

# **Oxidationsabhängiger Abbau der Proteintyrosinphosphatase PTP1B durch Calpain als regulatorischer Mechanismus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen  
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena



von Dipl.-Biochem. Antje Trümpler  
geboren am 25. August 1980 in Nordhausen

Gutachter

: **Prof. Dr. rer. nat. Frank-D. Böhmer**  
Institut für Molekulare Zellbiologie  
CMB – Zentrum für Molekulare Biomedizin  
Hans-Knöll-Str. 2  
07745 Jena  
Tel.: 03641-9395631  
Fax: 03641-9395602

**Prof. Dr. rer. nat. Peter Herrlich**  
Leibniz-Institut für Altersforschung  
– Fritz-Lipmann-Institut  
Beutenbergstr. 11  
07745 Jena  
Tel.: 03641-656334  
Fax: 03641-659335

**Prof. Dr. rer. nat. Reiner Lammers**  
Medizinische Klinik IV  
Otfried-Müller Str.10  
72076 Tübingen  
Tel.: 07071-2987599  
Fax: 07071-295974

Dissertation eingereicht am : 20.08.2009

Tag der Disputation : 30.11.2009

# INHALT

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1      | Proteintyrosinphosphatasen .....                                       | 4         |
| 2.1.1    | <i>Übersicht über die klassischen Proteintyrosinphosphatasen .....</i> | <i>5</i>  |
| 2.1.2    | <i>Katalysereaktion der Proteintyrosinphosphatasen.....</i>            | <i>6</i>  |
| 2.1.3    | <i>Mechanismen der Regulation.....</i>                                 | <i>7</i>  |
| 2.1.4    | <i>Struktur und Funktion der Proteintyrosinphosphatase PTP1B.....</i>  | <i>10</i> |
| 2.2      | Calpaine .....   | 13        |
| 2.2.1    | <i>Klassifizierung / Übersicht .....</i>                               | <i>13</i> |
| 2.2.2    | <i>Aktivierung und Regulation .....</i>                                | <i>15</i> |
| 2.2.3    | <i>Substraterkennung .....</i>   | <i>16</i> |
| 2.2.4    | <i>Die Rolle der Calpaine in Physiologie und Pathologie.....</i>       | <i>16</i> |
| 2.3      | Reaktive Sauerstoffspezies .....                                       | 18        |
| 2.3.1    | <i>Quellen reaktiver Sauerstoffspezies.....</i>                        | <i>19</i> |
| 2.3.2    | <i>Zelluläre Schutzmechanismen gegen Oxidation .....</i>               | <i>20</i> |
| 2.3.3    | <i>ROS als Signalmoleküle.....</i>                                     | <i>21</i> |
| 2.4      | UV-Strahlung.....  | 21        |
| 2.4.1    | <i>Physikalische Eigenschaften der solaren UV-Strahlung .....</i>      | <i>21</i> |
| 2.4.2    | <i>Photobiologische Effekte von UV-Strahlung .....</i>                 | <i>22</i> |
| 2.5      | Zielstellung .....   | 26        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                     | <b>27</b> |
| 3.1      | Materialien.....   | 27        |
| 3.1.1    | <i>Chemikalien und Antikörper .....</i>                                | <i>27</i> |
| 3.1.2    | <i>Primer .....</i>  | <i>28</i> |
| 3.1.3    | <i>Plasmide.....</i>   | <i>31</i> |
| 3.2      | Methoden.....  | 32        |
| 3.2.1    | <i>Mutagenese .....</i>  | <i>32</i> |
| 3.2.2    | <i>Rekombinante Expression und Aufreinigung von PTP1B.....</i>         | <i>32</i> |
| 3.2.3    | <i>Analyse der Phosphatase-Aktivität mittels pNPP-Assay .....</i>      | <i>34</i> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.4    | <i>Bestimmung von <math>K_M</math> und <math>v_{Max}</math></i> .....  | 34        |
| 3.2.5    | <i>In vitro-Verdau von PTP1B</i> .....   | 34        |
| 3.2.6    | <i>Assoziationsanalyse</i> .....   | 35        |
| 3.2.7    | <i>In-Gel-Phosphatase-Assay</i> .....  | 36        |
| 3.2.8    | <i>Zellkultur, Transfektion und Erzeugung stabiler Linien</i> .....  | 37        |
| 3.2.9    | <i>Lyse, Proteinbestimmung, IP</i> .....   | 38        |
| 3.2.10   | <i>UV-Bestrahlung von Zellen</i> .....   | 39        |
| 3.2.11   | <i>Zellstimulation</i> .....   | 40        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....  | <b>41</b> |
| 4.1      | <i>In vitro-Analyse des oxidationsabhängigen Abbaus von PTP1B durch Calpain</i> .....  | 41        |
| 4.1.1    | <i>Reversible Oxidation von PTP1B in vitro führt zu erhöhter Spaltung durch Calpain</i> .....  | 41        |
| 4.1.2    | <i>Oxidationsabhängige Spaltung von PTP1B durch Calpain führt zum Verlust des N-Terminus und zur Inaktivierung der Phosphatase</i> ..... | 46        |
| 4.1.3    | <i>Die Oxidation des katalytischen Zentrums führt zur Spaltung von PTP1B auf der Rückseite der katalytischen Domäne</i> .....            | 50        |
| 4.1.4    | <i>Mutagenese der die Spaltstelle umgebenden Aminosäuren führt nicht zur Blockierung der oxidationsspezifischen Spaltung</i> .....       | 53        |
| 4.1.5    | <i>Die Bindung von PTP1B an Calpain ist nach Oxidation stark erhöht</i> .....  | 57        |
| 4.2      | <i>Analyse des oxidationsspezifischen PTP1B-Abbaus nach UV-A-Bestrahlung in verschiedenen Zellsystemen</i> .....                         | 61        |
| 4.2.1    | <i>Analyse des UV-induzierten PTP1B-Abbaus mit Hilfe von rekonstituierten PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs</i> .....                             | 61        |
| 4.2.2    | <i>Analyse im Überexpressionsmodell von His-getaggtter PTP1B in HeLa-Zellen</i> .....  | 62        |
| 4.2.3    | <i>Überprüfung des Analyse-Systems in A431-Zellen</i> .....  | 63        |
| 4.3      | <i>Potenzielle physiologische Rolle des oxidationsspezifischen Abbaus von PTP1B durch Calpain</i> .....                                  | 65        |
| 4.3.1    | <i>Die Stimulation von HUVEC-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ionomycin führt nicht zum Abbau von PTP1B</i> .....               | 65        |
| 4.3.2    | <i>Einfluss der Hemmung der konstitutiven Aktivität von Bcr/Abl durch STI571 auf die Spiegel von PTP1B und SHP-1</i> .....               | 66        |
| 4.3.3    | <i>Insulinstimulation führt zu moderatem Verlust von PTP1B im Überexpressionsmodell</i> .....  | 67        |
| 4.3.4    | <i>Einfluss der Calpain-Aktivität auf Signalwege unterhalb des Insulinrezeptors</i> .....  | 68        |
| 4.3.5    | <i>Eine oxidationsspezifische PTP1B-Calpain-Interaktion ist in Zellen nicht nachweisbar</i> .....  | 70        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>72</b> |
| 5.1      | Oxidationsspezifische Spaltung von PTP1B .....  | 73        |
| 5.2      | Physiologische Bedeutung der oxidationsspezifischen Spaltung von<br>Proteintyrosinphosphatasen durch Calpain..... | 81        |
| <b>6</b> | <b>REFERENZEN.....</b>  | <b>87</b> |
| <b>7</b> | <b>ANHANG .....</b>   | <b>95</b> |
| 7.1      | Abkürzungsverzeichnis .....   | 95        |
| 7.2      | Danksagung .....  | 96        |
| 7.3      | Curriculum vitae .....  | 97        |
| 7.4      | Ehrenwörtliche Erklärung.....   | 99        |

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation zellulärer Signalwege erfolgt unter anderem über die kontrollierte Aktivität von Proteintyrosinkinase und Proteintyrosinphosphatasen (PTP). Letztere sind in der Lage, phosphorylierte Tyrosinreste zu dephosphorylieren und damit die Signaleigenschaften und gegebenenfalls die Aktivität der Substrate zu verändern. Die Kontrolle der PTP-Aktivität wiederum erfolgt auf vielen Ebenen. Hierzu gehören, je nach PTP, Expression und Protein-stabilität, kovalente Modifikationen, wie Phosphorylierung oder SUMOylierung, zelluläre Lokalisation und Interaktion mit regulatorischen Proteinen, sowie die Dimerisierung. Ein weiterer Faktor ist die Oxidation des in klassischen PTP deprotoniert vorliegenden Cysteins, das für die Katalyse der Dephosphorylierungsreaktion notwendig ist. Die Oxidation dieses Cysteins durch erhöhte zelluläre Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) geht mit einer (zumeist reversiblen) Inaktivierung der PTP einher. Sie ist zum Beispiel im Falle der Stimulation von Zellen mit mitogenen Faktoren, zum Beispiel Insulin, für die vollständige Rezeptoraktivierung notwendig. Zu den weiteren Stimuli, die eine PTP-Oxidation in der Zelle auslösen können, gehört die Bestrahlung mit UV-A- und UV-B-Licht. Infolge einer UV-Behandlung von Zellen erfolgt neben der oxidativen Hemmung zudem auch ein Calpain-abhängiger Abbau von verschiedenen PTP, der mit einer Liganden-unabhängigen EGFR-Aktivierung einhergeht. Die Integration der Calpain-Aktivierung und PTP-Oxidation führt zu einem weiteren regulatorischen Eingriff in die PTP-Aktivität. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine genauere Charakterisierung dieses neuen Regulationsmechanismus.

Es gelang, die Abbaubedingungen von PTP-Oxidation und gleichzeitiger Calpain-Aktivierung *in vitro* mit aufgereinigten Proteinen zu rekonstruieren. Hierfür wurde PTP1B als Modell gewählt, da diese PTP bereits sehr gut charakterisiert ist und bereits Kristallstrukturen der verschiedenen Oxidationszustände aufgeklärt sind. Es konnte gezeigt werden, dass die reversible Oxidation des katalytischen Cysteins Voraussetzung für die Spaltung durch Calpain ist. Eine Hauptspaltstelle innerhalb der katalytischen Domäne wurde identifiziert, deren Spaltung zu einer dauerhaften Inaktivierung der Phosphatase führt. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Bindung der oxidierten PTP1B an Calpain, unabhängig von dessen Aktivierungszustand, detektiert. Darauf basierend und mit Hilfe verschiedener Mutanten konnte folgendes Modell der oxidationsspezifischen Spaltung entwickelt werden: 1.) Die Konformationsänderungen infolge der Oxidation führen zu einer verstärkten Bindung der PTP an Calpain, an einer Domäne jenseits des katalytischen Zentrums. 2.) Aktives Calpain spaltet dadurch die oxidierte PTP deutlich effizienter, wobei die Spaltung an der dem katalytischen Zentrum

abgewandten Seite der PTP erfolgt. 3.) Eine Mutationsanalyse ergab, dass die Primärsequenz in der Umgebung der Spaltstelle von untergeordneter Bedeutung für die Effizienz der Spaltung ist.

Eine weitere Untersuchung des identifizierten Regulationsprinzips in UV-bestrahlten Zellen war aufgrund der instabilen Resultate nicht möglich. Es ist denkbar, dass noch unbekannte Gegenregulations-Mechanismen in das System eingreifen und diese dringend näher untersucht werden müssen. Mit Hilfe von Calpain-negativen Zellen gelang es jedoch, eine aktivierende Funktion des Calpains im Insulin-Signalweg zu zeigen. Die Insulin-stimulierte Aktivierung der Signalmoleküle AKT und S6-Kinase war in Abwesenheit von Calpain-4 stark reduziert. Obwohl eine Rolle in diesem System noch nicht nachgewiesen werden konnte, wäre der oxidationsspezifische PTP-Abbau durch Calpain ein möglicher Mechanismus, mittels dessen Calpain die Signalweiterleitung moduliert. Eine weiterführende Untersuchung dieses Phänomens kann möglicherweise Zusammenhänge zwischen Calpain und der Deregulation der Insulin-Signalübertragung beim Diabetes mellitus aufdecken.

## **ABSTRACT**

The controlled action of protein tyrosine kinases and phosphatases (PTPs) is a key step in regulation of cellular signalling. PTPs are able to dephosphorylate phosphotyrosine residues thereby modifying structural properties and, if applicable, catalytic activity of their substrates. The activity of PTPs is tightly regulated e.g. by expression and protein stability, covalent modifications such as phosphorylation and SUMOylation state, cellular localization and interaction with regulatory molecules, as well as dimerization. An important feature of classical PTPs is a deprotonated cysteine residue in the catalytic centre which is essential for catalysis of dephosphorylation reactions. However, this cysteine residue is highly susceptible to oxidation by elevated cellular levels of reactive oxygen species (ROS). Oxidation is accompanied by (generally reversible) inactivation of the PTPs and has been shown to be important for full receptor activation in case of stimulation of cells with mitogenic factors, notably with insulin. Among other stimuli which can cause PTP oxidation in cells is UV-radiation. Following UV treatment of different cell types – besides an oxidative inhibition – a calpain-dependent degradation of several PTPs has been observed. This effect has been shown to be responsible for ligand-independent activation of EGF receptor activation in response to UV irradiation. In the present thesis a more detailed understanding of this novel mechanism of PTP regulation has been achieved.

The oxidation specific cleavage of PTPs by calpain has been reconstituted *in vitro*. PTP1B was chosen as model since it is well characterized and crystal structures for the different oxidation states are available. In this dissertation it has been shown that specifically the reversible oxidation of the catalytic cysteine is pre-requisite for calpain-mediated cleavage. A major cleavage site within the catalytic domain has been identified and oxidation specific cleavage has been shown to lead to permanent inactivation of the PTP. Furthermore, an increased oxidation of PTP1B is associated with an enhanced binding to calpain independent of its activation state (presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$ ). Based on this and the analysis of different PTP1B mutants the following model of oxidation specific PTP cleavage is proposed: 1) Oxidation induced changes in protein conformation lead to increased association of PTP1B with calpain at a domain different from the catalytic domain of the latter. 2) The induced association enhances cleavage of PTP1B by the active calpain. 3) An exposed loop at the backside of the phosphatase is cleaved. Mutant analysis revealed that the primary sequence environment of the cleavage site in the loop is of minor importance.

Investigation of this novel regulatory mechanism in UV irradiated cells had to be discontinued due to instability of results. Potentially the investigated PTP degradation is counteracted in this system by yet unknown mechanisms which need further investigation. In a calpain negative background, however, an activating function of calpain in insulin signalling has been found. Notably, the insulin stimulated activation of the signalling molecules AKT and S6-kinase is severely impaired in the absence of calpain-4. The insulin induced oxidation of PTPs is well established and a calpain mediated cleavage of oxidized PTPs would be a reasonable explanation for the observed effect on insulin downstream signalling. Although a role of oxidation-induced PTP degradation has not yet been possible to be proved in this context, it is tempting to speculate on an involvement of calpain in modulation of insulin signalling. More detailed investigations of the observed phenomenon could reveal roles of calpain for deregulated insulin signalling in diabetes mellitus.



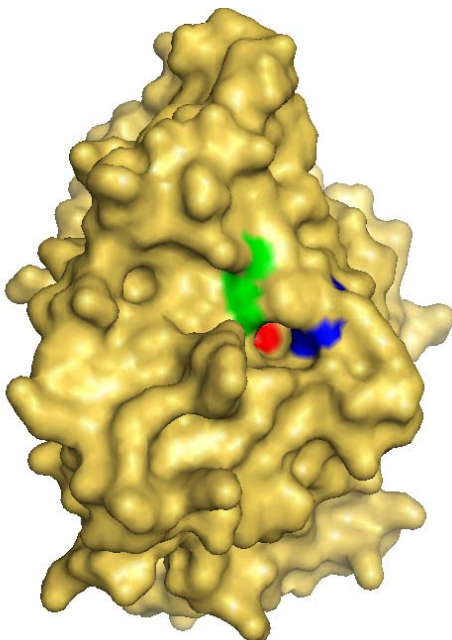
## 2 EINLEITUNG

Die Regulation zellulärer Signalwege erfolgt durch fein abgestimmte Systeme und ermöglicht die Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse. Reversible Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung oder SUMOylierung, stellen neben der Expressionsregulation den wichtigsten Regulationsmechanismus von Proteinen dar. Für diese Zwecke ist eine Vielzahl von Enzymen vorhanden, die ihrerseits auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Die Tyrosinphosphorylierung stellt einen zentralen Mechanismus bei der Signalübertragung von Wachstumsfaktorrezeptoren dar. Diese sind Rezeptortyrosinkinasen (RTK), d.h. sie werden durch die Bindung der Wachstumsfaktoren aktiviert und phosphorylieren sich selbst sowie ihre Substrate. Dadurch wird die Bindung von Adaptorproteinen und weiteren Signalmolekülen ermöglicht, die wiederum die nächsten Proteinkinasen aktivieren können. Es folgt eine ganze Kaskade (MAP-Kinase-Kaskade) von aktivierten Kinasen bis zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Expressionsinduktion verschiedener zellteilungsstimulierender Proteine (zum Beispiel so genannte „immediate early genes“). Auf diese Weise werden neben der Proliferation auch die Migration und Adhäsion der Zellen reguliert. Natürlich ist bei diesen Prozessen eine genaue Kontrolle notwendig, um die Signale zu begrenzen bzw. unter bestimmten Umständen zu verhindern. Einen Regulator, um die Signale wieder abzuschalten oder die Rezeptoren im Grundzustand inaktiv zu halten, repräsentieren Proteintyrosinphosphatasen (PTP). Sie sind in der Lage, RTK und deren Substrate zu dephosphorylieren und deren Aktivität zu beeinflussen. Während einige Phosphatasen verhältnismäßig unspezifisch agieren, gibt es auch Phosphatasen, die selektiv einzelne Tyrosin-Reste dephosphorylieren und somit eher zur Modulation als dem Abschalten der weiterführenden Signalkaskade führen. Obwohl einige PTP auch positiv regulierend in Signalketten eingreifen können (zum Beispiel SHP-2), gelten die meisten Familienmitglieder als negative Regulatoren, einige sogar als Tumorsuppressoren. Störungen in der Aktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren durch die Überexpression oder Mutationen der RTK oder das Fehlen der regulierenden PTP sind in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen zu beobachten und erste Tyrosinkinase-Inhibitoren werden in der Krebs-Therapie eingesetzt (zum Beispiel Imatinib).

### 2.1 *Proteintyrosinphosphatasen*

Von 107 im menschlichen Genom vorhandenen PTP-Genen kodieren 38 so genannte klassische PTP (Andersen *et al.*, 2001). Diese hydrolysieren exklusiv Tyrosin-Phosphate. Zu den weiteren Subgruppen gehören unter anderem die dual-spezifischen PTP (DUSP),

niedermolekulare PTP (LMW-PTP) und die PTP der Eya-Familie (Alonso *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2001). Viele der „nicht-klassischen“ PTP können neben Phosphotyrosinen auch andere phosphorylierte Strukturen dephosphorylieren (zum Beispiel Phospho-Serine oder Phospholipide). Eine wesentliche Determinante der hohen Substratspezifität der Phosphotyrosin-spezifischen PTP ist die engere und tiefere katalytische Tasche (siehe Abbildung 1). Die meisten PTP zeigen zudem eine starke Substratspezifität für bestimmte Proteine und sogar bezüglich einzelner Phosphotyrosin-Reste innerhalb eines Proteins. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die benachbarten Aminosäuren des Phosphotyrosins und ihre Wechselwirkungen mit der PTP (Östman *et al.*, 2006). Eine weitere Voraussetzung ist die Zugänglichkeit zu potenziellen Substraten für bestimmte PTP durch zelluläre Ko-Lokalisation (Haj *et al.*, 2002; Mauro and Dixon, 1994).



**Abbildung 1**    **Oberflächendarstellung der Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PTP1B**

Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PTP1B (aa 1-321) ist in der Oberflächenansicht dargestellt. Das katalytische Cystein wurde zur Veranschaulichung des aktiven Zentrums und des engen Substratkanals rot gefärbt. Weitere Aminosäuren, die für die Katalysereaktion essenziell sind, sind Asp181 (blau) und Gln262 (grün).

Die Abbildung wurde mit den Daten der veröffentlichten Kristallstruktur 1SUG (Barford *et al.*, 1994) und unter Verwendung von PyMol erstellt (DeLano, 2006).

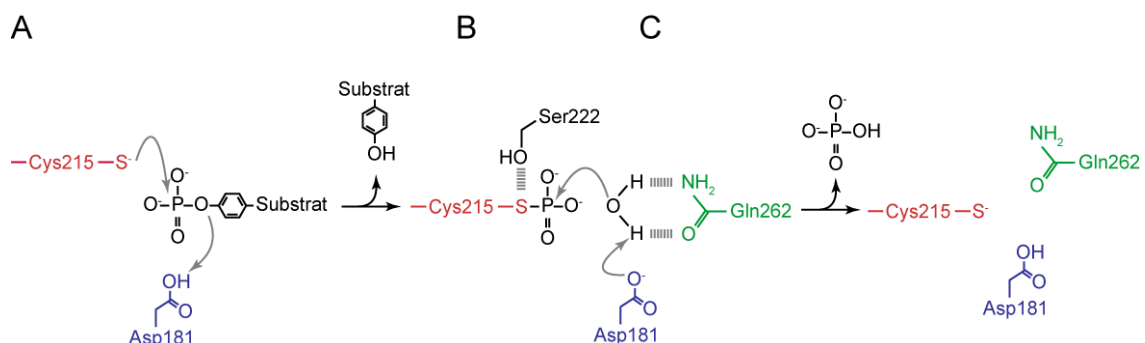
### **2.1.1 Übersicht über die klassischen Proteintyrosinphosphatasen**

Die klassischen PTP werden in zwei Familien unterteilt. Die Nicht-Rezeptor-PTP besitzen neben der katalytischen Domäne in der Regel weitere Domänen, wie beispielsweise SH2- oder SH3-Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Zu den zytoplasmatischen PTP gehören unter anderem PTP1B, SHP-1 oder TC-PTP (T-Zell-PTP). Neben den zytoplasmatischen PTP gibt es auch 21 PTP mit einer Transmembrandomäne. Sie werden deshalb als Rezeptor-ähnliche PTP (RPTP) bezeichnet. Viele davon besitzen im extrazellulären Teil für Zelladhäsionsmoleküle typische Domänen, zum Beispiel Fibronectin-III-ähnliche Domänen. RPTP werden wahrscheinlich durch Ligandenbindung reguliert und für sie wird eine Bedeutung bei Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten vermutet. Im zytosolischen Teil der

RPTP befindet sich neben der katalytischen PTP-Domäne (D1) oftmals eine weitere PTP-homologe Domäne (D2), die weniger oder teilweise auch gar nicht enzymatisch aktiv ist. Zu den bislang am besten untersuchten RPTP gehören LAR, RPTP $\alpha$  und CD45 (Östman *et al.*, 2006; Tonks, 2006).

### 2.1.2 Katalysereaktion der Proteintyrosinphosphatasen

Die katalytische Domäne der klassischen PTP besteht aus etwa 280 Aminosäuren und ist durch mehrere kurze Sequenzmotive definiert. Im aktiven Zentrum befindet sich bei allen die Konsensussequenz HCXXGXXRS/T (X bezeichnet beliebige Aminosäurereste), mit einem Cystein als essenzielles Nukleophil für die Hydrolyse-Reaktion. Die chemische Umgebung des katalytischen Cystein-Restes führt zu einer Absenkung des pKa-Wertes der Sulfidgruppe im Cystein auf etwa 5,4 und unter zellulären Bedingungen zu einer Deprotonierung (Cys-S<sup>-</sup>) (Lohse *et al.*, 1997). Durch diese Anionbildung ist der Schwefel in der Lage, gegenüber dem Phosphoratom des Phospho-Substrats als Nukleophil zu agieren (siehe Abbildung 2A). Dieser Angriff wird durch eine ebenfalls konservierte Asparaginsäure der PTP unterstützt, die als Protonendonator für das Tyrosin fungiert. Im ersten Reaktionsschritt wird das dephosphorylierte Substrat bereits freigesetzt, während sich übergangsweise eine kovalente Bindung zwischen dem Phosphatrest und dem Cystein-Schwefel ausbildet (siehe Abbildung 2B). Die Seitenkette eines ebenfalls stark konservierten Glutamins im aktiven Zentrum koordiniert ein Wassermolekül, das im anschließenden nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom für die Ablösung des Phosphatrestes vom katalytischen Zentrum verantwortlich ist. Dabei wird ein frei werdendes Proton des Wassermoleküls auf den invarianten Aspartat-Rest übertragen (siehe Abbildung 2C).



**Abbildung 2 Reaktionsmechanismus der Dephosphorylierungsreaktion durch Proteintyrosinphosphatasen**

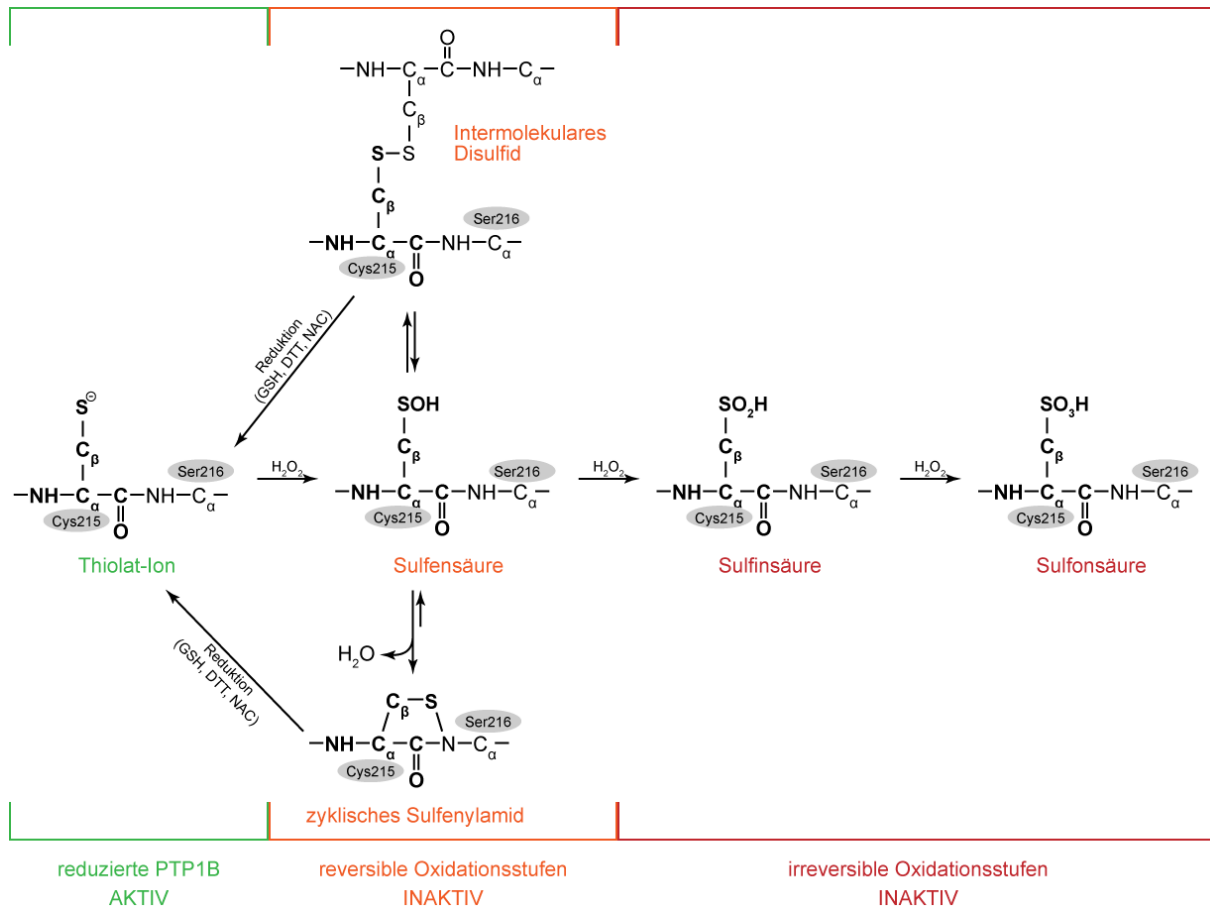
Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe bei der Substrat-Dephosphorylierung durch PTP. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der humanen PTP1B, die Farbcodierung erfolgte wie in Abbildung 1. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus (Monteiro *et al.*, 2008).

### **2.1.3 Mechanismen der Regulation**

Aufgrund ihrer Bedeutung in der Signalregulation stehen nicht nur Tyrosinkinassen sondern auch ihre Gegenspieler, die PTP, unter stringenter Kontrolle. Während einige PTP unter physiologischen Bedingungen aktiv sind und zum Beispiel die basale Aktivierung von RTK sowie anderen Tyrosinkinassen verhindern, gibt es auch andere PTP, deren Aktivierung nur unter bestimmten Umständen benötigt wird. Die Regulation der verschiedenen PTP-Familienmitglieder erfolgt auf sehr unterschiedlichen Wegen. Die Mechanismen sind bislang nicht für alle PTP bekannt. Für einige PTP (z. B. PTP1B oder RPTP $\alpha$ ) wurden sie dagegen bereits umfangreich untersucht. Im diesem Abschnitt sollen einige Ebenen der Regulation anhand von Beispielen kurz vorgestellt werden.

#### **Oxidation**

Im katalytischen Zentrum der PTP befindet sich ein nukleophiler, deprotonierter Cystein-Rest, der für die Dephosphorylierung der Substrate essenziell ist. Aus der Deprotonierung des Cysteins resultiert jedoch auch eine erhöhte Empfindlichkeit für eine Oxidation des Schwefels, welche dann zu einer Inaktivierung der PTP führt. Verantwortlich für die Oxidation sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Je nach Stärke der Oxidation kommt es zur Ausbildung von Sulfensäure (Cys-S-OH), Sulfinsäure (Cys-S-O<sub>2</sub>H) oder Sulfonsäure (Cys-S-O<sub>3</sub>H), wobei nur die Sulfensäure durch Reduktionsmittel wie Glutathion oder Thioredoxin wieder reduziert und damit reaktivierbar ist. Die beiden höher oxidierten Produkte (Sulfin- und Sulfonsäure) gelten unter zellulären Bedingungen als irreversibel oxidiert. Eine irreversible Oxidation wird offenbar teilweise durch eine schnelle Umwandlung der Sulfensäure-Intermediate in stabilere Formen verhindert. So konnte für PTP1B eine Umwandlung zu einem intramolekularen Sulfenylamid (siehe Abbildung 3) nachgewiesen werden (Salmeen *et al.*, 2003; van Montfort *et al.*, 2003). Diese Zyklisierung schützt das katalytische Cystein (Cys215 in PTP1B) vor einer weiteren Oxidation und führt zu Konformationsänderungen. Für PTP1B ist außerdem auch die Bildung eines Cys215-Glutathion-Intermediates nach Oxidation als Folge einer EGF-Stimulation nachgewiesen (Barrett *et al.*, 1999). Vor kurzem konnte allerdings auch ein nicht unerheblicher Teil irreversibel oxidiertem PTP1B in A431- und HepG2-Zellen detektiert werden. Es wird eine Rolle dieser permanenten Inaktivierung für den transformierten Phänotyp der Krebszelllinien angenommen (Lou *et al.*, 2008).



**Abbildung 3 Oxidationsstufen am Beispiel von PTP1B**

Durch die Oxidation des katalytischen Cysteins-215 kommt es zunächst zur Bildung eines relativ kurzlebigen Sulfensäure-Intermediates. Im Folgenden kommt es zu einer Disulfidbindung (zum Beispiel mit Glutathion) oder auch einer schnellen Umwandlung in das stabile Sulfenylamid unter Ringschluss des Schwefels mit dem Stickstoff-Atom der benachbarten Aminosäure Serin-216. Dies schützt die Phosphatase offenbar vor weiterer, irreversibler Oxidation zu Sulfin- und Sulfonsäure. Durch Reduktionsäquivalente wie Glutathion (GSH) oder N-Acetylcystein (NAC) können die reversiblen Oxidationsstufen reaktiviert werden.

### Weitere Regulationsprinzipien

Neben der oxidativen Inhibition gibt es noch eine Reihe weiterer Mechanismen, die die Aktivität von PTP regulieren können. Wie bei allen Proteinen erfolgt die Regulation natürlich auch bei den PTP über die Kontrolle der Expressionsspiegel und der Proteinstabilität. Einige PTP, wie zum Beispiel PTP1B und SHP-2, werden in allen Zellen exprimiert, während andere eine starke Gewebespezifität aufweisen und nur in neuronalen oder hämatopoetischen Zellen zu finden sind (Dadke *et al.*, 2007; den Hertog *et al.*, 2008; Feng, 1999; Neel and Tonks, 1997). Auch die Lokalisation innerhalb der Zelle bestimmt die Aktivität gegenüber gewissen Substraten (Mauro and Dixon, 1994). Nachfolgend wird beispielhaft auf weitere Regulationsmechanismen eingegangen.

Ligandenbindung und Dimerisierung bei Rezeptor-ähnlichen PTP

Ähnlich wie RTK wird auch bei Rezeptor-ähnlichen PTP davon ausgegangen, dass eine Ligandenbindung zu Aktivitätsänderungen beitragen kann. Von PTP $\zeta$  ist bekannt, dass diese PTP durch die Bindung des Zytokins Pleiotrophin gehemmt wird. Die dadurch erhöhte Tyrosinphosphorylierung ihrer Substrate  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Adducin und p190 Rho-GAP reguliert die Zelladhäsion und beeinflusst das Zytoskelett der Zelle (Fukada *et al.*, 2006). Für LAR-PTP gibt es sowohl aktivierende (Syndecan) als auch inhibierende (Dallylike-Protein, dlp) Liganden (Fox and Zinn, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Für die Rezeptor-ähnliche PTP $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass die PTP-Domäne inaktive Homodimere bilden kann. Dabei blockiert eine Helix-Loop-Helix-Struktur in Form eines „Keils“ der einen D1-Domäne das katalytische Zentrum der anderen und umgekehrt (Bilwes *et al.*, 1996), während zahlreiche Interaktionen anderer Proteinbereiche die Dimere stabilisieren. Durch die Bindung potenzieller Liganden oder die Oxidation der sehr oxidationsempfindlichen D2-Domäne kann diese Homodimerisierung beeinflusst und die Aktivität von RPTP $\alpha$  somit moduliert werden (Blanchetot *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 1999).

Phosphorylierung

Sowohl die Phosphorylierung durch Serin-/Threoninkinasen, als auch die Tyrosinphosphorylierung können bei der Regulation von PTP eine Rolle spielen. Als Beispiel hierfür sei die aktivierende Tyr-542-Phosphorylierung von SHP-2 durch den PDGF-Rezeptor genannt. Weiterhin entsteht durch diese Phosphorylierung eine Bindestelle für die SH2-Domäne des Adaptorproteins Grb2, das die Signalweiterleitung zum Ras-ERK-Signalweg ermöglicht (Vogel *et al.*, 1993). Daneben ist für SHP-1 ebenfalls eine aktivierende Tyrosinphosphorylierung durch den Insulin-Rezeptor und die src-Kinase beschrieben (Frank *et al.*, 2004; Liu and Chernoff, 1997; Uchida *et al.*, 1994). Hingegen wird nach TPA- oder Forskolin-Stimulation von HeLa-Zellen eine Phosphorylierung von Ser39 und Ser435 von PTP-PEST beobachtet, die mit einer reduzierten PTP-Aktivität einhergeht (Garton and Tonks, 1994).

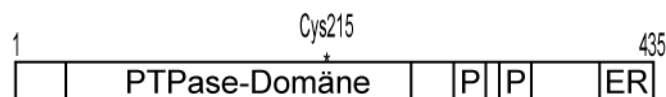
SUMOylierung

Eine weitere kürzlich entdeckte Regulationsebene ist die SUMOylierung. Dabei werden kleine Proteine (SUMO steht für „small ubiquitin-like modifier“) kovalent an die Lysine gebunden (Guo *et al.*, 2007). PTP1B wird in einer PIAS (Protein-Inhibitor von STAT1)-abhängigen Reaktion nach Insulinstimulation an den C-terminalen Resten Lys335 und Lys347 SUMOyliert (Dadke *et al.*, 2007). Diese Modifikation bewirkt eine reduzierte Aktivität von PTP1B. Die Expression einer nicht-SUMOylierbaren Mutante oder der Knock-out von PIAS schwächt die Insulinrezeptor-Aktivierung (Dadke *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen

der Phosphatase-Inhibition durch SUMOylierung sind bislang noch nicht geklärt. Unklar ist außerdem, ob auch andere PTP von dieser Form der Regulation betroffen sind.

#### 2.1.4 Struktur und Funktion der Proteintyrosinphosphatase PTP1B

Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an der PTP PTP1B durchgeführt. PTP1B (codiert vom Gen *PTPNI*) ist eine nicht-transmembranale PTP, die ubiquitär und teilweise zu sehr hohen Spiegeln exprimiert wird. Sie stellt 0,2 % aller löslichen Proteine in Blutplättchen und 0,1 % in HeLa-Zellen. Die PTP1B ist ein Protein von 50 kDa, bestehend aus 435 Aminosäuren, und war im Jahr 1988 die erste identifizierte PTP. PTP1B ist der Prototyp einer nicht-transmembranalen PTP (Tonks *et al.*, 1988). Am N-Terminus befindet sich eine einzelne katalytische Domäne, gefolgt von zwei Prolin-reichen Abschnitten, die mit SH3-Domänen anderer Proteine interagieren können (siehe Abbildung 4). Die letzten 35 Aminosäuren des C-Terminus enthalten außerdem eine Sequenz, die für die Lokalisation an der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) verantwortlich ist (Anderie *et al.*, 2007b; Frangioni *et al.*, 1992). Viele der PTP1B-Substrate sind an oder in der Plasmamembran lokalisiert. Trotz dieser räumlichen Trennung ist eine Dephosphorylierung auf verschiedenen Wegen möglich. Eine häufig auftretende Internalisierung von Rezeptoren könnte diese als Substrate für PTP1B zugänglich machen (Haj *et al.*, 2002). Des Weiteren ist eine Spaltung am C-Terminus von PTP1B unter Verlust des ER-Ankers nachgewiesen worden, die zur Freisetzung vom ER führt und die Aktivität der Phosphatase nicht negativ beeinflusst (Frangioni *et al.*, 1993). Kürzlich wurde außerdem mit Hilfe der so genannten Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) gezeigt, dass es auch permanent zu lokalen Anlagerungen des ER an die Plasmamembran kommen kann. Dies erlaubt die Interaktion von PTP1B mit seinen membranständigen Substraten ohne eine Freisetzung vom ER (Anderie *et al.*, 2007a).



**Abbildung 4 Domänenstruktur von PTP1B**

PTP1B besitzt eine N-terminale Phosphatasedomäne (PTPase-Domäne), zwei Prolin-reiche Regionen (P) und einen C-terminalen Bereich (ER), der die Verankerung am endoplasmatischen Retikulum verursacht.

Die Aktivität von PTP1B wird neben der Expression und Lokalisation durch verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert. Zu den bislang identifizierten Substraten gehören der Insulinrezeptor sowie die Rezeptoren für EGF, IGF und PDGF und die zytosolischen Januskinasen JAK und Tyk. PTP1B zeigt dabei eine deutliche Präferenz für die Dephos-

phorylierung benachbarter Phosphotyrosin-Reste (zum Beispiel für pY<sup>1162</sup>-pY<sup>1163</sup> in der Aktivierungsschleife des Insulinrezeptors) (Salmeen *et al.*, 2000).

### **Die Rolle von PTP1B in Diabetes und Adipositas**

Wegen der wichtigen Rolle als Gegenspieler des Insulinrezeptors könnte die Deregulation von PTP1B eine mögliche Ursache für Insulinresistenz und gestörte Glukose-Toleranz bei Diabetes-Typ-II-Patienten sein. In der Tat ist eine Überexpression von PTP1B in Muskelzellen von Patienten nachweisbar (Ahmad *et al.*, 1997).

Weitere Hinweise in dieser Richtung ergaben sich aus der Untersuchung von PTP1B-Knockout-Mäusen. Eine homozygote Zerstörung des *PTPNI*-homologen Gens in Mäusen (PTP1B-knockout) zeigt keinen dramatischen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Tiere. Die Mäuse haben eine normale Lebensdauer und sind sowohl phänotypisch als auch pathologisch normal. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen sie eine leicht erhöhte Insulinsensitivität nach der Nahrungsaufnahme. Diese geht mit erhöhten Phosphorylierungsspiegeln des Insulinrezeptors in Muskel- und Leberzellen, nicht jedoch in Adipozyten einher (Elchebly *et al.*, 1999; Klamann *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde beobachtet, dass der basale Energieumsatz der Knockout-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht ist. Unter fettreicher Diät sind sowohl die PTP1B<sup>-/-</sup>- als auch die PTP1B<sup>+/-</sup>-Mäuse resistent gegenüber Gewichtszunahme und Adipositas. Die Insulinsensitivität ist bei ihnen nicht reduziert, während Wildtyp-Mäuse unter diesen Bedingungen sehr schnell zunehmen und eine Insulinresistenz aufbauen.

Neben diesen Beobachtungen lassen weitere zelluläre und biochemische Studien auf eine wesentliche Rolle von PTP1B bei der Regulation der Insulin-Wirkung schließen. Aktive PTP1B kann den Insulinrezeptor dephosphorylieren und damit die Signalweiterleitung direkt beeinflussen (Salmeen *et al.*, 2000). Weiterhin wurde beobachtet, dass durch die Insulinvermittelte Rezeptoraktivierung eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgt und diese mittels Oxidation die PTP1B-Moleküle temporär hemmen. Offenbar ist nur so eine vollständige Rezeptoraktivierung möglich, ähnlich wie es schon für den Fall des EGF-Rezeptors beschrieben wurde (Lee *et al.*, 1998; Mahadev *et al.*, 2001).

Ein gewebsspezifischer Knockout von PTP1B in neuronalen Zellen führt ebenfalls zu einer reduzierten Gewichtszunahme und einem erhöhten Energieumsatz unter fettreicher Ernährung. Die Mäuse besitzen zudem erhöhte Leptinspiegel und -sensitivität. Leptin ist ein Proteohormon, das vor allem von Adipozyten gebildet wird und auf Neuronen im Hypothalamus wirkt. Die dadurch ausgelösten Signalwege führen zur Appetitzügelung und verringern somit die Nahrungsaufnahme. Bei sinkender Körperfettmasse, sinkt auch der Leptinspiegel im Blut und der Appetit nimmt zu. Der Leptinrezeptor ähnelt Zytokinrezeptoren und wirkt über die



Aktivierung von Tyrosinkinase der JAK-Familie. Diese stellen physiologische PTP1B-Substrate dar, und die erhöhte Leptinsensitivität der PTP1B<sup>-/-</sup>-Mäuse beruht auf der fehlenden Gegenregulation der JAK (Cheng *et al.*, 2002; Zabolotny *et al.*, 2002).

### **Die Bedeutung von PTP1B in der Tumorentwicklung**

PTP1B ist nicht nur ein wichtiger metabolischer Regulator, sondern spielt auch bei der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionssignalen eine wichtige Rolle. So ist seit langem bekannt, dass PTP1B sowohl den EGF- als auch den PDGF-Rezeptor dephosphoryliert und dadurch deren Aktivität moduliert. Basierend auf der beobachteten Dephosphorylierung verschiedener RTK durch PTP1B vermutet man daher eine tumorsupprimierende Funktion dieser Phosphatase. In der Tat verhindert eine PTP1B-Überexpression die Transformation durch die Proteintyrosinkinase Neu, v-Src oder p210-Bcr/Abl in Zellmodellen (Brown-Shimer *et al.*, 1992; LaMontagne *et al.*, 1998; Woodford-Thomas *et al.*, 1992). Andererseits wurde eine Überexpression von PTP1B in zahlreichen malignen Erkrankungen gezeigt. So ist PTP1B in p210-Bcr/Abl-exprimierenden Zellen überexprimiert. Bcr/Abl ist eine onkogene Proteintyrosinkinase, die 90 % aller Fälle chronischer myeloischer Leukämie (CML) verursacht. Im Promotor für PTP1B konnte ein Bcr/Abl-responsives Regulations-element identifiziert werden, das für die erhöhte PTP1B-Expression verantwortlich ist. Auch in soliden Tumoren, wie beispielsweise beim Eierstock- und beim Brustkrebs, sind Fälle von Überexpression gezeigt (Tanner *et al.*, 2000; Wiener *et al.*, 1994). Für die Heilungschancen des Brustkrebs gilt eine Überexpression von PTP1B bereits als schlechter Faktor (Tanner *et al.*, 1996). In diesen Zellen ist PTP1B offenbar in der Lage, den inhibitorischen Phosphotyrosin-Rest von Kinasen der Src-Familie zu dephosphorylieren und somit diese Kinasen zu aktivieren. Gleiches ist in Integrin-stimulierten Fibroblasten und Thrombozyten nachgewiesen worden (Arias-Salgado *et al.*, 2005; Dube and Tremblay, 2004).

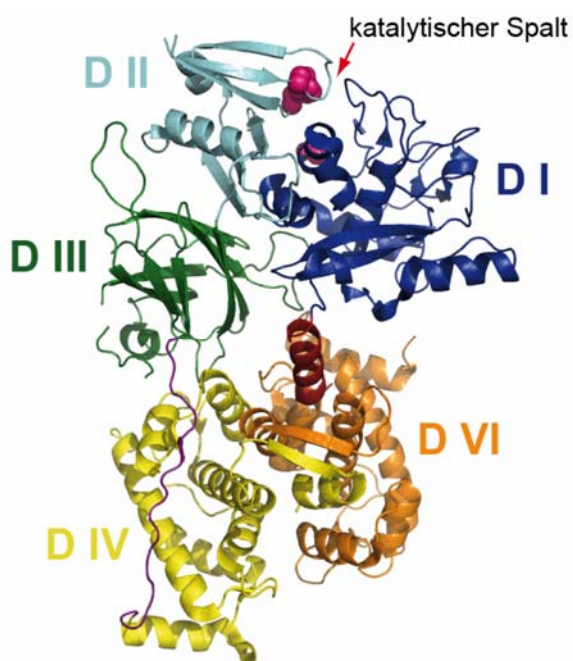
Interessanterweise zeigen PTP1B<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Prädisposition für eine Tumorbildung. Obwohl die PTP1B nicht nur den Insulinrezeptor sondern auch den homologen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktorrezeptor (IGF1) negativ reguliert, liegt in den Mäusen keine erhöhte Phosphorylierung des IGF1-Rezeptors vor. Die inhibitorische Wirkung von PTP1B auf diese und andere RTK kann offenbar durch andere PTP kompensiert werden. Ferner führt ein homozygoter PTP1B-Knockout in Mäusen zu einer verringerten Bildung von HER2-induziertem Brustkrebs, und das Fehlen von PTP1B korreliert in diesem Zusammenhang mit einer defizienten ERK-Aktivierung (Bentires-Alj and Neel, 2007; Buckley *et al.*, 2002; Julien *et al.*, 2007).

## 2.2 Calpaine

Calpaine gehören zu den zytosolischen Cystein-Proteasen. Sie sind durch eine katalytische Triade aus den invarianten Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparaginsäure gekennzeichnet, die für die proteolytische Aktivität essenziell sind. Die Struktur der katalytischen Domäne dient auch als Definition der Calpain-Familie, obwohl bei einigen Mitgliedern die katalytische Triade nicht komplett ist und diese Proteine dann katalytisch inaktiv sind. Zu diesen Pseudo-Proteasen gehört zum Beispiel Calpain 6, dem eine Rolle bei der Stabilisierung von Mikrotubuli zugeschrieben wird (Tonami *et al.*, 2007). Ein weiteres generelles Merkmal der Calpaine ist die Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für ihre proteolytische Aktivität. Die einzelnen Familienmitglieder benötigen jedoch sehr unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen für ihre Aktivierung.

### 2.2.1 Klassifizierung / Übersicht

Calpain-Homologe, d.h. Proteine mit der entsprechenden Proteasedomäne, findet man in fast allen eukaryotischen Organismen. Während den Homologen in Pflanzen und Pilzen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomänen fehlen, wird eine Genfusion mit Calmodulin als Ursprung der tierischen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calpaine diskutiert. Im menschlichen Genom sind 14 verschiedene Calpain-Gene identifiziert worden. Im Gegensatz zu den ubiquitär vorhandenen Calpainen 1 und 2 zeigen viele Calpaine eine gewebespezifische Expression (Croall and Ersfeld, 2007).



**Abbildung 5 Kristallstruktur von m-Calpain**

Dargestellt ist die Kristallstruktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem m-Calpain. Der N-Terminus der großen Untereinheit besteht aus einem Anker und ist rot dargestellt. Die Proteasedomäne bestehend aus D I (dunkelblau) und D II (hellblau) bilden den katalytischen Spalt (roter Pfeil). In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  sind die Elemente der katalytischen Triade (dargestellt als pinkfarbene Kugeln) nicht zueinander gerichtet und die Protease ist inaktiv. Die Domänen D III (grün) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne D IV (gelb) sind durch einen Linker (violett) miteinander verbunden. Die regulatorische, kleine Untereinheit besteht in dieser Struktur lediglich aus der ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Domäne D VI (orange), die für die Dimerisierung mit der D IV-Domäne verantwortlich ist.

Die Abbildung wurde mit PyMol und der publizierten Struktur 1DF0 in Anlehnung an Hosfield *et al.* erzeugt (DeLano, 2006; Hosfield *et al.*, 1999).

Strukturell sind die Calpaine durch ihre starke Domänenaufteilung gekennzeichnet. Die zweiteilige katalytische Domäne, bestehend aus D I und D II, beherbergt die katalytische Triade und ist allen Calpainen gemeinsam (siehe Abbildung 5). Entsprechend dem Vorkommen einer weiteren markanten Domäne (D IV) wird zwischen den klassischen und den atypischen Calpainen unterschieden.

### **Klassische Calpaine**

Zu den klassischen Calpainen zählen die Calpaine 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 und 13. Sie besitzen neben der Proteasedomäne D I / D II auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne D IV. Diese besteht aus fünf EF-Hand-Strukturen und wird dementsprechend als Penta-EF-Hand-Domäne (PEF-Domäne) bezeichnet. Vor der Auflösung der Kristallstruktur von Calpain 2 (siehe Abbildung 5) hatten Strukturvorhersagen eine Calmodulin-ähnliche Domäne bestehend aus vier EF-Händen erwarten lassen und so zu der Bezeichnung Calpain geführt („cal“ für Calmodulin-ähnlich, „pain“ für Papain-ähnlich). Die Kristallstruktur zeigte jedoch eine weitere EF-Hand und mittlerweile sind Penta-EF-Hand-Domänen (PEF-Domänen) auch in anderen Proteinen beschrieben worden. Eines ihrer Hauptmerkmale ist die Fähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden. Daneben ist für einige Proteine eine Dimerisierung der PEF-Domänen beschrieben worden und eine PEF-Domänen-vermittelte Membranassoziation wird vermutet. Für die Dimerisierung wird vor allem die fünfte, C-terminale EF-Hand benötigt, die kein  $\text{Ca}^{2+}$  bindet. Inwieweit in Calpainen die PEF-Domäne für die Dimerisierung verantwortlich ist und ob Hetero- oder Homodimere gebildet werden, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und von Calpain zu Calpain verschieden (Moldoveanu *et al.*, 2008; Ravulapalli *et al.*, 2005; Ravulapalli *et al.*, 2009). So wird davon ausgegangen, dass Calpain 3 in Zellen als Homodimer vorliegt, während die Calpaine 1 und 2 Heterodimere mit einer regulatorischen Untereinheit bilden. Bei dieser handelt es sich für beide Calpaine (1 und 2) um Calpain 4, das Genprodukt von *CAPNS1* (ehemals *CAPN4*). Calpain 4 hat ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa und besteht aus einer N-terminalen, Glycin-reichen D V-Domäne (40 der ersten 64 Aminosäuren dieser Domäne sind Glycine) und einer D IV-homologen PEF-Domäne (D VI), die zum einen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und zum anderen der Dimerisierung dient (Ravulapalli *et al.*, 2009). Die Heterodimere aus Calpain 4 und Calpain 1 bzw. 2 werden auch  $\mu$ -Calpain bzw.  $m$ -Calpain genannt, um sie von den Monomeren zu unterscheiden. Die Bezeichnungen ergeben sich aus dem unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf (mikromolar bzw. millimolar) der Calpaine in *in vitro* Protease-Assays (Croall and DeMartino, 1991).

Welche Rolle die Dimerisierung für die Aktivität der Calpaine spielt, ist bislang noch offen. Es gibt widersprüchliche Berichte über eine mögliche Dissoziation der Untereinheiten

von  $\mu$ -Calpain und m-Calpain nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und eine anschließend Calpain 4-unabhängige Proteaseaktivität der großen Untereinheiten (Dutt *et al.*, 1998; Suzuki and Sorimachi, 1998; Yoshizawa *et al.*, 1995; Zhang and Mellgren, 1996). Die rekombinante Expression von Calpain 2 allein in Bakterien führt nicht zur Bildung eines aktiven Calpains. Darüberhinaus sind die beiden Calpaine 1 und 2 in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit Calpain 4 (in *CAPNS1*<sup>-/-</sup>-Zellen) inaktiv und ihre Proteinspiegel verringert (Arthur *et al.*, 2000; Graham-Siegenthaler *et al.*, 1994). Dies deutet auf eine Rolle der kleinen Untereinheit als Chaperon bei der korrekten Proteinfaltung hin.

### **Atypische Calpaine**

Die Calpaine 5, 6, 7, 10 und 15 besitzen im Gegensatz zu den klassischen Calpainen keine PEF-Domäne und sind trotzdem in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden. Die atypischen Calpaine haben unterschiedlichste zusätzliche Domänen und es wird davon ausgegangen, dass sie andere Funktionen erfüllen als die klassischen Calpaine. Ein Beispiel hierfür stellt die Pseudoprotease Calpain 6 dar, der eine Scaffolding-Funktion zugeschrieben wird (Tonami *et al.*, 2007).

### **2.2.2 Aktivierung und Regulation**

Alle folgenden Ausführungen beschränken sich, sofern nicht anders angegeben, auf die beiden Haupt-Calpaine ( $\mu$ -Calpain und m-Calpain), da diese ubiquitär vorkommen und bislang am besten untersucht sind.

Im inaktiven Zustand sind die Subdomänen D I und D II des katalytischen Zentrums der Calpaine in einer offenen Konformation (um 50 ° verdreht zueinander) und die Aminosäuren der katalytischen Triade (Cys-His-Asp) sind nicht optimal zueinander orientiert (siehe Abbildung 5). Infolge eines Anstiegs der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration binden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die Domäne D IV, wodurch es zur Schließung und Aktivierung der katalytischen Domäne kommt (Strobl *et al.*, 2000). Außerdem wird dadurch die Affinität von  $\mu$ -Calpain zu Phospholipiden erhöht und es erfolgt eine Relokalisation des Calpains an die Plasmamembran (Mellgren, 1987; Molinari and Carafoli, 1997). Innerhalb weniger Minuten unterliegen beide Untereinheiten einer limitierten Autolyse. Dabei werden die katalytischen Untereinheiten Calpain 1 und Calpain 2 von 80 kDa zu etwa 76 kDa großen, aktiven Proteinen gespalten. Die Bedeutung der Autolyse sowohl der großen, als auch der kleinen Untereinheit ist noch umstritten. Obwohl nicht-autolysiertes Calpain ebenfalls eine schwache Aktivität aufweist, ist die Autolyse jedoch bei einer Calpain-Aktivierung immer zu beobachten (Goll *et al.*, 2003). Durch die Autolyse und potenziell auch durch Interaktionen mit Phospholipiden bzw. weitere

posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf für die Proteaseaktivität gesenkt. Dabei erfolgt die Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht nur über die EF-Hand-Motive der Domänen D IV und D VI, sondern ebenso an andere Domänen. Sogar ein minimales Konstrukt ausschließlich bestehend aus der katalytischen Domäne (D I & D II) von Calpain 1 der Ratte, das so genannte „Mini-Calpain“, zeigt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und eine schwache,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteaseaktivität (Moldoveanu *et al.*, 2002).

Die Aktivität von Calpainen wird durch den sehr spezifischen, endogenen Inhibitor Calpastatin reguliert. Dieses 72 kDa große Protein hat keine definierten Sekundärstrukturen und gilt als hitzestabil bis 100 °C (Goll *et al.*, 2003). Zu den gehemmten Calpainen gehören  $\mu$ - und m-Calpain, sowie das Heterodimer aus Calpain 9 und Calpain 4. Die vier identischen, inhibitorischen Domänen in Calpastatin ermöglichen die gleichzeitige Hemmung von bis zu vier Calpain-Molekülen. Die Kristallstruktur des Calpain-Calpastatin-Komplexes wurde kürzlich von zwei Gruppen aufgeklärt und zeigt, dass Calpastatin im aktiven Zentrum von Calpain bindet und es dadurch blockiert (Hanna *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2008).

### **2.2.3 Substraterkennung**

Calpaine werden in der Literatur vor allem als selektive Proteasen beschrieben, die eine limitierte Proteolyse ihrer Substrate bewirken. Dadurch werden häufig kritische Eigenschaften der Substrate verändert. Während viele Proteasen, wie zum Beispiel Trypsin, ihre Substrate an bestimmten Aminosäuren spalten und daher eine sehr gut vorhersehbare Spezifität aufweisen, gibt es für Calpaine bislang keine derart eindeutige Konsensussequenz. Der durchgeführte Vergleich von 106 Spaltstellen bestätigt die schon früher beobachtete Präferenz für Substrate mit hohem Anteil an Prolin-Resten bzw. mit einem erhöhtem „PEST-Score“ (Tompa *et al.*, 2004). Die Mutagenese von PEST-Motiven bewirkt jedoch nicht zwangsläufig eine Insensitivität des Substrats gegenüber Calpain (Carillo *et al.*, 1996; Molinari *et al.*, 1995). Vielmehr scheint die exakte Spaltstelle eher durch ihre konformationelle Umgebung und die Zugänglichkeit zum katalytischen Zentrum von Calpain determiniert zu sein.

### **2.2.4 Die Rolle der Calpaine in Physiologie und Pathologie**

Die beiden Haupt-Calpaine  $\mu$ - und m-Calpain werden in allen Zellen exprimiert und benötigen für ihre Aktivität die regulatorische Untereinheit Calpain 4 (*CAPNS1*). Die homozygote Zerstörung von *CAPNS1* führt zum Verlust der Aktivität von  $\mu$ - und m-Calpain, hat allerdings keinen Einfluss auf Überleben und Proliferation von embryonalen Stammzellen oder Fibroblasten (Arthur *et al.*, 2000). Calpain 4 ist jedoch für die Embryonalentwicklung notwendig und ein Knockout führt zum Sterben der Mausembryonen am elften Tag. Im

Gegensatz dazu hat ein Knockout von *CAPN1* keinen Einfluss auf das Überleben und die Fertilität von Mäusen. Es scheint, dass eine partielle Redundanz der Substratspezifitäten von Calpain 1 und 2 die Defizite weitgehend ausgleichen kann (Azam *et al.*, 2001).

Während sich die Substratspezifität von  $\mu$ - und m-Calpain *in vitro* kaum unterscheidet, so sind doch beide Proteasen für verschiedene zelluläre Prozesse wichtig. m-Calpain ist offenbar vor allem in eine Reihe terminaler Differenzierungsprozesse involviert. So wurde für die monozytäre Differenzierung von K562-Zellen, die Muskelzell-Differenzierung aus embryonalen Myoblasten oder die Ausbildung von Osteoblasten in Nagern eine drei- bis zehnfach höhere Expression von m-Calpain im Vergleich zu  $\mu$ -Calpain ermittelt. Zu den vorgeschlagenen Substraten, die hierbei eine Rolle spielen, gehören die Retinoblastoma-Genfamilie und p27<sup>Kip1</sup> (Jang *et al.*, 1999; Patel and Lane, 2000). Im Vergleich dazu kommt  $\mu$ -Calpain eine vorrangige Rolle in einer Vielzahl von Signalwegen im Zusammenhang mit der Adhäsion und Migration zu. Das  $\mu$ -Calpain spielt anscheinend eine Rolle bei der Integrin-vermittelten Adhäsion und Ausbreitung auf extrazellulärer Matrix und bei der Aktinfilament-Reorganisation (Sato and Kawashima, 2001). Die  $\mu$ -Calpain-Aktivierung wird außer bei der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin unter anderem auch in folgenden Systemen beobachtet: nach Hypoxie-Ischämie-Reperfusion in Neuronen, in suspendierten Endothelzellen und nach der Endothelzell-Adhäsion an Fibronectin (Sato and Kawashima, 2001). Das aktivierte Calpain spaltet eine Vielzahl von Substraten, zum Beispiel die Signalproteine FAK (fokale Adhäsionskinase), src-Familie-Kinasen, Phospholipase C $\beta$ , Proteinkinase C und die  $\alpha$ -Untereinheit stimulatorischer Gs-Proteine. Aber auch Zytoskelettbestandteile wie Integrin  $\beta$ 3, Paxillin, Talin oder Fodrin zählen zu den bevorzugt von  $\mu$ -Calpain gespaltenen Substraten (Sato and Kawashima, 2001).

Neben den ubiquitären  $\mu$ - und m-Calpainen spielen auch gewebsspezifischere Calpaine in fundamentalen Signalwegen eine Rolle. Beispielsweise wurde *CAPN10* als häufig mutiertes Gen im Typ 2 Diabetes mellitus (Nicht-Insulinabhängiger D. m.) identifiziert. Beim Typ 2-Diabetes führen Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und gestörte Insulinsekretion zu reduzierter Glukoseaufnahme und -verbrauch in Muskelzellen und erhöhter Glukose-Freisetzung aus der Leber. Die beobachteten Mutationen im *CAPN10*-Gen bewirken eine Störung der Glukose-induzierten Insulinsekretion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen sowie einer Blockade des Glukosetransporter (Glut-4)-Einbaus in der Plasmamembran von Muskelzellen und eine dadurch verminderte Glukose-Aufnahme. Hierfür werden in erster Linie Mängel im Umbau des Zytoskeletts bei der Exozytose und dem Vesikeltransport verantwortlich gemacht und

weniger ein direkter Einfluss des Calpain 10 auf Insulin-abhängige Signalwege (Brown *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2006; Horikawa, 2006; Turner, 2007).

### **Die Bedeutung von Calpain und PTP1B bei der Thrombozytenaktivierung**

Bereits 1993 wurde eine Calpain-vermittelte Abspaltung des C-Terminus von PTP1B in Thrombozyten nach deren Aktivierung durch verschiedene Agonisten wie Thrombin oder Fibrinogen beschrieben. Diese limitierte Proteolyse führt aufgrund der Abspaltung des ER-Ankers zu einer Relokalisierung des Proteins vom ER ins Zytosol. Außerdem wird eine leicht erhöhte Aktivität der PTP festgestellt und eine generell stark verringerte Tyrosinphosphorylierung der Proteine in Thrombozyten-Lysaten beobachtet (Frangioni *et al.*, 1993). Da Thrombozyten kaum Möglichkeiten zur Protein-Neusynthese besitzen, könnte die Spaltung und damit einhergehende PTP1B-Aktivierung ein irreversibles Signal für den Übergang von schwacher, reversibler Interaktion mit anderen Zellen hin zur Thrombozyten-Aggregation darstellen. Kürzliche Untersuchungen in Mausmodellen belegen jedoch, dass für eine effiziente Thrombozyten-Aggregation offenbar auch ein inaktivierender PTP1B-Abbau durch Calpain notwendig ist. Calpain-1-Knockout-Mäuse zeigten eine stark verringerte Blutgerinnung, während die frühen Ereignisse der Blättchen-Aggregation ungestört ablaufen (Azam *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen zeigten zudem erhöhte PTP1B-Spiegel in Thrombozyten. Die etwa doppelten Proteinspiegel gingen mit einer Verdopplung der Phosphatase-Aktivität in Lysaten und stark verringerten Phospho-Tyrosinspiegeln einher. Ein Doppel-Knockout von Calpain-1 und PTP1B führt zur Aufhebung dieses Effektes und zu einer normalisierten Blutgerinnung (Kuchay *et al.*, 2007).

### **2.3 Reaktive Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von hoch-energetischen Sauerstoffverbindungen, die aus einer unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff resultieren (siehe Tabelle 1 für Beispiele). Sie entstehen nicht nur als Nebenprodukte des aeroben Metabolismus, sondern spielen bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören auf der einen Seite die von Phagozyten gebildeten ROS zur Abwehr von Mikroorganismen. Auf der anderen Seite ist seit einiger Zeit bekannt, dass alle Zellen reaktive Sauerstoffspezies als Mediatoren der intrazellulären Signalwege verwenden. Insbesondere Thiol-haltige Proteine stellen ein wichtiges Ziel dar, da diese Gruppe relativ empfindlich für Oxidation ist und hierdurch ihre Proteinstruktur sowie Enzymaktivität moduliert werden können. Störungen der zellulären Regulation und ein damit einhergehendes

Übermaß an ROS führen jedoch zu biologischen Schäden und sind mit der Zellalterung und verschiedenen Erkrankungen verknüpft. Als Beispiele hierfür seien Arteriosklerose, Diabetes und Krebs genannt (Cai and Harrison, 2000; Halliwell, 2007).

Bei den ROS werden Ein-Elektronen- und Zwei-Elektronen-Oxidantien unterschieden, wobei in jeder Gruppe stärkere und schwächere Oxidantien zu finden sind. Sie unterscheiden sich in ihren bevorzugten Zielmolekülen. Die Radikale (Ein-Elektron-Oxidantien) favorisieren Kettenreaktionen, zum Beispiel die Peroxidation von Lipiden, können jedoch auch Thiole oxidieren. Dies führt zur Entstehung von Thiyl-Radikalen ( $RS\bullet$ ), die unter aeroben Bedingungen mit Thiolat-Ionen Disulfide ausbilden und zur Regeneration von Superoxid führen. Bei der Reaktion von Zwei-Elektronen-Oxidantien mit Thiolen hingegen kommt es zur Bildung von Sulfensäuren ( $RSOH$ ) (Winterbourn, 2008; Winterbourn and Hampton, 2008). Mögliche weitere Reaktionen der Sulfensäure-Intermediate sind in Abbildung 3 bereits am Beispiel von PTP1B dargestellt.

|                    |                 | $1e^- / 2e^-$ | Thiole | Methionin | Ascorbat | Vitamin E | Umsetzung durch                                  |
|--------------------|-----------------|---------------|--------|-----------|----------|-----------|--|
| Wasserstoffperoxid | $H_2O_2$        | 2             | +      | +         |          |           | Peroxiredoxine, Katalase, Glutathion-Peroxidasen |
| Superoxid          | $\bullet O_2^-$ | 1             | +      |           | +        | +         | Superoxid-Dismutase                              |
| Peroxynitrit       | $ONOO^-$        | 2             | ++     | +         | +        | +         | Peroxiredoxine                                   |
| Hypochlorige Säure | $HOCl$          | 2             | ++++   | ++++      | +++      | +         |  |
| Hydroxylradikal    | $\bullet OH$    | 1             | ++     | +         | ++++     | +++       |  |

**Tabelle 1 Beispiele physiologisch relevanter ROS**

Angegeben sind die Zuordnung der Radikale zu den Ein- oder Zwei-Elektronen-Oxidantien sowie relative Reaktivitäten gegenüber verschiedenen Molekülen. Außerdem aufgeführt sind umwandelnde Enzyme, die zu einem Abbau oder einer Umwandlung der ROS führen. Abgewandelt aus Winterbourn and Hampton, 2008.

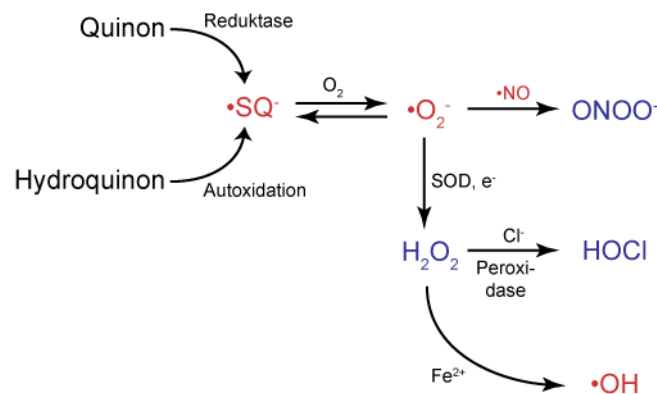
### 2.3.1 Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Eine unvollständige Reduktion des molekularen Sauerstoffs während der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien führt zur Entstehung von Superoxid ( $\bullet O_2^-$ ). Es wird außerdem durch NADPH-Oxidasen (Nox) an zellulären Membranen gebildet. Diese sind membranständige Proteinkomplexe, die Elektronen von NADPH über die Membran transportieren und auf molekularen Sauerstoff übertragen. Zu der Nox-Familie zählt auch die ER-lokalisierte Nox4, die das generierte Superoxid-Anion nicht in den extrazellulären Raum sondern in das ER-Lumen freigibt. Als Anion kann Superoxid nicht frei durch Membranen diffundieren und oxidiert nur selten direkt Biomoleküle (Winterbourn, 2008). Eine Dismutation von Superoxid



führt jedoch zur Bildung von frei diffusionsfähigem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Diese Reaktion kann spontan ablaufen, wird in der Regel jedoch durch Superoxid-Dismutasen (SOD) beschleunigt (siehe Abbildung 6).

Neben den physiologischen Wegen entstehen ROS auch durch Einflüsse, die von außen auf die Zelle treffen. Hierzu gehören unter anderem ionisierende und UV-Strahlung. Die Energie der Strahlung führt zur Anregung chemischer Verbindungen und kann eine Freisetzung von Radikalen verursachen. Die schädigende Wirkung der Strahlung beruht zum Teil auf den Effekten der ROS. Sie verlagern die Balance des intrazellulären Redox-Systems und greifen in die redoxregulierten Signalwege ein. Auch die Verstoffwechslung einiger Arzneimittel (zum Beispiel Doxorubicin, Alloxan) durch Cytochrom P450 kann zur Freisetzung von Superoxid führen (Winterbourn, 2008).



**Abbildung 6** Mögliche Reaktionen zur Bildung verschiedener ROS

Schema einiger reaktiver Sauerstoffspezies und ausgewählter Reaktionswege. Ein-Elektronen-Oxidantien sind rot und Zwei-Elektronen-Oxidantien blau dargestellt. Das Schema wurde leicht abgewandelt aus Winterbourn, 2008.

### 2.3.2 Zelluläre Schutzmechanismen gegen Oxidation

Antioxidantien sind Substanzen, die oxidativen Schaden verzögern, verhindern oder beseitigen (Winterbourn, 2008). Zur Erhaltung der Redox-Balance existiert in eukaryotischen Organismen eine Reihe von Systemen. Hierzu gehören niedermolekulare Thiole wie Glutathion und Vitamine (Ascorbat und Vitamin E). Die Zelle verfügt außerdem über Enzyme, die ROS in weniger reaktive Verbindungen überführen. So wird von Mitochondrien erzeugtes Superoxid schnell durch SOD in Wasserstoffperoxid und dieses durch Katalase in Wasser und molekularem Sauerstoff zerlegt. Peroxidasen, wie Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin, vermitteln zudem die Reduktion bereits oxidierten Moleküle (Rhee *et al.*, 2003). Diese Schutzmechanismen sind nicht nur für die zeitliche sondern auch die räumliche Eingrenzung der ROS-Wirkung verantwortlich. So ist der Diffusionsradius von Wasserstoffperoxid durch

zelluläre Antioxidantien drastisch verringert und eine lokale Signalwirkung wird ermöglicht (Winterbourn, 2008).

### 2.3.3 ROS als Signalmoleküle

Viele Wachstumsfaktorrezeptoren (zum Beispiel EGFR) können über die kleine GTPase Rac NADPH-Oxidasen (Nox) in der Plasmamembran aktivieren. Die anschließende ROS-Produktion führt zu einer Inaktivierung von PTP und ist für die Signalweiterleitung der Rezeptoren entscheidend (Lee *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2004). Für den Insulinrezeptor konnte eine Aktivierung der ER-ständigen Nox4 gezeigt werden. Diese ko-lokalisiert mit PTP1B, einem der Hauptregulatoren des Insulinrezeptors und ermöglicht so eine definierte Inaktivierung speziell dieses PTP-Pools (Mahadev *et al.*, 2004; Martyn *et al.*, 2006). Neben RTK kann auch die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Zytokinrezeptoren zur Erzeugung von ROS führen (Rhee *et al.*, 2003).

Die Nox-generierten Superoxid-Moleküle selbst fungieren kaum als Signalmediatoren, da sie schlecht durch die Membran diffundieren und relativ träge mit Thiolproteinen reagieren. Das durch Dismutation entstehende Wasserstoffperoxid ist weitaus besser als Signalmolekül geeignet. Trotz seiner hohen Diffusionsgeschwindigkeit wird sein Wirkungskreis durch die schnelle Reaktion mit Antioxidantien lokal begrenzt gehalten. Die Dauer des Signals ist somit regulierbar und eine Substratspezifität wird zum Beispiel durch verschiedene Empfindlichkeiten der Substrate für die Oxidation gewährleistet (Groen *et al.*, 2005; Persson *et al.*, 2004; Weibrecht *et al.*, 2007). Obwohl die Reaktionsfähigkeit der Cysteine von PTP im Vergleich zu Glutathion relativ gering ist, wurde vielfach eine Oxidation von PTP nach Rezeptorstimulation in Abhängigkeit von Wasserstoffperoxid gezeigt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Oxidation der PTP seltener direkt durch  $H_2O_2$  erfolgt, sondern ein indirekter Effekt ist. Vermittler könnten nach dieser Hypothese noch unbekannte, primäre Sensoren sein, die durch  $H_2O_2$  oxidiert werden und dann wiederum spezifisch andere Proteine oxidieren können. Peroxiredoxine stellen gute Kandidaten hierfür dar. Sie sind um zwei Größenordnungen reaktiver als Glutathion, und ein ähnlicher Mechanismus konnte bereits bei Hefe-Homologen identifiziert werden (D'Autreaux and Toledano, 2007; Winterbourn, 2008).

## 2.4 UV-Strahlung

### 2.4.1 Physikalische Eigenschaften der solaren UV-Strahlung

Elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen unter 400 nm zählen zur ultravioletten Strahlung. Diese wird in verschiedene Qualitäten unterteilt: UV-C (200-290 nm), UV-B (290-

320 nm) und UV-A (320-400 nm), wobei die Grenze zwischen UV-B und UV-A je nach Publikation zwischen 315 und 340 nm schwankt. UV-C-Licht zerstört Zellen und künstliche Quellen werden deshalb zum Beispiel zur Desinfektion eingesetzt. Das von der Sonne emittierte UV-C-Licht wird jedoch von der Erdatmosphäre nahezu vollständig absorbiert und ist daher bei der Untersuchung der Strahlenfolgen auf Organismen von untergeordneter Bedeutung (Diffey, 2002).

Die Angabe der Dosis erfolgt in  $\text{kJm}^{-2}$  oder  $\text{Jcm}^{-2}$ . Für medizinische Untersuchungen kann außerdem eine entsprechende Wichtung der verschiedenen Wellenlängen gemäß der biologischen Bedeutung vorgenommen werden und somit die Dosis in Vielfachen der „med“ (minimale erythemale Dosis) angegeben werden. Diese bezieht sich auf die Dosis, bei der erste Hautrötungen auftreten (Diffey, 2002).

Die auf der Erdoberfläche ankommenden UV-Dosen hängen von zahlreichen Faktoren ab: Tages- und Jahreszeit, geographische Breite, Höhe über dem Meeresspiegel, Bewölkungsgrad. Bei der Wirkung auf Organismen spielt außerdem auch die Reflektion der Umgebung eine wichtige Rolle. In den letzten Jahrzehnten hat ein weiterer Faktor an Bedeutung gewonnen: die abnehmende Absorption in der Ozonschicht. Ozon ( $\text{O}_3$ ) ist ein farbloses Gas und wird durch die Dissoziation von molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) unter Energieabsorption von kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda < 242 \text{ nm}$ ) in der Stratosphäre gebildet. UV-C und ein großer Anteil der UV-B-Strahlung von Wellenlängen kleiner als 320 nm wird von Ozon-Molekülen ( $\text{O}_3$ ) absorbiert, die dadurch wieder dissoziieren:  $\text{O}_3 \longrightarrow \text{O}_2 + \text{O}$ . Dieser Ozonabbau kann durch Chlorkradikale katalysiert und deutlich beschleunigt werden. Diese Radikale sind in den letzten Jahrzehnten zunehmend durch Abbau von Fluorchlorkohlenwasserstoffen (FCKW) in die Stratosphäre gelangt und führten zu einer Verlagerung des Gleichgewichts zwischen Ozon-Entstehung und -Abbau. Die deutliche Verringerung der Ozonschicht-Dicke verursacht eine zunehmend stärkere UV-Belastung in bestimmten Regionen der Erde. Eine Untersuchung möglicher schädigender Effekte dieser UV-Strahlung auf Organismen ist daher dringend nötig (Bahadir *et al.*, 2000).

## **2.4.2 Photobiologische Effekte von UV-Strahlung**

### **Absorptionscharakteristika von Biomolekülen**

Die biologischen Effekte von UV-Strahlung werden durch die photochemische Absorption der Strahlung von Biomolekülen verursacht. DNA absorbiert dabei deutlich stärker UV-Strahlung als Proteine. In Nucleinsäuren agieren die Nucleotide (Purine und Pyrimidine) als Chromophore und zeigen Absorptionsmaxima zwischen 260 und 265 nm. Die UV-Absorption führt zur Anregung der Moleküle und Folgereaktionen. Häufige Produkte dieser Reaktionen

sind Pyrimidin-Dimere, Pyrimidin-Addukte, Pyrimidinhydrate und DNA-Protein-Verknüpfungen. Organismen haben verschiedene Reparaturmechanismen entwickelt, um den dadurch entstehenden möglichen Mutationen entgegenzuwirken. Als Beispiele seien hier nur die Photoreaktivierung und die Basenaustauschreparatur („nucleotide excision repair“, NER) genannt. Patienten (zum Beispiel Xeroderma pigmentosum) mit erblichen Defekten in den verantwortlichen Reparaturproteinen zeigen von Kindheit an eine erhöhte Empfindlichkeit für Hautkrebs, was das Gefährdungspotenzial der UV-Strahlung im Hinblick auf die Entstehung von Krebserkrankungen unterstreicht.

Auch Proteine absorbieren UV-Strahlung im Bereich des UV-B und UV-C mit dem Absorptionsmaximum bei etwa 280 nm. Verantwortlich hierfür sind in erster Linie die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren von Tryptophan, Tyrosin, und Phenylalanin. Diese Schäden betreffen jedoch relativ unspezifisch alle Proteine und nur einen Bruchteil des zellulären Proteinaufkommens (Herrlich *et al.*, 2008).

Die deutlich energieärmere UV-A-Strahlung wird von DNA oder Proteinen kaum absorbiert. Weitaus größere Schäden entstehen durch sekundäre Effekte, vor allem durch die UV-induzierte Erzeugung von ROS. Es wird davon ausgegangen, dass so genannte „Photosensitizer“ durch UV-Licht angeregt werden und die Bildung von ROS (zum Beispiel Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$  und Superoxidation-Radikal  $\bullet\text{O}_2^-$ ), vermitteln bzw. induzieren (Klotz *et al.*, 2001). Die gebildeten ROS beeinflussen zelluläre Proteine und Signalwege.

### **Effekte solarer UV-Strahlung auf die menschliche Haut**

Aufgrund der starken Absorption dringt UV-Strahlung nur wenige Millimeter tief in die Hautschichten ein. Neben der Haut sind nur die Augen der UV-Strahlung ausgesetzt. Potenziell schädliche Auswirkungen auf die Netzhaut werden jedoch durch die Absorption an der Hornhaut und Linse vermindert.

#### Akute Effekte der UV-Bestrahlung

UV-A-Strahlung wird schon in der äußersten Hautschicht absorbiert und ist vorrangig für akute Reaktionen verantwortlich. Hierzu gehört die kurzfristige Bräunung durch Melanin-Modifikationen. Im Gegensatz dazu ist die höher-energetische UV-B-Strahlung in der Lage, in tiefere Hautschichten vorzudringen. Dort ist sie für die photochemische Synthese von Pro-Vitamin D aus 7-Dehydrocholesterol in der Epidermis notwendig. Dieses Provitamin kann zu dem essenziellen Vitamin D isomerisieren. Neben diesem positiven Effekt führt UV-B-Strahlung jedoch auch zu einer Reihe Schäden. So resultiert eine übermäßige Exposition in einem Sonnenbrand (Erythem), d.h. einer akuten Reaktion der Haut. Daneben verursacht UV-B-Strahlung weitere Effekte: epidermale Hyperplasie (innerhalb von 1-3 Wochen kann

sich die Schichtdicke der Oberhaut verdreifachen) und Bräunung (längerfristige, aber reversible Erhöhung des Melaningehaltes und der Zahl der Melanozyten der Epidermis). Beide Reaktionen stellen Mechanismen dar, die den Schutz der Haut vor weiterer UV-Strahlung und folgenden Schäden erhöhen.

### Langfristige Effekte

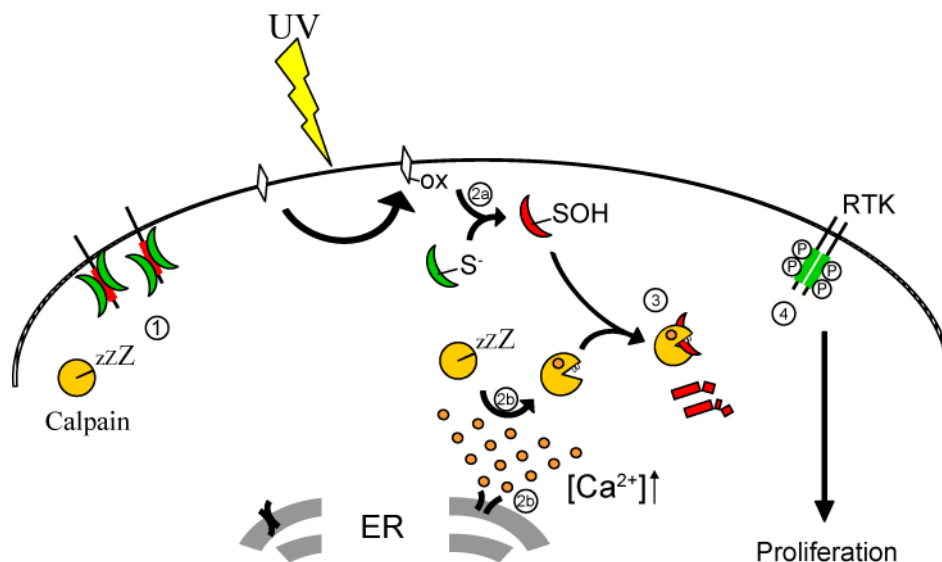
Hautalterung und Krebsentstehung zählen zu den langfristigen Effekten der UV-Strahlung. Die Hautalterung („photo-aging“) wird durch Trockenheit, tiefe Faltenbildung, Elastizitätsverlust und typische punktuelle Pigmentierung deutlich und basiert auf strukturellen Änderungen der Dermis. Auch die Entstehung von Hautkrebs korreliert deutlich mit der Menge der absorbierten UV-Strahlung (Diffey, 1991). Es werden dabei zwei Arten unterschieden: Zum einen der weiße Hautkrebs („non-melanoma skin cancer“, NMSC) und zum anderen maligne Melanome. Weiterhin gibt es zwei Typen des weißen Hautkrebses, dessen Ausgangspunkt verschiedene Zellen im Hautepithel darstellen: Basalzellkarzinom und spinözelluläres Karzinom. Das maligne Melanom hat seinen Ursprung in den Pigmentzellen der Haut (Melanozyten) und wird aufgrund der dunklen Farbe auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet. Melanome haben eine starke Tendenz zur Metastasierung. Während der weiße Hautkrebs vorrangig bei Freiluft-Arbeitern an Sonne-exponierten Stellen (Gesicht und Nacken) auftritt, wird für das Melanom eine unregelmäßige, extreme UV-Belastung der ungewöhnten Haut und nicht eine chronische Langzeitbestrahlung als Hauptursache gesehen. Entsprechend korrelieren schwere Sonnenbrände in der Vergangenheit häufig mit dem Auftreten des Melanoms (Diffey, 1991).

### Krebserzeugende Wirkung von UV-Strahlung

Als Ursache für die Entstehung von Hautkrebs gelten in erster Linie die photochemischen Änderungen an der nukleären DNA. Eine Anhäufung von Mutationen im Genom führt zu veränderter Genexpression oder Proteinaktivität und kann somit die Entartung einzelner Zellen zur Folge haben. Sobald diese einen Wachstumsvorteil besitzen, vermehren sie sich unkontrolliert und führen zur Tumorentstehung.

Ein weiterer schädigender Einfluss der UV-Strahlung auf die Hautzellen ist die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und damit der Verlust von zelleigenen niedermolekularen Antioxidantien ( $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure oder Glutathion), die für die Balance der zellulären Redox-Vorgänge bedeutend sind. Die UV-A-Bestrahlung von kultivierten Hautzellen (sowohl Keratinozyten als auch Melanozyten) führt *in vitro* zu einer sofortigen Verringerung des zellulären Glutathionspiegels (Larsson *et al.*, 2005). Die Erzeugung von ROS geht mit der Oxidation von Lipiden und empfindlichen Cystein-Resten

in Proteinen einher. Die mit der Oxidation und Hemmung von PTP verbundene Zunahme an tyrosinphosphorylierten Proteinen führt zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Signalwegen, zum Beispiel des EGF-Rezeptors (Gross *et al.*, 1999). Infolge der ROS-Bildung ist zudem der Abbau einiger PTP nach UV-Bestrahlung von Zellen beobachtet werden (Gulati *et al.*, 2004). Dieser wurde sowohl durch UV-A als auch durch UV-B (aber nicht durch UV-C) ausgelöst und basierte auf der gleichzeitigen Oxidation der PTP und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calpain-Aktivierung durch die UV-Bestrahlung (siehe Abbildung 7). Entsprechend konnte der PTP-Abbau durch eine simultane Behandlung der Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor (Ionomycin) erreicht werden. Die genauen Details dieses Mechanismus des oxidationsabhängigen Abbaus der PTP sind jedoch noch unklar (Gulati *et al.*, 2004). Unveröffentlichte Ergebnisse von Gulati *et al.* deuten auf eine Bedeutung von Membranlipiden, vor allem Cholesterol, als Mediatoren der Oxidation der PTP hin.



**Abbildung 7 Bisheriges Modell der UV-induzierten RTK-Aktivierung**

In der ruhenden Zelle werden die Wachstumsfaktorrezeptoren durch PTP inaktiv gehalten (1). Infolge von UV-Einstrahlung kommt es zu einer Cholesterol-abhängigen Oxidation und Inaktivierung von PTP (2a). Es erfolgt außerdem eine UV-induzierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER und einer damit verbundenen Aktivierung von Calpain (2b). Ein Zusammentreffen dieser beiden Ereignisse resultiert in einem Calpain-abhängigen Abbau der PTP (3). Durch die fehlende Gegenregulation kommt es gleichzeitig zu einer liganden-unabhängigen RTK-Aktivierung (4) und den damit verbundenen Signalen.

## 2.5 Zielstellung

Der Calpain-vermittelte Abbau und die damit einhergehende PTP-Inaktivierung stellen ein neues Regulationsprinzip dar, das nach der Bestrahlung von Zellen mit UV-A- und UV-B-Licht beobachtet wurde. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Koexistenz von  $\text{Ca}^{2+}$ -erhöhenden (und damit Calpain-stimulierenden) und PTP oxidierenden ROS nicht exklusiv auf UV-behandelte Zellen beschränkt ist. Die Vielfalt der Calpain-aktivierenden und ROS-erzeugenden Prozesse lässt eine weiter reichende Bedeutung für den oxidationspezifischen Abbau von PTP vermuten und macht die genauere Erforschung dieses Regulationsmechanismus dringend notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biochemischen Hintergründe des oxidationspezifischen Abbaus von PTP zu identifizieren. Hierfür wurden *in vitro*-Verdaustudien mit aufgereinigter PTP1B als Modell durchgeführt. Zum einen sollte die Identifikation der oxidationspezifischen Spaltstellen die Erzeugung spaltungsresistenter Mutanten ermöglichen. Die Analyse dieser Mutanten in einem PTP1B-negativen Zellmodell sollte Aufschluss über die Bedeutung des UV-induzierten Abbaus auf die Intensität und Dauer der induzierten RTK-Aktivierung geben. Die resistenten Mutanten sollten außerdem die Identifikation weiterer physiologischer oder pathologischer Prozesse erleichtern, bei denen ein oxidationspezifischer Abbau von PTP eine Rolle spielt. Zum anderen sollte die biochemische Analyse der PTP1B-Spaltung *in vitro* Aufschlüsse über den Mechanismus des Abbaus geben. Auf dieser Grundlage sollten tiefergehende Untersuchungen *in vitro* und auf zellulärer Ebene ermöglicht werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Antikörper

|                                      | <b>Hersteller</b>               | <b>Katalognr.</b> |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| BCA kit                              | Perbio Science, Bonn            | 23235             |
| μ-Calpain                            | Merck Biosciences, Bad Soden    | 208713            |
| Complete Protease-Inhibitor-Cocktail | Roche Diagnostics, Mannheim     | 04693132001       |
| Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | D8388             |
| E64                                  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | E3132             |
| G418                                 | PAA laboratories, Cölbe         | P25-011           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | Roth, Karlsruhe                 | 9681.1            |
| HiTrap Q 5 ml                        | GE Healthcare, Freiburg         | 17-1154-01        |
| Insulin                              | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | I5500             |
| Ionomycin                            | Axxora Deutschland, Lörrach     | 450-007-M001      |
| Katalase                             | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | C9322             |
| Lipofectamine 2000                   | Invitrogen, Karlsruhe           | 11668-019         |
| Natriumiodoacetat                    | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | I9148             |
| Nitrocellulose-Membran               | GE Healthcare, Freiburg         | RPN 203 G         |
| Pfu Ultra II                         | Agilent Technologies, Waldbronn | 600670            |
| Phenylsuperose-Säule 1 ml            | GE Healthcare, Freiburg         |                   |
| p-Nitrophenylphosphat                | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | S0942             |
| Poly (Glu,Tyr)                       | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | P0275             |
| Protein-A-Sepharose                  | GE Healthcare, Freiburg         | 17-0780-01        |
| PVDF-Membran                         | Millipore, Eschborn             | IPVH00010         |
| Tetramethylbenzidin (TMB)            | Sigma-Aldrich, Taufkirchen      | T8665             |

| <b>Antigen</b>                     | <b>Herkunft (Klon)</b> | <b>Verwendung</b>            | <b>Katalognummer</b> | <b>Firma</b>               |
|------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| PTP1B (human, N-Terminus)          | Ziege (polyklonal)     | IB: 1:1000                   | sc1718               | Santa Cruz                 |
| PTP1B (human, N-Terminus)          | Maus (RB7011)          | IB: 1:2000                   | AP8411c              | BioCat, Heidelberg         |
| PTP1B (human, katalytische Domäne) | Maus (FG6-1G)          | IB: 1:1000<br>IP: 1 μg/Punkt | PH01                 | Merck, Bad Soden           |
| PTP1B (murin)                      | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:1000<br>IF: 1:200      | 07-088               | Millipore, Schwalbach      |
| μ-Calpain                          | Maus (15C10)           | IB: 1:1000                   | C0355                | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |



| Antigen                                 | Art                    | Verwendung                        | Katalognummer                    | Firma                     |
|---|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Calpain (große und kleine Untereinheit) | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:5000                        | Peter A. Greer, Ontario, Kanada  |                           |
| Vinculin                                | Maus                   | IB: 1:5000                        | BZL03106                         | Biozol, Eching            |
| phospho-S6K (Thr389)                    | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:2000                        | 9205S                            | NEB, Frankfurt/M.         |
| p70-S6Kinase                            | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:2000                        | 9202                             | NEB, Frankfurt/M.         |
| phospho-AKT (Ser473)                    | Kaninchen (193H12)     | IB: 1:2000                        | 4058S                            | NEB, Frankfurt/M.         |
| panAKT                                  | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:2000                        | 9272                             | NEB, Frankfurt/M.         |
| phospho p42/44 MAPK (T202/Y204)         | Maus (E10)             | IB: 1:2000                        | 9106S                            | NEB, Frankfurt/M.         |
| ERK-1                                   | Kaninchen              | IB: 1:1000                        | 12320/L1                         | Transduction Laboratories |
| phospho-Insulinrezeptor (pYpY-1162/63)  | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:1000                        | 44804G                           | Biosource                 |
| Insulinrezeptor- $\beta$ (C-19)         | Kaninchen (polyklonal) | IB: 1:1000<br>IP: 1 $\mu$ g/Punkt | sc711                            | Santa Cruz                |
| TC-PTP (murin)                          | Maus (6F3)             | IB: 1:2000                        | MM-0019                          | MediMabs                  |
| TC-PTP (human)                          | Maus (CF4-1D)          | IB: 1:500                         | PH03L                            | Merck, Bad Soden          |
| SHP-1 (C-19)                            | Kaninchen              | IB: 1:1000                        | 06-117                           | Upstate                   |
| oxPTP                                   | Kaninchen (polyklonal) | IB: 10 $\mu$ g/ml                 | Arne Östman, Stockholm, Schweden |                           |
| mouse-IgG-HRP                           | Ziege (polyklonal)     | IB: 1:10 000                      | 074-1806                         | Medac, Wedel              |
| rabbit-IgG-HRP                          | Ziege (polyklonal)     | IB: 1:10 000                      | 074-1506                         | Medac, Wedel              |

### 3.1.2 Primer

In Tabelle 2 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet: (1) Mutagenese-Primer, die für die Einführung von Punktmutationen bzw. eines His<sub>6</sub>-Tags verwendet wurden, (2) Sequenzierungsprimer, für die verschiedene Bereiche von PTP1B bzw. der Vektor-PTP1B-Übergänge und (3) Primer, die für interne Kontroll-PCRs verwendet wurden.

**Tabelle 2    Verwendete Primer**

| Name                  | Ausgangs-Molekül       | 5'-3' Sequenz  | Zweck  |
|-----------------------|------------------------|--|--|
| (1) Mutagenese-Primer |                        |  |  |
| PTP1B-K73A-for        | hPTP1B WT              | CAA CGC TAG TTT GAT <u>AGC</u> AAT GGA AGA AGC CCA AAG GAG     | Mutagenese K73A  |
| PTP1B-K73A-rev        | hPTP1B WT              | CTC CTT TGG GCT TCT TCC ATT <u>GCT</u> ATC AAA CTA GCG TTG     |  |
| PTP1B-E75A-for        | hPTP1B WT              | CGC TAG TTT GAT AAA AAT GG <u>C</u> AGA AGC CCA AAG GAG TTA C  | Mutagenese E75A  |
| PTP1B-E75A-rev        | hPTP1B WT              | GTA ACT CCT TTG GGC TTC T <u>G</u> C CAT TTT TAT CAA ACT AGC G |  |
| PTP1B-E76A-for        | hPTP1B WT              | CTA GTT TGA TAA AAA TGG AAG <u>C</u> AG CCC AAA GGA GTT AC     | Mutagenese E76A  |
| PTP1B-E76A-rev        | hPTP1B WT              | GTA ACT CCT TTG GGC T <u>G</u> C TTC CAT TTT TAT CAA ACT AG    |  |
| PTP1B-E76Q-for        | hPTP1B WT              | GCT AGT TTG ATA AAA ATG GAA <u>C</u> AA GCC CAA AGG AGT TAC    | Mutagenese E76Q  |
| PTP1B-E76Q-rev        | hPTP1B WT              | GTA ACT CCT TTG GGC TT <u>G</u> TTC CAT TTT TAT CAA ACT AGC    |  |
| PTP1B-Q78A-for        | hPTP1B WT              | GAT AAA AAT GGA AGA AGC <u>CGC</u> AAG GAG TTA CAT TCT TAC C   | Mutagenese Q78A  |
| PTP1B-Q78A-rev        | hPTP1B WT              | GGT AAG AAT GTA ACT CCT T <u>GC</u> GGC TTC TTC CAT TTT TAT C  |  |
| PTP1B-KA/QA-for       | hPTP1B-Q78A            | CAA CGC TAG TTT GAT <u>AGC</u> AAT GGA AGA AGC CGC AAG GAG     | Mutagenese K73A  |
| PTP1B-KA/QA-rev       | hPTP1B-Q78A            | CTC CTT GCG GCT TCT TCC ATT <u>GCT</u> ATC AAA CTA GCG TTG     |  |
| PTP1B-C215S-for       | hPTP1B WT              | CCC GTT GTG GTG CAC T <u>C</u> C AGT GCA GGC ATC GGC A         | Mutagenese C215S   |
| PTP1B-C215S-rev       | hPTP1B WT              | TGC CGA TGC CTG CAC TG <u>G</u> AGT GCA CCA CAA CGG G          |  |
| His-sense             | pET19-PTP1B (aa 1-321) | CAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGG TGG TGG                        | Einführung His <sub>6</sub> -Gly <sub>3</sub> mit NcoI-Schnittstelle |
| His-antisense         | pET19-PTP1B (aa 1-321) | CAT GCC ACC ACC GTG ATG GTG ATG GTG ATG                        |  |

| <b>Name</b>              | <b>Ausgangs-Molekül</b> | <b>5'-3' Sequenz</b>                    | <b>Zweck</b>                                       |
|--------------------------|-------------------------|---|--|
| (2) Sequenzierungsprimer |                         |   |  |
| Seq-C-797-for            | hPTP1B WT<br>(aa 1-321) | AGC TGC GCT TCT CCT ACC TG              | Sequenzierung, C-Terminus<br>aa 321 (forward)      |
| Seq-C-1192-for           | hPTP1B (full<br>length) | GAC GAG GAC CAT GCA CTG AG              | Sequenzierung C-Terminus,<br>full length (forward) |
| Seq-N-104-rev            | hPTP1B WT               | GCC ACT CTA CAT GGG AAG TC              | Sequenzierung N-Terminus<br>(reverse)              |
| PTP1B-CS-f               | hPTP1B WT               | ACA TGG CCT GAC TTT GGA GTC C           | Sequenzierung Cys215-<br>Region (forward)          |
| PTP1B-215-Seq-r          | hPTP1B WT               | GGT CGG CTG TCT GGA TCA GC              | Sequenzierung Cys215-<br>Region (reverse)          |
| PTP1B-504-rev            | hPTP1B WT               | TTG TGC GCA TTT TAA CGA ACC             | Sequenzierung<br>aa77-Region (reverse)             |
| (3) interner PCR-Primer  |                         |   |  |
| PTP1B-T224-rev           | hPTP1B WT               | GCA AGA GGC AGG TAT CAG CCA GAC AGA AGG | Primer (reverse), Bindung<br>um Thr224             |

### 3.1.3 Plasmide

**Tabelle 3 Vorliegende Plasmide**

Aufgelistet sind alle Plasmide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten bzw. erzeugt wurden. Verwendete Abkürzungen: Amp.: Ampicillin, Neo.: Neomycin, Blast.: Blasticidin.

| Vektorname  | Gen                 | Mutation                                  | Resistenz    | Glyzerin-<br>kultur | Herkunft   |
|-------------|---------------------|---|--------------|---------------------|------------|
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | Wildtyp                                   | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | D. Barford |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | C215S                                     | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | C215A/S216A                               | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | D. Barford |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | K73A                                      | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | E75A                                      | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | E76A                                      | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | E76Q                                      | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | Q78A                                      | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | K73A/Q78A                                 | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pET19b      | PTP1B<br>(aa 1-321) | Wildtyp, N-term.<br>His <sub>6</sub> -tag | Amp.         | XL1Blue,<br>Rosetta | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | Wildtyp                                   | Amp., Neo.   | XL1Blue             | P. Gulati  |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | C215S                                     | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | C215A/S216A                               | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | K73A                                      | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | Q78A                                      | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B               | K73A/Q78A                                 | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3.1(-) | PTP1B<br>(aa 1-321) | Wildtyp                                   | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pLXSN       | PTP1B               | Wildtyp                                   | Amp., Neo.   | XL1Blue             | P. Gulati  |
| pLXSN       | PTP1B               | C215S                                     | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA6      | PTP1B               | Wildtyp                                   | Amp., Blast. | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | Wildtyp                                   | Amp., Neo.   | XL1Blue             | P. Gulati  |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | C215S                                     | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | C215A/S216A                               | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | K73A                                      | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | Q78A                                      | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |
| pcDNA3      | His-PTP1B           | K73A/Q78A                                 | Amp., Neo.   | XL1Blue             | erzeugt    |

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Mutagenese**

Für die rekombinante Expression in *E. coli* und die Überexpression in eukaryotischen Zellen wurden verschiedene PTP1B-Konstrukte erzeugt. Die Einführung der Punktmutationen zur Generierung der verschiedenen Konstrukte erfolgte mittels „QuikChange site-directed-mutagenesis“ entsprechend dem Protokoll von Stratagene (La Jolla, USA). Hierfür wurden Primer erstellt, die die gewünschten neuen Basen-Sequenzen enthielten und zueinander komplementär sind. Mit Hilfe dieser Primer und der fehlerarmen Pfu-DNA-Polymerase wurden die gesamten Plasmide amplifiziert. Anschließend wurden die Ausgangs-Plasmide mit Hilfe des methylierungsspezifischen Restriktionsenzym DpnI zerstört und nur die neu synthetisierte DNA, die die mutierten Sequenzen enthält, in Bakterien (*E. coli*, Stamm XL1-Blue) transfiziert. Die Überprüfung der erhaltenen Klone auf erfolgreiche Mutagenese erfolgte mittels DNA-Sequenzierung der fraglichen Region.

### **3.2.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung von PTP1B**

#### **Expression**

Die Expression der PTP1B-Konstrukte erfolgte in *E. coli Rosetta*. Hierfür wurden 500 ml LB-Medium mit 50 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Expression mit 2 mM IPTG induziert und die Kultur für 5 h bei 37 °C fortgesetzt. Die Bakterien wurden pelletiert (2500 rpm, 4 °C), auf Eis in 10 ml Puffer HiTrapQ-A resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Aufreinigung gelagert. Für die Lyse wurden die Bakterien aufgetaut und auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen (dreimal 30 s bei 50 % Leistung). Nach der Zugabe von EDTA (Endkonzentration 15 mM) und Triton X-100 (Endkonzentration 0,35 %) wurde das Lysat nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle unlöslichen Bestandteile wurden mittels Ultrazentrifugation (30.000 rpm, 30 min, 4 °C) abgetrennt und das Lysat für die Aufreinigung auf die FPLC-Säule zusätzlich filtriert (20 µm) und etwa im Verhältnis 1:1,5 mit HiTrapQ-A verdünnt.

#### **Anionenaustausch-Chromatographie**

Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie (5 ml HiTrapQ-Säule von GE Healthcare) bei Flussgeschwindigkeiten von 1 ml/min und einem Druck von unter 1 MPa. Nach der Äquilibrierung der Säule mit Puffer HiTrapQ-A wurde das Lysat in zwei Etappen auf die Säule gebracht. Nach Erreichen der Basislinie wurde dann mit der Elution begonnen. Hierfür wurde ein Gradient von 0 zu 0,5 M NaCl innerhalb von 50 ml angewandt. Dabei wurden Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt. Die Säule wurde dann

zunächst mit 100 % Puffer HiTrapQ-B und anschließend mit Puffer HiTrapQ-A gewaschen, um sie für die nächste Mutante verwenden zu können. Für längere Zeiträume wurde die Säule zuerst mit ddH<sub>2</sub>O, dann mit 20 % Ethanol äquilibriert und aufrecht bei 4 °C gelagert.

### **Dialyse**

Jeweils 20 µl der Fraktionen wurden entweder im pNPP-Assay (siehe 3.2.3) auf die erhaltene Phosphatase-Aktivität bzw. mittels SDS-PAGE mit Coomassiefärbung (für die inaktiven Mutanten) untersucht. Die Fraktionen mit der größten Menge PTP1B wurden vereint und dreimal gegen das 100-fache Volumen an Puffer PSS-A dialysiert. Die Dialyse erfolgte in Dialyseschlauch von Roth (14 kDa Ausschlussgrenze) mit zweimaligem Pufferwechsel bei 4 °C (zweimal 2-3 h und einmal über Nacht).

### **Hydrophobe Interaktions-Chromatographie**

Das Dialysat wurde erneut filtriert (20 µm) und auf die mit PSS-A äquilibrierte Phenylsuperose-Säule (1 ml Säulenvolumen) von Amersham gegeben. Die Flussgeschwindigkeit musste bei dieser Säule auf 0,25 ml/min begrenzt werden, damit der Druck nicht über 1,5 MPa stieg. Für die Elution wurde ein Gradient von 0 bis 60 % PSS-B über 15 ml benutzt und Fraktionen zu je 300 µl gesammelt. Die Säule wurde im Anschluss zunächst mit 100 % PSS-B und dann PSS-A gewaschen, mit ddH<sub>2</sub>O äquilibriert und in 20 % Ethanol aufrecht bei 4 °C gelagert. Nach der Analyse der Fraktionen wurden die besten 4-5 Fraktionen vereint, in Aliquots zu je 60 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und diese bei -80 °C gelagert. Die Analyse der erhaltenen Proteinkonzentration erfolgte über SDS-PAGE mit Coomassiefärbung im Vergleich zum BSA-Standard bzw. alten Aufreinigungen.

### **Puffer und Medien**

#### LB-Medium

10 g/l Trypton  
10 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt

#### HiTrapQ-A

20 mM Imidazol (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
0,5 mM EGTA  
2 mM Benzamidin  
0,5 mM PMSF  
3 mM DTT  
10 % Glycerol

#### HiTrapQ-B

1 M NaCl  
20 mM Imidazol (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
0,5 mM EGTA  
2 mM Benzamidin  
0,5 mM PMSF  
3 mM DTT  
10 % Glycerol

PSS-A

25 mM Tris (pH 7,5)  
 1,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 1 mM EDTA  
 1 mM EGTA  
 2 mM Benzamidine  
 0,5 mM PMSF  
 3 mM DTT

PSS-B

25 mM Tris (pH 7,5)  
 10 % Glyzerol  
 1 mM EDTA  
 1 mM EGTA  
 2 mM Benzamidine  
 0,5 mM PMSF  
 3 mM DTT

**3.2.3 Analyse der Phosphatase-Aktivität mittels pNPP-Assay**

Die Assays wurden direkt in 96-well-Mikrotiterplatten und in der Regel mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die Proben wurden je nach Bedarf mit pNPP-Puffer (100 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) verdünnt. Das Phosphatase-Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP) wurde in dem gleichen Puffer gelöst und in einer Endkonzentration von 10 mM zu den Proben gegeben. Die Inkubation erfolgte je nach Aktivität für 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des doppelten Probenvolumens NaOH (1 M) gestoppt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

**3.2.4 Bestimmung von  $K_M$  und  $v_{Max}$**

Für die Bestimmung der katalytischen Konstanten wurden für jeden Messpunkt 1 µg der rekombinant exprimierten PTP1B (Wildtyp bzw. K73A/Q78A-Mutante) eingesetzt und mit pNPP inkubiert. Hierfür wurde eine Titration der Substratkonzentration in acht Schritten von 0,1 mM bis 10 mM durchgeführt. Etwa alle 30 s wurde die optische Dichte der Proben ( $\lambda = 405$  nm) gemessen und gegen die Reaktionsdauer aufgetragen. Für die Bestimmung der Produktkonzentration wurde parallel eine Verdünnungsreihe mit p-Nitrophenol (0,05 mM bis 2 mM) gemessen. Aus den ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten wurden die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  und die Maximalgeschwindigkeit  $v_{Max}$  bestimmt. Hierfür wurde die Software Sigmaplot 10 (Systat Software, Chicago, USA) mit der Erweiterung „Enzyme Kinetics“ (Modul „Pharmacology enzyme kinetics“ mit 1 Substrat und 0 Aktivatoren) verwendet.

**3.2.5 *In vitro*-Verdau von PTP1B**

Aufgereinigte PTP1B (10 µg pro 50 µl Reaktionsansatz) wurde mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder ddH<sub>2</sub>O für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Wasserstoffperoxid aus der Reaktion zu entfernen, wurde anschließend 0,3 µg/ml Katalase zugegeben und die Inkubation für weitere 30 min fortgeführt. Durch Zugabe von 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 3 µg Calpain

zu einem Endvolumen von 70 µl wurde die Verdaureaktion bei 20 °C gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 6xA-Probenpuffer und Kochen der Proben für 5 min gestoppt. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE (13%ige Gele) aufgetrennt und entweder durch Coomassie- bzw. Silberfärbung analysiert oder auf PVDF-Membran transferiert und im Immunblot mit verschiedenen Antikörpern gegen PTP1B detektiert. Für die Identifikation der Fragmente mittels EDMAN-Abbau wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf Nitrocellulose-Membran transferiert und diese mit Coomassie gefärbt. Die zu analysierenden Fragmente wurden ausgeschnitten. Die Sequenzierung wurde durch Herrn Dr. Schlott (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) durchgeführt. Für die massenspektrometrische Analyse der Fragmente wurden die Verdau-Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie angefärbt. Die fraglichen Banden wurden ausgeschnitten und für den tryptischen Verdau und die Analyse im LC-ESI ebenfalls an Herrn Dr. Schlott (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) übergeben.

### **Puffer**

#### pNPP-Puffer

100 mM HEPES (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA

#### 6xA Probenpuffer

4 ml Glycerol  
3 ml β-Mercaptoethanol  
3 ml SDS-Lösung (20 %)  
Spatelspitze Bromphenolblau

### **3.2.6 Assoziationsanalyse**

Für die Analyse der Bindung von PTP1B an Calpain wurde ein publiziertes Protokoll leicht abgewandelt (Raynaud *et al.*, 2005). 96-well-Mikrotiterplatten wurden mit Calpain in Gegenwart von 1 µM E64 (einem irreversiblen Inhibitor) und entweder 1 mM EGTA oder 1 mM CaCl<sub>2</sub> beschichtet. Hierfür wurden 0,1 µg Calpain pro well über Nacht bei Raumtemperatur in einem Volumen von 100 µl in den Platten inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 200 µl/well Blockierlösung (2,5 % Milch und 1 % BSA in PBS) gegen unspezifische Proteinbindung blockiert. Rekombinant exprimierte PTP1B wurde mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorinkubiert und dann in die Mikrotiterplatte gegeben. Die Bindung wurde für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche Waschschrte wurden mit Hochsalz-PBS-Tween durchgeführt. Die Detektion der PTP1B erfolgte mittels Antikörper gegen PTP1B (1:1000, PH01) und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:10 000, anti-Maus-IgG von PIERCE) mit jeweils 2 h Inkubation und dreimaligem Waschen. Die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität erfolgte mit Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat. Zum Teil wurde anstelle der Antikörper-basierten Detektion ein Phosphatase-Assay zur Messung der gebundenen PTP1B



durchgeführt. Hierfür wurde die gebundene PTP1B mit 50 mM DTT zurückreduziert und der Umsatz des Phosphatasesubstrats pNPP direkt in den Platten bestimmt.

### Puffer

#### Hochsalz-PBS-Tween für ELISA

0,5 M NaCl  
2,7 mM KCl  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4  
0,2 % Tween 20

#### TMB-Lösung (stock)

1 mg/ml Tetramethylbenzidin in DMSO

#### TMB-Lösung (Verdünnung)

0,1 mg/ml Tetramethylbenzidin in  
25 mM Citrat  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:5000)

### 3.2.7 In-Gel-Phosphatase-Assay

Der In-Gel-Phosphatase-Assay erlaubt die Analyse der Phosphatase-Aktivität verschiedener Moleküle, nachdem diese im SDS-Polyacrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt wurden (Markova *et al.*, 2005). Hierfür wird ein universales PTP-Substrat poly(Glu, Tyr) mit Hilfe von aufgereinigter Src-Kinase und radioaktiv markiertem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP phosphoryliert. Dieses Substrat wird vor dem Gießen zu dem Trenngel-Ansatz gegeben ( $2 \cdot 10^5$  cpm/ml) und mit in das Gel einpolymerisiert. Die Proben werden dann normal mittels SDS-PAGE darin aufgetrennt. Anschließend wird mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid eine komplette Denaturierung der Proteine durchgeführt, bevor die Proteine langsam wieder renaturiert werden. Die auf diesem Weg reaktivierten PTP sind danach in der Lage, das einpolymerisierte Substrat zu dephosphorylieren. Dies führt zu einem Auswaschen der radioaktiven <sup>32</sup>P-Markierung an eben den Stellen, wo die Proteinbanden der Phosphatasen liegen. Da die Renaturierungsschritte in einem reduzierenden Milieu erfolgt, werden auch reversibel oxidierte PTP-Moleküle wieder reaktiviert. Das verwendete Protokoll und die Pufferzusammensetzungen wurden der Literatur entnommen (Markova *et al.*, 2005).

Dieser Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Zwecke eingesetzt. Zum einen wurde auf diesem Weg analysiert, ob die oxidationsspezifischen Fragmente der PTP1B noch katalytisch aktiv sind. Zum anderen wurden auch modifizierte In-Gel-Phosphatase-Assays durchgeführt, die der Bestimmung des Anteils reversibel oxidierte Phosphatase dienen. Hierfür wurden die PTP1B-Proben nach entsprechender Behandlung mit 150 mM Natrium-Iodoacetat (IAA) inkubiert. Dies führt zu einer Alkylierung aller nicht-oxidierten katalytischen Cystein-Reste. Während die reversibel oxidierten Cystein-Reste im Laufe der SDS-PAGE und der Renaturierungsschritte des In-Gel-Assays wieder reaktiviert werden, bleibt die Alkylierung irreversibel und diese Moleküle sind dann nicht zur Substrat-

Dephosphorylierung fähig. Nach der Renaturierungszeit wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und gleichzeitig die Proteine fixiert. Nach dem Trocknen des Gels erfolgte entweder eine Exposition mit Röntgenfilmen über Nacht bei -80 °C oder eine Auswertung mittels Phosphorimager (Fuji FLA-7000).

### **3.2.8 Zellkultur, Transfektion und Erzeugung stabiler Linien**

Die einzelnen Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, prinzipiell in Abwesenheit von Antibiotika-Zusatz, kultiviert. Die verwendeten Medien und Seren sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Erhaltung wurden die Kulturen alle 2-3 Tage gegebenenfalls durch Ablösung der Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA gesplittet. Die verwendeten HUVEC-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Regine Heller (Institut für Molekulare Zellbiologie, Jena) zur Verfügung gestellt.

Für die Erzeugung von Kryo-Kulturen wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und anschließend in 10 % FCS / 90 % DMSO resuspendiert und zunächst bei -80 °C langsam eingefroren. Die Röhrchen wurden nach einigen Tagen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff bzw. eine -150 °C-Truhe überführt und dort gelagert. Für die Reaktivierung von Kryo-Kulturen wurden diese in Medium aufgetaut und pelletiert, um das DMSO zu entfernen. Erst danach wurden sie in serumhaltigem Medium in Kulturflaschen überführt. Hierbei sei bemerkt, dass für das Auftauen der capn4 k.o.-Zellen eine vorherige Beschichtung der Kulturflasche notwendig war. Dafür wurde die Flasche für etwa 30 min mit 50 mg/ml poly-L-Lysin bei 37 °C inkubiert, anschließend die Flüssigkeit abgesaugt und die Flasche über Nacht im 37 °C-Inkubator getrocknet. In der Erhaltungskultur war dies nicht mehr notwendig.

**Tabelle 4 Zellkulturbedingungen**

| <b>Zelllinie</b>           | <b>Medium</b> | <b>Serum</b> |
|----------------------------|---------------|--------------|
| A431                       | DMEM          | 10 % FCS     |
| capn4-MEFs                 | DMEM          | 10 % FCS     |
| HEK293                     | DMEM/F12      | 10 % FCS     |
| HeLa                       | DMEM/F12      | 10 % FCS     |
| K562                       | RPMI          | 10 % FCS     |
| PTP1B <sup>-/-</sup> -MEFs | DMEM          | 10 % NCS     |

Für die Transfektion wurden die Zellen (HEK293, HeLa bzw. PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs) in entsprechender Dichte eingesät, so dass sie am nächsten Tag etwa 50 % konfluent waren. Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit der Calciumphosphat-Methode nach

Standardprotokoll des Labors (Chen and Okayama, 1987). HeLa- bzw. PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) gemäß mitgeliefertem Protokoll transfiziert. Für die stabile Transfektion wurde die DNA zuvor mit PvuI linearisiert, mit Isopropanol gefällt und anschließend aus Sterilitätsgründen für 20 min bei 65 °C erhitzt.

### **Selektion der stabilen Linien und der Einzelklone**

Die Expressionskonstrukte für eukaryotische Zellen (pcDNA3-Vektor) sind mit einer Resistenzkassette gegen Neomycin (G418) ausgestattet. Alle erfolgreich transfizierten Zellen sollten daher gegenüber diesem Antibiotikum resistent sein. In Vorversuchen wurde die minimale Konzentration an G418 ermittelt, bei der nicht-transfizierte Zellen komplett sterben. Für die HeLa-Zellen wurden entsprechend 0,5 µg/ml zur Selektion eingesetzt. Einen Tag nach der Transfektion der Zellen mit linearisiertem Plasmid wurden die Zellen mit 1 µg/ml G418 behandelt. Nach Expansion der überlebenden Zellen (etwa zwei Wochen) wurden die Expressionsspiegel an His-PTP1B analysiert. Da diese sehr gering waren, wurde eine Einzelzellklon-Selektion angesetzt. Hierfür wurden trypsinierte, vereinzelte Zellen gezählt und in verschiedenen Dichten (3, 1 und 0,3 Zellen/well) in 96-well-Platten eingesät. Nach etwa zwei Wochen wurden die einzelnen Wells mit dem Mikroskop auf Zellkolonien untersucht. Wells mit Einzelkolonien wurden weiterhin mit Medium und G418 versorgt und, nachdem ausreichend Zellen vorhanden waren, in größere Platten umgesetzt. Für jede Mutante wurden zwischen sieben und vierzehn Kolonien gefunden und weiterkultiviert. Eine Analyse der Expressionsspiegel erfolgte im Immunblot und nur die Zelllinien mit den höchsten Spiegeln wurden weiterverwendet.

### **3.2.9 Lyse, Proteinbestimmung, IP**

Für die Zelllyse wurden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem, entgastem PBS gewaschen und anschließend in eiskaltem, entgastem Lysepuffer aufgenommen. Die Entgasung aller Puffer erfolgte in der Regel für vier Stunden auf Eis mit einer Membranvakuum-pumpe (MZ2C, 1,7 m<sup>3</sup>/h, 0,18 kW). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden durch kräftiges Schütteln homogenisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min abgetrennt. Die Lysate wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis (für Immunpräzipitation) bzw. bei -20 °C (SDS-PAGE-Proben) gelagert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Verdünnungen der Lysate (1:50 bzw. 1:100) in Wasser als Duplikate hergestellt und der BCA-Kit (PIERCE) entsprechend dem Protokoll im 96-well-Platten-Format verwendet. Für die

SDS-PAGE wurden dann entsprechende Mengen der Lysate mit 6xA-Probenpuffer (siehe Seite 35) versetzt, gemischt und für fünf Minuten gekocht.

Für die Immunpräzipitation von PTP1B musste der entsprechende Antikörper zunächst kovalent an Protein-A-Sepharose-Beads gekoppelt werden. Sämtliche Inkubationsschritte der Kopplungsreaktion wurden bei Raumtemperatur auf dem Drehrad durchgeführt. Für zehn IP-Ansätze wurden 50 mg Protein-A-Sepharose in Lysepuffer II resuspendiert und gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml Lysepuffer II aufgenommen und mit 10 µg Antikörper für eine Stunde inkubiert. Die Beads wurden dann zweimal mit je 1 ml Natriumtetraborat-Puffer (0,1 M Natriumtetraborat, pH 9,0) gewaschen und mit frischem 20 mM Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid in Natriumtetraborat-Puffer kräftig gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Beads für zwei Stunden mit 0,2 M Ethanolin inkubiert und abschließend mit PBS gewaschen. Die gekoppelten Anti-PTP1B-Beads wurden bei 4 °C in PBS mit 0,02 % Natriumazid gelagert und vor dem Gebrauch dreimal mit einem 20-fachen Überschuss an Lysepuffer II gewaschen.

## **Puffer**

### Lysepuffer I

50 mM HEPES (pH 7,4)  
 150 mM NaCl  
 0,5 % NP40  
 1 mM EDTA  
 frisch zugegeben:  
 1x protease inhibitor cocktail  
 1:100 Leupeptin, Pepstatin A, PMSF  
 1:1000 Aprotinin

### Lysepuffer II

50 mM HEPES (pH 7,4)  
 150 mM NaCl  
 0,5 % NP40  
 10 mM NaPP<sub>i</sub>  
 2,09 g/l NaF  
 frisch zugegeben:  
 1x protease inhibitor cocktail  
 1:100 β-Glyzerophosphat, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

## **3.2.10 UV-Bestrahlung von Zellen**

### **Kalibrierung der UV-Lampen**

Eine genaue Kalibrierung der verwendeten UV-A-Lampe (Sellamed 1200, Sellas Medizinische Geräte GmbH, Gevelsberg) erfolgte in der Dermatologischen Abteilung der Elbe Kliniken in Buxtehude. Für die Messungen vor Ort wurde sowohl für die UV-A- als auch die UV-B-Lampe (UVM-15, Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch) ein Handmessgerät (UV-Light meter UV-340, Lutron Electronic Enterprise, Taiwan) verwendet. Die verwendeten Dosen wurden an bereits publizierten Werten und über einen Abgleich mit dem in dieser Publikation verwendeten Dosimeter orientiert (Gulati *et al.*, 2004).

### **Bestrahlung der Zellen**

Die Zellen wurden in 3 cm- oder 10 cm-Schalen eingesät und am nächsten Morgen für vier Stunden in serumfreiem Medium gehungert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem, entgastem PBS wurde ein dünner Film PBS zurückgelassen und die Zellen auf Eis bestrahlt. Hierfür wurde entsprechend der vorangegangenen Publikation (Gulati *et al.*, 2004) ein Abstand von 8 cm zwischen Zellen und Lampe gewählt und die Dosis über die Bestrahlungszeit entsprechend variiert. Bei längeren Bestrahlungszeiten wurden die Schalen alle 20 Minuten geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Unbestrahlte Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Direkt im Anschluss an die Bestrahlung wurde das PBS abgesaugt und eiskalter, entgaster Lysepuffer I auf die Zellen gegeben. Nach der Lyse wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

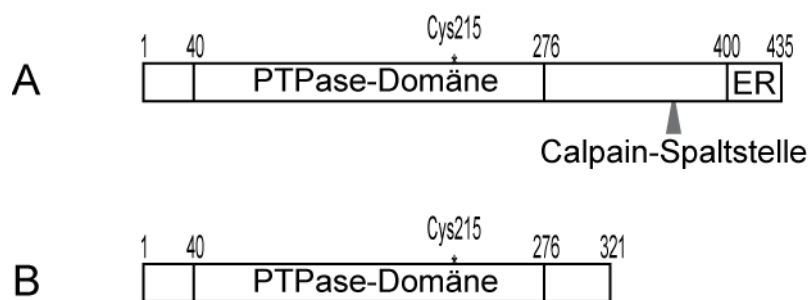
### **3.2.11 Zellstimulation**

Für die Stimulation der Zellen mit Insulin oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ionomycin wurden die Zellen eingesät und über Nacht in Medium mit 0,5 % Serum gehungert. Vor der Stimulation wurden die Zellen erneut mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit serumfreiem Medium und entsprechendem Stimulus bei 37 °C inkubiert. Die Stimulation mit Insulin erfolgte für verschiedene Zeitspannen und bei einer Konzentration von 10 nM, die für die Stimulation des Insulinrezeptors spezifisch ist, und evtl. exprimierte IGF-Rezeptoren unstimuliert lässt. Für die kombinierte Inkubation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ionomycin wurden die Zellen zunächst für 13 Minuten mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und dann für weitere zwei Minuten mit 2 µM Ionomycin inkubiert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem, entgastem PBS gewaschen und in eiskaltem, ebenfalls entgastem Lysepuffer I aufgenommen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *In vitro*-Analyse des oxidationsabhängigen Abbaus von PTP1B durch Calpain

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass der UV-A-induzierte Abbau von PTP von der Oxidation abhängt und darüber hinaus auch durch die Stimulation der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einem Calpain-aktivierenden Ionophor ausgelöst werden kann (Gulati *et al.*, 2004). Für die Charakterisierung des oxidationspezifischen Abbaus von PTP durch Calpain *in vitro* sollte die PTP1B als Modell-PTP dienen, da diese sich durch eine hohe Oxidations-Empfindlichkeit auszeichnet und ihr UV-A-abhängiger Abbau bereits in verschiedenen Zellsystemen gezeigt wurde. Um die unspezifischer Spaltungen zu reduzieren, wurde auf die Verwendung von „tags“ zur Aufreinigung von PTP1B verzichtet. In PTP1B befindet sich außerdem eine konstitutive, C-terminale Spaltstelle für Calpain (Frangioni *et al.*, 1993), die jedoch nicht zu der beobachteten UV-induzierten Inaktivierung beiträgt. Diese Spaltstelle wurde in den verwendeten Konstrukten für die *in vitro*-Experimente (siehe Abbildung 8) deletiert, da diese Spaltung die Abbau-Versuche erschwert hätte. Die biochemische Aufreinigung dieser C-terminal verkürzten PTP1B ist bereits beschrieben, und die Expressionskonstrukte wurden freundlicherweise von Prof. David Barford (Institute of Cancer Research, London) zur Verfügung gestellt (Barford *et al.*, 1994).

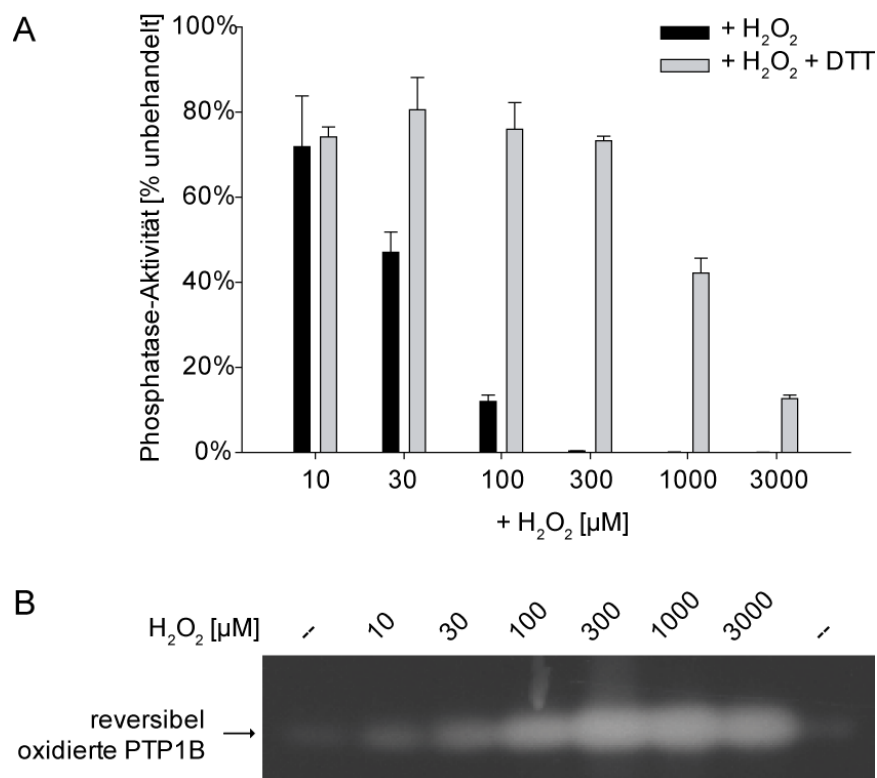


**Abbildung 8** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PTP1B  
Schematische Darstellung von PTP1B (A) und der verwendeten, C-terminal verkürzten Form (B).

#### 4.1.1 Reversible Oxidation von PTP1B *in vitro* führt zu erhöhter Spaltung durch Calpain

Die Oxidation der Phosphatasen gilt als wesentliche Voraussetzung für den UV-induzierten Abbau und sollte für die *in vitro*-Experimente durch Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erreicht werden. Um eine geeignete Konzentration hierfür zu ermitteln, wurde die in Bakterien exprimierte,

aufgereinigte Phosphatase mit verschiedenen Konzentrationen an  $H_2O_2$  inkubiert. Im Anschluss daran wurde einem Teil der Ansätze ein Überschuss an dem Reduktionsmittel DTT zugegeben und die Phosphatase-Aktivität anhand des Umsatzes von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) gemessen (siehe Abbildung 9 A). Mit steigender Konzentration an  $H_2O_2$  verringert sich der Anteil aktiver PTP1B stark (schwarze Balken). Bei geringeren  $H_2O_2$ -Dosen lässt sich die Aktivität durch die Reduktion mit DTT wieder herstellen (graue Balken), was auf eine reversible Oxidation der Phosphatase schließen lässt. Hingegen nimmt etwa ab 1 mM  $H_2O_2$  die Menge irreversibel oxidiertes PTP1B zu. Dies wird dadurch erkennbar, dass auch die Behandlung mit DTT nicht mehr zu einer Re-Aktivierung der Phosphatase führt.



**Abbildung 9 Reversible Oxidation von rekombinanter PTP1B**

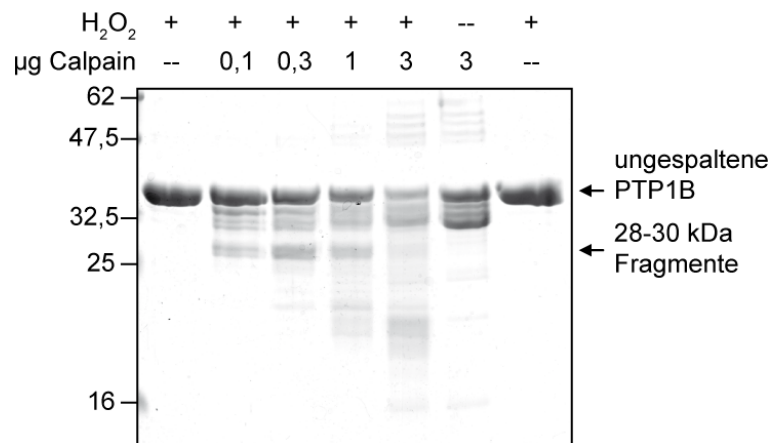
(A) Aufgereinigte PTP1B wurde mit verschiedenen Konzentrationen  $H_2O_2$  behandelt und anschließend mit (grau) oder ohne (schwarz) Überschuss an DTT (50 mM) inkubiert. Die Messung der Phosphatase-Aktivität erfolgte mittels pNPP-Assay und wurde auf die nicht-oxidierte Kontrolle bezogen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. (B) PTP1B wurde (wie in A) mit steigenden Konzentrationen  $H_2O_2$  behandelt. Anschließend wurden nicht-oxidierte Cysteine mit Iodacetat alkyliert und die Proben in einem radioaktiven In-Gel-Phosphatase-Assay analysiert. Weiße Banden zeigen die verbliebene Aktivität an, während alkylierte oder irreversibel oxidierte PTP1B inaktiv bleiben. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von drei unabhängigen Experimenten.

Ähnliche Ergebnisse lieferte auch ein anderer Assay zur Untersuchung der Reversibilität der Oxidation (siehe Abbildung 9 B). Hierfür wurde die aufgereinigte PTP1B ebenfalls mit

verschiedenen Konzentrationen  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorbehandelt. Die anschließende Inkubation mit Iodacetat (IAA) führt zu einer irreversiblen Alkylierung verbliebener, nicht-oxidierter Cystein-Reste und damit der Blockierung der Phosphatase-Aktivität der nicht-oxidierten PTP1B-Moleküle. Wird die Aktivität dann in einem radioaktiven In-Gel-Assay unter reduzierenden Bedingungen analysiert, so sind weder irreversibel oxidierte, noch vormals nicht-oxidierte, alkylierte PTP1B detektierbar. Die entstehenden weißen Banden spiegeln die Menge der vorher reversibel-oxidierten, inzwischen wieder reduzierten Phosphatase wider. Auch hier zeigte sich der größte Anteil reversibel oxidiertes PTP1B bei  $300 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , weshalb alle folgenden Verdau-Experimente bei dieser Konzentration durchgeführt wurden.

Für die Spaltungsexperimente wurde kommerziell erhältliches, aufgereinigtes  $\mu$ -Calpain aus humanen Erythrozyten verwendet. PTP1B wurde mit  $300 \mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid vorbehandelt, um eine vorrangig reversible Oxidation der Phosphatase zu erreichen. Damit eine eventuelle Beeinflussung der Aktivität von Calpain durch die Wasserstoffperoxid-Behandlung ausgeschlossen werden konnte, wurde überschüssiges  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Katalase zersetzt, bevor anschließend die Inkubation mit Calpain erfolgte. Die Spaltreaktion wurde durch die gleichzeitige Zugabe von  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  und der jeweils angegebenen Menge Calpain gestartet. Die Autoproteolyse von Calpain ist ein wichtiger Aspekt und kann zu einer raschen Selbst-Inaktivierung der Protease führen. Eine gute Einstellung der Inkubationsbedingungen ist daher sehr wichtig. Die Spaltreaktion wurde aus diesem Grund bei nur  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt und ein Vergleich verschiedener Zeitspannen ergab eine optimale Inkubationszeit von  $30 \text{ min}$  (vergleiche hierzu auch Abbildung 17, oberer Teil, auf Seite 49). Zudem wurde die eingesetzte Calpain-Menge titriert (siehe Abbildung 10). Mit zunehmender Menge an Calpain ist ein deutlicher Verlust an ungespaltener PTP1B zu erkennen, die mit dem Auftreten von oxidationsspezifischen, niedermolekularen Fragmenten (ca.  $28\text{-}30 \text{ kDa}$  sowie weitere kleinere Fragmente) einhergeht. Die Spaltung der nicht oxidierten PTP1B (zweite Bahn von rechts) fällt deutlich geringer aus und führt außerdem zu größeren Fragmenten (über  $30 \text{ kDa}$ ). Die beobachteten, oxidationsspezifischen Fragmente von  $28\text{-}30 \text{ kDa}$  stellen vermutlich initiale Spaltprodukte dar. Eine längere Einwirkung von Calpain bzw. eine größer Menge der Protease führt zu einem weiteren Abbau, weshalb die Intensität dieser Fragmente dann wieder abnimmt.

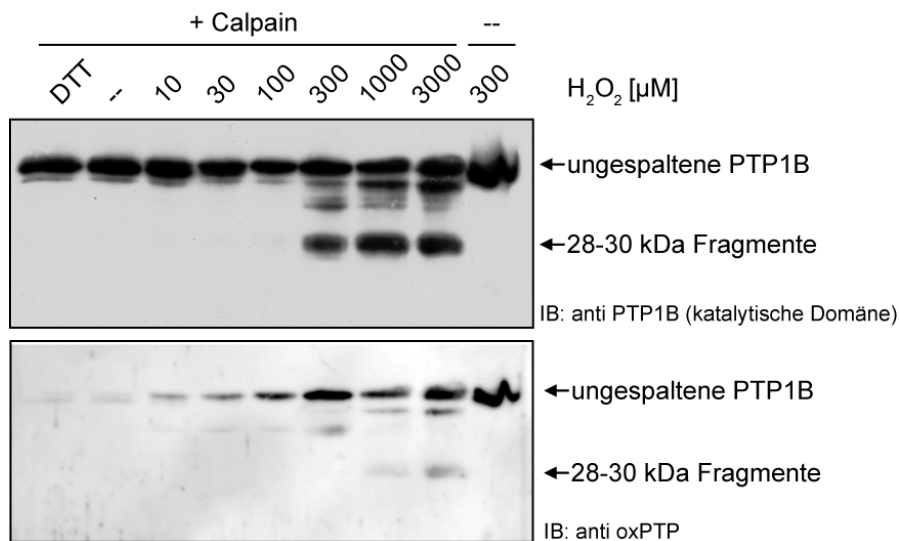




**Abbildung 10 Oxidationsabhängiger Abbau von PTP1B durch Calpain**

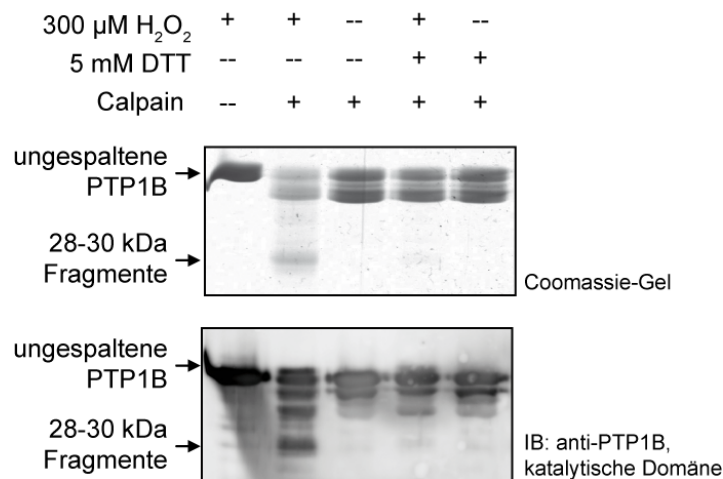
Rekombinant exprimierte PTP1B (10 µg pro Bahn) wurde mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, überschüssiges Wasserstoffperoxid durch 15 ng Katalase zersetzt und anschließend für 30 min mit verschiedenen Mengen aufgereinigtem µ-Calpain inkubiert. Nach dem Denaturieren der Proben wurden sie in einem 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Coomassiefärbung des Gels oder der PVDF-Membran nach Transfer. Hier gezeigt ist ein repräsentatives Gel von sechs unabhängigen Experimenten.

Die Titration der eingesetzten Wasserstoffperoxid-Konzentration im Spaltungsansatz zeigt anhand der Zunahme der Fragmentbildung mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration erneut die Oxidationsspezifität der beobachteten Spaltung (Abbildung 11). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Reversibilität der Oxidation (vergleiche Abbildung 9) lässt sich vermuten, dass Calpain mit hoher Spezifität vor allem reversibel oxidierte PTP1B spaltet. Die Analyse mit einem Antikörper gegen irreversibel oxidierte katalytische Zentren (oxPTP, unterer Teil der Abbildung 11) zeigt zudem, dass bereits bei 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein Teil der ungespaltenen PTP1B irreversibel oxidiert ist, während kaum terminal oxidierte Fragmente detektierbar sind (Persson *et al.*, 2004). Als weitere Bestätigung für die spezifische Spaltung reversibel oxidierter PTP1B wurde die oxidierte Phosphatase vor der Calpain-Zugabe mit dem Reduktionsmittel DTT inkubiert. Dies führt zur spezifischen Rückreduktion reversibel oxidierter Phosphatase, während potenziell vorliegende irreversibel oxidierte PTP1B davon unbeeinflusst bleibt. Eine Analyse der mit Calpain verdauten Proben im Immunblot zeigt, dass die Rückreduktion mit DTT die oxidationsspezifische Spaltung verringert und lediglich die unspezifische Spaltung der nicht-oxidierten Kontrolle zu beobachten ist (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 11 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosis-abhängiger Anstieg der PTP1B-Fragmentierung durch Calpain**

PTP1B (0,5 μg) wurde mit verschiedenen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Spaltung mit je 0,1 μg μ-Calpain wurden die Proben mittels Immunblot unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

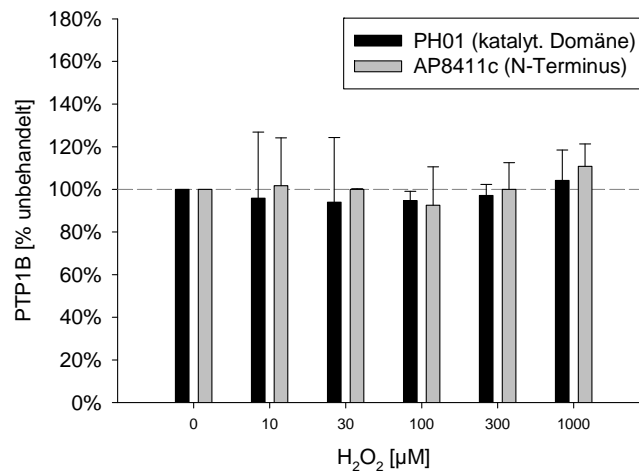


**Abbildung 12 Rückreduzierte PTP1B zeigt deutlich verringerte Spaltung durch Calpain**

Im Anschluss an die Oxidation der PTP1B (0,5 μg) durch 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde ein Teil der Proben für 30 min mit 5 mM DTT inkubiert. Die μ-Calpain-verdauten Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der PTP1B erfolgte sowohl im Coomassie-Gel (oberer Teil) als auch im Immunblot (unterer Teil) mit einem Antikörper gegen die katalytische Domäne von PTP1B (PH01). Hier sind ein repräsentatives Gel und zugehöriger Immunblot aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

#### 4.1.2 Oxidationsabhängige Spaltung von PTP1B durch Calpain führt zum Verlust des N-Terminus und zur Inaktivierung der Phosphatase

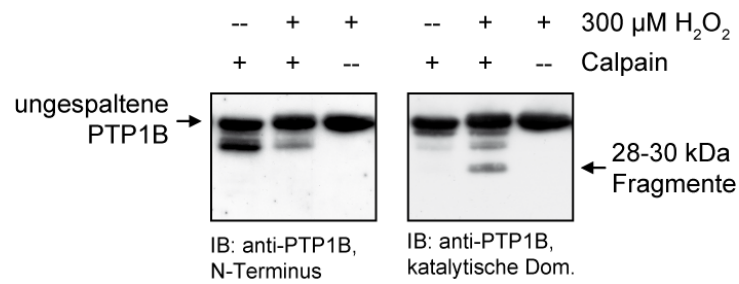
Eine Analyse der Spaltansätze im Immunblot mit verschiedenen PTP1B-spezifischen Antikörpern sollte die Lokalisation der oxidationsspezifischen Spaltstelle eingrenzen. Dazu wurde ein Antikörper gegen die katalytische Domäne (PH01) sowie zwei verschiedene Antikörper gegen den N-Terminus von humaner PTP1B (sc1718 und AP8411c) verwendet. Um eine unterschiedliche Detektierbarkeit von nativer und oxidiertem PTP1B durch die Antikörper auszuschließen, wurden zunächst Proben mit steigender Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert und im Immunblot untersucht (Abbildung 13). Es konnte gezeigt werden, dass die oxidierte Form von PTP1B genauso von Antikörpern erkannt wird wie die reduzierte Form.



**Abbildung 13 PTP1B-spezifische Antikörper unterscheiden nicht zwischen der nativen und der oxidierten Form des Proteins im Immunblot**

Rekombinante PTP1B (0,5 µg pro Punkt) wurde mit steigender Konzentration  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und anschließend in SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht. Der Immunblot wurde mit den angegebenen Antikörpern gegen PTP1B durchgeführt und mit dem Auswerteprogramm Multigauge (Fuji) quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von Duplikaten.

Eine Analyse von Verdau-Experimenten mit den verschiedenen Antikörpern im Immunblot ergab jedoch deutliche Unterschiede in der Detektion der oxidationsspezifischen Fragmente (siehe Abbildung 14). Während der Antikörper gegen die katalytische Domäne (Abbildung 14, links) ein ähnliches Bild wie die Coomassie-Färbungen ergab, zeigte die Analyse der Membran mit den Antikörpern gegen den N-Terminus keine oxidationsspezifischen Fragmente (Abbildung 14, rechte Seite). Hier sind lediglich die nicht oxidationsabhängigen, höhermolekularen Fragmente (>30 kDa) zu erkennen.



**Abbildung 14 Die oxidationsspezifischen Fragmente repräsentieren N-terminal verkürzte PTP1B**

PTP1B (0,5 μg pro Bahn) wurde mit oder ohne 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelt und anschließend dem Calpain-Verdau unterzogen. Die Proben wurden dann im 13%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Der Immunblot wurde zunächst mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von PTP1B (sc1718, rechte Seite) und nach dem Strippen der Membran mit einem Antikörper gegen die katalytische Domäne von PTP1B entwickelt.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der oxidationsspezifischen Spaltung um eine N-terminale Verkürzung handelt. Um die Spaltstellen exakt zu ermitteln, wurden die Banden verschiedener Fragmente durch Herrn Dr. Schlott (Fritz-Lipmann-Institut, Jena) mittels EDMAN-Abbau sequenziert (siehe Abbildung 15). Bei dieser Methode werden die Aminosäuren beginnend vom N-Terminus schrittweise chemisch abgebaut und mittels HPLC identifiziert. Die jeweils angegebenen Aminosäuren im Einbuchstabencode für die Positionen P<sub>1</sub>' bis P<sub>7</sub>' sind in der Abbildung 15 nach ihrer Wahrscheinlichkeit sortiert. Große Buchstaben geben sehr wahrscheinliche Aminosäuren an, während die kleinen Buchstaben für in Spuren detektierte Aminosäuren mit relativ geringerer Sicherheit stehen. Je weiter oben eine

| P <sub>1</sub> ' | P <sub>2</sub> ' | P <sub>3</sub> ' | P <sub>4</sub> ' | P <sub>5</sub> ' | P <sub>6</sub> ' | P <sub>7</sub> ' |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| A                | Q                | R                | q                | L                | I                | F                |
| S                | L                | D                | v                | Y                | M                | L                |
| t                | l                | l                | p                | F                | r                | d                |
|                  | g                |                  | h                | a                |                  | k                |
|                  | e                |                  | s                |                  |                  |                  |
|                  | r                |                  |                  |                  |                  |                  |
|                  | y                |                  |                  |                  |                  |                  |

**Abbildung 15 Identifizierung des N-Terminus der oxidationsspezifischen 28-30 kDa Fragmente**

Die Proben der Spaltansätze wurden auf Nitrocellulose-Membran transferiert und dort für einige Sekunden mit Coomassie angefärbt. Die Banden der oxidationsspezifischen Fragmente wurden ausgeschnitten und mittels EDMAN-Abbau sequenziert. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis einer solchen Sequenzierung im Einbuchstabencode. Die identifizierten Aminosäuren für die einzelnen Abbau-schritte (P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', etc.) sind nach der Peak-Stärke sortiert (zu oberst die höchstkonzentrierte) und Aminosäuren, die nur in Spuren detektiert wurden sind in kleinen Buchstaben angegeben. Rot markiert sind die Aminosäuren, die in PTP1B beginnend ab Ala77 vorkommen.

Aminosäure steht, desto stärker war das entsprechende Signal. Die in Abbildung 15 rot markierten Aminosäuren ergeben eine interne Sequenz AQRSYIL aus PTP1B, beginnend bei Alanin-77. Eine Überprüfung anderer möglicher Kombinationen dieser Aminosäuren zu potenziellen N-Termini, die aus anderen Spaltungen in PTP1B oder gar Calpain-1 selbst resultieren könnten, ergab keine weiteren signifikanten Übereinstimmungen. Alle untersuchten oxidationspezifischen Fragmentbanden ergaben dieselbe Aminosäuresequenz, und das Ergebnis konnte in wiederholten Experimenten bestätigt werden. Die Tatsache, dass Fragmente verschiedener Größen das gleiche Resultat der N-terminalen Sequenzierung ergaben, lässt weitere Spaltungen nahe dem C-Terminus vermuten. Eine Einordnung des identifizierten Spaltortes in die Gesamtsequenz von PTP1B ist in Abbildung 16 dargestellt.

```

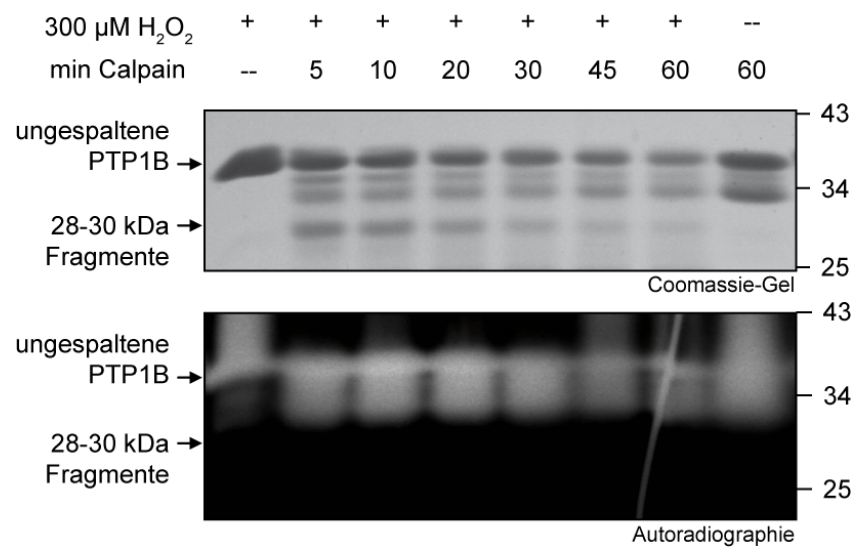
1  MEMEKEFEQI DKSGSWAAIY QDIRHEASDF PCRVAKLKPN KNRNRYR DVS
51  PFDHSRIKLH QEDNDYINAS LIK*MEE**A*QRS YILTQGPLPN TCGHFWEMVW
101 EQKSRGVVML NRVMKEKGSLK CAQYWPQQKEE KEMIFEDTNL KLTLLISEDIK
151 SYITVRQLEL ENLTTQETRE ILHFHYTTP DFGVPEPSPAS FLNFLFKVRE
201 SGSLSPHEGP VVVFCSAGIG RSGTFCLADT CLLLMDKRRK PSSVDIKKVL
251 LEMRRKRRMGL IQTADQLRFS YLAVIEGAKF IMGDSSVQDQ WKELSHEDLE
301 PPPEHIPPPP RPPKRILEPH N

```

**Abbildung 16 Sequenz humaner PTP1B**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der verwendeten C-terminal verkürzten PTP1B im Einbuchstaben-code. Die katalytische Domäne ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Konservierte, für die Phosphatase-Aktivität wichtige Reste sind **fett** und mit rechteckiger Umrandung markiert. Durch Spaltung an der identifizierten, oxidationspezifischen Spaltstelle (durch eine graue Pfeilspitze markiert) gehen auch wichtige Teile der katalytischen Domäne verloren (hellgraue Schrift).

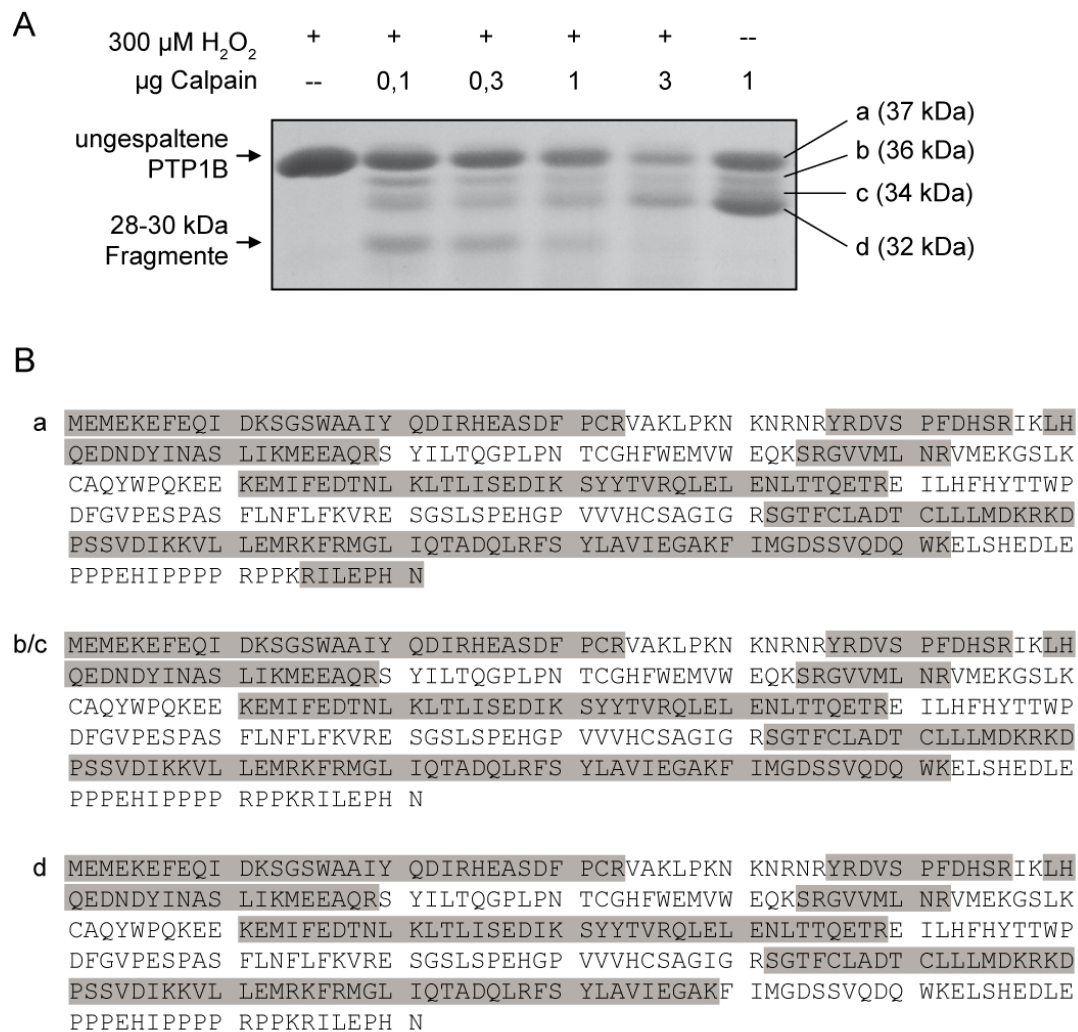
Nach einer Spaltung vor Alanin-77 entstehen ein kleineres N-terminales Fragment (in Abbildung 16 in grauer Schrift) und ein größeres C-terminales Hauptfragment (in schwarzer Schrift). Letzteres hat ein theoretisches Molekulargewicht von 28,2 kDa, was sich mit der beobachteten Größe der Fragmente (28-30 kDa, siehe Abbildung 10) deckt. Die Spaltung innerhalb der katalytischen Domäne (in Abbildung 16 unterstrichen) und die fehlenden konservierten Aminosäurereste (Gln44, Arg45, Tyr46, Tyr66 und Gln68) im entstehenden Hauptfragment legen einen irreversiblen Verlust der Phosphatase-Aktivität nach der oxidations-spezifischen Spaltung nahe. In-Gel-Phosphatase-Assays von Verdauproben bestätigen diese Annahme (siehe Abbildung 17). Während sowohl die ungespaltene PTP1B als auch die größeren, nicht oxidationsabhängigen Fragmente eine deutliche Dephosphorylierung des Substrats bewirken, ist bei den 28-30 kDa Fragmenten keine weiße Bande zu sehen, die auf Phosphatase-Aktivität hinweisen würde.



**Abbildung 17 Die oxidationsspezifische Spaltung von PTP1B führt zur Inaktivierung der Phosphatase**

Rekombinant exprimierte PTP1B wurde mit 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, überschüssiges Wasserstoffperoxid durch Katalase zersetzt und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit aufgereinigtem Calpain inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen der Proben in Probenpuffer abgestoppt und die Proben aliquotiert. Für den In-Gel-Phosphatase-Assay wurde poly-(Glu, Tyr) mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP phosphoryliert. Dieses Phosphatase-Substrat wurde in einem 13%igen SDS-Polyacrylamidgel einpolymerisiert und die Proben (entsprechend jeweils 0,1  $\mu$ g PTP1B) wie bei der herkömmlichen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Denaturierung und erfolgreicher Renaturierung der Proben in dem Gel spalten reaktivierte PTPase-Moleküle die radioaktiven Phosphate ab und erzeugen so weiße Banden bei der Autoradiographie des Gels. Separat wurde eine normale SDS-PAGE mit jeweils 8  $\mu$ g PTP1B pro Bahn durchgeführt und mit Coomassie gefärbt.

Eine massenspektrometrische Analyse (MS/MS) der höhermolekularen, unspezifischen Fragmente durch Herrn Dr. Schlott (FLI, Jena) ergab Hinweise auf eine C-terminale Spaltung. Während bei allen untersuchten Fragmenten nicht-oxidiertes PTP1B der N-Terminus detektiert wurde (siehe Abbildung 18 A), fehlten verschiedene C-terminale Bereiche. So konnte für die aufgereinigte PTP1B (in der Abbildung „a“) sowohl der N- als auch der C-Terminus, bei den untersuchten Spaltprodukten („b“, „c“ und „d“) jedoch nur der N-Terminus identifiziert werden. Das Fehlen der C-terminalen Fragmente belegt Spaltungen nahe dem C-Terminus. Ein Vergleich der hypothetischen Molekulargewichte der so erhaltenen Spaltprodukte stimmt mit den beobachteten Größen überein (Abbildung 18 A). Das katalytische Zentrum der Phosphatase ist bei allen drei Spaltprodukten noch intakt, was wiederum in Übereinstimmung mit der detektierten Phosphatase-Aktivität im In-Gel-Phosphatase-Assay ist (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 17 unterer Teil).



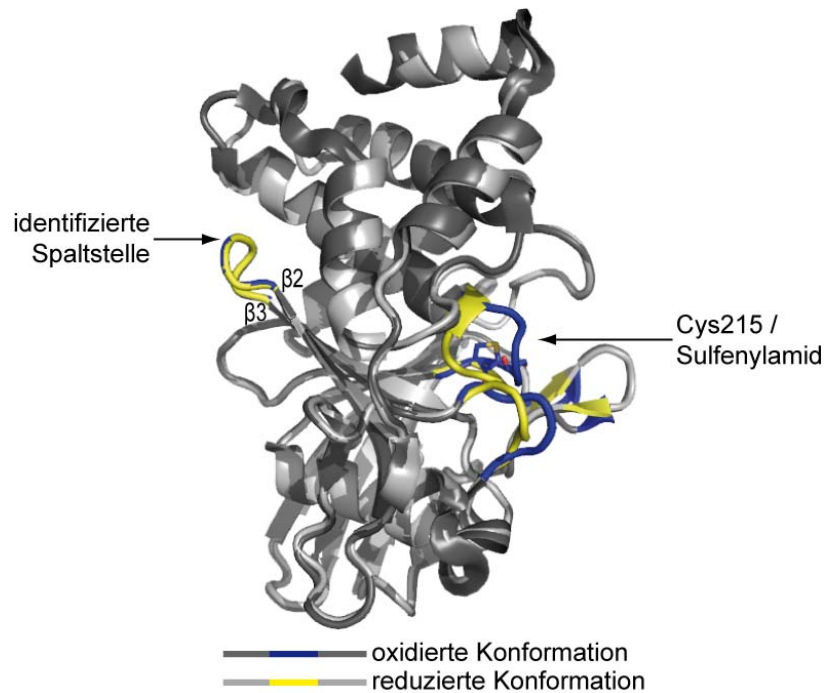
**Abbildung 18 Fragment-Ionen-Abdeckung der unspezifischen PTP1B-Spaltprodukte in der Massenspektrometrie**

(A) Rekombinante PTP1B wurde einer Oxidation mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  unterzogen und anschließend mit den angegebenen Mengen an Calpain inkubiert. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Die bezeichneten Banden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau mittels LS-ESI-Massenspektrometer analysiert. Die angegebenen Molekulargewichte sind anhand der Laufstrecke im Gel ermittelt worden. (B) Aminosäuresequenz der verwendeten verkürzten PTP1B. Die identifizierten Fragment-Ionen der untersuchten Banden sind grau unterlegt.

#### 4.1.3 Die Oxidation des katalytischen Zentrums führt zur Spaltung von PTP1B auf der Rückseite der katalytischen Domäne

Die identifizierte Spaltstelle zwischen Glutamat-76 und Alanin-77 liegt in einer Schleife, die die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta_2$  und  $\beta_3$  verbindet. Da diese Spaltung nur bei zuvor oxidiertem PTP1B erfolgt, könnte angenommen werden, dass sich die Zugänglichkeit oder Umgebung dieser Schleife durch die Oxidation ändert und so eine Erkennung durch Calpain bewirkt. Ein Vergleich der Kristallstrukturen von nicht-oxidiertem und reversibel oxidiertem PTP1B zeigt jedoch deutlich, dass sich die Konformationsänderungen allein auf Bereiche in der direkten

Umgebung des katalytischen Zentrums (Cystein-215) beschränken (siehe Abbildung 19; Kommunikation mit D. Barford, Institute of Cancer Research, London). Dagegen bleibt die Region um die Spaltstelle, sowohl bezüglich der Zugänglichkeit als auch im Hinblick auf ihre Konformation, unverändert.



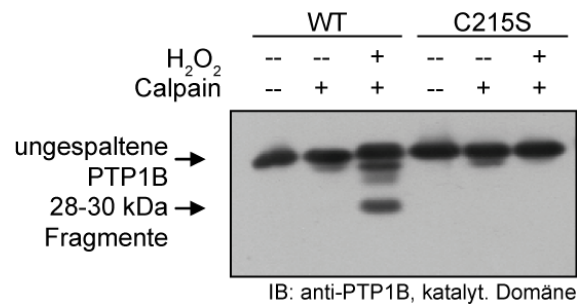
**Abbildung 19 Überlagerung der Kristallstrukturen von oxidiertem und nativem PTP1B**

Die Kristallstrukturen von reduzierter (2HNQ, hellgrau) und reversibel oxidiertem (1OEM, dunkelgrau) PTP1B wurden mit dem Programm PyMOL überlagert. Das Proteinerückgrat der Bereiche, die sich in der Konformation unterscheiden, wurde zur besseren Verdeutlichung gelb bzw. grün gefärbt. Die Schleife mit der identifizierten oxidationsspezifischen Spaltstelle zwischen den  $\beta$ -Faltblättern  $\beta 2$  und  $\beta 3$  ist ebenfalls farblich hervorgehoben, weist jedoch keine konformationellen Differenzen in Abhängigkeit vom Oxidationszustand auf. Des Weiteren wurde der durch Oxidation des katalytischen Cystein-Restes Cys215 entstehende Sulfenylamid-Ring dargestellt.

Zur Klärung, ob weitere Oxidationsprozesse außer der Oxidation des katalytischen Cys215 für die Spaltung durch Calpain von Bedeutung sind, wurden die gleichen Verdau-Experimente mit einer Punktmutante des Cysteins C215S durchgeführt. Die Substitution durch ein Serin führt bekanntermaßen nicht nur zur Inaktivierung der Phosphatase, sondern verhindert auch die Oxidation und dadurch Sulfenylamid-Bildung mit den entsprechenden Strukturänderungen. Eine Vorinkubation dieser Mutante mit  $H_2O_2$  und der anschließende Verdau mit Calpain führt daher nicht zu der beim Wildtyp beobachteten, oxidationsspezifischen Spaltung (siehe Abbildung 20). Dies entspricht den Beobachtungen von Salmeen *et al.*, nach denen die Oxidation des katalytischen Cysteins die einzige Veränderung nach  $H_2O_2$ -Behandlung ist (Salmeen *et al.*, 2003). Die bei Wildtyp-PTP1B beobachtete, unspezifische Spaltung in Abwesenheit von  $H_2O_2$ -Vorinkubation zu größeren Fragmenten ( $>30$  kDa) trat bei der



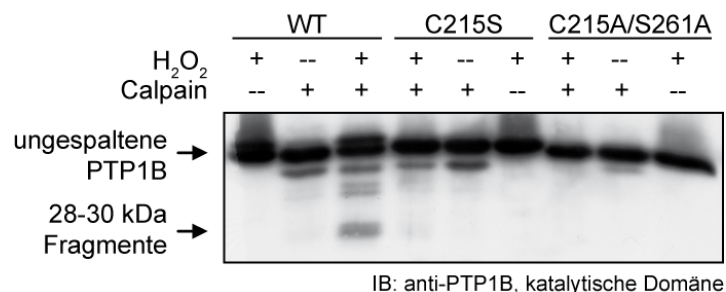
C215S-Mutante stets im ähnlichen Maße wie für den Wildtyp auf. Hier wurde sie jedoch auch nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Vorbehandlung erkennbar (siehe hierzu auch Abbildung 21).



**Abbildung 20 Die oxidationsspezifische Spaltung ist vom Vorhandensein des katalytischen Cysteins abhängig**

Aufgereinigte PTP1B (Wildtyp oder C215S-Mutante) wurde mit oder ohne 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorinkubiert und dann der Spaltung durch Calpain unterzogen. Die Analyse der Proben erfolgte im Immunblot mit einem Antikörper gegen die katalytische Domäne von PTP1B (PH01).

Eine andere Mutante des katalytischen Zentrums (C215A/S216A) wurde von Prof. David Barford (Institute of Cancer Research, London) für *in vitro*-Versuche zur Verfügung gestellt. Diese Mutante weist in der Kristallstruktur eine ähnliche Konformation auf, wie sie von reversibel oxidiertem Wildtyp nach Sulfenylamidbildung eingenommen wird. Diese Mutante sollte demnach auch ohne vorherige Behandlung mit Wasserstoffperoxid durch Calpain gespalten werden und wäre ein sehr hilfreiches Werkzeug für die weitere Charakterisierung des oxidationsspezifischen Abbaus. Entsprechende Verdauexperimente mit der Mutante zeigten allerdings keinen Abbau zu Fragmenten einer Größe von ca. 28 kDa (siehe Abbildung 21). Dieses Ergebnis war unabhängig von der eingesetzten Konzentration an Wasserstoffperoxid (im Bereich von 0 bis 1 mM) zu beobachten. Eine weitere Untersuchung dieser Mutante wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt.



**Abbildung 21 Die Strukturmutante C215A/S216A wird nicht durch Calpain gespalten**

Rekombinante PTP1B (Wildtyp oder C215A/S216A-Mutante) wurde mit oder ohne Vorbehandlung mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der Spaltung durch 1 µg Calpain ausgesetzt. Die Analyse der Proben erfolgte im Immunblot mit einem Antikörper gegen die katalytische Domäne von PTP1B.

#### 4.1.4 Mutagenese der die Spaltstelle umgebenden Aminosäuren führt nicht zur Blockierung der oxidationspezifischen Spaltung

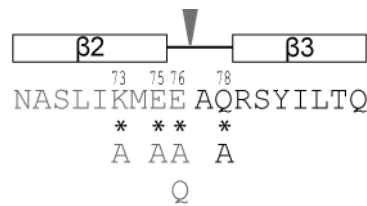
Im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen (zum Beispiel Trypsin) gibt es für Calpain keinen klaren Konsensus in den bereits bekannten Spaltstellen (Tomba *et al.*, 2004). Außer einer leichten, aber nicht zwingenden Präferenz für PEST-haltige Substrate ist über die Spezifität der Spaltung wenig bekannt. Der von Tomba *et al.* veröffentlichte Vergleich von 106 bis dahin bekannten Calpain-Spaltstellen und den jeweiligen Aminosäure-Häufigkeiten ermöglicht nur begrenzte Vorhersagen. In Tabelle 5 sind die entsprechenden Werte der häufigsten Aminosäuren, und die entsprechenden Häufigkeiten der Aminosäuren an der oxidationspezifischen Spaltstelle von PTP1B aufgeführt. Der Vergleich zeigt, dass die in dieser Arbeit identifizierte Spaltstelle nicht der Konsensussequenz entspricht, und wie wenig Vorhersagekraft die ermittelten Häufigkeiten speziell bei Calpainsubstraten besitzen.

|  | P <sub>4</sub>   | P <sub>3</sub>                 | P <sub>2</sub>                 | P <sub>1</sub>                 | P <sub>1</sub> ' | P <sub>2</sub> ' | P <sub>3</sub> '               | P <sub>4</sub> ' |
|--|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| häufigste Aminosäuren                      | <b>T</b><br>2,03 | <b>W / P</b><br>2,34 /<br>2,32 | <b>L / T</b><br>2,97 /<br>2,71 | <b>K / Y</b><br>2,84 /<br>2,69 | <b>S</b><br>3,33 | <b>P</b><br>2,89 | <b>P / W</b><br>5,59 /<br>3,12 | <b>P</b><br>2,92 |
| oxidationsspezifische Spaltstelle in PTP1B | <b>K</b><br>1,11 | <b>M</b><br>0,4                | <b>E</b><br>0,73               | <b>E</b><br>0,44               | <b>A</b><br>1,73 | <b>Q</b><br>1,68 | <b>R</b><br>0,91               | <b>S</b><br>1,08 |

**Tabelle 5 Häufigkeit der Aminosäuren in bekannten Calpain-Spaltstellen**

Aufgeführt sind die Aminosäuren mit den zugehörigen Häufigkeiten wie sie in Tomba *et al.* veröffentlicht sind. P<sub>x</sub> gibt die Position N-terminal und P<sub>x</sub>' die Position C-terminal der Spaltstelle an. Je größer die Zahl, desto häufiger wird die Aminosäure an entsprechender Position P<sub>x</sub>(') beobachtet. In der ersten Zeile sind die jeweils häufigsten Aminosäuren angegeben. In der unteren Zeile ist die Sequenz der identifizierten Spaltstelle in PTP1B mit den ermittelten Werten aufgeführt.

Diese Analyse der bekannten Spaltstellen und ihre Ungleichheit macht auch deutlich, wie schwer eine Vorhersage zu treffen ist, welche Aminosäurereste für die Spaltung essenziell sind und ob deren Austausch die Spaltung unterbinden könnte. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Substitutionen in der Spaltstellenregion eingeführt (siehe Abbildung 22), um die Mutanten auf ihre Spaltbarkeit durch Calpain zu untersuchen.



**Abbildung 22 Schema der substituierten Aminosäuren zur Zerstörung der identifizierten Spaltstelle**

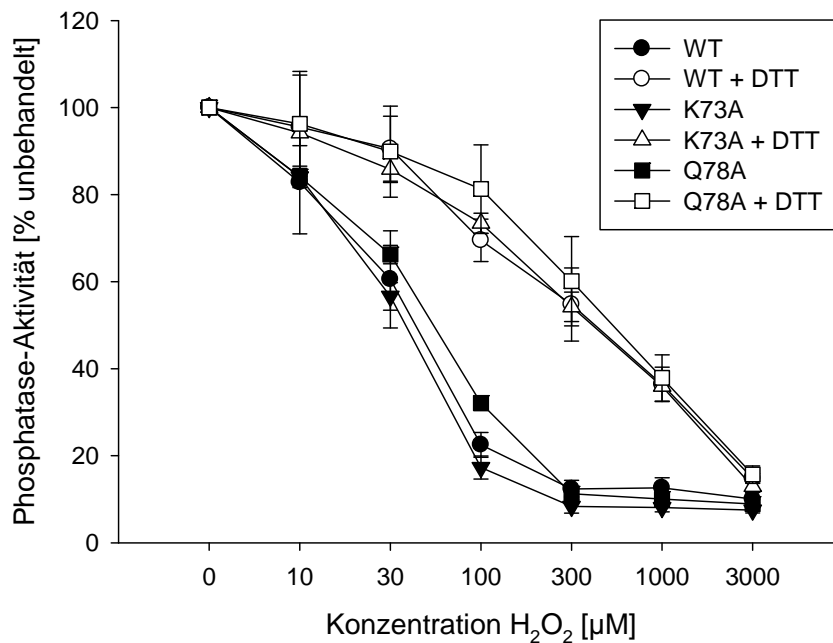
Dargestellt ist der Sequenzbereich um die oxidationsspezifische Spaltstelle (graue Pfeilspitze) von PTP1B. Der Teil des N-terminalen Fragments ist grau und der des C-terminalen Fragments schwarz dargestellt. Die Zugehörigkeit der Aminosäuren zu den  $\beta$ -Faltblättern ist entsprechend angedeutet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit mutierte Reste sind mit Sternchen markiert und unterhalb der Wildtyp-Aminosäuren sind die Substitutionen angegeben. Mit Ausnahme der K73A/Q78A-Doppelmutante wurden jeweils nur Einzel-Substitutionen durchgeführt.

Diese dann ebenfalls rekombinant exprimierten und aufgereinigten Mutanten zeigten keinerlei Beeinträchtigung in der Phosphatase-Aktivität. So wurde beispielhaft für eine der Mutanten die katalytischen Konstanten  $K_M$  und  $v_{Max}$  bestimmt, die sich nicht wesentlich von denen des Wildtyps unterschieden (siehe Tabelle 6). Darüber hinaus wurden auch Assays zur Oxidierbarkeit durchgeführt. Wie zu erwarten war, hat die Mutation durch ihre Lokalisation fern dem aktiven Zentrum keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit des katalytischen Zentrums gegenüber  $H_2O_2$  (siehe Abbildung 23). Die prinzipielle Voraussetzung der reversiblen Oxidierbarkeit für die Spaltung durch Calpain ist also bei allen untersuchten Mutanten gegeben.

|                 | $K_M$ [mM]     | $v_{Max}$ [a.u.]  |
|-----------------|----------------|-------------------|
| PTP1B-Wildtyp   | $19,9 \pm 0,8$ | $0,126 \pm 0,002$ |
| PTP1B-K73A/Q78A | $13,5 \pm 0,7$ | $0,191 \pm 0,003$ |

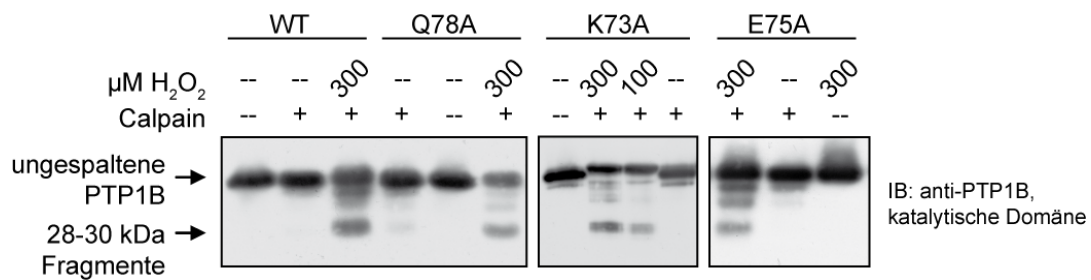
**Tabelle 6 Katalytische Konstanten von PTP1B-Wildtyp und K73A/Q78A-Mutante**

Die Anfangsgeschwindigkeiten der pNPP-Dephosphorylierung durch PTP1B-Wildtyp bzw. K73A/Q78A-Mutante wurden bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen an pNPP bestimmt und daraus die katalytischen Konstanten über die Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt. Die Konzentrationen von pNPP lagen im Bereich von 1 mM bis 100 mM. Die Werte wurden jeweils aus 5-fach-Bestimmungen ermittelt.



**Abbildung 23** Mutagenese in der Umgebung der identifizierten Spaltstelle führt zu keiner Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität oder Oxidierbarkeit

Aufgereinigte PTP1B (Wildtyp bzw. Mutanten) wurden mit der angegebenen Konzentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert (schwarze Symbole) bzw. nach der Oxidation mit 50 mM DTT zurückreduziert (weiße Symbole). Die verbliebene Phosphatase-Aktivität wurde mittels pNPP-Assay ermittelt und auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

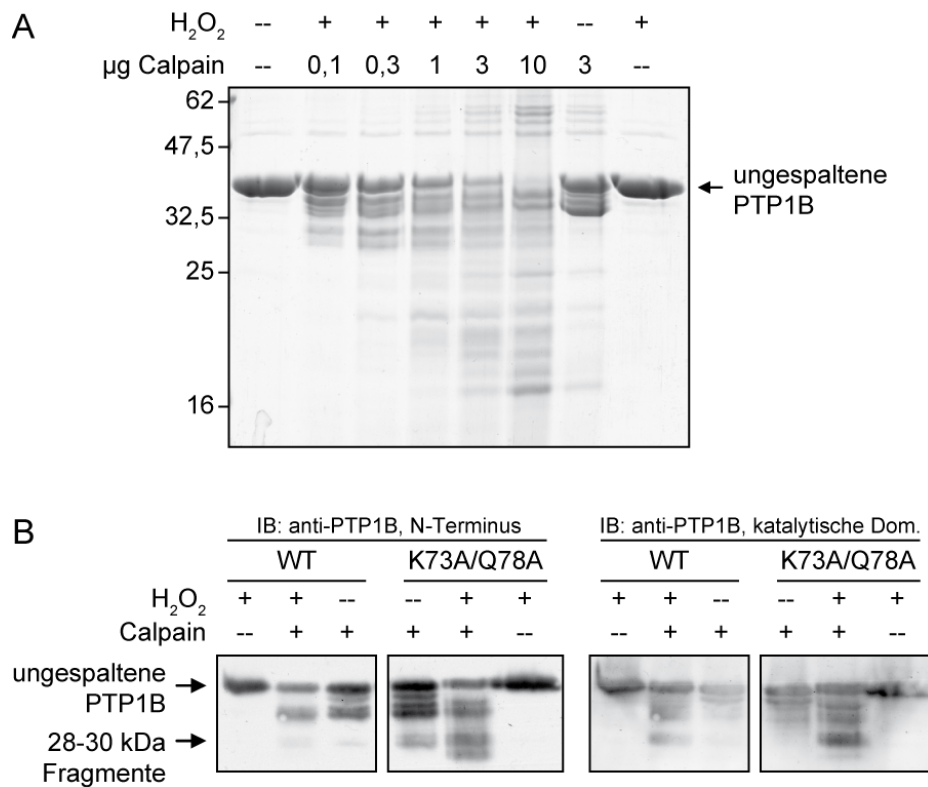


**Abbildung 24** Die verschiedenen Mutationen lassen die oxidationsspezifische Spaltung trotzdem zu

Aufgereinigte PTP1B (Wildtyp oder Mutanten) wurden mit oder ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorinkubiert und anschließend durch µ-Calpain verdaut. Die Proben wurden im Immunblot mit einem Antikörper gegen das katalytische Zentrum der PTP1B analysiert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Blots eines Teils der untersuchten Mutanten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Für die Spaltungsanalyse wurden die Mutanten ebenfalls mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Katalase vorbehandelt und anschließend für 30 min mit Calpain inkubiert. Die Analyse der Fragmentbildung erfolgte nach SDS-PAGE im Immunblot mit Antikörpern gegen PTP1B (siehe Abbildung 24). Die Mutanten zeigten alle, ebenso wie der Wildtyp, eine deutliche Fragmentierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (siehe K73A-Mutante in Abbildung 24). Die E75A-, E76A- und E76Q-Mutanten zeigten verglichen mit dem Wildtyp sogar eine leicht verstärkte Spaltung.

Eine etwas abgeschwächte Spaltung der K73A- und der Q78A-Mutante hingegen gaben Anlass zur Erzeugung einer Doppelmutante K73A/Q78A. Auch diese Mutante zeigte eine unveränderte Phosphatase-Aktivität (vgl. Tabelle 6 auf Seite 54) und Oxidierbarkeit durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Daten hier nicht gezeigt). Vergleichbar zu den Einzelmutanten zeigte die K73A/Q78A eine klare oxidationspezifische Spaltung durch Calpain (siehe Coomassie-Gel in Abbildung 25 A). Eine interessante Veränderung der Spaltstelle wird aber deutlich, sobald die Analyse der Spaltung im Immunblot erfolgt. Im Gegensatz zu den oxidationspezifischen Wildtyp-Fragmenten werden die entsprechenden Fragmente dieser Mutante ebenfalls von dem Antikörper gegen den N-Terminus erkannt (siehe Abbildung 25 B). Die anderen untersuchten Mutanten verhielten sich dagegen wie der Wildtyp (Daten hier nicht gezeigt). Diese Beobachtung legt nahe, dass die oxidationsabhängige Spaltung dieser Mutante nicht mehr im N-terminalen Bereich stattfindet, sondern die gebildeten Fragmente zumindest Teile des N-Terminus enthalten, die für die Detektion durch den Antikörper notwendig sind. Demzufolge scheint Calpain die entsprechende Schleife zwischen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 nicht mehr zu schneiden, spaltet dafür jedoch an anderer Stelle. Dieser Effekt des Ausweichens auf andere Zielsequenzen nach Mutagenese der Ursprungs-Spaltstelle wurde schon zuvor für die Autolyse-Stelle des Calpain B aus *Drosophila* beschrieben und scheint für Calpain nicht ungewöhnlich (Farkas *et al.*, 2004). Eine N-terminale Sequenzierung der Fragmente dieser Mutante mittels EDMAN-Abbau blieb leider ohne Erfolg. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der N-Terminus dieser Fragmente noch intakt ist und durch die Formyl-Methylierung des Methionin-1 den EDMAN-Abbau erschwert. Eine C-terminale Spaltung, die ein Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa erzeugt, würde eine Spaltstelle im Bereich der Aminosäure 240, also ebenfalls im Bereich des katalytischen Zentrums der Phosphatase, bedingen. Die resultierenden Fragmente sollten nach strukturellen Erwägungen inaktiv sein. Dies konnte in In-Gel-Phosphatase-Assays bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt).



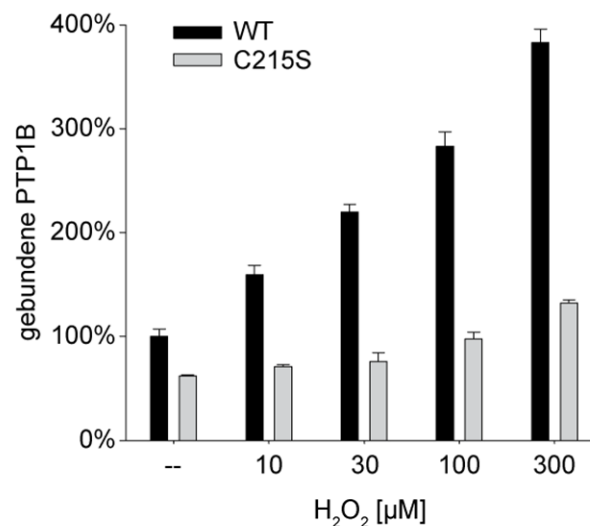
**Abbildung 25 Spaltung der oxidierten PTP1B erfolgt in der K73A/Q78A-Mutante an anderer Stelle**

(A) Rekombinante PTP1B (K73A/Q78A-Mutante) wurden mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelt und anschließend mit der angegebenen Menge an Calpain inkubiert. Der Verdau wurde durch Denaturierung in Probenpuffer gestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der Spaltung erfolgte durch Coomassie-Färbung des Gels. (B) Aufgereinigte PTP1B (Wildtyp oder K73A/Q78A-Mutante) wurden mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelt und mit 1 µg Calpain verdaut. Die Analyse der Verdauproben erfolgte im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern. (A+B) Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.5 Die Bindung von PTP1B an Calpain ist nach Oxidation stark erhöht

Trotz nicht unerheblicher Änderungen in der Konformation oxidiertes PTP1B treten im Bereich der identifizierten Spaltstelle keine Veränderungen der Tertiärstruktur auf. Die Erkennung des Oxidationszustands von PTP1B muss daher an anderer Stelle erfolgen. Eine Mutagenese in der unmittelbaren Umgebung der Spaltstelle führt nicht zu einer Resistenz gegenüber der oxidationsspezifischen Spaltung und im Fall der K73A/Q78A-Mutante lediglich zu einer veränderten Präferenz für eine (noch) nicht identifizierte, weitere oxidationsspezifische Spaltstelle. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass die Erkennung des Oxidationszustands des katalytischen Cysteins durch Calpain und die nachfolgende Spaltung der Phosphatase zwei getrennt ablaufende Mechanismen sind. Um zu testen, ob eine erhöhte Assoziation der oxidierten PTP1B an Calpain erfolgt und dies möglicherweise den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltungsreaktion darstellt, wurden ELISA-ähnliche

Assoziationsexperimente durchgeführt. Dafür wurde irreversibel inhibiertes Calpain in 96-well-Platten immobilisiert und zuvor oxidierte PTP1B in die Platten gegeben, um eine Bindung an Calpain zu gestatten. Die Detektion der gebundenen PTP1B erfolgte über die spezifische Bindung von anti-PTP1B-Antikörpern, die wiederum mit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern und der entsprechenden Peroxidasereaktion quantifiziert wurden. Tatsächlich ist eine Zunahme der gebundenen PTP1B-Menge mit steigender Konzentration des für die Vorbehandlung eingesetzten  $H_2O_2$  für den Wildtyp zu beobachten, während die C215S-Mutante unter diesen Bedingungen nur vernachlässigbar bindet (siehe Abbildung 26). Eine Analyse der Bindung der C215A/S216A-Mutante ergab auch hier nicht das vorhergesagte Ergebnis einer konstitutiven,  $H_2O_2$ -unabhängigen Assoziation an Calpain, sondern zeigte ähnlich wie die C215S-Mutante selbst bei steigenden  $H_2O_2$ -Konzentrationen keine Bindung an Calpain (Daten hier nicht gezeigt). Dies stimmt jedoch mit den Beobachtungen zum Abbau der C215A/S216A-Doppelmutante durch Calpain überein.



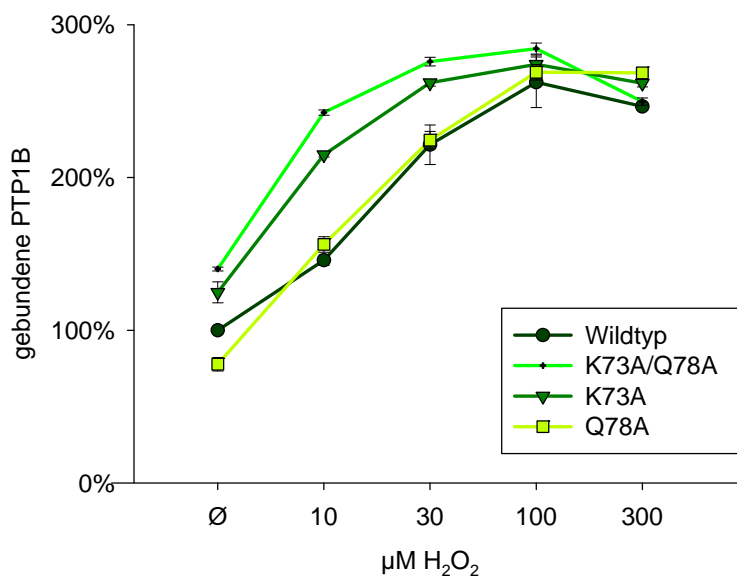
**Abbildung 26 Die Assoziation von PTP1B an Calpain steigt in Abhängigkeit von der Oxidation der Phosphatase**

Mikrotiterplatten wurden mit irreversibel inhibiertem Calpain beschichtet. Die mit verschiedenen Konzentrationen an  $H_2O_2$  vorbehandelte PTP1B (Wildtyp bzw. C215S) wurde für 2 h an das Calpain gebunden und mittels anti-PTP1B-Antikörper, sekundärem HRP-gekoppeltem Antikörper und TMB-Umsatz detektiert. Die gemessene Aktivität wurde auf die des unbehandelten Wildtyps bezogen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Für weitere Experimente mit Wildtyp-PTP1B bzw. aktiven Mutanten wurde die gebundene Menge PTP1B anhand der gebundenen Phosphatase-Aktivität bestimmt. Hierfür wurde die gebundene Phosphatase mit einem Überschuss an DTT wieder reduziert und der Substrat-Umsatz nach Zugabe von pNPP gemessen. Diese Abwandlung des Versuchsaufbaus erspart die Verwendung von Antikörpern und ist deutlich schneller durchzuführen. Während der

verwendete Antikörper nicht zwischen reversibel und irreversibel oxidierten Phosphatase unterscheidet, wird mit dem Phosphatase-Assay zudem die spezifische Detektion der gebundenen reversibel oxidierten Phosphatase ermöglicht. Möglicherweise gebundene irreversibel oxidierte PTP1B dagegen wird nicht detektiert. Das Ausmaß der Assoziation unterscheidet sich in beiden Assays nicht wesentlich voneinander. Dies zeigt erneut, dass speziell die reversible Oxidation der Phosphatase zu einer verstärkten Bindung an Calpain führt.

Da die erzeugten Punktmutanten im Bereich der Spaltstelle sich nicht in der prinzipiellen Spaltbarkeit durch Calpain unterscheiden, wäre auch für sie eine erhöhte Bindung nach vorheriger Oxidation zu erwarten. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von einigen dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Bei den K73A-enthaltenden Mutanten ist zwar im Vergleich mit dem Wildtyp eine leicht höhere Assoziation bei niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zu beobachten, im Wesentlichen verhalten sich die Mutanten jedoch wie der Wildtyp und zeigen eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dosisabhängige Assoziation mit Calpain.



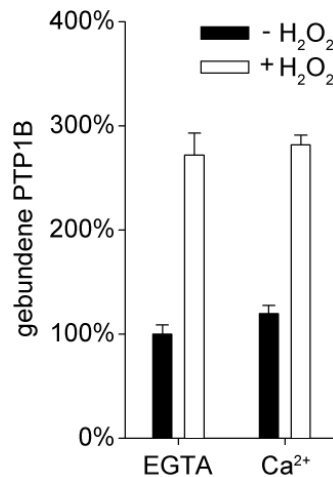
**Abbildung 27 Die Bindung der Spaltstellen-Mutanten unterscheidet sich nicht vom Wildtyp**

Die Bindung von PTP1B (Wildtyp bzw. Spaltstellen-Mutanten) an Calpain nach Vor-Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen PTP1B und Maus-IgG detektiert. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Versuchs von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Calpain benötigt für aktivierende Konformationsänderungen im Bereich der katalytischen Domäne die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Wenn die beobachtete Assoziation von PTP1B an Calpain im aktiven Zentrum der Protease erfolgt, sollte diese von der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig sein. Ein Vergleich der Bindung von Wildtyp-PTP1B entweder in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA) oder mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) zeigt jedoch, dass die verstärkte Bindung nach vorheriger Oxida-



tion der Phosphatase unabhängig vom Aktivierungszustand des Calpains ist (siehe Abbildung 28). Dieses Resultat unterstreicht die Annahme, dass die Erkennung sowie Bindung einerseits und die Spaltung von oxidiertem PTP1B andererseits vermutlich über verschiedene Domänen von Calpain erfolgen.



**Abbildung 28 Die Assoziation von PTP1B an Calpain ist unabhängig vom Aktivierungszustand des Calpains**

Mikrotiterplatten wurden mit irreversibel inhibiertem Calpain in Anwesenheit von entweder EGTA oder 1 mM CaCl<sub>2</sub> (wichtig für die Ausbildung der aktiven Konformation von Calpain) beschichtet. Anschließend wurde die Bindung von PTP1B-Wildtyp mit oder ohne Vor-Oxidation mit 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verglichen, indem die gebundene Phosphatase mit einem Überschuss an DTT wieder reduziert wurde und anschließend der Umsatz des PTP-Substrats pNPP in den Wells gemessen wurde. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Versuchs von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des katalytischen Cysteins von PTP1B hinreichend und notwendig für den Calpain-vermittelten Abbau *in vitro* ist. Eine dominante Spaltstelle konnte in einer Schleife vor Aminosäure 77 identifiziert werden. Die Mutagenese der Spaltstellenumgebung führte zu einer Veränderung der Calpain-vermittelten Spaltung, wenngleich es nicht gelang, eine echte Resistenz zu erzeugen. Wahrscheinlich beruht die oxidationspezifische Spaltung von PTP1B auf bekannten konformationellen Änderungen im katalytischen Zentrum der Phosphatase und einer dadurch verstärkten Bindung an Calpain, die unabhängig von dessen Aktivierungszustand zu beobachten ist. Diese Assoziation ermöglicht die Spaltung der Phosphatase unter anderem an der identifizierten Stelle vor Alanin-77 auf der den Konformationsänderungen abgewandten Seite von PTP1B.

## **4.2 Analyse des oxidationsspezifischen PTP1B-Abbaus nach UV-A-Bestrahlung in verschiedenen Zellsystemen**

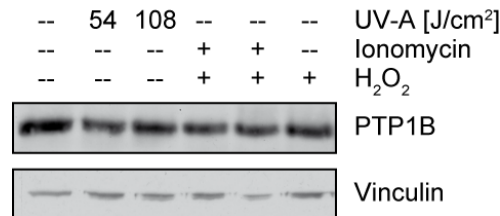
Gulati *et al.* hatten einen Abbau verschiedener PTP nach UV-A-Bestrahlung von Zellen beobachtet. Hierfür wurden Zellen in einer dünnen Pufferschicht mit UV-A-Licht bestrahlt und anschließend die Proteinspiegel der Lysate im Immunblot analysiert. Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieselbe UV-A-Lampe wie durch Gulati *et al.* verwendet. Die verwendeten Dosen richteten sich nach den in Gulati *et al.* veröffentlichten Angaben und entsprechen etwa 7-8 Stunden sommerlicher Sonneneinstrahlung in Mitteleuropa (Gulati *et al.*, 2004; Gulati *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von Hemmstoffversuchen konnte die Bedeutung von Calpain bei dem UV-A-induzierten Abbau gezeigt werden. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass in Gegenwart von Reduktionsmitteln (wie N-Acetylcystein) der Abbau gehemmt wird. Während die genauen Mediatoren der Oxidation und Calpain-Aktivierung bislang nicht bekannt sind, ließ sich der Abbau auch durch parallele Aktivierung von Calpain und Inkubation mit dem Oxidationsmittel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Zellen induzieren (Gulati *et al.*, 2004). Anknüpfend an diese Experimente sollte gezeigt werden, dass die Oxidation der Phosphatase selbst zum erhöhten Abbau nach der UV-A-Bestrahlung führt. Hierfür sollten Zellen, die PTP1B-Wildtyp bzw. PTP1B-C215S exprimieren, bestrahlt und auf die Proteinspiegel untersucht werden. Diese Mutante des katalytischen Zentrums ist nicht oxidierbar und *in vitro* nicht calpain-sensitiv.

### **4.2.1 Analyse des UV-induzierten PTP1B-Abbaus mit Hilfe von rekonstituierten PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs**

Um mögliche störende Effekte von endogener PTP1B zu vermeiden, wurden PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs (immortalisierte, embryonale Fibroblasten der Maus) verwendet. Diese sollten mit humaner PTP1B (Wildtyp oder der C215S-Mutante) rekonstituiert werden. Außerdem sollten die spaltungsresistenten Mutanten in diesem Modell untersucht werden. Erste Vorversuche an diesen stabil mit humaner PTP1B rekonstituierten Zellen zeigten aber keinen erkennbaren Verlust an PTP1B durch UV-A-Bestrahlung (siehe Abbildung 29). Parallel wurde zudem eine Co-Stimulation von Zellen in serumfreiem Medium mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ionomycin durchgeführt, die wie von Gulati *et al.* beschrieben, den gleichen Effekt auf die zellulären PTP-Spiegel haben sollte. Doch auch diese Behandlung führte nicht zum erwarteten Abbau der PTP1B (siehe Abbildung 29). Während die in Gulati *et al.* veröffentlichten Daten an humanen Zelllinien gewonnen wurden, handelte es sich bei den hier untersuchten Zellen um murine Fibroblasten, die mit humaner PTP1B rekonstituiert wurden. Möglicherweise führt dies zu

einer gestörten Interaktion zwischen Calpain und PTP1B. Die Immortalisierung der murinen Fibroblasten kann darüber hinaus auch zu unbekanntem Veränderungen der zellulären Abläufe und Regulationen geführt haben.



**Abbildung 29 Kein Abbau von PTP1B in hPTP1B rekonstituierten PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs**

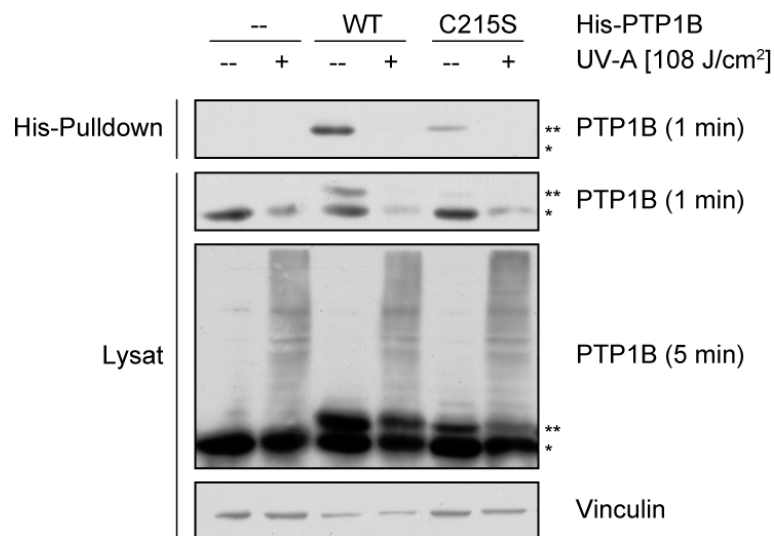
Stabil mit hPTP1B transfizierte PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs wurden für vier Stunden in serumfreiem Medium gehungert und anschließend zwei Mal mit eiskaltem, entgastem PBS gewaschen. Die Bestrahlung mit UV-A erfolgte in 8 cm Abstand zur Lampe auf Eis unter einer dünnen Schicht PBS. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen in eiskaltem, entgastem Puffer lysiert. Hier gezeigt ist ein repräsentativer Blot von vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.2 Analyse im Überexpressionsmodell von His-getaggtter PTP1B in HeLa-Zellen

Die Analyse von PTP1B-Mutanten in anderen Zelllinien humanen Ursprungs ist durch die endogene Expression von PTP1B erschwert. Zur Untersuchung der Effekte der Mutationen auf die Stabilität von PTP1B wurden His-getaggte PTP1B-Konstrukte für eine stabile Überexpression verwendet. Der UV-induzierte PTP1B-Abbau wurde auch für HeLa-Zellen in Gulati *et al.* beschrieben. Da die exprimierten His-PTP1B-Spiegel in den Zell-Pools verhältnismäßig gering waren, erwies sich die Selektion stärker exprimierender Einzelzellklone als notwendig, um auch für die His-PTP1B-Mutanten Proteinspiegel zu erreichen, die zumindest annähernd denen endogener PTP1B entsprachen. Zunächst wurde ein His-tag-spezifischer Antikörper im Immunblot verwendet, um die Spiegel der transfizierten PTP1B in den Lysaten analysieren zu können. Die erhaltenen Blots waren jedoch nicht aussagekräftig, da der Antikörper einen sehr starken Hintergrund ergab und das spezifische Signal schlecht zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Experimenten die His-getaggte PTP1B mittels Nickel-beads aus den Lysaten angereichert und die Pulldown-Proben im Immunblot gegen PTP1B analysiert. In vier der elf durchgeführten Experimente war eine Abnahme der PTP1B-Bande zu erkennen (siehe Abbildung 30), wenngleich die Mehrzahl der Experimente auch in diesem Zelltyp ohne erkennbaren Abbau von PTP1B verlief. Während bei kurzer Exposition der Blots in Abbildung 30 noch ein UV-A-induzierter Abbau von PTP1B abzulaufen scheint, wird diese Interpretation jedoch bei längerer Exposition fragwürdig. Das Auftreten einer deutlichen „Leiter“ hochmolekularer Signale lässt bezweifeln, dass der scheinbare Verlust des PTP1B-Signals unter diesen Bedingungen wirklich durch einen Abbau

der Phosphatase und nicht durch andere Modifikation (zum Beispiel Ubiquitynylierung) hervorgerufen wird. Aus diesem Grund lassen sich auch über den Einfluss von UV-Bestrahlung auf die C215S-Mutante aus diesen Versuchen keine Schlüsse ziehen.

Die kombinierte Stimulation der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ionomycin lieferte ebenfalls keinen stabilen Abbau von PTP1B. Daher sollten die Bedingungen sowohl der Bestrahlung als auch der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ionomycin-Stimulation in A431-Zellen überprüft und gegebenenfalls optimiert werden.



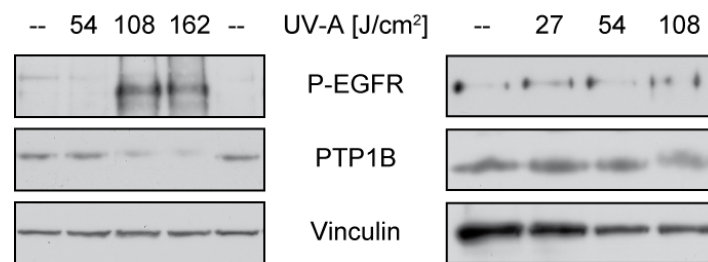
**Abbildung 30 Bestrahlung der HeLa-His-PTP1B Klone mit UV-A**

Parentale HeLa-Zellen sowie stabil transfizierte Einzelklone von His-PTP1B-Wildtyp bzw. C215S exprimierenden HeLa-Zellen wurden für 4 Stunden gehungert, mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit 108 J/cm<sup>2</sup> UV-A-Licht bestrahlt. Die Zellen wurden sofort lysiert und gleiche Mengen Protein für die Aufreinigung der His-PTP1B mittels Ni-beads-Pulldown eingesetzt. Die Analyse der Pulldowns und von Lysatproben erfolgte im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern und den angegebenen Expositionszeiten. Ein \* markiert endogene PTP1B und zwei \*\* markieren die His-getaggte PTP1B.

#### 4.2.3 Überprüfung des Analyse-Systems in A431-Zellen

Die UV-A-Bestrahlung der meisten untersuchten Zelllinien (PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs und HeLa siehe vorherige Kapitel, außerdem HEK293, die hier nicht gezeigt sind) hatte nicht zu dem erwarteten Abbau von PTP1B geführt. Daher sollten die generellen Bedingungen der Bestrahlung mit A431-Zellen getestet werden. Diese Zellen stellen den Ausgangspunkt der Analyse UV-A-induzierten Abbaus von PTP dar (Gulati *et al.*, 2004). Allerdings war auch die Wiederholung dieser Experimente entsprechend den genauen Protokollen nicht erfolgreich: Lediglich in fünf von insgesamt 14 Experimenten konnte ein Abbau von PTP1B und eine UV-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors detektiert werden (Beispiele siehe Abbildung 31). Die in wenigen Fällen untersuchte Überlebensquote der bestrahlten Zellen in 10 % FCS-

haltigem Medium über Nacht war zudem deutlich schlechter (nahe 0 %), als in früheren Experimenten durch P. Gulati ermittelt (etwa 50 % Überleben, persönliche Kommunikation).



**Abbildung 31 UV-A-induzierter Abbau von PTP1B in A431-Zellen**

A431-Zellen wurden in 3 cm-Schalen eingesät und vier Stunden in serumfreiem Medium gehungert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem, entgastem PBS wurde ein kleiner Überstand PBS auf den Zellen belassen. Die Bestrahlung erfolgte in 8 cm Abstand zur UV-A-Lampe auf Eis. Sofort nach der Bestrahlung wurde das PBS entfernt und die Zellen mit eiskaltem, entgastem Lysepuffer lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte nach 10%iger SDS-PAGE im Immunblot. Dargestellt sind zwei von 14 unabhängigen Experimenten (davon neun ohne sichtbaren Abbau von PTP1B, vgl. rechte Seite).

Im Rahmen zahlreicher Wiederholungsversuche wurden die Bedingungen für die Bestrahlung in vielerlei Hinsicht verändert (Daten hier nicht gezeigt). So wurde die Zelldichte, die Menge an überstehendem PBS bei der Bestrahlung sowie die Größe und Art der Petrischalen variiert, ohne einen Einfluss auf die PTP1B-Spiegel auszuüben. Außer dem üblichen 4-stündigen Hungern in serumfreiem Medium wurde auch das Hungern über Nacht mit 0,5 % FCS getestet oder darauf ganz verzichtet. Die Bestrahlung erfolgte in Dosen zwischen 27 J/cm<sup>2</sup> und 162 J/cm<sup>2</sup>, während der Standardwert aus Gulati *et al.* 54 J/cm<sup>2</sup> entsprechen würde (Korrekturfaktor von 20,4 im Corrigendum von Gulati *et al.* veröffentlicht). Ferner wurde die Bestrahlung sowohl im Abstand von 8 cm (Gulati *et al.*, 2004), als auch im Abstand von 12 cm mit verlängerter Bestrahlungsdauer getestet, ohne Unterschiede im Abbau von PTP1B festzustellen. Selbst eine Lyse in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren hatte keinen Einfluss auf die detektierten PTP1B-Spiegel der Zelllysate. Des Weiteren wurden authentische A431-Zell-Konserven aus der von Gulati *et al.* verwendeten Charge mit frischen A431-Zellen von der Deutschen Sammlung für Mikroben und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) verglichen, um eine mögliche Veränderung der Zellen im Laufe der Passagierung auszuschließen.

Darüberhinaus konnten weder die Co-Stimulation der A431-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ionomycin (ebenfalls unter verschiedenen Bedingungen), noch die Bestrahlung von A431- und HeLa-Zellen mit UV-B-Licht einen stabilen Abbau von PTP1B induzieren (Daten hier nicht gezeigt).

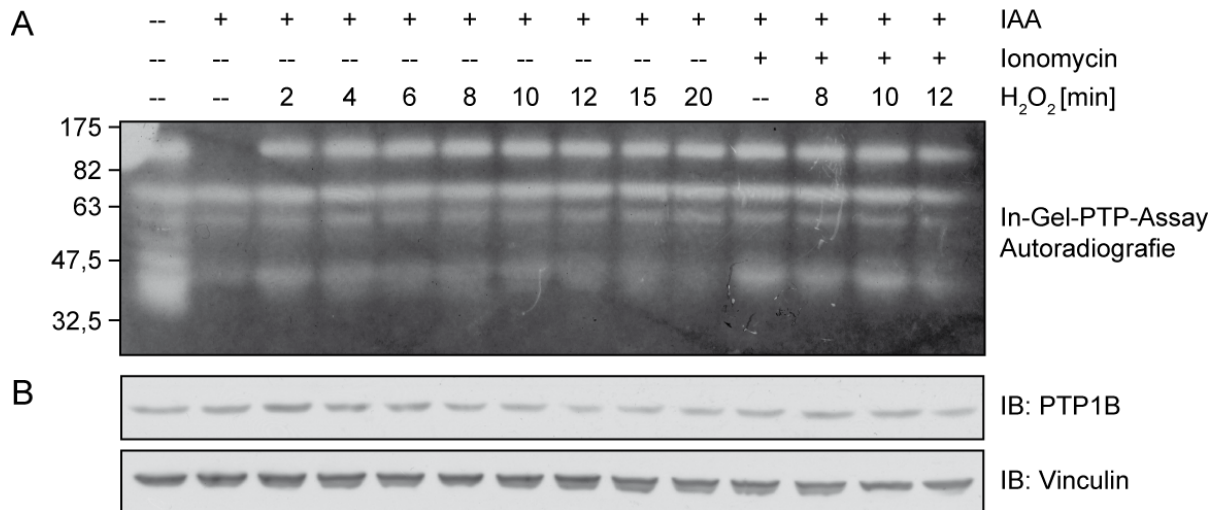
### **4.3 *Potenzielle physiologische Rolle des oxidationsspezifischen Abbaus von PTP1B durch Calpain***

Wie bereits durch Gulati *et al.* (2004) gezeigt, beruht der UV-induzierte Abbau von PTP1B auf dem simultanen Eintreten der Oxidation der Phosphatase und der Aktivierung von Calpain. Beides sind Ereignisse, die auch durch andere Zellstimulatoren ausgelöst werden und potenziell zusammentreffen können. Um neben der UV-Bestrahlung mit relativ hohen Dosen andere physiologische oder pathophysiologische Bedingungen zu finden, in denen der oxidationsspezifische Abbau von PTP eine Rolle spielt, wurden einige Experimente mit verschiedenen Zelltypen und Stimuli durchgeführt.

#### **4.3.1 Die Stimulation von HUVEC-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ionomycin führt nicht zum Abbau von PTP1B**

Endotheliale Zellen sind einer Reihe von Stressoren ausgesetzt. So könnte zum Beispiel die Einwirkung von oxidiertem LDL aus dem Blut auch Auswirkungen auf den Redox-Haushalt der Endothelzellen haben. Außerdem verursacht beispielsweise die Stimulation der VEGF-Rezeptoren einen durch NAD(P)H-Oxidase vermittelten Anstieg an ROS und wirkt damit potenziell auf die regulierenden Phosphatasen ein (Ushio-Fukai *et al.*, 2002). Versuche im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Regine Heller (Institut für Molekulare Zellbiologie, FSU, Jena) hatten Hinweise gegeben, dass durch die Stimulation von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVECs) mit 1 mM Wasserstoffperoxid die PTP1B oxidiert wird (Weber, 2008). In der Analyse der Phosphatase-Aktivität in modifizierten In-Gel-Phosphatase-Assays schien zudem nach 10 min Stimulation ein Verlust an reversibel oxidiertem PTP1B mit dem Auftauchen von reversibel oxidierten, niedermolekularen Fragmenten einherzugehen (Daten hier nicht gezeigt). Zur genaueren Untersuchung eines möglichen oxidationsspezifischen Abbaus von PTP1B, wurden HUVECs für verschiedene Zeitspannen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert bzw. eine Co-Stimulation mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin durchgeführt. Um den Oxidationszustand der zellulären PTP1B zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart des Alkylans IAA lysiert. Dies führt zu einer irreversiblen Inhibition von nicht-oxidierten Phosphatasen durch die Alkylierung des reaktiven Cysteins im katalytischen Zentrum. PTP-Moleküle, die zum Zeitpunkt der Zelllyse oxidiert vorlagen, sind davor hingegen geschützt und können im reduzierenden In-Gel-Phosphatase-Assay reaktiviert und somit detektiert werden. Je größer also der Anteil oxidiertem PTP ist, desto stärker ist die Aktivität im Gel, was anhand von weißen Banden zu sehen ist. Im Gegensatz zu den Vorversuchen von Franziska Weber im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Daten hier nicht gezeigt) konnte jedoch weder eine Veränderung der Aktivität von PTP1B noch das Auftauchen von

aktiven Fragmenten detektiert werden (siehe Abbildung 32 A). Auffällig ist hier der hohe basale Anteil an bereits oxidiertem PTP1B ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation der Zellen (zweite Bahn von links). Die Analyse der Proteinmenge im Immunblot lieferte ebenfalls keine Anzeichen für einen Abbau von PTP1B nach der Zellstimulation (Abbildung 32 B). Auch eine Wiederholung des Versuchs mit einer anderen HUVEC-Charge zeigte das gleiche Ergebnis.



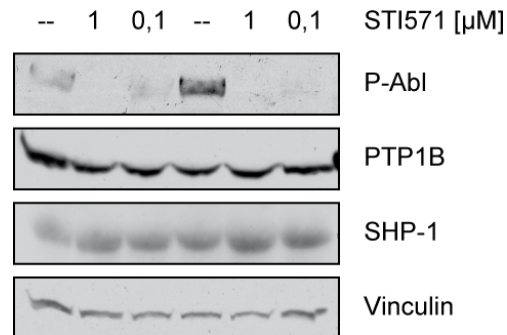
**Abbildung 32 PTP1B-Spiegel in HUVEC-Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition**

HUVEC-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mit oder ohne 2 µM Ionomycin stimuliert und sofort im Anschluss auf Eis in Gegenwart von 15 mM Natriumjodacetat (IAA) lysiert. Die Analyse des Oxidationszustands der PTP erfolgte im modifizierten In-Gel-Phosphatase-Assay (A) und des Proteinspiegels von PTP1B mittels Immunblot (B).

#### 4.3.2 Einfluss der Hemmung der konstitutiven Aktivität von Bcr/Abl durch STI571 auf die Spiegel von PTP1B und SHP-1

Ein anderer möglicher Hintergrund, vor dem der oxidationsspezifische Abbau von PTP eine Rolle spielen könnte, ist die konstitutive Aktivität von Kinasen wie beispielsweise Bcr/Abl. Die Tyrosinkinase Bcr/Abl ist das Produkt einer Genfusion und in etwa 90 % aller Fälle von chronisch-myeloischer Leukämie ursächlich beteiligt. Ihre konstitutive Aktivität führt zu einem dauerhaften proliferativen Signal für die Zelle und zu einer verstärkten Bildung von ROS (Kim *et al.*, 2005; Sattler *et al.*, 2000). Dies bedingt unter anderem die Oxidation und Inaktivierung von PTP. Wenn der oxidationsspezifische Abbau von PTP in diesen Zellen eine Rolle spielt, so sollte nach längerer Inhibition der Kinase ein Wieder-Anstieg der PTP-Proteinspiegel zu beobachten sein. Zur Untersuchung dieser These wurde die Bcr/Abl-positive Leukämie-Zelllinie K562 verwendet, deren Kinase-Aktivität über mehrere Stunden mit dem spezifischen Inhibitor STI571 (Imatinib) gehemmt wurde. Neben PTP1B interessierte in diesen Zellen auch die Protein-Menge von SHP-1. Diese PTP kommt in vielen hämatopoetischen Zellen vor, und sie ist ebenfalls vom UV-induzierten Abbau in A431-

Zellen betroffen (Gulati *et al.*, 2004). Obwohl die Behandlung der Zellen mit dem Hemmstoff über Zeiträume zwischen zwei und zwölf Stunden durchgeführt wurde, konnte keine Zunahme der Phosphatase-Spiegel beobachtet werden (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33 Die Inhibition von Bcr/Abl führt nicht zum Anstieg der Spiegel von PTP1B oder SHP-1**

K562-Zellen wurden für 6 h mit den angegebenen Konzentrationen STI571 bzw. mit der Lösemittelkontrolle DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf Eis lysiert. Die Analyse der Proteinspiegel erfolgte im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern. Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen Experimenten.

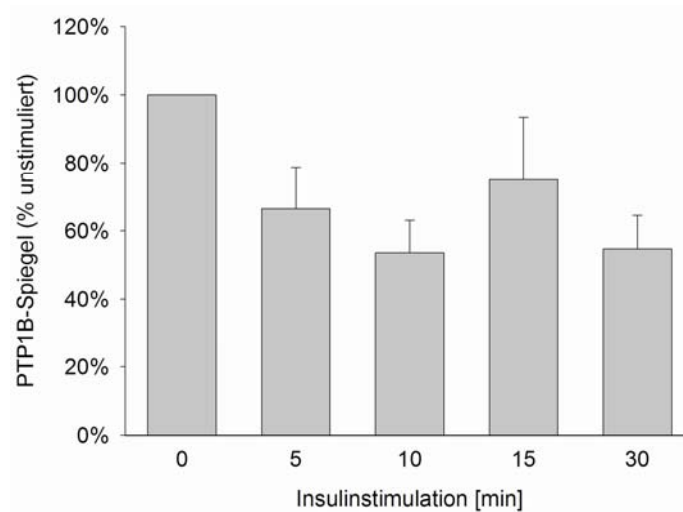
#### 4.3.3 Insulinstimulation führt zu moderatem Verlust von PTP1B im Überexpressionsmodell

Die Bedeutung der Oxidation von PTP bei der Aktivierung von RTK wurde unter anderem für den Insulinrezeptor nachgewiesen (Kappert *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1998; Mahadev *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Bislang wurde die Oxidation infolge von RTK-Stimulation als reversible Inaktivierung der Phosphatasen beobachtet. Entsprechend den hier vorgestellten Untersuchungen führt die Oxidation von PTP1B aber außerdem zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Calpain-vermittelten Abbau. Somit sollte eine gleichzeitige Aktivität von Calpain einen weit reichenden Einfluss auf die Signalwege der RTK ausüben. Während sich oxidierte PTP reaktivieren lassen, würde ein Abbau der Phosphatasen eine fehlende Inaktivierung der RTK auf längere Sicht bedeuten und damit die Signalstärke erhöhen.

Wichtigstes Beispiel der durch PTP1B regulierten RTK ist der Insulinrezeptor. In der Annahme, dass die Oxidation von PTP1B infolge einer Insulinstimulation zunimmt und zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Phosphatase gegenüber dem proteolytischen Abbau führen kann, wurden die Spiegel von transfizierter, humaner PTP1B in PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs im Verlauf einer akuten Insulinstimulation analysiert. Wenn Calpaine in diesem Zusammenhang aktiv sind, könnte die Insulin-stimulierte PTP1B-Oxidation zu einem Abbau führen. In entsprechenden Experimenten wurde eine geringe Abnahme der PTP1B-Spiegel um bis zu



40 % beobachtet (Abbildung 34). Im Immunblot waren jedoch keine Fragmente von PTP1B detektierbar, was auf eine vollständige Proteolyse der Phosphatase hindeutet.



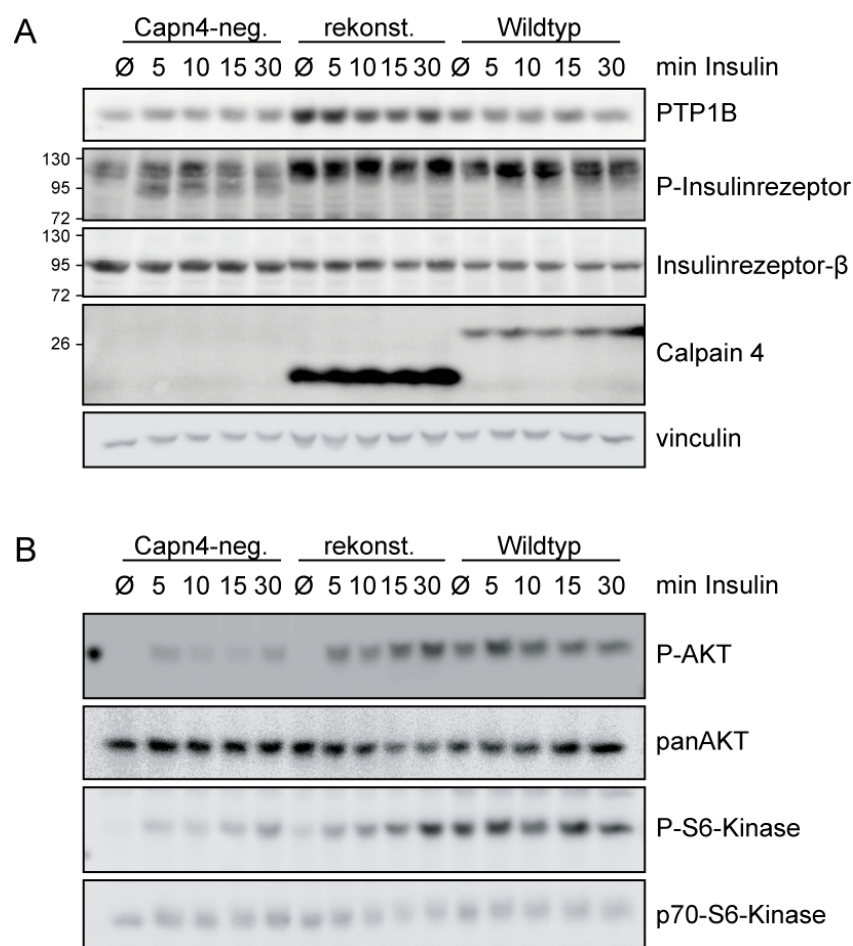
**Abbildung 34 Quantifizierung der PTP1B-Spiegel in hPTP1B-rekonstituierten PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs**

PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs wurden transient mit humaner PTP1B transfiziert. Für einen Teil der Experimente wurden auch die hPTP1B-rekonstituierten Zellen verwendet. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 10 nM Insulin stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden im Immunblot auf PTP1B- und Vinculinspiegel untersucht und diese quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.3.4 Einfluss der Calpain-Aktivität auf Signalwege unterhalb des Insulinrezeptors

Eine Zellstimulation mit Insulin führte zu einer moderaten Abnahme der PTP1B-Spiegel. Zur Untersuchung, inwieweit die Anwesenheit von Calpain eine Rolle bei diesem Phänomen spielt, wurden Calpain-4-negative MEFs mit Insulin stimuliert. In diesen Zellen fehlt die regulatorische Untereinheit für  $\mu$ -Calpain und m-Calpain, die am weitesten verbreiteten Calpaine. Diese sind ohne die regulatorische Untereinheit jedoch inaktiv und darüber hinaus in ihren Proteinspiegeln reduziert (Tan *et al.*, 2006a). Eine Analyse der endogenen Proteinspiegel von PTP1B in diesen Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-MEFs zeigte jedoch keinen wesentlichen Unterschied im PTP1B-Abbau im Zeitverlauf der Insulinstimulation (Abbildung 35 A). Dies kann in den wesentlich geringeren endogenen Spiegel an PTP1B begründet sein. Zudem ist unbekannt, welcher Anteil der vorhandenen PTP1B überhaupt in der Nähe der Insulinrezeptoren vorliegt und somit für eine Oxidation sowie den folgenden Abbau zugänglich ist. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Ab-/Anwesenheit von Calpain für die Aktivierung, Intensität und Dauer der Insulinsignalkwirkung von Bedeutung ist. Eine direkte Analyse der Insulinrezeptor-Phosphorylierung blieb im Immunblot leider erfolglos (siehe Abbildung 35 A). Es ist lediglich ein Phosphoprotein mit deutlich höherem Molekulargewicht detektierbar, das möglicherweise ein Insulinrezeptor-

Substrat darstellt, aber nicht identifiziert werden konnte. Daher wurden die Phosphorylierungsspiegel von AKT und S6-Kinase verglichen, zweier Kinasen, die durch die Insulinstimulation aktiviert werden. Sie wurden in Calpain-4-negativen und den korrespondierenden Wildtyp- bzw. mit Calpain-4 rekonstituierten Zellen im Zeitverlauf der Insulinstimulation analysiert (siehe Abbildung 35 B). Das Fehlen der regulatorischen Untereinheit Calpain-4 und der damit einhergehende Verlust der Protease-Aktivität von  $\mu$ - und m-Calpain in diesen Zellen führen zu einer stark reduzierten insulinabhängigen AKT- und S6-Kinase-Aktivierung. Während die Rekonstitution der Zellen mit Calpain-4 zwar den basalen Phosphorylierungsspiegel von AKT und S6-Kinase nicht wiederherstellen kann, so ist doch die deutliche Aktivierung nach der Insulinstimulation dem Wildtyp entsprechend. Der Immunblot gegen PTP1B zeigt zudem deutlich, dass die verminderte AKT- und S6-Kinase-Phosphorylierung in den Calpain-negativen Zellen nicht durch erhöhte Basalspiegel von PTP1B verursacht wurde. Ein



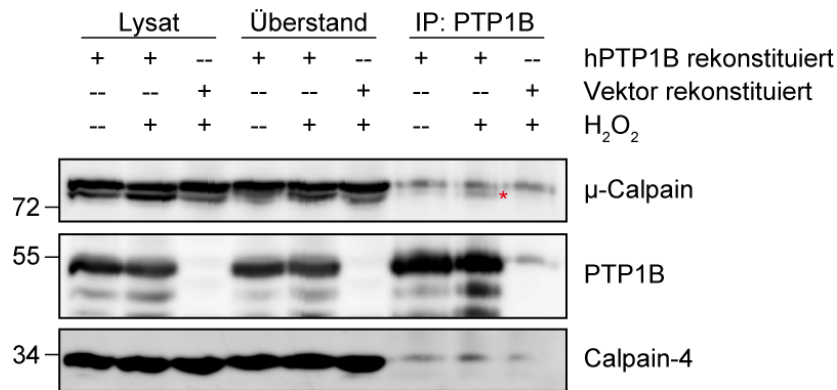
**Abbildung 35 Einfluss von Calpain auf die Aktivierung von AKT und S6-Kinase durch Insulin**

Wildtyp, Calpain-4 Knockout und mit einem etwas verkürzten Calpain-4 rekonstituierte Zellen wurden über Nacht in 0,5 % FCS-haltigem Medium gehungert und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit 10 nM Insulin stimuliert. Die Lysate wurden im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

weiterer Signalweg, der in der Regel durch den Insulinrezeptor aktiviert wird, ist die MAP/ERK-Kinase-Kaskade. Eine Analyse der ERK-Phosphorylierung ergab in diesen Experimenten jedoch nur sehr schwache und daher nicht auswertbare Signale (Daten hier nicht gezeigt).

#### **4.3.5 Eine oxidationsspezifische PTP1B-Calpain-Interaktion ist in Zellen nicht nachweisbar**

In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass oxidierte PTP1B im Vergleich zu reduzierter Phosphatase eine höhere Affinität zu Calpain aufweist (vergleiche Abschnitt 4.1.5). Der Nachweis einer zellulären Interaktion von PTP1B mit Calpain wäre ein wichtiger Schritt für die Etablierung der oxidationsspezifischen Spaltung in Zellen. Erste Versuche mittels Co-Immunpräzipitation wurden bereits gemacht. Hierfür wurden mit humaner PTP1B rekonstituierte PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs mit Wasserstoffperoxid stimuliert. Ein anti-PTP1B-Antikörper wurde für die IP kovalent an Protein-A-Sepharose gekoppelt und die Proben nach der Immunpräzipitation im Immunblot mit verschiedenen Antikörpern gegen Calpain analysiert. Die Gegenwart des irreversiblen Calpain-Inhibitors E64 nach der Lyse sollte unerwünschte Proteolyse verhindern und die Bindung an das Substrat verstärken. Als Kontrolle dienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierte PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs. Hierbei wurde sowohl die katalytische Untereinheit Calpain-1 (ca. 80 kDa) als auch die regulatorische Untereinheit Calpain-4 (ca. 30 kDa) analysiert. Für beide Proteine ist leider eine schwache, konstitutive Bande detektierbar, die auch in Abwesenheit von PTP1B in der IP erscheint und durch unspezifische Wechselwirkungen mit Antikörper oder Beads entsteht (siehe Abbildung 36). Bei der großen Untereinheit detektiert der Antikörper jedoch in den PTP1B rekonstituierten Zellen zusätzlich eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Bande von leicht geringerem Molekulargewicht (in der Abbildung markiert mit einem roten \*). Hierbei könnte es sich um die autoproteolytisierte Form des Calpain-1 handeln (ca. 78 kDa). Jedoch bleibt zu bemerken, dass diese kleinere Form auch in den Lysaten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation stärker wird. Sie könnte dennoch als Indiz für die Assoziation von aktiviertem Calpain mit PTP1B unter oxidativen Bedingungen gelten. Der hier beschriebene Effekt konnte jedoch in drei weiteren Versuchen nicht reproduziert werden, und die Frage nach einer zellulären Interaktion von oxidiertem PTP1B und Calpain bleibt vorerst offen.



**Abbildung 36 Assoziation von  $\mu$ -Calpain an PTP1B in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierten Zellen**

Mit humaner PTP1B rekonstituierte PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs bzw. Kontrollzellen wurden für 15 min mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in serumfreiem DMEM stimuliert. Für die Immunpräzipitation wurde der anti-PTP1B-Antikörper (PH01) kovalent an Protein-A-Sepharose gekoppelt, um einen Hintergrund aus schweren IgG-Ketten im Immunblot zu vermeiden. Die Lyse und die anschließende IP erfolgten in Gegenwart von 0,6  $\mu$ M E64, um eine proteolytische Aktivität von Calpain auszuschließen, die der Assoziation entgegenwirken würde. Der Immunblot der katalytischen Untereinheit (80 kDa) erfolgte mit dem anti- $\mu$ -Calpain-Antikörper. Die regulatorische Untereinheit (30 kDa, Calpain-4) wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Calpain aus dem Labor von Prof. Peter A. Greer detektiert (Queen's University, Kingston, Kanada).

## 5 DISKUSSION

Die Regulation Phosphotyrosin-vermittelter Signalwege erfolgt unter anderem durch die Aktivität verschiedener PTP. Die Oxidation von PTP durch ROS infolge einer Rezeptorstimulation oder anderer Stimuli führt zu einer Hemmung der Phosphatase-Aktivität und gilt als reversibler Regulationsmechanismus. Somit ermöglicht und verstärkt die Oxidation die Aktivierung der RTK und nachgeschalteter Signalwege (Tonks, 2005). Eine Behandlung von Zellen mit dem Oxidationsmittel  $H_2O_2$  oder eine Bestrahlung mit UV-A- oder UV-B-Licht führt auf diesem Weg zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des EGF-Rezeptors (Gamou and Shimizu, 1995; Knebel *et al.*, 1996; Schieven *et al.*, 1994). Genauere Untersuchungen des Mechanismus der UV-vermittelten EGFR-Aktivierung haben gezeigt, dass hierfür neben der Oxidation auch ein Abbau verschiedener PTP notwendig ist (Gross *et al.*, 1999; Gulati *et al.*, 2004). Ausgelöst wird der UV-induzierte Abbau durch die simultane PTP-Oxidation und Calpain-Aktivierung (Gulati *et al.*, 2004). Dieser neuartige Mechanismus, der regulierend in die Signalweiterleitung von Zellen eingreift und damit potenziell große biologische Bedeutung haben könnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

Die ROS-Produktion infolge der RTK-Stimulation erfolgt über eine regulierte Aktivierung von membranständigen Nox (Lambeth, 2004). Obwohl alle PTP als oxidationsempfindlich gelten, gibt es dennoch eine gute Spezifität bei der RTK-induzierten PTP-Oxidation. Meng *et al.* zeigen, dass die Stimulation des PDGF-Rezeptors spezifisch zu einer Oxidation von SHP-2 führt, während die Insulinrezeptor-Aktivierung mit der Oxidation von PTP1B und TC-PTP einhergeht (Meng *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2004). Möglich wird dies unter anderem durch eine lokal begrenzte Diffusion der beteiligten ROS-Moleküle in der Umgebung des aktivierten Rezeptors. Hierfür sorgen vor allem allgegenwärtige Antioxidantien, wie Peroxiredoxine. Durch den schnellen Abbau beschränken sie den Wirkungskreis der ROS um ihren Entstehungsort. Die Ko-Lokalisation der Insulin-stimulierten Nox4 und PTP1B an der ER-Membran bestätigen dies (Mahadev *et al.*, 2004; Martyn *et al.*, 2006). Obwohl viele Publikationen zu der Bedeutung der PTP-Oxidation existieren, so sind die Untersuchungen bislang nur in Zellkultur unter vergleichsweise sauerstoffreichen Bedingungen durchgeführt worden. Unklar ist noch immer, inwieweit die ROS-Produktion und die daraus resultierende PTP-Inaktivierung in lebenden Organismen die gleiche Rolle spielen, da die dort vorherrschenden Sauerstoff-Konzentrationen im Normalfall um Größenordnungen geringer ausfallen.

### 5.1 Oxidationsspezifische Spaltung von PTP1B

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die oxidationsspezifische Spaltung von PTP durch Calpain *in vitro* untersucht. Als Modellsystem diente hierfür rekombinant hergestellte PTP1B. Diese zytosolische PTP ist als wichtiger, negativer Regulator von verschiedenen RTK und deren Signalwegen bekannt und wird auf verschiedenen Ebenen in seiner Aktivität reguliert. Calpaine sind bereits in früheren Untersuchungen als relevante Proteasen für PTP1B identifiziert worden. Sie sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen, die vor allem für eine limitierte Proteolyse ihrer Substrate bekannt sind, und auf diesem Weg vielfach in zelluläre Signalwege eingreifen. PTP1B weist eine konstitutive Spaltstelle für Calpain auf, die das Abspalten des C-terminalen ER-Ankers und somit eine Relokalisation von PTP1B erlaubt (Frangioni *et al.*, 1993). Diese Spaltung führt jedoch weder zu einer Inaktivierung der katalytischen Aktivität noch zu einem weiteren Abbau der Phosphatase. Die untersuchte UV-Bestrahlung der Zellen bewirkt im Gegensatz dazu einen vollständigen Verlust detektierbarer PTP1B (Gulati *et al.*, 2004). Für die Analyse dieser Spaltung wurden die Bedingungen *in vitro* mit aufgereinigten Proteinen rekonstituiert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PTP1B in Abhängigkeit von seinem Oxidationszustand durch Calpain innerhalb der katalytischen Domäne gespalten wird. Für die erhöhte Spaltungssensitivität war eine Oxidation des katalytischen Cystein-215 verantwortlich, wie durch die Spaltungsresistenz einer entsprechenden C215S-Mutante gezeigt werden konnte. Die Oxidation dieses Cysteins ist durch seinen niedrigen pKa-Wert begünstigt und erfolgt in mehreren Stufen. Zunächst kommt es zur reversiblen Bildung eines Sulfensäureintermediats (-SOH), das relativ schnell in ein Sulfenylamid umgewandelt werden kann. Es wird angenommen, dass diese Umwandlung vor einer weiteren Oxidation bis hin zur Sulfonsäure (-SO<sub>3</sub>H) schützt (Salmeen *et al.*, 2003; van Montfort *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte mit verschiedenen Ansätzen nachgewiesen werden, dass die Spaltung der oxidierten PTP1B spezifisch für den reversiblen Oxidationszustand ist. Zum einen herrschte bei den gewählten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen die reversible Oxidationsstufe vor, zum anderen konnte eine Rückreduktion mit DTT die Spaltung verhindern. Ein Antikörper, der spezifisch irreversibel oxidierte PTP erkennt, zeigte ebenfalls keine Reaktion mit den oxidationsspezifischen Spaltprodukten im Immunblot.

Die Analyse der entstehenden Spaltprodukte mit verschiedenen Antikörpern zeigte das Fehlen des N-Terminus in den oxidationsspezifischen Fragmenten. Eine daraufhin durchgeführte

N-terminale Sequenzierung ergab, dass die Peptidbindung zwischen Glutamat-76 und Alanin-77 als Hauptspaltstelle fungiert. Die Spaltung an dieser Stelle scheint ein initialer Schritt auf dem Weg zum vollständigen Abbau zu sein, da eine verlängerte Inkubation mit Calpain oder der Einsatz sehr großer Mengen der Protease zu weiteren Spaltungen führten. Inwieweit der vollständige Abbau allerdings auch in Zellen durch Calpaine erfolgt, ist derzeit noch unklar. Generell ist von Calpainen vorrangig eine limitierte Proteolyse ihrer Substrate bekannt. Der beobachtete komplette Abbau der PTP1B *in vitro* war möglicherweise lediglich die Folge eines Enzymüberschusses. Die initiale, oxidationsabhängige Spaltung durch Calpain dient möglicherweise in UV-bestrahlten Zellen als Voraussetzung und Signal für den vollständigen Abbau der Fragmente durch andere Proteasen.

Eine wichtige Frage ist, ob die gespaltene PTP1B ihre Phosphatase-Aktivität unwiederbringlich verliert. Hierfür wäre eine Trennung von Hauptfragment und Ausgangsprotein notwendig. Eine chromatographische Isolation der Spaltprodukte könnte hier genaueren Aufschluss geben, ist jedoch durch die sehr ähnlichen Ladungseigenschaften von Ausgangsprotein und Fragment schwierig. Alternative Versuche, die *in vitro*-Spaltungsansätze mittels N-terminal-gerichteten Antikörpern vom Ausgangsprodukt zu depletieren, misslangen aufgrund der Ineffizienz dieser Immunpräzipitation (Daten hier nicht gezeigt). Die identifizierte Spaltung der PTP1B bei Alanin-77 führt zum Verlust einiger konservierter Aminosäuren, die für die katalytische Aktivität notwendig sind. Hierzu zählt zum Beispiel Tyrosin-46, das in der Phosphotyrosin-Bindungsschleife für die Substraterkennung essenziell ist. Im Rahmen dieser Arbeit gelang zudem der Nachweis, dass sich das oxidationspezifische Fragment im In-Gel-Phosphatase-Assay nicht reaktivieren lässt. Die Abspaltung des N-terminalen Fragments führt demnach zu einer permanenten Inaktivierung der Phosphatase.

Die Oxidation des katalytischen Zentrums und die daran anschließende Ausbildung eines Sulfenylamids führen aufgrund der sterischen Zwänge des gebildeten Fünf-Rings zu gravierenden Konformationsänderungen. Es kommt zur Exposition von sonst im Proteininneren verborgenen Aminosäuren, wie zum Beispiel Tyrosin-46 oder Isoleucin-219. Vergleichende Kristallstrukturanalysen von nativer und oxidiertes PTP1B belegen dies (Salmeen *et al.*, 2003; van Montfort *et al.*, 2003). Die Konformationsänderungen sind allerdings auf die Region um die katalytische Tasche der Phosphatase beschränkt, während der Rest der Phosphatase weitgehend unbeeinflusst bleibt. Die identifizierte Haupt-Spaltstelle von Alanin-77 dagegen liegt auf der dem katalytischen Zentrum abgewandten Seite des Proteins (siehe hierzu Abbildung

19). Der Vergleich der Ergebnisse anhand der publizierten Kristallstrukturen und deren Bestätigung durch Resultate von Prof. David Barford (Institute of Cancer Research, London, persönliche Kommunikation) ergaben, dass in der Schleife der Spaltstelle keine oxidations-abhängigen Konformationsänderungen erfolgen. Untersuchungen mit immobilisiertem, inaktivem Calpain ermöglichten eine Quantifizierung der Assoziation mit PTP1B in Abhängigkeit von dessen Oxidationszustand. Sie zeigten, dass reversibel oxidierte PTP1B mit deutlich höherer Affinität an die Protease bindet, wobei auch hier die Gegenwart des katalytischen Cysteinrestes der Phosphatase essenziell war. Der Aktivierungszustand des aufgereinigten Calpains hatte hingegen keinen Einfluss auf die Bindung. In Abwesenheit von Calpain-aktivierendem  $\text{Ca}^{2+}$  wird eine Bindung von Substraten durch die offene Konformation der katalytischen Domäne verhindert (Strobl *et al.*, 2000). Dies legt der Schluss nahe, dass zunächst die Erkennung der oxidierten Phosphatase über andere Regionen als das katalytische Zentrum des Calpains erfolgt. In diesem Fall ist es denkbar, dass das Calpain einen Teil der Phosphatase umschließt und die katalytische Domäne genau an der „Rückseite“ der Phosphatase lokalisiert ist. Wenn Calpain aktiv vorliegt, ermöglicht diese Bindung dann die Spaltung der oxidierten PTP1B. Das Prinzip der Substraterkennung und -bindung abseits des aktiven Zentrums ist nicht neu und bereits auch für andere Enzyme beschrieben. So erkennt beispielsweise die Jun-N-terminale Kinase (JNK) ihr Substrat Jun nicht an den Phosphorylierungsstellen, sondern an einer anderen Domäne (Karin and Gallagher, 2005). Als weiteres Beispiel sei die Serinphosphatase MYPT-1-PP1 genannt. Substraterkennung und -dephosphorylierung ihres Substrats Merlin erfolgen an unterschiedlichen Stellen und erfordern eine vorherige Dephosphorylierung der Phosphatase MYPT-1-PP (Jin *et al.*, 2006). Daneben ist die veränderte Affinität von Enzym zu Substrat ein in der Signalweiterleitung häufig beobachteter Regulationsmechanismus. So verändert sich die Substrateigenschaft eines anderen Calpain-Substrates  $\alpha$ -Actinin durch dessen Bindung an Phosphoinositide. Die Bindung von Phosphoinositol-3,4,5-Trisphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) führt zur Spaltung von  $\alpha$ -Actinin, während die Bindung von Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) die Spaltung unterbindet (Sprague *et al.*, 2008).

Mit den hier vorgelegten Daten konnte gezeigt werden, dass die Spaltung der Proteintyrosinphosphatase PTP1B vom Oxidationszustand ihres katalytischen Zentrums abhängt und nur die reversibel oxidierte Phosphatase ein Substrat für Calpain darstellt. Die Konformation der irreversiblen Oxidationsformen von PTP1B ähneln weitestgehend der nativen, reduzierten Form (Salmeen *et al.*, 2003; van Montfort *et al.*, 2003). Das steht im Einklang mit der



Beobachtung, dass in diesem Zustand, im Gegensatz zur reversibel oxidierten Form, keine Erkennung durch Calpain erfolgt und die Phosphatase somit ungespalten bleibt.

Eine Identifikation der an der Calpain-Bindung beteiligten Aminosäurereste seitens der PTP1B ist noch ungeklärt. Eine Mutagenese der nach Oxidation exponierten Aminosäuren Aufschluss könnte darüber geben. Hierbei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass die Mutation potenziell Einfluss auf die Aktivität und die Oxidierbarkeit der Phosphatase ausüben könnte. Eine weitere Möglichkeit, die Bindungsmotive zu identifizieren, wäre die Hemmung der Assoziation im *in vitro*-Assay durch Peptidbibliotheken. Eine Reihe von kleinen PTP1B-Peptiden mit überlappender Sequenz würde dabei zum Beispiel in Bindungsstudien auf ihre Fähigkeit getestet, mit der Assoziation von PTP1B zu konkurrieren. Auf diese Weise könnten die essenziellen Sequenzabschnitte der PTP1B für die oxidationspezifische Interaktion mit Calpain identifiziert werden. Auch bezüglich des Calpains ist noch unklar, welche Domänen für die Bindung der oxidierten Phosphatase zuständig sind. Die Untersuchung der Bindung an einzelne Calpain-Untereinheiten bzw. trunkierten Calpain-Formen wäre ein Ansatz um diese Information zu erhalten. Denkbar wären hier auch Kompetitionsstudien mit aufgereinigten, einzelnen Calpain-Domänen in dem entwickelten Bindungsassay.

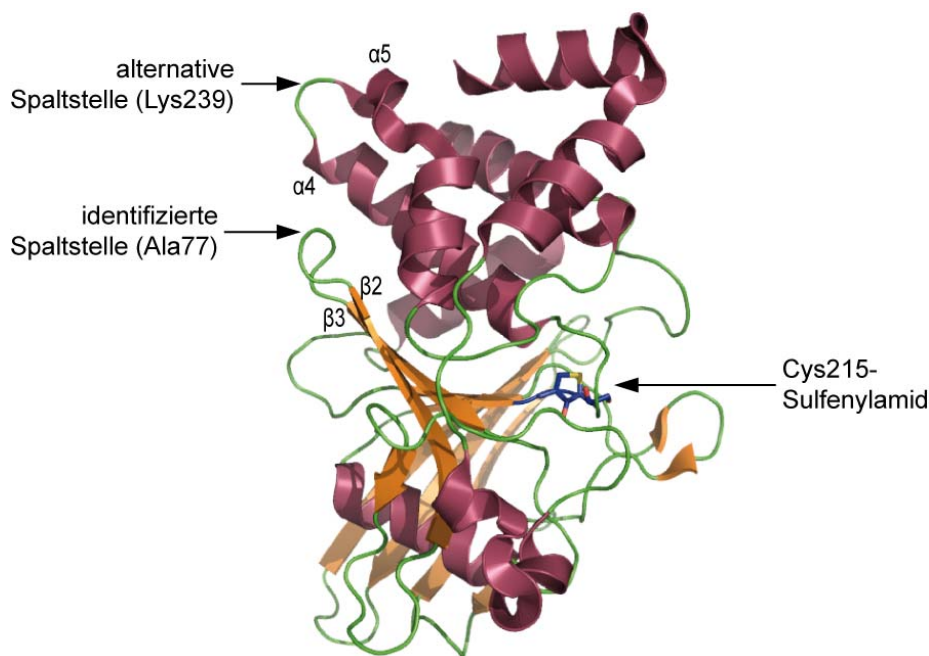
Die doppelte Substitution C215A/S216A im katalytischen Zentrum der Phosphatase bewirkt, unabhängig von einer Behandlung mit oxidierenden Agenzien, eine ähnliche Konformation wie die Oxidation des Wildtyps zum Sulfenylamid. Dies konnte in Kristallstrukturanalysen gezeigt werden (unveröffentlichte Daten, Prof. David Barford). Eine solche Strukturmutante stellt ein gutes Hilfsmittel bei der Untersuchung des Bindungsmechanismus oxidiertes PTP1B an Calpain dar. Es wäre zu erwarten, dass diese Mutante unabhängig von einer Vorbehandlung mit  $H_2O_2$  konstitutiv durch Calpain an der identifizierten Spaltstelle gespalten wird. Zahlreiche Verdau-Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass diese Mutante sich eher wie die C215S-Mutante verhält und auch in Gegenwart von  $H_2O_2$  Calpain-resistent ist. Lediglich die höhermolekularen, oxidations-unabhängigen Fragmente werden gebildet. Auch in den durchgeführten Bindungs-Assays verhält sich die C215A/S216A-Doppelmutante wie die oxidationsresistente C215S-Mutante und zeigt keine Assoziation an Calpain. Im Falle der Existenz weiterer, noch unbekannter Oxidationsstellen innerhalb der PTP1B wäre jedoch eine oxidationspezifische Spaltung dieser Mutante, ähnlich der des Wildtyps, zu erwarten. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen dies jedoch nicht. Es ist daher zu vermuten, dass die Konformation dieser Mutante doch nicht exakt der reversibel oxidierten PTP1B entspricht

und entscheidende Erkennungsmerkmale nicht exponiert sind. Dies kann in einer Diskrepanz zwischen der Konformation in Lösung und der Kristallstruktur begründet sein und bedarf genauerer Untersuchung vor der weiteren Verwendung dieser Mutante als Modell für die Sulfenylamid-Form.

Ein weiteres, wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung Calpain-resistenter PTP1B-Mutanten, um die Bedeutung der oxidationsspezifischen Spaltung in zellulären Prozessen untersuchen zu können. Da die identifizierte Spaltstelle weit entfernt vom katalytischen Zentrum liegt, schien eine Mutagenese in dieser Region ohne Einfluss auf die generelle Enzymaktivität möglich. In Rücksprache mit Prof. David Barford (Institute of Cancer Research, London) wurden die zu mutierenden Aminosäuren so ausgewählt, dass eine Veränderung der PTP1B-Konformation unwahrscheinlich ist. Deshalb wurde beispielsweise auf die Mutagenese des Alanin-77 verzichtet, da diese Aminosäure im Proteininneren verborgen liegt und deren Mutagenese zur Destabilisierung führen würde (Prof. D. Barford, persönliche Kommunikation). Wie erwartet zeigte keine der erzeugten Mutanten Effekte auf die Phosphatase-Aktivität oder die Oxidierbarkeit des katalytischen Zentrums. Auch die oxidationsabhängige Bindung an Calpain konnte bei den Mutanten gezeigt werden. Allerdings führte keine der untersuchten Substitutionen zu einer echten Spaltungsresistenz. Vergleiche hinsichtlich der Detektierbarkeit der Fragmente mit verschiedenen Antikörpern belegten jedoch, dass die K73A/Q78A-Doppelmutante nicht an der für den Wildtyp identifizierten Spaltstelle gespalten wird. Ein gegen den N-Terminus von PTP1B gerichteter Antikörper konnte die oxidationsspezifischen Fragmente der K73A/Q78A-Doppelmutante im Immunblot detektieren, während dies beim Wildtyp und anderen untersuchten Mutanten nicht der Fall war. Dies deutet auf eine Spaltung an einer anderen Stelle näher am C-Terminus der Mutante hin. Obwohl die Oxidation der Phosphatase von Calpain noch erkannt wird, verhindert die Mutation anscheinend die Spaltung in der Schleife um Alanin-77. Infolgedessen kommt es wahrscheinlich zur Spaltung von PTP1B an einer anderen Stelle in der Nähe des ursprünglichen Spaltorts. Der gleiche Effekt ist für die Autoproteolyse-Spaltstelle des Calpain B aus *Drosophila melanogaster* beschrieben. Bei der Erzeugung einer potenziell Autolyse-resistenten Mutante durch eine Mutagenese dieser Spaltstelle bei Aminosäure 223 führte zur einer Verschiebung der Autolyse zu benachbarten Peptidbindungen bei den Positionen 216 bzw. 231 (Tompa *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der Substrate von größerer Bedeutung sind als die Primärsequenz, ist auch für das Calpainsubstrat  $\alpha$ II-Spectrin beschrieben. Eine systematische Mutagenese der

Spaltstellenumgebung dieses Proteins ergab, dass die erwünschte Resistenz nur dann erzeugt wird, wenn die Substitution in der P<sub>2</sub>-Position die Konformation der betroffenen Region stark verändert (Stabach *et al.*, 1997).

Die oxidations-induzierte Spaltung der K73A/Q78A-Mutante führt zu einem Hauptspaltprodukt von 28 kDa, das jedoch – im Unterschied zur Situation bei der Wildtyp-PTP – den N-Terminus von PTP1B noch enthält. Für die Entstehung eines derartigen Spaltproduktes käme eine Spaltung in der Schleife zwischen den  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5, in der Umgebung von Lys239 infrage (siehe Abbildung 37). Eine Spaltung an dieser Stelle würde ein N-terminales Hauptfragment mit der theoretischen Größe von 27,8 kDa ergeben. Außerdem liegt diese Schleife ebenfalls an der dem katalytischen Zentrum abgewandten Seite der PTP1B oberhalb der identifizierten N-terminalen Schnittstelle. Auch diese Spaltung würde innerhalb der katalytischen Domäne erfolgen und ließe damit eine irreversible Inaktivierung der PTP erwarten. In diesem Fall ist auch diese Mutante für die geplanten Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der oxidationsspezifischen Spaltung von PTP1B nicht geeignet. Eine Bestätigung dieser Spaltstelle wäre zum Beispiel mittels massenspektrometrischer Untersuchung des Fragments möglich.



**Abbildung 37 Kristallstruktur oxidierter PTP1B**

Dargestellt ist die Struktur der reversibel oxidierten PTP1B. Die identifizierte oxidationsspezifische Spaltstelle zwischen den  $\beta$ -Faltblättern  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 ist angedeutet. Eine potenzielle alternative Spaltstelle in der Umgebung der identifizierten wäre die Schleife um Lysin-239, zwischen den Helices  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5. Die Abbildung wurde mit den Daten der veröffentlichten Kristallstruktur 1OEM (Salmeen *et al.*, 2003) unter Verwendung von PyMol erstellt (DeLano, 2006)



pTyr-Schleife (Y46) und in der WPD-Schleife (D181) innerhalb den klassischen PTP-Mitgliedern konserviert. Die mögliche Relevanz der Exposition dieser Aminosäuren für die Erkennung durch Calpain macht eine oxidationsabhängige Spaltung auch anderer Phosphatasen durch Calpain denkbar. Für den Abbau nach UV-Bestrahlung der Zellen zeigen die untersuchten PTP aber unterschiedliche Sensitivitäten. Während PTP1B bereits bei geringeren UV-Dosen abgebaut wird, wurde für SHP-1 erst bei höheren Dosen ein vollständiger Abbau nachgewiesen (Gulati *et al.*, 2004). Dies liegt möglicherweise an der unterschiedlichen Empfindlichkeit der PTP für die Oxidation, die die Voraussetzung für die Spaltung durch Calpain ist. Ursache für die differenzierte Oxidationsempfindlichkeit der PTP sind die unterschiedlichen Umgebungsvariablen der katalytischen Zentren (Groen *et al.*, 2005; Weibrecht *et al.*, 2007). So haben Groen *et al.* gezeigt, dass die Oxidationsempfindlichkeit mit der Orientierung des hoch-konservierten Arginin-221 (PTP1B-Nummerierung) in der PTP-Schleife verschiedener PTP variiert (Groen *et al.*, 2005).

Auch Calpaine besitzen im katalytischen Zentrum ein Cystein, dessen Oxidation zu einer Hemmung der Proteaseaktivität führt (Guttmann *et al.*, 1997; Guttmann and Johnson, 1998). Die hier verwendeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen hatten jedoch keinen negativen Einfluss auf die Calpain-Aktivität. Ein Verzicht auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-zersetzende Katalase bei den Verdau-Experimenten *in vitro* hatte keinerlei Einfluss auf die Fragmentbildung (Daten nicht gezeigt). Dies lässt zum einen eine geringere Oxidationsempfindlichkeit des katalytischen Zentrums von Calpain im Vergleich zu PTP1B vermuten und erklärt zum anderen die Möglichkeit einer gleichzeitigen Aktivierung von Calpain unter oxidativen Bedingungen in entsprechend stimulierten Zellen, wie sie nach UV-Bestrahlung beobachtet wurde (Gulati *et al.*, 2004).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PTP1B *in vitro* oxidationsabhängig durch Calpain gespalten wird und die entstehenden Fragmente katalytisch inaktiv sind. Entscheidend für die Sensitivität sind eine reversible Oxidation des katalytischen Cysteins und die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderungen der PTP1B. Diese gehen mit einer erhöhten Bindung der Phosphatase an Calpain einher, welche die Spaltung bewirkt. Es gelang weiterhin eine initiale Spaltstelle dieses Prozesses zu identifizieren.

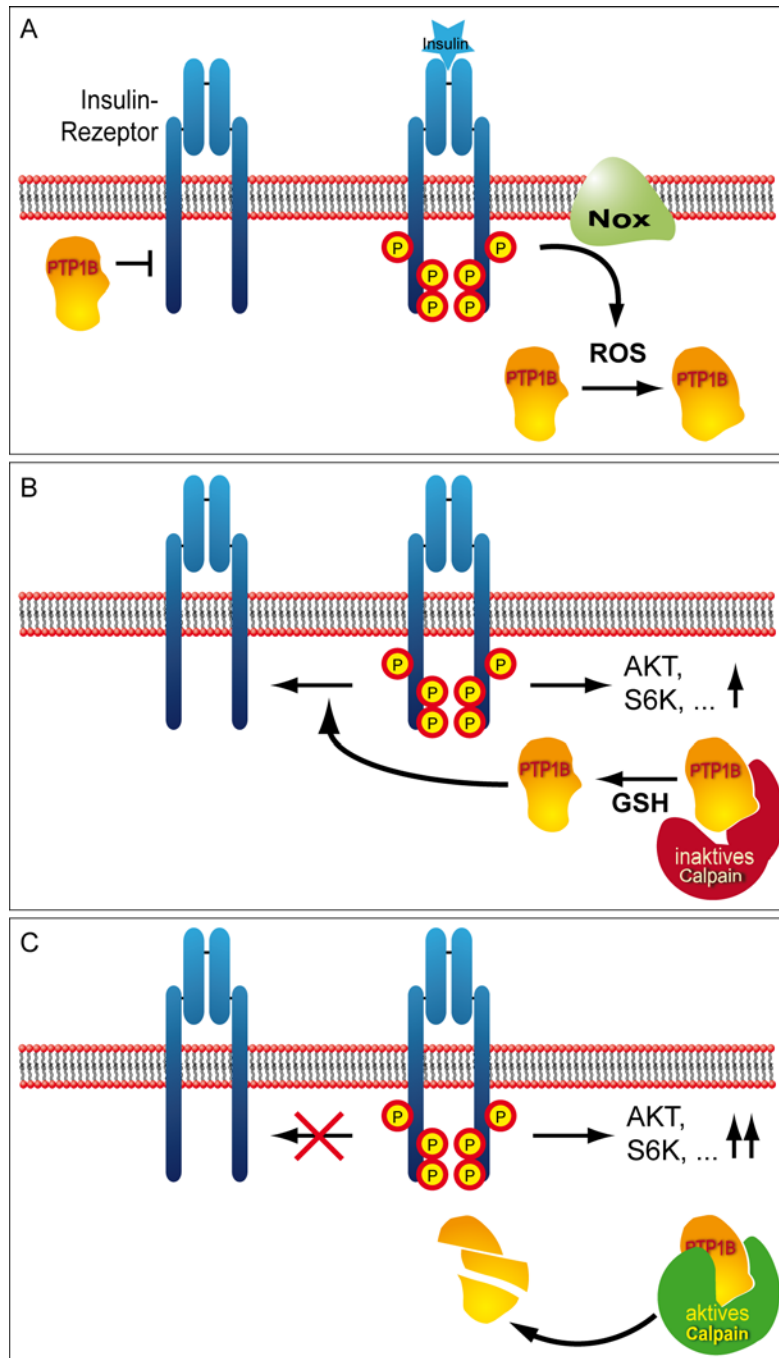
## 5.2 *Physiologische Bedeutung der oxidationsspezifischen Spaltung von Proteintyrosinphosphatasen durch Calpain*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Calpain spezifisch reversibel oxidierte PTP1B spaltet. Die *in vitro* gebildeten Fragmente sind katalytisch inaktiv und werden in Zellen, zum Beispiel nach UV-Bestrahlung, vermutlich recht schnell einem vollständigen Abbau unterworfen. Für den Nachweis oxidationsspezifischer Fragmente in den Zellen, wäre ein spezifischer Antikörper gegen den N-Terminus der identifizierten Spaltstelle ein wichtiges Hilfsmittel. Dieser könnte zum einen für die Analyse behandelter Zelllysate im Immunblot verwendet werden. Ein weiterer Nutzen wäre eine mögliche Anreicherung oxidationsspezifischer Fragmente mittels Immunpräzipitation. Ein solcher Antikörper könnte potenziell eine immunzytologische Färbung stimulierter Zellen und damit eine Lokalisation der Fragmente in der Zelle erlauben. Für die Erzeugung eines solchen Antiserums wurden Kaninchen mit dem KLH-konjugierten N-terminalen Peptid (AQRSYILTQGPLPNTC) immunisiert. Die gewonnenen Seren zeigten jedoch eine starke unspezifische Reaktion und es war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, die Bedingungen für den Immunblot ausreichend zu optimieren. Die starke Erkennung von ungespaltener PTP1B ließe sich möglicherweise durch eine Aufreinigung der enthaltenen Antikörper mit Hilfe des Peptid-Antigens reduzieren und so deren Spezifität verbessern.

Der Ausgangspunkt der Entdeckung des oxidationsspezifischen Abbaus von PTP durch Calpain liegt in der liganden-unabhängigen EGFR-Aktivierung nach Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht. PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs bieten die Möglichkeit, den Einfluss der verschiedenen erzeugten Mutanten auf den UV-induzierten Abbau zu untersuchen. Es war zu erwarten, dass die C215S-Mutante auch im Zellmodell resistent gegenüber dem oxidationsspezifischen Abbau durch Calpain ist, da sie nicht oxidiert werden kann. Mit Hilfe Calpain-resistenter Mutanten, die eine normale Aktivität und Oxidierbarkeit des Wildtyps behalten, könnte der Einfluss der Calpain-vermittelten Spaltung auf die EGFR-Aktivierung genauer untersucht werden. Diese Mutanten sollten reaktivierbar bleiben und somit die liganden-unabhängige EGFR-Aktivierung entweder unterbinden oder aber zumindest zeitlich verkürzen. Desweiteren sollten Studien zur Bestimmung der beteiligten ROS durchgeführt werden. Zum Beispiel sollte eine Überexpression von Katalase im Fall einer Beteiligung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Oxidation und den folgenden Abbau verhindern. Mit Hilfe von Calpain-negativen Fibroblasten sollte zudem die Rolle des Calpains bei dem UV-induzierten Abbau unabhängig von Inhibitor-Versuchen bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst PTP1B rekonstituierte PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs mit UV-A-Licht bestrahlt und die Proteinspiegel sowie die EGFR-Phosphorylierung analysiert. Dieses Zellmodell sollte die Untersuchung der Mutanten ohne störende Einflüsse des endogenen PTP1B-Wildtyps ermöglichen. Die UV-Bestrahlung zeigte jedoch weder einen Effekt auf die Proteinspiegel der Phosphatase noch auf die Rezeptoraktivierung in diesen Zellen. Dies könnte zum Beispiel an unphysiologischen Proteinmengen der PTP1B durch die Re-Expression liegen. Desweiteren ist nicht bekannt, ob murines Calpain ebenfalls in der Lage ist, humane PTP1B oxidationspezifisch zu binden und zu spalten. Die hohe Konservierung beider Proteine lässt dies jedoch vermuten. Trotzdem wurden die weiteren Versuche mit verschiedenen, humanen Zelllinien fortgeführt, die zum Teil auch von Gulati *et al.* erfolgreich verwendet wurden (Gulati *et al.*, 2004). Hierzu zählten HEK293- und HeLa-Zellen, die transient bzw. stabil mit His-getagtem Wildtyp bzw. verschiedenen Mutanten von PTP1B transfiziert wurden. Die Verwendung des His-tags sollte bei der Differenzierung der Mutanten vom endogenen Wildtyp helfen. In diesen Experimenten gelang es jedoch ebenfalls nicht, einen Abbau von PTP1B durch die UV-Bestrahlung der Zellen auszulösen. Zur Überprüfung des verwendeten Protokolls und der Bestrahlungsbedingungen, wurden die Versuche zudem in A431-Zellen durchgeführt – dem Hauptmodell der bis dahin veröffentlichten Untersuchungen (Gulati *et al.*, 2004). Auch wenn einige der Experimente (fünf der insgesamt 14) eine EGFR-Aktivierung und einen PTP1B-Abbau zeigen, blieb dieser Effekt in den meisten Fällen aus und ein robuster, UV-induzierter PTP1B-Abbau unerreicht. Dies galt für die Bestrahlung der Zellen sowohl mit UV-A- als auch UV-B-Licht. Die Ursachen für die Instabilität des Effekts ließen sich leider bislang nicht identifizieren.

Die Oxidation von PTP allgemein und von PTP1B im Besonderen als Voraussetzung der Calpain-vermittelten Spaltung wird durch eine Reihe weiterer Stimuli ausgelöst. Hierzu zählt unter anderem die Stimulation des Insulinrezeptors (Mahadev *et al.*, 2001). Die beobachtete Verringerung der Proteinspiegel in rekonstituierten PTP1B<sup>-/-</sup>-MEFs nach Insulinstimulation könnte durch eine oxidationspezifische, Calpain-vermittelte Spaltung verursacht werden. Die Oxidation der Phosphatase infolge der Insulinrezeptorstimulation führte nach dieser Hypothese nicht nur zu einer reversiblen Hemmung derselben. Vielmehr würde sich nach diesem Modell die Calpain-Empfindlichkeit der PTP1B durch die Oxidation, wie in den *in vitro*-Experimenten beobachtet, erhöhen. Da weder PTP1B-Fragmente noch höhermolekulare Formen detektierbar waren (Daten nicht gezeigt), liegt ein Abbau der PTP als Ursache nahe.



**Abbildung 39** Schema zur möglichen Rolle von Calpain bei der Signalregulation des Insulinrezeptors

PTP1B spielt eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des Insulinrezeptors, weshalb seine oxidationsspezifische Regulation durch Calpain eine wichtige Rolle spielen könnte. (A) Im Grundzustand sorgen PTP für die Inaktivität des Rezeptors. Infolge einer Insulinstimulation kommt es zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors und einer Aktivierung von NADPH-Oxidasen (Nox). Die von diesen gebildeten ROS führen zu einer reversiblen Oxidation und Hemmung der PTP1B und somit zur stabilen Aktivierung des Insulinrezeptors und der Signalweiterleitung zu z.B. AKT und S6-Kinase (S6K). (B) Die Konformationsänderungen durch die Oxidation ermöglichen die Bindung der PTP1B an Calpain. Im Falle von inaktiv vorliegendem Calpain kann dieses zwar die oxidierte PTP1B binden, jedoch nicht spalten. Durch die Reduktion und somit Reaktivierung der Phosphatase kann das Insulinrezeptorsignal wieder abgeschaltet werden. (C) Ist das Calpain hingegen aktiv, so kommt es zu einer inaktivierenden Spaltung der oxidierten PTP1B. Dadurch kann PTP1B den Insulinrezeptor nicht wieder deaktivieren. Es kommt zu einer Verstärkung und potenziell zur Verlängerung des Signals.



Zur Untersuchung der Rolle von Calpain bei der Insulin-Signalweiterleitung, wurde die Insulinstimulation in murinen Calpain-Knockout-Zellen analysiert. Obwohl in diesem Modell keine eindeutige Reduktion der PTP1B-Spiegel nachzuweisen war, konnte eine veränderte Signalweiterleitung in Abwesenheit von Calpain beobachtet werden. Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT und S6-Kinase war in Calpain-negativen Zellen deutlich verringert. Dies wäre im Einklang mit der Hypothese einer verstärkter Insulinrezeptor-aktivierung durch einen Calpain-vermittelten PTP1B-Abbau (siehe Abbildung 39), bedarf allerdings noch genauere Untersuchung. Der nicht detektierbare Abbau der Phosphatase ließe sich durch niedrigere, endogenen PTP1B-Spiegel erklären. Es steht zu vermuten, dass, ähnlich wie in hPTP1B-rekonstituierten MEFs, nur ein Bruchteil des vorhandenen PTP1B-Pools dem Abbau zugeführt wird, während große Teile durch fehlende Ko-Lokalisation entweder nicht oxidiert oder aber nicht gespalten werden. Dennoch ist ein Einfluss eines lokal begrenzten PTP1B-Abbaus auf die Aktivierung und Signalweiterleitung des Insulinrezeptors durchaus denkbar. Ein Nachweis der inaktivierenden Spaltung von PTP1B wäre jedoch notwendig, um eine kausale Verknüpfung zeigen zu können. Auch die Untersuchung von Calpain-resistenten PTP1B-Mutanten könnte Aufschluss über die vermutete Rolle der Calpain-vermittelten Spaltung oxidiert Phosphatase geben. Sie sollten nach dem vorgeschlagenen Modell inhibitorisch auf die Insulinstimulation einwirken, da sie lediglich reversibel über die Oxidation gehemmt werden, jedoch durch entsprechende Rück-Reduktion im Gegensatz zur gespaltenen Wildtyp-PTP1B reaktivierbar bleiben.

Primäre MEFs der Calpain-4-Knockout-Mäuse zeigen zudem eine im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Zellen stärkere Sensitivität gegenüber pro-apoptischen Stimuli, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ - oder Staurosporin-Behandlung. Zudem war bei diesen Untersuchungen eine verringerte AKT-Phosphorylierung in den Calpain-negativen Zellen gezeigt worden, die mit erhöhten Apoptoseraten einhergeht (Tan *et al.*, 2006b). Eine Beteiligung des Calpains bei der Signalweiterleitung durch deren Abbau von PTP wäre auch hier denkbar.

Vor kurzem ist in einem weiteren Fall eine Rolle von Calpain für die AKT-Phosphorylierung demonstriert worden. In Calpain-1-negativen Fibroblasten ist die B56 $\alpha$ -Untereinheit der AKT-regulierenden PP2A stabilisiert. Dies ermöglicht eine erhöhte Assoziation von PP2A mit AKT und hemmt auf diese Weise die Aktivierung von AKT in Abwesenheit von Calpain (Bertoli *et al.*, 2009). Inwieweit dieser Mechanismus einen Beitrag zu der Calpain-

Abhängigkeit der in dieser Arbeit untersuchten, Insulin-stimulierten AKT-Aktivierung leistet, ist noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Calpain-Abhängigkeit der Insulinstimulation ist bisher noch nicht beschrieben worden und könnte eine Relevanz für pathologische Prozesse haben. Dabei ist insbesondere eine mögliche Rolle im Zusammenhang mit Diabetes mellitus von Interesse. In der Tat wird in einer Reihe von Studien ein Zusammenhang von Calpain-Mutationen und Typ-2-Diabetes mellitus gesehen (Brown *et al.*, 2007; Sreenan *et al.*, 2001; Stalker *et al.*, 2005; Turner, 2007; Weedon *et al.*, 2003). In diesen Untersuchungen wird eine Rolle von Calpain bei der Insulinsekretion und der metabolischen Regulation beschrieben, deren Störung zur Diabetes-Entwicklung beitragen könnte. Auch die Regulation des Zytoskeletts ist durch Calpain-Dysfunktion beeinträchtigt. Eine Inaktivierung von Calpain-10 in Skelettmuskelzellen ist zum Beispiel mit einer gestörten Relokalisation des Glut-4-Rezeptors (Glucosetransporter-4) nach Insulinstimulation assoziiert. Ein fehlender Transport der Vesikel zur Plasmamembran führt zu einer stark verringerten Glucose-Aufnahme durch die betroffenen Zellen (Brown *et al.*, 2007). Eine Langzeit-Hemmung von Calpainen führt in pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu einer gestörten Insulinsekretion (Zhou *et al.*, 2003), ebenfalls ein typisches Phänomen des Typ-2-Diabetes. Ein direkter Effekt des Calpains auf die Signalweiterleitung konnte hingegen bislang lediglich für die Spaltung des Insulinrezeptorsubstrats IRS-1 in Adipozyten nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde dies jedoch nur unter chronischer Stimulation mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen an Insulin beobachtet und sollte mit einer verminderten AKT-Aktivierung einhergehen.

Die hier beobachtete positive Rolle Calpains für die Insulin-induzierte Signalweiterleitung bedarf weiterer Untersuchung des verantwortlichen Mechanismus. Hierfür sollten Calpain-Knockout-Mäuse auf eine mögliche Diabetes-Prevalenz untersucht werden. Aufgrund der verringerten Insulinwirkung wären zudem erhöhte Spiegel des Hormons im Blutkreislauf der Mäuse zu erwarten.

Eine Calpain-abhängige Signalaktivierung wurde auch in anderen Systemen bereits beschrieben. In den Thrombozyten von Calpain-1-negativen Mäusen liegen erhöhte PTP1B-Proteinspiegel vor und die generelle Phosphatase-Aktivität ist verstärkt. Dies geht mit verringerten Phosphotyrosinspiegeln und gestörter Blättchen-Aggregation einher. Ein Doppel-Knockout von Calpain-1 und PTP1B ist in der Lage, diesen Effekt wieder aufzuheben

(Kuchay *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu der beschriebenen C-terminalen Spaltung von PTP1B durch Calpain in aktivierten Blutplättchen (Frangioni *et al.*, 1993), scheint Calpain in diesem Zusammenhang eine inhibierende Wirkung auf PTP1B auszuüben. Es könnte daher sein, dass auch in diesem Modell die in dieser Arbeit beschriebene oxidationsspezifische Spaltung der Phosphatase durch Calpain eine Rolle spielt. Es wäre daher interessant, den Oxidationszustand von PTP1B in diesem Modell zu untersuchen. Die von Kuchay *et al.* publizierten Phosphatase-Assays wurden in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT durchgeführt, und eine potenziell vorhandene, reversible Oxidation der Phosphatase in den aktivierten Thrombozyten bleibt so unbetrachtet. Dies müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zu den noch offenen Fragen der Calpain-abhängigen Verstärkung der Insulinstimulation gehört die Aktivierung von Calpain. Während für eine Reihe von Wachstumsfaktor-Rezeptoren ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel berichtet wird, führt die Insulinstimulation in humanen Fibroblasten nicht zu diesem Effekt (Moolenaar *et al.*, 1984). Dennoch ist das Vorhandensein aktiven Calpains (abhängig oder unabhängig von der Insulinstimulation) auch auf anderen Wegen möglich. Zum einen könnte eine basale Aktivität in den untersuchten Zellen vorliegen, zum anderen werden verantwortliche Calpain-Moleküle möglicherweise durch Phosphorylierung oder anderweitige sekundäre Modifikationen aktiviert.

Zusammenfassend konnte der Effekt des UV-induzierten PTP1B-Abbaus nicht stabil reproduziert und daher auch nicht weiter aufgeklärt werden. Daher konnte dieses System nicht verwendet werden, um den oxidationsabhängigen Abbau von PTP1B in einem zellulären System weiter zu analysieren. Es gelang jedoch, eine Rolle von Calpain bei der Signalweiterleitung des Insulinrezeptors zu zeigen, die mit einer Bedeutung von Calpain für den oxidationsabhängigen Abbau von PTP1B nach der Insulinstimulation übereinstimmt. Die Aktivierung von Zielproteinen war in Calpain-4-Knockout-MEFs stark vermindert und konnte durch lentivirale Re-Expression wiederhergestellt werden. Um die Beteiligung des *in vitro* identifizierten Regulationsmechanismus der oxidationsspezifischen Spaltung von PTP1B durch Calpain an dieser Regulation zu beweisen, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

## 6 REFERENZEN

- Ahmad, F., Azevedo, J. L., Cortright, R., Dohm, G. L. and Goldstein, B. J.: "*Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes.*" *J Clin Invest* 100(2): 449-58 (1997).
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T.: "*Protein tyrosine phosphatases in the human genome.*" *Cell* 117(6): 699-711 (2004).
- Anderie, I., Schulz, I. and Schmid, A.: "*Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets.*" *Cell Signal* 19(3): 582-92 (2007a).
- Anderie, I., Schulz, I. and Schmid, A.: "*Characterization of the C-terminal ER membrane anchor of PTP1B.*" *Exp Cell Res* (2007b).
- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. and Moller, N. P.: "*Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains.*" *Mol Cell Biol* 21(21): 7117-36 (2001).
- Arias-Salgado, E. G., Haj, F., Dubois, C., Moran, B., Kasirer-Friede, A., Furie, B. C., Furie, B., Neel, B. G. and Shattil, S. J.: "*PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling.*" *J Cell Biol* 170(5): 837-45 (2005).
- Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. and Greer, P. A.: "*Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division.*" *Mol Cell Biol* 20(12): 4474-81 (2000).
- Azam, M., Andrabi, S. S., Sahr, K. E., Kamath, L., Kuliopulos, A. and Chishti, A. H.: "*Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function.*" *Mol Cell Biol* 21(6): 2213-20 (2001).
- Bahadir, M., Parlar, H. and Spitteller, M.: "*Springer Umweltlexikon.*" (2000) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Barford, D., Flint, A. J. and Tonks, N. K.: "*Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B.*" *Science* 263(5152): 1397-404 (1994).
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B. and Chock, P. B.: "*Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B.*" *J Biol Chem* 274(49): 34543-6 (1999).
- Bentires-Alj, M. and Neel, B. G.: "*Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer.*" *Cancer Res* 67(6): 2420-4 (2007).
- Bertoli, C., Copetti, T., Lam, E. W., Demarchi, F. and Schneider, C.: "*Calpain small-1 modulates Akt/FoxO3A signaling and apoptosis through PP2A.*" *Oncogene* 28(5): 721-33 (2009).
- Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T. and Noel, J. P.: "*Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization.*" *Nature* 382(6591): 555-9 (1996).
- Blanchetot, C., Tertoolen, L. G. and den Hertog, J.: "*Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress.*" *EMBO J* 21(4): 493-503 (2002).
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M.: "*Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene.*" *Cancer Res* 52(2): 478-82 (1992).

- Brown, A. E., Yeaman, S. J. and Walker, M.: "*Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells.*" *Mol Genet Metab* 91(4): 318-24 (2007).
- Buckley, D. A., Cheng, A., Kiely, P. A., Tremblay, M. L. and O'Connor, R.: "*Regulation of insulin-like growth factor type I (IGF-I) receptor kinase activity by protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) and enhanced IGF-I-mediated suppression of apoptosis and motility in PTP-1B-deficient fibroblasts.*" *Mol Cell Biol* 22(7): 1998-2010 (2002).
- Cai, H. and Harrison, D. G.: "*Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.*" *Circ Res* 87(10): 840-4 (2000).
- Carillo, S., Pariat, M., Steff, A., Jariel-Encontre, I., Poulat, F., Berta, P. and Piechaczyk, M.: "*PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein.*" *Biochem J* 313 ( Pt 1): 245-51 (1996).
- Chen, C. and Okayama, H.: "*High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.*" *Mol Cell Biol* 7(8): 2745-52 (1987).
- Cheng, A., Uetani, N., Simoncic, P. D., Chaubey, V. P., Lee-Loy, A., McGlade, C. J., Kennedy, B. P. and Tremblay, M. L.: "*Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B.*" *Dev Cell* 2(4): 497-503 (2002).
- Croall, D. E. and DeMartino, G. N.: "*Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation.*" *Physiol Rev* 71(3): 813-47 (1991).
- Croall, D. E. and Ersfeld, K.: "*The calpains: modular designs and functional diversity.*" *Genome Biol* 8(6): 218 (2007).
- D'Autreaux, B. and Toledano, M. B.: "*ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 813-24 (2007).
- Dadke, S., Cotteret, S., Yip, S. C., Jaffer, Z. M., Haj, F., Ivanov, A., Rauscher, F., 3rd, Shuai, K., Ng, T., Neel, B. G. and Chernoff, J.: "*Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation.*" *Nat Cell Biol* 9(1): 80-5 (2007).
- DeLano, W. L.: *The PyMOL Molecular Graphics System.* (2006) DeLano Scientific LLC; Palo Alto, CA, USA
- den Hertog, J., Ostman, A. and Bohmer, F. D.: "*Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms.*" *FEBS J* 275(5): 831-47 (2008).
- Diffey, B. L.: "*Solar ultraviolet radiation effects on biological systems.*" *Phys Med Biol* 36(3): 299-328 (1991).
- Diffey, B. L.: "*Sources and measurement of ultraviolet radiation.*" *Methods* 28(1): 4-13 (2002).
- Dube, N. and Tremblay, M. L.: "*Beyond the metabolic function of PTP1B.*" *Cell Cycle* 3(5): 550-3 (2004).
- Dutt, P., Arthur, J. S., Croall, D. E. and Elce, J. S.: "*m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium.*" *FEBS Lett* 436(3): 367-71 (1998).
- 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. and Kennedy, B. P.: "*Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene.*" *Science* 283(5407): 1544-8 (1999).
- Farkas, A., Tompa, P., Schad, E., Sinka, R., Jekely, G. and Friedrich, P.: "*Autolytic activation and localization in Schneider cells (S2) of calpain B from Drosophila.*" *Biochem J* 378(Pt 2): 299-305 (2004).
- Feng, G. S.: "*Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many.*" *Exp Cell Res* 253(1): 47-54 (1999).

- Fox, A. N. and Zinn, K.: "*The heparan sulfate proteoglycan syndecan is an in vivo ligand for the Drosophila LAR receptor tyrosine phosphatase.*" *Curr Biol* 15(19): 1701-11 (2005).
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. and Neel, B. G.: "*The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence.*" *Cell* 68(3): 545-60 (1992).
- Frangioni, J. V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E. W. and Neel, B. G.: "*Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets.*" *EMBO J* 12(12): 4843-56 (1993).
- Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschornig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M. and Bohmer, F. D.: "*Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1.*" *J Biol Chem* 279(12): 11375-83 (2004).
- Fukada, M., Fujikawa, A., Chow, J. P., Ikematsu, S., Sakuma, S. and Noda, M.: "*Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization.*" *FEBS Lett* 580(17): 4051-6 (2006).
- Gamou, S. and Shimizu, N.: "*Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor.*" *FEBS Lett* 357(2): 161-4 (1995).
- Garton, A. J. and Tonks, N. K.: "*PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation.*" *EMBO J* 13(16): 3763-71 (1994).
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J.: "*The calpain system.*" *Physiol Rev* 83(3): 731-801 (2003).
- Graham-Siegenthaler, K., Gauthier, S., Davies, P. L. and Elce, J. S.: "*Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both in vivo and in vitro.*" *J Biol Chem* 269(48): 30457-60 (1994).
- Groen, A., Lemeer, S., van der Wijk, T., Overvoorde, J., Heck, A. J., Östman, A., Barford, D., Slijper, M. and den Hertog, J.: "*Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases.*" *J Biol Chem* 280(11): 10298-304 (2005).
- Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neining, A., Gaestel, M., Herrlich, P. and Böhmer, F. D.: "*Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction.*" *J Biol Chem* 274(37): 26378-86 (1999).
- Gulati, P., Markova, B., Göttlicher, M., Böhmer, F. D. and Herrlich, P. A.: "*UVA inactivates protein tyrosine phosphatases by calpain-mediated degradation.*" *EMBO Rep* 5(8): 812-7 (2004).
- Gulati, P., Markova, B., Göttlicher, M., Böhmer, F. D. and Herrlich, P. A.: "*Corrigendum: UVA inactivates protein tyrosine phosphatases by calpain-mediated degradation.*" *EMBO Rep* 6(11): 1101 (2005).
- Guo, B., Yang, S. H., Witty, J. and Sharrocks, A. D.: "*Signalling pathways and the regulation of SUMO modification.*" *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1414-8 (2007).
- Guttmann, R. P., Elce, J. S., Bell, P. D., Isbell, J. C. and Johnson, G. V.: "*Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis.*" *J Biol Chem* 272(3): 2005-12 (1997).
- Guttmann, R. P. and Johnson, G. V.: "*Oxidative stress inhibits calpain activity in situ.*" *J Biol Chem* 273(21): 13331-8 (1998).
- Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G. and Bastiaens, P. I.: "*Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum.*" *Science* 295(5560): 1708-11 (2002).
- Halliwell, B.: "*Oxidative stress and cancer: have we moved forward?*" *Biochem J* 401(1): 1-11 (2007).
- Hanna, R. A., Campbell, R. L. and Davies, P. L.: "*Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin.*" *Nature* 456(7220): 409-412 (2008).

- Harris, F., Biswas, S., Singh, J., Dennison, S. and Phoenix, D. A.: "*Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus.*" *Ann N Y Acad Sci* 1084: 452-80 (2006).
- Herrlich, P., Karin, M. and Weiss, C.: "*Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response.*" *Mol Cell* 29(3): 279-90 (2008).
- Horikawa, Y.: "*Calpain-10 (NIDDM1) as a Susceptibility Gene for Common Type 2 Diabetes.*" *Endocr J* 53(5): 567-76 (2006).
- Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L. and Jia, Z.: "*Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation.*" *EMBO J* 18(24): 6880-9 (1999).
- Jang, J. S., Lee, S. J., Choi, Y. H., Nguyen, P. M., Lee, J., Hwang, S. G., Wu, M. L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P. A. and Trepel, J. B.: "*Posttranslational regulation of the retinoblastoma gene family member p107 by calpain protease.*" *Oncogene* 18(10): 1789-96 (1999).
- Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J., Sap, J. and Hunter, T.: "*Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha.*" *Nature* 401(6753): 606-10 (1999).
- Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P. and Morrison, H.: "*Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase.*" *Nature* 442(7102): 576-9 (2006).
- Johnson, K. G., Tenney, A. P., Ghose, A., Duckworth, A. M., Higashi, M. E., Parfitt, K., Marcu, O., Heslip, T. R., Marsh, J. L., Schwarz, T. L., Flanagan, J. G. and Van Vactor, D.: "*The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development.*" *Neuron* 49(4): 517-31 (2006).
- Julien, S. G., Dube, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B. P., Muller, W. J. and Tremblay, M. L.: "*Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis.*" *Nat Genet* 39(3): 338-46 (2007).
- Kappert, K., Sparwel, J., Sandin, A., Seiler, A., Siebolts, U., Leppanen, O., Rosenkranz, S. and Östman, A.: "*Antioxidants relieve phosphatase inhibition and reduce PDGF signaling in cultured VSMCs and in restenosis.*" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(12): 2644-51 (2006).
- Karin, M. and Gallagher, E.: "*From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance.*" *IUBMB Life* 57(4-5): 283-95 (2005).
- Kim, J. H., Chu, S. C., Gramlich, J. L., Pride, Y. B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J. D. and Sattler, M.: "*Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species.*" *Blood* 105(4): 1717-23 (2005).
- 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. and Kahn, B. B.: "*Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice.*" *Mol Cell Biol* 20(15): 5479-89 (2000).
- Klotz, L. O., Holbrook, N. J. and Sies, H.: "*UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events.*" *Curr Probl Dermatol* 29: 95-113 (2001).
- Knebel, A., Iordanov, M., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P.: "*An oxidant sensor at the plasma membrane.*" *Adv Exp Med Biol* 387: 57-62 (1996).
- Kuchay, S. M., Kim, N., Grunz, E. A., Fay, W. P. and Chishti, A. H.: "*Double Knockouts reveal that Protein Tyrosine Phosphatase 1B is a Physiological Target of Calpain-1 in Platelets.*" *Mol Cell Biol* (2007).
- Lambeth, J. D.: "*NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.*" *Nat Rev Immunol* 4(3): 181-9 (2004).

- LaMontagne, K. R., Jr., Hannon, G. and Tonks, N. K.: "*Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells.*" Proc Natl Acad Sci U S A 95(24): 14094-9 (1998).
- Larsson, P., Andersson, E., Johansson, U., Ollinger, K. and Rosdahl, I.: "*Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis.*" Exp Dermatol 14(2): 117-23 (2005).
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. and Rhee, S. G.: "*Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor.*" J Biol Chem 273(25): 15366-72 (1998).
- Liu, F. and Chernoff, J.: "*Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor.*" Biochem J 327 ( Pt 1): 139-45 (1997).
- Lohse, D. L., Denu, J. M., Santoro, N. and Dixon, J. E.: "*Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1.*" Biochemistry 36(15): 4568-75 (1997).
- Lou, Y. W., Chen, Y. Y., Hsu, S. F., Chen, R. K., Lee, C. L., Khoo, K. H., Tonks, N. K. and Meng, T. C.: "*Redox regulation of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in cancer cells.*" FEBS J 275(1): 69-88 (2008).
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. and Goldstein, B. J.: "*Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade.*" J Biol Chem 276(24): 21938-42 (2001).
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J. M., Arnold, R. S., Cheng, G., Lambeth, J. D. and Goldstein, B. J.: "*The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction.*" Mol Cell Biol 24(5): 1844-54 (2004).
- Markova, B., Gulati, P., Herrlich, P. A. and Böhmer, F. D.: "*Investigation of protein-tyrosine phosphatases by in-gel assays.*" Methods 35(1): 22-7 (2005).
- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C. and Knaus, U. G.: "*Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases.*" Cell Signal 18(1): 69-82 (2006).
- Mauro, L. J. and Dixon, J. E.: "*'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'.*" Trends Biochem Sci 19(4): 151-5 (1994).
- Mellgren, R. L.: "*Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes?*" FASEB J 1(2): 110-5 (1987).
- Meng, T. C., Fukada, T. and Tonks, N. K.: "*Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo.*" Mol Cell 9(2): 387-99 (2002).
- Meng, T. C., Buckley, D. A., Galic, S., Tiganis, T. and Tonks, N. K.: "*Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B.*" J Biol Chem 279(36): 37716-25 (2004).
- Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z. and Davies, P. L.: "*A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain.*" Cell 108(5): 649-60 (2002).
- Moldoveanu, T., Gehring, K. and Green, D. R.: "*Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains.*" Nature 456(7220): 404-8 (2008).
- Molinari, M., Anagli, J. and Carafoli, E.: "*PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis.*" J Biol Chem 270(5): 2032-5 (1995).
- Molinari, M. and Carafoli, E.: "*Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes.*" J Membr Biol 156(1): 1-8 (1997).
- Monteiro, H. P., Arai, R. J. and Travassos, L. R.: "*Protein Tyrosine Phosphorylation and Protein Tyrosine Nitration in Redox Signaling.*" Antioxid Redox Signal (2008).



- Moolenaar, W. H., Tertoolen, L. G. and de Laat, S. W.: "Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in human fibroblasts." *J Biol Chem* 259(13): 8066-9 (1984).
- Neel, B. G. and Tonks, N. K.: "Protein tyrosine phosphatases in signal transduction." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 193-204 (1997).
- Östman, A., Hellberg, C. and Böhmer, F. D.: "Protein-tyrosine phosphatases and cancer." *Nat Rev Cancer* 6(4): 307-20 (2006).
- Patel, Y. M. and Lane, M. D.: "Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27." *J Biol Chem* 275(23): 17653-60 (2000).
- Persson, C., Sjöblom, T., Groen, A., Kappert, K., Engstrom, U., Hellman, U., Heldin, C. H., den Hertog, J. and Östman, A.: "Preferential oxidation of the second phosphatase domain of receptor-like PTP-alpha revealed by an antibody against oxidized protein tyrosine phosphatases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 1886-91 (2004).
- Ravulapalli, R., Diaz, B. G., Campbell, R. L. and Davies, P. L.: "Homodimerization of calpain 3 penta-EF-hand domain." *Biochem J* 388(Pt 2): 585-91 (2005).
- Ravulapalli, R., Campbell, R. L., Gauthier, S. Y., Dhe-Paganon, S. and Davies, P. L.: "Distinguishing between calpain heterodimerization and homodimerization." *FEBS Journal* 276(4): 973-982 (2009).
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y. and Ouali, A.: "Calpain I-titin interactions concentrate calpain I in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril." *FEBS J* 272(10): 2578-90 (2005).
- Rhee, S. G., Chang, T. S., Bae, Y. S., Lee, S. R. and Kang, S. W.: "Cellular regulation by hydrogen peroxide." *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3): S211-5 (2003).
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K. and Barford, D.: "Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." *Mol Cell* 6(6): 1401-12 (2000).
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K. and Barford, D.: "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate." *Nature* 423(6941): 769-73 (2003).
- Sato, K. and Kawashima, S.: "Calpain function in the modulation of signal transduction molecules." *Biol Chem* 382(5): 743-51 (2001).
- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C. H., Pride, Y. B., Winkler, T., Greenfield, E. A., Salgia, R. and Griffin, J. D.: "The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells." *J Biol Chem* 275(32): 24273-8 (2000).
- Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kirihara, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B. and Ledbetter, J. A.: "ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced T cell signal transduction." *J Biol Chem* 269(32): 20718-26 (1994).
- Smith, L. K., Rice, K. M. and Garner, C. W.: "The insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease." *Mol Cell Endocrinol* 122(1): 81-92 (1996).
- Sprague, C. R., Fraley, T. S., Jang, H. S., Lal, S. and Greenwood, J. A.: "Phosphoinositide binding to the substrate regulates susceptibility to proteolysis by calpain." *J Biol Chem* 283(14): 9217-23 (2008).
- Sreenan, S. K., Zhou, Y. P., Otani, K., Hansen, P. A., Currie, K. P., Pan, C. Y., Lee, J. P., Ostrega, D. M., Pugh, W., Horikawa, Y., Cox, N. J., Hanis, C. L., Burant, C. F., Fox, A. P., Bell, G. I. and Polonsky, K. S.: "Calpains play a role in insulin secretion and action." *Diabetes* 50(9): 2013-20 (2001).

- Stabach, P. R., Cianci, C. D., Glantz, S. B., Zhang, Z. and Morrow, J. S.: "*Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility.*" *Biochemistry* 36(1): 57-65 (1997).
- Stalker, T. J., Gong, Y. and Scalia, R.: "*The calcium-dependent protease calpain causes endothelial dysfunction in type 2 diabetes.*" *Diabetes* 54(4): 1132-40 (2005).
- Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K. and Bode, W.: "*The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 588-92 (2000).
- Suzuki, K. and Sorimachi, H.: "*A novel aspect of calpain activation.*" *FEBS Lett* 433(1-2): 1-4 (1998).
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J. S. and Greer, P. A.: "*Conditional disruption of ubiquitous calpains in the mouse.*" *Genesis* 44(6): 297-303 (2006a).
- Tan, Y., Wu, C., De Veyra, T. and Greer, P. A.: "*Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli.*" *J Biol Chem* 281(26): 17689-98 (2006b).
- Tanner, M. M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Isola, J., Kuukasjarvi, T., Collins, C., Kowbel, D., Guan, X. Y., Trent, J., Gray, J. W., Meltzer, P. and Kallioniemi, O. P.: "*Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer.*" *Cancer Res* 56(15): 3441-5 (1996).
- Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A. and Isola, J. J.: "*Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer.*" *Clin Cancer Res* 6(5): 1833-9 (2000).
- Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F. and Friedrich, P.: "*On the sequential determinants of calpain cleavage.*" *J Biol Chem* 279(20): 20775-85 (2004).
- Tonami, K., Kurihara, Y., Aburatani, H., Uchijima, Y., Asano, T. and Kurihara, H.: "*Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization.*" *Mol Cell Biol* 27(7): 2548-61 (2007).
- Tonks, N. K., Diltz, C. D. and Fischer, E. H.: "*Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta.*" *J Biol Chem* 263(14): 6722-30 (1988).
- Tonks, N. K.: "*Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling.*" *Cell* 121(5): 667-70 (2005).
- Tonks, N. K.: "*Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11): 833-46 (2006).
- Turner, M. D.: "*Coordinated control of both insulin secretion and insulin action through calpain-10-mediated regulation of exocytosis?*" *Mol Genet Metab* 91(4): 305-7 (2007).
- Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C. and Kasuga, M.: "*Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTPIC, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains.*" *J Biol Chem* 269(16): 12220-8 (1994).
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., Pagano, P. J., Johnson, C. and Alexander, R. W.: "*Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis.*" *Circ Res* 91(12): 1160-7 (2002).
- van Montfort, R. L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R. and Jhoti, H.: "*Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B.*" *Nature* 423(6941): 773-7 (2003).

- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. and Ullrich, A.: "*Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation.*" *Science* 259(5101): 1611-4 (1993).
- Weber, F.: "*Charakterisierung von oxidans-sensitiven Proteintyrosinphosphatasen im VEGF-Signaling in humanen Endothelzellen.*" Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität, Jena (2008).
- Weedon, M. N., Schwarz, P. E., Horikawa, Y., Iwasaki, N., Illig, T., Holle, R., Rathmann, W., Selisko, T., Schulze, J., Owen, K. R., Evans, J., Del Bosque-Plata, L., Hitman, G., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Bell, G. I., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T. and Frayling, T. M.: "*Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility.*" *Am J Hum Genet* 73(5): 1208-12 (2003).
- Weibrecht, I., Böhmer, S. A., Dagnell, M., Kappert, K., Östman, A. and Böhmer, F. D.: "*Oxidation sensitivity of the catalytic cysteine of the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2.*" *Free Radic Biol Med* 43(1): 100-10 (2007).
- Wiener, J. R., Kerns, B. J., Harvey, E. L., Conaway, M. R., Iglehart, J. D., Berchuck, A. and Bast, R. C., Jr.: "*Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression.*" *J Natl Cancer Inst* 86(5): 372-8 (1994).
- Winterbourn, C. C.: "*Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.*" *Nat Chem Biol* 4(5): 278-86 (2008).
- Winterbourn, C. C. and Hampton, M. B.: "*Thiol chemistry and specificity in redox signaling.*" *Free Radic Biol Med* 45(5): 549-61 (2008).
- Woodford-Thomas, T. A., Rhodes, J. D. and Dixon, J. E.: "*Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts.*" *J Cell Biol* 117(2): 401-14 (1992).
- Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. and Suzuki, K.: "*Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions.*" *Biochem Biophys Res Commun* 208(1): 376-83 (1995).
- Zabolotny, J. M., Bence-Hanulec, K. K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Elmquist, J. K., Tartaglia, L. A., Kahn, B. B. and Neel, B. G.: "*PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo.*" *Dev Cell* 2(4): 489-95 (2002).
- Zhang, W. and Mellgren, R. L.: "*Calpain subunits remain associated during catalysis.*" *Biochem Biophys Res Commun* 227(3): 891-6 (1996).
- Zhou, Y. P., Sreenan, S., Pan, C. Y., Currie, K. P., Bindokas, V. P., Horikawa, Y., Lee, J. P., Ostrega, D., Ahmed, N., Baldwin, A. C., Cox, N. J., Fox, A. P., Miller, R. J., Bell, G. I. and Polonsky, K. S.: "*A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin.*" *Metabolism* 52(5): 528-34 (2003).

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

|                           |  |
|---------------------------|--|
| DTT                       | Dithiothreitol   |
| DUSP                      | dual-spezifische Proteintyrosinphosphatase(n)                    |
| EGF(R)                    | „epithelial growth factor (receptor)“                            |
| ER                        | endoplasmatisches Retikulum                                      |
| GSH                       | Glutathion   |
| HRP                       | Meerrettich-Peroxidase   |
| HUVEC                     | Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen                      |
| IAA                       | Natrium-Iodoacetat   |
| IB                        | Immunblot  |
| IGF(R)                    | „insulin-like growth factor (receptor)“                          |
| IP                        | Immunpräzipitation   |
| JNK                       | Jun-N-terminale Kinase   |
| $\mu$ -Calpain            | Heterodimer aus Calpain-1 und Calpain-4                          |
| m-Calpain                 | Heterodimer aus Calpain-2 und Calpain-4                          |
| MEFs                      | immortalisierte, embryonale Fibroblasten der Maus                |
| NAC                       | N-Acetylcystein  |
| Nox                       | NADPH-Oxidase(n)   |
| PDGF(R)                   | „platelet derived growth factor (receptor)“                      |
| PEF-Domäne                | Penta-EF-Hand-Domäne   |
| PIAS                      | Protein-Inhibitor von STAT1                                      |
| PIP <sub>2</sub>          | Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat                                  |
| PIP <sub>3</sub>          | Phosphoinositol-3,4,5-Trisphosphat                               |
| pNPP                      | para-Nitrophenylphosphat   |
| PTP                       | Proteintyrosinphosphatase(n)                                     |
| PTP1B                     | Proteintyrosinphosphatase 1B                                     |
| PTP1B <sup>-/-</sup> -MEF | immortalisierte, murine, epitheliale PTP1B-Knockout-Fibroblasten |
| ROS                       | reaktive Sauerstoffspezies                                       |
| RPTP                      | Rezeptorproteintyrosinphosphatase(n)                             |
| RTK                       | Rezeptortyrosinkinase(n)   |
| SDS                       | Sodiumdodecylsulfat  |
| SDS-PAGE                  | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                               |
| SHP-1                     | SH2-Domänen-PTP 1  |
| SOD                       | Superoxiddismutase   |
| SUMO                      | „small ubiquitin-like modifier“                                  |

## **7.2 Danksagung**

Entgegen allen Ausdrucks-Regeln der deutschen Sprache wird sich ein Wort in diesem Abschnitt wohl häufiger wiederholen müssen. Zu vielen verdanke ich so vieles, ohne dass meine Doktorarbeit wohl nie oder zumindest deutlich später fertig gestellt worden wäre.

Das dickste Dankeschön richtet sich an meinen Doktorvater Frank Böhmer. Sein beständiger Optimismus half mir so manche üble Stunde überstehen. Ich habe in den Jahren in seiner Arbeitsgruppe sehr viel gelernt, tolle Vorbilder erlebt und eine familiäre Atmosphäre genießen dürfen, wie sie wohl schwer wieder zu finden sein wird.

Peter Herrlich (FLI, Jena), Peter Greer (Queen's University, Kingston), David Barford (ICR, London), Arne Östman (KI, Stockholm), Pawan Gulati (University of Cincinnati) und Regine Heller (CMB, Jena) gebührt mein herzlicher Dank, für kritische Diskussionen und Anregungen sowie die Überlassung von DNA-Konstrukten, Antikörpern oder Zellen.

Ich danke Dr. Bernhard Schlott, der durch die N-terminale Sequenzierung des identifizierten Fragments sowie massenspektrometrische Untersuchungen der Fragmente einen wichtigen Beitrag zu der vorliegenden Arbeit geleistet hat.

Ich danke außerdem allen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Molekulare Zellbiologie, die mein Leben auch über das Labor hinaus so lange bereichert haben.

Astrid, Christian, Dirk, Kamal, Andrea, Lucho, Boyka, Volker – ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Vielen lieben Dank dafür und natürlich auch für die vielen tollen Stunden mit Kaffchen, Ski, Badminton, Tischtennis, Cocktails, Fußball oder leckerem Essen! Ich möchte mich gern bei Dorith dafür bedanken, dass sie nicht nur das Labor immer am Laufen hält, sondern auch mich!

Manu und allen anderen technischen Assistenten möchte ich dafür danken, dass sie uns allen so hervorragend den Rücken freihalten.

Irene, Konstanze, Georg, Claudi und Jana: ich danke euch für eure Freundschaft, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und immer da seid, wenn ich euch brauche.

Ich möchte außerdem Jana, Sabine und Hellfried für die fleißige Korrektur der vorliegenden Arbeit danken.

An dieser Stelle richtet sich auch mein herzlichster Dank an meine Oma und meine Eltern, die mich schon früh in die Welt hinausgelassen haben, um meine wissenschaftliche Neugier zu nähren. Danke für eure immerwährende Unterstützung und euer Verständnis!

### 7.3 *Curriculum vitae*

#### Persönliche Angaben

|                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| Name                | Antje Trümpler       |
| Geburtsdatum        | 25. August 1980      |
| Geburtsort          | Nordhausen/Thüringen |
| Staatsangehörigkeit | deutsch              |

#### Hochschulausbildung

|             |   |
|-------------|---|
| 2004 - 2009 | Promotion im Institut für Molekulare Zellbiologie, Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB) am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena |
| 1999 - 2004 | Studium der Biochemie/Molekularbiologie, Schwerpunkt Molekular Medizin, Friedrich-Schiller-Universität, Jena<br>Diplom (1,2)                    |

#### Schulbildung

|                   |   |
|-------------------|---|
| 08/1995 - 07/1999 | Mathematisch-naturwissenschaftlicher Spezialschuleteil des Albert-Schweitzer-Gymnasiums, Erfurt<br>Abitur (1,0) |
|-------------------|---|

#### Publikationen

**Trümpler A**, Schlott B, Herrlich P, Greer PA & Böhmer FD  
*Calpain-mediated degradation of reversibly oxidized protein-tyrosine phosphatase 1B*  
FEBS Journal 2009 Oct; 276(19): 5622-33

Teichmann K, Winkler R, Hampel K, **Trümpler A**, Böhmer FD & Imhof D  
*Monitoring phosphatase reactions of multiple phosphorylated substrates by reversed-phase HPLC*  
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 15; 853(1-2): 204-13

Mahboobi S, Uecker A, Sellmer A, Cenac C, Hocher H, Pongratz H, Eichhorn E, Hufsky H, **Trümpler A**, Sicker M, Heidel F, Fischer T, Stocking C, Elz S, Böhmer FD & Dove S  
*Novel bis(1H-indol-2-yl)methanones as potent inhibitors of FLT3 and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase*  
J Med Chem. 2006 Jun 1; 49(11): 3101-15

## **Posterpräsentationen und Vorträge**

- |      |  |
|------|--|
| 2006 | Poster auf der Jahrestagung der GBM in Mosbach   |
| 2006 | Vortrag beim EMBO Workshop „Redox Signalling in Human Disease and Aging“ in Rom<br><i>„Oxidation-dependent degradation of protein tyrosine phosphatase 1B“</i> |
| 2007 | Poster auf dem CSHL Meeting „Phosphorylation, Signaling & Disease“, Cold Spring Harbour  |
| 2007 | Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik in Jena   |

#### ***7.4 Ehrenwörtliche Erklärung***

Ich erkläre,

... dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

... dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

... dass ich weder die vorliegende Doktorarbeit noch Teile dieser für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 20.08.2009

Antje Trümpler