

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, CHEMIE UND GEOWISSENSCHAFTEN  
DER UNIVERSITÄT BAYREUTH

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION  
DER PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASE  
PTPRR

JAN EICKHOFF

AUS

BERLIN

2002

Diese Arbeit wurde in der Zeit von März 1998 bis Oktober 2001 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich angefertigt. Betreut wurde diese Arbeit von Herrn Prof. Dr. Gerhard Krauss vom Lehrstuhl für Biochemie an der Universität Bayreuth.

And the road goes on and on  
from the place where it began...

J.R.R. Tolkien

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, Frau Dipl.-Biochem. Anne Eickhoff und Herrn Prof.  
Dr. Heinrich Eickhoff.

Diese Arbeit wurde selbstständig verfasst. Es wurden keine anderen als die in dieser Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Martinsried, den 20.9.2002

Weder diese noch eine gleichartige Doktorprüfung wurden an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Martinsried, den 20.9.2002

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation

Dissertation eingereicht am 21.9.2002

Mündliche Prüfung am 30.1.2003

1.Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Krauss

2.Gutachter: Prof. Dr, Axel Ullrich

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
1.1.1	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen	4
1.1.2	Intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatasen	7
1.2	Protein-Tyrosin-Kinasen	9
1.2.1	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen	9
1.2.2	Intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinasen	10
1.3	MAP-Kinase-Kaskaden	11
1.4	Die Regulation der Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatasen	13
1.5	Biologische Funktionen von Protein-Tyrosin-Phosphatasen	16
1.6	Die Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei der Tumorentstehung	17
1.7	Zielsetzung	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1	Bezugsquellennachweis	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Enzyme	20
2.1.3	Radiochemikalien	20
2.1.4	„Kits“ und Sonstiges	20
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Liganden	21
2.2	Medien und Puffer	21
2.2.1	Medium für <i>E.coli</i> Bakterien	21
2.2.2	Zellkulturmedien	21
2.2.3	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	22
2.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	23
2.3.1	Bakterienstämme	23
2.3.2	Zelllinien und Gewebeproben	23
2.3.3	Antikörper	25
2.4	Plasmide und Oligonukleotide	26
2.4.1	Ausgangsvektoren	26
2.4.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide	27
2.4.3	Wichtige Oligonukleotide	29
2.5	Molekularbiologische Methoden	29
2.5.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	29

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.5.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	29
2.5.3	Enzymatische Behandlung von DNA	29
2.5.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	29
2.5.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	29
2.5.3.3	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	30
2.5.4	Gelelektrophorese von DNA	30
2.5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	30
2.5.6	DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien	30
2.5.6.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	30
2.5.6.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	30
2.5.6.3	Dauerkulturen von <i>E.coli</i> Bakterien	30
2.5.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	31
2.5.7.1	PCR-Amplifikationen von DNA und cDNA Fragmenten	31
2.5.7.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	31
2.5.8	Arbeiten mit RNA	31
2.5.8.1	Präparation von RNA	32
2.5.8.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	32
2.5.8.3	cDNA-Synthese	32
2.5.8.4	Bestimmung des zellulären mRNA-Vorkommens über Real-Time-PCR	33
2.6	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	33
2.6.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	33
2.6.2	Mykoplasmentest	33
2.6.3	Transfektion von Zellen	33
2.6.3.1	Kalziumphosphat-Transfektion	33
2.6.3.2	Lipofectamine®-Transfektion von COS7 Zellen	34
2.6.3.3	Bestimmung der Transfektionseffizienz	34
2.6.4	Retroviraler Gentransfer in NIH3T3-Fibroblasten	34
2.6.5	Radioaktive Markierung von Zellen	35
2.6.5.1	Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]-L-Methionin	35
2.6.5.2	Nachweis der <i>in vivo</i> Phosphorylierung der PTPRR durch PKA über [ <sup>32</sup> P]- Orthophosphat-Markierung	35
2.7	Proteinanalytische Methoden	35
2.7.1	Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)- Fusionsproteinen	35

2.7.1.1	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i> XL-1 Blue-Zellen	35
2.7.1.2	Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose	36
2.7.2	Triton X100-Lyse von Zellen	36
2.7.3	Proteinbestimmung	36
2.7.4	Immunpräzipitation von Proteinen	36
2.7.5	Präzipitation von Zellysytten mit GST-Fusionsproteinen	38
2.7.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.7.7	Färben und Fixieren von Polyacrylamidgelen	38
2.7.8	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	39
2.7.9	Immundetektion (Immunblot-Analyse)	39
2.7.9.1	<i>In vitro</i> Phosphatasetest	39
2.7.9.2	Substratbindungstest von Hitzeschockproteinen	40
2.8	Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen	40
2.8.1	Stimulation von Zellen	40
2.8.2	Immunfluoreszenz	40
2.8.3	Untersuchung der Proliferation stabil mit PTPRR infizierter NIH3T3-Zellen	41
2.8.4	Photometrische Bestimmung von lebenden Zellen (MTT-Assay)	41
2.8.5	Transkriptionsaktivierungs-Experimente (Reporter-Assay)	41
2.8.6	Migrationstest	41
2.8.7	Focusbildungstest	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
3.1	Verbreitung und Vorkommen	43
3.1.1	Expressionsmuster der PTPRR in verschiedenen Zelllinien und Geweben	43
3.1.1.1	Expression der PTPRR auf mRNA-Ebene	43
3.1.1.2	Expression der PTPRR auf Proteinebene	45
3.1.2	Intrazelluläre Lokalisation	46
3.2	Assoziierte Proteine und Substrate	48
3.2.1	Proteine mit 42-44 und 70-78 kDa assoziieren mit PTPRR <i>in vitro</i>	48
3.2.2	Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 sind Substrate der PTPRR	51
3.2.2.1	Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 binden an PTPRR <i>in vitro</i>	51
3.2.2.2	ERK1/2 ist ein Substrat der PTPRR <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
3.2.2.3	PTPRR inhibiert die ERK-vermittelte Transkription	61
3.2.3	Die Hitzeschockproteine HSP70 und GRP78 binden an die Juxtamembrandomäne der rekombinanten PTPRR	62

3.2.4	Die Expression der PTPRR verringert die Tyrosinphosphorylierung des Motorproteins KIF1C	66
3.3	Regulation der Expression und des Phosphorylierungs-zustandes der PTPRR	69
3.3.1	Die Expression der PTPRR wird von Differenzierungsagenzien beeinflusst	69
3.3.2	PKA reguliert die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK1/2	71
3.3.2.1	PTPRR wird durch PKA phosphoryliert	71
3.3.2.2	PKA reguliert die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK	72
3.4	Biologische Funktion	76
3.4.1	PTPRR verlangsamt die basale und PDGF-induzierte Proliferation	77
3.4.2	PTPRR blockiert die von v-Ki-Ras und HER2-vermittelte Transformation von Zellen	78
3.4.3	PTPRR verlangsamt die Migration von Zellen im Wundheilungs-experiment	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>84</b>
4.1	Verbreitung und Vorkommen	84
4.2	Assoziierte Proteine und Substrate	87
4.3	Regulation	92
4.4	Biologische Funktion	95
4.5	Ausblick	98
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>119</b>
	<b>NACHWORT</b>	<b>121</b>



---

# 1 EINLEITUNG

Kommunikation zwischen Zellen ist Voraussetzung für die Entwicklung eines multizellulären Organismus und die Aufrechterhaltung seiner strukturellen Funktionalität und Integrität. Über ein komplexes System von extra- und intrazellulären Signalen werden dabei zelluläre Funktionen wie Proliferation, Stoffwechsel, Migration, Adhäsion, Apoptose und Differenzierung gesteuert. Häufig ist der erste Schritt bei der Aktivierung zellulärer Signalwege die Bindung extrazellulärer Liganden an Oberflächenrezeptoren, meist GPCRen (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) und RTK<sub>n</sub> (Rezeptortyrosinkinasen); danach erfolgt die Weiterleitung der Signale ins Innere der Zelle durch ein komplexes Geflecht aus Wechselwirkungen zwischen Proteinen und kleineren Botenmolekülen. Dabei spielt die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten eine wichtige Rolle. Obwohl nur 0,01 bis 0,05 Prozent der zellulären Proteine tyrosinphosphoryliert sind, ist diese Modifikation essentiell für die Steuerung vieler physiologischer Prozesse. Ein genau abgestimmtes Wechselspiel von PTK<sub>n</sub> (Protein-Tyrosin-Kinasen) und PTPasen (Protein-Tyrosin-Phosphatasen) bei den reversiblen Tyrosinphosphorylierungsreaktionen stellt ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der Kontrolle der Genexpression und den daraus resultierenden physiologischen Veränderungen dar. Eine Störung des Gleichgewichtes von Tyrosinkinase- und Phosphataseaktivität liegt häufig bei Erkrankungen vor. So führt die Überexpression vieler PTK<sub>n</sub> zur Transformation von Zellen und ist eine entscheidende Komponente bei der Tumorentstehung. Im Gegensatz zu den PTPasen sind viele PTK<sub>n</sub> hinsichtlich ihrer Funktion und Regulation gut charakterisiert, wie z.B. die durch extrazelluläre Liganden regulierten Rezeptortyrosinkinasen der EGF-Rezeptor-Familie (Ullrich und Schlessinger, 1990; Schlessinger und Ullrich, 1992) oder die intrazellulären PTK<sub>n</sub> der Src-Familie (Bjorge *et al*, 2000; Williams *et al*, 1998; Brown und Cooper, 1996). Zum Verständnis der Rolle der Tyrosinphosphorylierung und deren Potential zur Modulierung von Proteinfunktionen ist eine bessere Kenntnis der PTPasen als Gegenspieler der PTK<sub>n</sub> erforderlich.

## 1.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Charakteristisch für die Mitglieder der Familie der Phosphatasen ist die hochkonservierte Phosphatase-Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G im katalytischen Zentrum (Charbonneau *et al*, 1989; Krueger *et al*, 1990; Zhang *et al*, 1994c; Zhang *et al*, 1994b). Man unterscheidet zwischen den „klassischen“ PTPasen, welche ausschließlich Tyrosinreste dephosphorylieren, und den dualspezifischen Phosphatasen, welche sowohl Tyrosin- als auch Threonin- und Serinreste dephosphorylieren können. Daneben gibt es noch eine dritte Gruppe der sogenannten „Low-molecular-weight“-PTPasen (LMW-PTPasen), die jedoch mit Ausnahme des CX<sub>5</sub>R-Motivs im katalytischen Zentrum keine Sequenzhomologie zu den anderen beiden Gruppen aufweist. Die „klassischen“ PTPasen lassen sich je nach Sequenz, welche die katalytische Domäne flankiert, in die Gruppe der membranständigen RPTPasen (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen) und die der intrazellulären PTPasen einteilen. Die flankierenden Domänen regulieren die Aktivität der Phosphatasen entweder direkt oder indirekt, indem sie mit regulatorischen Proteinen wechselwirken oder die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen.

Die etwa 250 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne ist bei allen PTPasen mit einer Homologie von 30 bis 40 Prozent hochkonserviert (Hooft van Huijsduijnen, 1998). Der an der Katalyse beteiligte Cysteinrest des Konsensusmotives verfügt wegen der Nachbarschaft des Argininrestes des Konsensusmotives über einen vergleichsweise niedrigen pKA-Wert und geht im ersten Schritt der Reaktion nach einem nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom mit diesem eine kovalente Bindung ein. Dabei dient ein Aspartatrest als Protonendonator für den Tyrosinrest. Die Sauerstoffatome der Phosphatgruppe werden im Michaelis-Komplex von der Guanidingruppe des Arginins und den Amidgruppen des Peptidrückgrats des aktiven Zentrums stabilisiert. Im zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird ein Phosphorylcysteinintermediat unter Mitwirkung des konservierten Aspartatrestes als Base hydrolysiert und die Phosphatgruppe freigesetzt (Denu *et al*, 1996; Zhang *et al*, 1995; Jia *et al*, 1995). Ein Tyrosinrest in der katalytischen Spalte trägt zur Spezifität für Phosphotyrosylproteine bei (Zusammenfassung Fauman und Saper, 1996). Die Eigenschaften des katalytischen Zentrums werden bei den „Substrate-trapping“-Mutanten ausgenutzt, bei denen der konservierte Cysteinrest gegen Serin oder der konservierte Aspartatrest gegen Arginin ausgetauscht werden. Dabei wird die katalytische Aktivität der PTPase ausgeschaltet bzw. stark reduziert, ohne die Affinität zu Substraten zu beeinflussen. „Substrate-trapping“-



### 1.1.1 Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die Mitglieder der Gruppe der transmembranen RPTPasen weisen eine meist stark glycosylierte extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und einen intrazellulären Teil mit zwei, in manchen Fällen auch nur einer Phosphatasedomäne auf. In fast allen Fällen besitzt die carboxyterminale Domäne geringe oder keine katalytische Aktivität. Sie verfügt jedoch über das Potential, Wechselwirkungen mit regulatorischen Proteinen oder Substraten zu vermitteln. Anders als bei den intrazellulären PTPasen findet man im zytoplasmatischen Teil der RPTPasen kaum Homologien zu Proteinmotiven bekannter Funktionen. Die extrazellulären Domänen sind durch eine Vielzahl von Strukturelementen gekennzeichnet, anhand derer man die RPTPasen in mindestens sechs verschiedene Klassen gliedern kann (Abb. 1A).

Ein repräsentativer Vertreter der Klasse I der RPTPasen ist CD45, die ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Thomas, 1989) und deren extrazellulärer Bereich aus einem aminoterminalen Bereich mit zwei spektrinähnlichen Domänen und einer FibronectinIII (FN III)-ähnlichen Domäne besteht, welche cysteinreich und N-glycosyliert ist (Fang *et al*, 1994). Zusätzlich kann durch alternatives Spleißen mindestens dreier Exons eine Diversität im extrazellulären Teil des CD45 erzeugt werden.

Zu den Vertretern der Klasse II der RPTPasen zählen unter anderem LAR, PTP $\delta$  und PTP $\sigma$  (Streuli *et al*, 1988; Zhang *et al*, 1994a). Sie weisen mit ein bis drei Immunglobulin-ähnlichen (Ig)-Strukturelementen und einer unterschiedlichen Anzahl an FN III-ähnlichen Domänen im extrazellulären Bereich Homologien zu der N-CAM (Neuronal cell adhesion molecule)-Familie der Zelladhäsionsmoleküle auf, wie z.B. N-CAM oder Facilin II (Williams und Barclay, 1988; Ruoslahti, 1988). LAR gilt mit acht FN III-ähnlichen- und drei Ig-Domänen als Prototyp der Klasse II und wird an der Zelloberfläche als ein Protein aus zwei nichtkovalent miteinander verknüpften Untereinheiten exprimiert, die durch die proteolytische Prozessierung eines Vorläuferproteins entstehen (Streuli *et al*, 1992; Yu *et al*, 1992).

PTP $\mu$  (Gebbink *et al*, 1991) und PTP $\kappa$  (Zondag *et al*, 1995) bilden eine besondere Gruppe innerhalb der Klasse II der RPTPasen, da sie zusätzlich zu einer Ig- und vier FN III-ähnlichen-Domänen eine sogenannte MAM-Domäne am aminoterminalen Ende der extrazellulären Region aufweisen. Diese MAM-Motive findet man auch in den extrazellulären Domänen von Proteinen, welche die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. So konnte eine Aggregation von Zellen durch homophile Wechselwirkung der PTP $\mu$  (Brady-Kalnay *et al*,

1993; Gebbink *et al*, 1993) und PTP $\kappa$  (Sap *et al*, 1994) nachgewiesen werden. Eine weitere Besonderheit dieser beiden Phosphatasen ist die ausgedehnte Juxtamembranregion mit einer Cadherin-ähnlichen Domäne.

Charakteristisch für die Klasse III der RPTPasen ist das Vorkommen einer unterschiedlichen Anzahl an FNII-ähnlichen Domänen in der extrazellulären Domäne. Die Phosphatasen dieser Klasse besitzen mit Ausnahme der *Drosophila*-Phosphatase DPTP99A (Hariharan *et al*, 1991) nur eine intrazelluläre PTPase-Domäne. Zu dieser Klasse der RPTPasen gehören unter anderem RPTP $\beta$ , DEP1, SAP1 und GLEPP1, welche nach ersten Hinweisen ebenso wie die RPTPasen der Klasse II eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen (Hariharan *et al*, 1991).

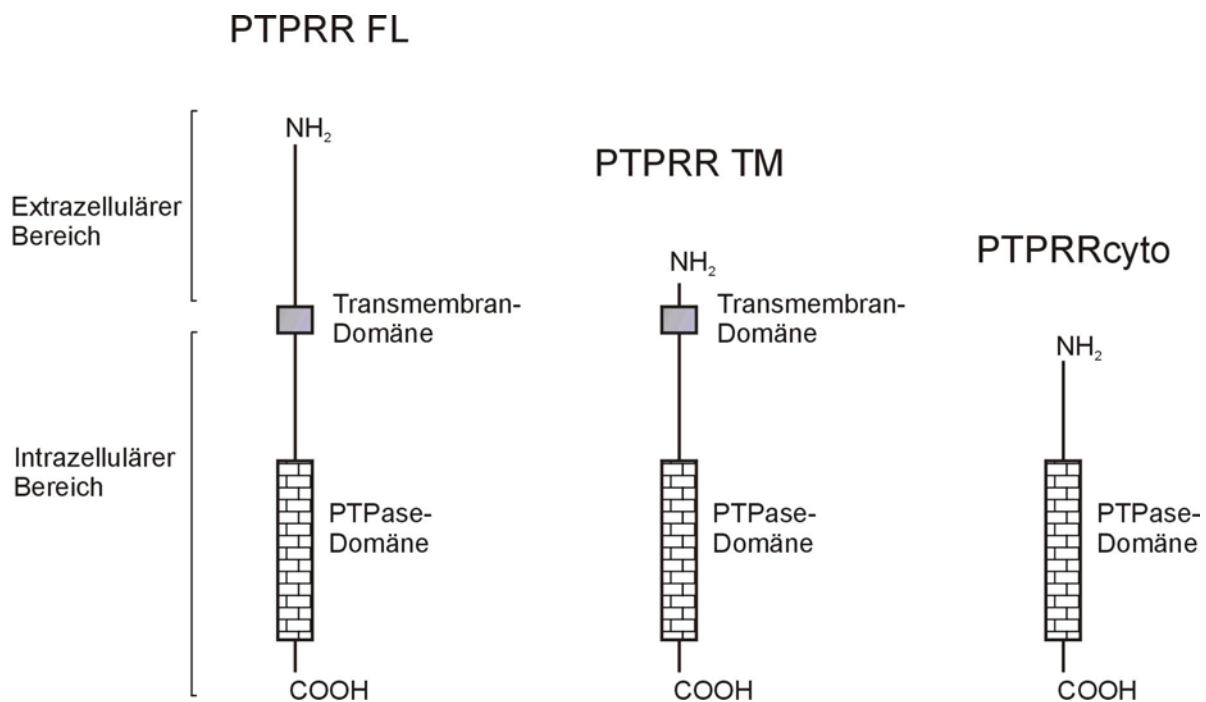
Die Klasse IV der RPTPasen wird von PTP $\alpha$  und PTP $\epsilon$  repräsentiert, die über kurze, stark glycosylierte extrazelluläre Domänen mit keinen bekannten Homologien verfügen (Matthews *et al*, 1990).

PTP $\gamma$  und PTP $\zeta$  sind Mitglieder der Klasse V der RPTPasen. Sie verfügen über einen ausgedehnten extrazellulären Bereich mit einer FN II-ähnlichen Domäne und einem Sequenzabschnitt mit Homologie zu einer Isoform des Enzyms Carboanhydrase, jedoch ohne katalytische Aktivität (Kaplan *et al*, 1990; Krueger und Saito, 1992; Levy *et al*, 1993; Barnea *et al*, 1993). Es gibt Hinweise dafür, daß die Carboanhydrase-ähnliche Domäne an Interaktionen mit neuronalen Zelladhäsionsmolekülen und dem extrazellulären Matrixprotein Tenascin beteiligt ist (Maurel *et al*, 1994; Barnea *et al*, 1994a; Barnea *et al*, 1994b).

Ein repräsentativer Vertreter der Klasse VI der RPTPasen ist PTPIA-2 mit nur einer katalytischen Domäne und einem cysteinreichen Sequenzabschnitt im extrazellulären Bereich (Lan *et al*, 1994).

Der Gegenstand dieser Arbeit, die PTPase PTPRR (PTPase des Rezeptor-Typs R), läßt sich keiner der oben aufgeführten Klassen der RPTPs zuordnen. Sie wurde aus neuronalen Zellen der Maus, der Ratte und des Menschen kloniert (Sharma und Lombroso, 1995; Ogata *et al*, 1995; Hendriks *et al*, 1995; Shiozuka *et al*, 1995, P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Auf mRNA-Ebene konnten verschiedene, durch alternatives Spleißen erzeugte Isoformen nachgewiesen werden (Van Den Maagdenberg *et al*, 1999; Augustine *et al*, 2000). Die längste Isoform, PTPRR FL [auch PTPBR-7 (aus Ratte), NEC-PTP (human), PCPTP-1 (murin) oder  $\alpha$ -PTPPBS (human oder murin) genannt] setzt sich aus einem extrazellulären Bereich von 226 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne, einem Juxtamembranbereich von 228 Aminosäuren mit kurzen Homologiebereichen zu PTP-STEP und He-PTP und einer carboxyterminalen katalytischen Domäne zusammen. Bei der Isoform PTPRR TM, [auch als PTP-SL (murin) oder  $\beta$ -PTPPBS (human oder murin) bezeichnet] ist die extrazelluläre

Domäne stark verkürzt, während die Isoform PTPRRcyto [auch  $\gamma$ -PTPPBS (human oder murin) genannt] nur aus der Juxtamembranregion und der katalytischen Domäne besteht (Abb. 2). Für diese Phosphatase gibt es eine Reihe verschiedener Bezeichnungen, je nach Ursprungsorganismus und Isoform. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird sie in dieser Arbeit durchgehend als PTPRR bezeichnet (abgeleitet vom Namen des Gens *ptpr*), wobei hPTPRR für die humane und mPTPRR für die murine Form steht.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der häufigsten Isoformen der PTPRR

Erläuterungen siehe Text.

Die Struktur der RPTPasen liefert Hinweise auf eine mögliche Regulation durch extrazelluläre Liganden. Bekannte Liganden der RPTPasen sind die extrazellulären Domänen der PTP $\mu$  und PTP $\kappa$ , welche homophil binden (Brady-Kalnay *et al.*, 1993; Gebbink *et al.*, 1993; Sap *et al.*, 1994), Kontaktin, welches mit PTP $\beta$  und PTP $\alpha$  interagiert (Peles *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 2000) sowie die extrazellulären Matrixproteine Tenascin und der Laminin-Lidogen-Komplex, die PTP $\beta$  und PTP LAR binden (O'Grady *et al.*, 1998). Eine Regulation durch Ligandenbindung konnte bisher jedoch nur für PTP $\beta$  gezeigt werden, welche durch Pleiotrophin inaktiviert wird (Meng *et al.*, 2000), und für DEP-1, welche durch extrazelluläre Matrixproteine aktiviert wird (Sorby *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Während die Mehrzahl der RPTPasen über zwei katalytischen Domänen verfügt, weisen alle zytoplasmatischen PTPasen nur eine katalytische Domäne auf.

Der nichtkatalytische Teil der Sequenzen fast aller intrazellulärer PTPasen umfaßt funktionelle Sequenzen mit Homologien zu anderen gut charakterisierten Proteinen und Domänen (siehe Abb. 1). Häufig vermitteln diese Sequenzen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, wie die SH2-Domäne, oder bestimmen die intrazelluläre Lokalisation über Membran-, Zytoskelett- oder Kernlokalisierungssignale (Mauro und Dixon, 1994).

Beispiele für Lokalisierungssequenzen liefern PTP1B und TC-PTP. Beide sind mit einer aminoterminalen PTPase-Domäne und einer carboxyterminalen regulatorischen Sequenz vergleichbar aufgebaut (Cool *et al.*, 1989; Chernoff *et al.*, 1990; Guan *et al.*, 1990; Brown-Shimer *et al.*, 1990). Der äußere Carboxyterminus der PTP1B besteht aus hydrophoben Aminosäuren, wie sie auch in typischen Transmembrandomänen gefunden werden. Er vermittelt die Bindung an die intrazelluläre Seite der ER-Membran (Frangioni *et al.*, 1992). Zwischen dem Carboxyterminus und der PTPase-Domäne befindet sich ein Abschnitt aus 100 Aminosäuren mit einigen Phosphorylierungsstellen und einer prolinreichen, SH3-Domänen bindenden Sequenz (Shifrin *et al.*, 1997; Schievella *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998). Die TC-PTP kommt in zwei verschiedenen Spleißformen vor und ist ein Beispiel dafür, wie die Lokalisation einer PTPase durch alternatives Spleißen reguliert werden kann. Während die Isoform TC48 eine ähnliche carboxyterminale hydrophobe Domäne wie PTP1B besitzt und sich ebenfalls an der intrazellulären Seite der ER-Membran befindet, ist bei der Isoform TC45 der hydrophobe Carboxyterminus durch die Aminosäuren Pro-Arg-Leu-Thr-Asp-Thr ersetzt. Dadurch wird die carboxyterminale nukleäre Lokalisationssequenz frei zugänglich und TC45 befindet sich im unstimulierten Zustand im Zellkern (Für eine Zusammenfassung Ibarra-Sanchez *et al.*, 2000).

Die beiden intrazellulären PTPasen SHP-1 (Shen *et al.*, 1991; Matthews *et al.*, 1992; Yi *et al.*, 1992) und SHP-2 (Vogel *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994), auch bekannt als PTP1C und PTP1D, sind aus zwei aminoterminalen SH2 (Src Homologie 2)-Domänen, einer katalytischen Domäne und einem Carboxyterminus mit zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen aufgebaut. Bei SHP-2 werden die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen von prolinreichen SH3(Src-Homologie3)-bindenden Domänen flankiert. SH2-Domänen binden an Phosphotyrosinreste innerhalb bestimmter Peptidsequenzen und kommen in der Familie der Src-Kinasen und vielen anderen an der Signaltransduktion beteiligten Molekülen vor (Van Vactor *et al.*, 1998; Neel, 1997; Feng, 1999). Im Fall von SHP-1 und SHP-2 können die SH2-

Domänen zwei verschiedene Funktionen ausüben. Zum einen können sie die SHPs zu den entsprechenden Bindungspartnern innerhalb der Zelle rekrutieren, zum anderen können sie die katalytische Aktivität direkt regulieren, indem sie in Abwesenheit geeigneter Phosphotyrosinliganden die katalytische Domäne binden und dadurch inaktivieren (Barford und Neel, 1998).

Weitere Beispiele zur gezielten intrazellulären Lokalisation über entsprechende Domänen liefern die intrazellulären PTPasen PTPH1 (Yang und Tonks, 1991), PTPMEG-1 (Gu *et al*, 1998), PTPD1 (Moller *et al*, 1994) und PTPBAS (Banville *et al*, 1994), für die eine aminoterminal FERM-Domäne von etwa 320 Aminosäuren charakteristisch ist, welche Homologien zu den zytoskelettassoziierten Proteinen der Bande 4.1-Familie aufweist. Diese Familie umfaßt intrazelluläre zytoskelettassoziierte Proteine wie Ezrin (Gould 1989), Talin (Rees *et al*, 1990) und Radixin (Winlenbus 1993), welche an der Verankerung des Zytoskeletts an der Zellmembran beteiligt sind. Zwischen der FERM-Domäne und der carboxyterminalen katalytischen Domäne befindet sich bei dieser Gruppe von PTPasen eine PDZ (post synaptic density disc-large zo-1)-Domäne, welche mit anderen Proteinen interagieren kann (Zusammenfassung siehe Ranganathan und Ross, 1997).

Eine weitere PTPase dieser Gruppe, PNP-1 (Sato *et al*, 1995; Saras *et al*, 1994; Maekawa *et al*, 1994; Banville *et al*, 1994) unterscheidet sich von den anderen PTPasen mit FERM-Domäne durch ihr hohes Molekulargewicht von 250 kDa, einer aminoterminal zur FERM-Domäne gelegenen Sequenz von 567 Aminosäuren ohne Homologien zu bekannten Proteinen sowie fünf GLGF (Gly-Leu-Gly-Phe)-Motiven und einem PEST-Motiv.

Dieses PEST(Pro/Glu/Ser/Thr-reiche)-Motiv, welches den Abbau von Proteinen beschleunigen kann (Matthews 1992), findet man auch bei den Mitgliedern der PEST-Familie der PTPasen, PTP-PEST (Yang *et al*, 1993) und PEP (Matthews *et al*, 1992). Die Funktion der PEST-Motive bei PTPasen ist bislang noch unklar.

Die PTPasen STEP (Striatum-enriched PTPase; Lombroso *et al*, 1991), He-PTP/LC-PTP (Hematopoeic PTP, Adachi *et al*, 1992) und PTPRR (Hendriks *et al*, 1995; Shiozuka *et al*, 1995; Ogata *et al*, 1995) bilden eine heterogene Familie intrazellulärer PTPasen (mit Ausnahme einiger membranständiger Isoformen der RPTP) mit Homologien in der carboxyterminalen PTPase-Domäne und einer kurzen Sequenz innerhalb der aminoterminalen Region. Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über diese Familie der PTPasen bekannt. STEP wird durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen exprimiert, ihre intrazelluläre Lokalisation kann durch proteolytische Spaltung reguliert werden. (Sharma *et*



*al*, 1995; Nguyen *et al*, 1999). Auch von He-PTP konnten verschieden lange Transkripte nachgewiesen werden, die durch alternatives Spleißen entstehen (Adachi *et al*, 1992).

## 1.2 Protein-Tyrosin-Kinasen

Neben Serin- und Threoninkinasen bilden Tyrosinkinasen eine der größten bekannten Familien homologer Proteine und Gene (Hanks und Hunter, 1995). Sie verfügen über einen gemeinsamen enzymatischen Mechanismus der Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste von Proteinen unter ATP-Verbrauch, wegen ihrer strukturellen Diversität üben sie jedoch die unterschiedlichsten biologischen Funktionen aus. PTKn lassen sich aufgrund ihrer Struktur ebenso wie die PTPasen in die Gruppe der transmembranen RTKn (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen) und die Gruppe der intrazellulären PTKn einteilen.

### 1.2.1 Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen

Die RTKn zeichnen sich durch eine gemeinsame Struktur aus. Sie bestehen aus einem aminoterminalen extrazellulären glycosylierten Bereich, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Region. Der extrazelluläre Bereich, welcher für die Ligandenbindung zuständig ist, weist eine große Diversität zwischen den verschiedenen RTKn auf, so daß man diese Unterschiede zur Einteilung der RTKn in 19 Unterfamilien heranziehen kann (Plowman *et al*, 1993; van der Geer *et al*, 1994). Der zytoplasmatische Anteil läßt sich in eine Juxtamembrandomäne, eine katalytische Kinasedomäne und eine carboxyterminale Domäne untergliedern. Die bei allen RTKn hochkonservierte Kinasedomäne enthält die ATP-Bindungsstelle und ist sowohl für die Autophosphorylierung des Rezeptors als auch für die Phosphorylierung der RTK-Substrate verantwortlich. Die Aminosäuresequenz des carboxyterminalen Bereiches ist zwischen den einzelnen Mitgliedern der RTKn nur schwach konserviert und enthält häufig viele Autophosphorylierungsstellen, an die Effektoren binden können.

Die Mitglieder der EGFR (Epidermal Growth Factor-Rezeptor)-Familie zum Beispiel weisen in ihrer extrazellulären Domäne zwei cysteinreiche Regionen auf. Sie umfaßt vier Mitglieder: den EGF-Rezeptor, EGFR oder HER1; (Ullrich *et al*, 1984), HER2 oder ErbB2; (Coussens *et al*, 1985), HER3 oder ErbB3; (Kraus *et al*, 1989) und HER4 oder ErbB4; (Plowman *et al*, 1993). Mitglieder dieser Rezeptortyrosinkinasefamilie werden mit der Entstehung bzw.

Progression von Tumoren beim Menschen in Zusammenhang gebracht (Lemoine *et al*, 1992; Blume-Jensen und Hunter, 2001; Ullrich *et al*, 1984).

Die Aktivierung der RTKs erfolgt in der Regel durch Stabilisierung der Dimerisierung von Rezeptormonomeren durch Ligandenbindung. Die Dimerisierung bewirkt Konformationsänderungen, die über die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der beiden Rezeptormoleküle zu einer gegenseitigen intermolekularen Transphosphorylierung der zytoplasmatischen Region führen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Schlessinger und Ullrich, 1992; Lemmon und Schlessinger, 1994). Neben der Homodimerisierung kann auch eine Heterodimerisierung verschiedener RTKs einer Unterfamilie erfolgen (Lemmon und Schlessinger, 1994).

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

Intrazelluläre Tyrosinkinasen sind an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt, die durch extrazelluläre Signale aktiviert werden und für die eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine charakteristisch ist. Die Übertragung der Signale in das Zellinnere erfolgt dabei in vielen Fällen über Transmembranrezeptoren ohne eigene Tyrosinkinaseaktivität, aber auch über RTKs und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Porter und Vaillancourt, 1998). Häufig wird die Aktivität intrazellulärer PTKs auch über Zell-Zell-Adhäsion oder die Interaktion mit der extrazellulären Matrix reguliert, wie etwa im Beispiel der an fokalen Adhäsionspunkten lokalisierten Kinase FAK, welche von Integrinen (Zelladhäsionsproteinen) ausgehende Signale weiterleitet (Zusammenfassung siehe Parsons *et al*, 2000; Schlaepfer *et al*, 1999; Cary *et al*, 1999).

Neben der katalytischen Domäne verfügen intrazelluläre PTKs häufig über zusätzliche funktionelle Sequenzabschnitte, die Interaktionen mit anderen Proteinen oder die intrazelluläre Lokalisation regulieren. Die SH2- und SH3- (Src-Homologie 2 und 3) Domänen, welche auch in den Sequenzen von PTPasen und Adaptormolekülen vorkommen, sind unter den intrazellulären Tyrosinkinasen weit verbreitet, wie etwa c-Src (Takeya *et al*, 1982) und den Src-ähnlichen Kinasen Fyn (Semba *et al*, 1986), Yes (Sukegawa *et al*, 1987) und Lck (Marth *et al*, 1985), aber auch den intrazellulären Kinasen CSK (Nada 1991) und c-Abl (Ben-Neriah *et al*, 1986). SH3-Domänen interagieren mit prolinreichen Sequenzen und sind oft für die Verankerung von Proteinen an der Plasmamembran oder am Zytoskelett verantwortlich (Zusammenfassung siehe Morton und Campbell, 1994).

Zytoplasmatische PTKn werden durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Die Aktivierung erfolgt meistens über intermolekulare oder autokatalytische Tyrosinphosphorylierung; eine Tyrosinphosphorylierung kann jedoch auch zur Inaktivierung zytoplasmatischer PTKn führen, wie das Beispiel von c-Src zeigt (Bjorge *et al*, 2000). Dabei können PTPasen auch an der Aktivierung beteiligt sein. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regulation der intrazellulären PTKn ist die intrazelluläre Lokalisation. So ist die Kinase FAK ausschließlich an Punkten der Zell-Zell-Adhäsion, den sogenannten Focal Adhesions, lokalisiert (Schaller *et al*, 1992). Ein weiteres Beispiel ist c-Src, die über eine Myristoylierung des Aminoterminus mit der Plasmamembran assoziieren kann (Resh, 1994).

### 1.3 MAP-Kinase-Kaskaden

Die MAPK-Signalwege sind Signalkaskaden, die durch eine große Auswahl verschiedener Stimuli wie Wachstumsfaktoren, mitogene Substanzen, Hormone, aber auch Stress und Entzündung aktiviert werden und eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Überleben und Migration steuern (Cobb und Goldsmith, 1995; Kyriakis und Avruch, 1996). An jedem dieser Signalwege sind multimolekulare Komplexe aus Rezeptoren, regulatorischen Proteinen und Adapterproteinen beteiligt, in die ein zentrales Modul aus drei Kinasen funktional eingebettet ist (Schaeffer und Weber, 1999; Whitmarsh und Davis, 1998). Die Signalamplifikation innerhalb dieser Kaskaden erfolgt hauptsächlich über sequenzielle Phosphorylierung und Aktivierung dieser drei Kinasen. Dabei phosphoryliert und aktiviert eine MAPKKK (MAPKK-Kinase oder MEKK) eine MAPKK (MAPK-Kinase oder MEK), welche wiederum eine der MAPKn (Mitogen aktiviert Protein-Kinasen) phosphoryliert und aktiviert, von denen die am besten charakterisierten ERK1 (von extrazellulären Signalen regulierte Kinasen) und ERK2, p38 Kinase und JNK/SAPK sind (Abb. 3).

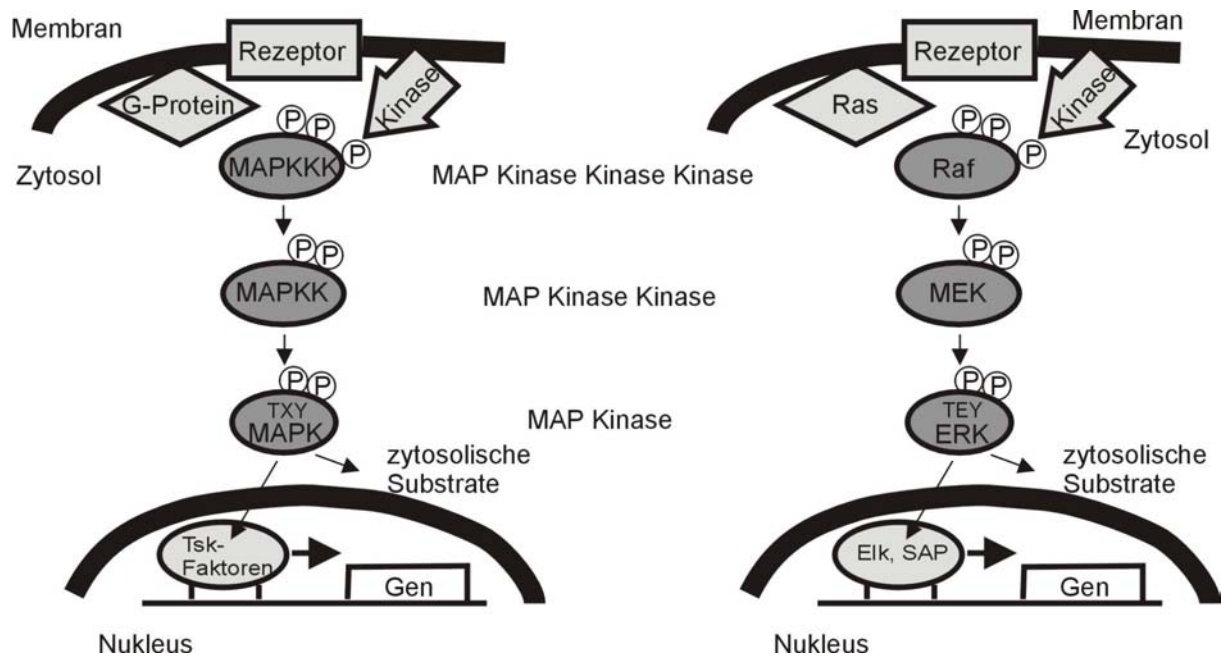
Die Aktivierung der MAPKn ERK1 und ERK2, hier ERK1/2 genannt, kann z.B. durch die Stimulation von RTKn wie dem EGFR ausgelöst werden, welche die Grb2/Sos-vermittelte Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras durch Stimulierung des GDP→GTP-Austausches bewirkt (Downward 1997). In der GTP-gebundenen Form erhöht sich die Affinität des membranständigen Ras zur MEKK Raf, welche dadurch zur Membran rekrutiert und aktiviert wird (Morrison und Cutler, 1997). Raf aktiviert wiederum die MKKn MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK-Kinasen 1 und 2) durch Phosphorylierung an Serinresten. Die dualspezifischen Kinasen MEK1 und MEK2 aktivieren nun die MAPKn ERK1/2 durch hochspezifische

Phosphorylierung an den Threonin- und Serinresten des Thr-Glu-Tyr-Motives in der Kinasedomäne VIII der ERK1/2. Nach Aktivierung gelangen die Threoninkinase ERK1/2 in den Zellkern und regulieren dort die Transkription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (Karin und Hunter, 1995; Treisman, 1996). So kann z.B. der Transkriptionsfaktor Elk-1 von ERK1/2 phosphoryliert werden, wodurch die Assoziation zwischen Elk-1 und dem SRF (Serum Response Factor) am SRE (Serum Response-Element) im c-fos-Promotor erfolgt und so die Transkription des c-fos-Gens aktiviert wird (Karin, 1996). ERK1/2 kann außerdem nach Aktivierung eine Reihe von zytosolischen und membrangebundenen Proteinen wie Signalmoleküle oder Komponenten des Zytoskeletts phosphorylieren (Cobb *et al*, 1991).

Eine Hyperaktivierung des ERK-Signalwegs wird häufig in Zusammenhang mit Tumorentstehung und -progression beobachtet. So induziert eine konstitutive Aktivierung des ERK-Signalweges die Transformation von NIH3T3 Fibroblasten (Mansour *et al*, 1994).

In den letzten Jahren begannen sich Hinweise zu häufen, daß sogenannte Gerüstproteine verschiedene Komponenten der MAPK-Kaskaden binden und in größeren Komplexen vereinigen, wodurch deren Spezifität und Effektivität erhöht werden kann (Kolch, 2000; Garrington und Johnson, 1999). Das Gerüstprotein MP-1 ist in der Lage sowohl MEK1 als auch ERK1 gleichzeitig zu binden; und das Chaperon KSR1 (Kinase-Suppressor von Ras) assoziiert mit Raf, MEK und ERK1/2 und kann so die Effektivität der ERK-Signalkaskade steigern.

Für die Aktivierung der ERK ist die Phosphorylierung sowohl des Threonin- als auch des Tyrosinrestes notwendig (Her *et al*, 1993). Drei verschiedene Klassen von Phosphatasen können an der Dephosphorylierung der ERK beteiligt sein: Die dualspezifischen Phosphatasen wie MKP-1/CL-100 und PAK, welche beide Reste dephosphorylieren, sowie Serin/Threoninphosphatasen wie PP2A und tyrosinspezifische Phosphatasen (Camps *et al*, 2000; Keyse, 1998). Die Dephosphorylierung und Inaktivierung der MAPKs in höheren Eukaryonten durch dualspezifische PTPasen ist gut untersucht; die Dephosphorylierung der MAPKs durch PTPasen war zu Beginn dieser Arbeit jedoch nur in Hefen gezeigt worden (Keyse, 1998). Die Inaktivierung der ERK durch dualspezifische Phosphatasen erfolgt im Zellkern (Keyse, 1995). Einer zytoplasmatischen dualspezifischen PTPase, MKP-3, konnte ebenfalls die Inaktivierung der ERK nachgewiesen werden (Groom *et al*, 1996; Mourey *et al*, 1996; Muda *et al*, 1996).



**Abb. 3: Die MAPK-Kaskade**

Auf der linken Seite ist ein allgemeines Schema der MAPK-Signalwege abgebildet, rechts ist der ERK-Signalweg schematisch dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

Zwischen den Komponenten der einzelnen MAPK-Kaskaden kann es Querverbindungen geben, ebenso von Komponenten aus anderen Signalwegen, wie von PKC (Protein-Kinase C; Burgering und Bos, 1995) und PKA (cAMP-abhängige Protein-Kinase) zu den MAPK-Kaskaden (Zusammenfassung siehe Houslay und Kolch, 2000). So kann z.B. PKA über verschiedene Mechanismen in den MAPK-Signalweg eingreifen, wie etwa in T-Lymphocyten, wo PKA JNK, nicht jedoch ERK1/2 inhibieren kann (Hsueh und Lai, 1995). In Rat-1-Fibroblasten, Adipozyten und Muskelzellen dagegen kann PKA den ERK-Signalweg unterdrücken, indem es die Aktivierung des Raf-1 durch Ras inhibiert (Cook und McCormick, 1993; Graves *et al*, 1993; Sevetson *et al*, 1993; Wu *et al*, 1993). Andererseits ist PKA auch an einer langanhaltenden Aktivierung der ERK1/2 in Phäochromocytoma PC12-Zellen beteiligt, wobei PKA den Rap1/B-Raf Signalweg aktiviert (Vossler *et al*, 1997; Frodin *et al*, 1994).

## 1.4 Die Regulation der Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Neben der Lokalisation intrazellulärer PTPasen sowie der Ligandenbindung der RPTPasen kann eine Reihe weiterer Mechanismen zur Regulation der Phosphatasen beitragen. So kann

die Tyrosinphosphorylierung von PTPasen die Assoziation mit Proteinen, die SH2-Domänen enthalten, ermöglichen. Die Phosphatase SHP-1 kann z. B. nach ihrer Rekrutierung an den PDGF-Rezeptor durch Interaktion ihrer SH2-Domäne mit der Y1009-Autophosphorylierungsstelle des Rezeptors an ihrem Carboxyterminus tyrosinphosphoryliert werden. Das daraus entstehende tyrosinphosphorylierte SH2-Bindungsmotiv der SHP-1 kann wiederum von der SH2-Domäne des Adaptorproteins GRB-2 gebunden werden (Bennett *et al*, 1994; Pawson *et al*, 1993). Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für die RPTPase PTP $\alpha$  nachgewiesen werden, welche ebenfalls nach Tyrosinphosphorylierung an die SH2-Domäne von Grb2 bindet (Su *et al*, 1994; den Hertog *et al*, 1994).

Eine Regulation durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten ist für PTPasen ebenfalls nachgewiesen worden. Diese reversible Phosphorylierung kann, wie das Beispiel der zytoplasmatischen PTP-PEST zeigt, die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen. Diese kann *in vitro* an zwei Serinresten, Ser30 und Ser435, sowohl von PKA als auch von PKC phosphoryliert werden; ebenso *in vivo* durch Stimulation mit TPA oder Forskolin, welche PKC- bzw. PKA-Aktivatoren sind (Garton und Tonks, 1994). Während die Phosphorylierung am Ser435 eine endosomale Lokalisation der PTP-PEST begünstigt, führt die Phosphorylierung am Ser39 zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität. Ein weiteres Beispiel für Regulation von PTPasen durch Phosphorylierung liefert PTP1B. In asynchron wachsenden HeLa-Zellen wird PTP1B von PKC an Ser378 phosphoryliert. Nach einem mitotischen Stopp wird dieser Serinrest dephosphoryliert und zwei unterschiedliche Kinasen phosphorylieren Ser286 und Ser352, was zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität der PTP1B führt (Flint *et al*, 1993). Bei Behandlung von T-Zellen mit Ionomycin hingegen korreliert eine Reduktion der Serinphosphorylierung der RPTPase CD45 mit einer reduzierten PTPase-Aktivität (Ostergaard und Trowbridge, 1991).

Die Regulation der PTPasen kann auch auf Transkriptionsebene erfolgen. Die Expression der RPTPasen LAR (Longo *et al*, 1993), PTP $\sigma$  (Celler *et al*, 1995) und DEP-1 (Ostman *et al*, 1994) steigt mit zunehmender Zelldichte und vermittelt möglicherweise die Kontaktinhibition des Zellwachstums, d.h. einen Proliferationsstopp bei Kontakt mit Nachbarzellen. Eine induzierbare Differenzierung konnte mit der Expression der PTP1C und PTP-PEST in HL-60 und P19-Zellen korreliert werden (Zhao *et al*, 1994; den Hertog *et al*, 1992). Bei der Aktivierung von Lymphozyten durch verschiedene Faktoren steigt die Expression der ausschließlich in lymphatischen Zellen exprimierten He-PTP signifikant an (Zanke *et al*, 1992) und der Expressionslevel der hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimierten

---

PTPRR kann in murinen PC-12-Zellen durch Induktion der Differenzierung mit NGF (Nerve Growth Factor) erhöht werden (Sharma und Lombroso, 1995).

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der PTPasen ist die Expression verschiedener Isoformen durch alternatives Spleißen. Neben der bereits erwähnten Regulation der TC-PTP kann auch die Lokalisation der intrazellulären PTP STEP durch alternatives Spleißen gesteuert werden. STEP kann in den Isoformen STEP46 und STEP61 auftreten. STEP 46 ist zytoplasmatisch, während STEP61 in der zusätzlichen N-terminalen Region über zwei PEST-Sequenzen, zwei prolinreiche Sequenzen und zwei Transmembrandomänen verfügt und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert ist (Bult *et al*, 1996). In den extrazellulären Domänen der RPTPs wurden ebenfalls durch alternatives Spleißen verursachte Variationen beobachtet, denen allerdings bislang noch keine Funktionen zugeordnet werden konnten.

Auch durch proteolytische Spaltung von PTPasen kann eine Regulation der Phosphatase-Aktivität erfolgen. So reguliert die proteolytische Prozessierung der intrazellulären PTP1B in Blutplättchen deren katalytische Aktivität (Ezumi *et al*, 1995). Die Spaltung der PTP1B wird neben künstlichen Stimuli wie TPA auch durch die Aggregation von Blutplättchen mit Fibrinogen und Thrombin induziert. Sie wird durch die durch Kalziumionen aktivierbare Protease Calpain vermittelt und führt über eine Abspaltung des Carboxyterminus der PTP1B zu einer Translokation des Enzyms von zellulären Membranen ins Zytoplasma. Neben einer Erhöhung der *in vitro*-Aktivität der löslichen Form der PTP1B korreliert die Prozessierung mit einer Änderung des Phosphotyrosingehaltes zellulärer Proteine, die typischerweise während der Aggregation von Blutplättchen auftreten (Shattil und Brugge, 1991). Auch für STEP konnte eine kalziuminduzierte proteolytische Spaltung der ER-assoziierten Isoform nachgewiesen werden (Nguyen *et al*, 1999).

## 1.5 Biologische Funktionen von Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Über die Beteiligung von PTPasen an Signalübertragungswegen ist im Vergleich zu Protein-Tyrosin-Kinasen bisher nur wenig bekannt. Als natürliche Antagonisten der PTKs verfügen die PTPasen über das Potential, einen negativen Einfluß auf tyrosinphosphatabhängige Signalwege auszuüben; sie können jedoch auch synergistisch mit PTKn wirken. Eine Beteiligung von PTPasen an biologischen Prozessen wie Differenzierung (Schaeffer und Weber, 1999; Van Vactor, 1998; Arregui *et al*, 2000; den Hertog, 1999; den Hertog *et al*, 1999), Adhäsion (Brady-Kalnay und Tonks, 1995), Migration (Angers-Loustau *et al*, 1999) und an hämatopoetischen Signalwegen (Frearson und Alexander, 1997; Okumura und Thomas, 1995) konnte nachgewiesen werden.

Sehr gut untersucht ist die Funktion der SHP-1 in hämatopoetischen Zellen. SHP-1 kann die Rezeptoren für die Zytokine Interleukin II und Erythropoetin, welche die Hämatopoese induzieren, negativ regulieren (Klingmüller *et al*, 1995). Dabei dephosphoryliert SHP-1 positiv regulatorische Tyrosinreste der mit diesen Rezeptoren assoziierten Tyrosinkinase und inaktiviert sie dadurch. Eine Funktion der SHP-1 in der Hämatopoese wird auch durch die sogenannten *motheaten* und *viable motheaten*-Phänotypen in Mäusen deutlich, in denen unterschiedliche Deletionen des Gens für SHP-1 vorliegen (Shultz *et al*, 1993; Tsui *et al*, 1993). In diesen Mäusen treten vielfältige hämatopoetische Abnormalitäten auf, die sich unter anderem in einer Überempfindlichkeit gegenüber Erythropoetin und einer Überproduktion von Autoantikörper produzierenden Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten äußern (Shultz *et al*, 1987).

Ein Beispiel für eine positive Funktion von PTPasen bei der Weiterleitung von Signalen durch Tyrosinphosphorylierung liefert die intrazelluläre SHP-2, deren *Drosophila*-Homologes Corkscrew positiv an den Effekten der Embryonalentwicklung beteiligt ist, die durch die Tyrosinkinase Torso vermittelt werden. SHP-2 wird als Folge der RTK-Aktivierung tyrosinphosphoryliert und kann dadurch mit SH2-Domänen enthaltenden Proteinen assoziieren, besitzt jedoch auch über seine eigene SH2-Domäne die Fähigkeit, tyrosinphosphorylierte Proteine zu binden (Feng *et al*, 1993). Dabei fungiert SHP-1 in erster Linie als Adaptorprotein.

Ein weiteres Beispiel für Positivregulation durch PTPasen in der Signaltransduktion ist die Dephosphorylierung der Src-Kinase durch PTP $\alpha$ . Diese kann negativ regulatorische Phosphatreste der Src-Familie der zytoplasmatischen PTK abspalten und diese so aktivieren.



Eine Überexpression der PTP $\alpha$  in Fibroblasten führt über eine langanhaltende Aktivierung der c-Src-Kinase zur Transformation (Zheng *et al*, 1992). Die Aktivierung der c-Src-Kinase korreliert ebenfalls mit der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen, in denen die Expression der PTP $\alpha$  nach Stimulation mit dem Differenzierungsagenz Retinolsäure stark ansteigt.

Sehr gut untersucht ist die Aktivierung von Kinasen der Src-Familie durch die RPTP CD45 im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen (Zusammenfassung siehe Chan *et al*, 1994). In T-Zellen dephosphoryliert CD45 den carboxyterminalen, negativ regulatorischen Phosphotyrosinrest der Src-ähnlichen Kinasen Lck und Fyn (Biffen *et al*, 1994; Mustelin *et al*, 1992). Beide Kinasen assoziieren neben anderen intrazellulären Tyrosinkinasen mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex und vermitteln stimulationsabhängig die zur T-Zell-Aktivierung führenden Effekte (Janeway und Bottomly, 1994; Weiss und Littman, 1994). Die Phänotypen CD45-negativer Zellen mit schweren Defekten in der Aktivierung belegen dabei die Bedeutung dieser PTPase in der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (Pingel und Thomas, 1989; Koretzky *et al*, 1990).

## 1.6 Die Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei der Tumorentstehung

Rezeptortyrosinkinasen spielen eine zentrale Rolle bei Wachstum, Proliferation und Migration und verfügen dadurch über ein großes onkogenes Potential. Ein Drittel aller Onkogene sind Rezeptor-Tyrosinkinasen (Hunter, 1989). Eine Überexpression oder eine verstärkte Aktivität der Kinasedomäne kann zu unkontrollierter Proliferation und Transformation der Zellen führen (Übersicht siehe Blume-Jensen und Hunter, 2001). Da PTPasen als Antagonisten der PTKn wirken, kommen sie als potentielle Tumorsuppressoren in Betracht.

Führt die Überexpression oder konstitutive Aktivierung einer Tyrosinkinase zur Transformation von Zellen, so sollte die Deletion oder Inaktivierung einer negativ regulatorischen PTPase ähnliche Auswirkungen haben. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß einige PTPasen von Chromosomenabschnitten codiert werden, welche in Krebszellen häufig deletiert sind. So befindet sich PTP $\gamma$  auf dem Chromosom 3p21 (LaForgia *et al*, 1991) welches in vielen Lungen und Nierenkarzinoma-Zelllinien deletiert ist; in nichttransformierten Nieren- und Lungenzelllinien wird PTP $\gamma$  dagegen normal exprimiert. Ein weiteres Beispiel ist die auf Chromosom 12q12-13 lokalisierte SHP-1. Eine Deletion

dieser Region führt zur malignen Transformation von Eosinophilen oder zu Leukämie bei Kindern (Yi *et al.*, 1992). Die Überexpression einer zytoplasmatischen Form der TC-PTP kann die Transformation von Fibroblasten durch die onkogene Tyrosinkinase v-Fms unterdrücken (Zander *et al.*, 1993).

Eine Ausnahme unter den PTPasen bildet PTP $\alpha$  mit ihrer Eigenschaft, durch Überexpression Transformation von Zellen zu verursachen. Ursache hierfür ist vermutlich die Fähigkeit der PTP $\alpha$ , die c-Src-Kinase an negativ regulatorischen Tyrosinresten zu dephosphorylieren und somit zu aktivieren.

## 1.7 Zielsetzung

Über PTPRR war zu Beginn dieser Arbeit noch wenig bekannt. Es war ein komplexes Expressionsmuster von Transkripten unterschiedlicher Größen in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen worden (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Zusätzlich lagen erste noch unveröffentlichte Hinweise auf eine von der Juxtamembrandomäne der PTPRR vermittelte Assoziation mit den MAPKs ERK1/2 und eine Dephosphorylierung des Tyrosinrestes des Aktivierungsmotivs der ERK1/2 durch PTPRR vor (R. Pulido und A. Ullrich, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen gaben zusammen mit der Tatsache, daß die Aktivierung der ERK häufig an der Tumorentstehung und –entwicklung beteiligt ist (Sebolt-Leopold, 2000; Cobb *et al.*, 1994; Blume-Jensen und Hunter, 2001), Anlaß zur Vermutung, daß PTPRR diese Prozesse möglicherweise beeinflussen kann. Über die biologischen Effekte einer Tyrosin-Dephosphorylierung der über dualspezifische Phosphorylierung aktivierten ERK1/2 in höheren Eukaryonten lagen noch keine Daten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der PTPRR in der zellulären Signaltransduktion untersucht werden, insbesondere ihre Regulation und Auswirkung auf biologische Prozesse. Von besonderem Interesse war dabei die Funktion der PTPRR bei der Tumorentstehung und Transformation von Zellen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borhydrid	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Dasca	Immunotech, Montreal
Desoxyribonukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Enzyme Dilution Buffer	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fisch-Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Polysciences, Eppenheim
Forskolin	Alexis, Grünberg
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazin-Ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
IBMX (8-Methoxymethyl-1-Methyl-3-(2-Methylpropyl)-Xanthin)	Alexis, Grünberg
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
D-(-)Luziferin	Boehringer, Mannheim
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Biomol, Haub
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolbromid)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumbutyrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen

Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Poly-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Retinolsäure (all-trans)	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
TPA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

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

### 2.1.2 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Boehringer, Mannheim
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
DNase, RNase frei	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
	NEB, Schwalbach
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

### 2.1.3 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP	>5000 Ci/mmol
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	>1000 Ci/mmol

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

### 2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

ECL Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, Rotenburg a. d. Fulda
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
DNA Master SYBR Green I <sup>®</sup>	Roche, Penzberg
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, New Jersey
Parafilm	Dynatech, Denkendorf

Poly Prep® Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy RNA-Preparation Kit	Qiagen, Hilden
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, Düsseldorf
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, Düsseldorf
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

Bradykinin	Sigma, Taufkirchen
EGF (Maus)	Toyoba, Japan
αFGF	Pepro Tech, USA
LPA	Sigma, Taufkirchen
PDGF B/B	Boehringer, Mannheim
NGF	Becton Dickenson,

## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Medium für *E.coli* Bakterien

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

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

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

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem LB-Medium 1,5% Agar zugesetzt.

### 2.2.2 Zellkulturmedien

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

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

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 1,0mg/ml Glukose, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 5% hitzeinaktiviertes FCS, 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum

Leibowitz L-15 Medium, 10% hitzeinaktiviertes FCS

Leibowitz L-15 Medium, 15% hitzeinaktiviertes FCS

MEM (Minimal Essential Medium), 2mM Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS

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

Einfriermedium: 90% hitzeinaktiviertes FCS, 10% DMSO.

### 2.2.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
			pH 6.96 (NaOH)
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glyzerin
	100,0	mM	EDTA pH 8,0
Lämmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β-Mercaptoethanol
NET (10x)	150,0	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	50	mM	Tris
	0,05	%	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS

“Strip”-Puffer	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	2,0 %	SDS
	100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM	Tris/Acetat
	10 mM	EDTA
		pH 8,0 (Eisessig)
TE10/1	10,0 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1,0 mM	EDTA pH 8,0
TE10/0,1	10,0 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1 mM	EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918,0 mM	Glycin
	1,0 %	SDS

## 2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und von Referenzen tabellarisch aufgeführt.

### 2.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ F'	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ), <i>RecA1</i> , <i>RelA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$ , $\Phi 80lacZ\Delta M15$ , F'	Genentech, San Francisco
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ), <i>lac</i> , <i>RecA1</i> , <i>RelA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F'[ <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta M15$ , Tn10]	Stratagene, LaJolla

### 2.3.2 Zelllinien und Gewebeproben

Zelllinie:	Ursprung:	Referenz:
A172	humanes Glioblastom	ATCC CRL-1620
A-431	humanes epidermoides Karzinom	ATCC CRL-555
AC751	humanes Mammakarzinom	M. Stampfer, Boston
GPE	modifizierte HEK293 Linie zur	Markowitz <i>et al</i> (1988)

---

	Produktion von helfervirusfreien, amphotropen Retroviren	
GPE/X/v-Fms	Produktion von retroviralen v-Fms-Überständen	C.Sherr, Memphis
GPE/X/v-ErbB	Produktion von retroviralen v-ErbB-Überständen	W. Rapp, d. AG
GPE/X/Her2	Produktion von retroviralen Her2-Überständen	U. Weiss, d. AG
GPE/X/v-Ki-Ras	Produktion von retroviralen v-Ki-Ras-Überständen	B. Holzmann, d. AG
BT-483	humane Duktalkarzinom, Brust	ATCC HTB 121
BT-549	humanes Brustkarzinom	ATCC HTB 122
CaOv3	humanes Adenokarzinom, Ovarien	ATCC HTB-75
CHO-K1	Ovarienzellen, Hamster	Sugen, San Francisco
COS7	immortalisierte Nierenfibroblasten, grüne Meerkatze	ATCC CRL-1651
DANG	humanes Pankreaskarzinom	DKFZ 610006
F9	murines Hodenkarzinom	ATCC CRL-1720
HBL-100	humane Brustepithelzellen	ATCC HTB-124
HEK293	humane embryonale Nierenfibroblasten transformiert mit Adenovirus Typ V	ATCC CRL-1573
HS766	humanes Pankreaskarzinom	ATCC HTB-134
MCF 7	humanes Brust-Adenokarzinom	ATCC HTB-22
MCF10A	humane Brustepithelzellen	ATCC CRL-10317
MDA-MB157	humanes Mammakarzinom	ATCC HTB-24
MDA-MB231	humanes malignes Mammakarzinom	ATCC HTB-26
MDA-MB-415	humanes Brust-Adenoarzinom	ATCC HTB-128
MDA-MB-453	humanes Mammakarzinom	ATCC HTB-131
NIH3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658



OvCar3	humanes Adenokarzinom, Ovarien	ATCC HTB-161
Rat-1	immortalisierte Rattenfibroblasten	R. Friedrich, Giessen
PC12	Ratten-Phäochromocytomazellen	P. Cohen, Dundee
Phoenix E	modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, ecotrophen Retroviren	P. Nolan, Stanford
SK-N-SH	Humanes Neuroblastom, Gehirn	ATCC HTB-11
SW948	humanes kolorektales Adenokarzinom	ATCC CCL-237
ZR 75-1	humanes Brustkarzinom	ATCC CRL-1500

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeprouben wurden von Prof. Dr. H. Höfler (München) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.3 Antikörper

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

Antikörper:	Eigenschaften:	Referenz:
BR7.2	Maus, monoklonal, gegen die zytoplasmatische Domäne der hPTPRR	M. Ogata, Osaka
EC-PTP	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Juxtamembrandomäne der hPTPRR	P. Knyazev, d. AG
ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz, Kalifornien
ERK2 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Unterdomäne XI der Ratten-ERK2	Santa Cruz, Kalifornia
GRP78	Kaninchen, polyklonal	Stressgen, Victoria, Kanada
GST	Kaninchen, polyklonal	P. Knyazev, d. AG
HA	Maus, monoklonal, gegen die 12 AS des Influenza-Hämagglutinin-Epitops	Babco, Kalifornien
HSC70	Ratte, monoklonal	Stressgen, Victoria, Kanada
JNK	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien

Phospho-ERK	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphoryliertes Threonin 202 und Thyrosin 204 der humanen ERK2	NEB, Schwalbach
Pan-ERK	Maus, monoklonal, gegen die AS 219-358 der humanen ERK2	Transduction Lab., Lexington
PY(4G10)	Maus, monoklonal, gegen phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
Phospho-JNK	Kaninchen, polyklonal, gegen aktivierte JNK	NEB, Schwalbach
Phosph-p38	Kaninchen, polyklonal, gegen aktivierte p38	NEB, Schwalbach
p38	Kaninchen, polyklonal	NEB, Schwalbach
PTP $\alpha$	Kaninchen, polyklonal, gegen AS 22-32 der PTP $\alpha$	R. Lammers, d. AG
PTPRR 428	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Juxtamembrandomäne der PTPRR	Eurogentech, Belgien
PTP-SL	Kaninchen, polyklonal, gegen die zytoplasmatische Domäne der mPTPRR	R. Pulido, d. AG

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

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

## 2.4 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.4.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	ColE1 ori, Amp <sup>r</sup> , Lac Promotor, fl (+) ori, SK (MCS)	Stratagene, Kalifornien
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> CMV Promotor, BGH poly A-site, hohe Kopienzahl	Invitrogen, Groningen

pGEX	Prokaryotischer Expressionsvektor zur Produktion von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> , pBR322 ori	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman (1989)
pRK5	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , CMV Promotor, SV 40 poly A-site, hohe Kopienzahl	Genentech, San Franzisco

#### 2.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pCMVβGal	Expressionsplasmid für β-Galaktosidase zur Normalisierung von Zellextrakten	A. Kieser, München
pEF-mPTPRR FL WT	Längste Isoform der mPTPRR,	M. Ogata, Osaka
pGEX-PTPRR 230-632	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der mPTPRR, AS 230-632	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTPRR 230-371	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der mPTPRR ohne Phosphatasedomäne, AS 230-371	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTPRR 230-338	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der mPTPRR ohne Phosphatasedomäne, AS 230-338	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTPRR 339-632	GST-Fusionsprotein der Phosphatase-Domäne der mPTPRR, AS 339-632	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTPRR 230-371 Δ314-327	GST-Fusionsprotein der zytoplasmatischen Isoform der mPTPRR ohne Phosphatase Domäne und KIM, AS 230-371	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTP-STEP128-235	GST-Fusionsprotein der PTP-STEP56 AS 128-235	R. Pulido, d. AG
pGEX-PTP-STEP128-497	GST-Fusionsprotein der PTP-STEP56 AS 128-497	R. Pulido, d. AG
pRK5-c-Src	c-Src-Kinase	T. Hunter, LaJolla
pRK5-CD45	RPTPase CD45	D. Cool, Seattle

---

pRK5-HA-PTPRRcyto WT	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR, HA markiert	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTPRRcyto CS	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Cys563 zu Ser, HA markiert	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTPRRcyto SE	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Ser321 zu Glu, HA markiert	R. Pulido, d. AG
pRK5-HA-PTPRRcyto SA	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Ser321 zu Ala, HA markiert	M. Sommer, d. AG
pRK5-hPTPRR FL WT	Längste Isoform der hPTPRR	P.Knyazev, d. AG
pRK5-KIF1C	Kinesin interacting factor 1C	R. Lammers, d. AG
pRK5-mPTPRR FL WT	Längste Isoform der mPTPRR	Diese Arbeit
pRK5-PTPRRcyto WT	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR	R. Pulido, d. AG
pRK5-PTP1B	PTP1B	B. Jallal, d. AG
pRK5-PTP $\alpha$	PTP $\alpha$	R. Lammers, d. AG
pRK5-PTPRR TM WT	Transmembrane Isoform der mPTPRR	R. Pulido, d. AG
pRK5-PTPRR TM CS	Transmembrane Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Cys563 zu Ser	R. Pulido, d. AG
pLXSN-HA-PTPRR cyto WT	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR HA markiert	M. Sommer, d. AG
pLXSN-HA-PTPRR cyto CS	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Cys480 zu Ser, HA markiert	M. Sommer, d. AG
pLXSN-HA-PTPRR cyto SE	zytoplasmatische Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Ser321 zu Glu, HA markiert	M. Sommer, d. AG
pLXSN-HA-PTPRR TM WT	Transmembrane Isoform der mPTPRR	M. Sommer, d. AG
pLXSN-HA-PTPRR TM CS	Transmembrane Isoform der mPTPRR mit dem AS-Austausch Cys563 zu Ser, HA markiert	M. Sommer, d. AG
pcDNA3-BDP1	PTP BDP-1	M. Gensler, d. AG

pcDNA3-HA-HePTP	HePTP, HA-markiert	K. Spiekermann, d. AG
pSREwt-Luc	Reporterplasmid mit Luziferasegen mit vorgeschaltetem TCF/SRE Enhancer	A. Kieser, München

### 2.4.3 Wichtige Oligonukleotide

Sequenz (5'→3'):

GAA AAG TTG AGG TTC TGG TTA TCA G

ACC ATT CCA CCT CTA TCC ATA CGA

Amplifikation der PTPRR-cDNA im Light-Cycler

CAC CAC ATG CTT GCC ATC C

CCG CGT CTC CTT TGA GCT

Amplifikation der Zyklophilin A-cDNA im Light-Cycler

Name:

NEC U

NEC B

Cyclo B

Cyclo F

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

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

### 2.5.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

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

### 2.5.3 Enzymatische Behandlung von DNA

#### 2.5.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionen wurden in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern 1-2 Stunden oder ü.N. beim Temperaturoptimum des Enzyms durchgeführt.

#### 2.5.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gesplante Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20µl in Phosphatasepuffer (50mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

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

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

### 2.5.4 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol. 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel 10min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10min in 1x TAE entfärbt.

### 2.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (50) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

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

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

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien wurde die Methode von Miller und Rosman (1989) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als  $5 \times 10^6$  Klone/µg DNA.

#### 2.5.6.2 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* Bakterien wurden 10µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20µl 5x KCM (500mM KCl, 150mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM MgCl<sub>2</sub>), 70µl H<sub>2</sub>O und 100µl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10min bei RT inkubiert, dann mit 1.000µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/ Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

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

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

## 2.5.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

### 2.5.7.1 PCR-Amplifikationen von DNA und cDNA Fragmenten

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

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

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Synthesereaktion wurden in einem Thermocycler „Progene“ der Firma Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

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

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes über Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden wie unter 2.5.7.2 beschrieben aufgereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

### 2.5.7.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

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

## 2.5.8 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-

Präparation wurden ständig Handschuhe zum Schutz vor RNasen der Haut getragen und regelmäßig gewechselt.

### 2.5.8.1 Präparation von RNA

Die Präparation von RNA aus Zellen und Geweben erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits für die Isolation zytoplasmatischer RNA (Qiagen, Hilden). Vor der Aufreinigung wurde die RNA nach Herstellerangaben mit Rnase-freier Dnase behandelt. Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 und 280 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

### 2.5.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegelkammern (Lehrach *et al.*, 1977). 1,2g Agarose wurden in 77ml H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgeköcht und 10min bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 10ml 10x MOPS und 13ml Formaldehyd (37% (v/v)) aufgefüllt und das Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 10 µg gesamt-RNA wurde mit 5µl 10x MOPS, 8,75µl Formaldehyd (37%(v/v)) und 25µl Formamid versetzt und das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt. Die Proben wurden 10min bei 65°C erhitzt, anschließend mit 10µl RNA-Probenpuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm<sup>2</sup> Gelfläche wurden 0,8 Volt Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 200ml Laufpuffer mit 5µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 30min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters fotografiert.

### 2.5.8.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Schema angesetzt:

1. Anlagern der Primer:

10,0 µl	RNA (1µg/µl)
1,0 µl	Zufalls-Hexanukleotid (2pmol)

2' 68°C, Abkühlen auf RT

2. Synthesereaktion:

4,0 µl	dNTP-Mix (2,5mM)
4,0 µl	5 x AMV-RT-Puffer
0,1 µl	RNase-Inhibitor (40 E/ µl)
1,0 µl	AMV-Reverse Transkriptase, ca 0,3E (0,7 µl AMV-RT in 50 µl AMV-RT-Puffer)

1h bei 42°C



#### 2.5.8.4 Bestimmung des zellulären mRNA-Vorkommens über Real-Time-PCR

Nach Isolierung der zytoplasmatischen RNA und cDNA-Synthese wurden 0,2µl cDNA (entspricht 150ng gesamt-RNA) jeder Probe aus den RT-Ansätzen mit dem „Master SYBR Green I“-Kit der Firma Roche Diagnostics (Penzberg) für die PCR vorbereitet. Zur Messung der PTPRR-mRNA-Konzentrationen wurden die Primer NEC U und NEC B und zur Bestimmung des Zyklophilin A-mRNA-Vorkommens wurden die Primer Cyclo F und Cyclo U eingesetzt. Die Amplifikation und Detektion erfolgte in einem LightCycler Real-Time-PCR-Instrument der Firma Roche Diagnostics (Penzberg).

## 2.6 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

### 2.6.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Laminair von Heraeus, Hanau) ausgeführt. Dabei wurden die Zellen regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sogenannten Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics, Krefeld).

PC12-Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Hierzu wurden die Schalen mit Kollagen (in Äthanol gelöst, isoliert aus Rattenschwänzen; Sigma, Taufkirchen) bedeckt und 2 h im Brutschrank inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Platten 3 x mit sterilem PBS gewaschen.

### 2.6.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen beeinflussen die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führen hierdurch zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit 20% Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und 15min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen untersucht.

### 2.6.3 Transfektion von Zellen

#### 2.6.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Bosc23- und HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird die DNA mit CaCl<sub>2</sub> und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei den Zellteilungen verloren (Scangos und Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48-72 h nach Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale (8ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 µg DNA in 260µl H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 40µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt. Unter Schütteln wurden 400µl BBS (2x) zugetropft. Nach 15min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und die Ansätze ü.N. bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und gegebenenfalls mit serumfreiem Medium bis zur weiteren Verwendung gehungert.

Für die Transfektion von Phönix E Zellen wurde das eben beschriebene Protokoll modifiziert: Anstelle von BBS wurde HBS verwendet und die CaCl<sub>2</sub>-Lösung war 2,0 M.

### **2.6.3.2 Lipofectamine®-Transfektion von COS7 Zellen**

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

Die Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von 150 000 Zellen/Loch (6-Loch-Schalen) ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 5µl Lipofectamine® und 95µl serumfreiem Medium sowie eine Lösung B mit 1.5µg Plasmid-DNA in 100µl serumfreiem Medium angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 30-45min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde zu den Transfektionsansätzen 800µl serumfreies Medium zugegeben. Die Transfektionsansätze wurden nun auf die Zellen pipettiert, deren Medium zuvor abgesaugt worden war. Nach 4 h im Brutschrank bei 7% CO<sub>2</sub> wurde 1ml Medium mit 20% FCS zu jedem Ansatz gegeben und diese weitere 20 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

### **2.6.3.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Säugerzelllinien wurden mit Expressionsplasmid der β-Galaktosidase transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, 10min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und 60min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert. Transfizierte Zellen waren blau eingefärbt.

## **2.6.4 Retroviraler Gentransfer in NIH3T3-Fibroblasten**

Zu Herstellung von stabil exprimierenden NIH3T3-Zelllinien wurden PhönixE-Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit der zu exprimierenden cDNA im retroviralen Expressionsvektor pLXSN nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen ü.N. mit 5ml Medium zum Sammeln des Virusüberstandes kultiviert und das Medium anschließend durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und ggf. bei -20°C eingefroren. Zur Infektion von NIH3T3-Fibroblasten wurden diese mit 200 000 Zellen/Schale auf 6 cm Kulturschalen ausgesät. 3ml des gesammelten Virusüberstandes der transfizierten PhönixE-Zellen oder Überstände von stabil exprimierenden GPE-Zelllinien wurden auf die NIH3T3-Zellen gebracht und die Ansätze in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei 37°C 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde dreimal 4 h lang infiziert. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden die Zellen in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgte mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-

Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, die von einem Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert wird, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen starben innerhalb weniger Tage ab.

## 2.6.5 Radioaktive Markierung von Zellen

### 2.6.5.1 Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-L-Methionin

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

### 2.6.5.2 Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung der PTPRR durch PKA über [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat-Markierung

Um die *in vivo* Phosphorylierung der PTPRR durch PKA nachzuweisen, wurden COS7-Zellen in 6-Loch-Schalen mit je 0,5µg HA-PTPRRcyto und der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der PKA (PKA<sub>C $\alpha$</sub> ) im Expressionsvektor pRK5 transient kotransfiziert. Die zellulären Phosphatgruppen wurden durch die Zugabe von 100µCi/Loch [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat zum ansonsten phosphatfreien Wachstumsmedium radioaktiv markiert (4h vor Stimulation). Vor der Lyse wurden die Zellen 30min mit 40µM Forskolin, welches die cAMP-Synthese stimuliert, in Gegenwart von 0,5M IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor, stimuliert. PTPRR wurde aus den Lysaten mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und die Phosphorylierung nach Auftrennung mit 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran über Autoradiographie sichtbar gemacht.

## 2.7 Proteinanalytische Methoden

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

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Systeme genutzt werden um eukaryontische Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gereinigt werden.

#### 2.7.1.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E.coli* XL-1 Blue-Zellen

*E.coli* XL-1 Blue-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmid-DNAs (pGEX+Insert) mit der KCM-Methode transformiert (siehe 2.5.6) und auf LB-Nährböden mit 50µg/ml Ampicillin ausplattiert. Je 1 L LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin wurde mit einer Kolonie inokuliert und die Proteinsynthese ü.N. mit 0,1mM IPTG bei RT induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5 000 G geerntet, in PBS mit 0,5mM EDTA, 1mM PMSF, 0,5mM DTT und 10,0 µg/ml Aprotinin resuspendiert und mit Ultraschall lysiert.

### 2.7.1.2 Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden die geklärten Lysate mit Triton X-100 (Endkonzentration 1% v/v) versetzt und mit 1ml Glutathion-Sepharose 16h bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert, um die Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose zu binden. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose in eine Chromatographie-säule (BioRad, München) überführt und dreimal mit 10ml kaltem PBS gewaschen. Eluiert wurde mit 10ml Elutionspuffer (15mM reduziertes Glutathion, 50mM Tris/HCl, pH 8,0) bei RT in 1ml-Fractionen. Zur Kontrolle wurden 20 µl aus allen Fractionen entnommen und mit 20 µl 3 x Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden alle Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

### 2.7.2 Triton X100-Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 lysiert. Bei dieser Lyse werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Glycerin, 5mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Unmittelbar vor der Lyse wurden 10,0 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100mM Natriumfluorid, 20mM Natriumpyrophosphat und 2mM Natriumorthovanadat (pH 10) zugegeben. Nach 5-10min auf Eis wurden die Zellysate in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (10min, 13.000 rpm, 4°C) zum Abtrennen unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett wurde der Überstand, der alle zytoplasmatischen und membranständigen Proteine enthielt, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder einer Immunpräzipitation unterzogen oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

### 2.7.3 Proteinbestimmung

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

### 2.7.4 Immunpräzipitation von Proteinen

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

Protein A und Protein G sind Membranproteine des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, die spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen binden. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-/G-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes aus Antikörper und Protein erleichtert (Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30µl Protein A-/G-Sepharose und 1-5µg monoklonaler Antikörper oder 3-10µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50mM Hepes; pH 7,5; 150mM NaCl; 10% Glycerin; 5mM EDTA; pH 8,0; 0,1% Triton X-100) versetzten Zellysaten gegeben und 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6.500 rpm

---

abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben 3min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-/G-Sepharose zu lösen.

### 2.7.5 Präzipitation von Zellysaten mit GST-Fusionsproteinen

Zusammen mit GST(Gluthathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen kann man assoziierte Bindungspartner aus Zellysaten fällen. Dabei nutzt man die Eigenschaft der GST, mit hoher Affinität an kovalent mit Sepharose gekoppeltes Glutathion zu binden.

Zur Präzipitation wurden je 30µl Protein GSH-Sepharose und 1-5 µg GST-Fusionsprotein zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50mM Hepes, pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Glycerin, 5mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zellysaten gegeben und 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6.500 rpm abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben 3min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-/G-Sepharose zu lösen.

### 2.7.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Lämmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so daß ihre Wanderung im Gel vorwiegend von ihrem Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurden im Anschluß 4%ige Sammelgele gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein:	MG (in kD):	Protein:	MG (in kD):
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
b-Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

### 2.7.7 Färben und Fixieren von Polyacrylamidgelen

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

### 2.7.8 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

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

### 2.7.9 Immundetektion (Immunblot-Analyse)

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

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1.000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Die Membran wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach viermal 15min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60-90min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte speziesspezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde die Membran erneut viermal 15min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1min in einer 1:1 Mischung aus ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

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

#### 2.7.9.1 *In vitro* Phosphatasetest

Für die *in vitro* Phosphatasetests wurden die nach Immunpräzipitation erhaltenen Präzipitate einmal mit Phosphatase-Reaktionspuffer (25mM HEPES, pH7,3; 5mM EDTA; 10mM DTT) gewaschen und mit steigenden Mengen GST PTPRR 230-632 in 20µl Phosphatase-Reaktionspuffer 15min bei RT unter konstantem Schütteln inkubiert. Als Kontrolle wurde 1,25 µg GST eingesetzt. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde nach 15min durch Zugabe von Lämmli-Puffer abgebrochen und die Präzipitate über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper immundetektiert. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurden die Proben mit Anti-ERK-Antikörper getestet.

### 2.7.9.2 Substratbindungstest von Hitzeschockproteinen

Die Bindung von Hitzeschockproteinen der HSP70-Familie an Substrate ist ATP-abhängig. In Gegenwart von ATP wird mit Hilfe von kleineren HSPen ein Kreislauf von Assoziation und Dissoziation der Substrate in Gang gesetzt, so daß einzelne Komponenten aus diesem Komplex herausgelöst werden können (Burston und Clarke, 1995; Hartl, 1991). Um zu bestimmen, ob PTPRR ein Substrat des HSC70 und GRP78 ist, wurde die Abhängigkeit der Bindung von ATP, welches HSP-Substrat-Komplexe destabilisiert, und dem nichthydrolysierbaren ATP-Analogon ATP- $\gamma$ -S, das zur Stabilisierung dieser Komplexe beiträgt, untersucht. Dazu wurden Rat-1-Lysate mit je 1  $\mu$ g GST-PTPRR 230-338 oder GST als Kontrolle gefällt und die Präzipitate in HSP-Testpuffer (5mM MgCl<sub>2</sub> in PBS) ohne ATP, mit 5mM ATP oder mit 5mM ATP- $\gamma$ -S 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit je 1ml HNTG gewaschen, über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HSC70-Antikörper analysiert. Nach Ablösen des Anti-HSC70-Antikörpers wurde mit einem Anti-GST-Antikörper getestet.

## 2.8 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

### 2.8.1 Stimulation von Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussähen auf Kulturschalen geeigneter Größe 18 bis 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Unmittelbar vor der Lyse wurden die Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G Protein-gekoppelter Rezeptoren oder anderen Substanzen stimuliert. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Immunblot analysiert.

### 2.8.2 Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläsern kultiviert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bei 4°C 30min mit 2% Formaldehyd, 0,125 M Sucrose in PBS und 10min mit 1% Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit 0,5% Saponin in PBS 10min lang permeabilisiert, einmal mit PBS gewaschen und 10min in 10mM Glycin und 0,1% Borhydrid in PBS inkubiert, um die Autofluoreszenz des Formaldehyds zu blocken. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen, 60min mit PBG (0,5%BSA, 0,045% Fisch-Gelatine und 10% Ziegen Serum in PBS) gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert und mit dem primären Antikörper (Anti-PTPRR 428) in einer Verdünnung von 1:200 in PBG ü.N. bei 4°C inkubiert. Zur Markierung der Zellkerne wurden die Zellen 15min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBG) bei 37°C angefärbt. Nichtgebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBG entfernt (30min), anschließend wurde mit dem sekundären Antikörper (FITC-konjugierter Esel anti-Kaninchen-Antikörper IgG (H+L), Dianova, Hamburg) 2h bei RT inkubiert und dreimal mit PBG, drei weitere Male mit PBS und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Deckgläser wurden mit Dasca versetzt, umgekehrt auf Objektträger gelegt und die angefärbten Zellen mit einem Zeiss-Axiovert S100 Mikroskop und der Software Openlab 2.1 analysiert.



### 2.8.3 Untersuchung der Proliferation stabil mit PTPRR infizierter NIH3T3-Zellen

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen PTPRR Konstrukte auf das Wachstum von NIH3T3 Zellen zu untersuchen, wurden 140 000 stabil mit verschiedenen PTPRR-Konstrukten infizierte Zellen/Loch auf 6-Loch Schalen ausgesät. 12h später wurde das Medium gewechselt und durch serumfreies Medium oder Medium mit 5ng/ml PDGF ersetzt. Nach 60h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Trypsinierung mit 1ml frischem Medium von den Schalen gelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counters ZM (Coulter Electronics, Krefeld) bestimmt.

### 2.8.4 Photometrische Bestimmung von lebenden Zellen (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der adhärenierten lebenden Zellen wurde die von Mosmann (1983) beschriebene Methode für Zellen des Immunsystems auf adhärenente Zellen übertragen. Der Test mißt die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms und reflektiert daher die Gesamtmenge der lebenden Zellen. Das Substrat MTT (Thiazolblau; 3-(Dimethylthiazolyl-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolbromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazolringes von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein alkohollösliches Formazanprodukt umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Zum Test wurden die adhärenierten Zellen mit einer MTT/PBS-Lösung (2,5 mg/ml) versetzt, so daß die MTT-Konzentration 0,6 mg/ml betrug, und 3h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1,5ml Isopropanol/0,04 N HCl lysiert und der Formazanfarbstoff gelöst. Die Messung des gelösten Farbstoffes erfolgte bei 570 nm ( $OD_{570}$ ) gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm ( $OD_{690}$ ).

### 2.8.5 Transkriptionsaktivierungs-Experimente (Reporter-Assay)

HEK293-Zellen wurden in 6-Loch-Schalen mit 5µg pSREwt-Luc Reporterplasmid, 50µg pCMVβGal zur Normalisierung der Ansätze und 100µg pRK5-PTPRRcyto WT, pRK5-PTPRR FL WT, pRK5-PTPRR FL CS oder Leervektor kotransfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen in Luziferase-Lysepuffer (100mM Kaliumphosphat, pH 7,8; 1mM DTT; 1% Triton X-100) lysiert und die Lysate durch Zentrifugation geklärt. Die Luziferaseaktivitätsmessungen wurden in Luziferase-Meßpuffer (25mM Glyzylglyzin, pH 7,8; 15mM MgSO<sub>4</sub>; 5mM ATP mit 15µg D(-) Luziferin pro Probe) und die β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen wurden mit dem Galacton/Emerald-System (Applied Biosystems, Foster City, USA) in einem MicromatPlus Luminometer (Berthold Technologie GmbH, Bad Wildbach) durchgeführt. Die Luziferaseaktivitäten wurden mit den β-Galaktosidaseaktivitäten normalisiert.

### 2.8.6 Migrationstest

Die Zellen wurden auf 6-cm-Schalen mit je 300 000 Zellen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe einer Rasierklinge von einer geraden Linie ausgehend von den Schalen abgelöst, zweimal mit Medium gewaschen und mit DME-Medium mit 4% FCS bedeckt. 24h nach dem Ablösen wurde die Wanderung der Zellen in den freigelegten Bereich mit Hilfe eines Axiovert S100 Mikroskops der Firma Zeiss und Videoauswertung mit der Software OpenLab 2.1 dokumentiert.

### **2.8.7 Focusbildungstest**

Stabil infizierte NIH3T3-Fibroblasten wurden mit 275 000 Zellen pro Schale auf 6cm-Schalen ausgesät und mit den von den GPE-Zellen sezernierten retroviralen Überständen mit v-Ki-Ras, Her2, v-ErbB und v-Fms infiziert (siehe 2.6.4). Das DME-Medium mit 4% FCS wurde alle 2 Tage ausgetauscht. Nach 10 Tagen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Kristallviolett-Färbelösung (0,5% Kristallviolett in 20%Methanol) fixiert und angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Foci per Hand ausgezählt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Verbreitung und Vorkommen

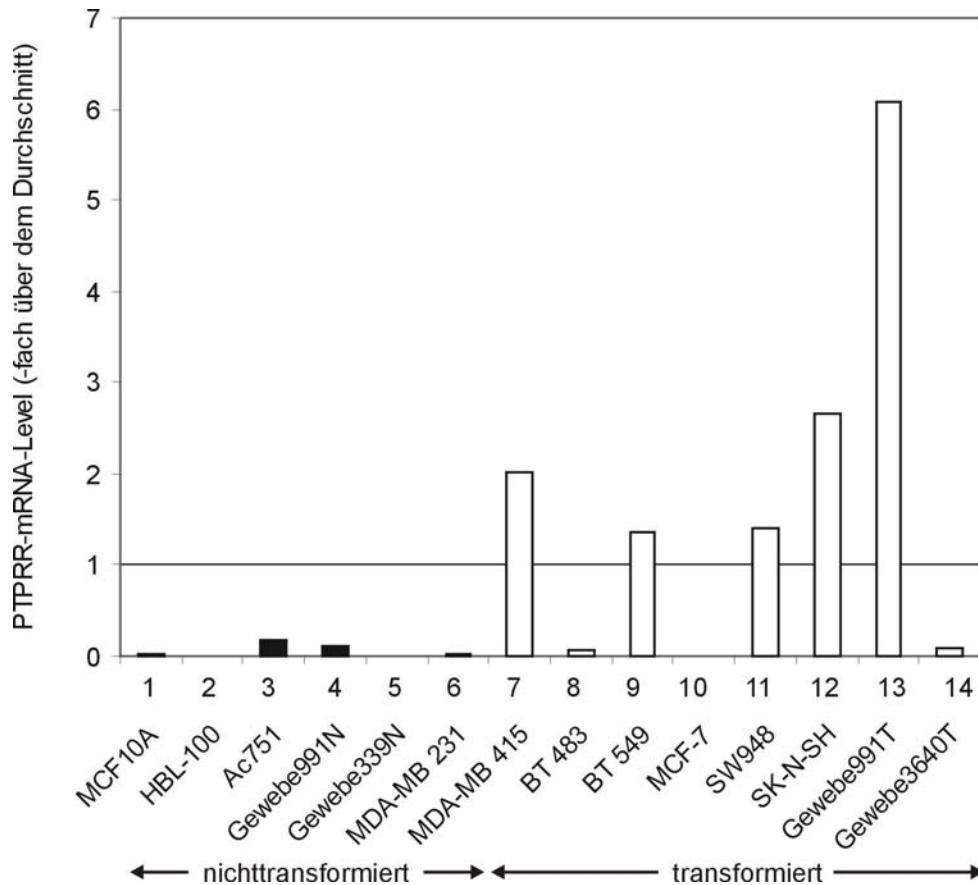
#### 3.1.1 Expressionsmuster der PTPRR in verschiedenen Zelllinien und Geweben

Zu Beginn dieser Arbeit lagen Daten zur Expression der PTPRR auf mRNA-Ebene aus Geweben der Maus vor, die ein Vorkommen der PTPRR überwiegend in neuronalen Zellen zeigten, sowie auf Proteinebene aus PC-12-Zellen und *in vitro* Translationsexperimenten (Shiozuka *et al*, 1995; Sharma und Lombroso, 1995; Ogata *et al*, 1995; Hendriks *et al*, 1995). Zum Vorkommen der PTPRR in humanen Zellen gab es erste Hinweise aus mRNA-Präparationen verschiedener Tumorzelllinien (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Um Einsicht in die Bedeutung der hPTPRR bei der Tumorentstehung zu erlangen, wurde aufbauend auf diese ersten Daten die Expression der PTPRR sowohl in Tumorzelllinien und verschiedenen Tumorgeweben als auch in nichttransformierten Zelllinien und Geweben auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht.

##### 3.1.1.1 Expression der PTPRR auf mRNA-Ebene

Zur Untersuchung der Bedeutung der hPTPRR bei der Tumorentstehung wurde das Expressionsniveau der hPTPRR in Zelllinien aus nichttransformierten Geweben mit dem in Tumorzelllinien sowie der Expressionslevel in Tumorgeweben mit dem im umgebenden, gesunden Gewebe verglichen. Als Nachweismethode wurde RT-PCR (Reverse-Transkription/Polymerase-Kettenreaktion) mit anschließender Quantifizierung des Produktes über Fluoreszenzmessung in einem LightCycler gewählt, da diese Technik eine exakte Quantifizierung der mRNA-Menge ermöglicht und über einen besonders großen dynamischen Bereich verfügt. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Nachweisempfindlichkeit, da die absoluten Transkriptmengen vieler PTPasen sehr gering sind und aus den Tumorproben nur geringe mRNA-Mengen zur Verfügung standen. Für die Amplifikation der cDNA wurden zwei Primer eingesetzt, welche die katalytische Domäne der humanen PTPRR flankieren, die in sechs von sieben aus RT-PCR-Experimenten bekannten Isoformen vorkommt, und sich über mehrere Exons erstreckt (Augustine *et al*, 2000; GenBank-Nummer NM\_002849). Die Messungen wurden mit der mRNA des konstitutiv exprimierte „Haushaltsgen“ Zyklophilin A

normalisiert (Hager *et al.*, 1999; Traish *et al.*, 2000). Die Detektion des PCR-Produktes erfolgte über die Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffes, der bei Anlagerung an doppelsträngige DNA seine Fluoreszenzeigenschaften verändert.



**Abb. 4: Expression der hPTPRR-mRNA in Zelllinien, Tumorzelllinien, gesundem Gewebe und Tumorgewebe**

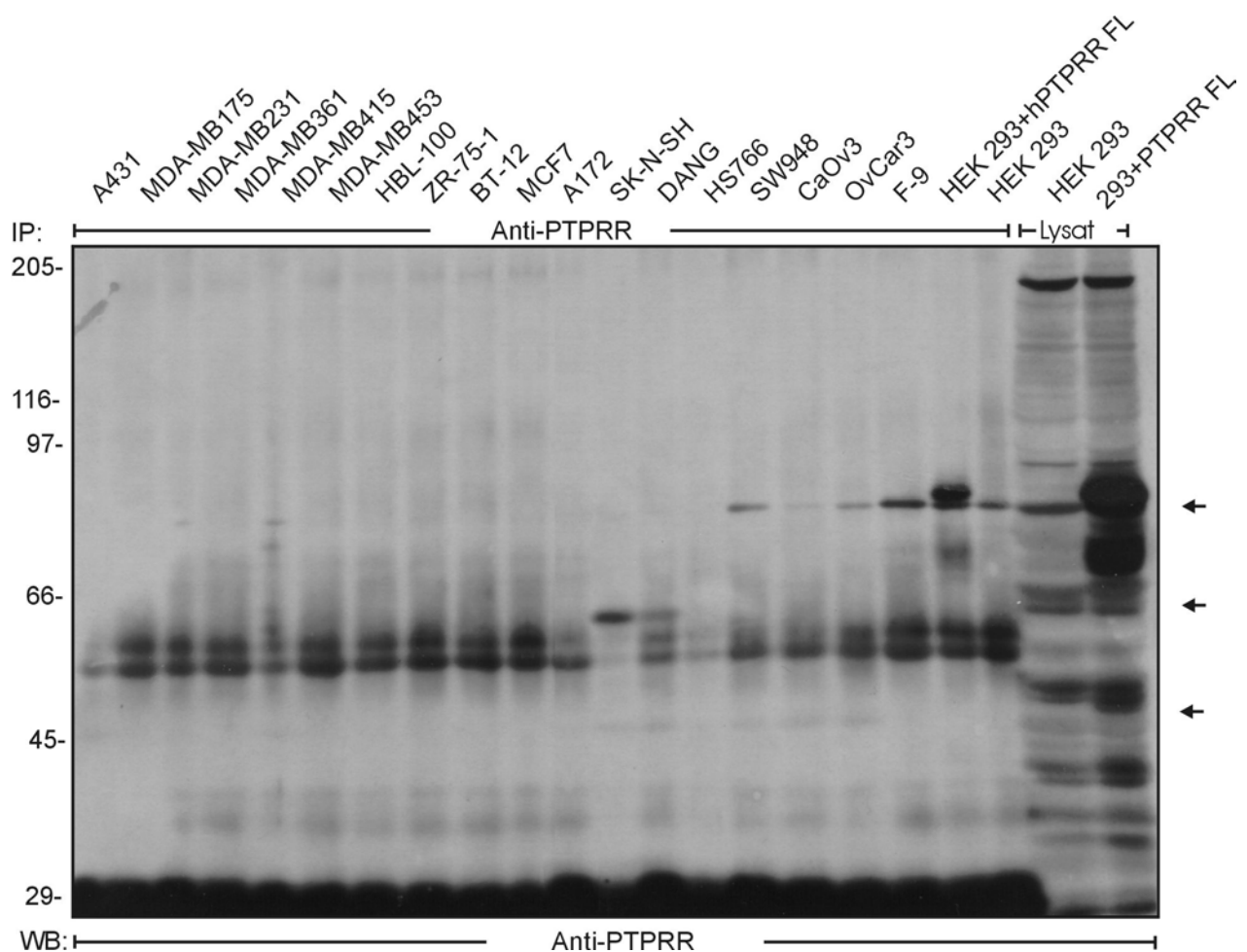
Zytoplasmatische gesamt-RNA wurde präpariert, mit DNaseI verdaut, um Meßfehler bei der RT-PCR durch Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, und mit Reverser Transkriptase in cDNA übersetzt. Je 0,2 µl cDNA (entspricht 150ng gesamt-RNA) aus den RT-Ansätzen wurden in der Amplifikationsreaktion eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte über das „Haushaltsgen“ Zyklophilin A. Im Diagramm ist das Verhältnis der normalisierten Expression der hPTPRR in den getesteten Zelllinien und Gewebeproben zum Durchschnitt wiedergegeben. Nichttransformierte Zelllinien und Gewebe sind schwarz hervorgehoben, transformierte weiß. 1-3 sind nichttransformierte Zelllinien, 7-12 transformierte Zelllinien, 4 und 13 bzw. 5 und 14 sind Paare aus gesundem Gewebe und Tumorgewebe von jeweils demselben Patienten. 1: MCF 10A, 2: HBL-100, 3: AC751, 4: Gewebe 991N, 5: Gewebe 339N, 6: MDA-MB-231; 7: MDA-MB-415; 8: BT483, 9: BT549, 10: MCF-7, 11:SW948, 12: SK-N-SH, 13: Gewebe 991T, 14: Gewebe 3640T.

Dabei konnte gezeigt werden, daß das Vorkommen der hPTPRR-mRNA in Tumorzelllinien im Durchschnitt deutlich über dem Vorkommen in Zellen aus nichttransformiertem Gewebe

liegt (Abb. 4, 1-3 und 6-12). Ähnlich verhält es sich in den cDNA-Paaren aus Tumorgewebe und umgebenden gesunden Gewebe: Im Tumorgewebe ist die Expression gegenüber dem gesunden Gewebe erhöht (Abb. 4, 4+5 und 13+14).

### 3.1.1.2 Expression der PTPRR auf Proteinebene

In verschiedenen Tumorzelllinien war vor Beginn dieser Arbeit über Northern-Blots ein komplexes Muster aus Transkripten der PTPRR unterschiedlicher Länge nachgewiesen worden, was ein Hinweis auf die potentielle Existenz verschiedener Isoformen der PTPRR war (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Um diese Daten zu überprüfen und das



**Abb. 5: Expression der hPTPRR in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene**

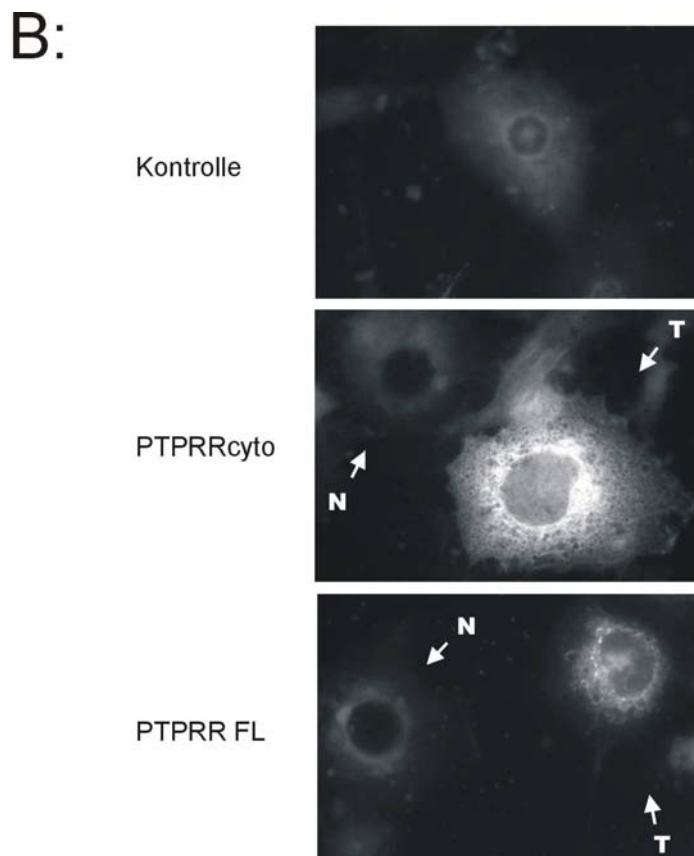
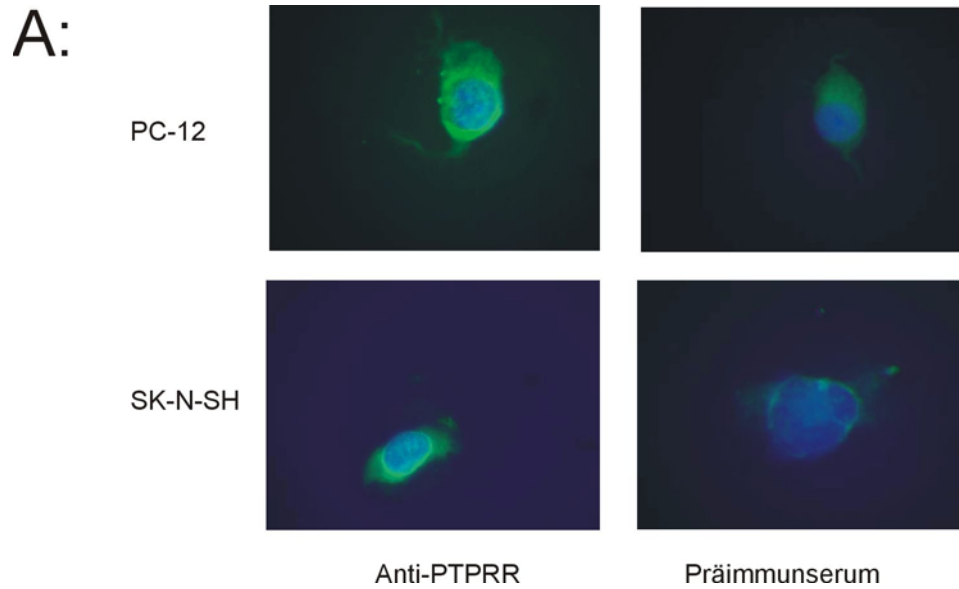
Je 1mg Lysat wurde mit 0,5 $\mu$ g Anti-PTPRR(BR7.2)-Antikörper immunpräzipitiert, über 7,5-12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit einem Anti-PTPRR(ECPTP)-Antikörper auf Expression der hPTPRR getestet. Als Positivkontrolle wurden HEK293-Zellen mit hPTPRR transfiziert und mit Anti-BR7.2-Antikörper immunpräzipitiert bzw. diese Lysate unbehandelt zusammen mit den übrigen Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Die vom Antikörper erkannten Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Molekulargewicht ist am linken Rand in kDa eingezeichnet.

Vorkommen möglicher Isoformen der PTPRR nachzuweisen, wurde die Expression der PTPRR auf Proteinebene in einer Reihe humaner Zelllinien untersucht. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper für die Immunpräzipitation verwendet, der gegen die zytoplasmatische Domäne der PTPRR aus der Ratte generiert worden war und dessen Affinität zur humanen Form vor Beginn der Experimente getestet wurde (Daten nicht gezeigt). Bei der Immundetektion der Banden der hPTPRR wurde zur Unterdrückung unspezifischer Signale ein anderer, polyklonaler Antikörper, Anti-ECPTP, eingesetzt, der gegen die zytoplasmatische Domäne der humanen PTPRR gerichtet ist. Dabei wurde in Lysaten aus MDA-MB-231-, MDA-MB-415-, SW948-, CaOv3-, OvCar3-, F-9- und HEK293-Zellen eine Bande bei 75kDa detektiert, deren Größe dem theoretischen Molekulargewicht der längsten aus RT-PCR-Experimenten bekannten Spleißform entspricht (Augustine *et al*, 2000). Weitere Banden wurden in Lysaten von MDA-MB-415-Zellen bei 71kDa und in Lysaten von SK-N-SH- und DANG-Zellen bei 64kDa nachgewiesen. Zudem erkannte der Antikörper in MDA-MB-415-, SK-N-SH-, DANG-, SW948-, CaOv3- und OvCar3-Lysaten eine Bande bei 46kDa (Abb. 5).

### 3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation

Die subzelluläre Lokalisation an der Signaltransduktion beteiligter Moleküle ist oft wichtig für deren Funktion. Um die zelluläre Verteilung der PTPRR zu bestimmen, wurden PTPRR exprimierende Zellen über Immunfluoreszenz analysiert. Dazu wurden die Zellen fixiert, ihre Membran permeabilisiert und PTPRR mit Anti-PTP-SL-Antikörper markiert. Die Verteilung der PTPRR-Antikörperkomplexe innerhalb der Zellen wurde mit einem sekundären Antikörper sichtbar gemacht, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Für die Bestimmung der Lokalisation der endogenen PTPRR wurden PC-12-, SK-N-SH- und SW948-Zellen verwendet, von denen bekannt war, daß sie PTPRR exprimieren (3.1.1 und Shiozuka *et al*, 1995). Um die verschiedenen Isoformen zu unterscheiden, wurden COS7-Zellen transient mit den durch alternatives Spleißen erzeugten Isoformen PTPRR<sub>cyto</sub> und PTPRR<sub>TM</sub> transfiziert, bevor diese über Immunfluoreszenz analysiert wurden. Bei PC-12, SK-N-SH- und SW948-Zellen ist die PTPRR ausschließlich im Zytoplasma, nicht jedoch im Zellkern lokalisiert; bei PC-12- und SK-N-SH- Zellen sieht man eine verstärkte Lokalisation in der perinukleären Region (Abb. 6A). In COS7-Zellen wird die PTPRR<sub>cyto</sub>-Isoform im gesamten Zytoplasma in einer Zytoskelett-ähnlichen Strukturierung exprimiert. PTPRR<sub>TM</sub> kommt hauptsächlich in der perinukleären Region mit Konzentrationen an diskreten Punkten

vor. Bei beiden Isoformen konnte keine Expression im Kern nachgewiesen werden (Abb. 6B). Das Vorhandensein der PTPRR in den Zellysaten wurde im Western-Blot bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 6: Lokalisation der PTPRR in Zellen mit endogener und exogener Expression**

**A:** PC-12- (obere Felder), SK-N-SH- (mittlere Felder) und SW948-Zellen (untere Felder) wurden auf Deckgläsern fixiert, permeabilisiert und mit Anti-PTP-SL-Antiserum (linke Felder) bzw. Präimmunserum (rechte Felder) inkubiert. Der Anti-PTP-SL-Antikörper wurde mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper sichtbar gemacht, an den der grün fluoreszierende Farbstoff FITC gekoppelt war. Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Bisbenzimid gegengefärbt. **B:** COS7-Zellen wurden mit dem Leervektor (oberes Feld), PTPRRcyto (mittleres Feld) oder PTPRR TM (unteres Feld) im Expressionsvektor pRK5 transient transfiziert, auf Deckgläsern fixiert und permeabilisiert und mit Anti-PTP-SL-Antiserum inkubiert. Der Anti-PTP-SL-Antikörper wurde mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit dem FITC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, sichtbar gemacht. T = transfizierte Zelle, N = nichttransfizierte Zelle.

## 3.2 Assoziierte Proteine und Substrate

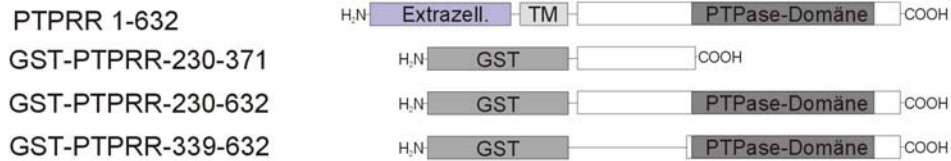
Ziel der folgenden Experimente war, mögliche Bindungspartner und Substrate der PTPRR zu identifizieren.

### 3.2.1 Proteine mit 42-44 und 70-78 kDa assoziieren mit PTPRR *in vitro*

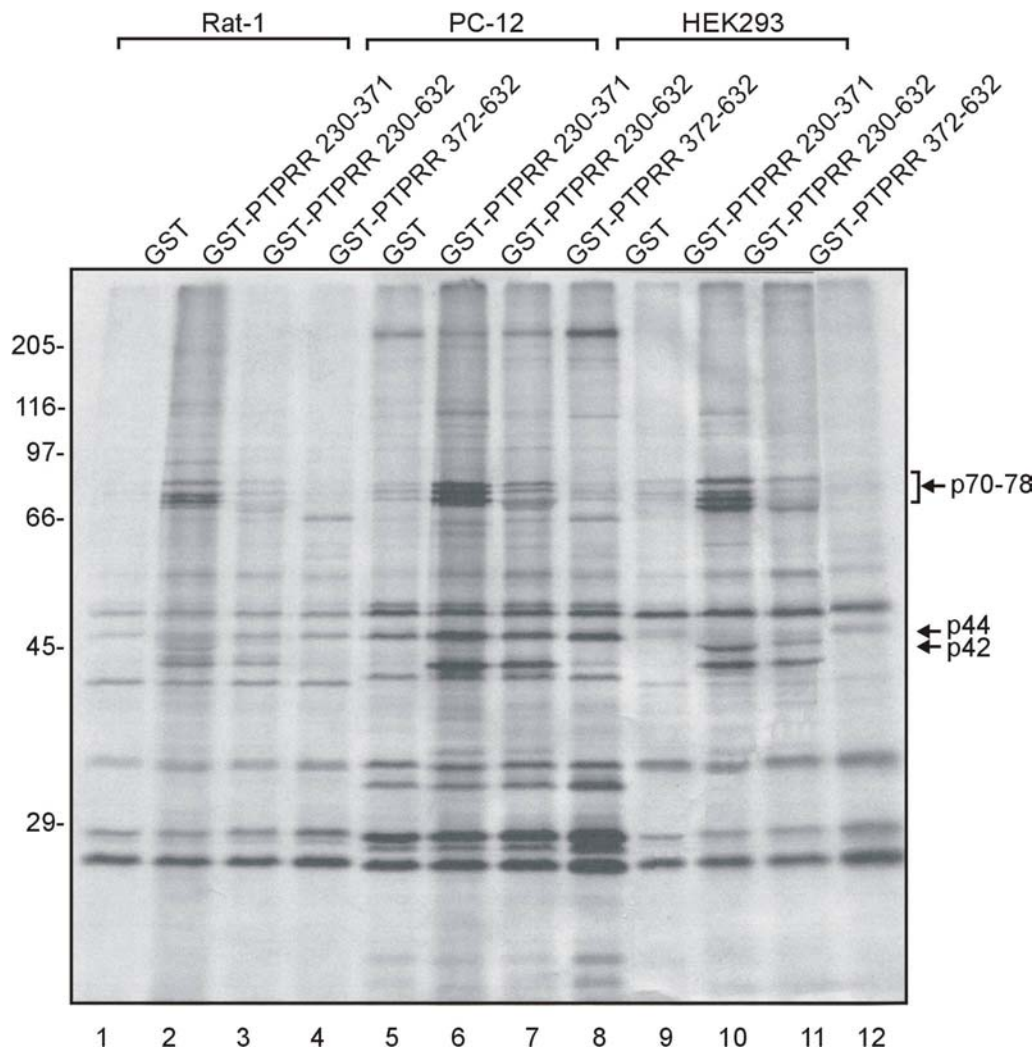
Um Proteine zu finden, die mit PTPRR *in vitro* assoziieren, wurden GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine mit der gesamten zytoplasmatischen Region der mPTPRR oder mit Teilbereichen davon als Affinitätsreagenzien verwendet. Rat-1-Fibroblasten wurden in mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Lysate wurden mit GST-mPTPRR 230-371, GST-mPTPRR 230-632, GST-mPTPRR 372-632 [die Numerierung der Aminosäuren entspricht der von Ogata *et al.*, 1995], oder GST präzipitiert, die Präzipitate in einem 7,5-12,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und über Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 7B, Spuren 1-4). Von denjenigen GST-Fusionsproteinen, welche die Juxtamembranregion der PTPRR enthalten (GST-mPTPRR 230-371 und GST-mPTPRR 230-632) wurden zwei Proteingruppen mit 70-78 kDa und 42-44 kDa gefällt (Abb. 7B, Spuren 2 und 3), nicht jedoch von GST alleine oder von einem GST-Fusionsprotein mit der katalytischen Domäne [GST-mPTPRR 372-632] (Abb. 7B, Spuren 1 und 4). Ähnliche Resultate wurden auch mit der Pheochromocytoma-Zelllinie PC-12 aus der Ratte und der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 erzielt (Abb. 7B, Spuren 5-12), was darauf schließen lässt, daß die Expression der mit den GST-PTPRR-Fusionsproteinen assoziierten Proteine eine weite Verbreitung aufweist.



A:

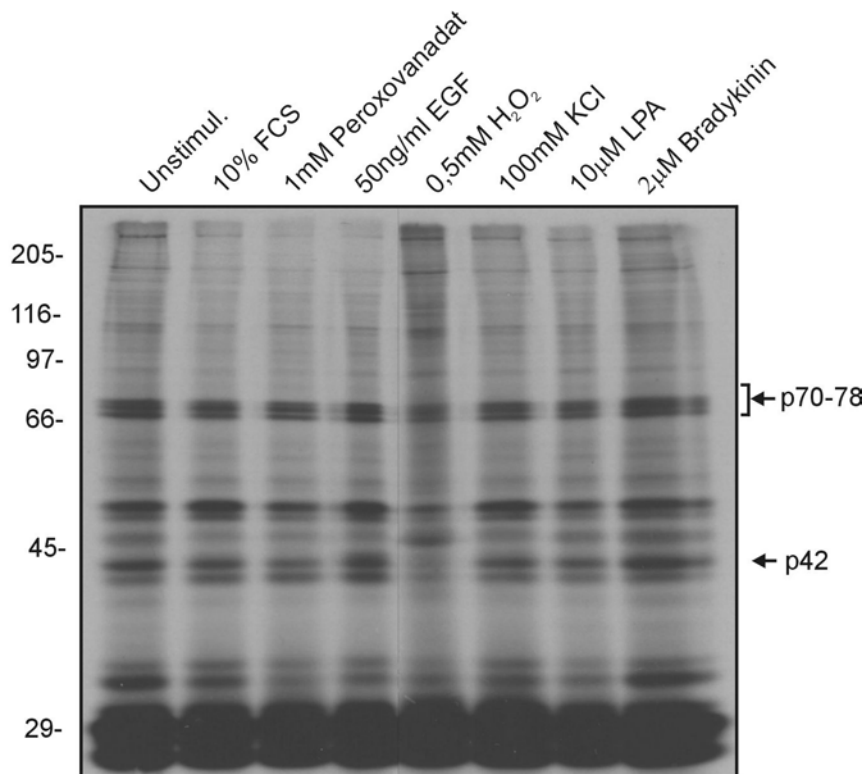


B:



**Abb. 7: Fällung von [<sup>35</sup>S]Methionin-markierten Zellysaten mit GST-mPTPRR-Fusionsproteinen**

**A:** Die zur Fällung eingesetzten GST-PTPRR-Fusionsproteine **B:** PC-12, Rat-1 und HEK293-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert und lysiert. Die Lysate wurden mit je 1 µg der verschiedenen GST-Fusionsproteine auf Gluthation-Sepharose gefällt, die gewaschenen Präzipitate auf einem 8-12%igen SDS-PA-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie nachgewiesen. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet.



**Abb. 8: Fällung von [<sup>35</sup>S]Methionin-markierten PC-12-Lysaten mit GST-mPTPRR 230-632 nach Stimulation mit FCS, Peroxovanadat, EGF, Sorbit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KCl, LPA oder Bradykinin**

PC-12-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. Vor der Lyse wurden die Zellen 10 min mit 10% FCS, 10 min mit 1mM Peroxovanadat, 5 min mit 50ng/ml EGF, 5 min mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 min mit 100mM KCl, 10 min mit 10µM LPA oder 10 min mit 2µM Bradykinin stimuliert. Die Lysate wurden mit je 1 µg GST-mPTPRR 230-632 gefällt. Die gewaschenen Präzipitate wurden auf einem 8-12%igen SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie nachgewiesen. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet.

Die Wechselwirkungen zwischen Molekülen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, werden häufig durch externe Stimuli reguliert. Um weitere mögliche Bindungspartner der PTPRR zu finden und Hinweise auf die Regulation der Wechselwirkung der p42-44 und p70-78 Proteine mit PTPRR zu erhalten, wurden [<sup>35</sup>S]Methionin-markierte PC-12 Zellen vor der Lyse mit Peroxovanadat, EGF (Epidermal Growth Factor), FCS (Fetal calf serum), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KCl, LPA (Lysophosphatidylsäure) oder Bradykinin stimuliert, welche eine breite Reihe verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege aktivieren. Die Lysate wurden mit dem zytoplasmatischen Fusionsprotein der PTPRR (GST-mPTPRR 230-632) präzipitiert, die Präzipitate auf einem 8-12%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und über Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 8). Das Bandenmuster lässt sich durch Stimulation kaum beeinflussen;

lediglich nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nimmt die Assoziation der p44-Bande an GST-mPTPRR 230-632 ab und eine Bande bei 49kDa wird verstärkt. Dies macht eine konstitutive Assoziation der p42-44 und p70-78 Proteine mit GST-PTPRR wahrscheinlich.

### 3.2.2 Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 sind Substrate der PTPRR

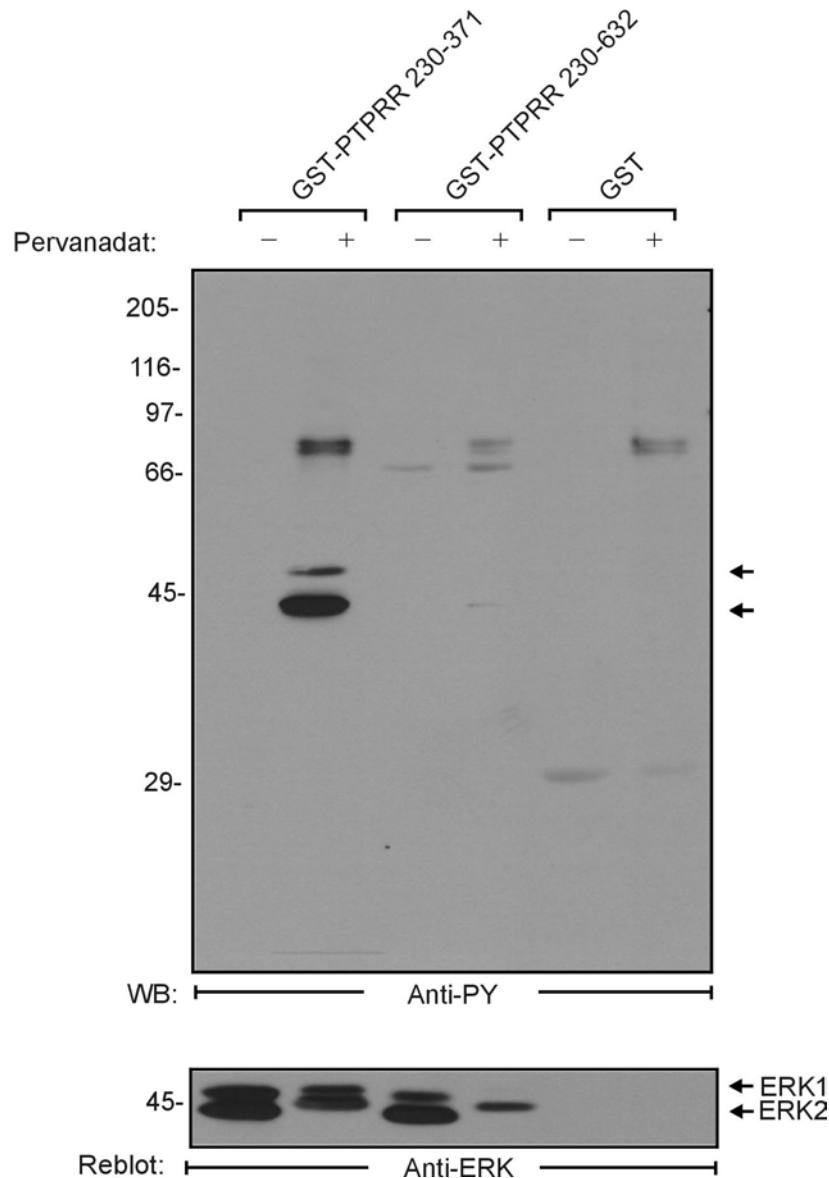
#### 3.2.2.1 Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 binden an PTPRR *in vitro*

Die Substrate der PTPasen können, ebenso wie viele andere Bindungspartner, tyrosinphosphoryliert werden. Um die mit GST-PTPRR assoziierten Proteine weiter zu charakterisieren, wurden diese auf ihr Potential untersucht, tyrosinphosphoryliert zu werden. Dazu wurden die Zellen vor der Lyse 15 min mit Pervanadat stimuliert, welches PTPasen inhibiert und zu einem starken Anstieg der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine führt. Anschließend wurden die Lysate wie in 3.2.1 beschrieben mit GST-PTPRR 230-371, GST-PTPRR 230-632 oder GST als Kontrolle gefällt, die Präzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembran auf ihren Phosphotyrosingehalt getestet. Dabei wurde mit GST-PTP 230-371 eine Doppelbande tyrosinphosphorylierter Proteine von 44 und 46 kDa präzipitiert (Abb. 9 oben). Mit GST-PTPRR 230-632 konnten dieselben Banden mit wesentlich schwächerer Intensität präzipitiert werden (Bande mit 46 kDa nach längerer Exposition sichtbar; Daten nicht gezeigt), was vermutlich nicht nur an einer schwächeren Bindung, sondern auch an einer partiellen Dephosphorylierung durch die Phosphataseaktivität der GST-PTPRR 230-632 trotz Gegenwart von Inhibitoren im Lysepuffer liegt. Durch Phosphorylierung wird die Mobilität der Proteine in der SDS-PAGE in der Regel geringfügig vermindert, so daß ein scheinbar höheres Molekulargewicht detektiert wird. Aufgrund dieses Effektes wurde davon ausgegangen daß die Größen der tyrosinphosphorylierten Banden von 44 und 46 kDa identisch waren mit denen der Banden p42-44 aus den [<sup>35</sup>S]Methionin-markierten Zellysaten.

Die Tyrosinphosphorylierung der Proteine p42-44 und ihr Auftreten als Doppelbande mit Größen von 42 und 44 kDa gaben Anlaß zur Vermutung, daß es sich bei diesen Proteinen um die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 handelt. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die beiden Banden bei 42 und 44kDa Immunreaktivität mit Anti-ERK-Antikörpern zeigten (Abb. 9 unten).

Um die für die Wechselwirkung mit ERK verantwortlichen Regionen der PTPRR zu untersuchen, wurden GST-Fusionsproteine mit verschiedenen Regionen der zytoplasmatischen Domäne der mPTPRR in *in vitro*-Fällungsexperimenten mit PC-12-

Lysaten eingesetzt [GST-mPTPRR 230-632, GST-mPTPRR 230-338, GST-mPTPRR 230-371 und GST-mPTPRR 339-632] sowie GST-Fusionsproteine der zur selben PTPase-Familie gehörenden STEP (Striatum-enriched Protein-Tyrosine-Phosphatase) [GST-STEP 128-497



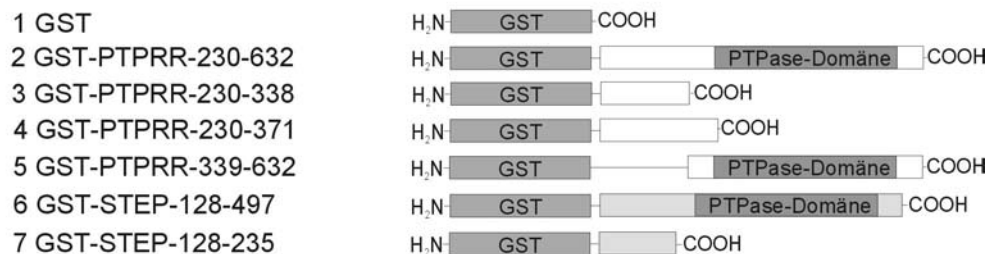
**Abb. 9: Bindung tyrosinphosphorylierter Proteine an rekombinante PTPRR**

Serum-gehungerte DANG-Zellen wurden 15 min vor der Lyse mit 1 mM Pervanadat stimuliert und die Lysate mit je 1  $\mu$ g GST-PTPRR 230-371, GST-PTPRR 230-632 oder GST als Kontrolle gefällt. Die gewaschenen Präzipitate wurden auf einem 10%igen SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und assoziierte tyrosinphosphorylierte Proteine mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper markiert (oben). Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde die Expression von ERK mit einem Anti-ERK-Antikörper bestätigt. Die tyrosinphosphorylierten Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet.

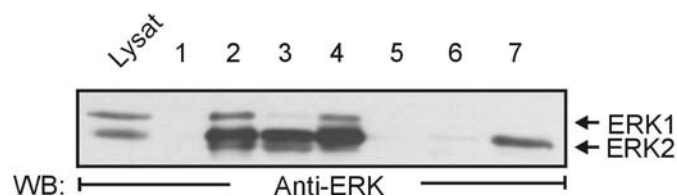
und GST-STEP 128-235; Nummerierung nach Lombroso, Isoform STEP56, GenBank-Nummer g915382, Abb. 10]. Alle GST-Fusionsproteine der PTPRR, welche die Juxtamembrandomäne enthielten, waren in der Lage, ERK1/2 zu binden, ebenso beide

Fusionsproteine der STEP (Abb. 10B, Spur 2-4 und 7). Die GST-Kontrolle und Fusionsproteine mit der katalytischen Domäne der PTPRR alleine zeigten keine Wechselwirkung mit ERK. Die für die Bindung an ERK verantwortlichen Aminosäuren lagen bei PTPRR in der Region von Aminosäure 230 bis 338 und bei STEP im Bereich von Aminosäure 128 bis 235. Ein Sequenzvergleich dieser beiden Regionen ergab eine konservierte Sequenz von 16 Aminosäuren in den Positionen 314-329 der PTPRR bzw. 216-231 der STEP (Abb. 11A). Um zu überprüfen, ob diese konservierte Sequenz für die Bindung der ERK notwendig ist, wurde die Auswirkung der Deletion dieser 16 Aminosäuren auf die *in vitro* Bindung der ERK an ein GST-Fusionsprotein mit der Juxtamembranregion der PTPRR untersucht. Hierzu wurden Zellysate mit GST, GST-mPTPRR 230-371 oder GST-mPTPRR 230-371 $\Delta$ 314-329 gefällt und die Präzipitate auf die Anwesenheit der ERK getestet (Abb. 11B). Die Deletion dieser Aminosäuren führt zu einem Verlust der Bindung der ERK1/2 an PTPRR. Daraus folgt, daß die Sequenz der PTPRR von Aminosäure 314 bis 329 ein Motiv ist, welches die Wechselwirkung mit ERK vermittelt. Im Folgenden wird dieses Motiv KIM (Kinase-Interaktions-Motiv) genannt.

**A:**



**B:**



**Abb. 10: ERK 1,2 bindet *in vitro* an die Juxtamembrandomäne der PTPRR und STEP**

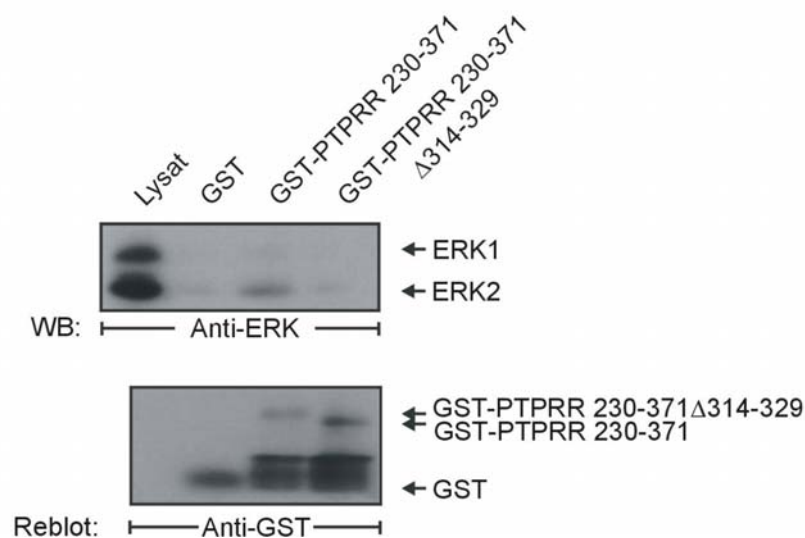
**A:** Darstellung der zur Fällung eingesetzten GST-PTPRR- und GST-STEP-Fusionsproteine **B:** Je 500 $\mu$ g PC-12-Totallysat wurde mit 1 $\mu$ g GST, GST-mPTPRR 230-632, GST-mPTPRR 230-338, GST-mPTPRR 230-371, GST-mPTPRR 339-632, GST-STEP 128-497 oder GST-STEP 128-235 gefällt. Nach 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran wurden eine Immunblotanalyse mit Anti-ERK C-14-Antikörper durchgeführt.

A:

PTPRR: 230 MIIYRLKERLQLSLRQDKEKNQEIHLSPFIARQQAQSEAKTTHSMVQPDQAF  
 STEP56:132 TVSLVIVTTLVWHLKAPPEPPAPLPEDRRQSVSRQPSFTYSEWMEEKVE

KVLNVVVDPQGQCTPEIRNSTSTSVCPSPFRMKPIGLQERRGNSVSLTLDMSLGSVE 334  
 DDFLDLDAVPETPVFDCVMDIKPETDPASLTVKSMGLQERRGNSVSLTLDMCTPGCNE 236

B:



**Abb. 11: Ein Motiv in der Juxtamembrandomäne der PTPRR vermittelt die Wechselwirkung mit ERK**

**A:** Sequenzvergleich zwischen der Region von Aminosäure 230-338 der PTPRR und Aminosäure 128-235 der STEP. Die homologen Bereiche sind durch einen Rahmen hervorgehoben. **B:** Je 500µg PC-12-Totallysat wurde mit 1µg GST, GST-mPTPRR 230-371 oder GST-mPTPRR 230-371Δ314-329 gefällt. Nach 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran wurde eine Immunblotanalyse mit Anti-ERK-Antikörper durchgeführt.

### 3.2.2.2 ERK1/2 ist ein Substrat der PTPRR *in vitro* und *in vivo*

In den folgenden Experimenten wurde die *in vivo* Assoziation zwischen ERK und PTPRR in intakten Zellen bestätigt und weiter untersucht.

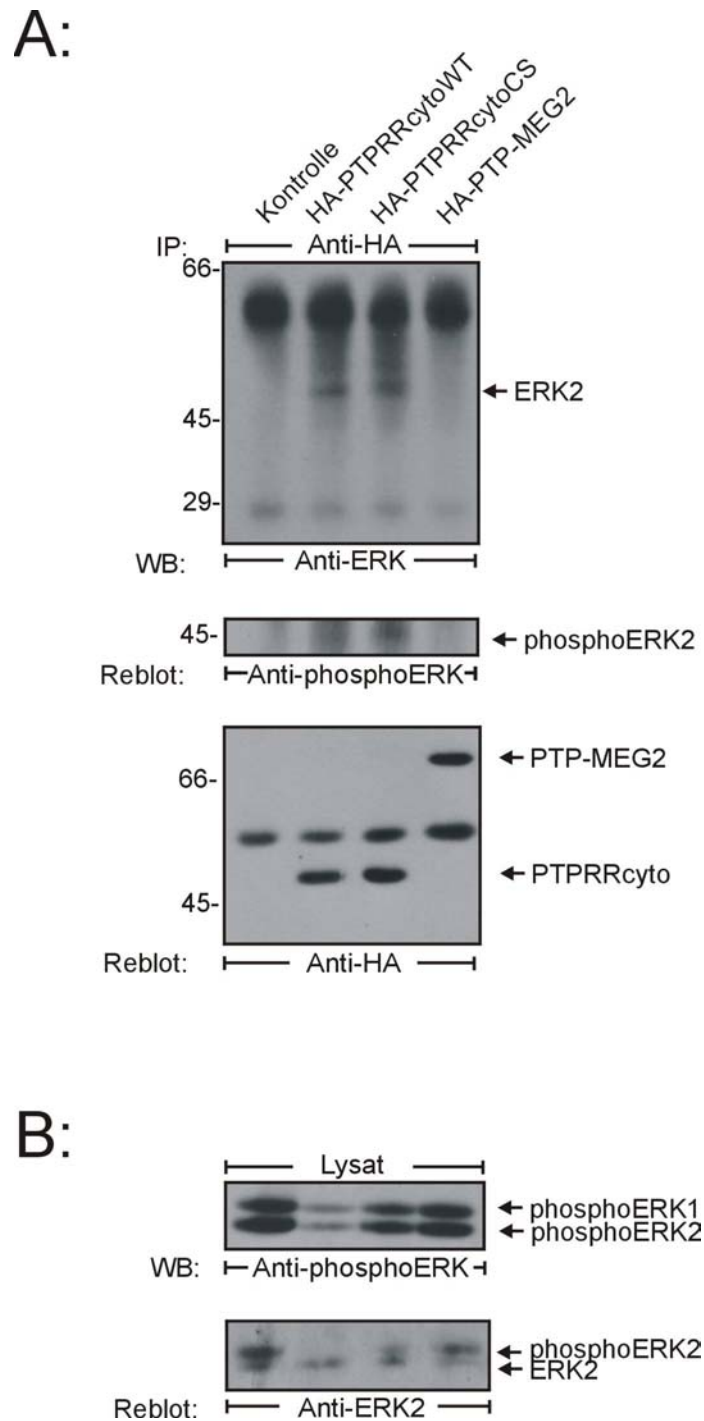
Hierzu wurde PTPRR überexprimiert, da die Menge der endogenen Phosphatase sehr gering ist (3.1.1.2 und 3.1.1.1.). Als Expressionssystem wurden die gut transfizierbaren HEK293-Zellen verwendet. Dafür wurden Konstrukte der PTPRR verwendet, denen mittels PCR eine Basensequenz angefügt worden war, welche für ein aminoterminales Hämagglutinin(Ha)-Epitop codiert. Die Präzipitation der PTPRR über das HA-Epitop sollte verhindern, daß der

Anti-PTPRR-Antikörper bei der Immunpräzipitation Regionen blockiert, die für die Wechselwirkung mit ERK verantwortlich sind. Zudem ermöglichte die Verwendung von HA-Markierungen den Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen in diesem Experiment eingesetzten Phosphatasen.

Neben dem Wildtyp der PTPRRcyto wurde auch eine Cystein563→Serin-Mutante verwendet, bei der das Cystein des Signatur-Motives des katalytischen Zentrums der Phosphatasedomäne [HCSAGIGRT, nach dem Konsensus-Motiv (H/V)C(X5)R(S/T); Zhang, 1998] gegen Serin ausgetauscht worden war. Eine solche Mutation verhindert die Ausbildung des Phosphorylcystein-Intermediats (Guan und Dixon, 1991; siehe Einleitung) und hat katalytische Inaktivität zur Folge.

HEK293-Zellen wurden mit dem HA-fusionierten Wildtyp der cytoplasmatischen mPTPRR (HA-mPTPRRcytoWT) oder einer HA-fusionierten C536S-Mutante der cytoplasmatischen mPTPRR (HA-mPTPRRcytoCS) und zur Kontrolle mit dem Leervektor oder der nichtverwandten zytoplasmatischen HA-fusionierten PTPase MEG2 (HA-MEG2) transfiziert. Nach der Lyse wurde mit Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und mit Anti-ERK1/2-Antiserum auf Assoziation der ERK getestet. PTPRRcytoWT und PTPRRcytoCS sind in der Lage, ERK2 zu binden, nicht jedoch MEG2 (Abb. 12A, Spur1 und 2). Eine Immundetektion mit einem Anti-HA-Antikörper bestätigte eine vergleichbare Expression der Phosphatasen.

Da PTPRR ERK1/2 bindet und ERK tyrosinphosphoryliert werden kann (Boulton *et al*, 1991), lag die Vermutung nahe, daß es sich bei ERK1/2 um ein Substrat der PTPRR handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 in den Lysaten der mit HA-mPTPRRcytoWT, HA-mPTPRRcytoCS oder HA-MEG2 transfizierten HEK293 Zellen untersucht (Abb. 12B). Sowohl die Analyse mit einem phosphoERK-Antikörper als auch die durch die Phosphorylierung bedingte Verschiebung der Banden im ERK-Immunblot zeigten, daß die Expression der PTPRRcytoWT die Phosphorylierung der ERK1/2 im Vergleich zur Leervektorkontrolle verringert (Abb. 12B, Spur 1 und2). Die CS-Mutante der PTPRR hat einen geringeren Effekt und die nichtverwandte PTPase MEG2 zeigt keine Wirkung (Abb. 12B, Spur 3 und 4). Es wurde somit gezeigt, daß bei Überexpression

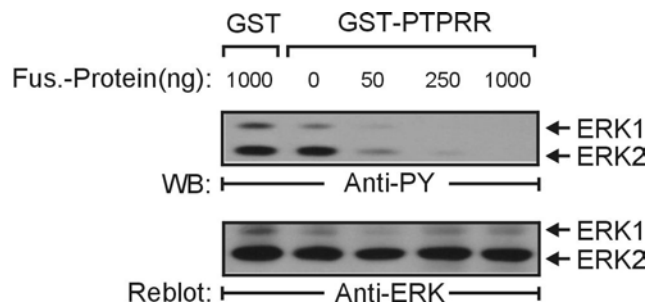


**Abb. 12: PTPRR bindet in intakten Zellen ERK1/2 und verringert deren Phosphorylierung**

HEK293-Zellen wurden mit je 0,5  $\mu$ g pRK5 Leervektor, HA-mPTPRRcytoWT, HA-mPTPRRcytoCS oder HA-MEG2 (alle im Expressionsvektor pRK5) transfiziert und nach 24h lysiert. **A:** 250  $\mu$ g Lysat wurden mit je 0,5  $\mu$ l Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Nach Auftrennung mit 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran wurde eine Immunblotanalyse mit Anti-ERK-Antikörper durchgeführt. Nach Ablösen des Anti-ERK-Antikörpers wurde mit Anti-phosphoERK-Antikörper getestet, danach wurde dieser Anti-phosphoERK-Antikörper wieder abgelöst und zur Expressionskontrolle wurde mit Anti-HA-Antikörper getestet. **B:** 30  $\mu$ g Lysat wurden mit 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-phosphoERK-Antikörper auf ERK-Phosphorylierung getestet. Nach Ablösen des Anti-phosphoERK-Antikörpers wurde mit Anti-ERK-Antikörper getestet.



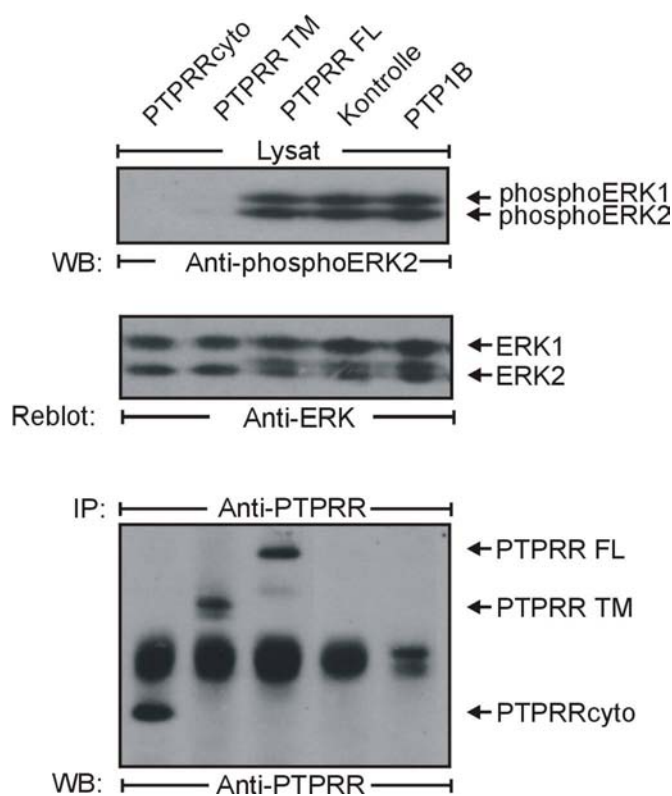
PTPRR spezifisch zu einer Verringerung der Phosphorylierung der ERK1/2 führt. Um zu bestätigen, daß die Verringerung der Phosphorylierung von ERK1/2 durch PTPRR kein indirekter Effekt, sondern ERK1/2 ein direktes Substrat der PTPRR ist, wurde ein *in vitro*-Phosphataseexperiment durchgeführt (Abb. 13). Dazu wurde zunächst die ERK1/2-Tyrosinphosphorylierung durch 10-minütige Stimulation von Rat-1-Fibroblasten mit EGF induziert. ERK wurde aus den Lysaten mit GST-PTPRR 230-338 präzipitiert, welcher die Phosphatasedomäne fehlt. Die Präzipitate wurden 15 min in Phosphatasepuffer mit steigenden Mengen GST PTPRR 230-632, welches über die Phosphatasedomäne verfügt, inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von Lämmli-Probenpuffer wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. PTPRR dephosphorylierte phosphoERK2 dosisabhängig, während GST alleine keinen Einfluß auf die ERK-Phosphorylierung hat (Abb. 13, oberes Feld). Die Kontrolle mit einem Anti-ERK-Antikörper nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers bestätigte einen vergleichbaren ERK-Gehalt in allen Proben (Abb. 13, unteres Feld). Somit konnte gezeigt werden, daß ERK1/2 *in vitro* ein direktes Substrat der PTPRR ist.



**Abb. 13: Dephosphorylierung der ERK durch GST-PTPRR**

Rat-1-Zellen wurden 10 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert und mit Lysepuffer ohne Phosphataseinhibitoren lysiert. Je 500 µg Lysate wurden mit 1 µg GST-PTPRR 230-338 präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Phosphatasespuffer mit steigenden Mengen GST PTPRR 230-632 entsprechend den Angaben in der Abbildung inkubiert. Als Kontrolle wurde 1,25 µg GST eingesetzt. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde nach 15 min durch Zugabe von Lämmli-Puffer abgebrochen und die Präzipitate über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper immunodetektiert. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurden die Proben mit einem Anti-ERK-Antikörper getestet.

PTPRR kann durch alternatives Spleißen des Gens *Ptprr* in verschiedenen Isoformen exprimiert werden (Shiozuka *et al*, 1995; Van Den Maagdenberg *et al*, 1999; Augustine *et al*, 2000); zur Bedeutung dieser Unterschiede war jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Nun sollten die Aktivitäten der verschiedenen Isoformen gegenüber ERK verglichen werden. Eingesetzt wurden dabei die Isoformen PTPRRcyto, PTPRR TM, welche über die Phosphatasedomäne, die Juxtamembrandomäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze „extrazelluläre“ Domäne verfügt sowie die längste bekannte Isoform PTPRR FL mit dem größten extrazellulären Anteil (Van Den Maagdenberg *et al*, 1999; Augustine *et al*, 2000).



**Abb. 14: Einfluß der unterschiedlichen Isoformen der PTPRR auf die Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2**

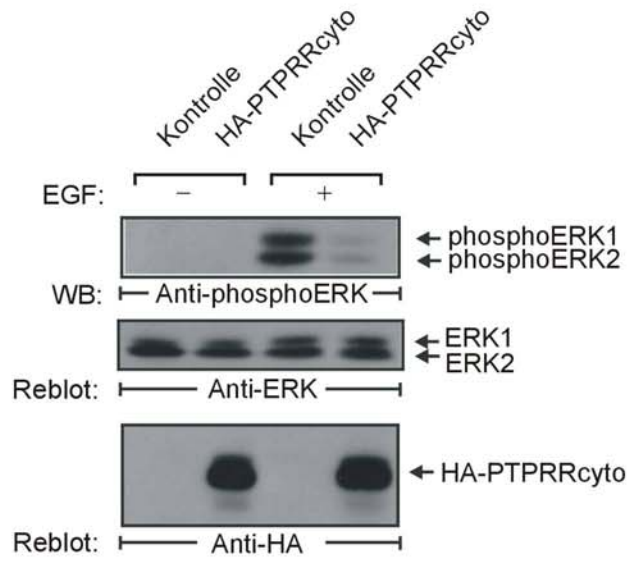
HEK293-Zellen wurden mit je 0,5 µg pRK5 Leervektor, mPTPRRcyto, mPTPRR TM, mPTPRR FL, oder PTP1B (alle im Expressionsvektor pRK5) transfiziert. Nach 10 min Stimulation mit 15ng/ml EGF wurden die Zellen lysiert, mit 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Mit einem Anti-phosphoERK-Antikörper wurde eine Immunblotanalyse durchgeführt, anschließend wurde dieser entfernt und mit Anti-ERK-Antikörper immunodetektiert. Zur Expressionskontrolle der Phosphatasen wurden je 250 µg der Lysate mit Anti-PTPRR-Antikörper 428, welcher alle drei Isoformen erkennt, immunpräzipitiert und mit dem selben Antikörper analysiert.

HEK293 Zellen wurden mit PTPRR<sub>cyto</sub>, PTPRR<sub>TM</sub>, PTPRR<sub>FL</sub>, der zytoplasmatischen Phosphatase PTP1B oder einer Vektorkontrolle transient transfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit EGF stimuliert, was zu einer Tyrosinphosphorylierung von ERK1/2 führt (Winston und Bertics, 1992). Die Zellysate wurden auf Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 getestet; zur Expressionskontrolle der Phosphatasen wurde mit dem Anti-PTPRR 428-Antikörper präzipitiert und immundetektiert (Abb. 14).

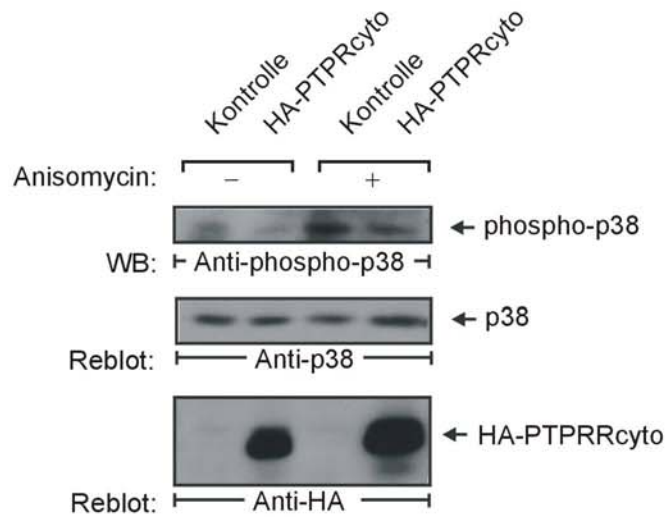
Wie sowohl der Anti-phosphoERK-Immunblot als auch die durch die Phosphorylierung hervorgerufene Verschiebung der ERK-Bande zeigen, kann die Expression der PTPRR<sub>cyto</sub> die Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 vollständig unterdrücken. PTPRR<sub>TM</sub> verringert die ERK1/2-Phosphorylierung etwas schwächer (Abb. 14, Spur 1 und 2 in den oberen beiden Feldern; die Tyrosinphosphorylierung wird bei PTPRR<sub>TM</sub> nach längerer Exposition sichtbar) und PTPRR<sub>FL</sub> und PTP1B haben keine Wirkung auf die ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 14, Spur 3 und 5). Somit konnte gezeigt werden, daß die unterschiedlichen Isoformen der PTPRR bei transienter Überexpression verschiedene Auswirkungen auf die Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 haben.

Dualspezifische MAPK-Phosphatasen weisen unterschiedliche Spezifitäten für die Mitglieder der MAPKinase-Familie auf. Um zu überprüfen, ob dies auch für PTPRR gilt, wurde der Einfluß der Überexpression der PTPRR auf die Aktivierung der ERK-, p38- und JNK/SAPK-Signalwege verglichen. Dazu wurden HEK293-Zellen mit PTPRR bzw. Vektorkontrolle transfiziert und die MAPK-Signalwege vor der Lyse mit EGF, Anisomycin bzw. Sorbit stimuliert. Die Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern auf Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2, p38 Kinase bzw. JNK getestet (Abb. 15). Dabei verringert PTPRR nur die Phosphorylierung der ERK1 /2 signifikant (Abb. 15A, oberes Feld), die Effekte auf die Phosphorylierung der p38 Kinase (Abb. 15B, oberes Feld) und JNK (Abb. 15C, oberes Feld) sind dagegen äußerst gering.

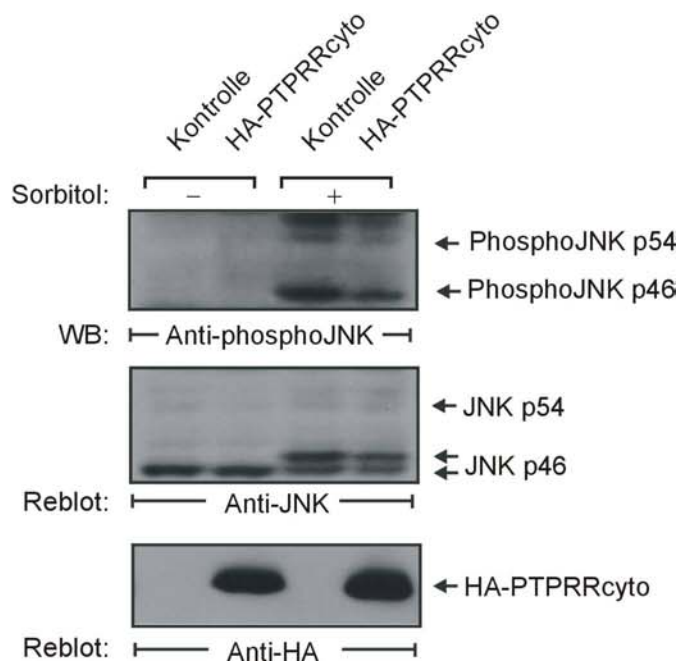
A:



B:



C:



**Abb. 15: Spezifität der PTPRR für verschiedene Mitglieder der MAPKinase-Familie**

HEK293-Zellen wurden mit je 0,5 µg pRK5 Leervektor oder HA-mPTPRRcyto transfiziert. Nach Stimulation mit 15ng/ml EGF (10 min), 10 µg/ml Anisomycin oder 0,5M Sorbitol (beides 20 min) wurden die Zellen lysiert, mit 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Mit Anti-phosphoERK- (A), phosphop38- (B) oder phosphoJNK-Antikörper (C) wurde eine Immunblotanalyse durchgeführt. Anschließend wurden diese Antikörper entfernt und die Expression der MAPKn mit Anti-ERK-, p38 bzw. JNK-Antikörper nachgewiesen. Zur Expressionskontrolle der PTPRR wurden diese Antikörper wieder abgelöst und die Blots mit Anti-HA-Antikörper analysiert.

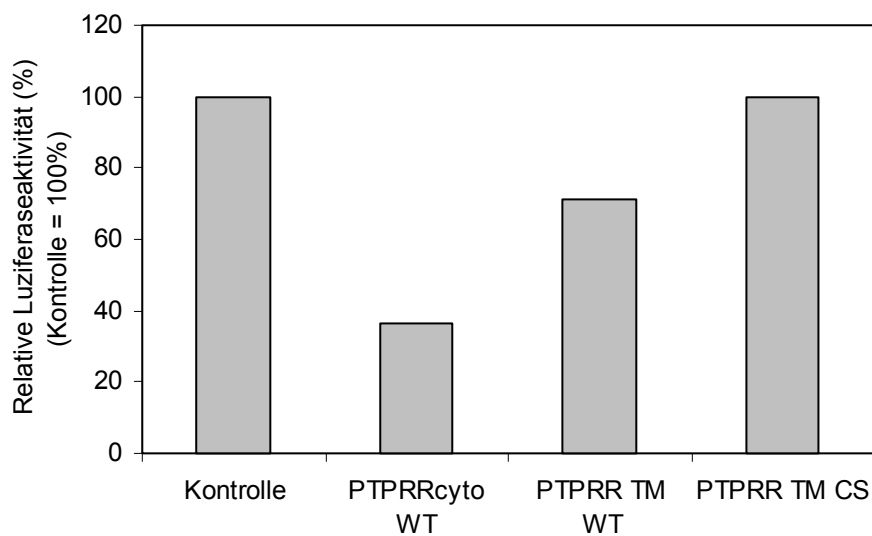
**3.2.2.3 PTPRR inhibiert die ERK-vermittelte Transkription**

In 3.2.2.2 war gezeigt worden, daß PTPRR ERK1/2 dephosphoryliert. ERK1 und ERK2 verfügen über eine Tyrosinphosphorylierungsstelle, die sich im TEY-Aktivierungsmotiv der ERK befindet (Crews *et al*, 1992a). Dieser Tyrosinrest wird gleichzeitig mit dem Threoninrest des TEY-Motivs von den dualspezifischen Proteinkinasen MEK1 und MEK2 (MAP-Kinase/ERK-Kinase 1 und 2) phosphoryliert, was zur Aktivierung der Kinaseaktivität der ERK1/2 führt (Crews *et al*, 1992b; Alessandrini *et al*, 1992). Diese doppelte Phosphorylierung ist dabei notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der ERK1/2 (Seger *et al*, 1992); die Dephosphorylierung des Tyrosins sollte also theoretisch für die Inaktivierung der ERK1/2 ausreichen. Zu Beginn dieser Arbeit lagen lediglich Berichte über die Inaktivierung der ERK1/2 in höheren Eukaryonten durch dualspezifische MAP-Kinase-Phosphatasen vor (Übersicht siehe Keyse, 1998).

Um zu überprüfen, ob PTPRR nicht nur in der Lage ist ERK1/2 zu dephosphorylieren, sondern auch funktionell zu inaktivieren, wurde in Transkriptions-Aktivierungs-Experimenten der Einfluß der PTPRR auf die Aktivität der ERK1/2 gegenüber dem Transkriptionsfaktor Elk-1 untersucht, welcher ein natürliches Substrat der ERK1/2 ist. Dabei wurde die Expression eines Luziferase-Reportergens von einem Reporterplasmid mit einem vorgeschalteten Enhancer-Element, dem Serum-Response-Element (SRE), gemessen. Aktiviertes ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk-1, der zusammen mit dem Serum-Response-Factor an das SRE bindet und so die Transkription des Luziferasegens auslöst (Gille *et al*, 1995; Übersichtsartikel siehe Treisman, 1992). Die Luziferaseaktivität in den Zellysaten ist ein Maß für die Stärke der ERK1/2-Kinaseaktivität bezüglich Elk-1.

HEK293-Zellen wurden mit dem Luziferase-Reporterplasmid, einem Plasmid mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen zur Normalisierung der Zellextrakte sowie Expressionsvektoren mit entweder PTPRRcytoWT, PTPRR TM WT, PTPRR TM CS oder einer Vektorkontrolle transient kotransfiziert. Die Zellen wurden 24h in DME-Medium mit 10% FCS gehalten und

lysiert. Die Lysate wurden in zwei Fraktionen geteilt, von denen die eine mit Luziferasepuffer und die andere mit  $\beta$ -Galaktosidasepuffer versetzt wurde, um anschließend im Luminometer auf Luziferase bzw.  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität getestet zu werden (Abb. 16). Dabei wird die Luziferaseaktivität durch Transfektion mit PTPRRcytoWT um etwa 65% und mit PTPRR TM WT um etwa 30% verringert. Die katalytisch inaktive PTPRR TM CS dagegen hat keinen Einfluß auf die Luziferaseaktivität. Eine Erklärung für den Unterschied zwischen PTPRRcytoWT und PTPRR TM WT könnte die stärkere Dephosphorylierung der ERK1/2 durch PTPRRcyto sein (Vergleiche 3.2.2.2, Abb. 14)



**Abb. 16: PTPRR verringert die Aktivität der ERK1/2 in intakten Zellen**

HEK293-Zellen wurden mit pSREwt-luc, CMV $\beta$ Gal und pRK5 mit entweder PTPRRcyto WT, PTPRR TM WT, PTPRR TM CS oder pRK5 ohne Insert (Kontrolle) transient kotransfiziert. Die Zellen wurden 24h in DME-Medium mit 10% FCS gehalten und lysiert. Die Lysate wurden in zwei Fraktionen geteilt, von denen die eine mit Luziferasepuffer und die andere mit  $\beta$ -Galaktosidasepuffer versetzt wurde um anschließend im Luminometer auf Luziferase bzw.  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität getestet zu werden.

### 3.2.3 Die Hitzeschockproteine HSP70 und GRP78 binden an die Juxtamembrandomäne der rekombinanten PTPRR

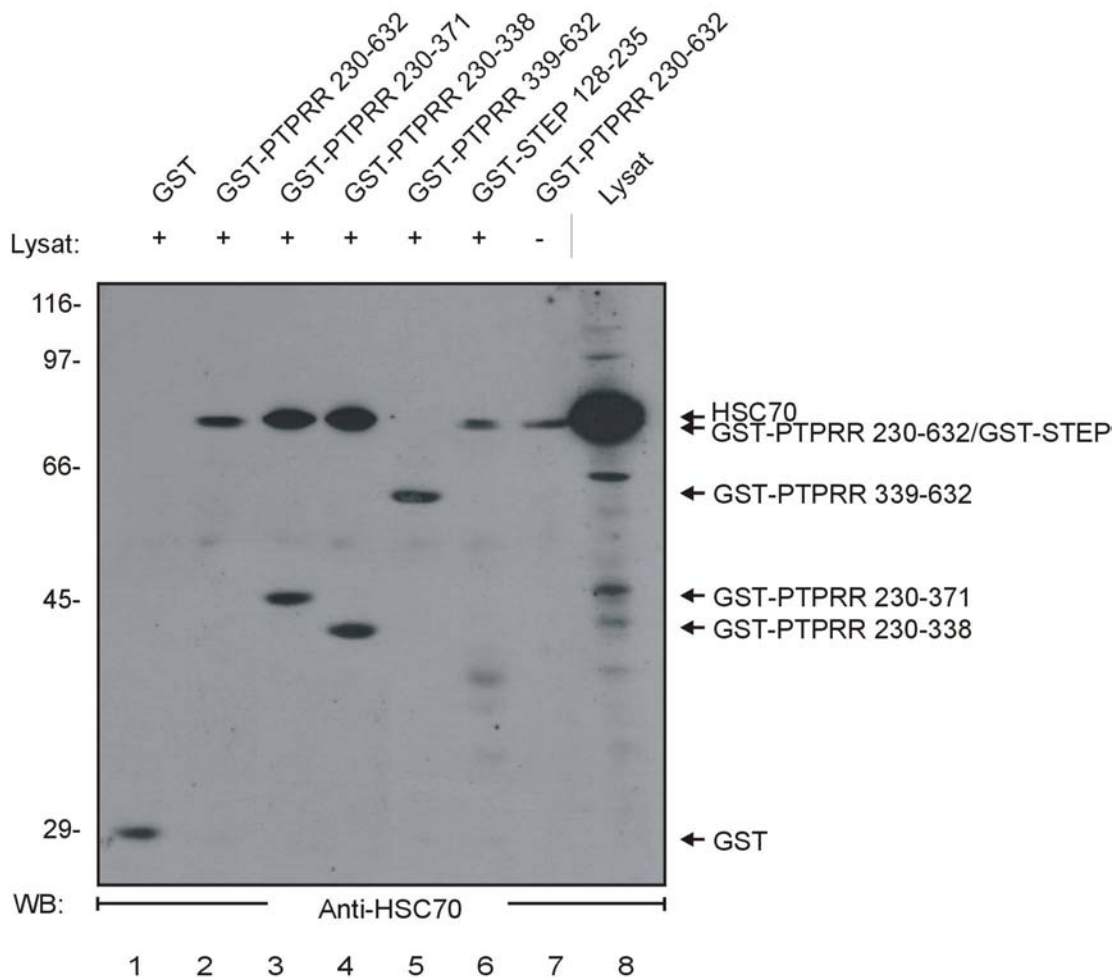
In 3.2.1 wurde dargestellt, daß neben ERK1/2 mehrere Proteine mit Molekulargewichten zwischen 70 und 78kDa *in vitro* an die Juxtamembrandomäne der PTPRR binden. Um diese Proteine zu identifizieren, wurde eine *in vitro*-Assoziation im präparativen Maßstab mit anschließender Sequenzierung der an GST-PTPRR gebundenen Proteine durchgeführt. Dazu wurden je 10mg Rat-1-Lysat entweder mit GST oder mit GST-mPTPRR 230-338 gefällt, die

Präzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt und die mit Coomassieblau G250 angefärbten Banden zwischen 70 und 78 kDa ausgeschnitten. Anschließend wurden die Banden mit Proteinase K verdaut, die Fragmente mit HPLC aufgetrennt und über Edman-Abbau sequenziert (Edman und Begg, 1967). Die Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lottspeich am MPI für Biochemie in Martinsried. Dabei konnten die Banden mit 70kDa und 78kDa ansequenziert werden. Die Bande p70 enthielt die Aminosäuresequenz (R)LIGRRFDDAVVQS, die Bande p78 die Sequenzen NQLTSNPENTVFDK und PLPFK. Über Sequenzvergleiche mit der EMBL-Proteindatenbank konnten die Proteine als HSC70 (Heat-shock-cognate 71kDa Protein) und GRP78 (Glucose-response-protein, 78kDa, auch HSC75 oder BIP-1 genannt) identifiziert werden, welche zur HSP70-Familie der Chaperone gehören.

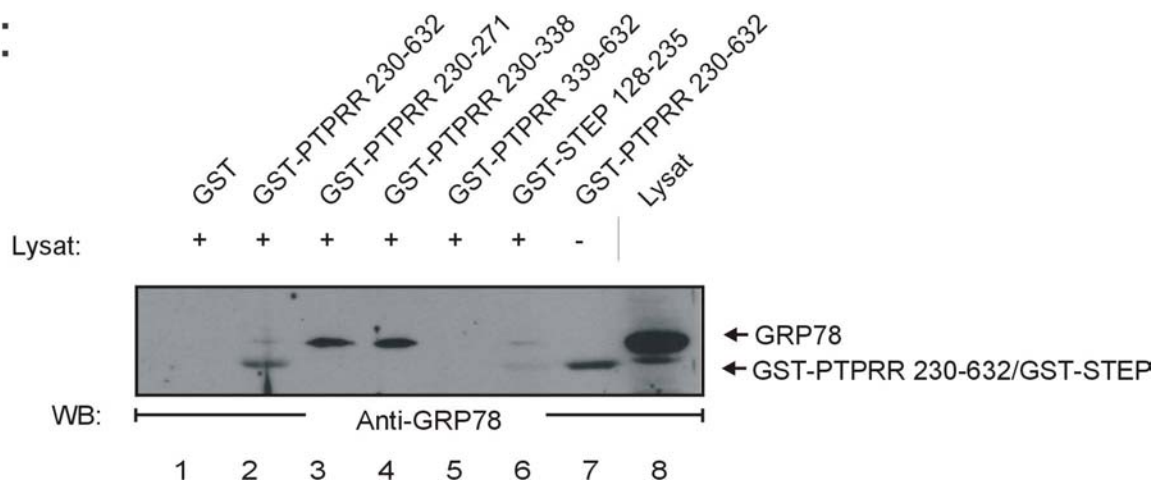
Um die Bindung des HSC70 und GRP78 an GST-PTPRR zu bestätigen, wurden die bei der *in vitro*-Assoziation erhaltenen Banden in Immunblotexperimenten mit Antikörpern gegen die Hitzeschockproteine HSC70, HSP75 und GRP78 getestet (Abb. 17, HSP75 nicht aufgeführt). Dabei konnte gezeigt werden, daß Anti-HSC70 und Anti-GRP78 Banden erkennen, die an GST-Fusionsproteine der PTPRR mit der Juxtamembrandomäne [GST-PTPRR 230-632, GST-PTPRR 230-371, GST-PTPRR 230-338] und STEP binden (Abb. 17A mit HSC70, Abb. 17B mit GRP78, Spur 2, 3, 4 und 6), nicht jedoch an ein GST-Fusionsprotein mit der katalytischen Domäne der PTPRR oder GST alleine (Abb. 17, Spur 1 und 5). Der Antikörper gegen HSP75, ein weiteres Mitglied der HSP70-Familie der Chaperone, erkannte keine Banden, was für die Spezifität der Assoziationen spricht (Daten nicht gezeigt).

Mitglieder der Familie der Chaperone wie HSC70 und GRP78 binden häufig unspezifisch ungefaltete oder fehlgefaltete Peptide. Um festzustellen, ob die Wechselwirkung dieser Hitzeschockproteine mit Peptiden spezifisch ist, kann man die Bindung auf ihre Abhängigkeit von Cofaktoren testen. Chaperone können in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: in der ADP-gebundenen und der ATP-gebundenen Form. Mit Hilfe von Cofaktoren wie den kleineren Hitzeschockproteinen HSP40, HDJ2, HIP oder Bag-1 wird ADP gegen ATP ausgetauscht und ein Kreislauf von Assoziation und Dissoziation der Substrate entsteht, der für den Prozess der Faltung der Substrate in die korrekte Konformation notwendig ist (Hartl, 1991; Burston und Clarke, 1995). Gibt man ATP zum einem Komplex aus immobilisiertem Substrat und Hitzeschockprotein, wird dieser Kreislauf in Gang gesetzt und der Chaperonkomplex läßt sich auswaschen; gibt man das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon

A:



B:

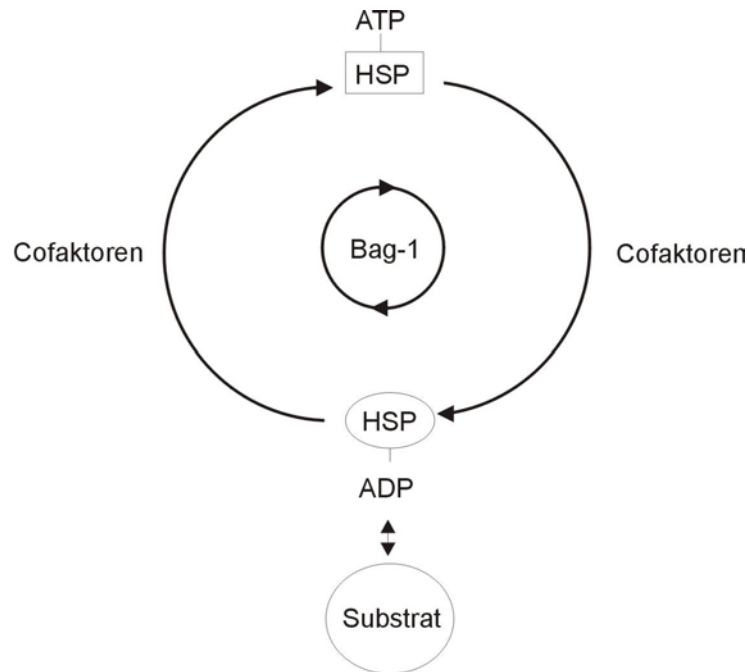


**Abb. 17: Die Proteine HSC70 und GRP78 binden *in vitro* an die Juxtamembrandomäne der GST-PTPRR**

Die Lysate von Rat-1-Zellen wurden *in vitro* mit je 1  $\mu$ g GST, GST-PTPRR 230-632, GST-PTPRR 230-371, GST-PTPRR 230-338, GST-PTPRR 339-632, oder GST-STEP 128-235 gefällt. Die Präzipitate wurden zusammen mit unbehandeltem Lysat oder GST-PTPRR 230-632 als Kontrolle über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HSC70-Antikörper analysiert (A). Anschließend wurde der Anti-HSC70-Antikörper abgelöst und der Blot mit Anti-GRP78-Antikörper getestet (B). Die GST-Fusionsproteine sind als unspezifische Banden unterhalb der Hitzeschockproteine zu erkennen. Da das Molekulargewicht des HSC70 nur geringfügig über dem der GST-PTPRR 230-632 und GST-STEP 128-235 liegt, laufen diese Proteine als schwach aufgelöste Doppelbande in Abb. 17A in den Spuren 2 und 6.



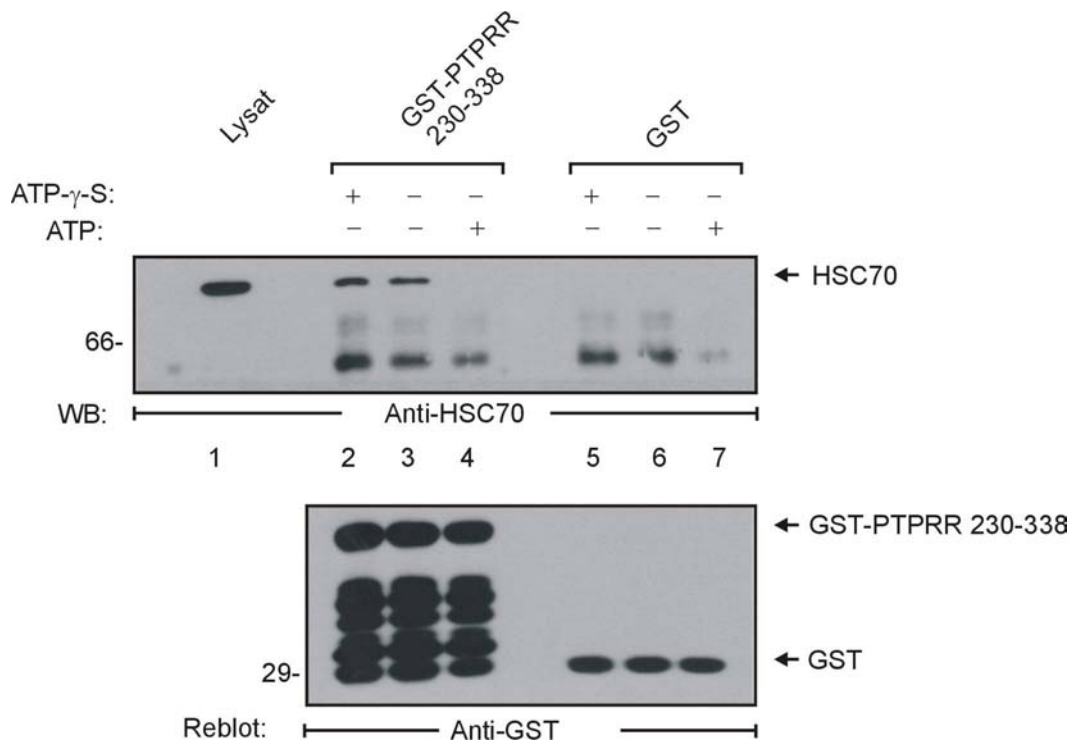
ATP- $\gamma$ -S zum Komplex, wird der Kreislauf blockiert und das Substrat bleibt gebunden (Abb. 18). Die kleineren Hitzeschockproteine sind in der Regel mit hoher Affinität an HSP70 gebunden und bleiben bei der Fällung assoziiert.



**Abb. 18: Bindung von Chaperonen der HSP70-Familie an Substrate in Abhängigkeit von Cofaktoren**

Chaperone der HSP70-Familie können in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: in der ADP-gebundenen und der ATP-gebundenen Form. Mit Hilfe von Cofaktoren wie den kleineren Hitzeschockproteinen HSP40, HDJ2, HIP oder Bag-1 wird ADP gegen ATP ausgetauscht und ein Kreislauf von Assoziation und Dissoziation der Substrate entsteht, der für den Prozess der Faltung der Substrate in die korrekte Konformation notwendig ist (Hartl, 1991; Burston und Clarke, 1995).

Um die Abhängigkeit der Assoziation des HSP70 mit der Juxtamembrandomäne der PTPRR in Abhängigkeit von Cofaktoren zu untersuchen, wurden Rat-1-Lysate mit GST-PTPRR 230-338 oder GST alleine präzipitiert und in HSP-Testpuffer ohne ATP, mit ATP oder mit ATP- $\gamma$ -S inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate gewaschen, aufgetrennt und mit einem Anti-HSC70-Antikörper getestet (Abb. 19). Während die Zugabe von ATP- $\gamma$ -S die Menge an gebundenem HSP70 leicht verstärkt, führt die Zugabe von ATP zur vollständigen Dissoziation des HSP70. Daraus lässt sich folgern daß die Bindung spezifisch und PTPRR ein Substrat des HSP70 ist. Für die Bindung von GRP78 an PTPRR konnte ebenfalls eine Abhängigkeit von Cofaktoren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

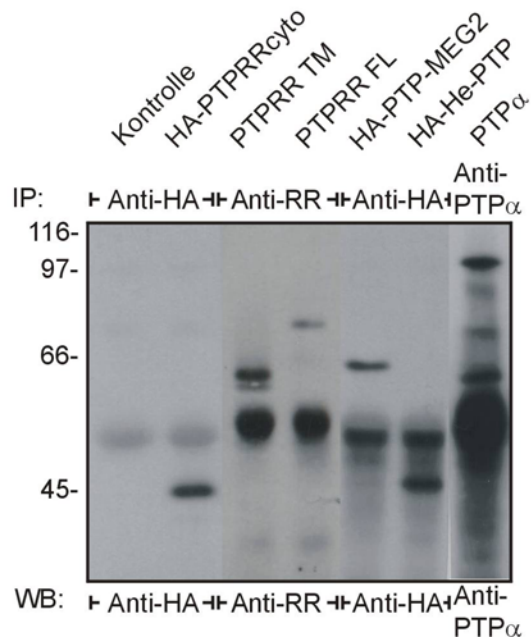
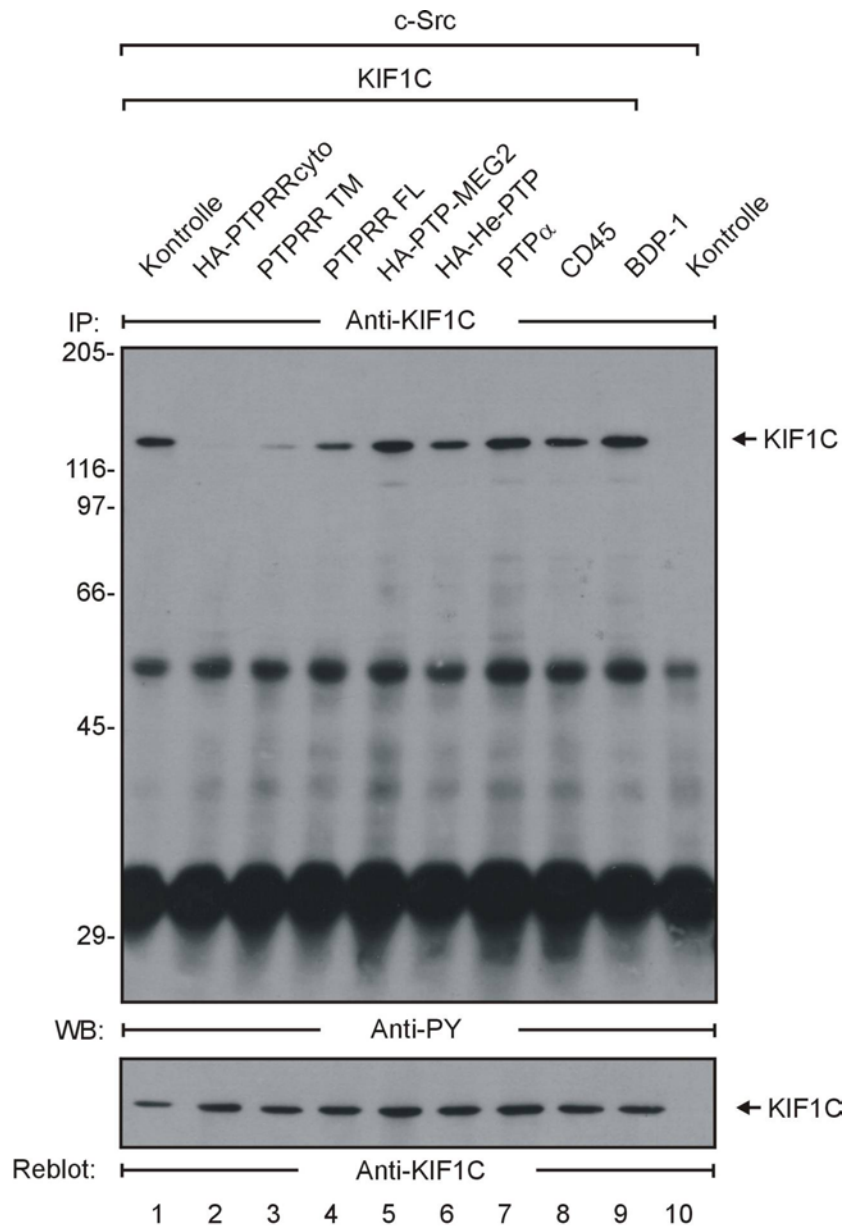


**Abb. 19: HSC70 bindet an PTPRR in Abhängigkeit von Cofaktoren**

Rat-1 Lysate wurden mit je 1  $\mu$ g GST-PTPRR 230-338 oder GST alleine gefällt und die Präzipitate in HSP-Testpuffer ohne ATP, mit 5mM ATP oder mit 5mM ATP- $\gamma$ -S inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen, über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HSC70-Antikörper analysiert. Nach Ablösen des Anti-HSC70-Antikörpers wurde mit einem Anti-GST-Antikörper getestet.

### 3.2.4 Die Expression der PTPRR verringert die Tyrosinphosphorylierung des Motorproteins KIF1C

Die Analyse der Genexpression in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien und in apoptoseresistenten HeLa-S3 Zervixkarzinom-Zellen mit Hilfe von cDNA-Arrays lieferte Hinweise auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen PTPRR und dem Motorprotein KIF1C, da sich ihre Expressionsprofile in verschiedenen Zelllinien stark ähneln (R. Abraham, persönliche Mitteilung). KIF1C (Kinesin associated protein family member 1C) ist ein ATP-bindendes Motorprotein, welches am retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist und durch die Überexpression der Tyrosinkinase c-Src oder nach Stimulation mit Peroxovanadat tyrosinphosphoryliert werden kann (Dorner *et al*, 1999).



**Abb. 20: Die Überexpression der PTPRR führt zu einer verringerten Tyrosinphosphorylierung des Motorproteins KIF1C**

HEK293 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen mit 0,3µg KIF1C-Expressionsplasmid, 0,1µg c-Src-Expressionsplasmid und 0,2 µg HA-PTPRRcyto, PTPRR TM, PTPRR FL, HA-MEG, HA-HePTP, BDP-1, PTP $\alpha$ , CD45 im Expressionsvektor oder Leervektor transient kotransfiziert. Jedes Lysat wurde in zwei Fraktionen geteilt, von denen die eine Fraktion mit Anti-KIF1C-Antikörper immunpräzipitiert, die Immunkomplexe über 10%ige SDS-Page aufgetrennt und die Tyrosinphosphorylierung des KIF1C nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen wurde. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde die Expression des KIF1C mit einem Anti-KIF1C-Antikörper nachgewiesen. Zur Expressionkontrolle der Phosphatasen wurde die andere Fraktion der Lysate mit Anti-HA-, Anti-PTPRR 428-, oder Anti-PTP $\alpha$ -Antikörper immunpräzipitiert, über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit den jeweiligen Antikörpern auf die Expression der Phosphatasen getestet. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet.

Um zu überprüfen, ob PTPRR Einfluß auf die Tyrosinphosphorylierung des KIF1C hat, wurde die Aktivität der PTPRR gegenüber KIF1C in intakten Zellen getestet. Dazu wurden HEK293-Zellen mit KIF1C, c-Src und verschiedenen PTPasen transient kotransfiziert. Nach der Lyse wurden die Proben mit einem Anti-KIF1C-Antikörper immunpräzipitiert und die Immunkomplexe auf Tyrosinphosphorylierung des KIF1C getestet (Abb. 20). Die zytoplasmatische Form der PTPRR wirkt am stärksten dephosphorylierend auf KIF1C, während die PTPRR TM einen weniger starken Effekt aufweist und die längste Form PTPRR FL eine noch schwächere Wirkung zeigt (Abb. 20, oberes Feld, Spuren 2-4). Die Spezifität dieser Dephosphorylierung wird dadurch belegt, daß alle anderen eingesetzten Phosphatasen die Tyrosinphosphorylierung des KIF1C nicht oder nur schwach verringern. Bemerkenswert ist dabei, daß die HePTP (Hämatopoetische PTP), welche der selben PTPase-Familie wie PTPRR angehört und ebenfalls ERK1/2 dephosphorylieren kann (Saxena *et al*, 1998), keinen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung des KIF1C hat.

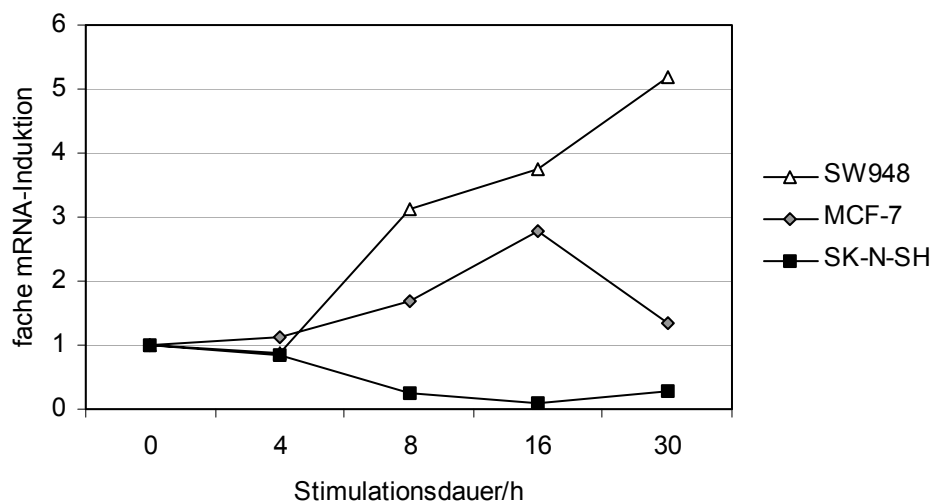
### 3.3 Regulation der Expression und des Phosphorylierungszustandes der PTPRR

Zur Steuerung der Aktivität von Enzymen kann eine Vielzahl verschiedener Mechanismen beitragen (Übersicht siehe Krauss, 1997). Die Untersuchungen der Regulation der PTPRR im Rahmen dieser Arbeit beschränkten sich auf die Phosphorylierung der PTPRR und die Regulation ihrer Expression, da Proteine, welche an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind häufig über diese Mechanismen reguliert werden.

#### 3.3.1 Die Expression der PTPRR wird von Differenzierungsagenzien beeinflusst

Die Expression vieler PTPasen wird durch Differenzierungsagenzien beeinflusst. Dies gilt insbesondere für PTPasen, die in neuronalen Zellen exprimiert sind (Arregui *et al*, 2000; den Hertog, 1999; den Hertog *et al*, 1999; Van Vactor, 1998). Auch bei Prozessen, die zur Differenzierung von Krebszellen führen und so deren weiteres Wachstum unterbinden, spielt die Expression von PTPasen häufig eine Rolle (Bhoola und Hammond, 2000; Mizuno *et al*, 1997; Keane *et al*, 1996; Kuo *et al*, 1995; Seimiya und Tsuruo, 1998; Taniguchi *et al*, 1999). Der Expressionslevel der PTPRR sollte in verschiedenen Tumorzelllinien nach Stimulation mit Substanzen, welche die Differenzierung auslösen, untersucht werden. Dazu wurden Zelllinien ausgewählt, deren Differenzierung nach Einwirkung der entsprechenden Agenzien bereits gut untersucht war: SK-N-SH-Zellen neuronalen Ursprungs, die sich mit Retinolsäure differenzieren lassen, SW948-Zellen aus Kolonkarzinom, die sich mit TPA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) differenzieren lassen und MCF-7-Zellen aus Mammakarzinom, die in Gegenwart von Natriumbutyrat differenzieren. Die Messung der PTPRR-mRNA-Mengen erfolgte vor Zugabe der Stimulantien und 4, 8, 16 und 30h danach, da sich der Expressionslevel der meisten Phosphatasen nach Zugabe von Differenzierungstimuli innerhalb einiger Stunden ändert. Zudem war bereits zu Beginn der Arbeit bekannt, daß die Expression der PTPRR in PC-12-Zellen aus der Ratte 10-16h nach Beginn der Stimulation mit NGF (Nerve-Growth-Factor) ihr Maximum erreicht (Sharma und Lombroso, 1995). Die Messung der Expression wurde auf mRNA-Ebene durchgeführt und erfolgte über RT-PCR und Quantifizierung des Produktes in einem LightCycler (vergleiche 3.1.1.1). Durch die Induktion der Differenzierung von SW948-Zellen wird die Expression der PTPRR-mRNA auf das 5-fache gesteigert; die Behandlung von SK-N-SH-Zellen mit Differenzierungsagenzien

führt dagegen zu einem Rückgang des hPTPRR-mRNA-Vorkommens auf etwa ein Zehntel. In MCF-7 Zellen steigert sich die PTPRR-mRNA-Menge bei Differenzierung nur gering (Abb. 21). 48h nach Beginn der Stimulation waren in allen untersuchten Zelllinien Morphologieänderungen zu beobachten, wie sie für differenzierte Zellen charakteristisch sind (Daten nicht gezeigt). In einem parallelen Ansatz mit konventioneller PCR in einem Thermoblock und Analyse über Gelelektrophorese mit anschließender Quantifizierung der eingescannten fotografierten Banden konnten die Ergebnisse reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 21: Die Expression der PTPRR-mRNA kann durch Differenzierungsagenzien beeinflusst werden**

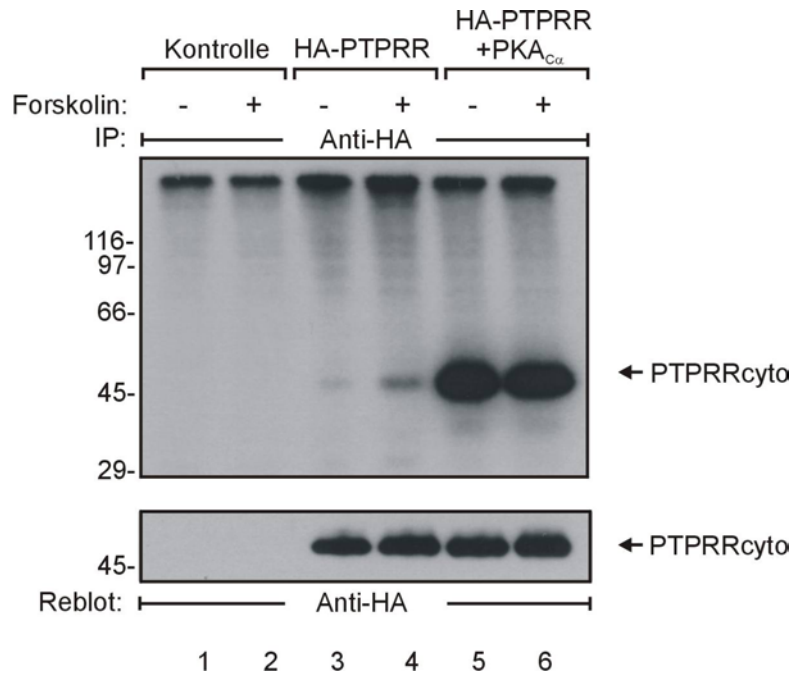
SW948-, SK-N-SH- und MCF7-Zellen wurden in 15cm-Schalen mit je 4, 6, bzw. 2,7 Millionen Zellen/Schale ausgesät und mit 1mM TPA, 0,5 $\mu$ M Retinolsäure bzw. 1mM Natriumbutyrat stimuliert. Die zytoplasmatische RNA wurde präpariert, mit DNaseI verdaut und mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Je 0,2  $\mu$ l cDNA (entspricht 150ng gesamt-RNA) aus den RT-Ansätzen wurden in der Amplifikationsreaktion mit je 2pMol Vorwärts- und Rückwärtsprimer NECu und NECb für die Phosphatase bzw. CYCLOf und CYCLOb für die Zykophilin A-Kontrolle eingesetzt. Meßgröße war die Fluoreszenz bei 530nm, hervorgerufen durch die Wechselwirkung des Farbstoffes SYBR Green mit dem doppelsträngigen PCR-Produkt. Als Maß für die Menge der hPTPRR- und Zyklophilin A-mRNAs wurden die Wendepunkte der Funktion *Fluoreszenz gegen Anzahl der Zyklen* verwendet, d.h. die Anzahl der Zyklen, bei denen die Hälfte der Primer umgesetzt ist. Aufgetragen ist das Verhältnis des Logarithmus des Wendepunktes der Phosphatase-Amplifikation zum Logarithmus des Wendepunktes der Zyklophilin A-Amplifikation.

### 3.3.2 PKA reguliert die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK1/2

Die Sequenz der zytoplasmatischen Region der PTPRR wurde auf mögliche posttranslationale Modifikationen mit Hilfe des NetPhos 2.0 Programmes am Center for Biological Sequence Analysis der Technischen Universität Dänemark in Kopenhagen ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) untersucht. Dabei wurde das Erkennungsmotiv R-X<sub>1-2</sub>-S/T-X- (Kennelly und Krebs, 1991) der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase (PKA) in den Positionen 319-323 gefunden (Numerierung nach Ogata *et al.*, 1995), welche sich im KIM (Kinase-Interaktions-Motiv, 3.2.2) befinden.

#### 3.3.2.1 PTPRR wird durch PKA phosphoryliert

Um eine mögliche Phosphorylierung der PTPRR durch PKA experimentell zu überprüfen, wurde ein *in vivo*-Kinase-Test mit PKA und PTPRR durchgeführt. Dazu wurden COS7-Zellen in 6-Loch-Schalen mit HA-PTPRRcyto und der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der PKA (PKA<sub>C $\alpha$</sub> ) in Expressionsvektoren transient kotransfiziert und die zellulären Phosphatgruppen durch Zugabe von [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat zum ansonsten phosphatfreien Wachstumsmedium radioaktiv markiert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit Forskolin behandelt, welches die cAMP-Synthese und somit PKA stimuliert. PTPRR wurde aus den Lysaten mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und die Phosphorylierung nach Auftrennung mit SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran über Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 22). Unstimulierte PTPRRcyto weist eine geringe Phosphorylierung auf, welche durch Stimulation mit PKA verstärkt wird (Abb. 22, Spur 3 und 4). Die Kotransfektion mit PKA<sub>C $\alpha$</sub>  führt zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung der PTPRR ohne und mit Forskolin (Abb. 22, Spur 5 und 6). Die Expression der PTPRR wurde durch Immunblotanalyse eines parallelen Ansatzes mit einem Anti-HA-Antikörper belegt. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtung bestätigt, daß sich bakteriell überexprimierte PTPRR *in vitro* durch PKA im KIM phosphorylieren läßt (M. Sommer, persönliche Mitteilung).



**Abb. 22: PTPRR wird von PKA *in vivo* phosphoryliert**

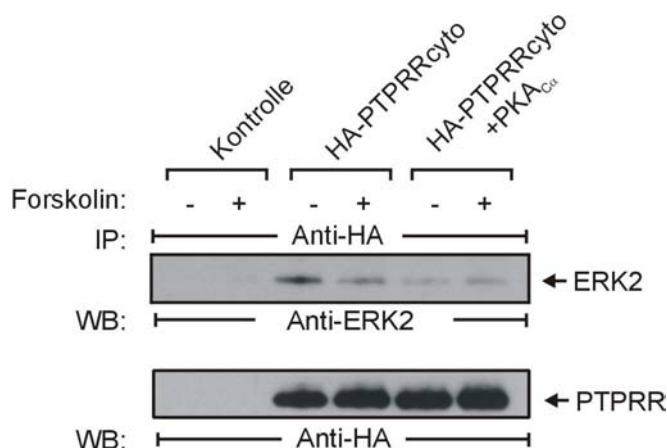
COS7-Zellen wurden in 6-Loch-Schalen mit je 0,5µg HA-PTPRRcyto und der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der PKA (PKA<sub>C $\alpha$</sub> ) im Expressionsvektor pRK5 transient kotransfiziert und die zellulären Phosphatgruppen durch die Zugabe von 100µCi/Loch [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat zum ansonsten phosphatfreien Wachstumsmedium radioaktiv markiert. Vor der Lyse wurden die Zellen 30 min mit 40µM Forskolin in Gegenwart von 0,5M IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor, stimuliert. PTPRR wurde aus den Lysaten mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und die Phosphorylierung nach Auftrennung mit 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran über Autoradiographie sichtbar gemacht. Ein identischer Transfektionsansatz ohne Orthophosphatmarkierung wurde wie oben stimuliert, immunpräzipitiert und eine Immunblotanalyse mit einem Anti-HA-Antikörper durchgeführt. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet.

### 3.3.2.2 PKA reguliert die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK

In 3.2.2.1 war gezeigt worden, daß PTPRR über das KIM an ERK bindet. Zudem war bekannt, daß PKA die PTPRR *in vitro* im KIM phosphoryliert (M. Sommer, persönliche Mitteilung) und die Aktivität der ERK1/2 reguliert (Vossler *et al*, 1997; Yao *et al*, 1998; Miller *et al*, 1998). Eine Phosphorylierung durch PKA in diesem Motiv könnte die Wechselwirkung zwischen ERK1/2 und PTPRR beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden COS7-Zellen mit HA-PTPRRcyto und der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der PKA (PKA<sub>C $\alpha$</sub> ) in Expressionsvektoren transient kotransfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit Forskolin stimuliert, welches die cAMP-Synthese und somit PKA stimuliert. Die Lysate wurden mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und auf Gegenwart der ERK1/2 getestet. Wie in Abb. 23 gezeigt führt die Stimulation der PKA ebenso wie die



Überexpression der PKA<sub>Cα</sub> zu einer Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen ERK und PTPRR. Daraus kann geschlossen werden, daß PKA die Wechselwirkung zwischen ERK und PTPRR reguliert.

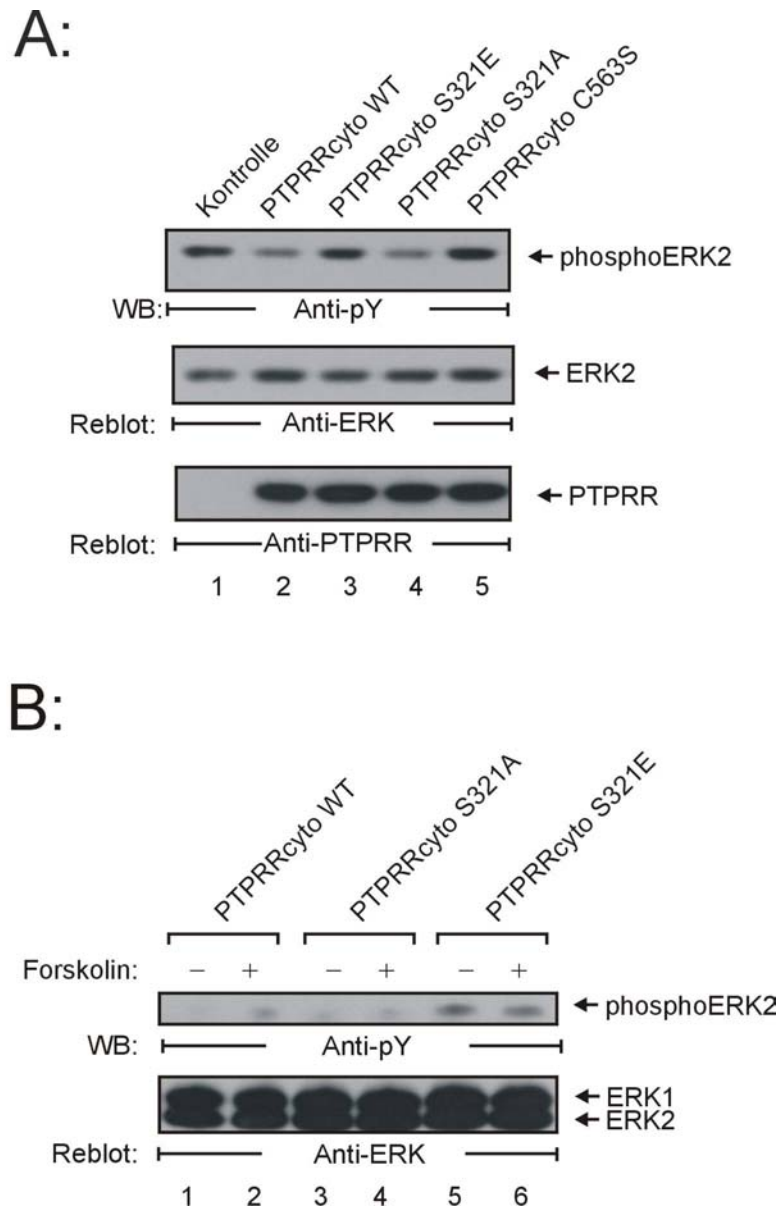


**Abb. 23: PKA reguliert die Bindung zwischen PTPRR und ERK**

COS7-Zellen in 6-Loch-Schalen wurden mit je 0,5µg HA-PTPRRcyto und der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der PKA (PKA<sub>Cα</sub>) im Expressionsvektor pRK5 transient kotransfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen 30 min mit 40µM Forskolin in Gegenwart von 0,5M IBMX stimuliert. PTPRR wurde aus den Lysaten mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und die Assoziation der ERK1/2 nach Auftrennung mit 10%iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran über Immunblotanalyse mit einem Anti-ERK-Antikörper sichtbar gemacht. Nach Ablösen des Anti-ERK-Antikörpers wurde die Expression der PTPRR mit einem Anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

Im Anschluß wurde der Effekt der PKA auf die Dephosphorylierung von ERK1/2 durch PTPRR untersucht. PKA kann die Aktivität der ERK1/2 über verschiedene Mechanismen regulieren, wie z.B. über die Stimulation des B-Raf oder die Inhibition des c-Raf (Grewal *et al.*, 2000; Cook und McCormick, 1993). Bei der Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung der PTPRR durch PKA auf die Aktivierung der ERK in intakten Zellen können sich diese Effekte störend auswirken. Um den Effekt der Phosphorylierung der PTPRR durch PKA auf die Phosphorylierung der ERK1/2 isoliert von den störenden Einflüssen untersuchen zu können, wurden Mutanten der PKA-Phosphorylierungsstelle der PTPRR eingesetzt. Die Mutation des Serins321 der PTPRR zu Alanin verhindert die Phosphorylierung des KIM durch PKA und behindert die Wechselwirkung mit ERK1/2 sterisch nicht. Die Mutation des Serins321 zu Glutamin ahmt die negative Ladung des Phosphatrestes nach, so daß die Mutante ähnlich der phosphorylierten Form der PTPRR nicht mehr in der Lage sein sollte ERK1/2 zu binden.

COS7-Zellen wurden mit Leervektor, PTPRRcytoWT, PTPRRcytoS321E, PTPRRcytoS321A oder der katalytisch inaktiven PTPRRcytoC563S im Expressionsvektor pRK5 transient transfiziert. Die Lysate wurden mit einem Anti-ERK- bzw. einem Anti-PTPRR-Antikörper immunpräzipitiert und die Proben nach Auftrennung über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper auf Phosphorylierung der ERK1/2 bzw. einem Anti-PTPRR-Antikörper auf Expression der PTPRR getestet. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde mit einem Anti-ERK1/2-Antikörper auf gleichmäßige Immunpräzipitation der ERK1/2 geprüft (Abb. 24A). Dabei führt die Mutation des Serins 321 zu Glutamat zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 im Vergleich zum Wildtyp, während die Ser321Ala-Mutation den gleichen Effekt auf die ERK-Phosphorylierung wie der Wildtyp aufweist (Abb. 24A, Spur 2, 3 und 4). Die Kontrolle mit PTPRRcytoC563S zeigt keinen Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 24A, Spur 5). Um zu bestätigen, daß der Effekt der PKA auf die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK über die Phosphorylierung des Serins 321 vermittelt wird, wurde der Einfluß der Ser321-Mutationen auf die ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation der PKA untersucht. Dazu wurden COS7-Zellen mit PTPRRcytoWT, PTPRRcytoS321A und PTPRRcytoS321E transfiziert und vor der Lyse mit Forskolin stimuliert. Die Lysate wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran mit einem Anti-phosphoERK-Antikörper auf Phosphorylierung der ERK1/2 getestet. Die Stimulation mit Forskolin führt beim Wildtyp zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 (Abb. 24B, Spur 1 und 2). Die Mutation des Serins zu Alanin verhindert den Effekt des Forskolins auf die ERK1/2-Phosphorylierung; hier ist die Phosphorylierung mit und ohne Forskolin schwach (Abb. 24B, Spur 3 und 4). Die Mutation des Serins zu Glutamat dagegen hat eine vergleichsweise stärkere Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 sowohl mit als auch ohne Stimulation zur Folge (Abb. 24B, Spur 5 und 6). Das Ausschalten des Effektes der PKA durch die Mutation des Serins 321 der PTPRR ist ein Beleg dafür, daß PKA über die Phosphorylierung dieses Serins die Bindung an ERK1/2 und somit die Dephosphorylierung der ERK durch PTPRR verhindert.

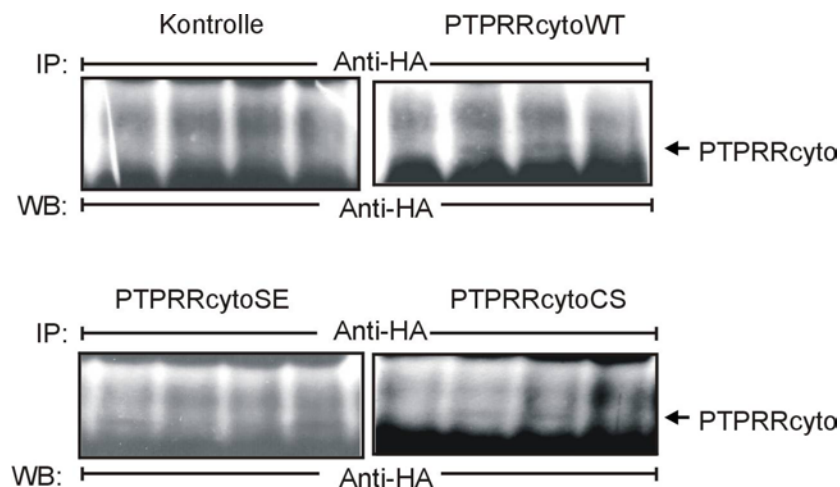


**Abb. 24: PKA reguliert über die Phosphorylierung des Serins 321 der PTPRR die Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2**

**A:** COS7-Zellen in 6-Loch-Schalen wurden mit je 0,5 µg Leervektor, PTPRRcytoWT, PTPRRcytoS321E, PTPRRcytoS321A oder PTPRRcytoC563S im Expressionsvektor pRK5 transient transfiziert. Die Lysate wurden mit einem Anti-ERK- bzw. einem Anti-PTPRR-Antikörper immunpräzipitiert und die Proben nach Auftrennung über 10%ige SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper bzw. einem Anti-PTPRR-Antikörper getestet. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde mit einem Anti-ERK-Antikörper getestet. **B:** COS7-Zellen in 6-Loch-Schalen wurden mit PTPRRcytoWT, PTPRRcytoS321A und PTPRRcytoS321E transfiziert und vor der Lyse 30 min mit 40µM Forskolin stimuliert. Die Lysate wurden nach Auftrennung über 10%ige SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran mit einem Anti-phosphoERK-Antikörper auf Phosphorylierung der ERK1/2 getestet. Nach Ablösen des Anti-phosphoERK-Antikörpers wurde mit einem Anti-ERK-Antikörper getestet.

### 3.4 Biologische Funktion

PTPasen können theoretisch in alle zellulären Prozesse eingreifen, bei denen die Tyrosinphosphorylierung eine Rolle spielt, und daher eine Vielzahl zellulärer Funktionen wie etwa Proliferation, Migration und Differenzierung steuern (Angers-Loustau *et al.*, 1999; Avraham *et al.*, 2000; Arregui *et al.*, 2000; Byon *et al.*, 1997; den Hertog, 1999; Van Vactor *et al.*, 1998). Zur Untersuchung der biologischen Funktion der PTPRR wurde der Schwerpunkt im Rahmen dieser Arbeit auf die ERK1/2-vermittelten zellulären Prozesse Proliferation, Kontaktinhibition und Migration gelegt, welche auch an der Entstehung und Entwicklung von Tumoren beteiligt sind. Für die folgenden Experimente wurden zunächst NIH3T3-Zelllinien generiert, die mPTPRRcyto stabil vom Expressionsvektor pLXSN exprimieren (Abb. 25). Dieser Vektor ermöglicht mit dem vergleichsweise schwachen SV40-Promotor eine moderate Überexpression.



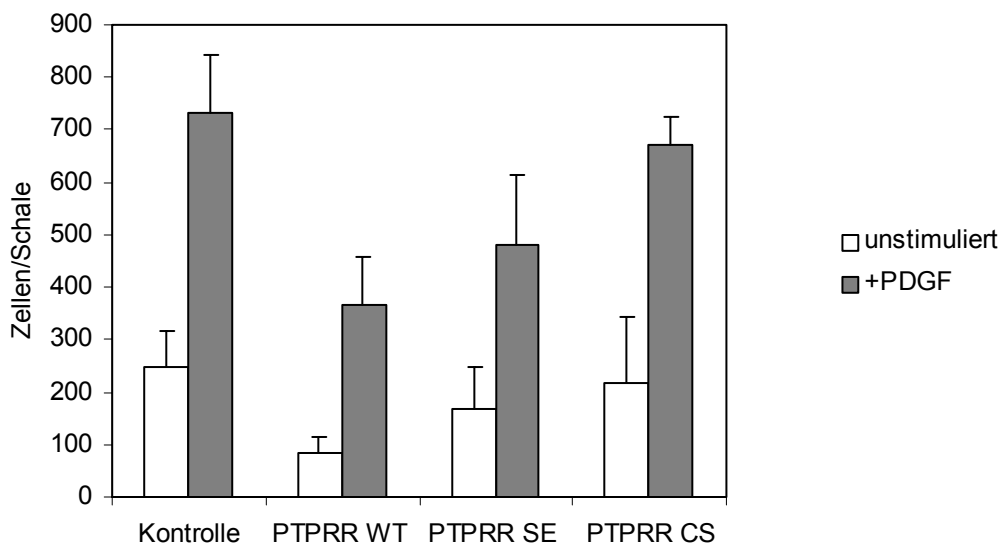
**Abb. 25: Stabile Expression der HA-PTPRRcyto in NIH3T3-Fibroblasten**

NIH3T3-Fibroblasten wurden mit HA-PTPRRcyto im Expressionsvektor pLXSN infiziert und mit dem Selektionsmarker G418 zwei Wochen selektiert. Von den selektierten Zellen wurden Klone ausgewählt, gezüchtet und eine 10cm-Schale jedes Klons zur Expressionkontrolle lysiert. Vergleichbare Mengen der Lysate wurden mit Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert, über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit Anti-HA-Antikörper auf Expression der PTPRR getestet.

### 3.4.1 PTPRR verlangsamt die basale und PDGF-induzierte Proliferation

Eine Folge der ERK1/2-Aktivierung in NIH3T3-Zellen ist die Steigerung der Proliferationsrate (Nishida und Gotoh, 1993; Blenis, 1993; Lenormand *et al.*, 1993). Um zu überprüfen, ob die Wechselwirkung der PTPRR mit ERK Einfluß auf die Proliferationsrate hat, wurden NIH3T3-Zellen mit mPTPRRcytoWT, der katalytisch inaktiven Mutante mPTPRRcytoC563S und der Mutante mPTPRRcytoS321E, welche ERK nicht bindet, stabil transfiziert. Die stabilen Zelllinien wurden auf 6-Loch Schalen ausgesät und mit PDGF stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen durch Trypsinierung von den Schalen abgelöst und die Zellzahl pro Loch erneut bestimmt (Abb. 26).

PTPRRcytoWT verringert die Proliferationsrate der unstimulierten NIH3T3-Zellen um 66% und die der PDGF-stimulierten NIH3T3-Zellen um 50% im Vergleich zur Vektorkontrolle. PTPRRcytoS321E lag mit 30% Rückgang der Proliferation sowohl der unstimulierten als auch der stimulierten Zellen im Bereich des statistischen Fehlers, ebenso die C563S-Mutante mit einem Rückgang von 11% ohne bzw. 9% mit PDGF.



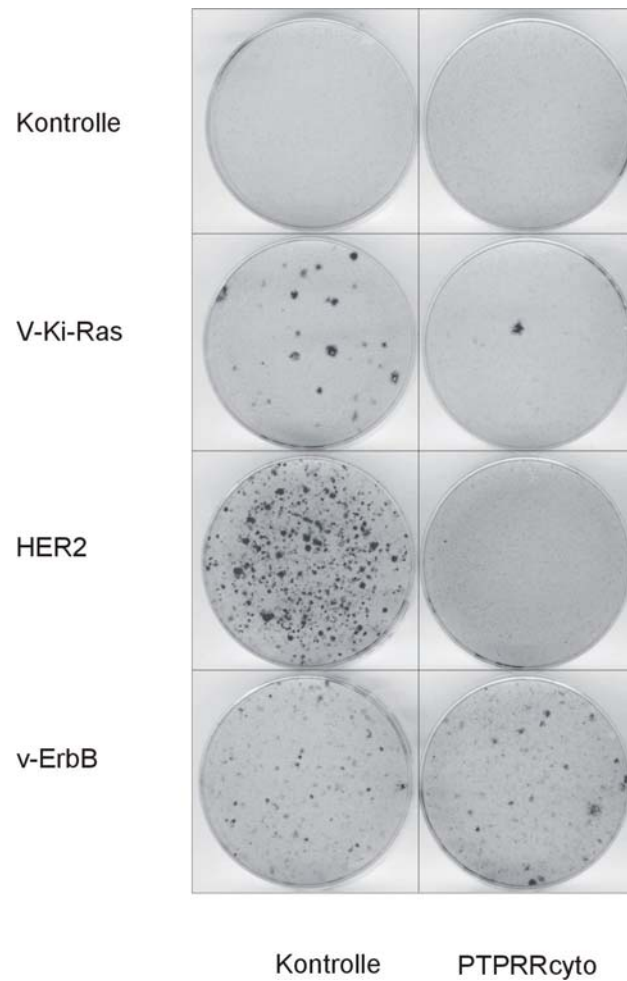
**Abb. 26: PTPRR verringert die Proliferationsrate von NIH3T3-Zellen**

NIH3T3-Zellen, die mit PTPRRcytoWT, PTPRRcytoC563S und PTPRRcytoS321E im Expressionsvektor pLXSN stabil infiziert worden waren, wurden mit 140 000 Zellen pro Loch auf 6-Loch Schalen ausgesät und nach 12h mit 5ng/ml PDGF stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen trypsiniert und die Anzahl der Zellen pro Loch mit einem Coulter Counter erneut bestimmt. Dabei wurden jeweils zwei Klone pro Konstrukt getestet und pro Klon zwei Zählungen vorgenommen.

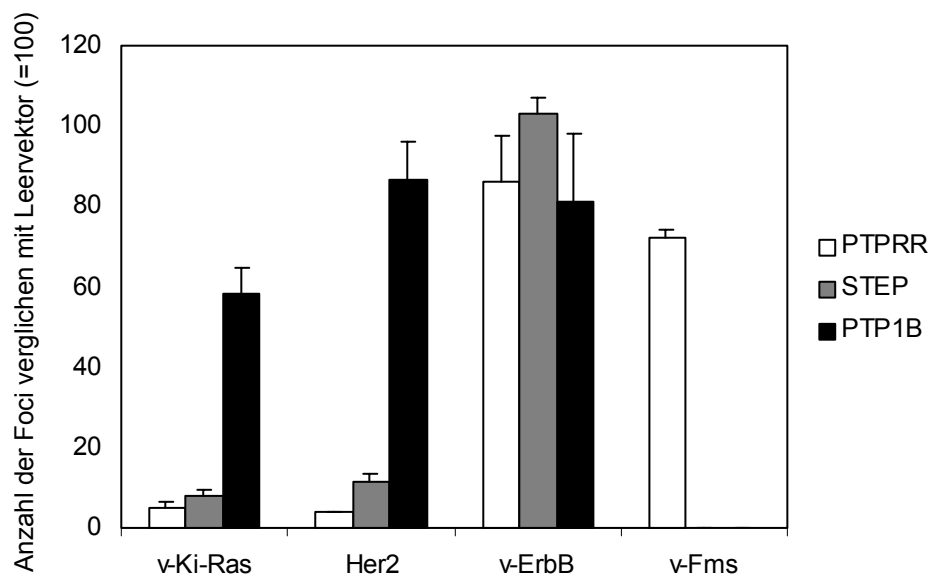
### 3.4.2 PTPRR blockiert die von v-Ki-Ras und HER2-vermittelte Transformation von Zellen

Ein Schritt bei der Transformation normaler Zellen zu Tumorzellen ist der Verlust der Kontaktinhibition, d.h. das Wachstum von Zellen trotz dichter Einbettung in eine Schicht aus Nachbarzellen. Um den Einfluß der PTPRR auf diesen Prozeß zu ermitteln, wurden sogenannte Fokusbildungs-Experimente durchgeführt, bei denen Nagerfibroblastenzellen mit Onkogenen infiziert werden, so daß sie die Kontaktinhibition verlieren und in mehreren Schichten übereinander wachsen. Dadurch entstehen die sogenannten Foci, die nach Anfärben mit dem Farbstoff Kristallviolett sichtbar werden. Als Onkogene wurden v-Ki-Ras verwendet, eine konstitutiv aktive Form des Raf-aktivators Ras, HER2, ein Mitglied der EGF-Rezeptor-Familie, welches häufig in Tumoren überexprimiert wird, v-ErbB aus dem Avian-Erythroblastosis-Virus, das ebenfalls mit der EGF-Rezeptor verwandt ist sowie v-Fms, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus dem McDonough Feline-Sarcoma-Virus. NIH3T3-Mäusefibroblasten, die stabil mit PTPRR, der zur selben PTPase-Familie gehörenden STEP oder der ebenfalls zytoplasmatischen PTP1B infiziert worden waren, wurden mit den Onkogenen v-Ki-Ras, HER2, v-ErbB und v-Fms nochmals infiziert. PTPRR unterdrückt die durch die Infektion mit v-Ki-Ras und HER2 hervorgerufenen Foci fast vollständig; der Effekt auf die von v-ErbB und v-Fms hervorgerufenen Foci ist jedoch wesentlich geringer (Abb. 27B, weiße Balken). STEP reduziert die v-Ki-Ras- und HER2-induzierte Transformation ebenfalls deutlich und zeigt keinen Effekt auf die Transformation durch v-ErbB (Abb. 27B, graue Balken). PTP1B dagegen verringert die Anzahl der durch v-Ki-Ras verursachten Foci auf etwa die Hälfte und die Anzahl der durch HER2 und v-ErbB verursachten Foci nur geringfügig (Abb. 27B, schwarze Balken). Die Analyse der Totallysate der stabil mit den PTPasen infizierten Zelllinien mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper zeigt, daß die Überexpression der Phosphatasen keine größeren unspezifischen Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster der Zellen bewirkt (Abb. 29A). Der Western-Blot der Totallysate der mit PTPRR und den Onkogenen doppelt infizierten Zellen mit einem Anti-PhosphoERK-Antikörper zeigt, daß PTPRR in der Lage ist, die durch die Onkogene v-Ki-Ras, HER2 und v-ErbB verursacht Phosphorylierung der ERK zu verringern (Abb. 29B). PTPRR kann also ebenso wie STEP spezifisch die von HER2 und v-Ki-Ras ausgehenden Signalwege, die zum Verlust der Kontaktinhibition führen, negativ regulieren.

A:



B:

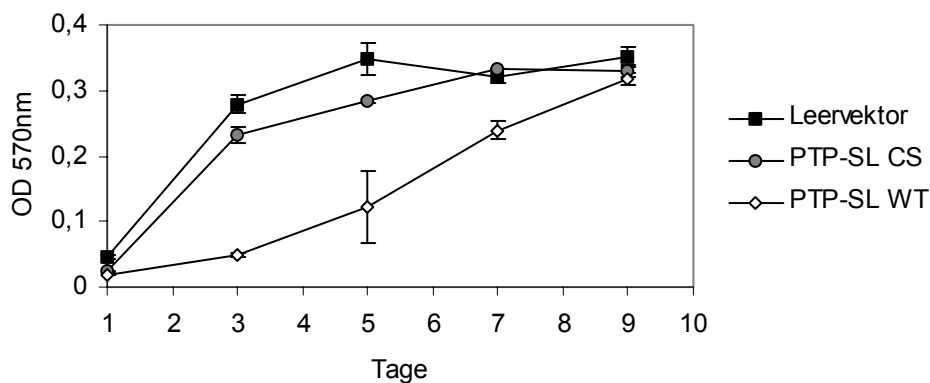


**Abb. 27: PTPRR kann die von v-Ki-Ras und HER2 verursachte Transformation von NIH3T3-Zellen unterdrücken**

NIH3T3-Fibroblasten, die stabil mit Leervektor, mPTPRRcyto, der zur selben PTPase-Familie gehörenden STEP oder der ebenfalls zytoplasmatischen PTP1B im Expressionsvektor pLXSN infiziert worden waren, wurden mit 275 000 Zellen pro Schale auf 6cm-Schalen ausgesät und mit den Onkogenen v-Ki-Ras, HER2, v-ErbB und v-Fms infiziert. Die Zellen wurden 10 Tage in DME-Medium mit 4% FCS gehalten und danach mit

Kristallviolett-Färbelösung fixiert und angefärbt. **A:** Foci mit Leervektor-transfizierten und PTPRR-transfizierten Zellen. **B:** Quantifizierung der Experimente. Die Fehlerbalken ergeben sich aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt (Daten nicht gezeigt).

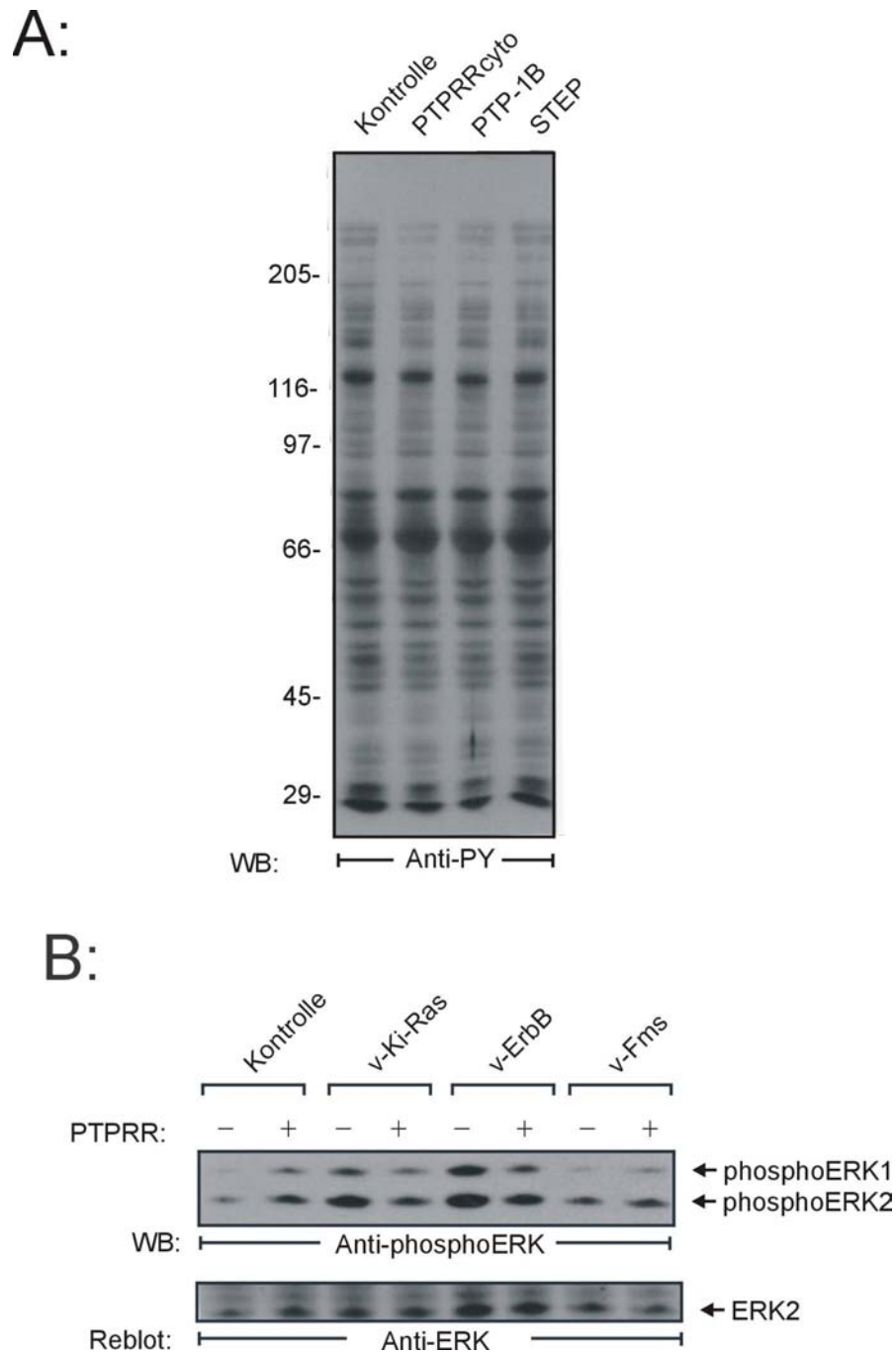
Eine weitere Eigenschaft von transformierten Zellen ist die Proliferation trotz Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Überexpression von HER2 tritt bei vielen Tumoren auf und kann zu einer unkontrollierten Proliferation von Zellen führen. Um den Einfluß der PTPRR auf diesen Prozeß zu testen, wurde NIH3T3-Zellen transient mit HER2 und PTPRR TM WT, PTPRR TM C563S oder Leervektor koinfiziert und in einem MTT-Wachstumsassay auf Proliferation in Medium mit einer Serumkonzentration, bei der sich nichttransformierte NIH3T3-Zellen nicht teilen, untersucht. Dabei konnte PTPRRcyto die HER2-induzierte Proliferation der Zellen stark verzögern, nicht jedoch eine katalytisch inaktive C563S-Mutante der PTPRR (Abb. 28). Der transformationsunterdrückende Effekt der PTPRR ist also nicht auf die Inhibition der Kontaktinhibition beschränkt.



**Abb. 28: PTPRR kann die HER2-induzierte Proliferation von NIH3T3-Zellen unter suboptimalen Serumkonzentrationen verzögern**

NIH3T3-Zellen wurden transient mit HER2 und PTPRR TM WT, PTPRR TM C563S oder Expressionsvektor pLXSN koinfiziert, auf 96-Loch-Schalen ausgesät und in Wachstumsmedium mit 4% FCS gehalten. Nach 1, 3, 5, 7 bzw. 9 Tagen wurden die Zahl der lebenden Zellen nach Zugabe von MTT gemessen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus vier voneinander unabhängigen Experimenten.



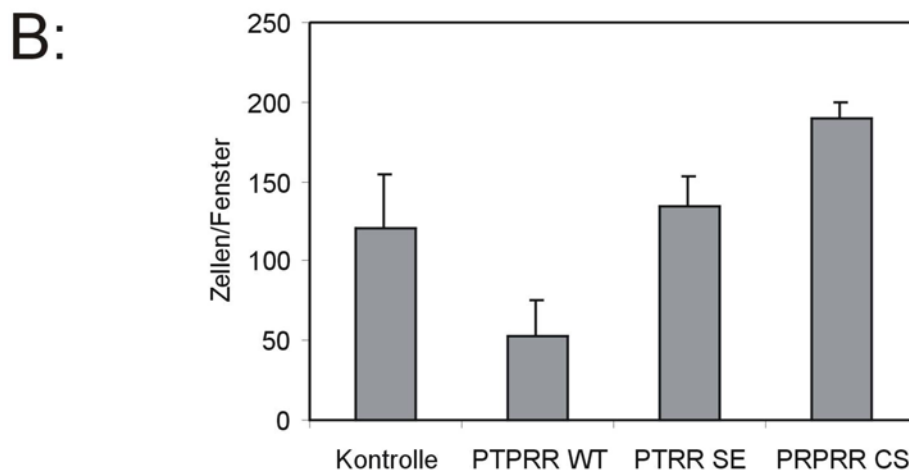
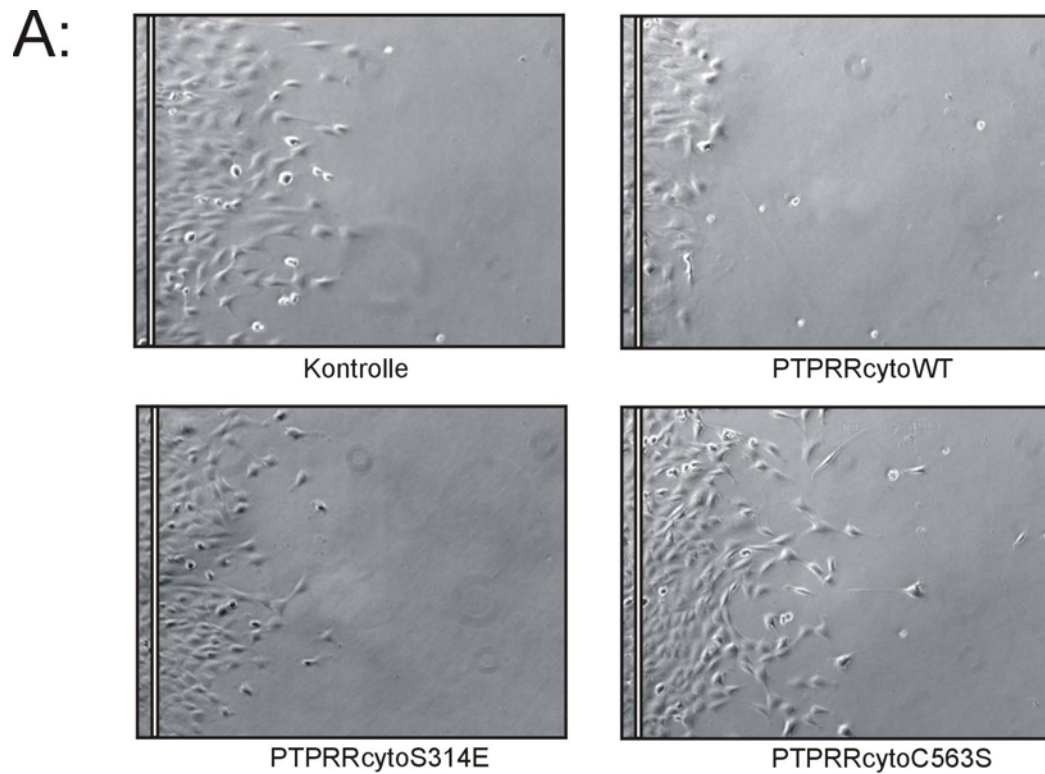


**Abb. 29: PTPRR verringert die von den Onkogenen v-Ki-Ras, HER2 und v-ErbB induzierte Phosphorylierung der ERK1/2**

**A:** NIH3T3-Fibroblasten, die mit Leervektor, mPTPRRcyto, der zur selben PTPase-Familie gehörenden STEP oder der ebenfalls zytoplasmatischen PTP1B im Expressionsvektor LXS<sub>N</sub> stabil infiziert worden waren, wurden auf 6cm-Schalen ausgesät und mit den Onkogenen v-Ki-Ras, HER2, v-ErbB und v-Fms infiziert. Die Zellen wurden 10 Tage in DME-Medium mit 4% FCS gehalten und lysiert. Die Lysate wurden über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa eingezeichnet **B:** Je 10µg der Lysate wurden über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-phosphoERK-Antikörper analysiert. Nach Ablösen des Anti-phosphoERK-Antikörpers wurde die Expression der ERK mit einem Anti-ERK-Antikörper nachgewiesen.

### 3.4.3 PTPRR verlangsamt die Migration von Zellen im Wundheilungsexperiment

Da die aktivierte ERK1/2 eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen spielt (Klemke *et al*, 1997; Graf *et al*, 1997; Stupack *et al*, 2000) und von PTPRR deaktiviert werden kann, lag es nahe, den Effekt der PTPRR auf die Migration zu untersuchen. Dazu wurden NIH3T3-Zellen, die mit mPTPRRcytoWT, mPTPRRcytoC563S und mPTPRRcytoS321E oder dem Expressionsvektor pLXSN stabil infiziert worden waren, nach Erreichen der Konfluenz, d.h. bei vollständiger Bedeckung des Schalenbodens mit Zellen, von einer geraden Linie ausgehend von einem Teilbereich der Schalen abgelöst. Bei diesem sogenannten Wundheilungstest bewegen sich Zellen entlang eines Wachstumsfaktorgradienten vom konfluenten in den freigelegten Bereich hinein, in dem weniger Wachstumsfaktoren verbraucht werden. 24h nach dem Ablösen der Zellen wurde die Migration unter dem Mikroskop analysiert. Im Ansatz mit der Vektorkontrolle ist die Migration deutlich zu erkennen; hier sind vereinzelte Zellen sichtbar, die Filopodien ausgebildet haben und in den freigelegten Bereich hineingewandert sind. Der Ansatz mit der S321E-Mutante zeigt ein ähnliches Migrationsverhalten wie der der Vektorkontrolle (Abb. 30A links oben und unten). Im Gegensatz dazu befinden sich beim Ansatz mit PTPRRcytoWT ebenfalls Zellen im freigelegten Bereich, die jedoch eine kompakte Lage ohne vereinzelte Zellen bilden und keine Anzeichen von Migration aufweisen (Abb. 30A oben rechts). Beim Ansatz mit PTPRRcytoCS kann zeigte sich eine verstärkte Migration im Vergleich zur Vektorkontrolle: hier sind mehr vereinzelte Zellen als in der Vektorkontrolle zu erkennen, die vereinzelten Zellen bilden längere Filopodien aus und wandern weiter in den freigelegten Bereich hinein (Abb. 30A, unten rechts). Die Zählung der in den freigelegten Bereich migrierten Zellen ergab ein ähnliches Bild (Abb. 30B). PTPRRcytoSE führt nicht zu einem signifikanten Rückgang der in den freigelegten Bereich migrierten Zellen. Die Expression der PTPRRcytoWT dagegen führt zu einem Rückgang auf ein Drittel und die der PTPRRcytoCS zu einer Steigerung um die Hälfte gegenüber der Vektorkontrolle. PTPRRcyto kann also die Migration von NIH3T3-Zellen verringern, wobei dieser Effekt sowohl von der Bindung an ERK als auch von der Phosphataseaktivität abhängt.



**Abb. 30: PTPRR verringert die Migration der NIH3T3-Zellen im Wundheilungsexperiment**

NIH3T3-Fibroblasten, die mit mPTPRRcytoWT, mPTPRRcytoC563S oder mPTPRRcytoS321E im Expressionsvektor pLXSN oder einem Kontrollvektor stabil transfiziert worden waren, wurden auf 6-cm-Schalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe einer Rasierklinge von einer geraden Linie ausgehend von den Schalen abgelöst, zweimal mit Medium gewaschen und in DME-Medium mit 4% FCS gehalten. 24h nach dem Ablösen wurde die Wanderung der Zellen in den freigelegten Bereich mit Videomikroskopie dokumentiert. Pro PTPRR-Konstrukt wurden je zwei Klone untersucht und zwei verschiedene Bilder wurden pro Klon ausgewertet. **A:** Repräsentative Bilder der Migration der stabilen Zelllinien **B:** Quantifizierung der Migration. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte von je zwei Aufnahmen zweier voneinander unabhängiger Klone. Dabei wurden diejenigen Zellen gezählt, die über die durch die weißen Balken gekennzeichneten Ränder der zusammenhängenden Zellschicht in den freigelegten Bereich hinein gewandert waren. Es wurden ausschließlich lebende Zellen gezählt.

## 4 DISKUSSION

Die Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung von Proteinen durch Kinasen und Phosphatasen ist ein verbreiteter Mechanismus zur Weiterleitung zellulärer Signale. Bei Prozessen, die zur Entstehung von Tumoren führen, ist das Phosphorylierungsgleichgewicht häufig gestört (Patarca, 1996; Kolibaba und Druker, 1997; Hunter, 1998).

Über die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPRR war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, daß sie in Tumorzelllinien in einem komplexen Spleißmuster in unterschiedlicher Stärke exprimiert wird (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Zudem lagen erste noch unveröffentlichte Daten vor, nach denen PTPRR die MAPKs ERK1/2 dephosphorylieren kann (R. Pulido, persönliche Mitteilung), welche zentrale Bestandteile zellulärer Signalwege sind und deren Aktivierung oft eine wichtige Rolle bei der Transformation von Zellen spielt (Cobb *et al*, 1994; Hendriks *et al*, 1995). In dieser Arbeit wurde die Funktion der PTPRR in der Signaltransduktion unter besonderer Berücksichtigung der Tumorentstehung untersucht. Dabei wurde auf Expression, Substrate und Bindungspartner, Regulation und biologische Funktion eingegangen.

### 4.1 Verbreitung und Vorkommen

Zu Beginn dieser Arbeit lagen Daten zum Vorkommen der PTPRR-mRNA aus Geweben der Maus vor, die eine Expression vorwiegend im Gehirn, aber auch im Kolon zeigten. (Ogata *et al*, 1995; Shiozuka *et al*, 1995; Augustine *et al*, 2000b). Zudem war in menschlichen Tumorzelllinien aus Kolon, Pankreas, Ovarien, Magen, Brust und in Glioblastomzelllinien ein komplexes Muster von Transkripten unterschiedlicher Länge nachgewiesen worden (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Daten zum Vorkommen der PTPRR auf Translationsebene lagen zu Beginn dieser Arbeit lediglich aus PC-12-Zellen und *in vitro* Translationsexperimenten vor (Sharma und Lombroso, 1995; Shiozuka *et al*, 1995; Ogata *et al*, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der PTPRR auf Proteinebene in verschiedenen Tumorzelllinien und Zelllinien aus nichttransformierten Geweben untersucht. Dabei wurden Banden mit 75, 71, 64 und 46 kDa detektiert, in Übereinstimmung mit *in vitro* Translationsexperimenten von Shiozuka und Ogata, bei denen unter anderem Proteine mit 74 und 62 kDa (Shiozuka *et al*, 1995) bzw. 46 kDa (Ogata *et al*, 1995) exprimiert wurden (siehe 3.1.1.1.). Ein Vergleich mit den theoretischen Molekulargewichten der verschiedenen alternativ gespleißten Transkripte (Augustine *et al*, 2000b) läßt vermuten, daß die Bande mit

75kDa der längsten transmembranen Isoform PTPRR FL (74kDa), die Bande mit 64kDa der PTPRR TM (65kDa) und die Bande mit 46kDa der zytoplasmatischen Isoform PTPRRcyto (46,5 kDa) entspricht. Diese Zuordnung wird durch die Tatsache unterstützt, daß diese drei Isoformen diejenigen zytoplasmatischen Bereiche enthalten, welche von den beiden hier eingesetzten Anti-PTPRR-Antikörpern erkannt werden.

Experimente zum Erstellen eines Expressionsprofils der PTPRR in verschiedenen Tumorzelllinien und –geweben mittels RT-PCR zeigten, daß hPTPRR sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumorzelllinien stärker exprimiert wird als in nichttransformierten Geweben und Zelllinien aus nichttransformierten Geweben (siehe 3.1.1.2). In Tumoren sind Proteinkinasen, insbesondere ERK1/2, häufig überdurchschnittlich aktiv und für den Transformationsprozeß verantwortlich (Kolibaba und Druker, 1997; Hunter, 1998). Viele dieser Kinasen werden durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Ursache für das verstärkte Vorkommen der hPTPRR-mRNA in Tumoren könnte ein Rückkopplungsmechanismus sein, mit dem die Zelle versucht, der Aktivierung der ERK1/2 oder anderer Proteinkinasen durch Dephosphorylierung entgegenzusteuern. Der mRNA-Level der hPTPRR lag in den exprimierenden Zelllinien um drei Größenordnungen unter dem des Kontrollgens Zyklophilin A. Ein geringer Expressionslevel wird bei vielen PTPasen beobachtet, da sie enzymatisch sehr aktiv sind und oft für das Wachstum und Überleben der Zellen wichtige Schlüsselenzyme dephosphorylieren. Für die Zuverlässigkeit dieser Daten spricht der Vergleich der über RT-PCR gewonnenen Ergebnissen mit denen aus dem Western-Blot, da sich hPTPRR bei Zelllinien, die eine überdurchschnittliche Expression der hPTPRR in der RT-PCR zeigen, mit Ausnahme der MDA-MB-231-Zellen auch im Western-Blot nachweisen lässt. Ein weiterer Beleg für die Qualität der Expressionsdaten ist die Beobachtung, daß hPTPRR sowohl in Northern-Blots (P. Knyazev, persönliche Mitteilung) als auch im Western-Blot in den Zelllinien SK-N-SH, SW948, Ovc3 und MDA-MB 415 die stärkste Expression aufweist.

Die Analyse der intrazellulären Verteilung der PTPRR über Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte, daß die Lokalisation der PTPRR über die Expression verschiedener Isoformen reguliert werden kann. Während die Isoform PTPRRcyto über das gesamte Zytoplasma verteilt ist, befindet sich die PTPRR FL in der perinukleären Region mit Konzentration in vesikulären Strukturen (siehe 3.1.2). Hervorzuheben ist dabei, daß die endogene PTPRR in SK-N-SH- und PC-12-Zellen, in denen PTPRR-Protein in den Größen der PTPRR FL und PTPRRcyto nachgewiesen wurde (siehe 3.1.2 und Shiozuka *et al*, 1995), ebenfalls im Zytoplasma mit Konzentration in der perinukleären Region vorkommt. Bei keiner der beiden Isoformen konnte eine Expression im Nukleus nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen

werden von Daten von Ogata *et al* (1999), Van Den Maagdenberg *et al* (1999) und Zuniga *et al* (1999) bestätigt, die zeigen konnten, daß PTPRR<sub>cyto</sub> im Zytoplasma und PTPRR<sub>TM</sub> an späten Endosomen lokalisiert ist, welche sich in der perinukleären Region befinden. Auch bei anderen Phosphatasen wie TC-PTP oder der mit PTPRR verwandten STEP kann die zelluläre Verteilung durch alternatives Spleißen reguliert werden (Ibarra-Sanchez *et al*, 2000; Bult *et al*, 1996).

Eine Lokalisation der PTPRR im Zytoplasma erscheint plausibel, da sich ein Großteil des zellulären Vorkommens der ERK1/2, eines Substrates der PTPRR (siehe 3.2.2), ebenfalls im Zytoplasma befindet und dort phosphoryliert wird. Nach Aktivierung durch Liganden werden viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen internalisiert und in endocytischen Vesikeln ins Zellinnere transportiert, von wo aus die Signale weitergeleitet werden (Ceresa und Schmid, 2000). Diese Internalisierung ist wichtig für die Aktivierung der ERKs (Kranenburg *et al*, 1999; DeFea *et al*, 2000). Zudem konnten Teile der ERK-Signalkaskade aus Komplexen mit späten Endosomen isoliert werden (Pol *et al*, 1998; Wunderlich *et al*, 2001). Die Expression einer Isoform der PTPRR, welche an späten Endosomen lokalisiert ist, könnte ein Mechanismus zur gezielten Regulation derjenigen ERK- und anderer Signalwege sein, welche von internalisierten Rezeptoren ausgehen. Mit einer nichtnukleären Lokalisation der PTPRR stimmt die Beobachtung überein, daß ausschließlich am Tyrosinrest des TEY-Motivs phosphorylierte ERK2 fast nur im Zellkern gefunden wurde (Cha und Shapiro, 2001). Zwar konnte zu einigen Zeitpunkten des Zellzyklus ausschließlich tyrosinphosphorylierte ERK2 auch im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Cha und Shapiro, 2001), hier könnte jedoch die Gegenwart der aktiven PKA eine Wechselwirkung von ERK2 und PTPRR verhindern (siehe 3.2.2).

Dualspezifische MAPK-Phosphatasen kommen mit Ausnahme der MKP-3 ausschließlich im Zellkern vor, während PTPRR und andere tyrosinspezifische MAPK-Phosphatasen im Zytoplasma lokalisiert sind (siehe 3.1.2 und Bult *et al*, 1996; Keyse, 1999; Zuniga *et al*, 1999). Dieses unterschiedliche Vorkommen gibt Anlaß zur Vermutung, daß die Dephosphorylierung zytoplasmatischer MAPKs eher durch tyrosinspezifische MAPK-Phosphatasen erfolgt, während für die Inaktivierung von MAPKs im Zellkern vorwiegend dualspezifische MAPK-Phosphatasen verantwortlich sind.

## 4.2 Assoziierte Proteine und Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit konnten anfangs noch unveröffentlichte Daten bestätigt werden, daß PTPRR die MAPKs ERK1/2 *in vitro* und *in vivo* bindet und dephosphoryliert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Zudem wurde ein Einfluß der überexprimierten PTPRR auf die ERK1/2-vermittelte Aktivierung der Transkription nachgewiesen und die Spezifität der PTPRR gegenüber den Mitgliedern der MAPK-Familie für ERK1/2 gezeigt (siehe 3.2.2.3 und 3.2.2.2). Nach Stimulus-spezifischer Aktivierung der ERKs durch Phosphorylierung am Threonin und Tyrosinrest des TEY-Aktivierungsmotivs werden diese in einem Zeitraum von einigen Minuten bis zu einigen Stunden, je nach Stimulus und Zelltyp, dephosphoryliert und deaktiviert (Traverse *et al.*, 1992; Marshall, 1995). Die biologischen Effekte der Stimuli hängen dabei von der Stärke und Dauer der Aktivierung der ERKs ab, welche wiederum von der Aktivität von MAPK-Phosphatasen beeinflusst werden kann (Rouyez *et al.*, 1997; Racke *et al.*, 1997; Dikic *et al.*, 1994). Zu Beginn dieser Arbeit waren aus höheren Eukaryonten nur MAPK-Phosphatasen bekannt, die Phospho-Threoninreste dephosphorylieren, wie PP2A, oder dualspezifisch für Phospho-Threonin und -Tyrosin sind, wie MKP1 und MKP3 (Camps *et al.*, 2000; Haneda *et al.*, 1999). Aus Studien mit dem PTPase-Inhibitor Pervanadat gab es bereits erste Hinweise, daß PTPasen eine Rolle bei der *in vivo* Regulation der MAPKs spielen (Alessi *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996). Mit PTPRR wurde erstmals eine MAPK-Phosphatase aus höheren Eukaryonten identifiziert, die spezifisch für Phospho-Tyrosinreste ist. Im Laufe dieser Arbeit konnte dies auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Karim und Rubin, 1999; Ogata *et al.*, 1999; Pulido *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 1998). Zudem wurde nachgewiesen, daß die Bindung der PTPRR an ERK über ein 16 Aminosäuren umfassendes Kinase-Interaktions-Motiv (KIM) in der Juxtamembranregion der PTPRR erfolgt, die katalytische Domäne jedoch im Gegensatz zu anderen PTPasen und vielen MAPK-Phosphatasen nicht an der Bindung dieses Substrates beteiligt ist (siehe 3.2.2.1 und Tonks und Neel, 2001; Keyse, 1999). Homologe ERK-Interaktionsmotive findet man ebenfalls bei anderen Bindungspartnern der ERKs wie Elk1, MEK oder RSK (Jacobs *et al.*, 1999) und in den Sequenzen der übrigen Mitglieder der STEP-Familie der PTPasen, denen ebenfalls nachgewiesen werden konnte, daß sie ERK binden und dephosphorylieren können (Saxena *et al.*, 1998; Zuniga *et al.*, 1999; Karim und Rubin, 1999; siehe Abb. 31). Eine Hypothese zur Existenz ähnlicher ERK-Bindungsdomänen bei Interaktionspartnern mit unterschiedlichen Funktionen wäre eine Kompetition der negativen und positiven Regulatoren um die Bindung der ERKs. Die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen,

welche die Aktivität von ERKn bestimmen, könnten so durch Konkurrenz von Kinasen und Phosphatasen um überlappende ERK-Bindungssequenzen feinreguliert werden. Eine weitere mögliche Aufgabe der KIME könnte eine Regulation der Lokalisation der ERKn durch Bindung an KIME-enhaltende Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation sein. So ist z.B. die Bindung von ERK1/2 an die katalytisch inaktive PTPRRcyto ausreichend, um eine Translokation der aktivierten ERK1/2 in den Zellkern zu verhindern (Pulido *et al*, 1998). Es wurde gezeigt, daß die *in vitro* Wechselwirkung zwischen ERK1/2 und PTPRR, die von ERK1/2 mit noch unbekanntem Ausmaß an Threonin phosphoryliert werden kann, unabhängig vom Aktivierungszustand der ERKn ist (siehe 3.2.1). Dies stimmt mit kristallographischen Daten überein, daß sich die ausgedehnte Substratbindungsregion der ERK2 weder nach Threonin- noch nach Tyrosinphosphorylierung ändert (Canagarajah *et al*, 1997). Der Einfluß anderer Proteinkinasen auf die Wechselwirkung zwischen ERK und PTPRR wurde jedoch nachgewiesen (siehe 3.3.2 und 4.3). Auffällig ist, daß PTPRR-Fragmente, die nur die Juxtamembranregion mit dem KIM enthalten, ERK besser binden als Fragmente mit der gesamten zytoplasmatischen Region (siehe 3.2.2.1). Ursache hierfür könnte eine Regulation der Bindung durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Regionen der PTPRR sein.

		*   * *   *   *	
PTPRR	(314)	GLQERRG <b>S</b> NVSLTLD <b>M</b>	(329)
STEP	(216)	GLQERRG <b>S</b> NVSLTLD <b>M</b>	(231)
He-PTP	(37)	RLQERRG <b>S</b> NVALMLD <b>V</b>	(52)
RSK1	(710)	I <b>L</b> AQRRV--RKLPSTT	(723)
Elk1	(310)	PQKGRKP--RDLE <b>L</b> PL	(324)
MEK1	(1)	MPK <b>K</b> K <b>K</b> P--T <b>P</b> I <b>Q</b> L <b>N</b> P	(13)

**Abb. 31: Vergleich der ERK-Interaktionsmotive der PTPRR, STEP, HE-PTP, RSK1, Elk1 und MEK1**

Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Positionen der Motive innerhalb der Sequenzen sind in Klammern angegeben, die für die Assoziation mit ERK wichtigen Reste sind mit Sternen (\*) gekennzeichnet (Pulido *et al*, 1998) und die von PKA phosphorylierten Serinreste sind durch Fettdruck hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren sind eingerahmt. Die Sequenzen sind nach Ogata *et al* (1995) (PTPRR), Sharma *et al* (1995) (STEP), Adachi *et al* (1992) (He-PTP), Alcorta *et al* (1989) (RSK1), Rao *et al* (1989) (Elk1) und Zheng und Guan (1993) (MEK1) nummeriert.



Weiterhin wurde der Nachweis erbracht, daß PTPRR spezifisch die Mitglieder der MAPK-Familie ERK1 und 2 dephosphoryliert, p38 Kinase dagegen kaum und JNK/SAPK nicht. Auch die der ERK1/2 sehr ähnliche ERK5/BMK ist ein Substrat der PTPRR (Eigene Beobachtung/Daten nicht gezeigt; M. Buschbeck, persönliche Mitteilung). Zuniga *et al* (1999) konnten zeigen, daß PTPRR in der Lage ist, sowohl ERK als auch p38 Kinase *in vitro* zu binden, nicht jedoch JNK/SAPK. Dies steht nicht im Widerspruch zu den hier erhaltenen Ergebnissen, da die Assoziation der PTPRR *in vitro* mit p38 Kinase wesentlich schwächer ist als die mit ERK1/2 (Zuniga *et al*, 1999). Auch für die übrigen Mitglieder der STEP-Familie der PTPasen, STEP, He-PTP und PTP-ER, konnte gezeigt werden, daß sie mit ERK1/2 assoziieren und deren Aktivität regulieren (siehe 3.2.2.2 und Saxena *et al*, 1998; Pulido *et al*, 1998; Karim und Rubin, 1999). Aufgrund der unterschiedlichen Verbreitung und Regulation dieser Phosphatasen ist es wahrscheinlich, daß die für die Dephosphorylierung eines bestimmten MAPK-Signalweges verantwortlichen PTPasen vom jeweiligen Zelltyp und Stimulus abhängen.

Beim Vergleich verschiedener Isoformen der PTPRR konnte gezeigt werden, daß die zytoplasmatische Isoform die EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung am stärksten reduziert, PTPRR TM eine schwächere Wirkung und die längste Isoform PTPRR FL unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen Einfluß auf die Phosphorylierung der ERK1/2 hat (siehe 3.2.2.2). Eine Erklärung für diese Differenzen könnte die unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen Isoformen der PTPRR sein. Ogata *et al* (1999) konnten über Immunfluoreszenz zeigen, daß PTPRR FL an der Plasmamembran lokalisiert ist, während ein Großteil der PTPRR TM mit Endosomen assoziiert (Van Den Maagdenberg *et al*, 1999). PTPRRcyto dagegen ist über das gesamte Zytoplasma verteilt (siehe 3.1.2 und Zuniga *et al*, 1999; Van Den Maagdenberg *et al*, 1999). Da sich ein Großteil des zellulären ERK-Vorkommens ebenfalls im Zytoplasma befindet, wird die Dephosphorylierung der ERK1/2 durch die räumliche Nähe der PTPRRcyto begünstigt. Bei Stimulation der MAPKs wird häufig nicht deren gesamtes zelluläres Vorkommen aktiviert sondern nur die Anteile, die durch spezifische Lokalisation oder Assoziation mit Gerüstproteinen kompartimentiert sind (Yasuda *et al*, 1999; Whitmarsh und Davis, 1998; Garrington und Johnson, 1999). So kann eine ERK1/2-Subpopulation mit Endosomen assoziieren und die von den dort internalisierten aktivierten RTKs ausgehenden Signale weiterleiten (Wunderlich *et al*, 2001). PTPRR TM könnte also die über internalisierte RTKs aktivierten MAPKs direkt am Ort der Aktivierung dephosphorylieren. Ogata *et al* (1999) fanden im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten keine Unterschiede zwischen den Phosphataseaktivitäten der PTPRRcyto und der PTPRR FL

gegenüber ERK1/2. Die Bedingungen in dem von Ogata *et al* (1999) eingesetzten System waren jedoch artifizieller als die in dieser Arbeit gewählten, da dort zusätzlich zur PTPase ERK überexprimiert wurde und größere Mengen DNA transfiziert wurden. Die Überexpression von PTPasen zusammen mit tyrosinphosphorylierten Proteinen führt jedoch oft zu einer unspezifischen Dephosphorylierung.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt, daß PTPRR die katalytische Aktivität der ERK1/2 verringern und die ERK1/2-vermittelte Transkriptionsaktivierung reduziert (siehe 3.2.2.3). Dabei hat die Isoform PTPRRcyto einen doppelt so starken Effekt wie die Isoform PTPRR FL. Dieser Unterschied kann durch die stärkere Dephosphorylierung der ERK1/2 durch PTPRRcyto im Vergleich zur PTPRR FL erklärt werden (siehe 3.2.2.2). Eine katalytisch inaktive PTPRR TM C563S-Mutante hat dagegen keinen Einfluß auf die Transkriptionsaktivierung, obwohl sie in der Lage ist, ERK über das KIM-Motiv zu binden. Nach Berichten von Zuniga *et al* (1999) kann die PTPRRcyto C563S-Mutante die Translokation der ERK1/2 in den Zellkern verhindern (Zuniga *et al*, 1999), was den Ergebnissen von Brunet *et al* (1999) zufolge die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren unterbinden sollte. Eine Erklärung für diese scheinbare Diskrepanz könnte die endosomale Lokalisation der PTPRR TM CS sein, durch welche die Phosphatase nur einen Teil des zellulären ERK1/2-Vorkommen binden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch Experimente von Ogata *et al* (1999) bestätigt, bei denen eine Verminderung der Transkriptionsaktivierung durch eine zytoplasmatische Isoform und eine schwächere Verminderung durch eine transmembrane Isoform der PTPRR erfolgte, während eine katalytisch inaktive C/S-Mutante der PTPRR nur geringe Wirkung zeigte. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit der zur selben Familie gehörenden He-PTP erzielt werden, welche ebenfalls ein KIM enthält (Saxena *et al*, 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein weiteres Protein identifiziert, dessen Phosphorylierung PTPRR negativ beeinflusst (siehe 3.2.4): das Motorprotein KIF1C (Kinesin-Interaktionsfaktor 1C), welches am retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist (Dorner *et al*, 1999). Die Spezifität dieser Dephosphorylierung konnte durch den Vergleich mit anderen Phosphatasen wie etwa der zur selben PTPase-Familie gehörenden zytoplasmatischen He-PTP belegt werden, die keinen oder nur geringen Einfluß auf die Phosphorylierung des KIF1C hatten. Die Isoformen der PTPRR zeigten Unterschiede in der Dephosphorylierung des KIF1C: PTPRRcyto unterdrückte die Phosphorylierung fast vollständig, PTPRR TM hatte eine etwas schwächere und PTPRR FL die geringste Wirkung. Ähnliche Effekte der unterschiedlichen PTPRR-Isoformen wurden

auch auf die ERK-Phosphorylierung nachgewiesen (siehe 3.2.2.2). Ebenso wie bei ERK könnte die Lokalisation der PTPRR-Isoformen bei der Dephosphorylierung des KIF1C eine Rolle spielen, da PTPRRcyto wie KIF1C im Zytoplasma lokalisiert ist (Dorner *et al*, 1999) und die räumliche Nähe eine Dephosphorylierung begünstigen würde. Einen weiteren Hinweis auf eine funktionelle Verbindung des KIF1C und PTPRR lieferte die Auswertung der Expressionprofile von mRNAs in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien und apoptoseresistenten Klonen der HeLaS3-Zervixkarzinomzelllinie (R. Abraham, persönliche Mitteilung). Dabei korrelierte das Vorkommen der PTPRR-mRNA in den verschiedenen Zelllinien und Klonen stark mit dem des KIF1C, was ein möglicher Hinweis auf eine Beteiligung beider Proteine an den selben Signalwegen ist. Mit PTPRR ist die erste PTPase identifiziert worden, die einen Effekt auf die Phosphorylierung des KIF1C hat. Eine Interaktion von PTPRR und KIF1C *in vivo* konnte nicht nachgewiesen, lediglich eine schwache Wechselwirkung *in vitro* wurde gezeigt (Daten nicht aufgeführt). Diese Interaktion könnte jedoch transient sein, ebenso wie die der PTPRR und PKA, deren Assoziation bisher nicht nachgewiesen wurde, obwohl PKA PTPRR *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert (siehe 3.3.2.2 und Pulido *et al*, 1998). Zudem besteht die Möglichkeit, daß der Effekt der PTPRR auf die Phosphorylierung des KIF1C indirekt ist, wie etwa über die Regulation der Aktivität der c-Src-Kinase. Bislang gibt es noch keine Hinweise auf die physiologische Bedeutung einer Dephosphorylierung des KIF1C durch PTPRR, da KIF1C bisher nur über Koexpression der c-Src-Kinase oder Stimulation mit Peroxovanat phosphoryliert werden konnte. Die Tatsache, daß das Vorkommen der PTPRR-mRNA in enger Korrelation mit dem von KIF1C in apoptoseresistenten Klonen erhöht ist, läßt jedoch eine Zusammenwirken beider Proteine in antiapoptotischen Signalwegen möglich erscheinen.

Zwei weitere Proteine, deren Wechselwirkung mit GST-PTPRR in diese Arbeit gezeigt werden konnte, sind die Hitzeschockproteine HSC70 und GRP78 (siehe 3.2.3), welche als Chaperone die korrekte Faltung ihrer Substrate vermitteln. In vielen Fällen ist die Bindung von Hitzeschockproteinen an rekombinante Proteine unspezifisch (Mayer und Bukau, 1998), in dieser Arbeit wurde jedoch die Spezifität der Bindung des HSC70 und GRP78 an PTPRR nachgewiesen, da die Wechselwirkung von ATP abhängig war. Diese ATP-Abhängigkeit ist Kennzeichen für die Bindung von HSP70-Proteinen an Substrate, wie etwa das Tumorsuppressorgen p53 oder pRB (Hainaut und Milner, 1992; Nihei *et al*, 1993a; Nihei *et al*, 1993b). Ein weiterer Hinweis für die Spezifität dieser Wechselwirkung ist die selektive Bindung von HSC70 und GRP78 an die Juxtamembrandomäne der PTPRR, nicht jedoch an andere Domänen. GRP78 ist an der Innenseite der ER-Membran lokalisiert und an der

Faltung neusynthetisierter Proteine sowie am Zusammenbau von Proteinkomplexen beteiligt (Gething, 1999). Möglicherweise übt GRP78 auch gegenüber PTPRR eine solche Funktionen aus. HSC70 ist am lysosomalen Transport von Proteinen und somit am Proteinabbau beteiligt; ein Großteil davon ist ebenso wie PTPRRcyto im Zytoplasma lokalisiert (Agashe und Hartl, 2000; Kiang und Tsokos, 1998; Mayer und Bukau, 1998; Ohtsuka und Hata, 2000). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit beobachtete Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK1/2 sind die Daten von Stewart *et al* (1999) interessant, daß HSP70 zusammen mit KSR (Kinase-Suppressor von Ras) und HSP90 in einem Multiprotein-Signalkomplex mit den ERK1/2-Aktivatoren MEK1 und 2 assoziiert vorliegen kann (Kolch, 2000; Helmbrecht *et al*, 2000). Zudem wurden von Denouel-Galy *et al* (1998), Yu *et al* (1998) und Jacobs *et al* (1999) auch Assoziationen von KSR mit Raf-1 und ERK nachgewiesen. Eine Reihe von Daten deuten darauf hin, daß Gerüstproteine wie KSR am Aufbau von Multiprotein-MAPK-Komplexen beteiligt sind, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Ras-Signalwegs spielen (Morrison, 2001). Die Bindung des HSC70 an die ERK-Phosphatase PTPRR könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung von HSP70 an einem solchen Multiprotein-MAPK-Komplex darstellen, zumal auch Assoziationen des HSP70 mit der MAPKKK Mos-1 (Liu *et al*, 1999) und mit dem ERK-Substrat pRB nachgewiesen werden konnten (Nihei *et al*, 1993b; Abe und Kufe, 1984; Kuo *et al*, 1995; Helson und Helson, 1985; Sidell *et al*, 1986). Möglicherweise könnte HSP70 auch als Bestandteil eines Multiprotein-MAPK-Komplexes zur Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen ERK und PTPRR beitragen. Mit einem solchen Modell würden die Beobachtungen übereinstimmen, daß sowohl die Interaktion von PTPRR mit HSP70 (siehe 3.2.3) als auch mit ERK1/2 (Zuniga *et al*, 1999) ATP-abhängig ist. Eine weitere mögliche Funktion der Interaktion von HSC70 und PTPRR wäre die Stabilisierung der funktionellen Integrität der PTPRR unter ATP-Verbrauch, wie dies auch für das HSC70-Substrat Mos-1 nachgewiesen wurde (Liu *et al*, 1999).

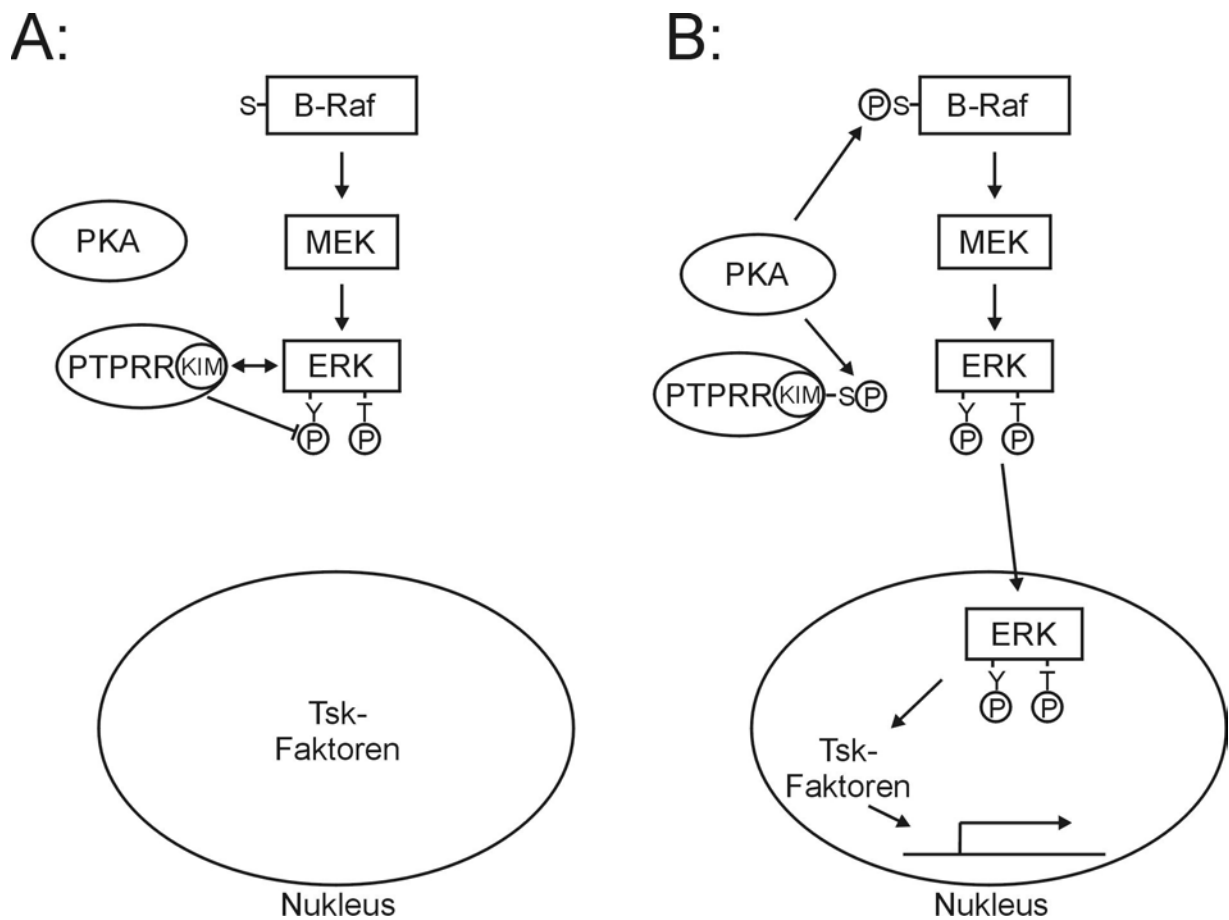
### 4.3 Regulation

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der Level der PTPRR-mRNA in humanen Zelllinien aus verschiedenen Geweben durch Stimuli, welche die Differenzierung auslösen, reguliert werden kann (siehe 3.3.1). In SW948-Kolonkarzinomzelllinien konnte eine Steigerung des PTPRR-mRNA-Vorkommens nach Zugabe des Differenzierungsagens TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) detektiert werden. Da die Differenzierung von Kolonkarzinomzelllinien mit einer Reduktion der ERK1/2-Aktivität einhergeht (Taupin und Podolsky, 1999; Ding *et*

al, 2001) und PTPRR ERK1/2 inaktivieren kann, erscheint eine funktionale Beteiligung der PTPRR an der Differenzierung dieser Zellen möglich. Für PC-12 Pheochromocytoma-Zelllinien aus der Ratte konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Stimulation mit dem Differenzierungsagens NGF die PTPRR-mRNA induziert (eigene Beobachtung/Daten nicht gezeigt; Sharma und Lombroso, 1995). In SK-N-SH Neuroblastomzelllinien dagegen wurde eine Verringerung der PTPRR-mRNA-Expression nach Stimulation mit dem Differenzierungsagens Retinolsäure beobachtet (siehe 3.3.1). Eine solche Reduktion könnte Voraussetzung für die verstärkte ERK1/2-Aktivität im Zellkern sein, welche bei der Differenzierung humaner Neuroblastomzelllinien beobachtet wird (Olsson *et al*, 2000), da PTPRR sowohl ERK1/2 dephosphorylieren als auch deren Translokation in den Zellkern verhindern kann (siehe 3.2.2.2 und Pulido *et al*, 1998). Die differentielle Regulation der PTPRR-Expression in diesen Zelllinien könnte ein Hinweis dafür sein, daß PTPRR in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Funktionen übernimmt.

PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) kann abhängig vom Zelltyp und Stimulus die Aktivität der MAPKs über die Phosphorylierung von MEKKs beeinflussen, welche von Ras-ähnlichen GTPasen aktiviert werden. So kann PKA beispielsweise den ERK1/2-Signalweg über die Phosphorylierung des B-Raf stimulieren, die Aktivierung des Raf-1 jedoch inhibieren (Vossler *et al*, 1997; Miller *et al*, 1998). Darüber hinaus ist bekannt, daß PKA in PC-12-Zellen, Neuronen des Hippocampus und präsynaptischen Neuronen die Translokation der ERK1/2 in den Zellkern über einen noch ungeklärten Mechanismus begünstigt (Michael *et al*, 1998; Impey *et al*, 1998; Yao *et al*, 1998). In dieser Arbeit wurde eine weitere Verknüpfung der PKA- und ERK1/2-Signalwege aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, daß PKA den Serinrest 321 des KIM der PTPRR phosphorylieren und dadurch die Bindung und Dephosphorylierung der ERK1/2 inhibieren kann (siehe 3.3.2). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit der Existenz eines neuartigen Mechanismus, über den PKA die Aktivierung der ERK1/2 reguliert (siehe Schema 1). Bei diesem Mechanismus würde sich in bestimmten Zelltypen ein Teil des zellulären Vorkommens an inaktiven ERK1/2 außerhalb des Zellkerns befinden und von PTPRR oder anderen KIM-enthaltenden PTPasen wie PTP-STEP oder HE-PTP komplexiert werden. Die Dissoziationskonstante dieses Komplexes würde von der Aktivität der PKA geregelt werden, welche vom Stimulus und Zelltyp abhängt. Eine Stimulation der PKA-Aktivität würde zu einer Phosphorylierung eines Serinrestes innerhalb des KIM führen und dadurch die Dissoziation des Komplexes von Phosphatase und MAPK begünstigen, so daß nach PKA-Aktivierung die Tyrosinophosphorylierung der MAPKs und deren Translokation in den Kern ermöglicht wird. Zudem wäre das KIM-Bindungsmotiv der

ERK für die Interaktion mit den KIMen anderer MAPK-Effektoren wie MEK1 oder Elk-1, in denen sich keine PKA-Phosphorylierungsstellen befinden (siehe Abb. 31), besser zugänglich, was sowohl die Aktivierung der MAPKs als auch deren Wechselwirkung mit Substraten erleichtern würde. Ein solches Modell wurde auch von Augustine *et al* (2000b) diskutiert. Eine Mutation des durch PKA phosphorylierten Serins 314 zu Glutamat, welche die negative Ladung des Phosphatrestes und somit die Phosphorylierung nachahmt, inhibierte in einem Wundheilungsexperiment den Effekt der PTPRR vollständig (siehe 3.4.3).



**Schema 1: Modell zum Mechanismus der Regulation der ERK-Signalkaskade durch PKA und PTPRR**

**A:** Ist das KIM nicht serinphosphoryliert, kann PTPRR ERK binden und dephosphorylieren. Eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wird dadurch verhindert. **B:** PKA kann über zwei verschiedene Wege zur Aktivierung der ERK beitragen. Zum einen aktiviert PKA B-Raf über Serinphosphorylierung, zum anderen phosphoryliert PKA das KIM der PTPRR, das für die Bindung an ERK verantwortlich ist. Dadurch wird die Dephosphorylierung der ERK verhindert und deren Translokation in den Nukleus ermöglicht.

Dies könnte ein möglicher Anhaltspunkt dafür sein, daß die Phosphorylierung der PTPRR durch PKA eine Rolle bei der Migration von Zellen spielt. Eine weitere mögliche physiologische Bedeutung der Phosphorylierung der PTPRR durch PKA könnte die Feinregulation des ERK1/2-Signalweges nach der Stimulation von Zellen mit dem G-Protein-gekoppeltem Rezeptor-Liganden Bradykinin sein (M. Sommer, persönliche Mitteilung).

Während der Durchführung dieser Arbeit wurden von Blanco-Aparicio *et al* (1999) Daten veröffentlicht, die ebenfalls auf eine Negativregulation der Bindung der PTPRR und ERK1/2 über Phosphorylierung des KIM durch PKA hinweisen. Dabei wurde gezeigt, daß die Behandlung von Zellen mit Okadasäure, einem Inhibitor der PP2A (Protein-Phosphatase 2A), zur Hyperphosphorylierung des von PKA phosphorylierten Serinrestes der PTPRR führt, was eine Dephosphorylierung des Serins 321 durch PP2A nahegelegt. Die für die Bindung an ERK1/2 verantwortlichen Aminosäuren der PTPRR (Zuniga *et al*, 1999) sind bei den anderen Mitgliedern der STEP-Familie der PTPasen, STEP, He-PTP und PTP-ER, konserviert; diese können ebenfalls mit MAPK<sub>n</sub> assoziieren und deren Aktivität regulieren (Saxena *et al*, 1998; Karim und Rubin, 1999). Während der Durchführung dieser Arbeit wurden Daten von Saxena *et al* (1999) veröffentlicht, die zeigen, daß PKA die Wechselwirkung zwischen He-PTP und ERK1/2 über die Phosphorylierung des KIM negativ beeinflussen kann. Auch für STEP wurde ein solcher Mechanismus gezeigt (Paul *et al*, 2000). Zudem wurden in der Sequenz der PTPase PTP-ER aus *Drosophila*, welche ebenfalls MAPK<sub>n</sub> inaktivieren kann, drei Kinase-Interaktions-Motive gefunden, die ebenfalls Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch PKA enthalten (Karim und Rubin, 1999). Die PKA-vermittelte Regulation der MAPK-Aktivität über die Phosphorylierung der Kinase-Interaktions-Motive von PTPasen ist also ein verbreiteter Mechanismus.

## 4.4 Biologische Funktion

In 3.4.1 wurde gezeigt, daß PTPRR die basale und PDGF-induzierte Proliferation von NIH3T3-Zellen verringert. Eine Reihe von Beobachtungen deutet darauf hin, daß dieser Effekt auf die Dephosphorylierung der ERK1/2 durch PTPRR zurückzuführen ist: 1) PTPRR verringert die PDGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung (siehe 3.2.2.2). 2) Die Aktivierung der ERK1/2 ist für die PDGF-vermittelte Stimulation der Proliferation von NIH3T3-Zellen notwendig (Chang und Karin, 2001; Posas *et al*, 1996). 3) Eine S321E-Mutation der PTPRR, welche die ERK1/2-Bindung stark einschränkt, führt zu einer Reduktion des Effektes. Eine katalytisch inaktive C/S-Mutante der PTPRR übt keine Wirkung auf die Proliferation aus,

obwohl sie in der Lage ist, ERK1/2 über das KIM-Motiv zu binden. Dies sollte nach Daten von Zuniga *et al* (1999) eine Translokation der ERK1/2 in den Zellkern verhindern und so theoretisch die Aktivierung nukleärer Substrate wie Transkriptionsfaktoren unterbinden. In Transkriptions-Aktivierungsexperimenten mit PTPRR bzw. He-PTP, welche ebenfalls ein KIM enthalten, wurde jedoch gezeigt, daß die C/S-Mutanten keinen oder nur geringen Effekt auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch ERK haben (siehe 3.2.2.2 und Ogata *et al*, 1999; Saxena *et al*, 1999). Zudem kann ERK die Proliferation von Zellen über die Phosphorylierung zytoplasmatischer Substrate wie der Carbamoylphosphat-Synthetase oder der S6-Kinase beeinflussen (Caraglia *et al*, 2000; Graves *et al*, 2000; Smith *et al*, 1999). Die Beobachtung, daß die Proliferation nicht vollständig von PTPRR reduziert werden kann, stimmt mit den Resultaten von Kashige *et al* (2000) überein, die zeigen, daß eine Inhibition des ERK-Signalwegs nur zu einer partiellen Inhibition der Proliferation von Fibroblasten führt. Ein negativer Einfluß der zytoplasmatischen Form der PTPRR auf die Zellteilung wurde auch von Augustine *et al* (2000a) gezeigt. Diese wiesen über den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden nach, daß die Inhibition der Expression der PTPRR in Chondrozyten einen Anstieg der Proliferation zur Folge hat.

Um einen möglichen Einfluß der PTPRR auf die Tumorentstehung zu untersuchen, wurde die Wirkung der Überexpression der PTPRR auf die durch Onkogene induzierte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten getestet. Dabei wurde auf Verlust der Kontaktinhibition geprüft, d.h. auf ein Wachstum von Zellen trotz dichter Einbettung in eine Schicht aus Nachbarzellen. Sowohl PTPRR als auch STEP verhinderten die Transformation von NIH3T3-Fibroblasten durch v-Ki-Ras und Her2, hatten jedoch keinen Einfluß auf die Transformation durch die Onkogene v-ErbB und v-Fms (siehe 3.4.2). Gleichzeitig wurde die durch die Onkogene induzierte Phosphorylierung der ERK1/2 durch Überexpression der PTPRR verringert. Im Gegensatz dazu hatte PTP1B, die der STEP-Familie der PTPasen nächstverwandte zytoplasmatische PTPase (Hooft van Huijsduijnen, 1998), keine oder nur geringe Wirkung auf die Transformation durch diese Onkogene, was auf die Spezifität der von PTPRR und STEP vermittelten Effekte hindeutet.

Aus diesen Daten folgt, daß 1) PTPRR und PTP-STEP über das Potential verfügen, dem Prozeß der Transformation von Zellen entgegenzuwirken und 2) ERK1/2 nicht an den von v-Fms und v-ErbB ausgehenden Signalwegen, die zum Verlust der Kontaktinhibition führen, beteiligt ist (siehe 3.2.2). Dies stimmt mit Ergebnissen von Meyer *et al* (1994) überein, daß die Aktivierung der ERK1/2 durch v-ErbB nicht zur Transformation von Zellen führt. Die Tatsache, daß ERK1/2 die gemeinsamen Substrate von PTPRR und von STEP sind,



unterstützt die Interpretation, daß PTPRR ihren transformationsvermindernden Effekt auf v-Ki-Ras und Her2 über die Inaktivierung der ERK1/2 ausübt. Für diese Deutung sprechen auch die Beobachtungen, daß PD98059, ein Inhibitor des ERK1/2 Signalwegs (Dudley *et al*, 1995), die v-Ki-Ras- und Her2-induzierte Transformation ebenfalls unterdrückte (eigene Beobachtung/Daten nicht gezeigt), und daß die Aktivierung der ERK1/2 wichtig für die v-Ki-Ras-vermittelte Transformation von Fibroblasten ist (Troppmair *et al*, 1994). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß die Überexpression der dualspezifischen MAPK-Phosphatase MKP-1 die Ras-induzierte ERK-Aktivierung ebenfalls reduzieren kann (Sun *et al*, 1994).

Es gibt widersprüchliche Daten über die Bedeutung der JNK- und ERK1/2-Signalwege für die Transformation von Zellen durch Her2 (Amundadottir und Leder, 1998; Kurebayashi, 2001; Tari *et al*, 1999; Nowak *et al*, 1997). Da ERK1/2, nicht jedoch JNK von PTPRR dephosphoryliert wird (siehe 3.2.2.2), liefern die hier erzielten Ergebnisse Hinweise für eine Rolle der ERK1/2 bei der Transformation von Zellen durch Her2. Interessant ist, daß PTPRR und STEP die Transformation durch Her2, nicht jedoch durch v-ErbB unterdrücken, da beide Rezeptortyrosinkinasen Mitglieder der EGFR-Familie sind und ähnliche Signalwege aktivieren (Arteaga, 2001; Gullick, 1998). Bemerkenswert ist außerdem, daß das für STEP codierende Gen in der chromosomalen Region 11p15.1-p15.2 liegt, in welcher bei Tumoren häufig Deletionen auftreten (Kerangueven *et al*, 1997; Osborne und Hamshere, 2000), was ein weiterer Hinweis auf eine Rolle der STEP als Tumorsuppressorprotein sein könnte. Der transformationsunterdrückende Effekt der PTPRR ist nicht auf den Verlust der Kontaktinhibition beschränkt. PTPRR kann die Her2-induzierte Proliferation von NIH3T3-Fibroblasten unter Reduktion von Wachstumsfaktoren verlangsamen (siehe 3.4.3). Eine Überexpression des Her2 tritt in vielen Tumorarten auf und kann unter anderem zu unkontrollierter Proliferation führen (Klapper *et al*, 2000).

Ein weiterer in dieser Arbeit gefundener Effekt der Überexpression der PTPRR ist die Verringerung der Migration von NIH3T3-Zellen (siehe 3.4.3). Diese Reduktion läßt sich der Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK1/2 zuschreiben, da die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs essentiell für die Migration ist (Krueger *et al*, 2001; Rikitake *et al*, 2000; Anand-Apte *et al*, 1997), PTPRR ERK1/2 inaktiviert und die Einführung einer Ser321Glu-Mutation in PTPRR, welche die Bindung der ERK1/2 inhibiert, die Wirkung rückgängig macht. Der Effekt dieser Mutation, welche die Phosphorylierung der PTPRR durch PKA imitiert, bietet eine mögliche Erklärung für den positiven Effekt der PKA auf die Migration von Zellen (Young *et al*, 1992; Elferink und de Koster, 1998). PKA könnte, zusätzlich zu

einer Aktivierung der ERK1/2 über B-Raf, durch die Phosphorylierung von KIM-enthaltenden PTPasen die Bindung und Dephosphorylierung der ERK1/2 verhindern, deren Aktivierung für die Migration von Zellen essentiell ist. Bemerkenswert ist, daß die katalytisch inaktive CS-Mutante der PTPRR die Migration von Fibroblasten im Vergleich zur Vektorkontrolle verstärkt. Eine mögliche Erklärung wäre eine Kompetition um die Bindung der ERK1/2 mit anderen MAPK-Phosphatasen, welche über die selben Bindungsstellen wie PTPRR CS an ERK1/2 binden. Eine weitere Deutungsmöglichkeit wäre eine Retention der aktivierten ERK1/2 durch PTPRR CS im Zytoplasma. Dies brächte ERK1/2 in die räumliche Nähe ihres zytoplasmatischen Substrates MLCK (Myosin-Leichte-Kette-Kinase), das für den migrationsstimulierenden Effekt der ERK1/2 verantwortlich ist (Klemke *et al*, 1997). Die Verminderung der zellulären Migration über die Dephosphorylierung der ERK1/2 ist eine weitere potentiell tumorunterdrückende Wirkung der PTPRR, da die Migration von Tumorzellen wichtig für deren Invasivität ist und die Inhibition der ERK1/2 die Migration und Invasivität von Tumorzellen verhindern kann (Krueger *et al*, 2001; Gu *et al*, 1998; Cho und Klemke, 2000).

## 4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß PTPRR die MAPKs ERK1 und 2, deren Aktivierung häufig in Tumoren beobachtet wird und die zur Transformation von Zellen führen kann (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Cobb *et al*, 1994; Sebolt-Leopold, 2000), dephosphoryliert und inaktiviert. Außerdem wurde ein negativer Einfluß der Überexpression der PTPRR auf die Proliferation und Migration von Zellen gezeigt, welche an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Krueger *et al*, 2001; Gu *et al*, 1998; Cho und Klemke, 2000), sowie auf den durch verschiedene Onkogene induzierten Verlust der Kontaktinhibition. Diese Daten deuten auf eine potentiell tumorsupprimierende Wirkung der PTPRR hin. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß der Expressionslevel der PTPRR in Tumorzelllinien und -geweben im Vergleich zu nichttransformierten Zelllinien und Geweben erhöht ist. Dies könnte ein Hinweis auf einen Rückkopplungsmechanismus sein, mit dem Zellen versuchen, die durch Onkogene häufig hyperaktivierten ERKs negativ zu regulieren. Um die Rolle der PTPRR bei der Entstehung von Tumoren weiter zu charakterisieren, sollte man den Expressionlevel der PTPRR in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Tumoren bestimmen und gleichzeitig die Aktivierung der ERKs untersuchen. Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen dual- und

---

tyrosinspezifischen MAPK-Phosphatasen bei der Tumorentstehung. Dabei könnten zelltyp- und gewebespezifische Unterschiede eine wichtige Rolle spielen, da die Expression der verschiedenen MAPK-Phosphatasen stark vom Zell- und Gewebetyp abhängt (Camps *et al*, 2000). Zudem stellt sich die Frage nach der Bedeutung der PKA bei diesem Prozeß, da sie die Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK inhibieren kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion der PTPRR in der zellulären Signaltransduktion mit den Schwerpunkten Substrate, Regulation und Beteiligung an biologischen Prozessen. Von besonderem Interesse war die Rolle der PTPRR bei der Tumorentstehung und Transformation von Zellen. Dabei wurden zu Beginn dieser Arbeit noch unveröffentlichte Daten bestätigt, daß PTPRR die MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) ERK1 und 2 (extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2) über ein neuartiges MAPK-Bindungsmotiv, das KIM (Kinase-Interaktions-Motiv), sowohl *in vitro* als auch *in vivo* binden und dephosphorylieren kann. Somit ist PTPRR die erste tyrosinspezifische Phosphatase, der eine Dephosphorylierung von MAPKs in höheren Eukaryonten nachgewiesen wurde. Eine weitere Analyse durch transiente Überexpression der PTPRR in HEK293-Zellen ergab, daß PTPRR spezifisch die MAPKs ERK1/2, nicht jedoch p38 Kinase oder JNK/SAPK dephosphoryliert. Zudem wurde über Transkriptionsaktivierungsexperimente der Nachweis erbracht, daß PTPRR die ERK1/2-vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren negativ beeinflussen kann. Bei der näheren Untersuchung der Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK1/2 wurde eine vorher unbekannte Verknüpfung des PKA(cAMP-abhängige Proteinkinase)- mit dem ERK-Signalweg aufgedeckt. Es wurde gezeigt, daß PKA den im KIM gelegenen Serinrest in der Position 321 der Aminosäuresequenz der PTPRR phosphoryliert und so die Bindung und Dephosphorylierung der ERK1/2 *in vivo* inhibieren kann. Dies weist auf einen neuartigen Mechanismus hin, über den PKA die Aktivierung des MAPK-Signalwegs reguliert.

Ein weiterer Effekt, der PTPRR in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ist die Inhibition der c-Src-induzierten Phosphorylierung des KIF1C (Kinesin-Interaktionsfaktor 1C), welcher am retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist. Damit wurde PTPRR als erste PTPase mit einer Dephosphorylierung des KIF1C in Verbindung gebracht.

Über *in vitro*-Assoziation mit GST-PTPRR im präparativen Maßstab mit anschließender Sequenzierung der gebundenen Proteine wurden die Hitzeschockproteine HSP70 und GRP78 als *in vitro* Bindungspartner der PTPRR identifiziert. Die nähere Untersuchung der Bindung ergab, daß diese innerhalb der Juxtamenbrandomäne der PTPRR erfolgt und von ATP abhängig ist. Diese Art der Bindung ist ein Anzeichen dafür, daß die Wechselwirkung spezifisch und PTPRR ein Substrat der Chaperone HSP70 und GRP78 ist, welche für die

korrekte Faltung von Proteinen sorgen. Da HSP70 ebenfalls mit anderen Mitgliedern des ERK-Signalwegs wechselwirken kann und zudem aus Komplexen mit den MAPK-Kaskade-Gerüstproteinen KSR und HSP90 isoliert wurde, ergibt sich aus der Assoziation von PTPRR und HSP70 die Möglichkeit einer Beteiligung an einem Multiprotein-ERK-Signalkomplex.

Bei der Analyse der endogenen Proteinexpression der PTPRR wurde erstmals das Auftreten verschiedener Isoformen in humanen Zellen nachgewiesen. Über Immunfluoreszenz wurde gezeigt, daß die zytoplasmatische Isoform PTPRR<sub>cyto</sub> im gesamten Zytoplasma vorkommt, während die Isoform PTPRR<sub>TM</sub> in perinukleären Vesikeln lokalisiert ist. Ein Vergleich der Effekte verschiedener überexprimierter Isoformen zeigte Unterschiede sowohl bei der PDGF-induzierten Phosphorylierung der ERK1/2 als auch bei der c-Src-vermittelten Phosphorylierung des KIF1C. Zudem wurden in Transkriptionsaktivierungsexperimenten Unterschiede in der ERK1/2-vermittelten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren detektiert. In allen Fällen hatte die zytoplasmatische Isoform die stärkste inhibitorische Wirkung.

Weiterhin wurde in stabil mit PTPRR transfizierten NIH3T3-Zellen der Effekt dieser PTPase auf biologische Prozesse untersucht. Dabei wurde ein negativer Einfluß der Überexpression der PTPRR auf die basale und PDGF-induzierte Proliferation sowie auf die Migration der Zellen beobachtet, welche beide an der Tumorentstehung beteiligt sein können. Die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen PTPRR und ERK für diese Effekte wurde dadurch belegt, daß eine Mutante der PTPRR, die ERK1/2 nicht mehr bindet, in beiden Experimenten keine Wirkung zeigte. Außerdem konnte die Überexpression der PTPRR sowie der verwandten PTPase STEP die durch die Onkogene v-Ki-Ras- und Her2-, nicht jedoch die durch v-ErbB- oder v-Fms-induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen in Focusbildungsexperimenten verhindern. Zudem reduzierte die Überexpression der PTPRR die Her2-vermittelte Proliferation von Zellen unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Diese Daten liefern nicht nur Hinweise auf eine potentiell tumorsupprimierende Wirkung der PTPRR und STEP, sondern gewähren auch Einblicke in die von den Onkogenen ausgehenden Signalwege, die zur Transformation von Zellen führen. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß der Expressionslevel der PTPRR in Tumorzelllinien und -geweben im Vergleich zu nichttransformierten Zelllinien und Geweben erhöht ist. Die in dieser Arbeit gesammelten Daten ergeben damit erste Hinweise auf einen Rückkopplungsmechanismus, mit dem Zellen versuchen könnten, die durch Onkogene häufig hyperaktivierten ERKs negativ zu regulieren.

## 6 SUMMARY

Issue of this work was the examination of the protein-tyrosine phosphatase PTPRR in the context of cellular signal transduction with emphasis on substrates, regulation and involvement in biological processes. Of special interest was the role of PTPRR in the transformation of cells and tumour development. This work revealed that PTPRR is able to bind the MAPKinases (mitogen activated protein kinases) ERK1 and 2 (extracellular regulated kinases 1 and 2) via a previously unknown MAPK binding motif, the KIM (kinase interaction motif) both *in vivo* and *in vitro*, and dephosphorylate them. This was in proof of data that had not been published at the beginning of this study. PTPRR is the first tyrosine-specific phosphatase that has been shown to dephosphorylate MAPKinases in higher Eucaryotes. The following analysis through overexpression in HEK293 cells demonstrated that PTPRR dephosphorylates specifically the MAPKinases ERK 1 and 2, but not p38 Kinase or JNK/SAPK. Furthermore, reportergene assays indicated that PTPRR can negatively regulate the activation of transcription factors by ERK1/2. A closer examination of the interaction between ERK and PTPRR discovered a previously unknown link between the PKA(cAMP dependent protein kinase) and ERK signalling pathways. It was shown that PKA can phosphorylate PTPRR at a serine residue at position 321 and thereby regulate the binding to and dephosphorylation of ERK1/2 *in vivo*. This indicates a novel mechanism by which PKA can regulate the activation of the MAPK signalling pathway.

Another effect of PTPRR revealed in this work is the inhibition of the c-src induced phosphorylation of KIF1C(Kinesin interacting factor 1C). KIF1C is involved in the retrograde transport from the Golgi to the Endoplasmatic Reticulum. PTPRR is the first PTPase that was shown to be involved in the dephosphorylation of KIF1C.

Preparative pull-down experiments with GST-PTPRR fusion proteins and subsequent sequencing of bound proteins identified the heat shock proteins HSP70 and GRP78 as *in vitro* binding partners of PTPRR. This interaction takes place within the juxtamembrane domain of PTPRR and is dependent on ATP. These observations demonstrate that the binding is specific and PTPRR is a substrate of HSP70 and GRP78, which assure structural integrity of PTPRR. As HSP70 can interact with other members of the ERK signalling cascade and was isolated from the ERK cascade scaffold proteins KSR and HSP70, the interaction between PTPRR and HSP70 gives rise to the possibility of an involvement of PTPRR in a multiprotein-ERK signalling complex.

---

The analysis of endogenous protein expression of PTPRR revealed the existence of different isoforms in human cells. In immune fluorescence experiments the isoform PTPRR<sup>TM</sup> was detected in perinuclear vesicles, whereas the isoform PTPRR<sup>cyto</sup> was distributed over the entire cytoplasm. A comparison between the effects of different overexpressed isoforms showed differences not only in the PDGF-induced phosphorylation but also in the c-src-dependent phosphorylation of KIF1C. In addition, differences in the ERK1/2 mediated activation of transcription were detected with reportergene assays. In all experiments the cytoplasmatic isoform of PTPRR displayed the strongest inhibition.

Furthermore, the effect of PTPRR on biological processes was examined in stably transfected NIH3T3 cells. A negative effect of the overexpression of PTPRR both on basal and PDGF-induced proliferation and on migration of cells was observed. Both processes are involved in tumour formation. The importance of the interaction between PTPRR and ERK for this negative regulation was verified with a mutant of PTPRR deficient in ERK binding, which did not show any effects in both experiments. In focus formation experiments, the overexpression of PTPRR or the closely related PTPase STEP inhibited the transformation of NIH3T3 cells caused by the oncogenes v-Ki-Ras and Her2, but not by v-ErbB or v-Fms. In addition, PTPRR inhibited the Her2-mediated proliferation of cells under conditions of serum starvation. These results do not only point to a possible tumoursuppressive effect of PTPRR, but give also insight into the oncogenic signalling pathways which lead to transformation of cells. The analysis of expression levels of PTPRR in different cell lines and tissues revealed an enhanced level of expression in transformed cells. These data provide first hints for a feedback mechanism by which cells could try to downregulate ERKs hyperactivated by oncogenes.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, M. & Kufe, D. W. (1984) Effect of sodium butyrate on human breast carcinoma (MCF-7) cellular proliferation, morphology, and CEA production. *Breast Cancer Res Treat* **4**, 269-74.
- Adachi, M. et al. (1992) Molecular cloning and chromosomal mapping of a human protein-tyrosine phosphatase LC-PTP. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1607-15.
- Agashe, V. R. & Hartl, F. U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 15-25.
- Alcorta, D. A. et al. (1989) Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase. *Mol Cell Biol* **9**, 3850-9.
- Alessandrini, A., Crews, C. M. & Erikson, R. L. (1992) Phorbol ester stimulates a protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8200-4.
- Alessi, D. R. et al. (1995) Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol* **5**, 283-95.
- Amundadottir, L. T. & Leder, P. (1998) Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. *Oncogene* **16**, 737-46.
- Anand-Apte, B. et al. (1997) Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Biol Chem* **272**, 30688-92.
- Angers-Loustau, A., Cote, J. F. & Tremblay, M. L. (1999) Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* **77**, 493-505.
- Arregui, C. O., Balsamo, J. & Lilien, J. (2000) Regulation of signaling by protein-tyrosine phosphatases: potential roles in the nervous system. *Neurochem Res* **25**, 95-105.
- Arteaga, C. L. (2001) The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* **19**, 32S-40S.
- Augustine, K. A. et al. (2000a) Evidence that the protein tyrosine phosphatase (PC12,Br7,S1) gamma (-) isoform modulates chondrogenic patterning and growth. *Int J Dev Biol* **44**, 361-71.
- Augustine, K. A. et al. (2000b) Protein tyrosine phosphatase (PC12, Br7,S1) family: expression characterization in the adult human and mouse. *Anat Rec* **258**, 221-34.
- Avraham, H., Avraham, S. & Taniguchi, Y. (2000) Receptor protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 425-32.
- Banville, D., Ahmad, S., Stocco, R. & Shen, S. H. (1994) A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases. *J Biol Chem* **269**, 22320-7.
- Barford, D. & Neel, B. G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* **6**, 249-54.
- Barnea, G. et al. (1993) Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **13**, 1497-506.
- Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N. & Baltimore, D. (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* **233**, 212-4.
- Bennett, A. M., Tang, T. L., Sugimoto, S., Walsh, C. T. & Neel, B. G. (1994) Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7335-9.



- Bhoola, R. & Hammond, K. (2000) Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells. *Cell Biol Int* **24**, 539-47.
- Biffen, M., McMichael-Phillips, D., Larson, T., Venkitaraman, A. & Alexander, D. (1994) The CD45 tyrosine phosphatase regulates specific pools of antigen receptor-associated p59fyn and CD4-associated p56lck tyrosine in human T-cells. *Embo J* **13**, 1920-9.
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A. & Fujita, D. J. (2000) Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* **19**, 5620-35.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J. & Pulido, R. (1999) A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **147**, 1129-36.
- Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5889-92.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-65.
- Boulton, T. G., Gregory, J. S. & Cobb, M. H. (1991) Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry* **30**, 278-86.
- Brady-Kalnay, S. M., Flint, A. J. & Tonks, N. K. (1993) Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J Cell Biol* **122**, 961-72.
- Brady-Kalnay, S. M. & Tonks, N. K. (1995) Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 650-7.
- Brown, M. T. p. & Cooper, J. A. p. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-49.
- Brown-Shimer, S. et al. (1990) Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5148-52.
- Brunet, A. et al. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* **18**, 664-74.
- Bult, A. et al. (1996) STEP61: a member of a family of brain-enriched PTPs is localized to the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* **16**, 7821-31.
- Burgering, B. M. & Bos, J. L. (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci* **20**, 18-22.
- Burston, S. G. & Clarke, A. R. (1995) Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem* **29**, 125-36.
- Buschbeck, M., Eickhoff, J., Sommer, M. N. & Ullrich, A. (2002) Phosphotyrosine-specific Phosphatase PTP-SL Regulates the ERK5 Signaling Pathway. *J Biol Chem* **277**, 29503-9.
- Byon, J. C., Kenner, K. A., Kusari, A. B. & Kusari, J. (1997) Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine-phosphatases. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**, 1-20.
- Camps, M., Nichols, A. & Arkininstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* **14**, 6-16.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-69.
- Caraglia, M. et al. (2000) Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation. *Eur J Biochem* **267**, 3919-36.
- Cary, L. A., Han, D. C. & Guan, J. L. (1999) Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol* **14**, 1001-9.

- Celler, J. W., Luo, X., Gonez, L. J. & Bohmer, F. D. (1995) mRNA expression of two transmembrane protein tyrosine phosphatases is modulated by growth factors and growth arrest in 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 614-21.
- Ceresa, B. P. & Schmid, S. L. (2000) Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 204-10.
- Cha, H. & Shapiro, P. (2001) Tyrosine-phosphorylated extracellular signal--regulated kinase associates with the Golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of Golgi structure. *J Cell Biol* **153**, 1355-67.
- Chan, A. C., Desai, D. M. & Weiss, A. (1994) The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* **12**, 555-92.
- Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Charbonneau, H. p. et al. (1989) Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5252-6.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.
- Chernoff, J., Schievella, A. R., Jost, C. A., Erikson, R. L. & Neel, B. G. (1990) Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2735-9.
- Cho, S. Y. & Klemke, R. L. (2000) Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Erk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* **149**, 223-36.
- Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-6.
- Cobb, M. H., Hepler, J. E., Cheng, M. & Robbins, D. (1994) The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. *Semin Cancer Biol* **5**, 261-8.
- Cobb, M. H., Robbins, D. J. & Boulton, T. G. (1991) ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 1025-32.
- Cook, S. J. & McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-72.
- Cool, D. E. et al. (1989) cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5257-61.
- Coussens, L. et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**, 1132-9.
- Crews, C. M., Alessandrini, A. & Erikson, R. L. (1992a) Erks: their fifteen minutes has arrived. *Cell Growth Differ* **3**, 135-42.
- Crews, C. M., Alessandrini, A. & Erikson, R. L. (1992b) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-80.
- den Hertog, J. (1999) Protein-tyrosine phosphatases in development. *Mech Dev* **85**, 3-14.
- den Hertog, J. et al. (1999) Receptor protein-tyrosine phosphatase signalling in development. *Int J Dev Biol* **43**, 723-33.
- den Hertog, J., Pals, C. E., Jonk, L. J. & Kruijer, W. (1992) Differential expression of a novel murine non-receptor protein tyrosine phosphatase during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1241-9.
- den Hertog, J., Tracy, S. & Hunter, T. (1994) Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on Tyr789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 in vivo. *Embo J* **13**, 3020-32.
- Denouel-Galy, A. et al. (1998) Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* **8**, 46-55.

- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. & Dixon, J. E. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361-4.
- Dikic, I., Schlessinger, J. & Lax, I. (1994) PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* **4**, 702-8.
- Ding, Q., Wang, Q. & Evers, B. M. (2001) Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 282-8.
- Dorner, C., Ullrich, A., Haring, H. U. & Lammers, R. (1999) The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family. *J Biol Chem* **274**, 33654-60.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. & Saltiel, A. R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7686-9.
- Edman, P. & Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem* **1**, 80-91.
- Elferink, J. G. & de Koster, B. M. (1998) The role of cyclic AMP and protein kinase A in stimulation of neutrophil migration by endothelins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**, 518-21.
- Ezumi, Y., Takayama, H. & Okuma, M. (1995) Differential regulation of protein-tyrosine phosphatases by integrin alpha IIb beta 3 through cytoskeletal reorganization and tyrosine phosphorylation in human platelets. *J Biol Chem* **270**, 11927-34.
- Fang, K. S. p., Barker, K. p., Sudol, M. p. & Hanafusa, H. p. (1994) A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J Biol Chem* **269**, 14056-63.
- Fauman, E. B. p. & Saper, M. A. p. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**, 413-7.
- Feng, G. S. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res* **253**, 47-54.
- Feng, G. S., Hui, C. C. & Pawson, T. (1993) SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* **259**, 1607-11.
- Feng, G. S. et al. (1994) Receptor-binding, tyrosine phosphorylation and chromosome localization of the mouse SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Oncogene* **9**, 1545-50.
- Flint, A. J., Gebbink, M. F., Franza, B. R., Jr., Hill, D. E. & Tonks, N. K. (1993) Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *Embo J* **12**, 1937-46.
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. & Tonks, N. K. (1997) Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1680-5.
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. & Neel, B. G. (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545-60.
- Frearson, J. A. & Alexander, D. R. (1997) The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *Bioessays* **19**, 417-27.
- Frodin, M., Peraldi, P. & Van Obberghen, E. (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* **269**, 6207-14.
- Garrington, T. P. & Johnson, G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 211-8.
- Garton, A. J., Flint, A. J. & Tonks, N. K. (1996) Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol* **16**, 6408-18.
- Garton, A. J. & Tonks, N. K. (1994) PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *Embo J* **13**, 3763-71.

- Gebbink, M. F. et al. (1993a) Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **268**, 16101-4.
- Gershoni, J. M. & Palade, G. E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**, 1-15.
- Gething, M. J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 465-72.
- Gille, H. et al. (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J* **14**, 951-62.
- Graf, K. et al. (1997) Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **29**, 334-9.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-9.
- Graves, L. M. et al. (1993) Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10300-4.
- Graves, L. M. et al. (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**, 328-32.
- Grewal, S. S. et al. (2000) Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 3722-8.
- Groom, L. A., Sneddon, A. A., Alessi, D. R., Dowd, S. & Keyse, S. M. (1996) Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* **15**, 3621-32.
- Gu, J., Tamura, M. & Yamada, K. M. (1998) Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* **143**, 1375-83.
- Guan, K. L. & Dixon, J. E. (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem* **266**, 17026-30.
- Guan, K. L., Haun, R. S., Watson, S. J., Geahlen, R. L. & Dixon, J. E. (1990) Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1501-5.
- Gullick, W. J. (1998) Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem Soc Symp* **63**, 193-8.
- Hager, G., Eckert, E. & Schwaiger, F. W. (1999) Semiquantitative analysis of low levels of mRNA expression from small amounts of brain tissue by nonradioactive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Neurosci Methods* **89**, 141-9.
- Hainaut, P. & Milner, J. (1992) Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *Embo J* **11**, 3513-20.
- Haneda, M., Sugimoto, T. & Kikkawa, R. (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur J Pharmacol* **365**, 1-7.
- Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**, 576-96.
- Hariharan, I. K. p., Chuang, P. T. p. & Rubin, G. M. p. (1991) Cloning and characterization of a receptor-class phosphotyrosine\par phosphatase\par gene expressed on central nervous system axons in Drosophila\par melanogaster.\par. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11266-70.\par.
- Hartl, F. U. (1991) Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation. *Semin Immunol* **3**, 5-16.

- Helmbrecht, K., Zeise, E. & Rensing, L. (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* **33**, 341-65.
- Helson, L. & Helson, C. (1985) Human neuroblastoma cells and 13-cis-retinoic acid. *J Neurooncol* **3**, 39-41.
- Hendriks, W., Schepens, J., Brugman, C., Zeeuwen, P. & Wieringa, B. (1995) A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase with a single catalytic domain is specifically expressed in mouse brain. *Biochem J* **305**, 499-504.
- Her, J. H. et al. (1993) Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *Biochem J* **296**, 25-31.
- Hooft van Huijsdijnen, R. (1998) Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. *Gene* **225**, 1-8.
- Houslay, M. D. & Kolch, W. (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* **58**, 659-68.
- Hsueh, Y. P. & Lai, M. Z. (1995) c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase is sensitive to cAMP inhibition in T lymphocytes. *J Biol Chem* **270**, 18094-8.
- Hunter, T. (1989) The functions of oncogene products. *Prog Clin Biol Res* **288**, 25-34.
- Hunter, T. (1998) The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect* **94**, 81-119.
- Ibarra-Sanchez, M. J. et al. (2000) The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Semin Immunol* **12**, 379-86.
- Impey, S. et al. (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**, 869-83.
- J Sambrook, E. F., T Maniatis 1990 *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cols Spring Harbour Laboratory Press, New York).
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A. J. & Kornfeld, K. (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**, 163-75.
- Janeway, C. A., Jr. & Bottomly, K. (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**, 275-85.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J. & Tonks, N. K. (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**, 1754-8.
- Kaplan, R. et al. (1990) Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7000-4.
- Karim, F. D. & Rubin, G. M. (1999) PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during Drosophila eye development. *Mol Cell* **3**, 741-50.
- Karin, M. (1996) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351**, 127-34.
- Karin, M. & Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**, 747-57.
- Kashige, N., Carpino, N. & Kobayashi, R. (2000) Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2093-8.
- Keane, M. M., Lowrey, G. A., Ettenberg, S. A., Dayton, M. A. & Lipkowitz, S. (1996) The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res* **56**, 4236-43.
- Kennelly, P. J. & Krebs, E. G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266**, 15555-8.
- Kerangueven, F. et al. (1997) Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res* **57**, 5469-74.

- Keyse, S. M. (1995) An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1265**, 152-60.
- Keyse, S. M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 143-52.
- Keyse, S. M. (1999) The role of protein phosphatases in the regulation of mitogen and stress-activated protein kinases. *Free Radic Res* **31**, 341-9.
- Kiang, J. G. & Tsokos, G. C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* **80**, 183-201.
- Klapper, L. N., Kirschbaum, M. H., Sela, M. & Yarden, Y. (2000) Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* **77**, 25-79.
- Klemke, R. L. et al. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* **137**, 481-92.
- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G. & Lodish, H. F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-38.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351**, 289-305.
- Kolibaba, K. S. & Druker, B. J. (1997) Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F217-48.
- Koretzky, G. A., Picus, J., Thomas, M. L. & Weiss, A. (1990) Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* **346**, 66-8.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. & Aaronson, S. A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9193-7.
- Krauss, G. (1997) *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion* (Wiley-VCH, Weinheim).
- Krueger, J. S., Keshamouni, V. G., Atanaskova, N. & Reddy, K. B. (2001) Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene* **20**, 4209-18.
- Krueger, N. X. & Saito, H. (1992) A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7417-21.
- Krueger, N. X., Streuli, M. & Saito, H. (1990) Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *Embo J* **9**, 3241-52.
- Kuo, M. L., Huang, T. S. & Lin, J. K. (1995) Preferential requirement for protein tyrosine phosphatase activity in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced differentiation of human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* **50**, 1217-22.
- Kurebayashi, J. (2001) Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* **8**, 45-51.
- Kyriakis, J. M. & Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**, 24313-6.
- LaForgia, S. et al. (1991) Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5036-40.
- Lämmlli, U. K. (1970) Cleavage of structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-682.

- Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y. & Notkins, A. L. (1994) Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* **13**, 505-14.
- Lee, S. Y. & Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* **9**, 676-9.
- Lehrach, F., Muller, R. & Theis, H. (1977) [5 years of clinico-experimental and therapeutic experiences with pentoxifylline]. *Med Monatsschr* **31**, 159-63.
- Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **19**, 459-63.
- Lemoine, N. R. et al. (1992) The erbB-3 gene in human pancreatic cancer. *J Pathol* **168**, 269-73.
- Lenormand, P. et al. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 1079-88.
- Levy, J. B. et al. (1993) The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* **268**, 10573-81.
- Liu, F., Sells, M. A. & Chernoff, J. (1998) Transformation suppression by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3 ligand. *Mol Cell Biol* **18**, 250-9.
- Liu, H., Vuyyuru, V. B., Pham, C. D., Yang, Y. & Singh, B. (1999) Evidence of an interaction between Mos and Hsp70: a role of the Mos residue serine 3 in mediating Hsp70 association. *Oncogene* **18**, 3461-70.
- Lombroso, P. J., Murdoch, G. & Lerner, M. (1991) Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7242-6.
- Longo, F. M. et al. (1993) Leukocyte common antigen-related receptor-linked tyrosine phosphatase. Regulation of mRNA expression. *J Biol Chem* **268**, 26503-11.
- Maekawa, K., Imagawa, N., Nagamatsu, M. & Harada, S. (1994) Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase containing a membrane-binding domain and GLGF repeats. *FEBS Lett* **337**, 200-6.
- Mansour, S. J. et al. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**, 966-70.
- Markowitz, D., Goff, S. & Bank, A. (1988) Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* **167**, 400-6.
- Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85.
- Marth, J. D., Peet, R., Krebs, E. G. & Perlmutter, R. M. (1985) A lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase gene is rearranged and overexpressed in the murine T cell lymphoma LSTRA. *Cell* **43**, 393-404.
- Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E. & Thomas, M. L. (1992) Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol* **12**, 2396-405.
- Matthews, R. J. p., Cahir, E. D. p. & Thomas, M. L. p. (1990) Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase\par family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase\par domain.\par. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4444-8.\par.
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R. K. & Margolis, R. U. (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2512-6.
- Mauro, L. J. & Dixon, J. E. (1994) 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. *Trends Biochem Sci* **19**, 151-5.

- Mayer, M. P. & Bukau, B. (1998) Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol Chem* **379**, 261-8.
- Meng, K. et al. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2603-8.
- Meyer, S., LaBudda, K., McGlade, J. & Hayman, M. J. (1994) Analysis of the role of the Shc and Grb2 proteins in signal transduction by the v-ErbB protein. *Mol Cell Biol* **14**, 3253-62.
- Michael, D. et al. (1998) Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1864-9.
- Miller, A. D. & Rosman, G. J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**, 980-2, 984-6, 989-90.
- Miller, M. J. et al. (1998) Differential effects of protein kinase A on Ras effector pathways. *Mol Cell Biol* **18**, 3718-26.
- Mizuno, K. et al. (1997) SHP-1 is involved in neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *FEBS Lett* **417**, 6-12.
- Moller, N. P. et al. (1994) Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7477-81.
- Morrison, D. K. (2001) KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* **114**, 1609-12.
- Morrison, D. K. & Cutler, R. E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 174-9.
- Morton, C. J. & Campbell, I. D. (1994) SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol* **4**, 615-7.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mourey, R. J. et al. (1996) A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. *J Biol Chem* **271**, 3795-802.
- Muda, M. et al. (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J Biol Chem* **271**, 4319-26.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Mustelin, T. et al. (1992) Regulation of the p59fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur J Immunol* **22**, 1173-8.
- Neel, B. G. (1997) Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **9**, 405-20.
- Nguyen, T. H., Paul, S., Xu, Y., Gurd, J. W. & Lombroso, P. J. (1999) Calcium-dependent cleavage of striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP). *J Neurochem* **73**, 1995-2001.
- Nihei, T. et al. (1993a) Demonstration of selective protein complexes of p53 with 73 kDa heat shock cognate protein, but not with 72 kDa heat shock protein in human tumor cells. *Cancer Lett* **73**, 181-9.
- Nihei, T., Takahashi, S., Sagae, S., Sato, N. & Kikuchi, K. (1993b) Protein interaction of retinoblastoma gene product pRb110 with M(r) 73,000 heat shock cognate protein. *Cancer Res* **53**, 1702-5.
- Nishida, E. & Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* **18**, 128-31.
- Nowak, F., Jacquemin-Sablon, A. & Pierre, J. (1997) Expression of the activated p185erbB2 tyrosine kinase in human epithelial cells leads to MAP kinase activation but does not confer oncogenicity. *Exp Cell Res* **231**, 251-9.



- Ogata, M., Oh-hora, M., Kosugi, A. & Hamaoka, T. (1999) Inactivation of mitogen-activated protein kinases by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 52-6.
- Ogata, M., Sawada, M., Fujino, Y. & Hamaoka, T. (1995) cDNA cloning and characterization of a novel receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed predominantly in the brain. *J Biol Chem* **270**, 2337-43.
- O'Grady, P., Thai, T. C. & Saito, H. (1998) The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *J Cell Biol* **141**, 1675-84.
- Ohtsuka, K. & Hata, M. (2000) Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *Int J Hyperthermia* **16**, 231-45.
- Okumura, M. & Thomas, M. L. (1995) Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Immunol* **7**, 312-9.
- Olsson, A. K., Vadhammar, K. & Nanberg, E. (2000) Activation and protein kinase C-dependent nuclear accumulation of ERK in differentiating human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* **256**, 454-67.
- Osborne, R. J. & Hamshire, M. G. (2000) A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res* **60**, 3706-12.
- Ostergaard, H. L. & Trowbridge, I. S. (1991) Negative regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity by ionomycin in T cells. *Science* **253**, 1423-5.
- Ostman, A., Yang, Q. & Tonks, N. K. (1994) Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9680-4.
- Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M. & Weed, S. A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**, 5606-13.
- Patarca, R. (1996) Protein phosphorylation and dephosphorylation in physiologic and oncologic processes. *Crit Rev Oncog* **7**, 343-432.
- Paul, S. et al. (2000) The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *J Neurosci* **20**, 5630-8.
- Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J. & Henkemeyer, M. (1993) Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **340**, 279-85.
- Peles, E. et al. (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* **82**, 251-60.
- Pingel, J. T. & Thomas, M. L. (1989) Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* **58**, 1055-65.
- Plowman, G. D. et al. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* **366**, 473-5.
- Pol, A., Calvo, M. & Enrich, C. (1998) Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* **441**, 34-8.
- Porter, A. C. & Vaillancourt, R. R. (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* **17**, 1343-52.
- Posas, F. et al. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**, 865-75.
- Pulido, R., Zuniga, A. & Ullrich, A. (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *Embo J* **17**, 7337-50.

- Racke, F. K., Lewandowska, K., Goueli, S. & Goldfarb, A. N. (1997) Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem* **272**, 23366-70.
- Ranganathan, R. & Ross, E. M. (1997) PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* **7**, R770-3.
- Rao, V. N. et al. (1989) elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science* **244**, 66-70.
- Rees, D. J., Ades, S. E., Singer, S. J. & Hynes, R. O. (1990) Sequence and domain structure of talin. *Nature* **347**, 685-9.
- Resh, M. D. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**, 411-3.
- Rikitake, Y. et al. (2000) Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1006-12.
- Rouyez, M. C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I. & Porteu, F. (1997) Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 4991-5000.
- Ruoslahti, E. (1988) Versatile mechanisms of cell adhesion. *Harvey Lect* **84**, 1-17.
- Sap, J. p., Jiang, Y. P. p., Friedlander, D. p., Grumet, M. p. & Schlessinger, J. p. (1994) Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol Cell Biol* **14**, 1-9.
- Saras, J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H. & Gonez, L. J. (1994) Cloning and characterization of PTPL1, a protein tyrosine phosphatase with similarities to cytoskeletal-associated proteins. *J Biol Chem* **269**, 24082-9.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S. & Reed, J. C. (1995) FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**, 411-5.
- Saxena, M., Williams, S., Brockdorff, J., Gilman, J. & Mustelin, T. (1999) Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase-targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem* **274**, 11693-700.
- Saxena, M., Williams, S., Gilman, J. & Mustelin, T. (1998) Negative regulation of T cell antigen receptor signal transduction by hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem* **273**, 15340-4.
- Scangos, G. & Ruddle, F. H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene* **14**, 1-10.
- Schaeffer, H. J. & Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-44.
- Schaller, M. D. et al. (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5192-6.
- Schievella, A. R., Paige, L. A., Johnson, K. A., Hill, D. E. & Erikson, R. L. (1993) Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine. *Cell Growth Differ* **4**, 239-46.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. & Sieg, D. J. (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78.
- Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-91.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2000) Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* **19**, 6594-9.
- Seger, R. et al. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**, 14373-81.

- Seimiya, H. & Tsuruo, T. (1998) Functional involvement of PTP-U2L in apoptosis subsequent to terminal differentiation of monoblastoid leukemia cells. *J Biol Chem* **273**, 21187-93.
- Semba, K. et al. (1986) yes-related protooncogene, syn, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5459-63.
- Sevetson, B. R., Kong, X. & Lawrence, J. C., Jr. (1993) Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10305-9.
- Sharma, E. & Lombroso, P. J. (1995) A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* **270**, 49-53.
- Sharma, E., Zhao, F., Bult, A. & Lombroso, P. J. (1995) Identification of two alternatively spliced transcripts of STEP: a subfamily of brain-enriched protein tyrosine phosphatases. *Brain Res Mol Brain Res* **32**, 87-93.
- Shattil, S. J. & Brugge, J. S. (1991) Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 869-79.
- Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I. & Chretien, P. (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* **352**, 736-9.
- Shifrin, V. I., Davis, R. J. & Neel, B. G. (1997) Phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signaling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 2957-62.
- Shiozuka, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Hashimoto, S. & Kawashima, H. (1995) Cloning and expression of PCPTP1 encoding protein tyrosine phosphatase. *Gene* **162**, 279-84.
- Shultz, L. D., Coman, D. R., Lyons, B. L., Sidman, C. L. & Taylor, S. (1987) Development of plasmacytoid cells with Russell bodies in autoimmune "viable motheaten" mice. *Am J Pathol* **127**, 38-50.
- Shultz, L. D. et al. (1993) Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* **73**, 1445-54.
- Sidell, N., Sarafian, T., Kelly, M., Tsuchida, T. & Haussler, M. (1986) Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma: a cell variant system showing two distinct responses. *Exp Cell Biol* **54**, 287-300.
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Malarkey, K. & Sturgill, T. W. (1999) Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem* **274**, 2893-8.
- Sorby, M., Sandstrom, J. & Ostman, A. (2001) An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene* **20**, 5219-24.
- Stewart, S. et al. (1999) Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol* **19**, 5523-34.
- Streuli, M., Krueger, N. X., Hall, L. R., Schlossman, S. F. & Saito, H. (1988) A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen. *J Exp Med* **168**, 1523-30.
- Streuli, M. p. et al. (1992) Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region. *Embo J* **11**, 897-907.
- Stupack, D. G., Cho, S. Y. & Klemke, R. L. (2000) Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol Res* **21**, 83-8.
- Su, J., Batzer, A. & Sap, J. (1994) Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-alpha is tyrosine-phosphorylated and associated with the adaptor protein Grb2. *J Biol Chem* **269**, 18731-4.

- Sukegawa, J. et al. (1987) Characterization of cDNA clones for the human c-yes gene. *Mol Cell Biol* **7**, 41-7.
- Sun, H., Tonks, N. K. & Bar-Sagi, D. (1994) Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* **266**, 285-8.
- Takeya, T., Feldman, R. A. & Hanafusa, H. (1982) DNA sequence of the viral and cellular src gene of chickens. 1. Complete nucleotide sequence of an EcoRI fragment of recovered avian sarcoma virus which codes for gp37 and pp60src. *J Virol* **44**, 1-11.
- Taniguchi, Y., London, R., Schinkmann, K., Jiang, S. & Avraham, H. (1999) The receptor protein tyrosine phosphatase, PTP-RO, is upregulated during megakaryocyte differentiation and is associated with the c-Kit receptor. *Blood* **94**, 539-49.
- Tari, A. M., Hung, M. C., Li, K. & Lopez-Berestein, G. (1999) Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells. *Oncogene* **18**, 1325-32.
- Taupin, D. & Podolsky, D. K. (1999) Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* **116**, 1072-80.
- Thomas, M. L. (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* **7**, 339-69.
- Tonks, N. K. & Neel, B. G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 182-95.
- Traish, A., Kim, N. N., Huang, Y. H., Goldstein, I. & Moreland, R. B. (2000) Cyclic AMP regulates mRNA expression of alpha-1d and alpha-2a adrenergic receptors in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Int J Impot Res* **12**, S41-47.
- Traverse, S. et al. (1992) Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-15.
- Troppmair, J. et al. (1994) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J Biol Chem* **269**, 7030-5.
- Tsui, H. W., Siminovitch, K. A., de Souza, L. & Tsui, F. W. (1993) Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* **4**, 124-9.
- Ullrich, A. et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418-25.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-12.
- Van Den Maagdenberg, A. M. et al. (1999) The mouse Ptprr gene encodes two protein tyrosine phosphatases, PTP-SL and PTPBR7, that display distinct patterns of expression during neural development. *Eur J Neurosci* **11**, 3832-44.
- van der Geer, P., Hunter, T. & Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337.
- Van Vactor, D. (1998) Protein tyrosine phosphatases in the developing nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 174-81.
- Van Vactor, D., O'Reilly, A. M. & Neel, B. G. (1998) Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 112-26.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. & Ullrich, A. (1993) Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* **259**, 1611-4.
- Vossler, M. R. et al. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**, 73-82.

- Weiss, A. & Littman, D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-74.
- Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* **23**, 481-5.
- Williams, J. C., Wierenga, R. K. & Saraste, M. (1998) Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem Sci* **23**, 179-84.
- Winston, L. A. & Bertics, P. J. (1992) Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of 42- and 45-kDa ERK-related proteins. *J Biol Chem* **267**, 4747-51.
- Wu, J. et al. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**, 1065-9.
- Wunderlich, W. et al. (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* **152**, 765-76.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J. & Tonks, N. K. (1993) Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **268**, 6622-8.
- Yang, Q. & Tonks, N. K. (1991) Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5949-53.
- Yao, H., York, R. D., Misra-Press, A., Carr, D. W. & Stork, P. J. (1998) The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem* **273**, 8240-7.
- Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M. & Davis, R. J. (1999) The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7245-54.
- Yi, T. L., Cleveland, J. L. & Ihle, J. N. (1992) Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol* **12**, 836-46.
- Young, M. R., Young, M. E., Lozano, Y. & Bagash, J. M. (1992) Activation of protein kinase A increases the in vitro invasion, migration, and adherence to reconstituted basement membrane by Lewis lung carcinoma tumor cells. *Invasion Metastasis* **12**, 253-63.
- Yu, Q., Lenardo, T. & Weinberg, R. A. (1992) The N-terminal and C-terminal domains of a receptor tyrosine phosphatase are associated by non-covalent linkage. *Oncogene* **7**, 1051-7.
- Yu, W., Fantl, W. J., Harrowe, G. & Williams, L. T. (1998) Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**, 56-64.
- Zander, N. F. et al. (1993) Suppression of v-fms-induced transformation by overexpression of a truncated T-cell protein tyrosine phosphatase. *Oncogene* **8**, 1175-82.
- Zanke, B. et al. (1992) Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase). *Eur J Immunol* **22**, 235-9.
- Zhang, W. R. p., Hashimoto, N. p., Ahmad, F. p., Ding, W. p. & Goldstein, B. J. p. (1994) Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphate family. *Biochem J* **302**, 39-47.
- Zhang, Z. Y., Wu, L. & Chen, L. (1995) Transition state and rate-limiting step of the reaction catalyzed by the human dual-specificity phosphatase, VHR. *Biochemistry* **34**, 16088-96.
- Zhao, Z., Shen, S. H. & Fischer, E. H. (1994) Phorbol ester-induced expression, phosphorylation, and translocation of protein-tyrosine-phosphatase 1C in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5007-11.

- Zhao, Z., Tan, Z., Diltz, C. D., You, M. & Fischer, E. H. (1996) Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **271**, 22251-5.
- Zheng, C. F. & Guan, K. L. (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* **268**, 11435-9.
- Zheng, X. M., Wang, Y. & Pallen, C. J. (1992) Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **359**, 336-9.
- Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J. & Pulido, R. (1999) Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem* **274**, 21900-7.

## 8 ABKÜRZUNGEN

'	Minute
"	Sekunde
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	enzymatische Einheiten (nach Herstellerangaben)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK1	von extrazellulären Signalen regulierte Kinasen1
ERK1	von extrazellulären Signalen regulierte Kinasen2
ERK1/2	ERK1 und ERK2
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
Gab1	Grb2-associated binder-1
G-418	Genetecin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid

---

JNK/SAPK	Jun-N-terminale Kinase/stressaktivierte Proteinkinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidylsäure
LTR	Long terminal repeat
MAP-Kinase	von Mitogenen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MEK-Kinase
min	Minute
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)
Neo <sup>r</sup>	Neomycinresistenz
NGF	Nerve growth factor
OD	
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTPRR	Rezeptor-Typ R PTPase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH2-Domäne	Src Homologie 2 Domäne
SHP-2	SH2-containing PTP-2
STEP	Striatum enriched PTPase
TPA	Tetradecanoyl-phorbol-13-Azetat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Tyrosinkinase
TM	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymaktivitätseinheit (Units)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel



# NACHWORT

Mein erster Dank geht ganz besonders an Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen und die Freiräume beim Bearbeiten des Projektes danken.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Krauss für seine Bereitschaft, meine Promotion als Doktorvater zu betreuen. Herrn Prof. Dr. Matthias Sprinzl und Herrn Prof. Dr. Franz-Xaver Schmid danke ich stellvertretend für viele weitere Angehörige der Universität Bayreuth für die hervorragende Ausbildung im Rahmen des Biochemiestudiums an der Universität Bayreuth.

Ich möchte allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe, insbesondere des Labors *G32/33*; für das angenehme und produktive Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Mein besonderer Dank gebührt dabei Herrn Marc Sommer, dessen Ideen, Anregungen und intensive Zusammenarbeit einen wesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit haben. Für wichtige Vorarbeiten und für die Herstellung unentbehrlicher Plasmide, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben, danke ich Herrn Dr. Raffael Polido. Weiterhin möchte ich mich für die Zusammenarbeit auf verschiedenen Gebieten und nützlichen Anregungen bei Herrn Prof. Dr. P. Knyazev und Herrn Marcus Buschbeck herzlich bedanken. Für ständige Diskussionsbereitschaft und viele guten Ratschläge gilt meine Dankbarkeit insbesondere Herrn Andreas Gschwind, Herrn Jens Ruhe, Herrn Martin Treder, Herrn Johannes Bange, Herrn Reimar Abraham Frau Dr. Esther Zwick-Wallasch und Michael Leserer. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Axel Choidas und Herrn Dr. Christian Walasch für ihre Hilfsbereitschaft in der Anfangsphase dieser Arbeit. Für die Bereitstellung wichtiger Plasmide und Antikörper möchte ich Herrn Dr. Karsten Spiekermann, Frau Miriam Gensler, Herrn Andreas Weiss, Herrn Dr. Frank-Ullrich Weiss, Frau Dr. Birgit Holzmann, Herrn Dr. Reiner Lammers und Herrn Prof. Dr. Masato Ogata danken. Mein Dank geht ebenfalls an Herrn Dr. Arnd Kieser und Herrn Dr. Josef Kellermann für ihre Kooperation bei verschiedenen Projekten.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für langjährige Unterstützung in allen Belangen danken.  
Danke, Barbara!