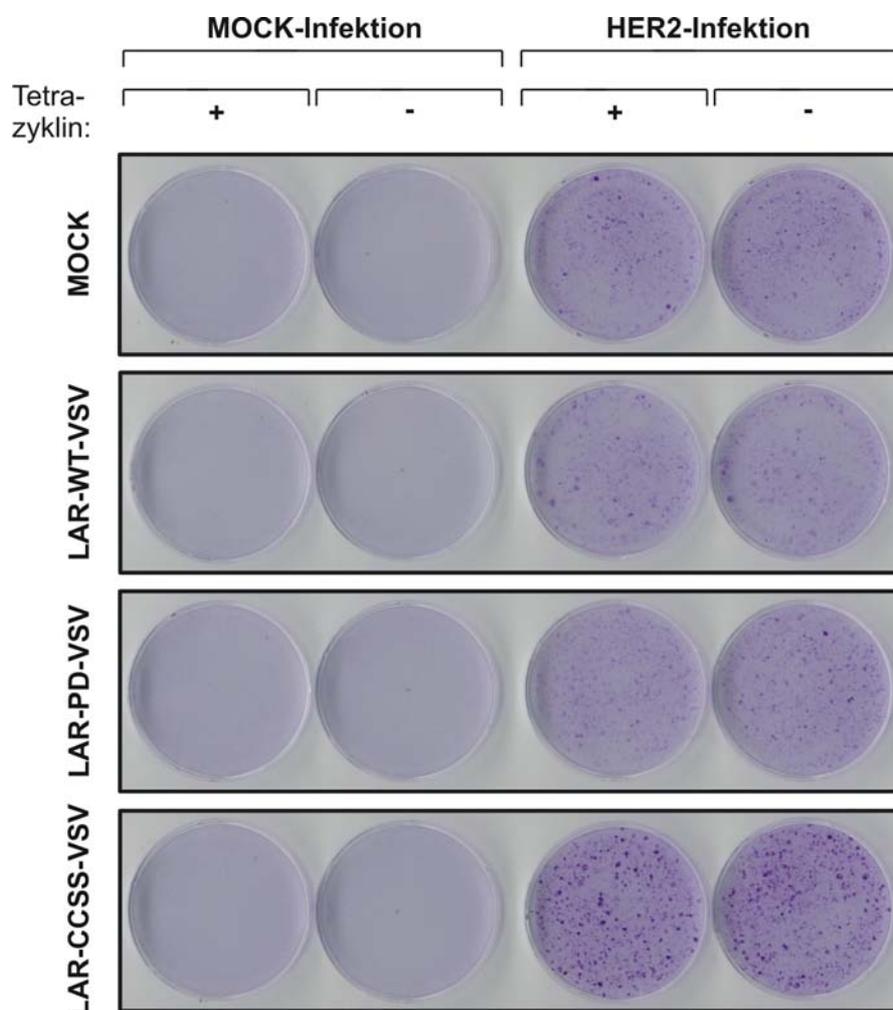
Grundlage des „Focus Formation Assays“ ist die mit Transformation verbundene Aufhebung der Kontaktinhibition infolge veränderter Zell-Zell-Adhäsion. Dem zumindest teilweise zugrundeliegend wurde eine verstärkte Phosphorylierung zellkontaktvermittelnder Proteine wie  $\beta$ -Catenin beschrieben. Vor diesem Hintergrund rückte die nach EGFR-Stimulation beobachtete Prozessierung und damit verbunden die Aktivitätsverringering von PTP-LAR verstärkt in den Fokus des Interesses, da diese zumindest in MDA-MB-468 ebenfalls mit einer erhöhten  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung einhergeht. Da auch HER2 die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin stimuliert, stark transformierend wirkt und - wie in den Kapiteln 3.4.1.2 und 3.4.2.4 gezeigt - die Prozessierung von PTP-LAR vermittelte, sollten die in Abschnitt 3.11.1 erzeugten Klone mit HER2 transformiert und zwei Fragen untersucht werden.

Erstens, ob LAR-Aktivität allgemein einen transformationsmodulierenden Einfluß hat und sich die ektopische Expression aktiver LAR-Formen negativ, die Expression katalytisch inaktiver Derivate eher positiv auf die Focusbildung auswirkt.

Zweitens, ob die prozessierungsdefiziente LAR-Mutante gegenüber der Wildtyp-Form einen unter Umständen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die durch HER2 hervorgerufene Transformation aufweist.

Um monoklonalen Effekten entgegenzutreten, wurden jeweils zwei stabile NIH3T3-tTA-SFG-MOCK-, -LAR-WT-, -LAR-PD- sowie -LAR-CCSS-Klone vereinigt und infiziert. Dabei führte die Infektion von NIH3T3-tTA-SFG-MOCK-Zellen als Positivkontrolle für

HER2-vermittelte Transformation zu einer deutlichen Focusbildung (Abbildung 32). Demgegenüber war die Kontaktinhibition in NIH3T3-tTA-SFG-LAR-WT-Klonen in geringerem Maße gestört, die Entstehung von Foci deutlich reduziert. Kein signifikant stärkerer, inhibitorischer Effekt war zunächst entgegen den Erwartungen in den NIH3T3-tTA-SFG-LAR-PD-Ansätzen zu beobachten. Die Expression dieser prozessierungsdefizienten LAR-Mutante führte im Vergleich zu LAR-Wildtyp zu einer wenn überhaupt nur geringen Abnahme der Focusbildung. Einen starken Effekt hatte hingegen die Expression der katalytisch inaktiven CCSS-Mutante in den NIH3T3-CCSS-Klonen. Hier war eine erhebliche Zunahme sowohl in der Zahl wie auch in der Größe der Foci zu beobachten. Grundsätzlich hatte die Entfernung von Tetrazyklin keinen signifikanten Einfluß auf die Focusbildung.

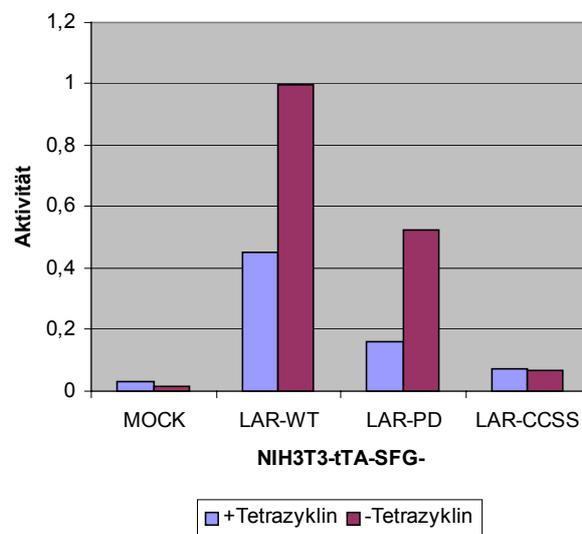


**Abb. 32: Der Einfluß verschiedener LAR-Derivate auf die HER2-vermittelte Zelltransformation in stabilen NIH3T3-Klonen**

Für den Focus Formation Assay wurden die in Kapitel 3.11.1 beschriebenen, jeweils biklonalen stabilen NIH3T3-MOCK-, -LAR-WT-VSV-, -LAR-PD-VSV- sowie -LAR-CC1522/1813SS-Populationen ausgesät und mit Überstand einer pLXSN-HER2-stabilen GPE-Verpackungszelllinie infiziert. Anschließend wurden die Zellen jeweils zur Hälfte in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden für insgesamt 12 Tage bei 37°C inkubiert, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Schließlich wurden die entstandenen Foci durch Kristallviolett färbung sichtbar gemacht.

Aus diesem Experiment ging klar hervor, daß die ektopische Expression katalytisch aktiver LAR-Formen einen inhibitorischen, die des katalytisch inaktiven Derivats einen stimulatorischen Effekt auf HER2-vermittelte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten hat.

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß die Expression der prozessierungsdefizienten LAR-Mutante gegenüber der Wildtyp-Form nicht zu der vermuteten, signifikant stärkeren Verringerung der Focusbildung führte, ergab sich aus dem Vergleich der Expressionsstärke (Abbildung 31B) und den hiermit korrelierenden Aktivitätsunterschieden beider Konstrukte (Abbildung 33). Die Phosphataseaktivität der dem Focus Formation Assay zugrundeliegenden Klone wurde hierzu wiederum im Rahmen eines pNPP-Assays untersucht.



**Abb. 33: Bestimmung der Phosphataseaktivität der dem Focus Formation Assay zugrundeliegenden NIH3T3-Klone**

NIH3T3-MOCK-, -LAR-WT-VSV-, -LAR-PD-VSV- sowie -LAR-CC1522/1813SS-Zellen wurden für 5 Tage in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Nach der Zellyse in Phosphataseinhibitor-freiem Lysepuffer wurden die Lysate in gleiche Aliquots geteilt und jeweils der Immunpräzipitation der LAR-Derivate mit monoklonalem Anti-VSV-Antikörper zugeführt. Zur Kontrolle der Expression wurden die Immunkomplexe jeweils einer Präzipitation mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ VSV; Abbildung 31B). Für die Immunkomplexe der jeweils anderen Präzipitationen wurde die *in vitro*-Phosphataseaktivität gegenüber pNPP wie unter 2.5.2 beschrieben bestimmt. Da die Reaktion sehr schwach war, wurde diese erst nach 90 min abgestoppt. Die gemessenen Werte sind in dem Balkendiagramm dargestellt.

Hierbei war ersichtlich, daß die NIH3T3-LAR-WT-Klone gegenüber den NIH3T3-LAR-PD-Zellen in Anwesenheit von Tetrazyklin eine nahezu dreifache, in Abwesenheit des Antibiotikums eine etwa doppelt so starke Phosphataseaktivität aufwiesen. Für die NIH3T3-MOCK- bzw. LAR-CCSS-Zellen war nach Entfernung des Antibiotikums erwartungsgemäß kein erhöhter Umsatz von pNPP meßbar. Aus diesen Untersuchungen ging eine deutlich unterschiedliche Phosphataseaktivität für LAR-WT- und LAR-PD-Mutante exprimierende Klone hervor, die eine unmittelbare Vergleichbarkeit und damit die Evaluierung potentieller Effekte der Prozessierung von PTP-LAR nur sehr bedingt gestatteten.

### 3.12 Untersuchung von PTP-LAR auf der Basis von mRNA-Expressionsprofilen

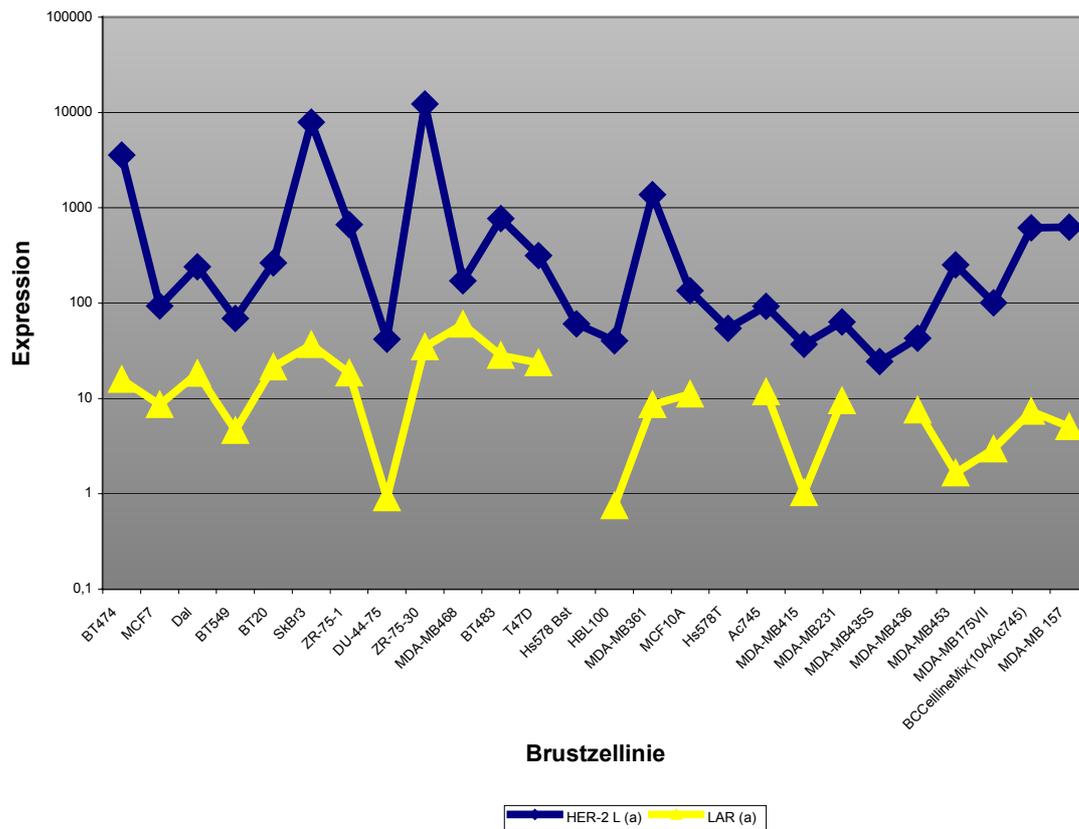
Parallel zu den auf Proteinebene in ausgewählten Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Experimenten sollte PTP-LAR auf Transkriptionsebene in möglichst vielen Brustkrebslinien mittels cDNA-Array-Analyse untersucht werden. Die Ergebnisse sollten dann, sofern dies möglich sein sollte, mit den auf Translationsebene erhobenen Daten in Korrelation gesetzt werden. Der Einsatz von cDNA-Arrays gestattet es dabei, die Expression vieler hunderter oder tausender Gene gleichzeitig zu analysieren.

Hierzu wurde zunächst eine Serie neuer Nitrozellulosemembranen mit in pBluescript klonierten Sequenzen von 663 Genen (Tyrosin-Kinasen und -Phosphatasen, Serin/Threonin-Kinasen und -Phosphatasen, Proteasen, Wachstumsfaktoren, Apoptose-assoziierte Gene u.a.) hergestellt. Um Mehrfachbestimmungen für die Expression eines Gens durchführen und damit die Zuverlässigkeit der Daten steigern zu können, wurde zu einer jeden Sonde doppelt aufgetragen, zum anderen wurden für manche Gene mehrere Sonden mit verschiedenen Sequenzen auf die Filter aufgebracht. Zu der aus 25 Brustzelllinien (22 Mammakarzinomzelllinien und 3 immortalisierte Brustepithelzelllinien) isolierten mRNA wurde die komplementäre DNA (cDNA) unter Inkorporation <sup>33</sup>P-radioaktiv markierten ATPs hergestellt und mit den hergestellten Filtern hybridisiert. Nach 48-stündiger Exposition auf Phosphoimager-Platten wurden die Arrays mit einem Phosphoimager eingelesen und die Daten digitalisiert. Die Schwärzung der Punkte auf den cDNA-Arrays wurden mit Hilfe des Programms „Array Vision“ (Raytest, Kanada) ermittelt und die Daten in Microsoft Excel exportiert.

#### 3.12.1 Erstellung von Korrelationsanalysen zu PTP-LAR

Zunächst wurde das mRNA-Expressionsprofil von PTP-LAR mit dem von EGFR und HER2 verglichen. Die eingangs erwähnte, in früheren Untersuchungen beobachtete Ähnlichkeit in der Expression von PTP-LAR und EGFR sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene konnte im Rahmen dieser cDNA-Array-Analysen leider nicht bestätigt werden. Ursache hierfür waren jedoch eindeutig technische Schwierigkeiten, da in zahlreichen Brustkrebszelllinien, deren EGFR-Expression in der Literatur beschrieben und auf Proteinebene bestätigt wurde, mit den hier verwendeten Filtern keinerlei EGFR-Hybridisierungssignal detektiert werden konnte. Bezüglich HER2 waren für die meisten der untersuchten Zelllinien hingegen gute Signale detektierbar. Das Expressionsprofil dieser Rezeptortyrosinkinase wurde dem von PTP-LAR gegenübergestellt (Abbildung 34).

Mit Ausnahme weniger Linien wie Hs578Bst, Hs578T und MDA-MB-435S ergab sich eine stark übereinstimmende Korrelation in der mRNA-Expression von PTP-LAR und HER2.

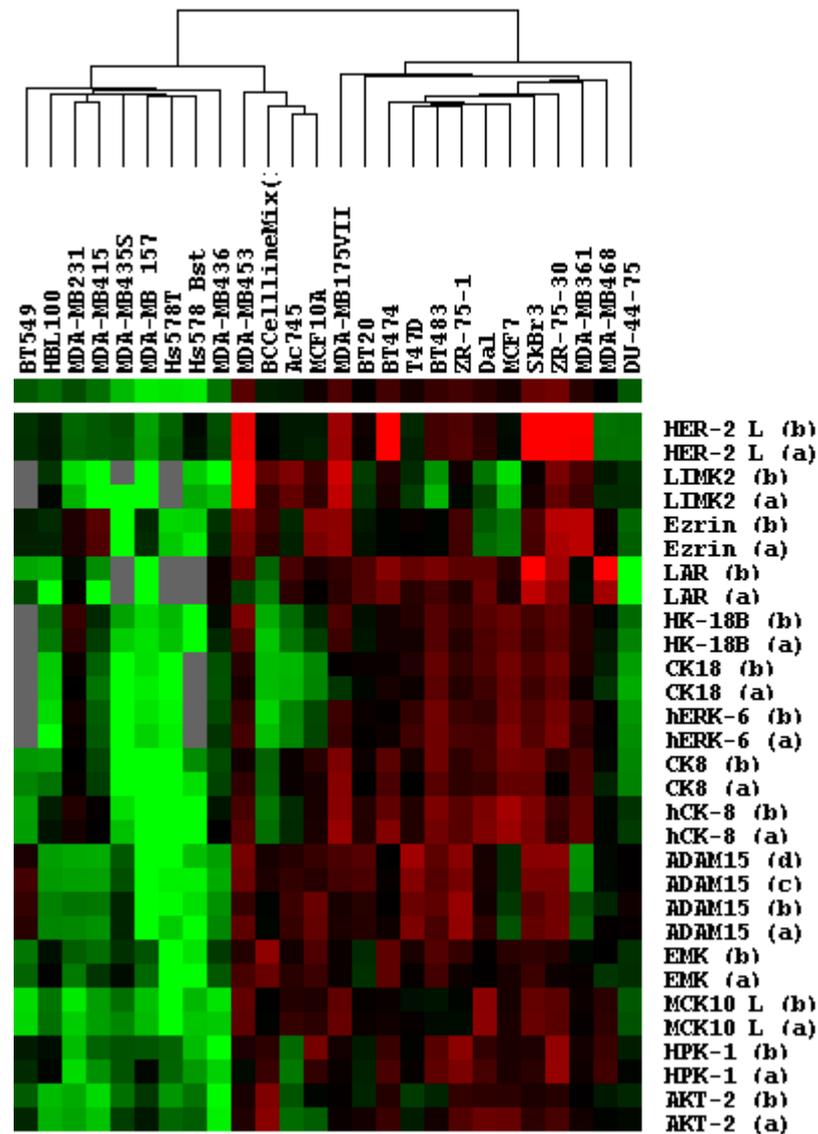


**Abb. 34: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von PTP-LAR und HER2**

Die normalisierten, für die Sondenpaare von PTP-LAR (gelb) und HER2 (blau) ermittelten Werte aus 22 Mammakarzinomzelllinien und 3 immortalisierten Brustepithelzelllinien (HBL100, MCF10A und Ac745) wurden einander gegenübergestellt. Die Auftragung erfolgte in einer logarithmischen Skalierung, um auch kleinere Werte besser sichtbar zu machen.

### 3.12.2 Gruppierung von Genen mit ähnlichem Expressionsprofil wie PTP-LAR

Parallel zu den auf Proteinebene durchgeführten Experimenten sollten als weiterer Ansatz zur Charakterisierung der Funktion und Regulation von PTP-LAR Gene identifiziert und gruppiert werden, die in ihrem mRNA-Expressionsprofil dem von PTP-LAR nahe kamen. Grundgedanke hierbei war die Annahme, daß funktionell zusammengehörige Gene unter Umständen auch auf Transkriptionsebene ähnlich reguliert werden und gemeinsame Funktion daher mit gemeinsamer mRNA-Expression korreliert. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe des Programms „Cluster“ die Expressionsprofile sämtlicher Sonden aus allen 25 Brustzelllinien durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus miteinander verglichen (Eisen et al., 1998) und über das Programm „Treeview“ als Dendrogramm dargestellt (Abbildung 35).



**Abb. 35:** Gruppierung von Genen mit einem zu PTP-LAR ähnlichen Expressionsprofil

Dargestellt ist der Ausschnitt aus einem Dendrogramm, in dem auf benachbart liegenden Zweigen die zu PTP-LAR ähnlich exprimierte Gene bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,7 angeordnet sind. Grün unterlegte Quadrate markieren dabei niedrige, rotfarbene hohe Expression. Schwarz gekennzeichnete Flächen deuten hingegen mittlere, graue Felder keine detektierbare Expression an.

Dabei wurden die Sonden mit ähnlichen Expressionsprofilen auf benachbarten Zweigen dargestellt. Der Korrelationskoeffizient des ermittelten und von den Einstellungsparametern (die Filtermöglichkeit von Genen oder die Spezifikation des mathematischen Algorithmus zum Gruppieren betreffend) unabhängigen „LAR-Clusters“ betrug dabei 0,7. Er nimmt allgemein einen Wert zwischen  $-1$  (genau entgegengesetzte Profile) und  $+1$  (identische Profile) an und beziffert so die Ähnlichkeit und damit die Zuverlässigkeit einer ermittelten Gengruppierung. Neben den Genen selbst wurden aber auch die Zelllinien auf der Basis der Ähnlichkeit ihrer Expressionsdaten gruppiert. Zellen mit geringerer Expression der dem LAR-Cluster zugehörigen Gene wurden dabei eher links, Linien mit entsprechend höherer

---

Expression eher rechts angeordnet. Somit wurden Gene gefunden, die im Rahmen der untersuchten Brustzelllinien ähnliche Expression auf Transkriptionsebene zeigten und auf der Basis dessen als funktionelle oder regulatorische Interaktionspartner für PTP-LAR in der näheren Diskussion standen. Ein hierdurch angedeuteter funktioneller Zusammenhang konnte für HER2 als ein die Prozessierung von PTP-LAR vermittelnder Faktor auf Proteinebene bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4.1.2 und 3.4.2.4).

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu Mechanismen der Regulation sowie zur Substratspezifität der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR angestellt, um die biologische Funktion dieser Phosphatase insbesondere in Zusammenhang mit Brustkrebs zu identifizieren. Hierfür wurde zunächst ein Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem modifiziert und etabliert, das bei verringerter Basalaktivität die Expression auch negativ regulatorischer Proteine wie Phosphatasen in einem breiten Zielzellspektrum erlaubte. Für PTP-LAR selbst wurde die funktionelle Korrelation zu Mitgliedern der EGFR-Familie analysiert. Dabei wurde vor allem auf die Assoziation mit und die Phosphorylierung durch den EGFR eingegangen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse der Regulation der Phosphataseaktivität von PTP-LAR durch proteolytische Prozessierung unter physiologischen Bedingungen. Die Ergebnisse zeigen eine Möglichkeit zur Regulation von PTP-LAR im Zuge der Aktivierung von HER-Familienmitgliedern auf und weisen auf eine Funktion von PTP-LAR in der Kontaktinhibition sowie der durch Cadherine vermittelten Zelladhäsion hin.

### 4.1 Modifikation des Tetrazyklin-induzierbaren Systems

Das zu Beginn dieser Arbeit verfügbare Tetrazyklin-regulierte Genexpressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) zeichnete sich durch hohe Basalaktivität, Instabilität der Klone sowie in der Restriktion auf gut transfizierbare Zelllinien aus.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Optimierung eines auf retroviralen Plasmiden basierenden Expressionssystems (Büeler und Mulligan, 1996; Lindemann et al., 1997) ermöglichte den DNA-Transfer über Infektion und gestattete damit die Etablierung dieses Systems auch in Tumorzellen, die sich in vielen Fällen durch eine sehr geringe Transfektionseffizienz auszeichneten. Die Integration der Virus-DNA in das Genom der Zielzellen hatte dabei eine erheblich erhöhte Stabilität der generierten Klone zur Folge.

Die Einführung eines Neomycin-Resistenzgens in das retrovirale Transaktivatorplasmid SFG-tcITE1-Neo (siehe 3.1.1) sowie die Einklonierung des Gens für Hygromycin-B-Phosphotransferase in das Expressionsplasmid SFG-t7EC3-MCS unter Entstehung der Derivate SFG-t7EC3M-PHS und SFG-t7EC3M-SHP (siehe 3.1.3) erlauben die Selektion infizierter Zellen und damit die effiziente Erzeugung stabiler Klone. Wie anhand der von beiden Expressionsderivaten ausgehenden Expression von PTP-H1 zu ersehen war, hatte die entgegengesetzte Orientierung von Resistenz- und Zielgen eine nur sehr schwache, die Gleichrichtung beider Gene eine erheblich stärkere Induktion des Zielgens zur Folge (siehe 3.1.3). Die Abschwächung der Expression in SFG-t7EC3M-SHP geht dabei vermutlich auf eine in der Gegenläufigkeit der Promotoren begründeten Interferenz der Transkription zurück. Denkbar wäre jedoch auch eine Antisense-Wirkung der entstehenden Transkripte und damit

eine Inhibition der Translation. Die Orientierung hatte dabei keinen Einfluß auf die Basalexpression des Zielgens in Gegenwart von Tetrazyklin, die für keines der beiden Plasmide detektierbar war. Ein Grund hierfür liegt in der Wahl des HSV-Minimal-Promotors als dem das Hygromycin-Resistenzgen kontrollierende Regulationselement. Dieses Promotorderivat verfügt über keinerlei Enhancer-Elemente, die zu einer unspezifischen Rekrutierung der RNA-Polymerase auch an den benachbarten, Transaktivator-regulierten Promotor des Zielgens führen könnten. Die transkriptionsverstärkende Wirkung auch entfernt auf demselben Plasmid lokalisierter Enhancer-Elemente wurde beispielsweise für den SV40-Promotor bereits in den Achtziger Jahren beschrieben (Wasylyk et al., 1984).

Ein weiterer und der wohl zentrale Grund für die nicht detektierbare Basalaktivität liegt in der zusätzlichen Regulation des Transaktivators, der die Transkription des Zielgens kontrolliert. Während in bisherigen Systemen die Regulation der Transaktivatoraktivität ausschließlich auf Proteinebene durch Tetrazyklin-induzierte Maskierung der DNA-Bindedomäne realisiert wurde (Gossen und Bujard, 1992, Gossen et al., 1995; Lindemann et al., 1997), wird der Transaktivator in dem hier modifizierten System zusätzlich auf Transkriptions- und damit auf Expressionsebene reguliert. Durch die Kontrolle seines eigenen Gens über den Transaktivator-abhängigen Promotor ist es im Gegensatz zu Systemen mit konstitutiver Expression möglich, die Expression des Transaktivatorproteins in Gegenwart von Tetrazyklin auf ein Niveau unterhalb der Detektionsgrenze zu reduzieren, wie dies exemplarisch anhand des MDA-MB-231- (siehe 3.1.2) oder des MCF-7-Klons (siehe 3.1.2 und 3.1.3) gezeigt wurde (analoge Daten andere Zelllinien sind nicht gezeigt). Hierdurch wird die Gesamtkopienzahl des Transaktivatorproteins und damit auch die Zahl jener Transaktivatormoleküle erheblich reduziert, die infolge des chemischen Gleichgewichtes nicht durch Tetrazyklin inhibiert werden und daher die Transkription des Zielgens initiieren können. Insgesamt resultiert dies in einer herabgesetzten Basalaktivität des Zielgens. Im Falle der in MCF-7 induzierten LAR-Expression war daher in Gegenwart und unmittelbar nach Entfernung von Tetrazyklin keinerlei Expression der Phosphatase detektierbar (siehe 3.1.3). In weiterer Übereinstimmung mit dem zusätzlichen Regulationselement setzte die Expression des Zielgens zeitgleich mit der des Transaktivatorproteins ein (siehe 3.1.3).

Die Verringerung der Basalaktivität durch Einführung des zusätzlichen Regulationselements für den Transaktivator steht auch in Einklang mit vergleichenden Untersuchungen, die generell für das Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem eine gegenüber dem herkömmlichen Tetrazyklin-regulierten System geringere Basalaktivität ergaben (No et al., 1996). Hier führt die Zugabe von Ecdyson zum Kulturmedium zur Dimerisierung der beiden Transaktivator-Untereinheiten RXR und VpEcR (Yao et al., 1992, 1993; Mangelsdorf und Evans, 1995;). Da lediglich Ecdyson-stabilisierte Dimere zur Anlagerung an spezifische DNA-Erkennungssequenzen befähigt sind, stellt die Dimerisierung per se ein zur Interaktion mit dem Steroidhormon zusätzliches Regulationsprinzip dar, das einer Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA im nicht induzierten Zustand ebenfalls entgegenwirkt.

Auch für Tetrazyklin-induzierte Genexpressionssysteme wurden in der Folgezeit Ansätze publiziert, die auf der Basis zusätzlicher Regulationsmechanismen eine verringerte Basalaktivität zur Folge haben sollten. So wurde sich die transkriptionshemmende Wirkung von Transrepressorproteinen, Chimären aus der DNA-Bindedomäne des Tet-Repressors und beispielsweise der KRAB-Repressordomäne des humanen Zinkfingerproteins Kox1 (Margolin et al., 1994; Deuschle et al., 1995), zunutze gemacht. Durch die zusätzliche Einführung eines in Abwesenheit von Doxyzyklin aktiven Transrepressorproteins (Tet-Off-System) zu einem durch Tetrazyklin aktivierten Transaktivatorderivat (Tet-On-System) konnte eine Verringerung der Basalaktivität des Zielgens erreicht werden (Freundlieb et al., 1999). Auch der Ansatz, die Expression des Transaktivatorproteins über einen Tetrazyklin-kontrollierten Rückkopplungsmechanismus zu regulieren, wurde von anderen Gruppen aufgegriffen und führte in Übereinstimmung zu dem hier entwickelten System zu einer Verringerung der Basalexpression des Zielgens (Mohammadi und Hawkins, 1998).

Die hohe Basalaktivität und die zum Teil nur geringe Induzierbarkeit der im Zuge der „Focus-Formation-Assays“ generierten Klone steht im starken Gegensatz zu den in den polyklonalen Ausgangspopulationen beobachteten Verhältnissen (siehe 3.11.1) sowie zu allen anderen Zelllinien, die unter Verwendung des modifizierten Systems erzeugt wurden. Möglicherweise sind mit der Anzucht dieser NIH-3T3-Klone einhergehende Kulturbedingungen ursächlich für die beobachteten Induktionsverhältnisse.

Mit der Klonierung des auf pcDNA3 basierenden Plasmids pcDNA3-tTA-Puro entstand ein zu SFG-tcITE1-Neo alternativ zu verwendendes Transaktivator-konstrukt, das ebenfalls dem Mechanismus der sich selbst regulierenden Expression unterliegt. Im Gegensatz zu dem retroviralen Plasmid SFG-tcITE1-Neo, in dem die Kodierungssequenzen sowohl des Transaktivators wie auch des Resistenzgens dem Transaktivator-regulierten Promotor unterstehen, werden hier beide Gene von unabhängigen Promotoren reguliert (siehe 3.1.4). Im Gegensatz zu SFG-tcITE1-Neo erlaubt dies die Selektion in Gegenwart von Tetrazyklin und damit unabhängig von der Transaktivatorexpression, die bei zu hohem Maße toxisch für die Zellen sein und zu einer Gegenselektion der entstehenden Klone führen kann (Saez et al., 1997). Aufgrund der gegenüber Puromycin vermittelten Resistenz können andere, das Gen für Neomycin-Phosphotransferase tragende Expressionsplasmide kotransfiziert und bei gleichzeitiger Etablierung des modifizierten Induktionssystems zur Erzeugung tripelstabiler Zellen herangezogen werden. Schließlich erlaubt die Generierung stabiler Transaktivator-exprimierender Zellen mit diesem Plasmid die Nutzung des gesamten Infektionspotentials für die Einführung des Zielgens über SFG-t7EC3M-PHS. Dies ist insbesondere für Zellen wie MDA-MB-231 von Vorteil, die sich mit hoher Effizienz nur einmal infizieren lassen (Johannes Bange, diese Arbeitsgruppe, persönliche Mitteilung und Daten nicht gezeigt).

Insgesamt stellen diese optimierten Vektoren Komponenten dar, die die Tetrazyklin-induzierbare Expression von Zielgenen in den meisten Fällen mit stark verminderter Basalaktivität erlauben.

## 4.2 Assoziation von PTP-LAR und EGFR

Ausgehend von bereits vorhandenen Expressionsdaten aus Northern-Blot- und Micro-Array-Analysen, die für PTP-LAR und EGFR in verschiedenen Brustkrebslinien korrelierende Daten ergaben, wurde die Assoziation beider Proteine untersucht. Damit in Einklang stehend wurde zunächst in HEK-293 Fibroblasten die Assoziation ektopischen EGFRs sowohl mit überexprimierter als auch mit endogener PTP-LAR gezeigt (siehe 3.2.1). Durch Generierung geeigneter Deletionsformen des EGFRs konnte dessen intrazellulärer Teil als die mit PTP-LAR interagierende Domäne identifiziert werden (siehe 3.2.2 und 3.2.3). So wurde bei Koexpression in HEK-293 Fibroblasten die Assoziation von PTP-LAR mit undeletierten EGFR-Formen sowie einer die Transmembran- und Intrazellulärdomäne umfassenden Mutante beobachtet, wohingegen die Interaktion mit der EGFR-CD533-Mutante nahezu undetektierbar war. Das hier außerordentlich schwache Signal war dabei sehr wahrscheinlich zurückzuführen auf die Assoziation von LAR mit Heterodimeren, die sich aus endogen in HEK-293 Fibroblasten vorhandenem EGFR und diesem EGFR-Derivat zusammensetzen. Auf jener Heterodimerisierung basiert auch die inhibitorische Wirkung der EGFR-CD533-Mutante (Kashless et al., 1991; Redemann et al., 1992). Bemerkenswert ist die über die intrazelluläre EGFR-Domäne vermittelte Assoziation mit PTP-LAR vor dem Hintergrund, daß EGFR-Mutanten mit Deletionen des Carboxyterminus oder auch nur Deletionen innerhalb der am Carboxyterminus lokalisierten TSR-Sequenz (tissue specificity region) Transformation von Fibroblasten *in vitro* bzw. die Bildung von Sarkomen *in vivo* hervorrufen (Lee et al., 1993; Carter und Kung, 1994). Ein in Folge dieser Mutationen ausbleibender, potentiell negativ regulatorischer Effekt von LAR gegenüber dem EGFR stünde in Einklang mit der Beobachtung, daß Transfektion von LAR-Antisense-Konstrukten in der Rattenhepatoma-Zelllinie McA-RH7777 zu erhöhter Tyrosinphosphorylierung verschiedener Komponenten des EGFR-Signaltransduktionsweges führt (Kulas et al., 1996). Selbstverständlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß derartige Mutationen des EGFRs auch die Assoziation mit anderen Phosphatasen, wie sie für PTP-H1 (Imyanitov et al., unpublished) oder SHP-1 (Tomic et al., 1995) diskutiert wird, unterbinden und dem EGFR somit die Negativregulation durch diese Phosphatasen entzogen wird.

Bestätigt wurde die Assoziation beider Proteine auch auf endogener Ebene in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-468 und BT-20. Hier konnte in den Immunkomplexen der Phosphatase der EGFR, nach Präzipitation der Kinase daran bindende PTP-LAR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Desweiteren konnte ebenfalls endogen in der Brustkrebslinie MDA-MB-468 eine EGF-stimulierte Modulation dieser Interaktion gezeigt werden, wobei maximale Assoziation von EGFR und immunpräzipitierter PTP-LAR mit deren maximaler Prozessierung einherging (siehe 3.8). Diese prozessierungsabhängige Assoziation soll an späterer Stelle ausführlicher und dabei vor allem im Kontext der bei Prozessierung beobachteten Aktivitätsverringern von PTP-LAR erörtert werden (siehe 4.6). Sie bekräftigt aber neben

weiteren funktionellen Korrelationen wie der anschließend diskutierten Phosphorylierung von PTP-LAR durch den EGFR die physiologische Relevanz der gefundenen Assoziation beider Proteine.

### 4.3 Tyrosinphosphorylierung von PTP-LAR

Eine prinzipielle Möglichkeit zur Regulation der Aktivität wie auch der Spezifität von Proteintyrosinphosphatasen besteht in der Phosphorylierung an Tyrosinresten (siehe 1.3.4). So führt beispielsweise die Tyrosinphosphorylierung der Transmembranphosphatase CD45 durch CSK zu einer Erhöhung der *in vitro* Aktivität sowie zur Assoziation mit deren Substrat in T-Zellen, der zur Src-Familie gehörenden Kinase Lck (Autero et al., 1994). Ebenfalls Tyrosinphosphorylierung und damit einhergehend eine Erhöhung der Phosphataseaktivität wurde für die zytoplasmatische Phosphatase SHP-1 nach Aktivierung unter anderem des Insulin- oder des Ret-Rezeptors beobachtet (Uchida et al., 1994; Hennige et al., 2001). *In vitro* Experimente mit PTP $\alpha$  deuten hingegen auf eine durch Tyrosinphosphorylierung hervorgerufene Verringerung der Aktivität hin (den Hertog et al., 1994; Su et al., 1994).

Der Nachweis der Assoziation zwischen dem EGFR und PTP-LAR ließ eine Phosphorylierung auch von LAR durch diese Rezeptortyrosinkinase vermuten. Im 293- Überexpressionssystem konnte die Phosphorylierung von PTP-LAR bei Koexpression mit EGFR-Wildtyp nachgewiesen werden. Die verglichen hiermit deutlich erhöhte Tyrosinphosphorylierung, die sich bei gleichzeitiger Expression mit der lediglich die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne umfassenden Deletionsform des EGFRs ergab, korreliert mit der stärkeren Kinaseaktivität dieser Deletionsform. Koexpression mit der im zytoplasmatischen Teil deletierten und damit inhibitorisch wirkenden CD533-Mutante (Kashless et al., 1991; Redemann et al., 1992) führte erwartungsgemäß zu keiner Phosphorylierung von PTP-LAR.

Neben den Überexpressionssystemen konnte die Phosphorylierung von PTP-LAR auch in endogenen Systemen nachgewiesen werden. So war eine Phosphorylierung der P-Untereinheit von PTP-LAR bereits nach dreiminütiger Stimulation gehungerter MDA-MB-468 und BT-20 Brustkrebszellen deutlich detektierbar (siehe 3.3.2). Die Tatsache, daß die Vorbehandlung dieser Brustkrebslinien mit dem Phosphataseinhibitor Peroxid eine erhöhte Phosphorylierung sowohl nach EGF-Stimulation, aber auch zu einer erhöhten Basalphosphorylierung von PTP-LAR in unstimulierten Zellen führt, deutet auf eine konstitutive Dephosphorylierung dieser Phosphatase hin und unterstreicht den transienten Charakter dieser Phosphorylierung. So könnte die Dephosphorylierung über einen autokatalytischen Mechanismus durch PTP-LAR selbst erfolgen, aber auch die Beteiligung anderer Phosphatasen wäre durchaus denkbar. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Phosphatasen PTP $\sigma$  und PTP $\delta$  als weitere Mitglieder der LAR-Familie, für die bereits eine Heterodimerisierung mit PTP-LAR gezeigt wurde (Wallace et al., 1998). Sensitivität der Phosphorylierung von PTP-LAR gegen-

über Tyrphostin AG1478 bekräftigt die Notwendigkeit der Aktivierung des EGFRs (siehe 3.3.3). Transaktivierung des EGFRs nach Stimulation mit Thrombin führte in den untersuchten Zelllinien hingegen zu keiner eindeutigen Phosphorylierung von PTP-LAR (Daten nicht gezeigt). Ob die EGFR-vermittelte Phosphorylierung zu einer veränderten Aktivität oder Assoziation mit Phosphotyrosin-bindenden Proteinen führt, konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Hierfür und für das Verständnis der Phosphorylierung von PTP-LAR allgemein wäre die Identifizierung und Mutierung der phosphorylierten Tyrosinreste wichtig, ist aufgrund der Vielzahl intrazellulärer Tyrosinreste jedoch sehr aufwendig. In jedem Falle bekräftigt der Nachweis der Phosphorylierung vor allem in endogenen Systemen die *in vivo*-Relevanz dieser posttranslationalen Modifikation sowie der Interaktion beider Proteine.

#### 4.4 Stimulierbare proteolytische Prozessierung von PTP-LAR

Bereits zu Beginn der Neunziger Jahre wurde PTP-LAR als eine Transmembranphosphatase beschrieben, deren Zwei-Untereinheiten-Struktur aus der Spaltung eines Vorläuferproteins durch eine Subtilisin-ähnliche Protease hervorgeht (Streuli et al., 1992; Yu et al., 1992). Zusätzlich zu dieser mit der Reifung einhergehenden Spaltung läßt sich eine zusätzliche proteolytische Prozessierung nach Stimulation verschiedener Zellen mit dem Kalziumionophor A23187 oder dem Tumorpromotor TPA hervorrufen (Streuli et al., 1992; Aicher et al., 1997). Unter Erzeugung verschiedener LAR-Mutanten konnte die der TPA-induzierten Prozessierung zugrundeliegende Schnittstelle auf die juxtamembranären Aminosäuren 1221 bis 1234 eingegrenzt werden (Serra-Pages et al., 1994). Das Ergebnis der proteolytischen Spaltung an dieser Stelle ist eine aminoterminal Verkürzung der P-Untereinheit um 14 kDa, die mit einer verstärkten Detektierbarkeit der P-Untereinheit im Zytoplasma sowie einer Freisetzung des nahezu gesamten extrazellulären Teils und der Akkumulation der E-Untereinheit im Zellüberstand einhergeht (Serra-Pages et al., 1995; Aicher et al., 1997).

Neben epidermoiden A431 und Hela Cervixkarzinomzellen (Aicher et al., 1997) konnte die TPA-induzierte Prozessierung von PTP-LAR unter anderem auch in den Brustkrebslinien MDA-MB-468 (siehe 3.4.2.1), MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, aber auch in ACHN Nierenkarzinomzellen sowie der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-8 (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. In all diesen untersuchten Zelllinien hat die durch TPA induzierte Prozessierung eine deutliche Verringerung der reifen P-Untereinheit von PTP-LAR zur Folge, wobei Stimulationsdauer und Abnahme reifer P-Untereinheit miteinander korrelieren. Bezüglich des Prozessierungsproduktes konnte gezeigt werden, daß dieses mit zunehmender Stimulationsdauer zunächst zunimmt, zu einem maximalen Maße akkumuliert und nach noch längerer Stimulationszeit in immer geringer werdendem Maße detektierbar ist (Daten nicht gezeigt). Ausmaß der proteolytischen Spaltung und Akkumulation des Spaltproduktes variieren dabei von Zelllinie zu Zelllinie.

Erste Hinweise auf Tyrosinphosphorylierung als mögliche Ursache für die Prozessierung von PTP-LAR ergaben sich aus der Abnahme der P-Untereinheit nach Orthovanadat- (siehe 3.3.2) bzw. Pervanadatbehandlung von MDA-MB-468 (siehe 3.9) und verschiedenen anderen Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Dabei könnte die bereits diskutierte Phosphorylierung von PTP-LAR selbst zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Protease führen, denkbar wäre jedoch auch eine durch Tyrosinphosphorylierung vermittelte direkte oder indirekte Aktivierung der zugrundeliegenden Protease. Mit diesen Beobachtungen in Einklang stehend wurde Pervanadat als prozessierungsinduzierender Stimulus auch für verschiedene andere Transmembranproteine beschrieben. So hat die Inkubation mit diesem Tyrosinphosphatase-inhibitor die Abspaltung der extrazellulären Domäne von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie HER2 (Codony-Servat et al., 1999) oder HER4 (Vecchi et al., 1996), aber auch die Prozessierung von Wachstumsfaktor-Vorläuferproteinen wie dem TGF $\alpha$ -Proprotein (Harano und Mizuno, 1994) oder Pro-Amphiregulin (Vecchi et al., 1996) zur Folge. Auch die proteolytische Umsetzung von Syndecan-1 (Reiland et al., 1996) sowie von  $\beta$ APP (Slack et al., 1995) wurde nach Pervanadatbehandlung beobachtet. Im Falle von HER2 konnte die Pervanadat-induzierte Prozessierung durch BB-94 inhibiert werden, ein Hinweis darauf, daß es sich bei der HER2-Spaltung um einen Metalloprotease-vermittelten Prozeß handelt.

Die Bedeutung der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen und der von ihnen vermittelten Tyrosinphosphorylierung für die Prozessierung von PTP-LAR zeichnete sich erstmals in den Koexpressionsexperimenten in HEK-293 ab. Hier führte die Expression katalytisch aktiver EGFR-Formen, nicht aber der dominant negativ wirkenden CD533-Deletionsform, sowohl zu Phosphorylierung (siehe 3.3.1, Daten nicht gezeigt) als auch zu einer Abnahme der LAR-P-Untereinheit (siehe 3.2.3). Bekräftigt wird der Zusammenhang zwischen Aktivität des EGFRs und dem Ausmaß der LAR-Prozessierung dabei zusätzlich durch die Beobachtung, daß die Koexpression der in der extrazellulären Domäne deletierten EGFR-INTRA-Form, für die verglichen mit der Wildtyp-Form sowohl eine höhere Aktivität als auch ein stärkeres Transformationspotential beschrieben wurde, auch mit einer verstärkten Reduzierung der P-Untereinheit einhergeht (siehe 3.2.3).

Die Überexpression des EGFRs sowie die Amplifikation des zugrundeliegenden Gens wird in zahlreichen Tumoren beobachtet (Ullrich et al., 1984; Gullick, 1991; Prigent und Lemoine, 1992; Gusterson, 1992). In *in vitro* Transformations-Assays wie Focus-Formation- oder Soft-Agar-Assay zeigt sich diesbezüglich eine direkte Korrelation zwischen Expressions- und Transformationsgrad (Velu et al., 1987). Diese in HEK-293 durch Transfektion aufsteigender Plasmidmengen nachgestellte Situation ließ eine Korrelation auch zwischen der Expression des EGFRs und der Prozessierung der LAR-P-Untereinheit erkennen (siehe 3.4.1.1).

Die Amplifikation und/oder Überexpression von HER2 wird unter anderem bei Ovarialkrebs und etwa dreißig Prozent aller Brustkrebserkrankungen beobachtet und ist mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden (Slamon et al., 1987, 1989). HER2 verfügt verglichen mit dem EGFR über ein weitaus stärkeres Transformationspotential. In

Übereinstimmung hiermit konnte bei Expression aufsteigender, dem EGFR entsprechenden Mengen an HER2 auch eine gegenüber dem EGFR deutlich stärkere Prozessierung der LAR-P-Untereinheit beobachtet werden (siehe 3.4.1.2). Dies äußerte sich bei vergleichbarer Expression beider Rezeptoren in einer bedeutend stärkeren Abnahme unprozessierter P-Untereinheit, die von einer entsprechend stärkeren Zunahme des Prozessierungsproduktes begleitet wurde. Daß die Abnahme der reifen P-Untereinheit nicht auf Austitrierung endogener RNA-Polymerase II infolge zunehmender Koexpression der Rezeptortyrosinkinase und damit auf ein Überexpressionsartefakt zurückzuführen ist, zeigt sich anhand des unreifen LAR-Vorläuferproteins, das unabhängig von der Konzentration kotransfizierten RTK-Plasmids in immer gleichem Maße exprimiert wurde. Auch die Zunahme des Prozessierungsproduktes in einem der Abnahme der reifen P-Untereinheit entsprechenden Maße belegt dessen Abnahme infolge Prozessierung und nicht als Folge eines Überexpressionsartefakts.

Die physiologische Relevanz der von EGFR oder HER2 vermittelten LAR-Prozessierung wurde durch ligandeninduzierte Spaltung bestätigt. So konnte die Prozessierung von PTP-LAR durch Aktivierung von HER2 nicht nur infolge dessen Überexpression, sondern auch infolge Stimulation mit dem dafür spezifischen Liganden  $\beta$ -Heregulin ( $\beta$ -HRG) gezeigt werden. Am stärksten wurde dies in der HER2 stabil exprimierenden MCF-7-Mammakarzinomzelllinie beobachtet (siehe 3.4.2.4). Stimulation dieser Linie mit  $\beta$ -HRG hat ein näherungsweise gleichstarkes Prozessierungsmaß wie nach Behandlung mit dem starken Tumorpromotor TPA zur Folge.

Bemerkenswert ist in dieser Zelllinie das Auftreten einer Doppelbande sowohl auf der Höhe der reifen P-Untereinheit als auch auf der des Prozessierungsproduktes. Dabei trat die ligandeninduzierte Abnahme der geringfügig unterhalb der reifen LAR-P-Untereinheit laufenden Bande deutlicher hervor als für die LAR-P-Untereinheit selbst, erreichte aber insbesondere nach längeren Inkubationszeiten nicht die durch TPA hervorgerufene Verringerung (siehe 3.4.2.4). Eine genaue Identifizierung dieser zusätzlichen Bande war mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht möglich. Allerdings könnte es sich bei diesem Protein um die Phosphatase  $PTP\sigma$ , einem weiteren Vertreter der LAR-Phosphatasefamilie, handeln. Für diese Vermutung gibt es verschiedene Hinweise. Zum ersten wäre die Akkumulation von  $PTP\sigma$  mit der Immunpräzipitation durch den eingesetzten Antikörper erklärbar, da das von diesem Antikörper erkannte Epitop aufgrund der identischen carboxyterminalen Aminosäuresequenz von PTP-LAR und  $PTP\sigma$  in beiden Proteinen vorliegt und damit zur Präzipitation beider Phosphatasen führt. Ferner entspricht die Größe reifer  $PTP\sigma$ -P-Untereinheit mit angegebenen 80 kDa genau der des hier beobachteten Proteins. Das insbesondere nach vierzigminütiger  $\beta$ -HRG-Stimulation knapp oberhalb des LAR-Spaltproduktes auftretende Fragment stimmt hinsichtlich der Größe mit dem Prozessierungsprodukt ebenfalls von  $PTP\sigma$  überein, das nach TPA-Stimulation mit 72 kDa beschrieben und analog zu LAR auf Prozessierung unmittelbar N-terminal der Transmembransequenz zurückzuführen ist (Serra-Pages et al., 1994; Aicher et al., 1997). Weiterhin hat in völliger

Übereinstimmung mit publizierten Daten (Aicher et al., 1997) die Behandlung mit TPA eine durch Serin-/Threoninphosphorylierung hervorgerufene Mobilitätsverringering zwar der PTP-LAR-, nicht aber der vermeintlichen PTP $\sigma$ -Bande zur Folge (siehe 3.4.2.4). Im Falle von PTP $\sigma$  als der diskutierten Bande würde  $\beta$ -Heregulin-vermittelte Stimulation von Zellen einen Stimulus für die Prozessierung nicht nur von PTP-LAR, sondern auch für andere Vertreter dieser Phosphatasefamilie darstellen und damit einen unter Umständen übergeordneten Mechanismus für die Regulation verschiedener Phosphatasen implizieren.

Die Korrelation zwischen dem Transformationspotential überexprimierter HER-Familienmitglieder und der Prozessierung von PTP-LAR wurde oben bereits diskutiert. Vor diesem Hintergrund und der Beobachtung, daß mit HER2 transformierte NIH3T3-Zellen nach Superinfektion mit einem  $\alpha$ -HRG-exprimierenden Retrovirus eine nochmals stärkere Kolonienbildung im Soft-Agar-Assay aufweisen (Wallasch et al., 1995), kommt der  $\beta$ -HRG-induzierten LAR-Proteolyse verstärkte Bedeutung zu. Die gewonnenen Ergebnisse erlauben in diesem Zusammenhang nämlich die Vermutung, daß der durch die Sekundärinfektion nochmals erhöhte Transformationsgrad mit einer nochmaligen Verstärkung der Prozessierung endogener PTP-LAR einhergeht, eventuell sogar teilweise darauf zurückzuführen ist.

Der hier auf Proteinebene gezeigte funktionelle Zusammenhang zwischen PTP-LAR und der die Prozessierung von PTP-LAR vermittelnden Rezeptortyrosinkinase HER2 ließ sich im Rahmen von DNA-Micro-Arrays und daraus abgeleiteten „Clusteranalysen“ auch auf Transkriptionsebene bestätigen. Hier wurden bei der Analyse von 24 Brustzelllinien vergleichbare Expressionsprofile bezüglich der mRNA beider Gene gefunden (siehe 3.12.2).

In Analogie zu HER2 und  $\beta$ -Heregulin konnte auch EGF als physiologischer Stimulus für die Prozessierung von PTP-LAR nachgewiesen werden. So führte die Behandlung verschiedenster Tumorzelllinien wie MCF-7, SK-OV-8 oder ACHN mit EGF zur Prozessierung von PTP-LAR in zwar unterschiedlich starkem, aber deutlich detektierbarem Maße (Daten nicht gezeigt). Am stärksten war die durch Zugabe von EGF herbeigeführte Prozessierung in der Brustkrebslinie MDA-MB-468 zu sehen (siehe 3.4.2.1). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Zelllinien erreichte hier die EGF-vermittelte proteolytische Spaltung den durch TPA-Behandlung hervorgerufenen Prozessierungsgrad. Der der EGF-vermittelten Prozessierung von PTP-LAR zugrundeliegende Signaltransduktionsweg wird an späterer Stelle genauer diskutiert. Als physiologischen Hintergrund zu der hier beobachteten LAR-Prozessierung infolge ligandenvermittelter Aktivierung des EGFRs sei auf die in vielen Tumoren beobachtete erhöhte Expression verschiedenster Wachstumsfaktoren hingewiesen (Nister et al., 1988; Carter und Kung, 1994), die in Form autokriner Loops auf den Tumor zurückwirken und dort die Aktivierung entsprechender Rezeptoren stimulieren. *In vitro* hat die Koexpression von EGF oder TGF $\alpha$  einen potenzierenden Effekt auf die EGFR-vermittelte Transformation von NIH3T3 (Velu et al., 1987; Riedel et al., 1988), bezüglich TGF $\alpha$  transgene Mäuse zeigen spontane Entwicklung von Brustkarzinomen sowie Lungen- und Hauttumoren (Jhappan et al., 1990; Matsui et al., 1990; Vassar, 1992; Sandgren et al., 1993; Dominey et al., 1993).

Neben der Aktivierung des EGFRs durch dafür spezifische Liganden führt auch die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren über den als Transaktivierung (Daub et al., 1996) bezeichneten Signaltransduktionsweg zur Prozessierung von PTP-LAR. So läßt sich in M1-Rezeptor exprimierenden Cos-7-Zellen die Prozessierung koexprimierter PTP-LAR durch Stimulation mit dem Liganden Carbachol (siehe 3.4.2.3), in Endothelin-Rezeptor rekonstituierten HEK-293 Fibroblasten durch Endothelin stimulieren (siehe 3.4.2.2). Die Prozessierung von PTP-LAR stellt somit ein Ergebnis der Aktivierung verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und damit möglicherweise ein Ergebnis der Transaktivierung im allgemeinen dar.

Auffällig für die in dieser Arbeit identifizierten Stimuli für die Prozessierung von PTP-LAR ist, daß es sich hierbei grundsätzlich um Aktivierungsereignisse bekannter Onkogene handelt, die mit der Entstehung zahlreicher Tumore *in vivo* und der Transformation von Fibroblasten *in vitro* in Verbindung gebracht werden. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen erhebt sich die Hypothese, daß die Prozessierung von PTP-LAR ein an der Transformation von Fibroblasten beteiligtes und diese begünstigendes Phänomen darstellt. Alternativ hierzu muß die proteolytische Spaltung der Phosphatase als ein lediglich aus der Stimulation oder der Transformation resultierendes Ereignis bedacht werden. Die Diskussion dieser Frage soll an späterer Stelle wieder aufgenommen werden.

#### 4.5 Mechanismus der Prozessierung von PTP-LAR

Die ligandeninduzierte Prozessierung von PTP-LAR ließ sich unter endogenen Bedingungen sehr gut in der Brustkrebslinie MDA-MB-468 zeigen. Hier führte die Stimulation der Zellen mit EGF zur proteolytischen Spaltung von PTP-LAR in einem zu TPA-Behandlung vergleichbaren Maß (siehe 3.4.2.1). Die Untersuchung der Prozessierung in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer machte den temporären und reversiblen Charakter dieser Spaltung deutlich. Maximale Verringerung der reifen P-Untereinheit bei gleichzeitig größter Akkumulation des Prozessierungsproduktes stellte sich vierzig Minuten nach EGF-Zugabe ein, mit zunehmender Stimulationsdauer war das Spaltprodukt in zunehmend geringerem Maße detektierbar und erreichte schließlich nach drei Stunden näherungsweise wieder das Maß unstimulierter Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Notwendigkeit aktiven EGFRs für die Prozessierung von PTP-LAR nach EGF-Stimulation wurde durch entsprechende Inhibitorstudien bestätigt. Erwartungsgemäß hatte die Vorbehandlung von MDA-MB-468 mit dem Tyrphostin AG1478 die Unterdrückung EGF-vermittelter Aktivierung des EGFRs und damit einhergehend die Inhibition der Prozessierung von PTP-LAR zur Folge (siehe 3.5.1).

Der klassischste Signaltransduktionsweg, der durch RTKs und auch dem EGFR vermittelt wird, führt über Rekrutierung von Ras an die Zellmembran und anschließender Stimulation

der Serin-/Threoninkinasen Raf und MEK zur Aktivierung der MAP-Kinasen. Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 ist ein zentraler Mechanismus zur Regulation verschiedenster zellbiologischer Prozesse wie Transkription, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose, steht aber auch in Zusammenhang mit pathophysiologischen Phänomenen wie Transformation oder Antiapoptose in Tumorzellen.

Die Aktivierung von Erk1 und Erk2 konnte als essentielles Ereignis auch in der zur Prozessierung von PTP-LAR führenden Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, daß die Vorbehandlung von MDA-MB-468 mit dem MEK-spezifischen Inhibitor PD98059 zu einer nahezu vollständigen Inhibition der durch EGF stimulierten Prozessierung von PTP-LAR führt (3.5.2.1). Die unvollständige Inhibition der proteolytischen Spaltung geht dabei mit einer auch nur teilweisen Inaktivierung von Erk1 und Erk2 einher, was die direkte Korrelation zwischen Erk1/Erk2-Aktivierung und LAR-Prozessierung unterstreicht. Die Spezifität dieses Inhibitors wird zum einen durch die in Gegenwart von PD98059 völlig unveränderte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, aber auch in der uneingeschränkten Aktivierung der MAPK p38 deutlich. Somit hat im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, die p38 für den basalen Prozessierungslevel von TGF $\alpha$  in Abwesenheit von Wachstumsfaktor-Stimuli verantwortlich machen (Fan und Derynck, 1999), die EGF-stimulierte Aktivierung von p38 zumindest in MDA-MB-468 keinen Einfluß auf die Prozessierung von PTP-LAR (siehe 3.5.2.1). Völlig identische Beobachtungen wurden unter Verwendung des ebenfalls für MEK spezifischen Inhibitors U0120 erzielt und bestätigen die mit PD98059 beobachteten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Bekräftigt wird die Involvierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 im Rahmen der LAR-Prozessierung durch den Nachweis ihrer Beteiligung auch im „Ectodomain-Shedding“ anderer Transmembranproteine. So kann auch die PMA-induzierte Prozessierung von HB-EGF durch PD98059 inhibiert werden (Gehtmann et al., 1999). Desweiteren ist die FGF- bzw. PDGF-stimulierte proteolytische Spaltung von TGF $\alpha$  ebenso von der Aktivierung der Erks abhängig wie die durch dieselben Liganden vermittelte Prozessierung von L-Selektin oder TNF $\alpha$  (Fan und Derynck, 1999). Auch für die nach Stimulation des EGFRs beobachtete Prozessierung der HGF-Rezeptortyrosinkinase Met ist die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 entscheidend (Nath et al., 2000).

Trotz des inzwischen näherungsweise zehnjährigen Wissens um die Prozessierung von LAR-Familienmitgliedern (Streuli et al., 1992) gab es hinsichtlich der Identität der zugrundeliegenden Protease keinerlei Hinweise. In dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis der Metalloproteasen als die für die Spaltung von PTP-LAR verantwortliche Gruppe von Proteinasen geführt werden. Die Vorbehandlung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 mit dem für diese Gruppe von Proteasen spezifischen Inhibitor Batimastat hatte die vollständige Blockierung der durch EGFR-Stimulation hervorgerufenen LAR-Prozessierung zur Folge (siehe 3.5.3). Sehr deutlich ist zu sehen, daß in Gegenwart des Inhibitors die mit zunehmender Stimulationsdauer einhergehende Abnahme der reifen P-Untereinheit wie auch die

Akkumulation des Prozessierungsproduktes ausbleibt. Der Aktivierungszustand des EGFRs selbst bleibt vom Inhibitor unbeeinflusst. Die Aktivierung einer Metalloprotease nach Stimulation von Erk1/Erk2-Aktivität wurde auch für die PMA-induzierte Spaltung von HB-EGF (Gechtman et al., 1999) sowie für die EGFR-vermittelte Prozessierung der Met-Rezeptortyrosinkinase (Nath et al., 2000) beschrieben und scheint einen allgemeinen, die Prozessierung bestimmter Transmembranproteine regulierenden Signalweg darzustellen. Dies läßt sich aufgrund übereinstimmender Beobachtungen bezüglich der Prozessierung verschiedener Proteine vermuten. Wie gezeigt, wird die Prozessierung von PTP-LAR analog zu TNF $\alpha$  oder L-Selektin durch Ligandenstimulation von Rezeptortyrosinkinasen eingeleitet, erfordert die Aktivierung der beiden MAP-Kinasen Erk1/Erk2 und wird durch Mitglieder der Familie der Metalloproteasen vermittelt. Ferner konnte die Inhibierbarkeit der proteolytischen Spaltung von TNF $\alpha$  und L-Selektin in Gegenwart von TIMP-3 (Borland et al., 1999), nicht aber durch andere natürlicherweise vorkommende Inhibitoren von Metalloproteinasen wie TIMP-1 (Preece et al., 1996) oder TIMP-2 (Borland et al., 1999) gezeigt werden. Erstgenannter Inhibitor von Metalloproteinasen, nicht aber TIMP-1, -2 oder -4, konnte *in vitro* als Inhibitor für aufgereinigte ADAM-17/TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) nachgewiesen werden. Die Gegenüberstellung dieser verschiedenen Beobachtungen ließ somit ADAM-17 als diejenige Protease vermuten, die die proteolytische Spaltung auch von L-Selektin und PTP-LAR katalysiert.

Der Beweis hierfür konnte unter Zuhilfenahme zweier Fibroblastenlinien erbracht werden, die ausgehend von einer bezüglich des ADAM-17-Gens deletierten „Knock-out“-Maus bzw. von einer entsprechenden Wildtyp-Maus etabliert wurden (Peschon et al., 1998). Stimulation mit TPA vermochte in Wildtyp-Fibroblasten bei verschiedenen Zelldichten die Prozessierung und die damit einhergehende Abnahme der reifen P-Untereinheit zu induzieren, wohingegen in TACE-freiem Hintergrund keinerlei Verringerung induziert werden konnte (siehe 3.6). Die Zelldichte der TACE-„Knock-out“-Fibroblasten war zum Zeitpunkt der Stimulation der mit höchster Zellzahl ausgesäten Wildtyp-Fibroblasten vergleichbar, weshalb Unterschiede bezüglich der Prozessierung aufgrund unterschiedlicher Zelldichte auszuschließen sind. Die Aktivität von TPA in Wildtyp- wie auch in „Knock-out“-Zellen wird durch das infolge Serin-/Threoninphosphorylierung verringerte Laufverhalten von PTP-LAR bestätigt, welches nach TPA-Stimulation in beiden Zelllinien zu beobachten war (siehe 3.6).

Bestärkt wird die Identifizierung von ADAM-17 als die PTP-LAR prozessierende Protease durch die Assoziation beider Proteine bei Kotransfektion in HEK-293 Fibroblasten, die ebenfalls von einer geringfügigen Prozessierung der Phosphatase begleitet wird (siehe 3.7.1). Die Spezifität dieser Interaktion wird durch die unterschiedlich starke Assoziation von TACE mit verschiedenen LAR-Derivaten bekräftigt (siehe 3.7.2). Hierbei ergab sich nach Substitution des katalytisch essentiellen Cysteins im aktiven Zentrum der membranproximalen PTP-Domäne I eine verglichen mit LAR-Wildtyp verringerte Assoziation von LAR-C1522S mit ADAM-17, während LAR-C1813S mit dem Austausch der entsprechenden

Aminosäure in der membrandistalen PTP-Domäne II eine verstärkte Interaktion mit TACE zur Folge hatte. Dies führt zu der Vermutung, daß die zweite Phosphatasedomäne im Laufe der Evolution die katalytische Funktion weitgehend verloren und die einer spezifischen Bindungsdomäne angenommen hat. Entsprechend der hier vorliegenden Daten scheint sie die Wechselwirkung mit der PTP-LAR prozessierenden Metalloprotease ADAM-17 als direkte Enzym-Substrat-Wechselwirkung zu vermitteln. Eine Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelnde und damit regulatorische Funktion wird ferner durch Beobachtungen untermauert, denen zufolge die membrandistale LAR-Phosphatasedomäne für die Assoziation der Phosphatase mit phosphoryliertem Insulin-Rezeptor entscheidend ist (Tsujikawa et al., 2001). In *in vitro*-Bindungsassays mit entsprechenden LAR-GST-Fusionsproteinen ließ sich die generelle Assoziation beider Proteine, nicht aber die von TACE und dem LAR-C1813S-Derivat, bestätigen (siehe 3.7.3).

#### 4.6 Konsequenzen der LAR-Prozessierung

Der Begriff „Ectodomain-Shedding“ umschreibt einen Prozeß, in dem die extrazelluläre Domäne von Transmembranproteinen infolge proteolytischer Spaltung von der Zelloberfläche freigesetzt wird (Bosenberg und Massague, 1993; Blobel, 1997; Werb und Yan, 1998). Neben Zytokinen (Yee et al., 1993; Black et al., 1997; Moss et al., 1997), deren Rezeptoren (Madge et al., 1999), Zelladhäsionsproteinen und zahlreichen anderen Proteinen sind auch verschiedene Wachstumsfaktor-Vorläufer diesem Prozeß unterworfen. Spaltung dieser Vorläufer-Formen führt zur Freisetzung reifer, biologisch aktiver Wachstumsfaktoren, die über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus die Aktivierung dafür spezifischer Rezeptoren stimulieren können. Dieses aktivierende Prinzip ist die Grundlage der Transaktivierung (Daub et al., 1996, 1997), in der nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und noch nicht identifizierter Proteasen die proteolytische Spaltung von HB-EGF (Prenzel et al., 1999) oder Amphiregulin (Andreas Gschwind, diese Arbeitsgruppe, persönliche Mitteilung) zur Aktivierung des EGFRs und der sich daran anschließenden Signalkaskaden führt.

Zur Erklärung der physiologischen Bedeutung der Prozessierung und der damit verbundenen Internalisierung der P-Untereinheit sind prinzipiell drei Modelle vorstellbar. Zum einen wäre denkbar, daß die Prozessierung der P-Untereinheit zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Aktivierung oder zumindest einer Aktivitätssteigerung führt. Unter Annahme einer unveränderten Aktivität könnte eine aus der Spaltung resultierende Lokalisationsänderung eine Zusammenführung zuvor räumlich getrennter Phosphatase und Substrat zur Folge haben, was ebenfalls ein aktivierendes Prinzip darstellen würde. Als drittes Modell wäre eine aus der Prozessierung resultierende Inaktivierung der Phosphatase möglich. Hierbei könnte eine mit der proteolytischen Spaltung einhergehende Konformations- und/oder

Lokalisationsänderung die Degradation der Phosphatase einleiten oder aber zur Desensibilisierung gegenüber einem die Phosphatase aktivierenden Liganden, wie dem Laminin-Nidogen-Komplex (O'Grady et al., 1998), führen. Dessen Interaktion mit membranständiger Phosphatase würde dabei durch prozessierte und infolgedessen freigesetzte E-Untereinheit kompetiert werden, was eine Negativregulation der Phosphataseaktivität und damit die temporäre Phosphorylierung des Substrats zur Folge hätte.

Bestärkt wird die Hypothese einer durch Prozessierung hervorgerufenen Aktivitätsverringerung durch Untersuchungen der *in vitro*-Phosphataseaktivität immunpräzipitierter PTP-LAR gegenüber pNPP als Substrat. Hierbei konnte nach Stimulation sowohl mit EGF als auch mit TPA eine mit der Prozessierung und damit mit der Abnahme reifer P-Untereinheit korrelierende Verminderung der katalytischen Aktivität reproduzierbar gezeigt werden (siehe 3.9). So hatte der physiologische Stimulus EGF bei geringerer Verringerung reifer P-Untereinheit eine etwa 20%ige Abnahme der katalytischen Aktivität zur Folge, Behandlung mit TPA führte nach vergleichsweise stärkerer Prozessierung zu einer entsprechend höheren Verringerung der Phosphataseaktivität. Die nach Prozessierung beobachtete zytoplasmatische Lokalisation der P-Untereinheit wäre in diesem Modell auf endosomale oder proteasomale Degradation der Phosphatase zurückzuführen. Sie würde auch erklären, weshalb das Prozessierungsprodukt in nur begrenzten Umfang akkumulieren kann und nach gewisser Stimulationszeit kaum mehr detektierbar ist. Der endosomale oder proteasomale Abbau muß jedoch noch unter Verwendung entsprechender Inhibitoren bestätigt werden.

Die Inhibition der negativ regulatorischen Phosphatase LAR infolge Prozessierung stünde dabei in synergistischem Einklang mit der ebenfalls über proteolytische Spaltung herbeigeführten Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise  $TGF\alpha$ . Die Tatsache, daß beiden Ereignissen mit der Aktivierung des EGFRs, der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 sowie der Metalloprotease ADAM-17 derselbe Signalweg zugrunde liegt, deutet auf einen übergeordneten, auf Prozessierung basierenden Mechanismus zur synergistischen Regulation funktionell zusammengehöriger Stimulationseignisse und Signalkaskaden hin.

Die Prozessierung von PTP-LAR hat neben der eben beschriebenen Aktivitätsverringerung auch eine Auswirkung auf die bereits diskutierte Assoziation von LAR mit dem EGFR. So konnte auf endogener Ebene in der Brustkrebslinie MDA-MB-468 eine EGF-stimulierte Modulation dieser Interaktion gezeigt werden, wobei maximale Assoziation von Rezeptor-tyrosinkinase und immunpräzipitierter PTP-LAR mit deren maximaler Prozessierung einhergeht. Inhibition der Prozessierung durch Vorbehandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 hatte die Verhinderung dieser EGF-induzierten Assoziation zur Folge (siehe 3.8). Auch die Vorbehandlung mit dem Metalloproteinase-Inhibitor Batimastat führte zur Inhibition sowohl der Prozessierung als auch der damit einhergehenden, verstärkten Assoziation von LAR und EGFR (Daten nicht gezeigt).

Die beobachtete Aktivitätsverringerung von PTP-LAR, die nach Prozessierung und gleichzeitig verstärkter Assoziation mit dem EGFR beobachtet wurde, wird durch ebenfalls

hiermit korrelierende Phosphorylierungszunahme von  $\beta$ -Catenin sowie daran gebundenem EGFR untermauert. Starke Tyrosinphosphorylierung der Armadillo-Catenine  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin ließ sich zunächst nach Stimulation mit EGF ebenfalls in der Brustkrebslinie MDA-MB-468 detektieren (siehe 3.10). EGF-induzierte Phosphorylierung dieser mit der zytoplasmatischen Domäne von Cadherin direkt assoziierenden Proteine (Ozawa et al., 1989; Hinck et al., 1994) wurde nach Vorbehandlung mit Orthovanadat auch in anderen Zelllinien wie der Blasenkarzinomzelllinie NBTII beschrieben (Müller et al., 1999) und steht in Einklang mit der aus der Literatur bekannten Assoziation des EGFRs mit Cadherin-Catenin-Komplexen (Hoschoetzky et al., 1994). Auch die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit und die Phosphorylierung durch HER2 wurde in der Literatur gezeigt (Ochiai et al., 1994; Shibata et al., 1996). Inhibition der Prozessierung von PTP-LAR durch Batimastat ging mit einer Verringerung der EGF-stimulierten Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin einher, wobei sich eine Abnahme um den Faktor 1,5 bei zwanzig- und um den Faktor 2 bei vierzigminütiger Ligandenzugabe einstellte (siehe 3.10). Bezüglich der Phosphorylierung von Plakoglobin konnten hingegen keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Als besonders interessant erwies sich die Tyrosinphosphorylierung einer mit  $\beta$ -Catenin koimmunpräzipitierten EGFR-Subpopulation. Für diese Teilfraktion war nach Vorbehandlung mit Batimastat und damit nach Inhibition der LAR-Prozessierung ein etwa 8-fach verringertes Phosphorylierungssignal detektierbar, während im Falle direkt immunpräzipitierten, gesamtzellulären EGFRs kein Einfluß des Inhibitors auf den Phosphorylierungsgrad zu erkennen war (siehe 3.10).

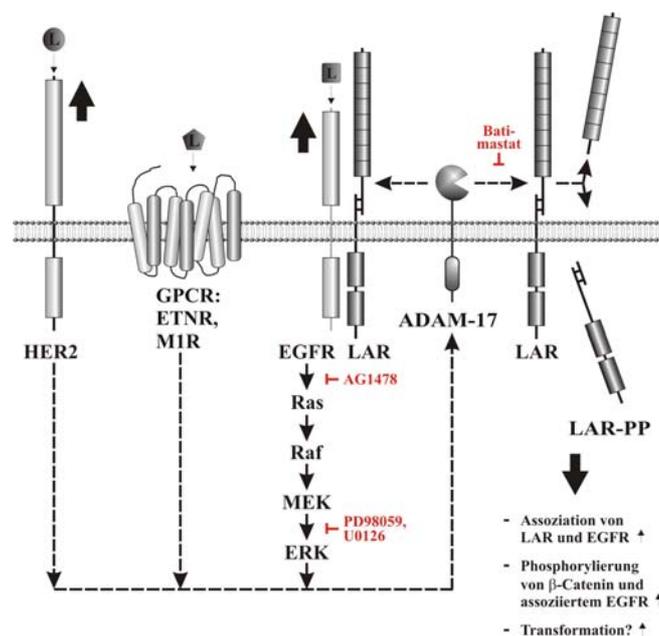
Die stärkste Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und daran bindendem EGFR stellte sich bei stärkster Prozessierung und damit Inaktivierung von PTP-LAR sowie gleichzeitigem Assoziationsmaximum von EGFR und LAR ein. Die verstärkte Assoziation mit prozessierungsbedingt inaktivierter PTP-LAR könnte die verstärkte Aktivierung jener EGFR-Subfraktion erklären, die mit  $\beta$ -Catenin assoziiert und somit dessen Phosphorylierung katalysiert. Inhibition der Prozessierung durch Batimastat und damit Aufrechterhaltung der Phosphataseaktivität von PTP-LAR führt demgegenüber zu der bedeutend geringfügigeren Aktivierung des EGFRs und damit auch geringfügigeren Phosphorylierung assoziierenden  $\beta$ -Catenins. In Einklang steht die direkte Regulation des EGFRs durch die stimulationsabhängig assoziierende Phosphatase LAR mit der publizierten Beobachtung, daß Antisense-vermittelte Suppression endogener LAR-Expression mit einer verstärkten Autophosphorylierung des EGFR nach EGF-Stimulation einhergeht (Kulas et al., 1996). Denkbar wäre aber auch, daß  $\beta$ -Catenin ein direktes Substrat für PTP-LAR darstellt und in Abhängigkeit vom Prozessierungs- und damit Aktivitätsstatus dephosphoryliert wird. Letzteres fände Unterstützung in der gezeigten Assoziation von Cadherin/Catenin-Komplexen und der Phosphatase PTP-LAR (Kypta et al., 1996; Müller et al., 1999) sowie der Beobachtung, daß  $\beta$ -Catenin *in vitro* durch ein GST-Fusionsprotein mit aktiver intrazellulärer LAR-Domäne dephosphoryliert wird (Müller et al., 1999).

## 4.7 Biologische Bedeutung von PTP-LAR

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ergeben eine auffällige Korrelation zwischen der Prozessierung und damit der katalytischen Aktivität von PTP-LAR und Ereignissen, die mit Transformation von Zellen in Verbindung gebracht werden. Besonders deutlich wurde der Einfluß dieser Phosphatase auf HER2-induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen im Rahmen von „Focus-Formation-Assays“ (siehe 3.11.2). So führte die ektopische Expression von LAR-Wildtyp zu einer deutlichen Verringerung der infolge HER2-Infektion entstandenen Zellfoci. Bekräftigt wird dies durch *in vivo*-Untersuchungen in Nacktmäusen, denen zufolge Expression von PTP-LAR in HER2-stabilen Brustepithelzellen zur Entstehung von Tumoren mit vermindertem Volumen führt (Zhai et al., 1996). Entgegen den Erwartungen wurde bei Expression einer unprozessierbaren LAR-Form kein signifikant zusätzlicher, transformationsinhibierender Einfluß beobachtet. Erklärbar ist dies jedoch mit der gemessenen Phosphataseaktivität, die gegenüber den Wildtyp-exprimierenden Klonen deutlich niedriger ausfiel und in der schwächeren Expression dieser LAR-Mutante begründet sein dürfte (siehe 3.11.2). Demgegenüber stand die stark potenzierende Wirkung der LAR-CCSS-Doppelmutante auf HER2-induzierte Focusbildung, die selbst bei geringer Expression dieser katalytisch inaktiven Mutante zu beobachten war (siehe 3.11.2). Unerklärlicherweise und im Gegensatz zu induzierbaren Klonen anderer Zelllinien sowie anderer Konstrukte wiesen die im „Focus-Formation-Assay“ verwendeten Klone Basalaktivität auf. Die geschilderten Effekte waren daher schon in nicht induziertem Zustand zu beobachten und konnten durch Induktion der Expression nicht mehr gesteigert werden. Die Auswirkung auch schon geringster ektopischer Expression auf die Transformation untermauert jedoch die Spezifität der verschiedenen LAR-Konstrukte und macht das Zugrundeliegen eventueller Überexpressionsartefakte unwahrscheinlich. Ferner werden hierdurch in der Literatur beschriebene Beobachtungen belegt, denen zufolge bereits zweifache Erhöhung der LAR-Expression in NBTII-Blasenkarzinomzellen eine starke Verringerung der Tumorentstehung in Nacktmäusen zur Folge hat (Müller et al., 1999).

Der Einfluß von PTP-LAR auf HER2-induzierte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten steht desweiteren in völliger Übereinstimmung mit der verstärkten Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bei prozessierungsbedingter Inaktivierung von PTP-LAR. Onkogen-transformierte, zum Beispiel HER2 überexprimierende Zellen, weisen neben verminderten Zell-Zell-Kontakten oder erhöhter Invasion häufig verstärkte Tyrosinphosphorylierung von Cadherin/Catenin-Komplexen, insbesondere von  $\beta$ -Catenin, auf (Matsuyoshi et al., 1992; Hamagushi et al., 1993; Behrens et al., 1993). Diese erhöhte  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung wird auch nach Prozessierung von PTP-LAR, wie sie ebenfalls nach Überexpression (siehe 3.4.1.2) sowie Ligandestimulation (siehe 3.4.2.4) des Onkogens HER2 gezeigt wurde, beobachtet (siehe 3.10). Auch die für transformierte Zellen typische Verringerung der Zell-Zell-Kontakte, die unter anderem durch Cadherin/Catenin-Komplexe vermittelt werden, wurde im Zusammenhang mit

TPA-induzierter LAR-Prozessierung beobachtet (Aicher et al., 1997). Bezugnehmend auf den „Focus-Formation-Assay“ hätte die ektopische Expression von LAR-Wildtyp eine Erhöhung zellulärer LAR-Aktivität zur Folge, die bei stärkerer Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin eine Stabilisierung der interzellulären Kontakte und damit verbunden die gezeigte Verringerung der Focusbildung bewirken würde. Koexpression katalytisch inaktiver LAR-CCSS-Mutante hingegen würde zusätzlich zur HER2-vermittelten LAR-Prozessierung und damit LAR-Inaktivierung zur Konkurrenz mit verbliebener aktiver PTP-LAR führen. Dies hätte infolge verstärkter Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin eine Destabilisierung Cadherin/ $\beta$ -Catenin-vermittelter Zelladhäsion und damit die beobachtete, starke Zunahme der Focusbildung zur Folge (siehe 3.11.2). Bestärkt wird der mögliche Zusammenhang von Transformation und LAR-Prozessierung auch durch die gezeigten Einflüsse des EGFRs, dessen Transformationspotential ebenfalls seit langem bekannt ist und dessen Aktivierung durch Überexpression (siehe 3.4.1.1), Ligandenstimulation (siehe 3.4.2.1) sowie infolge Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren (siehe 3.4.2.2 und 3.4.2.3) ebenfalls zur Prozessierung von PTP-LAR führt. Die in dieser Arbeit identifizierten, zur Prozessierung von PTP-LAR führenden Signaltransduktionswege mit den daran beteiligten Komponenten sowie die mit LAR-Prozessierung korrelierenden zellbiologischen und biochemischen Ereignisse sind in der Abbildung 36 noch einmal schematisch zusammengefasst.



**Abb. 36:** Zusammenfassung identifizierter, zur Prozessierung von PTP-LAR führender Signaltransduktionswege sowie damit einhergehender biochemischer und zellbiologischer Ereignisse.

Schematisch dargestellt ist die durch Ligandenstimulation (L) von EGFR, HER2 oder der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ETNR und MIR sowie durch Überexpression der beiden EGFR-Familienmitglieder (dicke Pfeile) induzierte Prozessierung von PTP-LAR (unterbrochene Linie). Durch Verwendung entsprechender Inhibitoren (rot) wurde im Falle des EGF-vermittelten Signalweges die Notwendigkeit aktiven EGFRs, die Aktivierung von Erk1/Erk2 sowie die Beteiligung einer Metalloproteinase gezeigt. Als PTP-LAR prozessierende Protease wurde dabei ADAM-17/TACE identifiziert. Folge der Prozessierung ist eine verstärkte Assoziation von PTP-LAR und EGFR, eine erhöhte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit assoziierendem EGFR sowie eventuell eine Verstärkung HER2-vermittelter Transformation von NIH3T3-Fibroblasten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, Regulationsmechanismen sowie die biologische Funktion der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR näher zu charakterisieren und ihre pathophysiologische Bedeutung insbesondere in Mammakarzinomzellen zu untersuchen.

Da Proteintyrosinphosphatasen in vielen Fällen negativ regulatorische Funktionen ausüben, erwies sich deren konstitutive Expression selbst in geringem Ausmaß oftmals als toxisch. Zunächst mußte daher ein induzierbares Genexpressionssystem etabliert werden, das sich gegenüber bisher verfügbaren Systemen durch verringerte Basalaktivität sowie eine effizientere Transferierbarkeit in ein weiteres Spektrum an Zielzellen auszeichnete. Zu diesem Zweck wurde neben resistenzvermittelnden Selektionsmarkern in die beiden Komponenten eines Tetrazyklin-induzierbaren, retroviralen Zweikomponentensystems eine zusätzliche Regulationsebene eingeführt. Diese erlaubt zusätzlich zur Tetrazyklin-vermittelten Regulation des Zielgens die Kontrolle auch des Transaktivatorproteins auf Transkriptionsebene. Sie ermöglicht im nicht-induzierten Zustand eine starke Verringerung der Transaktivatoraktivität, die in herkömmlichen Systemen unreguliert und daher zumindest teilweise für die vergleichsweise höhere Basalexpression des Zielgens verantwortlich ist.

Im Fokus der Betrachtungen stand anschließend die membranständige Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR, für die eine Assoziation mit dem EGFR gezeigt werden konnte. Herstellung und Koexpression verschiedener EGFR-Deletionsformen führten weiterhin zur Identifizierung des zytoplasmatischen Teils als diejenige EGFR-Domäne, die mit PTP-LAR wechselwirkt. Die funktionelle Bedeutung der Assoziation wurde durch die EGFR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von PTP-LAR unterstrichen. Diese konnte sowohl bei Überexpression katalytisch aktiver EGFR-Derivate in HEK-293-Fibroblasten als auch endogen nach Stimulation der Brustkrebslinien MDA-MB-468 und BT-20 mit EGF nachgewiesen werden.

Als weitere posttranslationale Modifikation wurde die proteolytische Spaltung von PTP-LAR nach Behandlung von Zellen mit TPA oder Kalziumionophoren bereits in der Mitte der Neunziger Jahre beschrieben. Physiologische Stimuli für diese Prozessierung waren jedoch nicht bekannt. Erste Hinweise hierfür ergaben sich nach Koexpression von PTP-LAR und der in zahlreichen Tumoren verstärkt exprimierten EGFR-Familienmitglieder EGFR und HER2. Es konnte gezeigt werden, daß die zunehmende Expression beider Rezeptortyrosinkinasen eine zunehmende Prozessierung von PTP-LAR zur Folge hat. In Einklang hiermit wurde auch deren Stimulation mit spezifischen Liganden als prozessierungsinduzierendes Ereignis nachgewiesen. So konnte nach Stimulation HER2-exprimierender MCF-7-Brustkrebszellen mit dem Liganden  $\beta$ -Heregulin, aber auch infolge EGF-Stimulation verschiedener Tumorklinen die Prozessierung von PTP-LAR detektiert werden. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie dem muscarinischen Acetylcholin- (M1R) oder dem Carbachol-Rezeptor in Cos-7-Zellen bzw. HEK-293-Fibroblasten über den als Transaktivierung bezeichneten Signaltransduktionsweg zur Spaltung von PTP-LAR führt.

Genauere Analysen der EGF-stimulierten LAR-Prozessierung in MDA-MB-468 ergaben, daß neben aktiviertem EGFR auch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, nicht aber von p38, erforderlich ist. Die Vorbehandlung mit den MEK-spezifischen Inhibitoren PD98059 sowie U0126 unterdrückten nämlich bei Inhibition der ERK1/ERK2-, nicht aber der Aktivität von p38, die EGF-stimulierte Prozessierung von PTP-LAR. Ferner wurde eine Inhibition der LAR-Prozessierung in Gegenwart von Batimastat, einem für Metalloproteasen spezifischen Inhibitor, beobachtet. Dies erlaubte eine Eingrenzung der die Spaltung katalysierenden Protease auf diese Proteasefamilie. Weitere sich daran anschließende Studien ergaben TPA-induzierbare Prozessierung von PTP-LAR in Maus-Wildtyp-, nicht aber in ADAM-17-„Knock-out“-Fibroblasten. Somit konnte ADAM-17 als die oder zumindest als eine der LAR-Prozessierung zugrundeliegenden Protease identifiziert werden. Untermauern ließ sich diese Protease-Substrat-Beziehung durch den Nachweis der direkten Assoziation beider Proteine.

Als Folgen der EGF-stimulierten Prozessierung von PTP-LAR wurde eine mit der Spaltung korrelierende Zunahme der Assoziation von LAR und EGFR gezeigt. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die durch EGF- sowie TPA-Stimulation induzierte Prozessierung von PTP-LAR mit einer Verringerung der Phosphataseaktivität einhergeht. Dies steht in Einklang mit der nach EGF-Stimulation beobachteten Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und einer damit assoziierenden EGFR-Subpopulation. Im Gegensatz dazu wurde bei Inhibition der Prozessierung durch Batimastat eine deutlich verringerte Phosphorylierung beider Proteine festgestellt. Dies galt insbesondere für den assoziierenden EGFR.

Darüber hinaus wurde die prinzipielle Bedeutung von PTP-LAR für Transformation anhand HER2-infizierter NIH3T3-Fibroblasten in „Focus-Formation-Assays“ analysiert. Dabei verringerten katalytisch aktive LAR-Formen bereits bei geringer Expression die HER2-vermittelte Focusbildung deutlich. Bei ebenfalls sehr schwacher Expression einer katalytisch inaktiven LAR-CCSS-Doppelmutante ließ sich hingegen ein potenzierender Effekt auf die HER2-induzierte Transformation demonstrieren.

Die Resultate stellen den hier charakterisierten Mechanismus der LAR-Prozessierung vor einen pathophysiologischen Hintergrund und weisen auf die Bedeutung von PTP-LAR als ein transformationsbeeinflussendes Element in der Zelle hin.

Alle Ergebnisse sind in Abbildung 36 auf Seite 126 nochmals schematisch zusammengefasst.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adamsky, K., Schilling, J., Garwood, J., Faissner, A. und Peles, E. (2001). Glial tumor cell adhesion is mediated by binding of the FNIII domain of receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) to tenascin C. *Oncogene*, **20**, 609-618.
- Aicher, B., Lerch, M.M., Müller, T., Schilling, J. und Ullrich, A. (1997). Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTP $\sigma$  by inducible proteolytic processing. *J. Cell Biol.*, **138**, 681-696.
- Alroy, I. und Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters*, **410**, 83-86.
- Angers-Loustau, A., Cote, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A. und Tremblay, M.L. (1999). Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration and cytokinesis in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **144**, 1019-1031.
- Autero, M., Saharinen, J., Pessa-Morikawa, T., Soula-Rothhut, M., Oetken, C., Gassmann, M., Bergman, M., Alitalo, K., Burn, P., Gahmberg, C.G. und Mustelin, T. (1994). Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50<sup>csk</sup> kinase creates a binding site for p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase and activates the phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1308-1321.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. und Rhee, S.G. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 217-221.
- Banville, D., Ahmad, S., Stocco, R. und Shen, S.H. (1994). A novel protein-tyrosine-phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22320-22327.
- Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D. und Marshall, M. (1998). Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene*, **17**, 1539-1547.
- Barford, D., Flint, A.J. und Tonks, N.K. (1994). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, **263**, 1397-1404.
- Barnea, G., Grumet, M., Sap, J. Margolis, R.U. und Schlessinger, J. (1994). Close similarity between receptor-linked tyrosine phosphatase and rat-brain proteoglycan. *Cell*, **76**, 205
- Barone, M.V. und Courtneidge, S.A. (1995). Myc but not fos rescue of PDGF signaling block caused by kinase-inactive src. *Nature*, **378**, 509-512.
- Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y, Yim, M.B. und Chock, P.B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34543-34546.
- Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N.A., Amrein, K.E., Autero, M., Burn, P. und Alitalo, K. (1992). The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and downregulates its catalytic activity. *EMBO J.*, **11**, 2919-2924.
- Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T. und Noel, J.P. (1996). Structural basis for inhibition of receptor-tyrosine phosphatase- $\alpha$  by dimerisation. *Nature*, **382**, 555-559.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Welfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis,

- R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. und Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yalnik, V. und Margolis, B. (1994). A region in Shc distinct from SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32031-32034.
- Blobel, C.P. (1997). Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF $\alpha$  and Notch. *Cell*, **90**, 589-592.
- Borland, G., Murphy, G. und Ager, A. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2810-2815.
- Bosenberg, M.W., Pandiella, A. und Massague, J. (1992). The cytoplasmic carboxyterminal amino acid specifies cleavage of membrane TGF $\alpha$  into soluble growth factor. *Cell*, **71**, 1157-1165.
- Bosenberg, M.W. und Massague, J. (1993). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 532-538.
- Broome, M.A. und Hunter, T. (1996). Requirement for c-src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16798-16806.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-378.
- Burgess, W.H., Dionne, C.A., Kaplow, J., Mudd, R., Friesel, R., Zilberstein, A., Schlessinger, J. und Jaye, M. (1990). Characterization and cDNA cloning of phospholipase C-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 4770-4777.
- Büeler, H. und Mulligan, R.C. (1996). Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. *Mol. Med.*, **2**, 545-555.
- Calaib, M.B., Polte, T.R. und Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for src family kinases. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 954-963.
- Carraway, K.L., III und Cantley, L.C. (1994). A Neu acquaintance for ErbB3 and ErbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signalling. *Cell*, **78**, 5-8.
- Carter, T.H. und Kung, H.J. (1994). Tissue-specific transformation by oncogenic mutants of epidermal growth factor receptor. *Crit. Rev. Onc.*, **5**, 389-428.
- Castagnino, P., Biesova, Z., Fazioli, F., Gill, G.N. und DiFiore, P.P. (1995). Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent. *Oncogene*, **10**, 723-729.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. und Fischer, E.H. (1988). The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7182-7186.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S., Diltz, C.D., Harrylock, M., Cool, D.E., Krebs, E.G., Fischer, E.H. und Walsh, K.A. (1989). Human placenta protein-tyrosine phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5252-5256.

- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752.
- Chen, Y.-H., Pouyssegur, J., Courtneidge, S.A. und van Oggerghen-Schilling, E. (1994). Activation of the Src family kinase activity by the G-protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27372-27377.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. und Fudenberg, H.H. (1977). Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcus 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. USA*, **87**, 2735-2739.
- Chung, C.T. und Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucl. Acid Res.*, **16**, 3580.
- Clark, E.A., Shattil, S.J. und Brugge, J.S. (1994). Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 464-469.
- Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J. und Baselga, J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.*, **59**, 1196-1201.
- Czech, M.P. (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*, **100**, 603-606.
- Cohen, G.B., Ren, R. und Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, **80**, 237-248.
- Conboy, J., Kan, Y.W., Shohet, S.B. und Mohandas, N. (1986). Molecular cloning of a protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9512-9516.
- Cong, F., Spencer, S., Cote, J.F., Wu, Y., Tremblay, M.L., Lasky, L.A. und Goff, S.P. (2000). Cytoskeletal protein PSTPIP-1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation. *Mol. Cell*, **6**, 1413-1423.
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. und Krebs, E.G. (1989). DNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5257-5261.
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Fischer, E.H. und Krebs, E.G. (1990). Expression of a human T-cell protein tyrosine phosphatase in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7280-7284.
- Cooper, J.A. und Howell, B. (1993). The when and how of src regulation. *Cell*, **73**, 1051-1054.
- 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., Levinson, A. und Ullrich, A. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.
- Coussens, L., van Beveren, C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, R.K., Isacke, C.M., Verma, L.M. und Ullrich, A. (1986). Structural alteration of a viral homologue of the receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus. *Nature*, **320**, 277-280.

- Cunningham, B.A. (1995). Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 628-633.
- Daniel, J.M. und Reynolds, A.B. (1997). Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *BioEssays*, **19**, 883-891.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. und Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557-560.
- Daub, H., Wallasch, C., Lanckenau, A., Herrlich, A. und Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G-protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.*, **16**, 101-112.
- Debant, A., Serra-Pages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S.-H. und Streuli, M. (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5466-5471.
- Den Hertog, J., Tracy, S. und Hunter, T., Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on tyrosine 789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein Grb-2 in vivo (1994) *EMBO J.*, **13**, 3020-3032.
- den Hertog, J., Sap, J., Pals, C.E.G.M., Schlessinger, J. und Kruijer, W. (1995). Stimulation of receptor protein tyrosine phosphatase alpha activity and phosphorylation by phorbol ester. *Cell Growth Differ.*, **6**, 303-307.
- Den Hertog, J. und Hunter, T. (1996). Tight association of Grb2 with receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  is mediated by the SH2 and C-terminal SH3 domains. *EMBO J.*, **15**, 3016-3027.
- Denu, J.M., Zhou, G., Gou, Y. und Dixon, J.E. (1995). The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase. *Biochemistry*, **34**, 3396-3403.
- Denu, J.M., Lohse, D.L., Vjayalakshmi, J. und Dixon, J.E. (1996). Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **93**, 2493-2498.
- Desai, C.J., Gindhart jr, J.G., Goldstein, L.S. und Zinn, K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor neuron guidance in the Drosophila embryo. *Cell*, **84**, 599-609.
- Desai, D.M., Sap, J., Schlessinger, J. und Weiss, A. (1993). Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*, **73**, 541-554.
- Deuschle, U., Meyer, W.K. und Thiesen, H.-J. (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1907-1914.
- Dominey, A.M., Wang, X.J., King Jr, L.E., Nanney, L.B., Gagne, T.A., Sellheyer, K., Bundman, D.S., Longley, M.A., Rothnagel, J.A., Greenhalgh, D.A. und Roop, D.R. (1993). Targeted overexpression of transforming growth factor  $\alpha$  in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ.*, **4**, 1071-1082.
- Douziech, N., Calvo, E., Coulombe, Z., Muradia, G., Bastien, J., Aubin, R.A., Lajas, A. und Morisset, J. (1999). Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology*, **140**, 756-777.
- Downward, J. (1997). Routine role for Ras. *Curr. Biol.*, **7**, 258-260.

- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14863-14868.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. und Kennedy, B.P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, **283**, 1544-1548.
- Elson, A. und Leder, P. (1995). Identification of a cytoplasmic, phorbol ester-inducible isoform of protein tyrosine phosphatase  $\epsilon$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12335-12339.
- Erpel, T. und Courtneidge, S.A. (1995). Src family protein tyrosine kinases und cellular signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 176-182.
- Erpel, T., Alonso, G., Roche, S. und Courtneidge, S.A. (1996). The Src SH3 domain is required for DNA-synthesis induced by platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16807-16812.
- Fan, H. und Derynck, R. (1999). Ectodomain shedding of TGF- $\alpha$  and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.*, **18**, 6962-6972.
- Fang, K.S., Barker, K., Sudal, M. und Hanafuse, H. (1994). A transmembrane protein tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14056-14063.
- Featherstone, C. (1997). Src structure crystallizes 20 years of oncogene research. *Science*, **275**, 1066.
- Feng, G.S., Hui, C.-C. und Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphoprotein phosphatase as a target of protein tyrosine kinases. *Science*, **259**, 1607-1611.
- Feng, G.S. und Pawson, T. (1994). Phosphotyrosin phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. *Trends Genetics*, **10**, 54-58.
- Ferguson, K.M., Lemmon, M.A., Schlessinger, J. und Sigler, P.B. (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C-pleckstrin homology domain. *Cell*, **83**, 1037-1046.
- Fialkow, L., Chan, C.K. und Downey, G.P. (1997). Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *J. Immunol.*, **158**, 5409-5417.
- Flores, E., Roy, G., Patel, D., Shaw, A. und Thomas, M.L. (1994). Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4938-4946.
- 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**, 545-560.
- Frangioni, J.V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E.W. und Neel, B.G. (1993). Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.*, **12**, 4843-4856.
- Freeman, M.R.J., Plutzky, J. und Neel, B.G. (1992). Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11239-11243.

- Freundlieb, S., Schirra-Müller, C. und Bujard, H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.*, **1**, 4-12.
- Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M. und Ullrich, A. (1996). Association of human protein-tyrosine phosphatase  $\kappa$  with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16712-16719.
- Fukunaga, K., Noguchi, T., Takeda, H., Matozaki, T., Hayashi, Y., Itoh, H. und Kasuga, M. (2000). Requirement for protein-tyrosine phosphatase SHP-2 in insulin-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5208-5213.
- Garton, A.J. und Tonks, N.K. (1994). PTP-PEST, a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *EMBO J.*, **13**, 3763-3771.
- Garton, A.J., Flint, A.J. und Tonks, N.K. (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6408-6418.
- Garton, A.J., Burnham, M.R., Bouton, A.H. und Tonks, N.K. (1997). Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosin phosphatase substrate recognition. *Oncogene*, **15**, 877-885.
- Gebbink, M.F., Van Etten, I., Hatebor, G., Suijkerbuijk, R., Beijersbergen, R.L., Van Kessel, A.G. und Moolenaar, W. (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.*, **290**, 123-130.
- Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E. und Klagsbrun, M. (1999). The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade and by cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28828-28835.
- Gershoni, J.M. und Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.*, **131**, 1-15.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Goldstein, B.J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M.F. und Harbeck, M. (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4283-4289.
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
- Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L. und McDonald, N. (1989). Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J.*, **8**, 4115-4123.
- Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neiningner, A., Gaestel, M., Herrlich, P. und Böhmer, F.D. (1999). Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26378-26386.

- Grumet, M., Friedlander, D.R. und Edelman G.M. (1993). Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhesion Comm.*, **1**, 177-190.
- Gu, M., York, J.D., Warshawsky, I. und Majerus, P.W. (1991). Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5867-5871.
- Guan, J.L. und Shalloway, D. (1992). Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*, **358**, 690-692.
- Guan, K. und Dixon, J.E. (1991). Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17026-17030.
- Guan, K., 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. USA*, **87**, 1501-1505.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. und Carraway, K.L., III. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8132-8136.
- Harano, T. und Mizuno, K. (1994). Phorbol ester-induced activation of a membrane-bound candidate pro-transforming growth factor- $\alpha$  processing enzyme. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20305-20311.
- 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. USA*, **88**, 11266-11270.
- Hengge, A.C., Sowa, G.A., Wu, L. und Zhanh, Z.Y. (1995). Nature of the transition state of the protein tyrosine phosphatase catalyzed reaction. *Biochemistry*, **34**, 13982-13987.
- Hennige, A.M., Lammers, R., Hoppner, W., Arit, D., Strack, V., Teichmann, R., Machicao, F., Ullrich, A., Haring, H.U. und Kellerer, M. (2001). Inhibition of Ret oncogene activity by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *Endocrinology*, **142**, 4441-4447.
- Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J. und Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.*, **125**, 1327-1340.
- Hjelm, H., Hjelm, K. und Sjoquist, J. (1977). Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbant for isolation of immunoglobulins. *FEBS Letters*, **28**, 73-76.
- Hoffmann, K.M., Tonks, N.K. und Barford, D. (1997). The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatase mu. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27505-27508.
- Holgado-Madruga, M., Emllet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K. und Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. *Nature*, **379**, 560-564.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H und Kemler, R. (1994).  $\beta$ -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.*, **127**, 1375-1380.
- Hunter, T. und Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311-1315.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the Ying and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.

- Hunter, T. (2001). The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *The Harvey Lectures*, **94**, 81-120.
- Jackson, P. und Baltimore, D. (1989). N-terminal mutation activates the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J.*, **8**, 449-456.
- Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H. und Merlino, G.T. (1990). TGF-alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell*, **61**, 1137-1147.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A.J. und Tonks, N.K. (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, **268**, 1754-1758.
- Jinag, G. und Hunter, T. (1999). Receptor activation: when a dimer is not enough. *Curr. Biol.*, **9**, R568-R571.
- 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**, 2942-2951.
- Jink, F.R., Harder, K.W., Melhado, I.G., Anderson, L.L., und Duncan, A.M.V. (1992). The gene for leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase (LAR) is localized to human chromosome 1p32, a region frequently deleted in tumors of neuroectodermal origin. *Cytogenet. Cell Genet.*, **61**, 266-268.
- Juliano, R.L. und Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.*, **120**, 577-586.
- Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M. und Schlessinger, J. (1990). Cloning of three human protein tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7000-7004.
- Kashless, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1991). A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptor by heterodimerisierung. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1445-1463.
- Katsura, H., Williams, M.C., Brody, J.S., (1995). Two closely related receptor-type tyrosine phosphatases are differentially expressed during rat lung development. *Devel. Dynamics*, **204**, 89-97.
- Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. und Williams, L.T. (1994). PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science*, **268**, 1177-1180.
- Keilhack, H., Muller, M., Bohmer, S.A., Frank, C., Weidner, K.M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Gunther, B., Muller, T., Birchmeier, C. und Bohmer, F.D. (2001). Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine kinase phosphatase SHP-1. *J. Cell Biol.*, **152**, 325-334.
- Kim, L. und Wong, T.W. (1995). The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4553-4561.
- Kishimoto, T., Taga, T. und Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*, **76**, 253-262.
- Klaman, L.D., Boss, O., Peroni, O.D., Kim, J.K., Martino, J.L., Zabolotny, J.M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.B., Sharpe, A.H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G.I., Neel, B.G. und Kahn, B.B. (2000).

- Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 5479-5489.
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. und Lodish, H.F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, **80**, 729-738.
- Kmieciak, T.E., Johnson, P.J. und Shalloway, D. (1988). Regulation by the autophosphorylation site in overexpressed pp60c-src. *Mol. Cell Biol.*, **8**, 4541-4546.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M., Ellis, C. und Pawsons, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252**, 668-674.
- Kossiakoff, A.A. und De Vos, A.M. (1998). Structural basis for cytokine hormone-receptor recognition and receptor activation. *Adv. Protein Chem.*, **52**, 67-108.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Propescu, 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. USA*, **86**, 9193-9197.
- Krueger, N.X., Streuli, M. und Saito, H. (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J.*, **9**, 3241-3252.
- Krueger, N.X., Van Vactor, D., Wan, H.I., Gelbart, W.M., Goodman, C.S. und Saito, H. (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, **84**, 611-622.
- Kulas, D.T., Goldstein, B.J. und Mooney, R.A. (1996). The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 748-754.
- Kunkel, T.A. (1985). Mutational specificity of depurination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9193-9197.
- Kuriyan, J. und Cowburn, D. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 259-288.
- Kypta, R.M., Su, H. und Reichardt, L.F. (1996). Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J. Cell Biol.*, **134**, 1519-1529.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lammers, R., Lerch, M.M. und Ullrich, A. (2000). The carboxy-terminal tyrosine residue of protein-tyrosine phosphatase alpha mediates association with focal adhesion plaques. *J. Biol. Chem.*, **275**, 3391-3396.
- Lee, E.B., Beug, H. und Haymann, M.J. (1993). Mutational analysis of the role of the carboxy-terminal region of the v-erbB protein in erythroid transformation. *Oncogene*, **8**, 1317-1327.
- Lee, J., Dull, T.J., Lax, I., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1989). HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *EMBO J.*, **8**, 167-173.
- Lee, S.Y. und Rasheed, S. (1990). A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques*, **9**, 676-679.

- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boediker, H. (1977). RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751.
- Lehväslaiho, H., Lehtola, L., Sistonen, L. und Alitalo, K. (1989). A chimeric EGF-R-neu proto-oncogene allows EGF to regulate neu tyrosine kinase and cell transformation. *EMBO J.*, **8**, 159-166.
- Lemmon, M.A. und Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 459-464.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., O'Brien, R., Sigler, P.S. und Schlessinger, J. (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10472-10476.
- Levitzki, A. und Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: An approach in drug development. *Science*, **267**, 1782-1788.
- Li, R.Y., Gaits, F., Ragab, A., Ragab-Thomas, J.M.F. und Chap, H. (1995). Tyrosine phosphorylation of an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase is coupled to platelet thrombin receptor via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G-protein. *EMBO J.*, **14**, 2519-2526.
- Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S. und Mulligan, R.C. (1997). Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Med.*, **3**, 466-476.
- Lombroso, P.J., Murdoch, G. und Lerner, M. (1991). Molecular characterization of a protein tyrosine phosphatase enriched in striatum. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7242-7246.
- Lopez, F., Esteve, J.P., Buscail, L., Delesque, N., Saint, L.N., Vaysse, N. und Susini, C. (1996). Molecular mechanism of antiproliferative effect of somatostatin: involvement of a tyrosine phosphatase. *Metabolism*, **45**, 14-16.
- Lopez, F., Esteve, J.P., Buscail, L., Delesque, N., Saint, L.N., Theveniau, M., Nahmias, C., Vaysse, N. und Susini, C. (1997). The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24448-24454.
- Lorenz, U., Ravichandran, K., Pei, D., Walsh, C.T., Burakoff, S.J. und Neel, B.G. (1994). Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T-cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1824-1834.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. und Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431-442.
- Lo, Y.Y.C. und Cruz, T.F. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 11727-11730.
- Luna, E.J. und Hitt, A.L. (1992). Cytoskeleton-plasma membrane interaction. *Science*, **258**, 955-964.
- Maeda, N. und Noda, M. (1998). Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *J. Cell Biol.*, **142**, 203-216.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T. und Noda, M. (1999). A receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth-factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12474-12479.

- Maegawa, H., Ugi, S., Adachi, M., Hinoda, Y., Kikkawa, R., Yachi, A., Shigeta, Y. und Kashiwagi, A. (1994). Insulin receptor kinase phosphorylates protein tyrosine phosphatase containing src homology 2 regions and modulates its PTPase activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **199**, 780-785.
- Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T. und Weiss, A. (1998). Dimerisation-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science*, **279**, 88-91.
- Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T.G., Olson, J.L., Daikh, D.I., Killeen, N. und Weiss, A. (2000). An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell*, **103**, 1059-1070.
- Mangelsdorf, D.J. und Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-850.
- Margolin, J., Friedman, J.R., Meyer, K-H., Vissing, H., Thiesen, H-J. und Rauscher III, F.J. (1994). Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4509-4513.
- 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**, 1101-1107.
- Margolis, B. (1999). The PTB domain: the name doesn't say it all. *Trends Endocrinol. Metab.*, **10**, 262-267.
- Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K., Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C. und Kasuga, M. (1994). Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2075-2081.
- Matsui, Y., Halter, S.A., Holt, J.T., Hogan, B.L.M. und Coffey, R.J. (1990). Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF-alpha transgenic mice. *Cell*, **61**, 1147-1155.
- Matthews, R.J., Cahir, E.D. und Thomas, M.L. (1990). Identification of an additional member of the protein tyrosine phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4444-4448.
- Matthews, R.J., Cahir, E.D., 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**, 2396-2405.
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A. und Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9015-9019.
- 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 neuronal cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2512-2516.
- Mayer, B.J. und Baltimore, D. (1993). Signaling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.*, **3**, 8-13.
- McLaughlin, S. und Dixon, J.E. (1993). Alternative splicing gives rise to a nuclear protein tyrosine phosphatase in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6839-6842.

- Meisenhelder, J., Suh, P.-G., Rhee, S.G. und Hunter, T. (1989). Phospholipase C- $\chi$  is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell*, **57**, 1109-1122.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. und Deuel, T.F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2603-2608.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-79.
- Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M., Superti-Furga, G., Pawson, T., DiFiore, P.P., Lafrancone, L. und Pelicci, P.G. (1997). Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.*, **16**, 706-716.
- Miller, A.D. und Rosman, G.J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques*, **7**, 980-986.
- Mizuno, K., Hasegawa, K., Katagiri, T., Ogimoto, M., Ichikawa, T. und Yakura, H. (1993). MPTP $\delta$ , a putative murine homolog of HPTP $\delta$ , is expressed in specialized regions of the brain and in B-cell lineage. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5513-5523.
- Möller, N.P.H., Bach-Möller, K., 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 ezrin-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7477-7481.
- Mohammadi, S.A. und Hawkins, R.E. (1998). Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system. *Gene Therapy*, **5**, 76-84.
- Morrison, D.K. und Cutler, R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 174-179.
- Morton, C.J. und Campbell, I.D. (1994). "Molecular Velcro". *Curr. Biol.*, **4**, 615-617.
- Mosinger, B., Tillmann, U., Westphal, H. und Trembly, M.L. (1992). Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 499-503.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D. und Becherer, J.D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*, **385**, 733-736.
- Müller, T., Choidas, A., Reichmann, E. und Ullrich, A. (1999). Phosphorylation and free pool of  $\beta$ -catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10173-10183.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Mustelin, T. und Burn, P. (1993). Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 215-220.
- Nam, H.J., Poy, F., Krueger, N.X., Saito, H. und Frederick, C.A. (1999). Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell*, **97**, 449-457.

- Nath, D., Williamson, N.J., Jarvis, R. und Murphy, G. (2000). Metalloproteinase mediated shedding of the transmembrane receptor, Met, is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor, EGF receptor and integrins.
- Nister, M., Libermann, T.A., Betsholtz, C., Petterson, M., Claessen-Welsh, L., Heldin, C-H., Schlessinger, J. und Westermark, B. (1988). Expression of messenger RNAs for platelet derived growth factor and transforming growth factor alpha and their receptors in human glioma cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 3910-3918.
- No, D., Yao, T.P. und Evans, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3346-3351.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y. und Kasuga, M. (1994). Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6674-6682.
- Ochiai, A., Akimoto, S., Kanai, Y., Shibata, T., Oyama, T. und Hirohashi, S. (1994). C-erbB2 gene product associates with catenins in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **205**, 73-78.
- Ogata, M., Sawada, M., Kosugi, A. und Hamaoka, T. (1994). Developmentally regulated expression of a murine receptor like protein tyrosine phosphatase in the thymus. *J. Immunol.*, **153**, 4478-4487.
- O'Grady, P., Krueger, N.X., Streuli, M., (1994). Genomic organisation of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25193-25199.
- 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**, 1675-1684.
- Oh, E.S., Gu, H., Saxton, T.M., Timms, J.F., Hausdorff, F., Frevert, E.U., Kahn, B.B., Pawson, T., Neel, B.G. und Thomas, S.M. (1999). Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3205-3215.
- Okada, M. und Nakagawa, H. (1989). A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60src function. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20886-20893.
- Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. und Nakagawa, H. (1991). CSK: a protein tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24249-24252.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. und Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.*, **19**, 3159-3167.
- Ostergaard, H.L. und Trowbridge, I.S. (1991). Negative regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity by ionomycin in T cells. *Science*, **253**, 1423-1425.
- Östman, 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. USA*, **91**, 9680-9684.
- Ozawa, M., Baribault, H. und Kessler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.*, **8**, 1711-1718.
- Pages, P., Benali, N., Saint, L.N., Esteve, J.P., Schally, A.V., Tkaczuk, J., Vaysse, N., Susini, C. und Buscail, L. (1999). Sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1). Evidence for the role of SHP-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15186-15193.

- Paige, L.A., Nadler, M.J.S., Harrison, M.L., Cassady, J.M. und Geahlen, R.L. (1993). Reversible palmitoylation of the protein tyrosine kinase p56lck. *J. Biol. Chem.*, **268**, 8669-8674.
- Parson, J.T. und Parson, S.J. (1997). Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factors and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 187-192.
- Pawson, T und Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Peles, E., Schlessinger, J. und Grumet, M. (1998). Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase beta: implications for intercellular signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 121-124.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T und Pelicci, P.G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, **70**, 93-104.
- Perkins, L.A., Larsen, I. und Perrimon, N. (1992). *Corkscrew* encodes a putative tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell*, **70**, 225-236.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. und Black, R.A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Plowman, G.D., Ullrich, A., und Shawver, L.K. (1994). Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention. *Drug News & Perspectives*, **7**, 334-339.
- Pot, D.A., Woodford, T.A., Remboutsika, E., Haun, R.S. und Dixon, J.E. (1991). Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19688-19696.
- Preece, G., Murphy, G. und Ager, A. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 11634-11640.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. und Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, **402**, 884-888.
- Prigent, S.A. und Lemoine, N.R. (1992). The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog. Growth Factor Res.*, **4**, 1-24.
- Puissant, C. und Houdebine, L.M. (1990). An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques*, **8**, 148-149.
- Pulido, R., Krueger, N.X., Serra-Pages, C., Saito, H. und Streuli, M. (1995). Molecular characterization of the human transmembrane protein-tyrosine phosphatase  $\delta$ . *J. Biol. Chem.*, **270**, 1-7.
- Rotin, D., Goldstein, B.J. und Fladd, C.A. (1994). Expression of the tyrosine phosphatase LAR-PTP2 is developmentally regulated in lung epithelia. *Am. J. Physiol.*, **267**, 263-270.
- Redemann, N., Holzmann, B., von Räden, T., Wagner, E.F., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992). Anti-oncogenic activity of signaling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 491-498.
- Redinbaugh, M.G. und Turley, R.B. (1986). Adaptation of the bicinchronic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose. *Anal. Biochem.*, **153**, 267-271.

- Reiland, J., Ott, V.L., Lebakken, C.S., Yeaman, C., McCarthy, J. und Rapraeger, A.C. (1996). Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem. J.*, **319**, 39-47.
- Resh, M.D. (1994). Myristoylation and palmitoylation of src family members: the fats of the matter. *Cell*, **76**, 411-413.
- Riedel, H., Massoglia, S., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1988). Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptors transforms NIH 3T3 mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1477-1481.
- Robinson, M.J. und Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180-186.
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., Schlessinger, J. und Pawson, T. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in the activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*, **360**, 689-692.
- Sadoshima, J. und Izumo, S. (1996). The heterotrimeric G<sub>q</sub> protein-coupled angiotensin II receptor activates p21<sup>ras</sup> via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.*, **15**, 775-787.
- Saez, E., No, D., West, A. und Evans, R.M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 608-616.
- Sahin, M., Dowling, J.J. und Hockfield, S. (1995). Seven protein tyrosine phosphatases are differentially expressed in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **351**, 617-631.
- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Tonks, N.K. und Barford, D. (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell*, **6**, 1401-1412.
- Sambrook, I., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1990). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- Sandgren, E.P., Luetke, N.C., Qiu, T.H., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. und Lee, D.C. (1993). Transforming growth factor alpha dramatically enhances oncogene-induced carcinogenesis in transgenic mouse pancreas and liver. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 320-330.
- Sap, J., D'Eustachio, P., Givol, D. und Schlessinger, J. (1990). Cloning and expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6112-6116.
- Saras, J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. und Gonez, L.J. (1994). Cloning and characterization of PTPL1, a protein tyrosine phosphatase with similarities to cytoskeletal-associated proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24082-24089.
- Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1992). A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. *J. Cell Sci.*, **103**, 131-143.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S. und Reed, J.C. (1995). FAP1: a protein tyrosine phosphatase that associates with FAS. *Science*, **268**, 411-415.

Scangos, G. und Ruddle, F.H. (1981). Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene*, **14**, 1-10.

Schaapveld, R.Q., Schepens, J.T., Robinson, G.W., Attema, J., Oerlemans, F.T., Fransen, J.A., Streuli, M., Wieringa, B., Hennighausen, L. und Hendriks, W.J. (1997). Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Dev. Biol.*, **188**, 134-146.

Schaller, M.D. und Parsons, J.T. (1993). Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.*, **3**, 258-262.

Schaller, M.D. und Parsons, J.T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for crk. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 2635-2645.

Schlessinger, J. (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 443-447.

Schlessinger, J. (1995). Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *The harvey lectures*, **89**, 105-123.

Seedorf, K., Felder, S., Millauer, B., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1991). Analysis of platelet-derived growth factor receptor domain function using a novel chimeric receptor approach. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12424, 12431.

Semba, K., Nishizawa, M., Miyajima, N., Yoshida, M.C., Sukegawa, J., Yamanashi, Y., Sasaki, M., Yamamoto, T. und Toyoshima, K. (1986). Yes-related proto-oncogene, syn, belongs to the protein tyrosine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5459-5463.

Serra-Pages, C., Saito, H. und Streuli, M. (1994). Mutational analysis of proprotein processing, subunit association, and shedding of the LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23632-23641.

Serra-Pages, C., Kedersha, N.L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A. und Streuli, M. (1995). The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J.*, **14**, 2827-2838.

Shen, S.H., Bastien, L., Posner, L. und Chretien, P. (1991). A protein tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein tyrosine kinases. *Nature*, **352**, 736-739.

Shenoy-Scaria, A.M., Timsongauen, L.K., Kwong, J., Shaw, A.S. und Lublin, D.M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 6385-6392.

Sheperd, P.R., Reaves, B.J. und Davidson, H.W. (1996). Phosphoinositide 3-kinase and membrane traffic. *Trends Cell Biol.*, **6**, 92-97.

Shibata, T., Ochiai, A., Kanai, Y., Akimoto, S., Gotoh, M., Yasui, N., Machinami, R. und Hirohashi, S. (1996). Dominant negative inhibition of the association between  $\beta$ -catenin and c-erbB2 by N-terminally deleted  $\beta$ -catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene*, **13**, 883-889.

Shitara, K., Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M. und Yamaguchi, Y. (1994). Brain-specific receptor-type protein-tyrosine-phosphatase RPTP $\beta$  is a chondroitin sulfate proteoglycan in vivo. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20189-20193.

- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Rajan, T.V., Yi, T., Ihle, J.N., Matthews, R.J., Thomas, M.L. und Beier, D.R. (1993). Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell*, **73**, 1445-1454.
- Sicheri, F., Moarefi, I. und Kuryan, J. (1997). Crystal structure of the src family tyrosine kinase Hck. *Nature*, **385**, 602-609.
- Slack, B.E., Breu, J., Petryniak, M.A., Srivastava, K. und Wurtman, R.J. (1995). Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of amyloid precursor protein secretion by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8337-8344.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. und McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. und Press, M.F. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. und Cantley, L.C. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, **72**, 767-778.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R.A. und Cantley, L.C. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of csk, 3BP2, fps/fes, Grb2, HCP, SHC, syk and vav. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 2777-2785.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Hall, L.R., Schlossman, S.F. und Saito, H. (1988). A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen. *J. Exp. Med.*, **168**, 1553-1562.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Tsai, A.Y.M. und Saito, H. (1989). A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8698-8702.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Thai, T. und Saito, H. (1990). Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA und LAR. *EMBO J.*, **9**, 2399-2407.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Ariniello, P.D., Tang, M., Munro, J.M., Blattler, W.A., Adler, D.A., Disteché, 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. (1996). Protein tyrosine phosphatases in signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188.
- Stuckey, J.A., Scheubert, H.L., Fauman, E.B., Zhang, Z.Y., Dixon, J.E. und Saper, M.A. (1994). Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5Å and the complex with tungstate. *Nature*, **370**, 571-575.
- Su, J., Batzer, A. und Sap, J. (1994). Receptor tyrosine phosphatase RPTP $\alpha$  is tyrosine-phosphorylated and associated with the adapter protein Grb2. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18731-18734.
- Su, J., Yang, L.-T. und Sap, J. (1996). Association between receptor protein-tyrosine phosphatase RPTP- $\alpha$  and the Grb2 adaptor: dual Src homology (SH)2.SH3 domain requirement and functional consequences. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28026-28096.

- Sukegawa, J., Semba, K., Yamanashi, Y., Nishizawa, M., Miyajima, N., Yamamoto, T. und Toyoshima, K. (1987). Characterization of cDNA clones for the human c-yes gene. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 41-47.
- Sun, H. und Tonks, N.K. (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signalling. *TIBS*, **19**, 480-485.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. und Finkel, T. (1995). *Science*, **270**, 296-299.
- 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 the SH3 domains of src. *EMBO. J.*, **12**, 2625-2634.
- Superti-Furga, G. und Gonfloni, S. (1997). A crystal milestone: the structure of regulated src. *Bioessays*, **19**, 447-450.
- Swarup, G., Kamatkar, S., Radha, V. und Rema, V. (1991). Molekular cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase showing homology with transcription factors fos and jun. *FEBS Letters*, **280**, 65-69.
- Takada, T., Matozaki, T., Takeda, H., Fukunaga, K., Noguchi, T., Fujioka, Y., Okazaki, I., Tsuda, M., Yamao, T., Ochi, F. und Kasuga, M. (1998). Role of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9234-9242.
- Takeda, H., Matozaki, T., Fujioka, Y., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Narumiya, S., Yamamoto, T. und Kasuga, M. (1998). Lysophosphatidic acid-induced association of SHP-2 with SHPS-1: roles of RHO, FAK and a SRC family kinase. *Oncogene*, **16**, 3019-3027.
- Takegawa, M., Itoh, F., Hinoda, Y., Arimura, Y., Toyota, M., Sekiya, M., Adachi, M., Imai, K. und Yachi, A. (1992). Cloning and characterization of a human cDNA encoding a novel putative cytoplasmic protein tyrosine phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **189**, 1223-1230.
- Takeya, T. und Hanafusa, H. (1983). Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell*, **32**, 881-890.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*, **268**, 251-255.
- Thomas, P.S. (1983). Hybridization of denatured RNA transferred or dotted nitrocellulose paper. *Meth. Enzymol.*, **100**, 255-266.
- Toledano-Katchalski, H. und Elson, A. (1999). The transmembranal and cytoplasmic forms of protein tyrosine phosphatase epsilon physically associate with the adaptor molecule Grb2. *Oncogene*, **18**, 5024-5031.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. und Fischer, E.H. (1988a). Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6722-6730.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. und Fischer, E.H. (1988b). Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6731-6737.
- Tracy, S., Van der Geer, P. und Hunter, T. (1995). The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTPalph $\alpha$ , is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10587-10594.

- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 205-215.
- Trowbridge, I.S. und Thomas, M.L., (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 85-116.
- Tsai, W., Morielli, A.D., Cachero, T.G. und Peralta, E.G. (1999). Receptor protein tyrosine phosphatase alpha participates in the m1 muscarinic acetylcholine receptor-dependent regulation of Kv1.2 channel activity. *EMBO J.*, **18**, 109-118.
- Tsuda, M., Matozaki, T., Fukunaga, K., Fujioka, Y., Imamato, A., Noguchi, T., Takada, T., Yamao, T., Takeda, H., Ochi, F., Yamamoto, T. und Kasuga, M. (1998). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13223-13229.
- Tsujikawa, K., Kawakami, N., Uchino, Y., Ichijo, T., Furukawa, T., Saito, H. und Yamamoto, H. (2001). Distinct function of the two protein tyrosine phosphatase domains of LAR (leukocyte common antigen-related) on tyrosine dephosphorylation of insulin receptor. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 271-280.
- Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C. und Kasuga, M. (1994). Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr<sup>538</sup> and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12220-12228.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, W.D. und Seeburg, P.H. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M. und Ramachandran, J. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, **313**, 756-761.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jakobs, S., Francke, U., Ramachandran, J. und Fujita-Yamaguchi, Y. (1986). Insulin-like growth factor 1 receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.*, **5**, 2503-2512.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Van Elten, R.A., Jackson, P. und Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*, **58**, 669-678.
- Van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **10**, 251-337.
- Van der Geer, P. und Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *TIBS*, **20**, 277-280.
- Vassar, R. (1992). Transgenic overexpression of transforming growth factor  $\alpha$  bypasses the need for c-Ha-ras mutations in mouse skin tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4643.

- Vecchi, M., Baulida, J. und Carpenter, G. (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18989-18995.
- Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Willingham, M.C., Merlino, G.T., Pastan, I. und Lowy, D.R. (1987). Epidermal growth factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science*, **238**, 1408-1410.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. und Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, **259**, 1611-1614.
- Wallace, M.J., Fladd, C.A., Batt, J. und Rotin, D. (1998). The second catalytic domain of protein tyrosine phosphatase delta (PTP delta) binds to and inhibits the first catalytic domain of PTP sigma. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2608-2616.
- Wallasch, C., Weiss, 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**, 4267-4275.
- Walton, K.M., Martell, K.J., Kwak, S.P., Dixon, J.E. und Largent, B.L. (1993). A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase is expressed during neurogenesis in the olfactory neuroepithelium. *Neuron*, **11**, 387-400.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C. und Chambon, P. (1984). Short and long range activation by the SV40 enhancer. *Nucleic Acid Res.*, **12**, 5589-5608.
- Weng, L.-P., Yuan, J. und Yu, Q. (1998). Overexpression of the transmembrane tyrosine phosphatase LAR activates the caspase pathway and induces apoptosis. *Curr. Biol.*, **8**, 247-256.
- Werb, Z. und Yan, Y. (1998). A cellular striptease act. *Science*, **282**, 1279-1280.
- Weiss, A., und Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76**, 263-274.
- White, M.F. (1994). The IRS-1 signaling system. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 47-54.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A. und De Vos, A.M. (1997). Cristal structure at 1,7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Fit-1 receptor. *Cell*, **91**, 695-704.
- Woodford-Thomas, T.A., Rhodes, J.D., Dixon, J.E. (1992). Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **117**, 401-414.
- Xu, W., Harrison, S.C. und Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-src. *Nature*, **385**, 595-602.
- Yan, H., Grossman, A., Wang, H., D'Eustachio, P., Mossie, K., Musacchio, J.M., Silvennoien, O. und Schlessinger, J. (1993). A novel receptor tyrosine phosphatase- $\sigma$  that is highly expressed in the nervous system. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24880-24886.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J. und Tonks, N.K. (1993). Cloning and expression of PTP-PEST. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6622-6628.
- Yang, X., Seow, K.T., Bahri, S.M., Oon, S.H. und Chia, W. (1991). Two Drosophila receptor-like tyrosine phosphatase genes are expressed in a subset of developing axons and pioneer neurons in the embryonic CNS. *Cell*, **67**, 661-673.

- Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M. und Evans, R.M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, **71**, 63-72.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.-D., McKeown, M., Cherbas, P. und Evans, R.M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, **366**, 476-479.
- Yarden, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U., Fried, V.A., Ullrich, A. und Williams, L.T. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, **323**, 226-232.
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. und Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.*, **6**, 3341-3351.
- Yarden, Y. und Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 443-478.
- Yee, N.S., Langen, H. und Besmer, P. (1993). Mechanism of kit ligand, phorbol ester and calcium-induced down-regulation of c-kit receptors in mast cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14189-14201.
- Yeung, Y.G., Berg, K.L., Pixley, F.J., Angelette, R.H. und Stanley, E.R. (1992). Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated on tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23447-23450.
- Yi, T., Cleveland, J.L. und Ihle, J.N. (1992). Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 836-846.
- 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**, 1051-1057.
- Zhai, Y.-F., Wirth, J.J., Welsch, C.W. und Esselmann, W.J. (1996). Protein tyrosine phosphatases: cellular regulators of human breast cancer. *Cancer Treat. Res.*, **83**, 107-125.
- Zhang, I.S. und Longo, F.M. (1995). LAR tyrosine phosphatase receptor: alternative splicing is preferential to the nervous system, coordinated with cell growth and generates novel isoforms containing extensive CAG-repeats. *J. Cell Biol.*, **128**, 415-431.
- Zhang, W.R., Hashimoto, N., Ahmad, F., Ding, W. und Goldstein, B.J. (1994). Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein tyrosine phosphatase in the leukocyte-common-antigen-related phosphatase family. *Biochem. J.*, **302**, 39-47.
- Zhang, Z.Y., Wang, Y., Wu, L., Faumann, E.B., Stuckey, J.A., Schubert, H.L., Saper, M.A. und Dixon, J.E. (1994a). The Cys(X)<sub>5</sub>Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry*, **33**, 15266-15270.
- Zhang, Z.Y., Wang, Y. und Dixon, J.E. (1994b). Dissecting the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1624-1627.
- Zhang, Z.Y. und Dixon, J.E. (1994). Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. USA*, **68**, 1-36.
- Zhao, Z., Shen, S.H. und Fischer, E.H. (1993). Stimulation by phospholipids of a protein tyrosine phosphatase containing two src homology 2 domains. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4521-4525.

---

Zhao, Z., Shen, S.H. und Fischer, E.H. (1994). Phorbol ester-induced expression, phosphorylation and translocation of protein-tyrosine-phosphatase 1C in HL-60 cells. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5007-5011.

Zheng, X.M., Resnick, R.J. und Shalloway, D. (2000). A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J.*, **19**, 964-978.

Ziemiecki, A., Harpur, A.G. und Wilks, A.F. (1994). JAK protein tyrosine kinases: their role in cytokine signalling. *Trends Cell Biol.*, **4**, 207-212.

Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K. und Ullrich, A. (1997). Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signalling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24767-24770

## 7 Abkürzungen

'	Minute
's	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cDNA	komplementäre cDNA
d. AG.	diese Arbeitsgruppe
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethelendiamintetraacetat
EGTA	N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
ETNR	Endothelinrezeptor
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötale Kälberserum
G418	Genetecin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinN'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
β-HRG	β-Heregulin
Hyg <sup>r</sup>	Hygromycinresistenz
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat

---

IRES	Internal ribosome entry site
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidylsäure
LAR	Leucocyte common antigen-related
M1R	M1 muscarinischer Acetylcholinreceptor
MAP Kinase	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minute
Neo <sup>r</sup>	Neomycinresistenz
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie-Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTB	Phosphotyrosine binding
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTX	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH2/3-Domäne	Src Homologie 2/3 Domäne
SHP-2	SH2-containing PTP-2
Sos	Son of sevenless
SRE	Serum response element
SRF	Serum response factor
TACE	TNF- $\alpha$ converting enzyme
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TF	Transkriptionsfaktor
TM	Transmembranhelix
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	Enzymaktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Nachwort

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, sein stetes Interesse sowie der Einräumung besonderer Freiräume und bester Arbeitsbedingungen. Damit verbunden möchte ich Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die hervorragende Atmosphäre in seinem Labor, die unvergeßlichen Erlebnisse und die Ausbildung weit über den wissenschaftlichen Bereich hinaus besonders danken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für seine Bereitschaft bedanken, meine Dissertation zu betreuen und an der Fakultät für Chemie und Pharmazie die Ludwig-Maximilians-Universität zu vertreten.

Für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Zeit im Labor möchte ich mich bei Martin, Esther, Stefan, Michael, Beatrix, Reimar, Jan, Marc, Oliver, Sylvia, Miriam, Susanne, Tatjana Knyazeva, Pjotr Knyazev, Yuri Cheburkin und Sylvia Gärtner bedanken. Besonders danken möchte ich vor allem Uta, Renate Gautsch und Renate Hornberger. Herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Irmi Sures, Herrn Dr. Henrik Daub, Norbert, Johannes und Andreas Gschwind für die guten und fruchtbaren Gespräche.

Besonders danken möchte ich Norbert, Johannes und Esther für die vielen schönen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors, aber auch für ihre Freundschaft in nicht ganz so angenehmen Momenten.

Nicht genug kann ich meinen Eltern und meinem Bruder Jörg für die nie endende Unterstützung danken.



## Lebenslauf

Name: Jens Ruhe  
Geburtsdatum: 2. Oktober 1970  
Geburtsort: Coburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Auenstraße 26, 80469 München

### Schulausbildung:

1977-1981 Grundschule am Moos, Neustadt bei Coburg  
1982-1990 Arnold-Gymnasium, Neustadt bei Coburg – Abitur 1990

### Akademische Ausbildung:

10/1990-9/1992: Grundstudium der Biologie an der Universität Konstanz  
10/1992-4/1995: Hauptstudium der Biologie an der Universität Konstanz  
5/1993-7/1993: Tätigkeit als Hilfwissenschaftler am Lehrstuhl für Immunologie der Universität Konstanz  
5/1995-6/1996: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Konstanz mit dem Thema: Untersuchungen zum Mechanismus der Transkription und zur Regulation der Expression von RpoN- einem alternativen Sigmafaktor in *Escherichia coli*  
8/1996-1/1997: Wissenschaftliche Tätigkeit in der Abteilung „Molekularbiologie der Zelle II“ am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg  
5/1997-9/2001: Doktorarbeit in der Abteilung für Molekularbiologie, Prof. Dr. Axel Ullrich, am Max-Planck-Institut für Biochemie mit dem Thema: Untersuchungen zur pathophysiologischen Funktion der Proteintyrosinphosphatase PTP-LAR in Mammakarzinomzellen  
ab 10/2001: Wissenschaftlicher Angestellter bei U3 Pharma AG