

Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Proteintyrosinphosphatase BDP1

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

Vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Miriam Gensler

Betreuer:
Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 27.10.03

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Axel Ullrich

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Elmar Vilsmaier
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Ullrich

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung	1
1.2	Proteintyrosinkinasen.....	2
1.2.1	Rezeptortyrosinkinasen.....	2
1.2.1.1	Die EGFR (epidermal growth factor receptor)-Familie.....	3
1.2.1.2	Aktivierung von Rezeptoren der EGFR-Familie	4
1.2.1.3	EGF-induzierte Signalkaskaden.....	5
1.2.1.3.1	Die MAP Kinase Kaskade	6
1.2.1.4	Signaldiversifikation innerhalb der EGFR-Familie	8
1.2.1.5	Negativregulation von Rezeptoren der EGFR-Familie.....	9
1.2.2	Zytoplasmatische Tyrosinkinasen.....	10
1.3	Proteintyrosinphosphatasen (PTPn)	11
1.3.1	Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTPn)	12
1.3.2	Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen	13
1.3.2.1	BDP1 – ein Mitglied der PEST-Phosphatasenfamilie	16
1.3.3	Der katalytische Mechanismus der Proteindephosphorylierung.....	17
1.3.4	Regulation von Rezeptortyrosinkinasen der EGFR-Familie durch Phosphatasen.....	19
1.4	Proteintyrosinphosphatasen – potentielle Tumorsuppressoren?	21
1.5	Zielsetzung	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Bezugsquellennachweis.....	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Enzyme	24
2.1.3	„Kits“ und Sonstiges	24
2.1.4	Wachstumsfaktoren und Liganden	25

2.2	Medien und Puffer	25
2.2.1	Medien für E.coli Bakterien.....	25
2.2.2	Zellkulturmedien.....	25
2.2.3	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	26
2.3	Bakterienstämme	27
2.4	Zelllinien	27
2.5	Antikörper	28
2.6	Mäusestämme.....	29
2.7	Plasmide und Oligonukleotide.....	29
2.7.1	Ausgangsvektoren.....	29
2.7.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	30
2.7.3	Wichtige Oligonukleotide.....	30
2.8	Molekularbiologische Methoden	31
2.8.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	31
2.8.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	31
2.8.3	Enzymatische Behandlung von DNA	31
2.8.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	31
2.8.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	31
2.8.3.3	Phosphorylierung von Primern	31
2.8.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	32
2.8.4	Gelelektrophorese von DNA.....	32
2.8.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	32
2.8.6	DNA-Transfer in E.coli Bakterien.....	32
2.8.6.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	32
2.8.6.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	32
2.8.6.3	Dauerkultur von <i>E.coli</i> Bakterien	33
2.8.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	33
2.8.7.1	PCR-Amplifikation von DNA	33
2.8.7.2	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
2.8.8	Arbeiten mit RNA.....	34

2.8.8.1	Präparation kleinerer Mengen von RNA	34
2.8.9	cDNA-Synthese	34
2.9	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen.....	35
2.9.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	35
2.9.2	Mykoplasmentest	35
2.9.3	Differenzierung der murinen Brustepithelzelllinie HC11.....	35
2.9.4	Transfektion von Zellen.....	36
2.9.4.1	Kalziumphosphat-Transfektion.....	36
2.9.4.2	Transfektion von NIH 3T3 mit Polyfect®.....	36
2.9.5	Retroviraler Gentransfer in die humane Brustkrebszelllinie T47D	36
2.10	Herstellung eines polyklonalen Anti-BDP1-Antikörpers.....	37
2.10.1	Affinitätsreinigung des polyklonalen Antikörpers BDP1-CT	37
2.11	Proteinanalytische Methoden	37
2.11.1	Expression und Aufreinigung von BDP1-GST-Fusionsproteinen.....	37
2.11.2	Triton X-100 Lyse von Zellen	38
2.11.3	Proteinbestimmung	38
2.11.4	Immunpräzipitation von Proteinen	38
2.11.5	GST-Pulldown-Assay in SkBr3-Zelllysaten.....	39
2.11.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
2.11.7	Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen.....	39
2.11.8	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	39
2.11.9	Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	40
2.12	Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen	40
2.12.1	pNPP-Assay zur Bestimmung von Phosphataseaktivität.....	40
2.12.2	Untersuchung von Promotoraktivität mittels Luziferaseassay	41
2.12.3	Immunhistochemische Färbung von Gewebsschnitten.....	41
2.12.3.1	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	41
2.12.3.2	Immunhistochemische Färbung.....	41
3	ERGEBNISSE.....	43

3.1	Untersuchungen zur Rolle von BDP1 in der HER2-vermittelten Signaltransduktion.....	43
3.1.1	Einfluss von BDP1-Überexpression auf die EGF-induzierte Gesamttyrosinphosphorylierung in HEK 293-Zellen	43
3.1.2	Einfluss exogener BDP1 auf die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung glykosylierter Proteine in HEK 293-Zellen	45
3.1.3	Untersuchung der HER2-Phosphorylierung in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen.....	47
3.1.4	Untersuchung zur Spezifität der negativregulatorischen Wirkung von BDP1	49
3.1.5	Analyse der EGF-stimulierten Phosphorylierung von Adaptorproteinen bei Expression exogener BDP1	51
3.1.6	Aktivität von MAPKn in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen.....	51
3.1.7	Expressionsprofil von BDP1, HER2 und EGFR in humanen Brustkrebszelllinien und Brusttumoren aus Mäusen	52
3.1.8	Unterdrückung der Expression endogener BDP1 in der humanen Brustkrebszelllinie T47D	55
3.1.9	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien mit GST-BDP1-Konstrukten in SkBr3-Zellysaten	56
3.1.10	Einfluss von EGF-Stimulation auf die enzymatische Aktivität von BDP1	56
3.2	Untersuchungen zur Rolle von BDP1 bei der Differenzierung der murinen Brustdrüse.....	58
3.2.1	Analyse der Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus.....	58
3.2.2	Immunhistologische Lokalisation von BDP1 in murinem Brustdrüsengewebe	59
3.2.3	Expression von BDP1 in der murinen Brustepithelzelllinie HC11	61
3.2.4	Analyse der Promotorregion von BDP1	63
3.2.5	Überprüfung der funktionalen Integrität der potentiellen GAS- und GRE-Stellen im murinen BDP1-Promotor.....	65
3.2.6	Analyse der Expression von BDP1 in Brustdrüsengewebe von Stat5-null Mäusen.....	66

3.2.7	Untersuchung von Stat3 als potentiellm Target von BDP1 während der Schwangerschafts-induzierten Brustentwicklung.....	68
3.3	Untersuchung der Interaktion von BDP1 mit dem Adaptormolekül Grb2	69
3.3.1	Koimmunopräzipitation von BDP1 mit Grb2 in HEK 293-Zellen.....	70
3.3.2	Hyperphosphorylierung von BDP1 bei Koexpression von Grb2	70
3.3.3	Einfluss der Expression verschiedener Grb2-Deletionskonstrukte auf die Phosphorylierung von BDP1	72
3.3.4	Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Grb2-vermittelte Phosphorylierung von BDP1	73
3.3.5	Untersuchung der Rolle von c-Abl in der Grb2-vermittelten BDP1-Phosphorylierung	75
4	DISKUSSION.....	77
4.1	Negativregulation der HER2-vermittelten Signaltransduktion durch BDP1.....	77
4.2	Mechanismus der Inhibierung des HER2-Signalweges durch BDP1	79
4.3	BDP1 – ein Tumorsuppressor?.....	80
4.4	Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus während der Schwangerschaft	81
4.5	Expressionskontrolle von <i>bdp1</i>	84
4.6	Potentielle Funktion von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus während der Schwangerschaft.....	85
4.7	Die Bindung von BDP1 an Grb2 und deren Bedeutung für die Interaktion mit c-Abl	87
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	91

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.

(Johann Wolfgang von Goethe)

1 Einleitung

In multizellulären Organismen muss die Aktivität einer Zelle mit der ihrer mittelbaren und unmittelbaren Nachbarzellen sowie dem nichtzellulären Bereich koordiniert werden. Nur so kann die Entwicklung und der Erhalt der funktionellen Integrität des Organismus gewährleistet werden. Aus dieser Notwendigkeit entwickelte sich eine Vielzahl an inter- und intrazellulären Signaltransduktionswegen, die zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose steuern. Die interzelluläre Zellkommunikation wird durch ein breites Spektrum an Liganden vermittelt, zu denen zum Beispiel Hormone, Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsfaktoren gehören. Die Bindung dieser Liganden an spezifische Rezeptoren initiiert die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die zur Regulation der Genexpression und den daraus resultierenden biochemischen und physiologischen Vorgängen führen (van der Geer et al., 1994).

Bei der intrazellulären Signalweiterleitung spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle. So bilden die Rezeptortyrosinkinasen (RTK_n) eine der Hauptklassen an Zelloberflächenrezeptoren. Nach ihrer Aktivierung durch Ligandenbindung können RTK_n mittels Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine extrazelluläre Signale in die Zelle bis hin zum Zellkern weiterleiten und so eine zelluläre Antwort hervorrufen (Ullrich and Schlessinger, 1990).

1.1 Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von zellulären Proteinen erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten (Cohen, 1992; Sun and Tonks, 1994). Obwohl der Anteil an tyrosinphosphorylierten Proteinen nur 0,05 bis 0,1 % an der Gesamtphosphorylierung in der Zelle ausmacht, ist diese posttranslationale Modifikation essentiell für die Steuerung vieler physiologischer Prozesse (Hunter, 1995).

Tyrosinphosphorylierung ist ein reversibler, dynamischer Prozess, der durch die Aktivität von Proteintyrosinkinasen (PTK_n) und deren Gegenspielern, den Proteintyrosinphosphatasen (PTP_n) kontrolliert wird. Störungen im empfindlichen Wechselspiel von PTK_n und PTP_n können drastische Veränderungen im feinen

Regelwerk der Zelle bewirken, die zur Entstehung von Erkrankungen wie z. B. Krebs führen können (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2 Proteintyrosinkinasen

Eine Analyse der humanen Genomsequenzen im Rahmen des „Human Genome Projects“ ergab, daß unter den rund 26600 Genen ca. 11% für Proteine kodieren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie zum Beispiel Rezeptoren oder G-Protein-Untereinheiten. Unter ihnen wurden mehr als 860 Proteinkinasen identifiziert, deren Gesamtheit als Kinom bezeichnet wird (Manning et al., 2002; Venter et al., 2001).

Neben Serin- und Threoninkinasen bilden die PTKn eine der größten bekannten Familien homologer Proteine (Hanks and Hunter, 1995). PTKn katalysieren die Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes ihrer Substrate. Aufgrund ihrer Struktur lassen sich PTKn in die Gruppen der transmembranen RTKn und die Gruppe der intrazellulären PTKn einteilen.

1.2.1 Rezeptortyrosinkinasen

RTKn sind transmembrane Proteine, die sich aus einer N-terminalen extrazellulären, meist glykosilierten Domäne, einer einfachen Transmembranhelix und einem zytoplasmatischen Teil, der die Kinasedomäne trägt, zusammensetzen. Der extrazelluläre Anteil jeder RTK ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielfalt unterschiedlicher Sequenzmotive aus. Diese strukturellen Unterschiede wurden zur Einteilung der bislang 58 bekannten RTKn in 20 verschiedene Unterfamilien verwendet (Robinson et al., 2000), die in Abb. 1 gezeigt sind. So besitzt z.B. die EGF (epidermal growth factor)-Rezeptorfamilie zwei Cystein-reiche Regionen in der extrazellulären Domäne, während sich die Mitglieder der PDGF (platelet derived growth factor)-Rezeptorfamilie durch ihre fünf Immunglobulin-ähnlichen Regionen auszeichnen.

Der zytoplasmatische Anteil der RTKn setzt sich aus der Juxtamembranregion, der Kinasedomäne und dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Schlessinger and Ullrich, 1992). Die katalytische Domäne ist 250-300 Aminosäuren lang und zwischen

allen RTKs hochkonserviert. Sie enthält die Bindungsstelle für den Phosphatdonor ATP und katalysiert sowohl die Autophosphorylierung des Rezeptors als auch die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Substrate (Yarden and Ullrich, 1988a; Yarden and Ullrich, 1988b). Der wenig konservierte carboxyterminale Bereich von RTKs enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen, die im phosphorylierten Zustand hochspezifische Bindungsstellen für Proteine darstellen oder zur katalytischen Aktivierung des Rezeptors beitragen (Hubbard et al., 1998; Schlessinger, 2000).

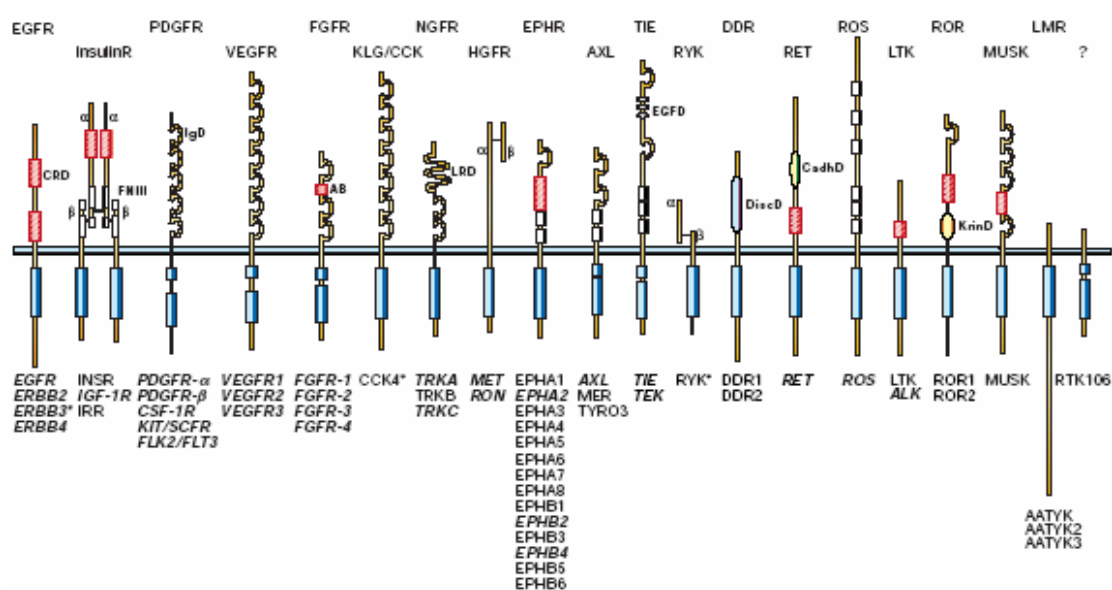


Abb. 1: Die Familien der Rezeptortyrosinkinasen. Die Abbildung zeigt die 20 identifizierten Familien der Rezeptortyrosinkinasen mit ihren klassifizierenden extrazellulären Domänen. EGFR, epidermal growth factor receptor; InsR, insulin receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; VEGFR; vascular endothelial growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; KLG/CCK, colon carcinoma kinase; NGFR, nerve growth factor receptor; HGFR, hepatocyte growth factor receptor, EphR, ephrin receptor; Axl, a Tyro3 PTK; TIE, tyrosine kinase receptor in endothelial cells; RYK, receptor related to tyrosine kinases; DDR, discoidin domain receptor; Ret, rearranged during transfection; ROS, RPTK expressed in some epithelial cell types; LTK, leukocyte tyrosine kinase; ROR, receptor orphan; MuSK, muscle-specific kinase; LMR, Lemur. Weitere Abkürzungen: AB, acidic box; CadhD, cadherin-like domain; CRD, cysteine-rich domain; DiscD, discoidin-like domain; EGFD, epidermal growth factor-like domain; FNIII, fibronectin type III-like domain; IgD, immunoglobulin-like domain; KrinD, kringle-like domain; LRD, leucine-rich domain (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

1.2.1.1 Die EGFR (epidermal growth factor receptor)-Familie

Eine der am besten erforschten Untergruppe der RTKs ist die EGFR-Familie. Sie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGFR (HER1, ErbB1) (Ullrich et al., 1984), HER2

(human EGFR, ErbB2/neu) (Coussens et al., 1985), HER3 (ErbB3) (Kraus et al., 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman et al., 1993). HER2 und HER3 nehmen in dieser Familie eine Sonderstellung ein. Während für HER2 bis heute kein direkter Ligand bekannt ist (Klapper et al., 1999), weist HER3 auf Grund von Punktmutationen innerhalb der katalytischen Domäne keine enzymatische Aktivität auf (Guy et al., 1994).

Die Mitglieder der EGFR-Familie stehen häufig in Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von Krebs beim Menschen (Olayioye et al., 2000). Eine erhöhte Expression des EGFR tritt bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungenkrebs auf (Salomon et al., 1995; Grandis et al., 1996). In 20 bis 30% aller Brustkrebsfälle wurde eine Amplifikation des *her2*-Gens und ein damit assoziiertes aggressives Tumorverhalten beobachtet (McCann et al., 1991; Hynes and Stern, 1994). Der kausale Zusammenhang zwischen HER2-Überexpression und einer schlechten klinischen Prognose wird gestützt durch eine signifikant geringere Überlebensrate und einem früher auftretenden Rezidiv bei Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Brust- oder Ovarialkrebs in Vergleich zu Patienten mit Tumoren ohne HER2-Überexpression (Berchuck et al., 1990; Slamon et al., 1989). Neben der klinischen Nutzung von HER2 als prognostischem Marker stellt dieser Rezeptor somit auch ein Ziel für eine spezifische Krebstherapie dar. So konnte mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalen anti-HER2-Antikörper, das erste Onkogen-spezifische Medikament entwickelt werden, das gegen einen transmembranen Rezeptor gerichtet ist (Shawver et al., 2002).

1.2.1.2 Aktivierung von Rezeptoren der EGFR-Familie

Viele Prinzipien, die der Aktion von RTKs zugrundeliegen, wurden durch die Erforschung des EGFR aufgedeckt. So liegt der Aktivierung von RTKs in der Regel die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren zu Grunde, die durch die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor ausgelöst wird (Schlessinger, 2002).

Zu den Liganden der EGFR-Familie zählen EGF, TGF- α (transforming growth factor- α), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), Epi- und Amphiregulin, Betacellulin sowie verschiedene Liganden der Heregulin/NDF- (neu differentiation factor) Untergruppe.

Zur Zeit existieren zwei verschiedene Modelle, die die Rezeptordimerisierung beschreiben. Ein Modell beschreibt einen Liganden-induzierten Mechanismus, bei dem ein Ligandenmolekül auf Grund seiner Bivalenz an zwei Rezeptormoleküle bindet und so die Rezeptordimerisierung initiiert (Gullick, 1994). Gegen dieses Modell sprechen die kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturen des EGFR im Komplex mit EGF oder TGF- α , die je Ligand nur eine Bindung an einen Rezeptor zeigen (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Diese Ergebnisse sprechen für einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus, bei dem die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung im Rezeptor bewirkt und so eine Interaktionsstelle in der extrazellulären Domäne freilegt (Ferguson et al., 2003; Jorissen et al., 2003).

Neben der Bildung von Rezeptorhomodimeren kann die Bindung eines Liganden auch zur Dimerisierung zweier verschiedener Rezeptoren und somit zur Bildung von Heterodimeren führen (Daly, 1999; Wallasch et al., 1995). Die in beiden Fällen folgende Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase leitet die Autophosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste ein. Diese Phosphorylierungsstellen dienen dann als Andockstation für Adaptormoleküle wie Grb2, Shc oder Gab1 und bilden den Ausgangspunkt für eine Reihe von Signalkaskaden (Hackel et al., 1999; Prenzel et al., 2001).

1.2.1.3 EGF-induzierte Signalkaskaden

Durch die Initiation intrazellulärer Signalkaskaden haben RTKs die Möglichkeit, externe Stimuli an zytoplasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiterzugeben. Die erste Komponente dieser Signalketten bilden in der Regel Adaptormoleküle, die SH2 (src homology 2)-Domänen (Bradshaw and Waksman, 2002) oder PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive aufweisen (Guy et al., 2002). Über diese Phosphotyrosin-bindenden Gruppen erfolgt die Interaktion mit den autophosphorylierten Tyrosinresten der RTKs und die Adaptormoleküle werden ihrerseits durch die Kinase des Rezeptors phosphoryliert. Außer den genannten Interaktionsmotiven besitzen viele Adaptormoleküle weitere Bindungsmodule wie z.B. PH (pleckstrin homology)-Domänen, die mit verschiedenen Phospholipiden sowie G $\beta\gamma$ -Dimeren heterotrimerer G-Proteine wechselwirken können (Shaw, 1996) oder SH3 (src homology 3)-Domänen, welche an Prolin-reiche Proteinsequenzen binden können (Zarrinpar et al., 2003). Die meisten Signalmoleküle tragen

verschiedene Bindungsmodule in Kombination und können daher mit mehreren Proteinen interagieren, was zur Bildung multimerer Signalkomplexe führt (Abb. 2).

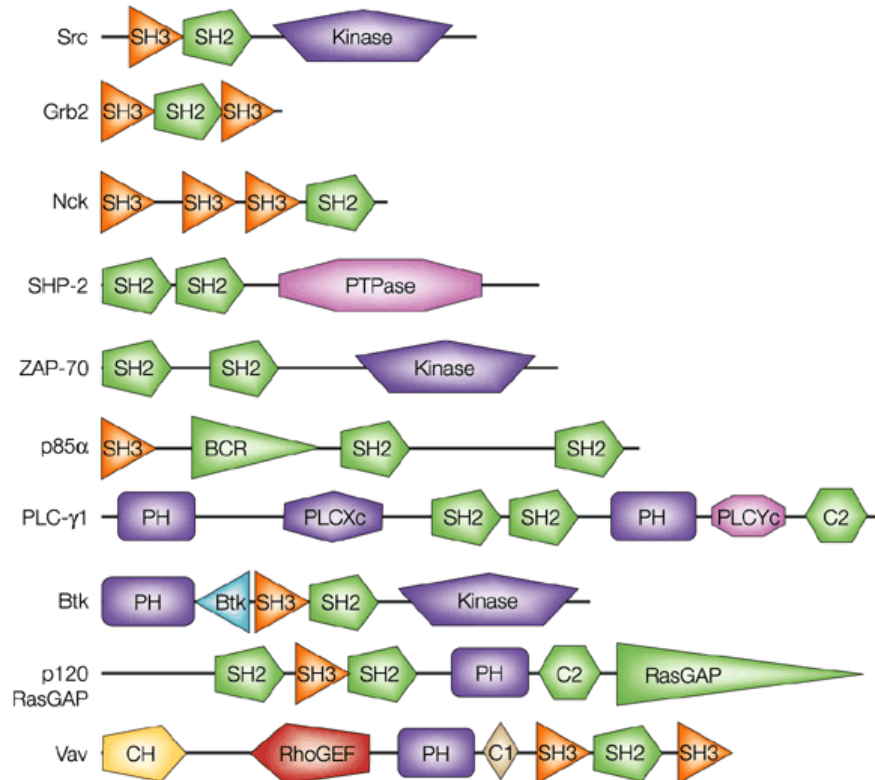


Abb. 2: Modulare Struktur einiger ausgewählter Signalmoleküle. Die farbigen Module repräsentieren konservierte funktionelle Domänen: BCR, GTPase-Aktivator-Domäne; Btk, Bruton-Tyrosinkinase-Cystein-reiches Motiv; C1 und C2, Proteinkinase C konservierte Domäne 1 und 2; CH, Calponin-Homologie-Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne; PLCXc und PLCYc, Teile der katalytischen Domäne von Phospholipase C; SH2 und SH3, src-Homologie-Domäne 2 und 3 (Yaffe, 2002).

1.2.1.3.1 Die MAP Kinase Kaskade

Die Kaskade biochemischer Ereignisse, die vom EGFR über die Aktivierung des Protoonkogens Ras zur Kontrolle der Genexpression durch MAPKs (mitogen-activated protein kinases) führt, gehört zu den am besten untersuchten Signalwegen und wird als Ras/MAPK-Signalweg bezeichnet (Graves et al., 1995). In diesem Szenario spielt das Adaptorprotein Grb2 eine Schlüsselrolle. Grb2 besteht aus zwei SH3- und einer SH2-Domäne und besitzt keine enzymatische Aktivität (Tari and

Lopez-Berestein, 2001). Nach der Aktivierung und Autophosphorylierung des EGFR bindet Grb2 entweder direkt in einem SH2-Domäne-vermittelten Prozess oder indirekt mittels Interaktion mit Shc, einem weiteren Adaptormolekül, an den Rezeptor. Über seine SH3-Domäne rekrutiert Grb2 dann den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless) zur Zellmembran. Diese Translokation des Grb2/Sos-Komplexes begünstigt die Wechselwirkung von Sos mit dem membranassoziierten kleinen G-Protein Ras und den Austausch von Ras-gebundenem GDP gegen GTP. Das somit aktivierte Ras-Protein seinerseits aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf-1. Dies führt über die intermediären Threonin/Tyrosin-Kinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinasen 1 und 2) zur Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von ERK1 und ERK2 (extracellular regulated kinase 1 and 2), die daraufhin in den Zellkern translokieren und dort durch Serin/Threoninphosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk die Transkription regulieren (Cobb et al., 1991; Khokhlatchev et al., 1998; Treisman, 1996) (Abb. 3).

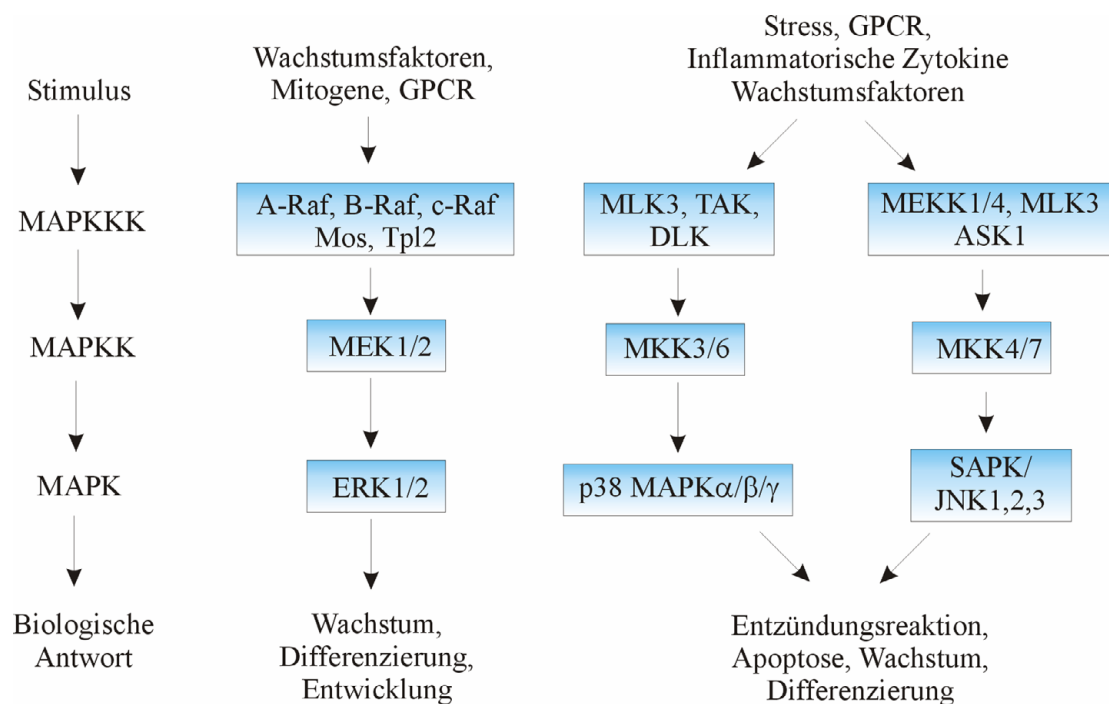


Abb. 3: Die MAPK-Signalwege. Schematische Darstellung der MAPK Kaskaden, die zur Aktivierung der MAPK ERK1/2, JNK1,2,3 und p38 $\alpha/\beta/\gamma$ führen (Garrington and Johnson, 1999).

Parallel zur ERK/MAPK-Kaskade werden in höheren eukaryotischen Systemen weitere MAPK-Kaskaden aktiviert, die ebenfalls die Signalübertragung in den Kern übernehmen. Die daran beteiligten Proteinkinasen besitzen einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden Proteinen des ERK-Signalweges. So sind die den ERK1 und 2 homologen Kinasen Jnk1 und 2 (c-jun N-terminal kinase 1 and 2), sowie die nach ihrer Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Während ERK1/2 in der Regel hauptsächlich nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden, wird die Aktivität von JNK1/2 und p38 von diesen Stimuli nur eingeschränkt induziert. Die Hauptaktivatoren dieser Kinasen sind zellulärer Stress in Form von UV-Bestrahlung, osmotischem Schock oder proinflammatorische Zytokine (Derijard et al., 1994; Su and Karin, 1996).

1.2.1.4 Signaldiversifikation innerhalb der EGFR-Familie

Signaltransduktion durch die Rezeptoren der EGFR-Familie trägt zu einer Vielzahl von Entwicklungs- und Krankheitsprozessen bei (Burden and Yarden, 1997). Ebenso zeigt die Stimulation von kultivierten Zellen mit verschiedenen Liganden der EGFRen ganz unterschiedliche Einflüsse auf das Migrations-, Proliferations- oder Differenzierungsverhalten der Zellen. Wie kommt es zu diesem breiten Spektrum an zellulären Antworten? Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung verschiedener Liganden an den gleichen Rezeptor zu einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptormoleküls führen kann, obwohl die absolute Gesamtphosphorylierung gleich ist. So zeigten Sweeney und Kollegen, dass einige Tyrosinreste von HER4 nur nach Stimulation mit bestimmten Liganden phosphoryliert wurden, während die Phosphorylierung anderer Tyrosine mit jedem Liganden für HER4 induziert werden konnte (Sweeney et al., 2000). Ein einzelner Rezeptor scheint somit in der Lage zu sein, je nach gebundenem Liganden ganz unterschiedliche Signale in die Zelle weiterzuleiten und so zur Signalvariabilität beizutragen.

Andererseits kommt es, wie bereits erwähnt, nach der Bindung eines Liganden neben der Bildung von Homodimeren auch zur Wechselwirkung zweier unterschiedlicher Rezeptoren, wobei HER2 der bevorzugte Heterodimerisierungspartner ist. Da jeder Rezeptor mit einer spezifischen Auswahl intrazellulärer Adaptoren und

Signalmolekülen interagiert, besteht hier eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines breiten Spektrums zellulärer Antworten. Hinweise auf eine selektive Transphosphorylierung in Abhängigkeit vom Bindungspartner untermauern zusätzlich eine Rolle der Heterodimerisierung bei der Signaldiversifikation (Muthuswamy et al., 1999; Olayioye et al., 1998). Dieses interaktive und vielschichtige Signalnetzwerk mit seinen kombinatorischen Möglichkeiten sowohl auf Expressions- als auch auf Aktivierungsebene erlaubt eine spezifische biologische Antwort in jedem physiologischen Kontext (Abb. 4).

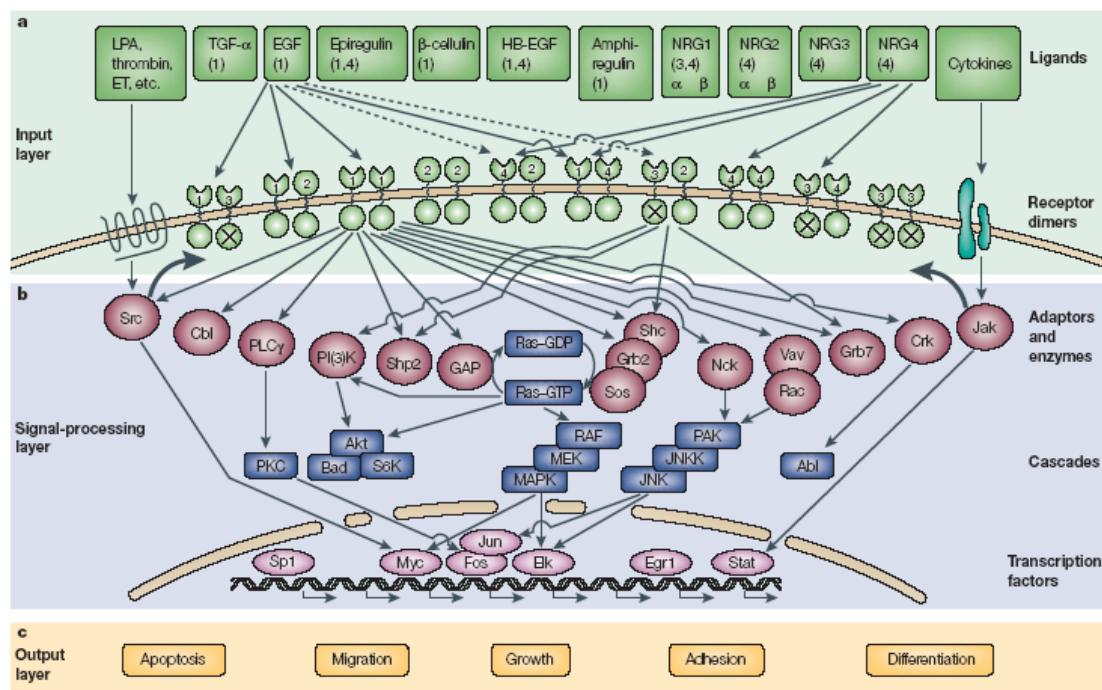


Abb. 4: Das komplexe Signalnetzwerk der EGFR-Familie. Die kombinatorischen Möglichkeiten der verschiedenen Liganden, Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden ermöglichen ein hohes Maß an Signaldiversifikation (Yarden and Sliwkowski, 2001). Nähere Erläuterungen im Text.

1.2.1.5 Negativregulation von Rezeptoren der EGFR-Familie

Die Vielfalt normaler zellulärer Funktionen, die durch die Mitglieder der EGFR-Familie reguliert werden, sowie die pathophysiologische Relevanz uneingeschränkter Kinaseaktivität unterstreichen die Notwendigkeit einer straffen aber fein abgestimmten Kontrolle der Signalweiterleitung durch RTKn. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen eine

angemessene Dauer und Stärke des Signals von Rezeptoren garantiert. Im Falle des EGFRs konnten mehrere Wege der Rezeptorregulation identifiziert werden (Fiorini et al., 2001). Diese schließen Liganden-induzierte Endozytose (Wiley and Burke, 2001), Degradation durch die Ubiquitin-Proteasom-Maschinerie (de Melker et al., 2001; Levkowitz et al., 1998) und Induktion inhibitorischer Proteine (Azios et al., 2001; Doherty et al., 1999; Hackel et al., 2001) ein. Ein nahe liegender und wichtiger Weg der Negativregulation von Rezeptortyrosinkinasen ist die Kontrolle der Tyrosinphosphorylierung durch Proteintyrosinphosphatasen, auf die in Abschnitt 1.3.4 eingegangen wird.

1.2.2 Zytoplasmatische Tyrosinkinasen

Intrazelluläre Tyrosinkinasen sind an einer Vielfalt von Signalwegen beteiligt, die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden und für die eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine charakteristisch ist. Viele zytoplasmatische PTKn übermitteln Signale von Transmembranrezeptoren wie z. B. Peptidhormon-, Zytokin- oder Immunrezeptoren. Andere Kinasen werden durch zelluläre Ereignisse wie Adhäsion an andere Zellen oder die extrazelluläre Matrix, Kalziumeinstrom in die Zelle oder in bestimmten Stadien des Zellzyklus aktiviert (Kolibaba and Druker, 1997).

Neben der katalytischen Domäne besitzen zytoplasmatische PTKn meist zusätzliche funktionelle Sequenzabschnitte, die die Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. SH2- oder SH3-Domänen) oder die intrazelluläre Lokalisation regulieren (s. Abb. 5).

Die Regulation zytoplasmatischer PTKn kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Aktivierung beruht meist auf intermolekularer oder autokatalytischer Tyrosinphosphorylierung, allerdings kann die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste auch zur Inaktivierung führen, wie z. B. für c-Src gezeigt wurde (Parsons and Parsons, 1997). Ein anderer wichtiger Aspekt bei der Signalübertragung durch zytoplasmatische PTKn ist deren intrazelluläre Lokalisation. Die Kinase FAK (focal adhesion kinase) ist ausschließlich an Punkten der Zell-Matrix-Adhäsion, den sogenannten „focal adhesions“ lokalisiert (Schaller et al., 1992). Ein anderes Beispiel ist die Kinase c-Src, die über Myristoylierung des Aminoterminus mit der Plasmamembran assoziieren kann (Resh, 1994).

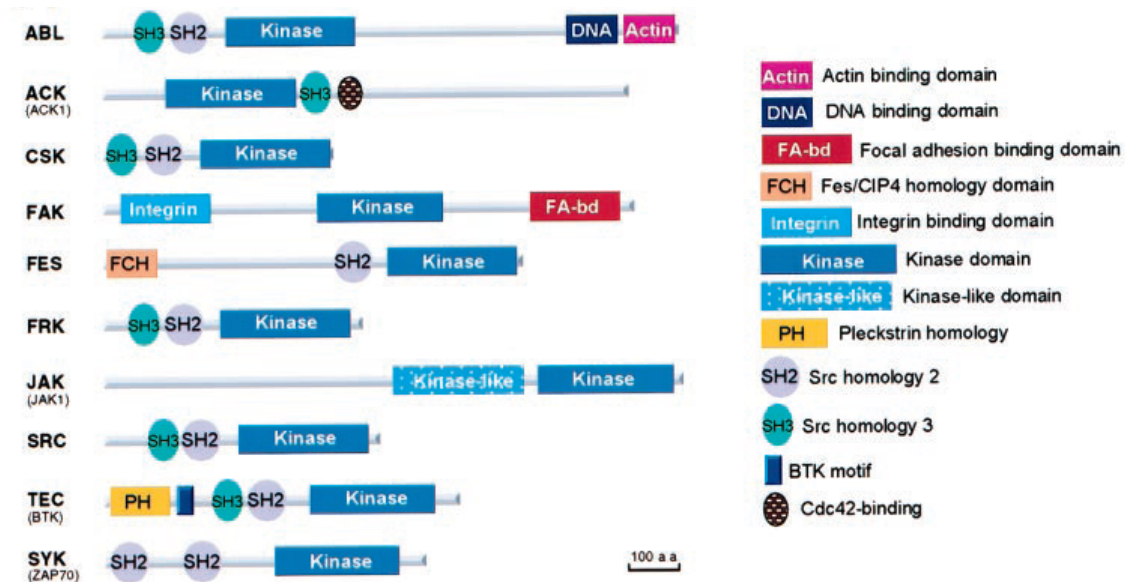


Abb. 5: Struktur einiger zyttoplasmatischer Kinasen. Die farbigen Abschnitte repräsentieren funktionelle Abschnitte innerhalb des Kinaseproteins (Robinson et al., 2000).

1.3 Proteintyrosinphosphatasen (PTPn)

Sehr bald nach der Entdeckung der Tyrosinkinase gab es erste Hinweise auf die Existenz und Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen. Mit der vollständigen Aufreinigung und Sequenzanalyse der zytosolischen Phosphatase 1B wurde das erste Mitglied einer neuen Enzymfamilie entdeckt, die spezifisch die Dephosphorylierung von Tyrosinresten katalysiert (Tonks et al., 1988a; Tonks et al., 1988b). Während ein Sequenzvergleich mit Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen oder Alkalischer Phosphatase keine wesentlichen Übereinstimmungen ergab, konnte eine deutliche Homologie zu dem in Leukozyten exprimierten, membranständigen Protein CD45 gezeigt und eine stark konservierte Proteintyrosinphosphatasedomäne identifiziert werden [Charbonneau et al., 1989; Charbonneau et al., 1988].

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

Außerhalb der Phosphatasedomäne weisen Phosphatasen eine starke strukturelle Vielfalt auf. Auf der Basis dieser verschiedenen Strukturmerkmale und der

Lokalisation innerhalb der Zelle werden Phosphatasen analog den Proteintyrosinkinasen in membranständige und zytoplasmatische PTPn unterteilt.

1.3.1 Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTPn)

Membranständige, rezeptorähnliche Proteintyrosinphosphatasen bestehen aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Bereich mit einer oder zwei Phosphatasedomänen. Aufgrund der Diversität im extrazellulären Bereich werden auch Rezeptortyrosinphosphatasen in verschiedene Klassen unterteilt. Die Klasse I umfasst dabei die in hämatopoietischen Zellen exprimierte Phosphatase CD45 (Charbonneau et al., 1989; Charbonneau et al., 1988; Thomas et al., 1985) sowie Ch-PTP1 (Fang et al., 1994). Neben zwei charakteristischen Phosphatasedomänen im zytoplasmatischen Teil weisen Klasse-I-Phosphatasen in ihrem extrazellulären Bereich zwei Spektrin-ähnliche Elemente und ein Fibronectin-ähnliches Motiv auf (Fang et al., 1994). CD45 kommt im Rahmen der Antigen-induzierten Aktivierung von B- und T-Zell-Rezeptoren eine zentrale Rolle zu (Trowbridge and Thomas, 1994).

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

Als extrazelluläres Strukturmerkmal weisen Klasse-III-Rezeptortyrosinphosphatasen charakteristischerweise ausschließlich Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen in unterschiedlicher Anzahl auf. Für die Mehrzahl der Mitglieder dieser Familie ist weiterhin das Vorhandensein von nur einer Phosphatasedomäne kennzeichnend. Entsprechend dieser Strukturmerkmale werden PTP β (Krueger et al., 1990), DEP-1

(Ostman et al., 1994), SAP-1 (Matozaki et al., 1994) sowie in *Drosophila* die Phosphatasen DPTP10D (Yang et al., 1991) und DPTP99A dieser Familie zugeordnet. PTP99A stellt aufgrund des Vorhandenseins von zwei Phosphatasedomänen in gewissem Maße eine Ausnahme dar, wobei in der zweiten, carboxyterminalen Domäne der katalytisch essentielle Cysteinrest nicht konserviert ist (Hariharan et al., 1991).

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

Als charakteristisch für die Klasse-V-Phosphatasen PTP γ und RPTP β /PTP ζ gilt neben einer Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domäne ein sogenanntes CAH-Motiv im aminoterminalen extrazellulären Bereich, das Homologie zu dem Enzym Carboanhydratase aufweist. Die für dessen katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren sind jedoch nicht konserviert (Barnea et al., 1993; Krueger et al., 1990).

1.3.2 Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen

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

Die zytoplasmatischen Phosphatasen PTP1B (Chernoff et al., 1990) und TC-PTP (Cool et al., 1989; Mosinger et al., 1992; Swarup et al., 1991) weisen am Carboxyterminus einen hydrophoben Sequenzbereich auf, dem für die Verankerung von PTP1B im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Woodford-Thomas et al., 1992) bzw. TC-PTP im perinukleären Raum (Cool et al., 1990) eine maßgebliche Rolle zukommt. Die unmittelbare Lokalisation von PTP1B am endoplasmatischen Retikulum scheint für die Regulation der katalytischen Aktivität von Bedeutung zu sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die durch eine Ca²⁺-abhängige Protease vermittelte proteolytische Spaltung von PTP1B zu deren Freisetzung vom ER führt und dies mit einer Zunahme der katalytischen Aktivität einhergeht. Ähnlich wurde für

TC-PTP eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Entfernung des carboxyterminalen Segmentes beobachtet (Cool et al., 1990).

Eine weitere Gruppe von intrazellulären Phosphatasen definiert sich durch das Vorhandensein einer sogenannten Ezrin-ähnlichen Domäne. Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Motiv mit Homologie zu Proteinen wie Bande4.1-Protein, Ezrin, Radixin oder Talin (Conboy et al., 1986; Sato et al., 1992), die am Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Die Untergruppe dieser Phosphatasen wird durch die Mitglieder MEG-1 (Gu et al., 1991), PTP-H1 (Yang and Tonks, 1991), PTP-D1 (Moller et al., 1994) sowie PTP-BAS gebildet (Maekawa et al., 1994). Der Aufbau und die Umstrukturierung des Zytoskeletts geht in vielen Fällen mit der Tyrosinphosphorylierung verschiedener, mit dem Zytoskelett kolokalisierender und assoziierender Proteine einher (Luna and Hitt, 1992), wobei zahlreiche Komponenten der Zytoskeletts direkte Substrate für Tyrosinkinase darstellen. Die Identifizierung der Ezrin-ähnlichen Domäne deutet daher auf eine Interaktion dieser Phosphatase-Untergruppe mit Komponenten des Zytoskeletts und auf eine mögliche regulatorische Rolle im Rahmen des Aufbaus und der Organisation des Zytoskeletts hin. Desweiteren weisen MEG-1, PTP-H1 und PTP-D1 ein, PTP-BAS fünf sogenannte GLGF-Motive auf. Eine derartige Struktur wurde in der an Zellverbindungen assoziierten Guanylat-Kinase oder in Proteinen mit sogenannten PEST-Wiederholungen gefunden. Eines der fünf GLGF-Motive in PTP-BAS vermittelt die Bindung dieser Phosphatase an den Transmembranrezeptor FAS-1.

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

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

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

Die systematische Zusammenstellung der wesentlichen Gruppen der Proteintyrosinphosphatasen in Abbildung 6 macht die enorme Diversität und Vielfalt dieser Proteinklasse deutlich und weist auf ihre zentrale biologische Funktion in der Regulation der intra- und interzellulären Kommunikation hin.

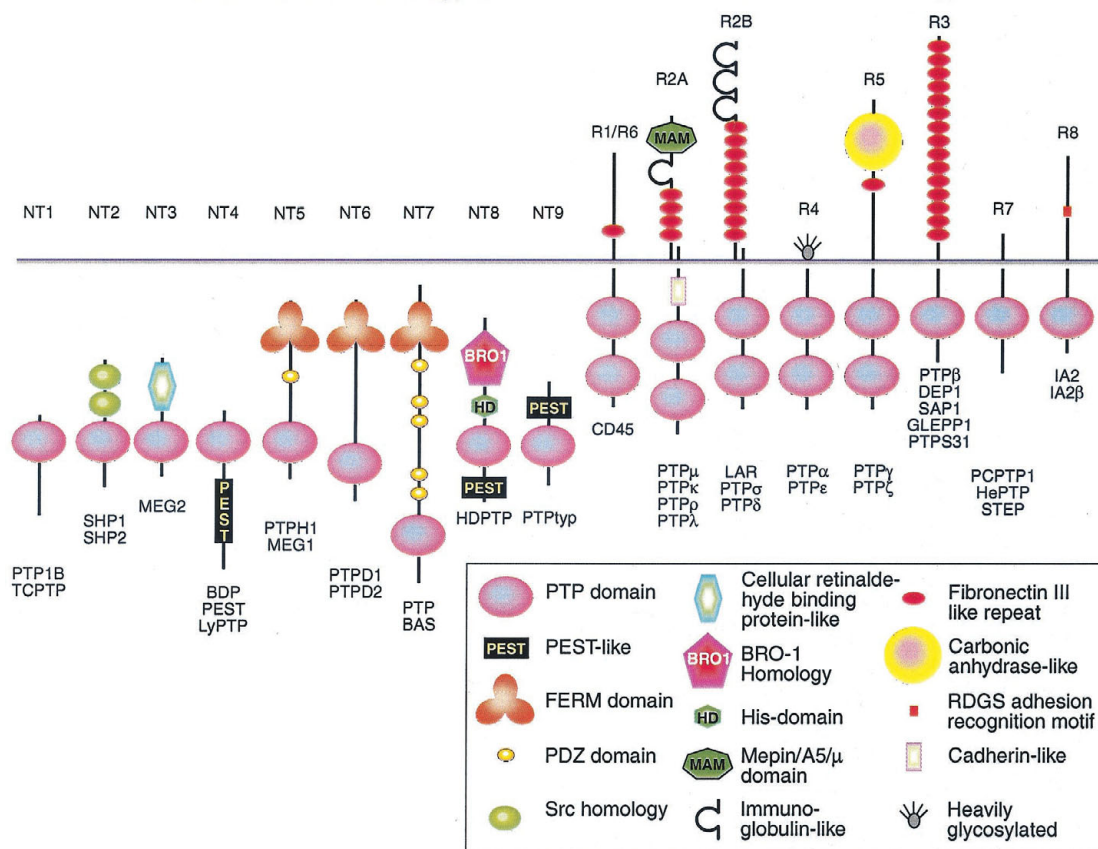


Abb. 6: Schematische Darstellung der Familie der Proteintyrosinphosphatasen. Die Abbildung gibt einen Überblick über die Familie der Proteintyrosinphosphatasen mit den Unterfamilien der Rezeptortyrosinphosphatasen sowie den zytoplasmatischen Phosphatasen (Andersen et al., 2001).

1.3.2.1 BDP1 – ein Mitglied der PEST-Phosphatasenfamilie

Eine weitere Unterfamilie der zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen ist die PEST-Familie. Die zu dieser Gruppe gehörenden Phosphatasen BDP1, PTP-PEST und PEP zeichnen sich durch eine gemeinsame Struktur aus, die aus einer N-terminalen katalytischen Domäne und einer benachbarten nichtkatalytischen, Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reichen Domäne besteht. Für diese namensgebende PEST-Domäne wurde ursprünglich eine Rolle in der Destabilisierung von Proteinen vermutet (Rogers et al., 1986), jedoch wurde für die PEST-Phosphatasen eine durchschnittliche Halbwertszeit bestimmt, so dass diese Domäne wohl nicht zur verstärkten Proteolyse beiträgt (Charest et al., 1995; Flores et al., 1994). Der Prolin-reiche und hochkonservierte C-terminale Bereich der Mitglieder der PEST-Familie umfasst 20 Aminosäuren und wird als C-terminale Homologiedomäne (CTH) bezeichnet.

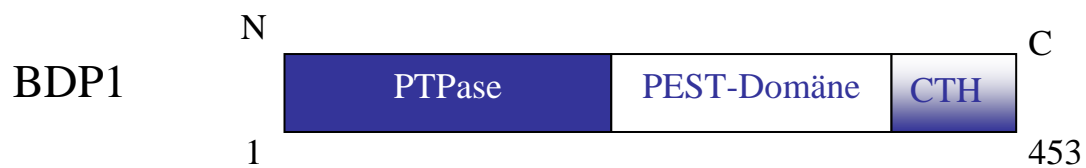


Abb. 7: Die Struktur der zytoplasmatische Phosphatase BDP1. Die Zahlen beschreiben die Position der Aminosäuren. Nähere Erläuterungen zur Struktur finden sich im Text.

PEP wird ausschließlich in hämatopoietischen Zellen exprimiert und scheint über die Interaktion mit $p50^{\text{csk}}$ an der Negativregulation der src-Kinase-vermittelten Signaltransduktion des T-Zellrezeptors beteiligt zu sein (Gjorloff-Wingren et al., 1999). PTP-PEST dagegen ist ein ubiquitinär exprimiertes Protein. Ebenso wie für PEP konnte eine Interaktion mit $p50^{\text{csk}}$ gezeigt werden, die über eine Prolin-reiche Sequenz in der PEST-Domäne der beiden Phosphatasen vermittelt wird. Weitere Prolin-reiche Sequenzen von PTP-PEST ermöglichen die Bindung der Phosphatase an $p130^{\text{Cas}}$, einem physiologischen Substrat von PTP-PEST, und Paxillin, wodurch der Phosphatase eine mögliche Rolle bei der Regulation von Zell-Matrix-Kontakten, den sogenannten „focal adhesions“, sowie Migration und Zytokinese von Fibroblasten zugeschrieben wird (Angers-Loustau et al., 1999; Cote et al., 1999; Garton and

Tonks, 1999; Shen et al., 2000). Ebenfalls über Prolin-reiche Sequenzen wird die Bindung an die Adaptorproteine Grb2 und Shc ermöglicht, deren funktionelle Bedeutung jedoch noch nicht ermittelt werden konnte (Charest et al., 1996; Charest et al., 1997).

Die Expression von BDP1 (brain derived phosphatase 1) (Kim et al., 1996), auch bekannt als PTP20 (Aoki et al., 1996), PTP-HSCF (für hematopoietic stem cell factor) (Cheng et al., 1996), PTP-K1 (Huang et al., 1996) oder FLP1 (für fetal liver phosphatase) (Dosil et al., 1996), konnte sowohl in hematopoietischen Zellen als auch in einer Reihe humaner Gewebe und Zelllinien aus z. B. Darm, Niere und Brust gezeigt werden (Cheng et al., 1996; Kim et al., 1996). Über die physiologische Funktion von BDP1 ist bis heute nur wenig bekannt. Ebenso wie die beiden anderen PEST-Familienmitglieder interagiert BDP1 mit p50^{csk} und kann so die Aktivität von src-Kinasen negativregulatorisch beeinflussen. Im Gegensatz zu PEP und PTP-PEST erfolgt die Bindung von BDP1 an p50^{csk} jedoch nicht über die Interaktion der Prolin-reichen Sequenzen in BDP1 und der SH3-Domäne von p50^{csk}. Die Wechselwirkung dieser beiden Proteine wird vielmehr durch die SH2-Domäne von p50^{csk} vermittelt, die zwei phosphorylierte Tyrosine im nichtkatalytischen Teil von BDP1 binden kann (Wang et al., 2001). Desweiteren konnten Spencer und Kollegen zeigen, dass BDP1 ebenso wie die beiden anderen PEST-Phosphatasen mit den zytoskeletalen Proteinen PSTPIP1 und 2 (proline, serine, threonine phosphatase interacting protein 1 and 2) interagiert. Hierbei wurde ein neuer Bindemechanismus aufgedeckt, der die Interaktion der sogenannten „coiled-coil“-Domäne von PSTPIP und der Prolin-reichen C-terminalen Homologiedomäne von BDP1 beschreibt (Spencer et al., 1997). Aufbauend auf diesen Resultaten zeigte die Gruppe um Cong, dass BDP1 und PTP-PEST durch die Bindung an PSTPIP1 zur zytoplasmatischen Kinase c-Abl rekrutiert werden und deren Aktivität durch Dephosphorylierung negativ regulieren können (Cong et al., 2000).

1.3.3 Der katalytische Mechanismus der Proteindephosphorylierung

Der ausgeprägten Homologie im Bereich des katalytischen Zentrums, das durch die Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G gekennzeichnet ist, liegt der allen Tyrosinphosphatasen gemeinsame katalytische Mechanismus zugrunde (Kolmodin

and Aqvist, 2001). Von essentieller Bedeutung für die Phosphataseaktivität ist hierbei der im katalytischen Zentrum konservierte Cysteinrest. Der Austausch dieses Cysteins gegen Alanin oder Serin führt zur vollständigen Inhibition der Phosphataseaktivität (Guan and Dixon, 1991). Die Bedeutung dieses hochkonservierten Aminosäurerestes erklärt sich aus dem Mechanismus der enzymatischen Reaktion von Phosphatasen, welcher mittels biochemischer Analysen insbesondere an der *Yersinia* PTPase aufgeklärt wurde (Zhang, 1998; Zhang et al., 1994b).

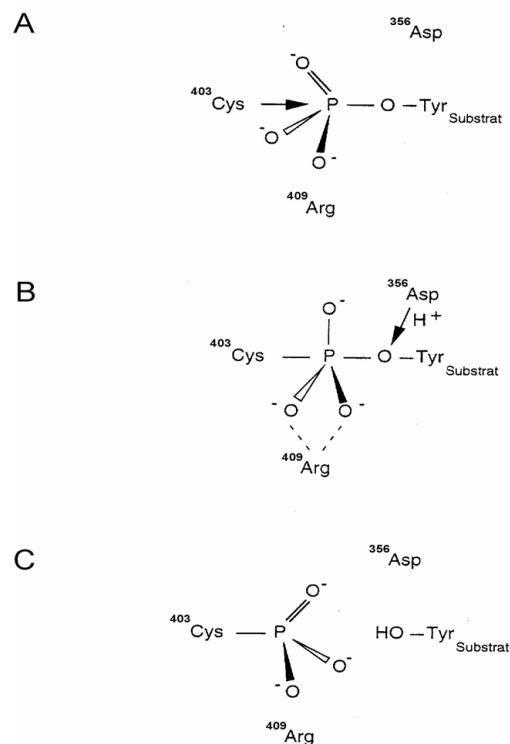


Abb. 8: Der Katalysemechanismus von Proteintyrosinphosphatasen. Die Nummerierung der an der Reaktion beteiligten Aminosäuren entspricht der Position in der Tyrosinphosphatase von *Yersinia*. (Zhang et al., 1994b) Weitere Erläuterungen zu dieser Abbildung finden sich im Text.

Nach der Bindung eines Substrats an das katalytische Zentrum der Phosphatase kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des Cysteinrestes auf das Phosphoratom des phosphorylierten Tyrosinrestes (Abb. 8A). Daraus resultiert die Ausbildung eines pentakovalenten Übergangszustandes, der durch die Guanidinogruppe eines benachbart liegenden Argininrestes im katalytischen Zentrum stabilisiert wird (Abb. 8B). Die abgehende Gruppe, und damit das Substrat, wird

anschließend von einem als katalytische Säure fungierenden Asparaginsäurerest protoniert (Abb. 8C). Als Ergebnis resultiert aus dieser ersten Teilreaktion des Katalysemechanismus von PTPasen ein kovalentes Enzym-Thiophosphat-Intermediat und das freie, dephosphorylierte Substrat.

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



- E = ENZYM
 S = SUBSTRAT
 Y = TYROSINREST
 (P) = PHOSPHATGRUPPE

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

1.3.4 Regulation von Rezeptortyrosinkinasen der EGFR-Familie durch Phosphatasen

Die Forschungsergebnisse der letzten zwei Dekaden brachten immer deutlicher zum Vorschein, dass die Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen zumindest partiell durch Proteintyrosinphosphatasen reguliert wird. So führt einerseits die Inhibierung von zellulären Phosphatasen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (Jallal et al., 1992). Andererseits weist die schnelle Dephosphorylierung von Ligand-aktivierten Rezeptortyrosinkinasen nach Behandlung von Zellen mit Kinaseinhibitoren auf eine Kontrolle durch Phosphatasen hin (Sorby

and Ostman, 1996). Somit scheinen Phosphatasen sowohl die Liganden-unabhängige als auch die Liganden-induzierte Signalgenerierung durch Rezeptortyrosinkinasen zu beeinflussen.

Für eine Reihe von Rezeptortyrosinkinasen sind bereits eine oder mehrere Phosphatasen als Negativregulatoren identifiziert worden (Ostman et al., 2001). Im folgenden soll jedoch genauer auf die Kontrolle der EGFR-Signaltransduktion durch Phosphatasen eingegangen werden. So zeigten z. B. Hashimoto und Kollegen, dass die katalytische Domäne der Rezeptorphosphatase LAR den EGFR *in vitro* dephosphorylieren kann (Hashimoto et al., 1992), während die Unterdrückung der LAR-Expression durch Antisense-Konstrukte zu einer Erhöhung der Wachstumsfaktor-stimulierten EGFR-Aktivierung führt (Kulas et al., 1996).

Auch für die zytoplasmatische Phosphatase SHP-1 wurde eine mögliche regulatorische Funktion eingeräumt. SHP-1 assoziiert mittels der N-terminalen SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosin 1173 des EGFRs und unterdrückt die EGF-induzierte Aktivierung des Rezeptors (Keilhack et al., 1998; Tenev et al., 1997b).

Zwei weitere zytoplasmatische PTPn, für die eine Rolle in der EGFR-Kontrolle impliziert wird, sind die verwandten Phosphatasen PTP1B und TCPTP. PTP1B sowie eine 48 kDa schwere Spleißvariante der TCPTP sind im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Lammers und Kollegen zeigten, dass die Überexpression jeder dieser Phosphatasen zusammen mit dem EGFR zu einer Reduktion der Liganden-unabhängigen EGFR-Phosphorylierung führt, während die Aktivierung des Rezeptors durch Liganden unbeeinflusst bleibt (Lammers et al., 1993). Die Entwicklung von sogenannten „Substrate Trapping“-Mutanten, bei denen entweder das katalytische Cystein gegen Serin ausgetauscht (C/S-Mutante) oder wie bei der meist effektivere D/A-Mutante das katalytisch invariante Aspartat durch Alanin ersetzt wird, zeigten eine Assoziation dieser beiden Enzyme mit dem phosphorylierten EGFR sowohl in Kopräzitations- als auch in Kolokalisationsstudien (Liu and Chernoff, 1997; Milarski et al., 1993; Tiganis et al., 1998b; Tiganis et al., 1999). Die Lokalisation der Phosphatasen im endoplasmatischen Retikulum wirft die Frage auf, warum der EGFR als Zelloberflächenrezeptor im ER reguliert wird. Eine Erklärungsmöglichkeit ist die Regulation der Aktivität des neu gebildeten, noch ER-lokalisierten EGFRs, der die Möglichkeit zur Autophosphorylierung besitzt (Slieker et al., 1986). So könnte ein

unter Umständen inadäquates und Liganden-unabhängiges EGFR-Signal verhindert werden.

Eine weitere Spleißvariante von TCPTP mit einem Molekulargewicht von 45 kDa dagegen scheint die Aktivität des membranständigen EGFRs zu regulieren. Diese Form von TCPTP ist in unstimulierten Zellen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, kann jedoch nach EGFR-Aktivierung den Zellkern verlassen und bildet einen Komplex mit Tyrosin-phosphorylierten Substraten im Zytoplasma, zu denen auch der EGFR gehört (Tiganis et al., 1998a; Tiganis et al., 1999).

Während im Falle des EGFR somit bereits eine Reihe von negativregulatorischen Phosphatasen beschrieben wurden, konnte bislang keine regulatorische Phosphatase für die übrigen EGFR-Familienmitglieder gefunden werden. Das breite Spektrum normaler zellulärer Prozesse, die durch die EGFR-Familie gesteuert werden, ebenso wie die pathophysiologische Relevanz unkontrollierter Kinaseaktivität insbesondere von HER2 unterstreichen die Notwendigkeit der Erforschung von Kontrollmechanismen durch Phosphatasen, die unter Umständen wertvolle Therapieansätze für hyperproliferative Krankheiten wie z.B. Krebs bieten könnten.

1.4 Proteintyrosinphosphatasen – potentielle Tumorsuppressoren?

Beruhend auf dem Potential der Proteintyrosinphosphatasen, die Signaltransduktion onkogener Kinasen gegenzuregulieren, wurde seit ihrer Entdeckung im Jahr 1988 (Tonks et al., 1988a; Tonks et al., 1988b) eine potentielle Tumorsuppressorfunktion für diese Enzymgruppe postuliert. Trotz intensiver Forschung wurden bisher jedoch nur wenige Anhaltspunkte gefunden, die diese Hypothese stützen. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphatase DEP-1, die als Negativregulator für die RTKs PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) (Kovalenko et al., 2000; Persson et al., 2002) und Met (Palka et al., 2003) bekannt ist. Die Fähigkeit von DEP-1 zur Beeinflussung der PDGF-induzierten Zellmigration und Zell-Matrix-Adhäsion sowie die häufig auftretende Deletion des DEP-1-Gens PTPRJ in humanen Tumoren deuten auf eine potentielle Funktion von DEP-1 als Tumorsuppressor hin (Ruivenkamp et al., 2003; Ruivenkamp et al., 2002).

1.5 Zielsetzung

Obwohl die Identifizierung von PTP1B als erste Proteintyrosinphosphatase (Tonks et al., 1988a; Tonks et al., 1988b) nur eine Dekade nach der Entdeckung von v-src als erste Proteintyrosinkinase (Collett and Erikson, 1978) erfolgte, ist über Vorkommen und Funktion der meisten PTPs im Vergleich zu den entsprechenden Daten über Kinasen nur wenig bekannt. In Anbetracht der lang postulierten Tumorsuppressorfunktion von Tyrosinphosphatasen ist ihre weitere Erforschung in physiologischen wie pathophysiologischen Prozessen von großem Interesse.

Über die Proteintyrosinphosphatase BDP1 lagen zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Daten vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische und pathophysiologische Rolle von BDP1 in der zellulären Signaltransduktion untersucht werden. Ein Schwerpunkt sollte dabei die potentielle Regulation von Kinasen der EGFR-Familie durch BDP1 sein.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG1478	Alexis Biochemicals, Lausen
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borhydrid	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Biotrend Chemikalien, Köln
CNBr-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethansulfonsäure	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Polysciences, Eppenheim
Genistein	Sigma, Taufkirchen
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin- Imatinib	Dr. Keri, Vychem, Ungarn
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
MBP (myelin basic protein)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piceatannol	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen

PP1	Alexis Biochemicals, Lausen
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
T4 Gen 32 Protein	Pharmacia, Freiburg
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

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

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt/Main
Reverse Transkriptase, AMV	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin (Gibco)	Invitrogen, Eggenstein

2.1.3 „Kits“ und Sonstiges

ECL Kit	PerkinElmer/NEN, Köln
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Poly Prep® Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.4 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (Maus)	Toyoba, Japan
Heregulin- β 1 EGF domain	R & D Systems,
IGF1	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Lilly, Giessen

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Medien für E.coli Bakterien

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

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

Ampicillin	100 μ g/ml
Kanamycin	100 μ g/ml

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

2.2.2 Zellkulturmedien

Alle GibcoTM Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Eggenstein), fötales Kälberserum von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose und 2mM L-Glutamin

Minimum essential medium (MEM) mit 2 mM L-Glutamin

RPMI medium1640 mit 2 mM L-Glutamin

Nutrient mixture F12 (HAM) mit 2mM L-Glutamin

L15 (Leibovitz) Medium

Die Medien wurden gemäß den Herstellerangaben mit 1 mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Je nach kultivierter Zelllinie wurde den Medien hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt.

Einfriermedium: 90% 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 ₂ HPO ₄
	pH 6.96 (NaOH)	
Denhardt (100x)	2,0 %	Polyvinylpyrrolidon
	2,0 %	Ficoll
	2,0 %	BSA
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30 %	Glyzerin
	100 mM	EDTA pH 8,0
HBS (2x)	280 mM	NaCl
	1.5 mM	Na ₂ HPO ₄
	100 mM	Hepes
	pH 7.0	
Lämmli-Puffer (3x)	20 %	Glyzerin
	3 %	SDS
	10 mM	EDTA pH 8.0
	0,05 %	Bromphenolblau
	5 %	Mercaptoethanol
NET (10x)	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl pH 7.4
	0,05 %	Triton X-100
PBS	137 mM	NaCl
	27 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl)
SD-Transblot	50 mM	Tris/HCl pH 7.5
	40 mM	Glycin

	20 %	Methanol
	0,004 %	SDS
„Strip“-Puffer	62,5 mM	Tris/HCl pH6.8
	2 %	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM	Tris/Acetat, pH 8.0
	10 mM	EDTA
TE 10/0.1	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
	0.1 mM	EDTA pH 8.0
Tris-Glycin-SDS (10x)	250 mM	Tris/HCl pH 7.5
	2 M	Glycin
	1 %	SDS

2.3 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5αF'	F' endA1 hsd17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 recA1 gyrA (Nal) thi-1 Δ(lacZYA-argF196)	Genentech, USA
CJ236	dut ung thi-1 relA	Kunkel, 1985
BL21 Codon+ (DE3)	F' ompT hsdS(r _B -m _B -) dcm+ Tet ^r galλ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene, NL

2.4 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenfibroblasten Transformiert mit Adenovirus Typ V DNA	ATCC, USA
HC11	Murine Brustepithelzellen	(Doppler et al., 1989)
NIH 3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC, USA
T47D	Humane Brustkrebszelllinie, duktales Karzinom	ATCC, USA
SkBr3	Humane Brustkrebszelllinie, Adenokarzinom	ATCC, USA

Alle weiteren Zelllinien wurden entweder von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ, Braunschweig) bezogen und entsprechend den Angaben des Vertreibers kultiviert.

2.5 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Referenz
Abl (SC -23)	Maus, monoklonal, gegen den C-Terminus von Abl-Kinasen	Santa Cruz, USA
BDP1 CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminalen Bereich von humaner BDP1 als GST-Fusionsprotein	diese Arbeit
EGFR 108.1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	(Lax et al., 1989)
EGFR UBI	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid (AS 1006-1116) des humanen EGFRs	Santa Cruz, USA
ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des Ratten ERK2	Santa Cruz, USA
Erk2 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Subdomäne XI des Ratten ERK2	Santa Cruz, USA
Gab1 C-terminal	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid (AS 664-694) des humanen Gab1	UBI, USA
Gab1 (H-198)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der mittleren Region (AS 119-316) des humanen Gab1	Santa Cruz, USA
Grb2	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen Grb2	R. Lammers, diese AG
Her2-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen Her2	(Lee et al., 1989)
Her2 13D1B1	Maus, monoklonal	H. J. Bühring
HA.11	Maus, monoklonal, gegen das Influenza Hemagglutinin Epitop	BabCo, USA
IGF1R 24-31	Maus, monoklonal	(Soos et al., 1992)
JNK (C-17)	Kaninchen, polyklonal, gegen den C-Terminus des humanen JNK	Santa Cruz, USA
p38 (C-20)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen p38	Santa Cruz, USA
PY	Maus, monoklonal, gegen Phosphotyrosinreste	UBI, USA
Phospho-ERK2	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) MAPK	NEB, Frankfurt/M
Phospho-p38	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182) MAPK	NEB, Frankfurt/M
Phospho-JNK	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-JNK (Thr183/Tyr185) MAPK	NEB, Frankfurt/M
Phospho-Stat3 SC-8059	Maus monoklonal, gegen Phospho-Stat3 (Tyr-705)	Santa Cruz, USA
SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 c-terminalen AS des humanen SHC als GST-Fusionprotein	R. Lammers, diese AG
Stat3 SC-482	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, USA
Tubulin	Maus, monoklonal, Aszites	Sigma, Taufkirchen

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

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1:20000	BioRad, München
Ziege gegen Kaninchen	1:20000	BioRad, München
Kaninchen gegen Schaf	1:20000	Dianova, Hamburg

2.6 Mäusestämme

Maus	Referenz
MMTV-HER2	(Muller et al., 1988)
WAP-TGF α /Wnt	(Humphreys and Hennighausen, 2000)
MMTV-PMT	(Baribault et al., 1997)
MMTV-Wnt	(Shackleford et al., 1993)
WAP-SV40-TAg	(Li et al., 2000)

Alle Gewebeproben von transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Lothar Hennighausen, Bethesda zur Verfügung gestellt.

Für die Analyse der Expression von BDP1 im Brustgewebe aus Mäusen verschiedener Schwangerschaftsstadien wurde der Mäusestamm C57/B6 verwendet.

2.7 Plasmide und Oligonukleotide

2.7.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl, F1 + origin	Invitrogen, USA
pBlueScript KS+	Klonierungsvektor, F1 origin, Amp ^r	Stratagene, USA
pGEX-5X1-3	Prokaryotischer Expressionsvektor zur Herstellung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen, Amp ^r , IPTG-induzierbar	Amersham Pharmacia, Freiburg
pRK5	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor SV40 poly A	Genentech, USA
pSuperRetro	siRNA generierender Vektor, H1 RNA Promotor, pBABE Backbone	OligoEngine
pGl3-Basic	Luziferase-Reporter-Vektor	Promega, USA

2.7.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3-BDP1 wt	cDNA von BDP1 wt	(Kim et al., 1996)
pcDNA3-BDP1 C/S	cDNA von BDP1, katalytisch inaktive Mutante C229S	(Kim et al., 1996)
pcDNA3-BDP1 D/A	cDNA von BDP1, Trapping-Mutante, D197A	diese Arbeit
pGEX-BDP1-CT	cDNA von GST und AS 295-436 von BDP1	diese Arbeit
pRK5-Grb2	cDNA von Grb2	R. Lammers, diese AG
pRK5-Grb2 Δ CSH3	cDNA von Grb2 mit Deletion der C-terminalen SH3-Domäne (AS 163-217)	R. Lammers, diese AG
pRK5-Grb2 Δ NSH3	cDNA von Grb2 mit Deletion der N-terminalen SH3-Domäne (AS 1-53)	R. Lammers diese AG
pRK5-Grb2 Δ N2SH3	cDNA von Grb2 mit partieller Deletion der N-terminalen SH3-Domäne (AS 1-36)	R. Lammers diese AG
pEF-HA-HePTP wt	cDNA der humanen HePTP wt, N-terminal HA-Tag	K. Spiekermann, diese AG
pEF-HA-HePTP C/S	cDNA der humanen HePTP C291S, N-terminal HA-Tag	K. Spiekermann diese AG
pRK5-c-Abl	cDNA von murinem c-Abl IV	Jackson <i>et al.</i> , 1993
pGl3-BDP1	cDNA von murinem BDP1-Promotor (AS -1 bis -1939)	diese Arbeit
pZZ1- β -Cas	cDNA des murinen β -Casein-Promotors (AS -1 bis -344)	(Wakao et al., 1995)
pSR BDP1	BDP1-spezifische "siRNA"-generierender Vektor. BDP1 Zielsequenz: GAGGGACACAGCGACTACA	diese Arbeit

2.7.3 Wichtige Oligonukleotide

BDP1-Prom.-5' CGGGTACCCTGGTGTGTTTGCAAGCCATTG
 BDP1-Prom.-3' CCAAGCTTGAGGTCTCCCACAAGGAGTG

Klonierung von pGl3-BDP1 über KpnI/HindIII-Schnittstellen

pSUPER-BDP1-5'
 GATCCCCGAGGGACACAGCGACTACATTCAAGAGATGTAGTCGCTGTGTCCCTCTTTTTGGAAA

pSUPER-BDP1-3'
 AGCTTTTCCAAAAGAGGGACACAGCGACTACATCTTGAATGTAGTCGCTGTGTCCCTCGGG

Klonierung von pSR BDP1 nach Vorschrift des Vertreibers

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus 2ml *E.Coli*-Kultur mit Hilfe des QIAGEN Mini Kits präpariert.

2.8.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

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

2.8.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.8.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

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

2.8.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg verdaute Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe 5 Units alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kits eluiert.

2.8.3.3 Phosphorylierung von Primern

Zur direkten Ligation von synthetischen Oligomeren in Vektoren müssen die Oligomere zunächst phosphoryliert werden. 200 pmol Oligonukleotid wurden mit 5 Units T4 Polynukleotidkinase, 1x Kinase Puffer und 10 mM ATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 min gestoppt.

2.8.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden in einem 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragmentes, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 Unit T4-DNA-Ligase versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und ü.N. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.8.4 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 30-200 Volt innerhalb von 1-2 Stunden. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

2.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach der Gelelektrophorese wurden Gelstücke mit den aufgetrennten DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.8.6 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

2.8.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.8.6.2 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* Bakterien wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1000 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz bei 5000

rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.8.6.3 Dauerkultur von *E.coli* Bakterien

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

2.8.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

2.8.7.1 PCR-Amplifikation von DNA

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 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 spezifischer Oligonukleotide an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligonukleotide wird der zwischen den Oligomeren liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA, 1-10 ng
1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol/µl
1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol/µl
2.5 µl 10x PCR Puffer II mit 20 mM MgCl ₂
2 µl dNTP-Mix, 2.5 mM je dNTP
0.5 µl Pfu DNA Polymerase (2.5 U/µl)
17 µl H ₂ O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen H₂O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in einem Thermocycler „Progene“ der Firma Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

Erste Denaturierung:	3 min	94°C
Amplifikation 20-30 Zyklen:	1 min	94°C (Denaturierung)
	1 min	50-60°C (Hybridisierung)
	1.5 min/kB	72°C (Synthese)
Letzte Synthese:	5 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mittels Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden

wie unter 3.8.7.2 beschrieben aufgereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.8.7.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifzierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAGEN PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.8.8 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, Rnase-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM-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 häufig gewechselt.

2.8.8.1 Präparation kleinerer Mengen von RNA

Die Präparation von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits für die Isolation zytoplasmatischer RNA (Qiagen, Hilden). Nach der Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.8.9 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte nach folgendem Schema:

1. Anlagern der Primer:

5 µg total RNA
1,0 µl Zufalls-Hexanukleotid (2 pmol)
ad 10µl H₂O

2' 68°C, 10' Raumtemperatur

2. Synthesereaktion

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

1h bei 42°C

2.9 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.9.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

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

2.9.2 Mykoplasmentest

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

2.9.3 Differenzierung der murinen Brustepithelzelllinie HC11

Zur Differenzierung wurden HC11-Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz in normalem Nährmedium (RPMI 1640 mit 10% FCS, 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml Insulin) kultiviert. Die Zellen wurden 2 Tage im konfluenten Zustand gehalten. Am dritten Tag der Konfluenz wurden die Zellen in ein Medium ohne EGF überführt (RPMI 1640 mit 2% FCS, 5µg/ml Insulin) und waren nach weiteren 24 h differenzierungskompetent. Zur Initiierung der Differenzierung wurde ein Nährmedium mit laktogenen Hormonen auf die Zellen gegeben (RPMI 1640 mit 2% FCS, 1 µM Dexamethason, 5 µg/ml Prolaktin und 5 µg/ml Insulin) und das Medium bis zum Zeitpunkt der Lyse jeden Tag gewechselt.

2.9.4 Transfektion von Zellen

2.9.4.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird die DNA mit CaCl_2 und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von der Zelle aufgenommen (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei Zellteilung verloren (Scangos und Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale in 8 ml Medium ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 μg DNA in 260 μl H_2O verdünnt und mit 40 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt. Unter Schütteln wurden 400 μl 2x BBS zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und gegebenenfalls mit serumfreiem Medium bis zur weiteren Verwendung gehungert.

2.9.4.2 Transfektion von NIH 3T3 mit Polyfect®

Für die Transfektion der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 wurde das Transfektionsreagenz Polyfect der Firma Qiagen, Hilden verwendet und die Transfektion gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.9.5 Retroviraler Gentransfer in die humane Brustkrebszelllinie T47D

Zur Infektion der Zelllinie T47D mit dem „siRNA“-generierenden Konstrukt pSR BDP1 wurde zunächst die Verpackungszelllinie Phoenix A mittels Kalziumphosphatmethode (s. 3.9.3.1) mit pSR BDP1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem minimalen Volumen an Nährmedium versetzt. Nach weiteren 24 h wurde der virale Überstand gesammelt und durch einen 45 μm Filter sterilfiltriert. Der Überstand wurde dann mit 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Polybren versetzt und auf die zu infizierenden T47D-Zellen gebracht und 4 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Dieser Vorgang wurde noch dreifach wiederholt, wobei der letzte Überstand über Nacht auf den Zellen belassen wurde. Am nächsten Morgen wurde das Medium erneuert und nach 8-12 h 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin zur Selektion infizierter Zellen zugegeben und das Medium jeden Tag erneuert. Nach dem Absterben aller nichtinfizierter Zellen konnten die Zellen für das entsprechende Experiment verwendet werden.

2.10 Herstellung eines polyklonalen Anti-BDP1-Antikörpers

Zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers Anti-BDP1-CT wurde ein GST-Fusionsprotein, das die Aminosäuren 295-436 des humanen BDP1-Proteins umfasst, hergestellt und aufgereinigt (s. 3.11.1). 500 µg des Fusionsproteins wurden mit der gleichen Menge Titermax Gold Adjuvant der Firma Sigma, Taufkirchen versetzt und gemischt. Die Zugabe dieses Adjuvants erhöht die Immunreaktion und damit die Bildung von Antikörpern gegen das Zielprotein. Die Suspension wurde subkutan in die Flanken eines Kaninchens injiziert, wobei zuvor eine kleine Menge Blut zur Herstellung von Normalserum abgenommen wurde. Nach 6 Wochen erfolgte eine zweite, nach weiteren 2 Wochen eine dritte Injektion mit dem Antigen, wobei das Fusionsprotein hierbei mit Freud's Adjuvant incomplete der Firma Sigma, Taufkirchen vermischt wurde. Nach weiteren 4 Wochen wurde das Kaninchenserum gewonnen und im Westernblot sowie in der Immunpräzipitation getestet.

2.10.1 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antikörpers BDP1-CT

Polyklonale Antikörper können durch Affinitätschromatographie an dem Träger-gekoppelten Antigen aufgereinigt und die Qualität des Antikörpers so verbessert werden. Zur Kopplung des Antigens an Sepharose-Beads wurde 250 mg CNBr-Sepharose in 30 ml 1 mM HCl suspendiert und mit 50 ml 1 mM HCl gewaschen. Die Kopplungsstellen wurden durch Suspendieren der Sepharose in 5 ml K-Puffer (50 mM H₃BO₄, 500 µM NaCl, pH 8.0) aktiviert und 1 mg Antigen sofort dazugegeben. Die Kopplung erfolgte bei RT, die Probe wurde dabei 2 h geschüttelt. Danach wurde zur Absättigung der freien Kopplungsstellen 30 ml Tris/HCl pH8.0 zugegeben und weitere 2 h bei RT geschüttelt. Die Beads wurden dann je viermal mit W-Puffer (100 mM NaOAc, 500 mM NaCl, pH 4.0), K-Puffer und TN-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend 10 ml des zu Reinigenden Serums zugegeben. Die Bindung der Antikörper an das Antigen erfolgte bei 4°C ü.N., wobei die Beads auf einem Drehrad vermischt wurden. Die Beads wurden in eine BioRad Poly Prep Säule überführt und mit 10 ml TN-Puffer gewaschen und die Antikörper mit 10 ml E1-Puffer (100 mM Glyzin, 300 mM NaCl, pH 2.5) und 10 ml E2-Puffer (100 mM Triethanolamin, pH 10.3) eluiert. Das affinitätsgereinigte Serum wurde abschließend in 1xPBS mit 10% Glycerin dialysiert.

2.11 Proteinanalytische Methoden

2.11.1 Expression und Aufreinigung von BDP1-GST-Fusionsproteinen

E.coli B121 Codon+-Zellen wurden mit pGEX BDP1-Konstrukten transformiert. Eine Kolonie wurde in 100 ml LB-Medium inokuliert und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen 1:50 mit frischem LB-Medium verdünnt und bei einer Absorption von A₆₀₀=0.4-0.5 die Proteinsynthese mit 0,2 µM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Zellen

durch Zentrifugation bei 6000 rpm geerntet und das Pellet in 18 ml eiskaltem PBS mit 0.5 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 0,5 % Aprotinin, 1mM PMSF und 0.5 mM DDT resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall lysiert und mit 1% Triton X-100 versetzt. Durch Zentrifugation bei 20000 rpm wurde unlösliches Material entfernt und der Überstand mit Glutathion-Sepharose-Beads ü.N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit PBS wurden diese in eine Chromatographiesäule (BioRad, München) überführt und die Fusionsproteine mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) bei RT eluiert.

2.11.2 Triton X-100 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) versetzt, zu dem zusätzlich frisch 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM NaOrthovanadat (pH10) gegeben wurde. Nach 5-10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und unlösliche Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde dann zur Immunopräzipitation verwendet oder als Totallysate analysiert.

2.11.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce, Sankt Augustin, nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.11.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines spezifischen Proteins aus dem Zelllysate wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen das Protein mittels spezifischer Antikörper an Protein A-Sepharose gekoppelt wird und so von Zelllysate abgetrennt werden kann (Chenais et al., 1977). Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag.

Zur Immunpräzipitation wurden 30 µl Protein A-Sepharose und eine angemessene Menge des spezifischen Antikörpers zu dem mit dem gleichem Volumen HNTG-Puffer versetzten Zelllysate gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden bei 6500 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit HNTG-Puffer wurden die Proben in 30 µl Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100 °C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen und die Proteine zu denaturieren.

2.11.5 GST-Pulldown-Assay in SkBr3-Zelllysaten

Durch die Bindung des GST-Teils von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose lassen sich die Fusionsproteine zusammen mit assoziierten Bindungspartnern aus dem Zelllysate fällen.

SkBr3 Zellen wurden 20 min mit 100 μ M Pervanadat stimuliert und mit Nonidet P-40-Puffer lysiert (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid). Zur irreversiblen Inhibierung zellulärer Tyrosinphosphatasen wurde dem Lysepuffer außerdem 5 mM Iodessigsäure zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mM zum Lysat zugegeben, um noch freie Iodessigsäure zu inaktivieren. Unlösliches Material wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C entfernt. Das Zelllysate wurde dann mit 100 μ g GST-Fusionsprotein und 30 μ l Glutathion-Sepharose versetzt und 2 h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Nonidet P-40-Puffer wurden die Proben in 30 μ l Lämmli-Puffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel 5 min bei 100°C gekocht.

2.11.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Laufgeschwindigkeit im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung und damit ihrer Ladung. Abhängig von Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15 %-ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%-iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert.

2.11.7 Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5-60 min gefärbt und anschließend mit 40% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt und fixiert. Anschließend wurden die Gele auf 3MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.11.8 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit

Transblot-SD Puffer für 2h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrozellulosemembran auf einer „Semidry“-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt und blockiert.

2.11.9 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der spezifischen Erkennung des immobilisierten Proteins durch den spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt wird dieses primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper erkannt, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Aufgrund dieser enzymatischen Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit der Firma NEN.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in NET (NET-Gelatine) vorinkubiert. Die primären Antikörper wurden in NET-Gelatine in eine angemessene Konzentration zwischen 1:1000 und 1: 10000 verdünnt. Der Filter wurde 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert und danach dreimal mit NET-Gelatine gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT mit dem zweiten Antikörper in NET-Gelatine inkubiert. Die Membran wurde 3 Mal gewaschen und mit ECL-Reagenz 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei verpackt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Um die Membran ein weiteres Mal zu benutzen, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer „Strip“-Lösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

2.12 Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen

2.12.1 pNPP-Assay zur Bestimmung von Phosphataseaktivität

Die Aktivität von Phosphatasen kann anhand ihres Potentials zur Dephosphorylierung des synthetischen Substrates para-Nitrophenylphosphat (pNPP) bestimmt werden. Während die Ausgangssubstanz pNPP farblos ist, weist das dephosphorylierte Substrat eine gelbe Färbung auf, so daß dessen Entstehung durch Absorptionsmessung bei 410 nm gemessen werden kann. Zur Bestimmung der Gesamtphosphataseaktivität im Totallysat wurden eine angemessene Menge Zellysat (1-5 μg) mit 100 μl pNPP-Puffer (10 mM pNPP in 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) versetzt und 1-2 h bei 37°C unter Lichtausschluß geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 1M NaOH gestoppt und die Absorption bei 410 nm bestimmt.

2.12.2 Untersuchung von Promotoraktivität mittels Luziferaseassay

Die Promotoraktivität von Nukleotidsequenzen kann mit Hilfe von Luziferase-Reporterassays untersucht werden. Hierzu wird das Luziferase-Protein aus *Photinus pyralis* unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorsequenz exprimiert. Die Menge des Proteins und damit die relative Promotoraktivität kann dann anhand der Umsetzung des Luziferase-Substrates Luziferin und der dabei freiwerdenden Lumineszenz gemessen werden. Durch Kotransfektion der Zellen mit einem konstitutiv exprimierendem Reporterkonstrukt der Luziferase aus *Renilla reformis* können alle Proben normalisiert werden und Transfektions- bzw. Pipettierungenauigkeiten ausgeglichen werden.

Der Luziferase-Assay wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System der Firma Promega, USA nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusammengefasst wurden NIH 3T3, die mit den entsprechenden Luziferase-Konstrukten transfiziert und 4 h mit Prolaktin stimuliert waren, wurden mit einem speziellen Puffer lysiert und eine angemessene Menge Lysat in weiße 96-Lochplatten überführt. Die Zugabe der Reagenzien sowie der Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Microplate Luminometer L96V der Firma EG&G Berthold.

2.12.3 Immunhistochemische Färbung von Gewebsschnitten

2.12.3.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Das einzubettende Gewebe wurde zunächst ü. N. in Formaldehyd fixiert und durch Eintauchen und die folgende Alkoholreihe dehydratisiert:

50 % Ethanol
70 % Ethanol
80 % Ethanol
90 % Ethanol
100 % Ethanol
100 % Ethanol
100 % Ethanol

Die Inkubation erfolgte dabei jeweils für 1 h. Das Gewebe wurden dann zweimal für 15 min in Xylen getaucht und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurde das Gewebe in 6 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei RT getrocknet.

2.12.3.2 Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte zunächst zweimal für 10 min in Xylol und anschließend 2 min in Alkoholbäder mit 50% Ethanol/50% Xylol, sowie 100%, 80%, 60% und 40% Ethanol

getaucht. Abschließend wurden sie 2 min in destilliertes Wasser gegeben. Nach dem Spülen mit 10 mM PBS, pH 7,4, wurden endogene Peroxidasen durch 10-minütige Inkubation mit 1% H₂O₂ blockiert und die Schnitte wieder mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Denaturierung der Antigene wurden die Schnitte dann in Zitratpuffer (10,5 g Zitronensäuremonohydrat in 5l H₂O, pH 6,0) zwei Mal 6 min in der Mikrowelle gekocht und danach für 15 min bei RT stehen gelassen. Die Schnitte wurden dann auf dem Objektträger mit einem PapPen umrahmt. Die anschließende Färbung erfolgte mit Hilfe des Vectastain Elite ABC Kit der Firma Vector Laboratories, USA. Zunächst wurden die Schnitte mit Normalserum für 20 min bei RT blockiert und dann mit dem Primärantikörper für 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurde 30 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Inkubation mit ABC Elite Reagenz und dem Peroxidase Substrat erfolgte nach Angaben des Herstellers für 30 bzw. 5 min, bevor die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt wurden. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Rolle von BDP1 in der HER2-vermittelten Signaltransduktion

Die Kontrolle und Regulation der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen ist von grundlegender Bedeutung für viele physiologische und pathophysiologische zelluläre Ereignisse. Im Rahmen dieser Kontrollmechanismen kommt der Gruppe der Proteintyrosinphosphatasen eine wichtige Rolle zu, da diese sowohl direkt als auch indirekt zur Inaktivierung der Rezeptoren sowie zur Inhibierung der Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden beitragen können (Ostman and Bohmer, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Hinweise darauf vor, dass die zytoplasmatische Proteintyrosinphosphatase BDP1 möglicherweise an der Negativregulation verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und insbesondere der Rezeptoren der EGFR-Familie beteiligt sein könnte ((Kim et al., 1996); Y. W. Kim, persönliche Mitteilung). Die Untersuchung dieser potentiellen Kontrollfunktion von BDP1 sollte im ersten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden.

3.1.1 Einfluss von BDP1-Überexpression auf die EGF-induzierte Gesamttyrosinphosphorylierung in HEK 293-Zellen

Um eine potentielle Rolle von BDP1 bei der Regulation der EGF-induzierten Signaltransduktion zu untersuchen, wurde ein Überexpressionssystem in HEK 293-Zellen etabliert, welche sich auf Grund ihrer leichten Transfizierbarkeit sehr gut für Überexpressionsstudien eignen. Zunächst sollte ermittelt werden, welchen Einfluss die exogene Expression von BDP1 auf die EGF-vermittelte zelluläre Gesamttyrosinphosphorylierung besitzt. Hierzu wurden HEK 293-Zellen mit Expressionsplasmiden für den Wildtyp der BDP1 (BDP1 wt) sowie für eine katalytisch inaktive C/S-Mutante (BDP1 C/S) oder einem leeren Kontrollplasmid transfiziert und nach EGF-Stimulation lysiert. Das Gesamtlysat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die nachfolgende Immundetektion mit Phosphotyrosin-

spezifischem Antikörper zeigte, dass nach Stimulation mit EGF ein spezifisches Muster an phosphorylierten Banden detektiert werden konnte (Abb. 9). Das Molekulargewicht der am stärksten phosphorylierten Banden wurde zu 185 kDa, 180 kDa, 110 kDa und 56 kDa bestimmt. Während der Phosphorylierungsgrad der 56 kDa- und 180 kDa-Bande durch die Überexpression der Wildtyp-Phosphatase nur

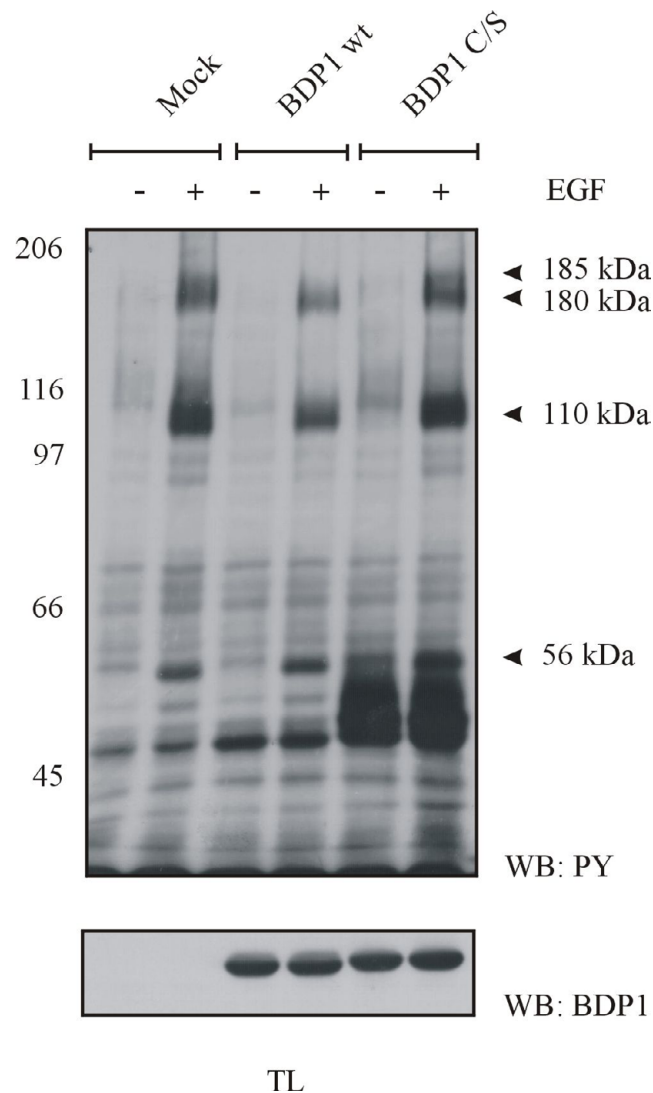


Abb. 9: Einfluss von BDP1-Überexpression auf den Gesamtposphotyrosingehalt in EGF-stimulierten HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden transient mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 (BDP1 wt), die katalytisch inaktive C/S-Mutante (BDP1 C/S) oder einem leeren Kontrollplasmid transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Nach Stimulation mit 5 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen lysiert und 50 µg Totallysate (TL) in einer Immunoblotanalyse (WB) mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper bzw. Anti-BDP1-Antikörper untersucht.

mäßig beeinflusst wurde, zeigten die Banden mit dem Molekulargewicht von 110 und 185 kDa eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungslevel. Gleichzeitig schien im unstimulierten Zustand bei Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante die Phosphorylierung zweier Banden dieses Molekulargewichts erhöht, während im Bereich von 56 und 180 kDa sowie in den EGF-stimulierten Proben keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zu erkennen waren. Die C/S-Mutante der BDP1 war selbst als stark phosphorylierte Bande im Bereich von 50 kDa zu erkennen, was auf einen Autodephosphorylierungsmechanismus der Phosphatase hinweist. Diese Ergebnisse zeigen, daß die exogene Expression von BDP1 einen Einfluß auf die EGF-vermittelte Signalübertragung hat und den Phosphorylierungsstatus verschiedener zellulärer Proteine beeinflussen kann.

3.1.2 Einfluss exogener BDP1 auf die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung glykosylierter Proteine in HEK 293-Zellen

Viele Transmembranproteine wie Rezeptortyrosinkinasen und speziell die Rezeptoren der EGFR-Familie liegen in einem Größenbereich von ca. 180 kDa und werden im extrazellulären Bereich glykosiliert. Mit Hilfe von Lentilsepharose lassen sich gezielt glykosilierte Proteine präzipitieren. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um zu untersuchen, ob es sich bei den in 4.1.1 beschriebenen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 180 bzw. 185 kDa um Transmembranproteine handeln könnte. Aus Lysaten EGF-stimulierter HEK 293-Zellen wurden die glykosilierten Proteine mit Lentilsepharose präzipitiert. Bei der anschließenden Immundetektion konnte tatsächlich ein phosphoryliertes Bandenduplett im Größenbereich von 180 bis 185 kDa detektiert werden. Während die Überexpression der Wildtyp-Phosphatase auf die untere Bande nur wenig Einfluss zeigte, erschien die Phosphorylierung der oberen Bande unter den gleichen Umständen stark vermindert (Abb. 10). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen überein, die bei der Untersuchung des Totallysates bei den Banden des gleichen Molekulargewichtes gemacht wurden (Abb. 9).

Bei der Stimulation von Zellen mit EGF kommt es zur Bindung des Liganden an den EGFR, was zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung des Rezeptors führt. Neben der Bildung von EGFR-Homodimeren führt die Stimulation der Zellen mit EGF auch zur Bildung von EGFR-HER2-Heterodimeren, die sich

ebenso autophosphorylieren. Um zu überprüfen, ob es sich bei den mit Lentilsepharose präzipitierten Banden um ein EGFR-HER2-Duplett handeln könnte, wurde die gleiche Nitrozellulosemembran noch einmal zur Immundetektion mit einem EGFR- bzw. HER2-spezifischen Antikörper verwendet. Tatsächlich konnten in allen Proben die Banden des EGFRs bei 180 kDa und die Banden von HER2 bei 185 kDa detektiert werden. Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Expression exogener BDP1 die Phosphorylierung von HER2 zu beeinflussen scheint, während der Phosphorylierungslevel des EGFRs weitgehend unverändert bleibt.

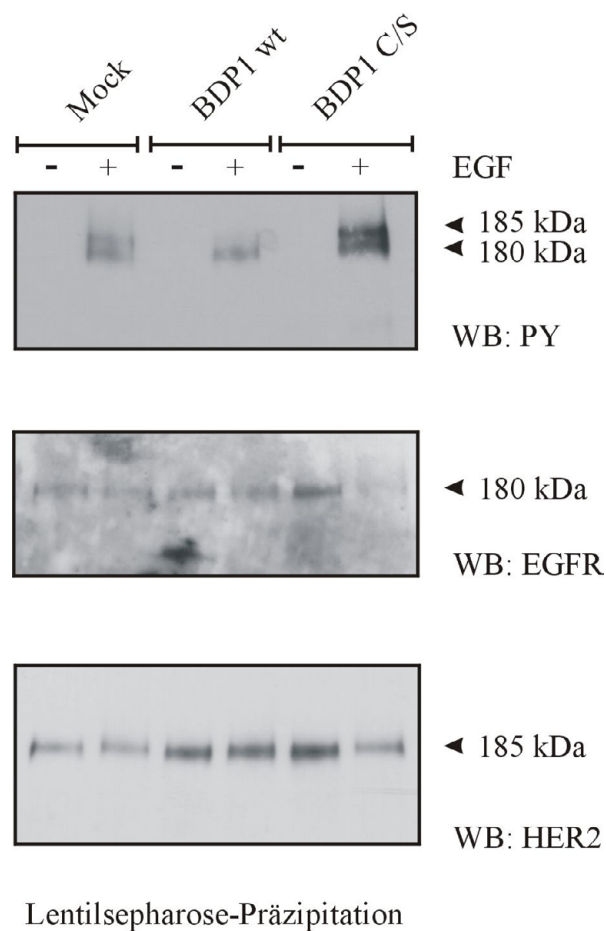


Fig. 10: Einfluss von BDP1-Überexpression auf Phosphotyrosingehalt glykosylierter Proteine nach EGF-Stimulation in HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für BDP1 Wildtyp (BDP1 wt), einer katalytisch inaktiven C/S-Mutante (BDP1 C/S), oder einem leeren Kontrollplasmid transfiziert und 24 h gehungert. Nach der Stimulation der Zellen mit 5 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen lysiert und glykosylierte Proteine mit Lentilsepharose präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Anti-Phosphotyrosinantikörper (PY) im Western Blot (WB) detektiert und mit Anti-HER2- bzw. Anti-EGFR-Antikörpern identifiziert.

3.1.3 Untersuchung der HER2-Phosphorylierung in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen

Um genauer zu untersuchen, ob die Expression von BDP1 die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von HER2 reduzieren kann, wurden HER2 Immunopräzipitationen durchgeführt und die Phosphorylierung des Rezeptors in BDP1-überexprimierenden Zellen mit der in Kontroll-transfizierten HEK-293-Zellen verglichen. Bereits nach 15-sekündiger Stimulation mit EGF konnte in den Kontrollzellen eine Phosphorylierung von HER2 induziert werden, die innerhalb von einer Minute ein Maximum erreichte. Nach 30 Minuten konnte ein Abklingen des Signals beobachtet werden (Abb. 11A und B). In BDP1-überexprimierenden Zellen war die Tyrosinphosphorylierung von HER2 stark vermindert und auch zeitlich leicht verzögert, so dass sich das Signal nach 30 Minuten immer noch auf dem maximalen, im Vergleich zu den Kontrollzellen jedoch stark reduzierten Level befand.

Die Fähigkeit der exogenen BDP1, auf die EGF-stimulierte HER2-Phosphorylierung Einfluss zu nehmen, war strikt abhängig von der katalytischen Aktivität der Phosphatase, da die Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante nicht ausreichte, um den Phosphorylierungsstatus von HER2 zu senken sondern im Gegenteil eher zu einer leichten Erhöhung der Phosphorylierung führte (Abb. 11C). Solche dominant positiven Effekte von C/S-Mutanten von Phosphatasen wurden schon in früheren Publikationen berichtet (Cong et al., 2000) und reflektieren wahrscheinlich die Konkurrenz von C/S-Mutanten mit endogenen Phosphatasen.

Während die Aktivierung von HER2 durch EGF über die Bildung von Heterodimeren aus HER2 und dem EGFR erfolgt, wurde im folgenden Experiment Heregulin- β 1 zur Stimulation verwendet, um so die Bildung und Aktivierung von HER2-HER3-Dimeren zu induzieren. Wie in Abb. 11D zu sehen, führte die Expression von BDP1 auch nach Heregulin- β 1-Stimulation zur Verringerung der HER2-Tyrosinphosphorylierung, während die Expression der C/S-Mutante in diesem Experiment bereits im unstimulierten Zustand in einer Erhöhung der Rezeptorphosphorylierung resultierte. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das negativregulatorische Potential von BDP1 in Bezug auf die HER2-Phosphorylierung vom HER2-Bindungspartner im heterodimeren Komplex unabhängig ist.

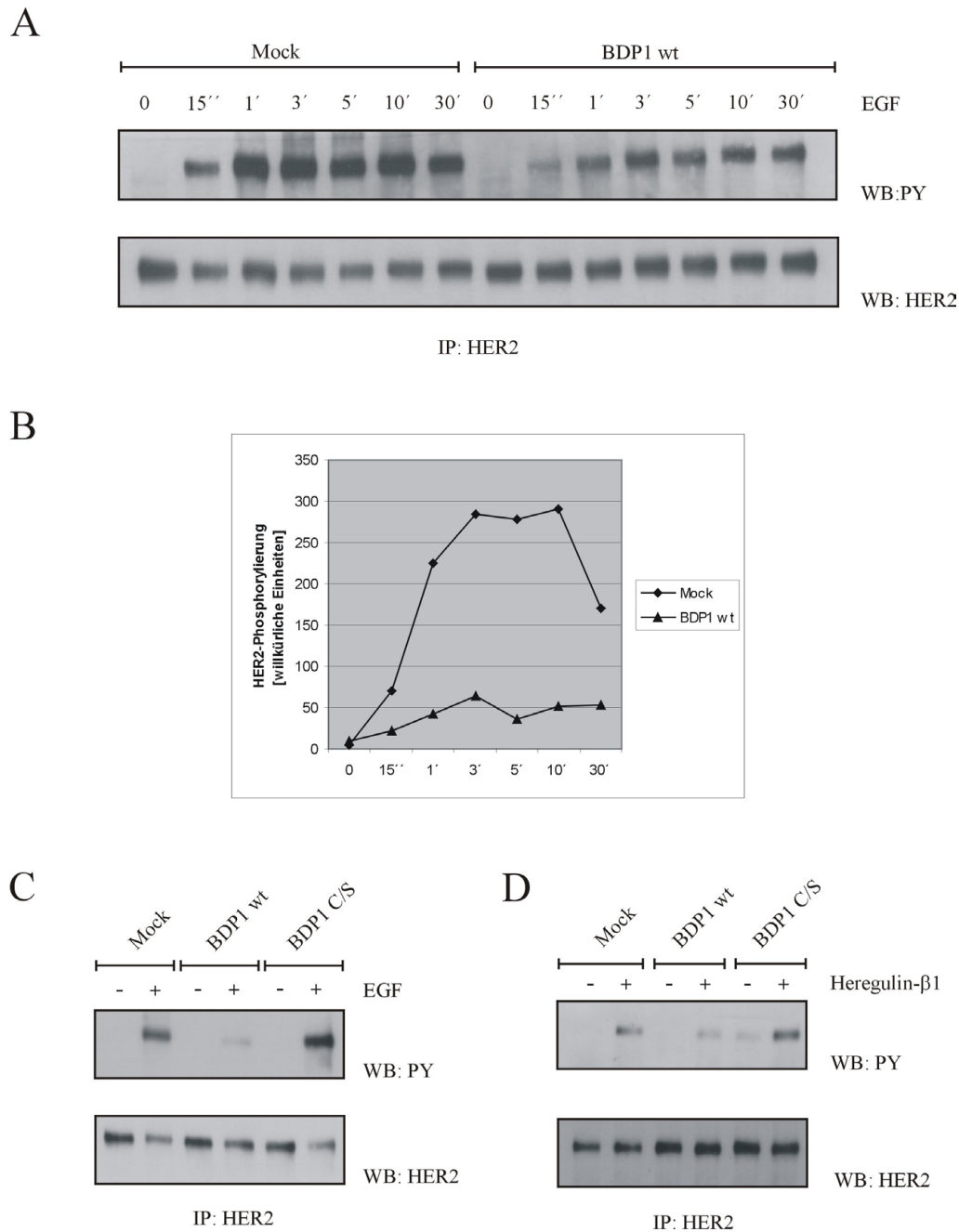


Abb. 11: Überexpression von BDP1 reduziert die Tyrosinphosphorylierung von HER2 in HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden transient mit Expressionkonstrukten für BDP1 Wildtyp (BDP1 wt), der katalytisch inaktiven C/S-Mutante (BDP1 C/S) oder dem leeren Kontrollvektor (Mock) transfiziert und für 24 h gehungert. Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und Anti-HER2-Immunopräzipitationen mittels Anti-Phosphotyrosin- (PY) und Anti-HER2-Antikörpern im Immunoblot (WB) analysiert. *A*, HEK 293-Zellen, die mit pcDNA3 BDP1 wt oder dem Leervektor transfiziert waren, wurden mit 5 ng/ml EGF stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. *B*, Die Phosphorylierung von HER2 aus (*A*) wurde densitometrisch quantifiziert. Die Daten zeigen das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. *C* und *D*, pcDNA 3, pcDNA BDP1 wt und pcDNA3 C/S wurden transfiziert. Die Zellen wurden mit 5 ng/ml EGF (*C*) oder 25 ng/ml Heregulin-β1 (*D*) für 5 min stimuliert.

3.1.4 Untersuchung zur Spezifität der negativregulatorischen Wirkung von BDP1

Da HER2 zur Familie der eng verwandten EGFRen gehört, wurde im Folgenden untersucht, ob die Überexpression von BDP1 die Signaltransduktion der Rezeptoren der EGFR-Familie generell beeinflusst oder ob dieser Effekt für den HER2-Rezeptor spezifisch ist. Zu diesem Zweck wurde die Phosphorylierung des EGFR in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen untersucht. Im Gegensatz zur starken Reduktion der HER2-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 11) wurde die EGF-induzierte Aktivierung des EGFR durch die Expression exogener BDP1 nur marginal, wenn überhaupt, beeinträchtigt (Abb. 12A). Ebenso wurde die Phosphorylierung der unverwandten RTK IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) nach Stimulation mit dem Liganden IGF1 durch Überexpression von BDP1 nicht beeinflusst (Abb. 12B).

Eine weitere Kontrolle zur Untersuchung der Spezifität von Phosphatasen ist die Expression von unverwandten Kontrollphosphatasen. Für das folgende Experiment wurde HePTP als Kontrollphosphatase gewählt, die ebenso wie BDP1 ein Vertreter der zytoplasmatischen PTPn ist und ein vergleichbares Molekulargewicht besitzt. Neben den Expressionskonstrukten für BDP1 wurden Expressionsvektoren für HePTP Wildtyp und die katalytisch inaktive C/S-Mutante von HePTP in HEK 293-Zellen transfiziert und der Phosphorylierungsstatus von HER2 nach Stimulation mit EGF ermittelt. Durch das Anfügen eines Hemagglutinin-(HA)-Epitops an den C-Terminus der jeweiligen Phosphatasesequenz konnten die Expressionslevel der Phosphatasen miteinander verglichen werden. Trotz gleicher Proteinmengen von BDP1 und HEPTP zeigte die Expression der Kontrollphosphatase keinen Einfluss auf die Aktivierung von HER2 (Abb. 12C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der negativregulatorische Effekt von BDP1 auf HER2 sowohl auf Rezeptorebene als auch von Seiten der Phosphatase spezifisch ist.

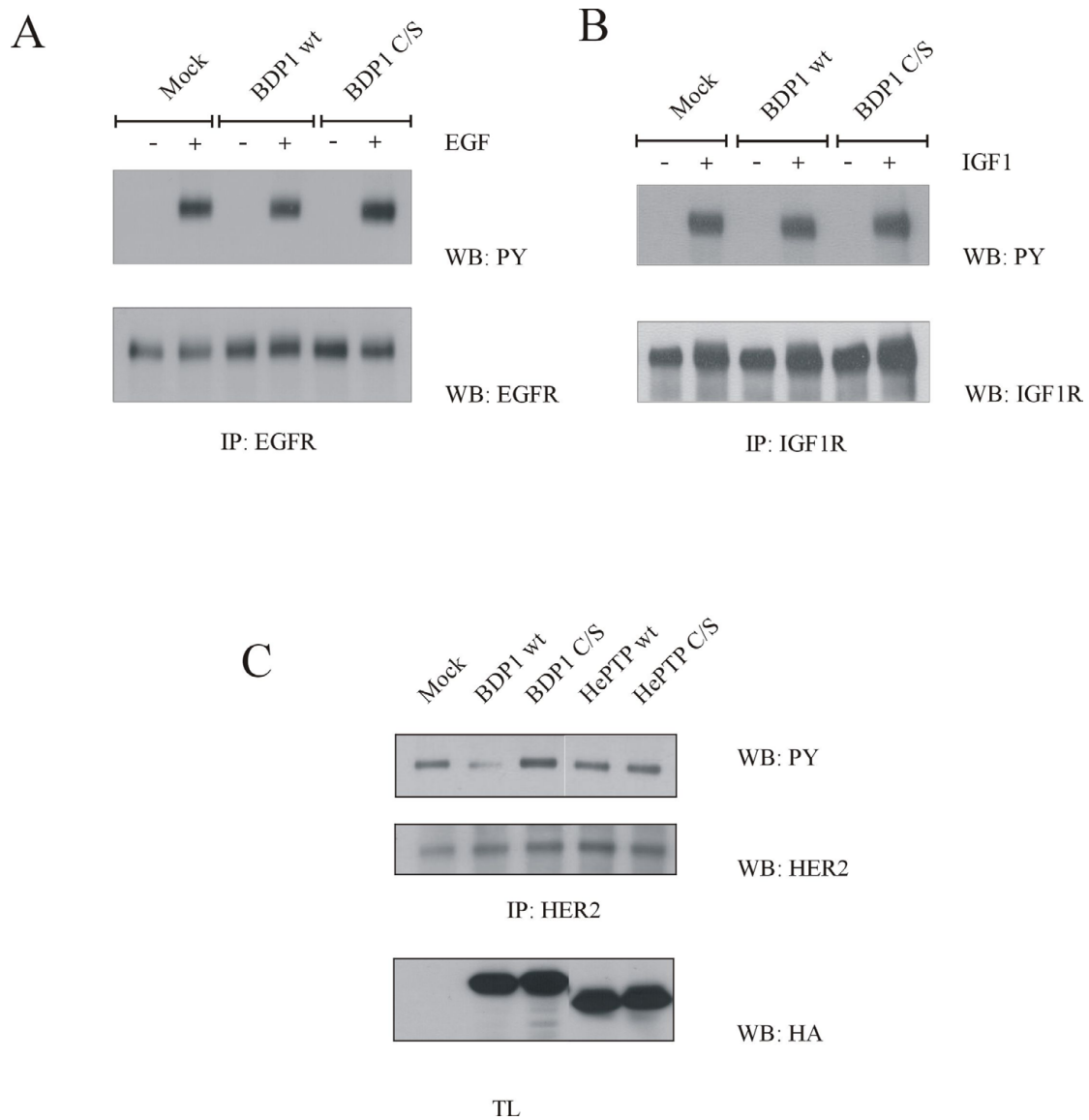


Abb. 12: Der negativregulatorische Effekt von BDP1 ist spezifisch für HER2. *A und B*, HEK 293-Zellen wurden mit einem leeren Kontrollvektor (Mock) oder mit Expressionskonstrukten für BDP1 Wildtyp (BDP1 wt) oder der katalytisch inaktiven C/S-Mutante (BDP1 C/S) transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. *A*, nach Stimulation mit 5 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen lysiert und Anti-EGFR-Immunopräzipitate im Western Blot (WB) mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern und Anti-EGFR-Antikörpern analysiert. *B*, die Zellen wurden mit 25 ng/ml IGF1 für 5 min stimuliert und lysiert. Anti-IGF1R-Immunopräzipitate wurden mittels Anti-Phosphotyrosin (PY)-bzw. Anti-IGF1R-Antikörpern analysiert. *C*, transfizierte HEK 293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die katalytisch inaktive C/S-Mutante von BDP1 oder HePTP exprimierten wurden mit 5 ng/ml EGF für 5 min stimuliert und lysiert. Anti-HER2-Immunopräzipitate wurden mit Anti-Phosphotyrosin-bzw. Anti-HER2-Antikörpern analysiert. 30 µg Totallysat (TL) wurden im Immunoblot mit Anti-HA-Antikörpern analysiert.

3.1.5 Analyse der EGF-stimulierten Phosphorylierung von Adaptorproteinen bei Expression exogener BDP1

Aktivierte RTKn rekrutieren und phosphorylieren eine Reihe von Adaptorproteinen und initiieren dadurch Signalkaskaden, die letztlich in spezifischen zellulären Antworten resultieren (Schlessinger, 2000). Aufbauend auf den vorangegangenen Ergebnissen, die zeigten, dass BDP1 potentiell in der Lage ist, die Phosphorylierung und somit Aktivierung von HER2 zu reduzieren, sollte im folgenden untersucht werden, ob die Überexpression von BDP1 auch die Rezeptor-proximale Signalweiterleitung durch HER2 beeinträchtigt. Dazu wurde die EGF-induzierte Phosphorylierung der Adaptorproteine Shc und Gab1 in An- und Abwesenheit exogener BDP1 in HEK 293-Zellen analysiert. Während weder die 46 noch die 52 kDa-Form von Shc durch die Überexpression von BDP1 in ihrer Tyrosinphosphorylierung beeinflusst wurde (Abb. 13A), wurde die Phosphorylierung von Gab1 nahezu vollständig verhindert (Abb. 13B). Eine längere Exposition des gleichen Immunoblots zeigte außerdem, dass die Expression der C/S-Mutante von BDP1 das Potential besaß, die Phosphorylierung von Gab1 bereits in unstimulierten Zellen zu Erhöhen (Daten nicht gezeigt).

3.1.6 Aktivität von MAPKn in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation von Rodrigues und Kollegen wurde eine Rolle von Gab1 bei der Aktivierung von MAPKn vorgeschlagen (Rodrigues et al., 2000). Da in Abschnitt 4.1.5 gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von BDP1 in HEK 293-Zellen die EGF-induzierte Phosphorylierung von Gab1 nahezu vollständig verhindert, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die Aktivierung der MAPKn ERK2, JNK1 und p38 durch die Expression exogener BDP1 gestört wird. Die Aktivität der MAPK wurde mittels Immunoblot mit Antikörpern ermittelt, die spezifisch die aktivierte Form der jeweiligen MAPK erkennen. Wie in Abb. 14 gezeigt, führte die Stimulation von HEK 293-Zellen mit EGF zu einer starken Aktivierung von ERK2, jedoch zu einer weniger ausgeprägten Erhöhung der Aktivität von JNK1 und p38, wie es für die beiden Stresskinasen zu erwarten war. Die Aktivität von ERK2 sowie von JNK1 wurden durch die BDP1-Überexpression auf ca.

50% reduziert, während die Aktivierung von p38 nur zu ca. 20% verhindert wurde. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus 4.1.5 und 4.1.6, dass die Expression exogener BDP1 nicht nur die HER2-Phosphorylierung verringern kann, sondern auch die Rezeptor-proximale Signalweiterleitung beeinflusst.

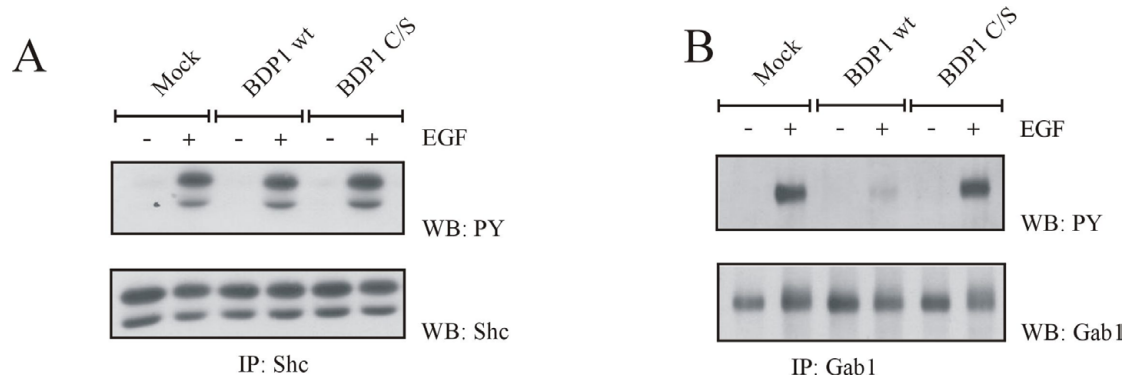


Abb. 13: Einfluss von BDP1-Expression auf die EGF-induzierte Phosphorylierung der Adaptorprotein Shc und Gab1. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für BDP1 Wildtyp (BDP1 wt), BDP1 C/S-Mutante oder dem Leervektor (Mock) transfiziert und in serumfreiem Medium für 24 h gehungert. Nach Stimulation mit 5 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen lysiert. Anti-Shc- (A) und Anti-Gab1-Immunopräzipitate (B) wurden im Westernblot (WB) mit Anti-Phosphotyrosin- (PY), Anti-Shc- oder Anti-Gab1-Antikörpern untersucht.

3.1.7 Expressionsprofil von BDP1, HER2 und EGFR in humanen Brustkrebszelllinien und Brusttumoren aus Mäusen

Um der Frage nachzugehen, ob HER2 ein physiologisches Substrat von BDP1 sein könnte, sollte im Weiteren untersucht werden, ob HER2 und BDP1 im physiologischen Kontext koexprimiert werden. Dazu wurden 17 humane Brustkrebszelllinien und eine normale Brustepithelzelllinie hinsichtlich der Expression von BDP1, HER2 sowie des EGFR auf Proteinebene analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Totallysate der Zellen mit Hilfe der entsprechenden Antikörper mittels Immunoblotanalyse getestet. Abb. 15A zeigt, dass in allen Zelllinien, die HER2 exprimierten, auch BDP1 detektiert werden konnte. Speziell die Brustkrebslinien BT474 und SkBr3, die HER2 aufgrund einer Genamplifikation überexprimieren (Kraus et al., 1987), enthielten auch größere Mengen des BDP1-Proteins. Im Gegensatz dazu zeigten die meisten Zelllinien mit geringem oder nicht

detektierbarem HER2-Gehalt ebenfalls geringe BDP1-Expression. Im Gegensatz zu HER2 korrelierten die Proteinmengen des EGFRs und BDP1 nicht so gut.

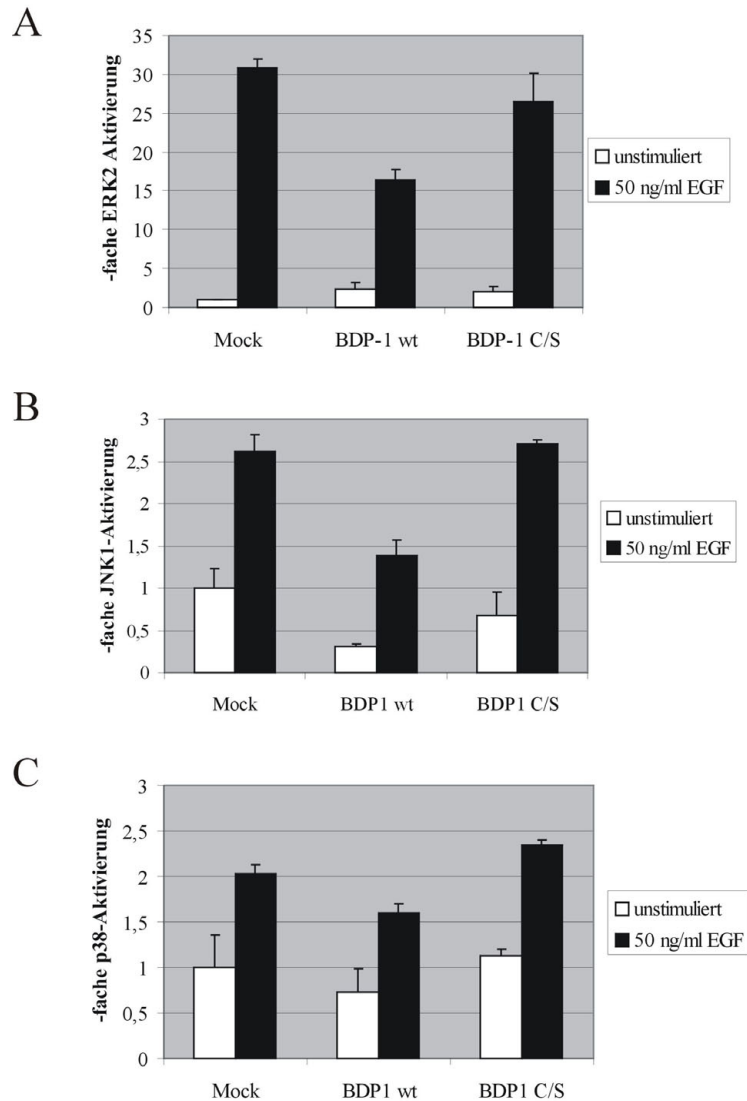
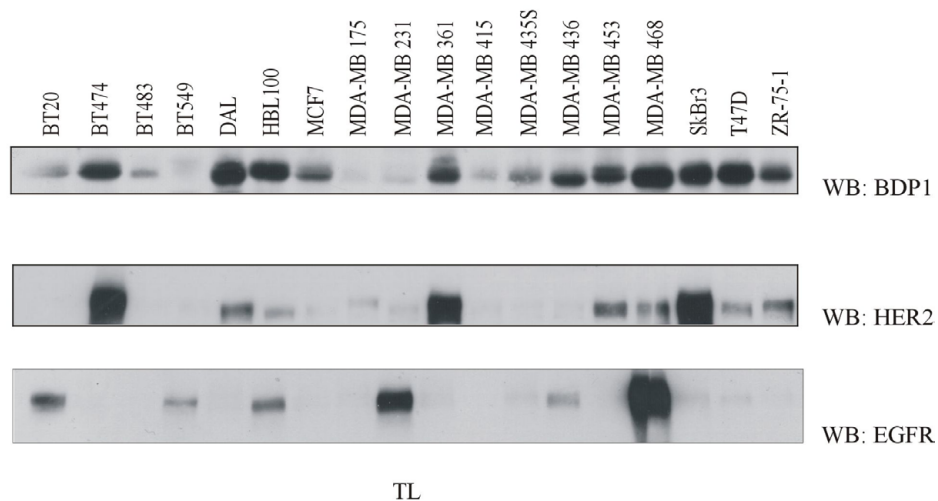


Abb. 14: Aktivität der MAPKn ERK2, JNK1 und p38 in BDP1-überexprimierenden HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für BDP1 Wildtyp (BDP1 wt), der katalytisch inaktiven C/S-Mutante (BDP1 C/S) oder dem Leervektor (Mock) transfiziert und für 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml EGF für 20 min stimuliert, lysiert und das Totallysat im Immunoblot mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern für aktivierte ERK2- (A), JNK1- (B) und p38-Kinase (C) analysiert. Die Aktivität der jeweiligen Kinase in unstimulierten und kontrolltransfizierten Zellen wurde als 1-fach definiert. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt aus 3 unabhängigen Experimenten \pm S.A.

Desweiteren wurde die Proteinexpression von BDP1 in Brusttumoren von transgenen Mäusen untersucht, die HER2 oder andere Onkogene unter der Kontrolle von Genpromotoren exprimierten, die die Expression der Onkogene auf das alveolare Brustepithel beschränkten (Baribault et al., 1997; Humphreys and Hennighausen, 2000; Li et al., 2000; Muller et al., 1988; Shackelford et al., 1993). BDP1 konnte in allen getesteten Proben detektiert werden, wobei die Expression der Phosphatase in dem HER2-überexprimierenden Tumor maximal war (Abb. 15B).

A



B

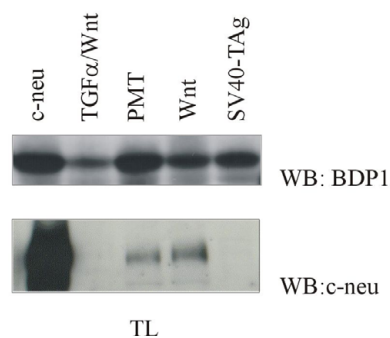


Abb. 15: Expression von BDP1, HER2 und EGFR in humanen Brustkrebszelllinien und Brusttumoren von Mäusen. A, Die Zelllinien wurden unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach der Lyse wurden 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse (WB) mit Anti-BDP1-, Anti-HER2- und Anti-EGFR-Antikörpern untersucht. B, 50 µg Totallysat von Brusttumoren transgener Mäuse, die die angegebenen Onkogene unter der Kontrolle brustspezifischer Promotoren tragen (MMTV-HER2, WAP-TGFα/Wnt, MMTV-PMT, MMTV-Wnt, WAP-SV40-TAg) wurden im Immunoblot mit Anti-BDP1- und Anti-HER2-Antikörpern analysiert.

3.1.8 Unterdrückung der Expression endogener BDP1 in der humanen Brustkrebszelllinie T47D

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung der BDP1-Aktivität in Folge von Überexpression zu einer Reduktion der Signaltransduktion durch HER2 führt, wurde ein sogenannter „RNA interference“-Ansatz gewählt, um das gegenteilige Experiment durchzuführen. Durch die Infektion der humanen Brustkrebslinie T47D mit einem retroviralen Expressionskonstrukt für BDP1-spezifische „small interfering RNAs“ (siRNAs), konnte die Expression endogener BDP1 spezifisch reduziert werden (Abb. 16). Die Zellen wurden dann mit Heregulin- β 1 stimuliert und der HER2-Phosphotyrosinlevel untersucht. In Übereinstimmung mit den Experimenten, bei denen BDP1 überexprimiert wurde (Abb. 11), führte die Repression endogener BDP1-Expression zu einem Anstieg der Heregulin- β 1-induzierten HER2-Phosphorylierung. Dieses Ergebnis spricht für die vorgeschlagene Rolle von BDP1 bei der Regulation der HER2-vermittelten Signaltransduktion.

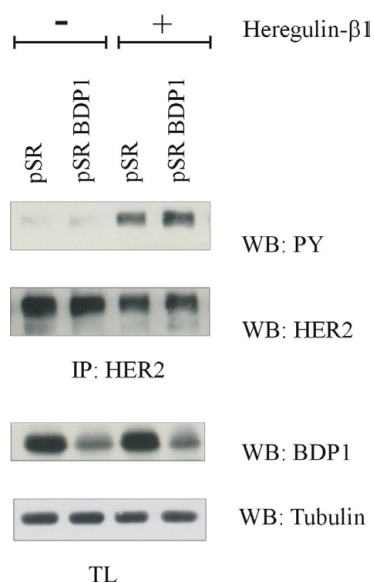


Abb. 16: Repression endogener BDP1-Expression mittels „siRNAs“. T47D Brustkrebszellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt pSuperRetro (pSR) BDP1, das BDP1-spezifische „small interfering RNAs“ exprimiert, oder dem leeren Kontrollvektor infiziert. Nach 24-stündigem Hungern in serumfreiem Medium wurden die Zellen mit 20 ng/ml Heregulin- β 1 für 5 min stimuliert und lysiert. Anti-HER2-Immunopräzipitate (IP) wurden mit Anti-Phosphotyrosin- (PY) und Anti-HER2-Antikörpern analysiert. Die Expression endogener BDP1 wurde mittels Westernblotanalyse (WB) des Totallysates (TL) mit Anti-BDP1-Antikörpern ermittelt. Gleiche Proteinmengen wurden mit Anti-Tubulin-Immunoblotanalyse bestätigt.

3.1.9 *In vitro*-Bindungsstudien mit GST-BDP1-Konstrukten in SkBr3-Zelllysaten

Um einen ersten Hinweis darauf zu bekommen, ob BDP1 HER2 direkt dephosphoryliert, oder ob die Phosphatase eher in die Rezeptor-proximale Signalkette eingreift und somit womöglich einen negativen „feedback loop“ reguliert, wurde nach Bindungspartnern und damit möglichen Substraten von BDP1 gesucht. Dazu wurden SkBr3 Brustkrebszellen mit Pervanadat, einem unspezifischen Phosphataseinhibitor, stimuliert, um endogene Phosphatasen zu inhibieren und potentielle Substrate von BDP1 in einen Zustand maximaler Phosphorylierung zu überführen. Mit den Zelllysaten wurden dann *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt, wofür GST-BDP1-Fusionsproteine eingesetzt wurden. Neben einem BDP1 Wildtyp- und C/S-Konstrukt wurde in diesem Experiment eine D/A-Mutante eingesetzt, die als sogenannte „Trapping“-Mutante bezeichnet wird. Bei dieser Mutante wurde der Aspartatrest, der während des Dephosphorylierungsvorgangs als katalytische Säure fungiert und den abgehenden Tyrosylrest protoniert, durch einen Alaninrest substituiert. Dies führt zu einem Verlust der Phosphataseaktivität und einer Stabilisierung des Phosphatase-Substrat-Komplexes. Während mit dem Wildtyp- und C/S-Konstrukt der Phosphatase keine spezifisch assoziierenden Proteine aus dem Zelllysate präzipitiert werden konnten, erfolgte die Bindung eines phosphorylierten Proteins von ca. 185 kDa an die D/A-Mutante von BDP1, das im Immunoblot als HER2 identifiziert werden konnte. Dieses Ergebnis liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die negativregulatorische Wirkung von BDP1 auf die Signaltransduktion durch HER2 auf einer direkten Bindung und Dephosphorylierung von HER2 durch BDP1 beruhen könnte.

3.1.10 Einfluss von EGF-Stimulation auf die enzymatische Aktivität von BDP1

Für viele Phosphatasen sind reversible Regulationsmechanismen bekannt, die die Aktivität des Enzyms zum Beispiel von der Phosphorylierung der Phosphatase oder von der Substratbindung abhängig machen (Denu and Dixon, 1998). Somit ist neben der

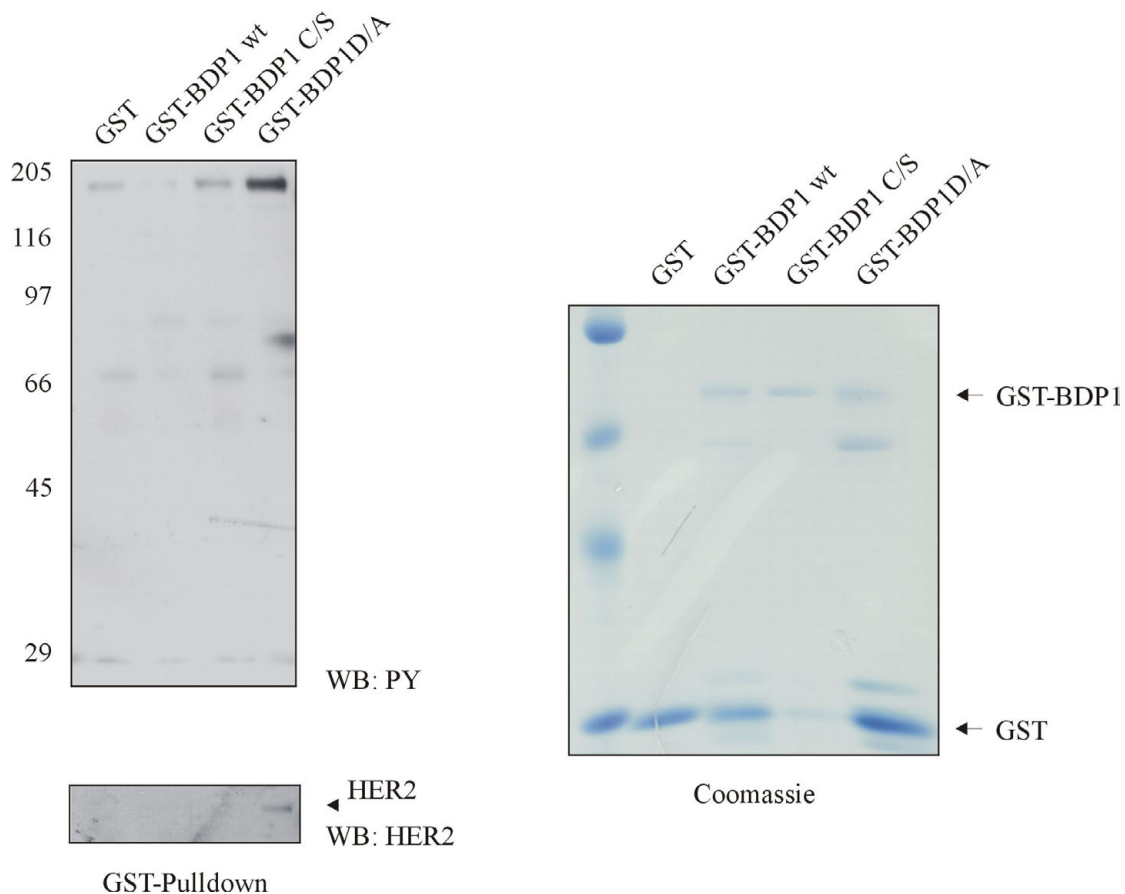


Abb. 17: Pulldownexperiment mit GST-BDP1-Fusionsproteinen in SkBr3-Zellysaten. SkBr3 Brustkrebszellen wurden unter normalen Bedingungen kultiviert und für 20 min mit 100 μ M Pervanadat stimuliert und lysiert. Zur Präzipitation wurden 100 ng GST-Fusionsprotein der Wildtyp-Phosphatase (GST-BDP1-wt), der katalytisch inaktiven C/S-Mutanten (GST-BDP1-C/S) sowie der sogenannten „Trapping“-Mutante (GST-BDP1-D/A) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde GST verwendet. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Assoziierende Proteine wurden mittels Westernblotanalyse (WB) mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern detektiert und mit Anti-HER2-Antikörpern identifiziert (linker Teil). Die Größe und Menge der eingesetzten GST-Proteine wurde anhand eines Coomassie-gefärbten Replik-Gels gezeigt (rechter Teil).

Frage nach dem direkten Substrat der Phosphatase bei der BDP1-vermittelten HER2-Inaktivierung weiter interessant, ob die Stimulation und Aktivierung des Rezeptors und die damit verbundene Signalweiterleitung ins Zellinnere zu einer Erhöhung der Aktivität von BDP1 und damit zur punktgenauen Aktivierung der Negativregulation führt. Um diese Frage zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit EGF stimuliert und mit den Lysaten ein *in vitro*-Phosphataseassay durchgeführt, bei dem die Aktivität von Phosphatasen anhand ihres Potentials zur Dephosphorylierung des synthetischen Substrates pNPP gemessen wird. Da die Aktivität immunopräzipitierter BDP1 mit diesem Assay nicht gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde

die Gesamtphosphataseaktivität im Totallysat bestimmt. Wie Abb. 18 zeigt, wurde die Gesamtaktivität im Totallysat von HEK293-Zellen durch transiente Expression von Wildtyp BDP1 ca. 5-fach erhöht, während die Expression der cs-Mutante keinen Einfluß auf die Gesamtphosphataseaktivität besaß. Eine Stimulation der Zellen mit EGF führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der Phosphataseaktivität. Somit scheint Im HEK 293-System das negativregulatorische Potential von BDP1 bezüglich der Phosphorylierung von HER2 nicht durch eine Änderung der Phosphataseaktivität reguliert zu werden.

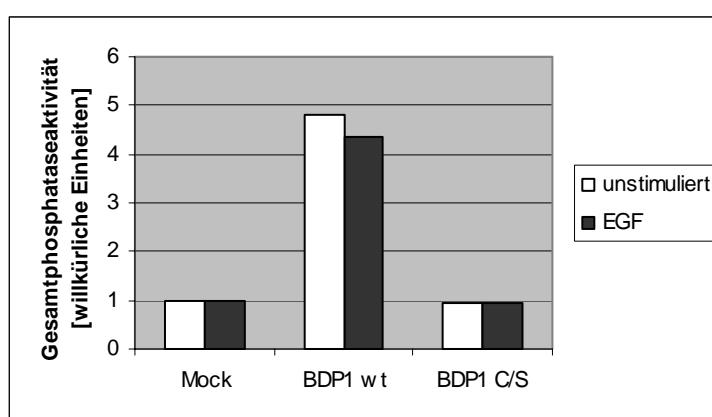


Abb. 18 Gesamtphosphataseaktivität in BDP1-exprimierenden HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 (BDP1 wt), einer katalytische inaktiven C/S-Mutante oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert und 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Nach Stimulation mit 50 ng/ml EGF für 5 min wurden die Zellen lysiert und 5 µg Totallysat für den Phosphataseassay mit pNPP als synthetisches Substrat eingesetzt. Die Phosphataseaktivität wurde anhand der Absorption des dephosphorylierten Substrates bei 405 nm bestimmt.

3.2 Untersuchungen zur Rolle von BDP1 bei der Differenzierung der murinen Brustdrüse

3.2.1 Analyse der Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus

In Abschnitt 4.1.7 konnte gezeigt werden, dass BDP1 in verschiedenen Brustkrebszelllinien exprimiert wird und die Expression teilweise mit der des HER2-

Rezeptors korreliert. In den folgenden Abschnitten sollte nun im Vergleich dazu die Expression von BDP1 in normalem Brustdrüsengewebe analysiert werden, um so eine potentielle Rolle von BDP1 bei der normalen Brustentwicklung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Brustdrüsen von Mäusen in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft entnommen und die Expression von BDP1 auf Proteinebene untersucht. Um natürliche Schwankungen der Proteinexpression auszugleichen, wurden die Lysate von Brustdrüsen von Mäusen in gleichen Schwangerschaftsstadien gepoolt. Während im Gewebe jungfräulicher Mäuse die Proteinmenge von BDP1 unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte ab dem 14.5-ten über den 19.5-ten Schwangerschaftstag ein sprunghafter Anstieg der BDP1-Expression beobachtet werden, die ab dem 1. Laktationstag ein Maximum erreichte und erst nach der Wegnahme des Nachwuchses mit der Involution, also der Rückbildung des Brustdrüsengewebes, wieder abfiel. Dieses Expressionsmuster deutet auf eine funktionelle Rolle von BDP1 bei der Differenzierung des murinen Brustdrüsengewebes während der Schwangerschaft hin.

3.2.2 Immunhistologische Lokalisation von BDP1 in murinem Brustdrüsengewebe

Während der Schwangerschaft kommt es im Brustgewebe zu fundamentalen Umgestaltungen der Gewebestruktur und –funktion. Ausgehend von einem duktalem System, das das gesamte Fettgewebe der Brust durchzieht, führt die Einwirkung von Progesteron, plazentalen Laktogenen, Prolaktin sowie Liganden der EGFR-Familie zu extensiven Proliferations- und Differenzierungsvorgängen, die in der Bildung des alveolaren Systems resultieren. Die Epithelzellen der lobuloalveolaren Einheiten sind nach der Geburt des Nachwuchses für die Milchproduktion verantwortlich. Das Beenden des Säugens führt zum Abbau des alveolaren Systems durch Apoptose und die Brustdrüse kehrt in einen Zustand ähnlich dem vor der Schwangerschaft zurück.

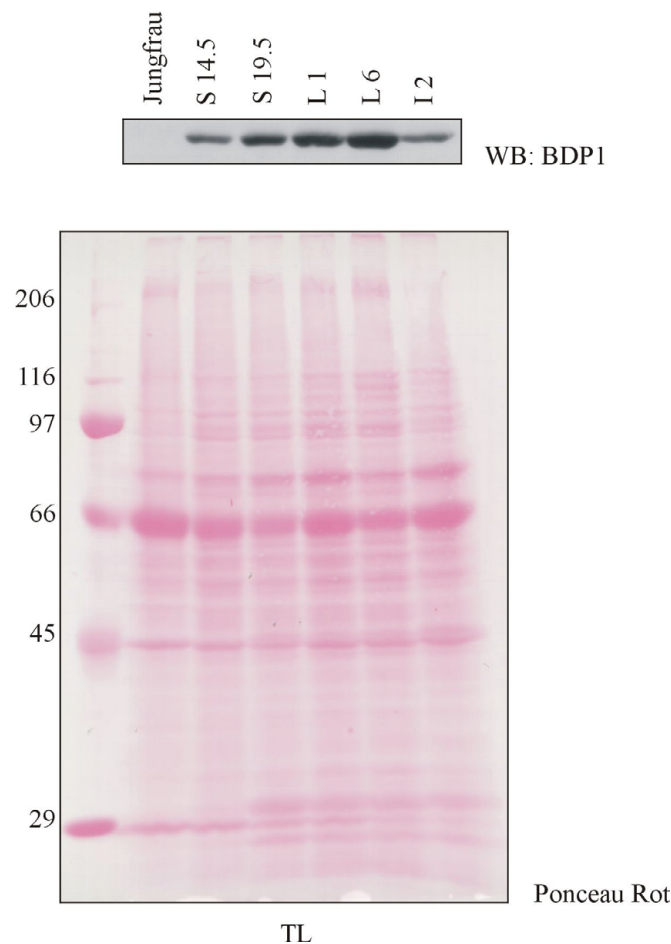


Abb. 19: Expression von BDP1 in murinem Brustdrüsengewebe verschiedener Schwangerschaftsstadien. Brustdrüsengewebe von Mäusen in den angegebenen Schwangerschaftsstadien wurden lysiert und jeweils 50 µg des Totallysates elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von BDP1 wurde in einer Immunoblotanalyse (WB) mit Anti-BDP1-Antikörpern analysiert. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde anhand des Ponceau-gefärbten Westernblots bestätigt. S 14.5 und S 19.5 = 14.5-ter bzw. 19.5-ter Schwangerschaftstag; L 1 und L 6 = 1. bzw. 6. Laktationstag; I 2 = 2. Involutionstag.

Eine Erklärung für den starken Expressionsanstieg von BDP1 im Verlauf der Schwangerschaft könnte die Expression der Phosphatase in epithelialen Zellen des lobuloalveolaren Systems sein, das während dieser Zeit infolge extensiver Proliferation vermehrt wird. Um die Lokalisation von BDP1 in der murinen

Brustdrüse zu klären, wurde mit Gewebsschnitten von jungfräulichen und laktierenden Mäusen eine immunhistologische Analyse durchgeführt. Während das Stroma, das sich aus Fettgewebe und Fibroblasten zusammensetzt, keine Expression von BDP1 erkennen ließ, zeigten sowohl die duktafen als auch die alveolaren Epithelzellen eine starke Färbung mit BDP1-spezifischem Antikörper (Abb. 20). Mit der in den Gewebsschnitten gut zu erkennenden quantitativen Zunahme der alveolaren Epithelzellen lässt sich so zumindest teilweise die Erhöhung der BDP1-Expression im Gesamtbrustgewebe erklären.

3.2.3 Expression von BDP1 in der murinen Brustepithelzelllinie HC11

Um zu untersuchen, ob neben der quantitativen Zunahme der BDP1-exprimierenden Epithelzellen auch eine Regulation auf Expressionsebene für die erhöhte Detektion von BDP1 im Gesamtlysate des Brustgewebes verantwortlich sein könnte, wurde die murine Brustepithelzelllinie HC11 für weitere Experimente gewählt. Diese Zelllinie stammt aus der Brustdrüse einer Maus im mittleren Schwangerschaftsstadium und lässt sich unter dem Einfluss laktogener Hormone differenzieren (Doppler et al., 1989), was zur Bildung von Milchproteinen führt. HC11-Zellen bilden somit ein *in vitro*-System, in dem zelluläre Vorgänge während der frühen Differenzierung epithelialer Brustzellen untersucht werden können. Zur Differenzierung der Zellen wurden diese mit einem Hormonmix aus Prolaktin, Insulin und Dexamethason behandelt und die Expression von β -Casein, einem frühen Differenzierungsmarker, mittels RT-PCR kontrolliert. Wie in Abb. 21 gezeigt, konnte nach 3-tägiger Behandlung der Zellen mit den laktogenen Hormonen eine deutliche Expression von β -Casein detektiert werden. Die Expression von β -Casein erwies sich zu diesem Zeitpunkt bereits als maximal (Daten nicht gezeigt), so dass von einer maximalen Differenzierung der Zellen zu diesem Zeitpunkt ausgegangen werden konnte.

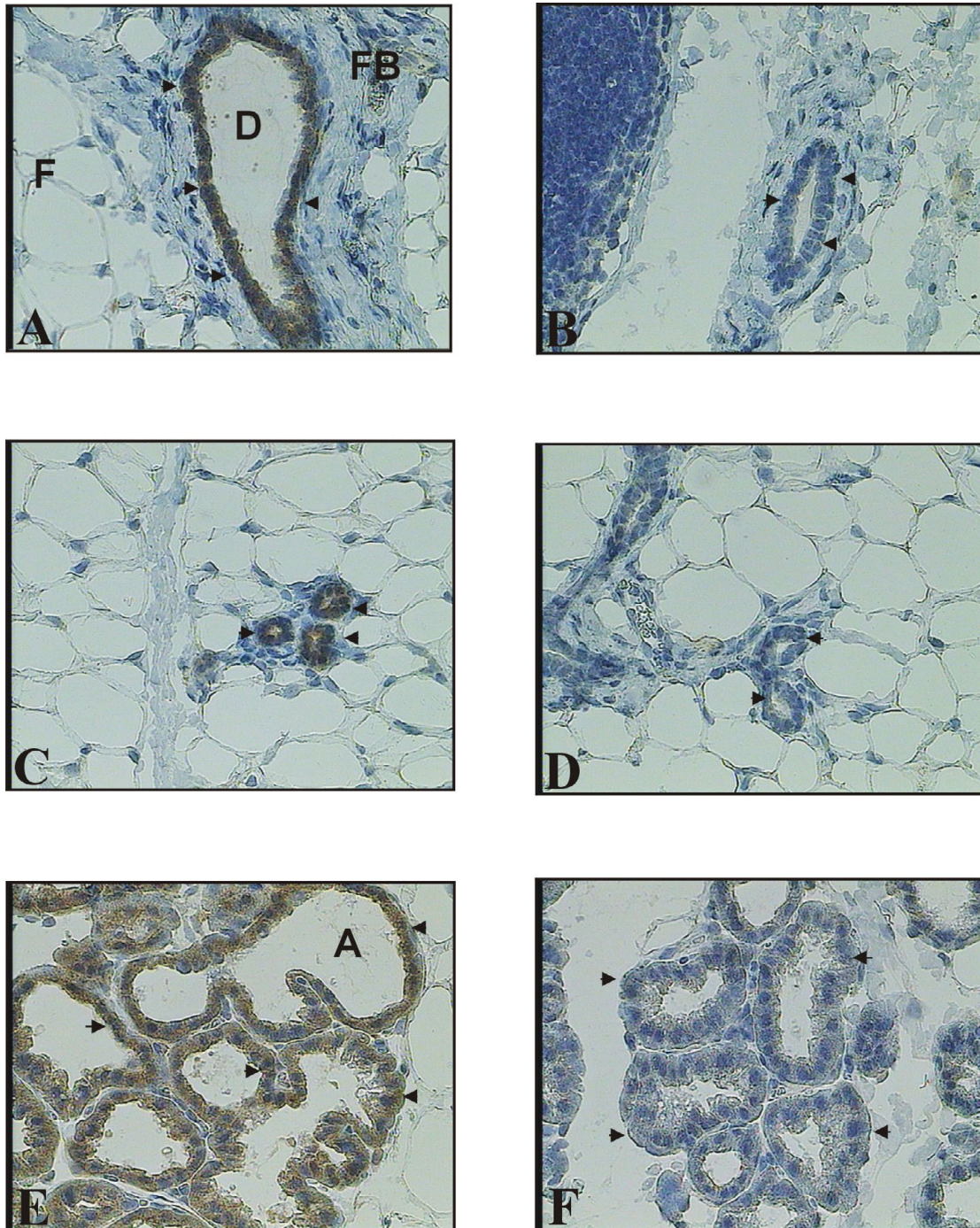


Abb. 20: Immunhistologische Lokalisation von BDP1 in jungfräulichem und laktierendem murinen Brustgewebe. Gewebsschnitte von murinen Brustdrüsen im jungfräulichen (A-D) und laktierendem Stadium (E und F) wurden mit Anti-BDP1-Antikörpern (A, C, E) bzw. dem entsprechenden Präimmenserum (B, D, F) immunohistologisch gefärbt. Die Zellkerne wurden anschließend mit Eosin angefärbt. A, Alveolus; D, Duktus; F, Fettgewebe; FB, Fibroblasten. Die Pfeilspitzen bezeichnen die alveolaren bzw. duktaalen Epithelzellen. Alle Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

Eine Analyse der Expression von BDP1 sowohl auf Protein- als auch auf RNS-Ebene zeigte, dass in HC11-Zellen bereits unter normalen Kultivierungsbedingungen eine Basalexpression von BDP1 detektierbar war, die durch Behandlung der Zellen mit laktogenen Hormone weiter erhöht werden konnte (Abb. 21) und nach 3 Tagen einen maximalen Level erreichte. Diese Beobachtung lässt auf eine transkriptionelle Regulation der Expression von BDP1 durch laktogene Hormone während der Differenzierung von Brustepithelzellen schließen.

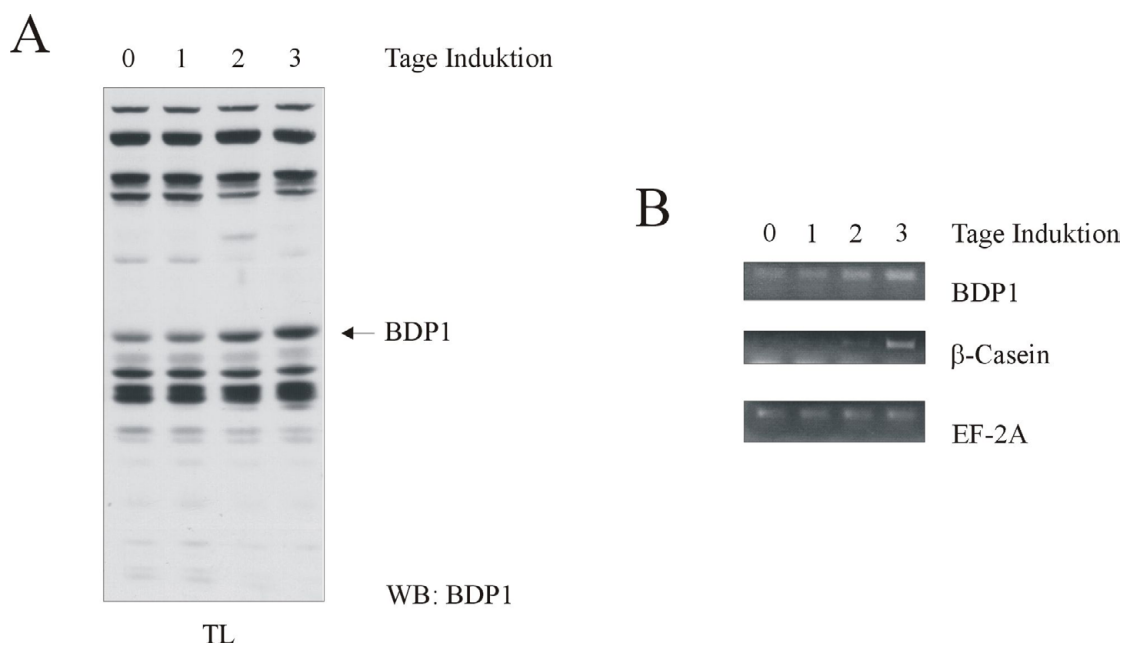


Abb. 21: Expression von BDP1 in der murinen Brustepithelzelllinie HC11 unter der Einwirkung laktogener Hormone. Laktationskompetente HC11 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit einem laktationsinduzierendem Hormonmix aus 1 μ M Dexamethason, 5 μ g/ml Insulin und 5 μ g/ml Prolaktin behandelt und anschließend lysiert. *A*, 50 μ g des Totallysates (TL) wurden im Western Blot (WB) mit Hilfe von α -BDP1-Antikörpern analysiert. *B*, die Expression von BDP1 auf mRNA-Ebene wurde durch PCR-Amplifikation von cDNA ermittelt. Die gleichen cDNA-Proben wurden für die Analyse des Differenzierungsmarkers β -Casein und des "housekeeping"-Gens EF-2A eingesetzt.

3.2.4 Analyse der Promotorregion von BDP1

Die Differenzierung epithelialer Brustzellen während der Schwangerschaft sowie des HC11 *in vitro*-Systems wird über die Modulation der Genexpression durch Hormone

wie Prolaktin und Glukokortikoiden gesteuert. So führt die Bindung von Prolaktin an seinen Rezeptor zur Aktivierung des Jak-Stat-Signalweges, was letztlich in der Translokation aktiver Stat5-Dimere in den Nukleus bewirkt. Diese Stat5-Dimere agieren dann als Transkriptionsfaktoren und beeinflussen über die Bindung spezifischer Stat5-Bindestellen in den Promotorregionen Prolaktin-sensitiver Gene, den sogenannten GAS-Stellen (interferon- γ activated site), die Transkription. Die Konsensusbindestelle für Stat5 lautet hierbei TTC NNN GAA, wobei „N“ für jede beliebige Base steht. Natürliche Glukokortikoide oder synthetische glukokortikoide Substanzen wie Dexamethason binden an zytoplasmatische Rezeptoren, die ebenfalls dimerisieren und als aktive Transkriptionsfaktoren spezifische GRE-Bindestellen (glucocorticoid responsive element) in den Promotorregionen Glukokortikoid-sensitiver Gene besetzen. Die Konsensusbindestelle für Glukokortikoidrezeptoren wird durch die Nukleotidsequenz GGT ACA ANN TGT YCT K kodiert, wobei Y für C oder T und K für G oder T steht.

Da die Expression von BDP1 wie in Abb. 21 gezeigt durch die Stimulation von HC11-Zellen mit Prolaktin und Dexamethason erhöht werden konnte, sollte im Folgenden die Promotorregion von BDP1 auf das Vorhandensein von GAS- bzw. GRE-Bindestellen untersucht werden. Da die genaue Größe des BDP1-Promotors noch nicht bekannt ist, wurde der Sequenzbereich analysiert, der 2000 bp vor dem transkriptionellen Start des BDP1-Gens einschließt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Online-Software „MatInspector“ (Quandt et al., 1995), einem Programm mit dem Nukleotidsequenzen nach Konsensusbindestellen für Transkriptionsfaktoren durchsucht werden können. Wie Tabelle 1 zeigt, ergab die Analyse der murinen Sequenz, dass sich im Promotorbereich eine potentielle GAS-Stelle sowie zwei potentielle GRE-Stellen befinden. Eine Analyse der entsprechenden humanen Nukleotidsequenz zeigte, dass diese möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen auch in der Promotorregion des menschlichen BDP1-Gens erhalten sind, was für die Funktionalität dieser Abschnitte sprechen könnte.

A) Potentielle Konsensusbindestellen in der Promotorsequenz des murinen BDP1-Gens

Konsensusbindestelle	Position	Sequenz
GRE I	-830	TCC ATA CAG TGT CCTC
GAS	-1644	TTT CAG TGA AAA
GRE II	-1768	TTG AAA CTC TGT CCT A

B) Potentielle Konsensusbindestellen in der Promotorsequenz des humanen BDP1-Gens

Konsensusbindestelle	Position	Sequenz
GRE I	-1443	TTT ACT ACT TGT ACT T
GAS	-1815	ACA TTT TCT GGG AAA ATG T
GRE II	-1844	ATA ACC ATG TGT GCT C

Tab. 1: Potentielle Bindestellen für Stat5 (GAS) und den Glukokortikoidrezeptor (GRE) in der Promotorsequenz des murinen und humanen BDP1-Gens. Die Positionen beziehen sich auf den Transkriptionsbeginn des BDP1-Gens, der als +1 definiert wurde.

3.2.5 Überprüfung der funktionalen Integrität der potentiellen GAS- und GRE-Stellen im murinen BDP1-Promotor

Die Funktionalität der gefundenen GAS- und GRE-Stellen wurde im Weiteren mit Hilfe eines Reporteragen-Assays untersucht. Hierzu wurde zunächst die gesamte 2000 bp umfassende potentielle Promotorregion des murinen BDP1-Gens in einen Luziferase-Reportervektor kloniert. Nach der Transfektion dieses Konstruktes in die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 konnte die Promotoraktivität nach Stimulation der Zellen mit Dexamethason und/oder Prolaktin anhand der gemessenen Luziferaseaktivität gemessen werden. Als Kontrolle wurde ein Luziferase-Reporterkonstrukt mitgeführt, das die Promotorsequenz des murinen β -Casein-Gens enthielt. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Bernd Groner, Frankfurt, zur Verfügung gestellt und wurde bereits als Dexamethason- und Prolaktinsensitiv beschrieben (Wakao et al., 1995). Entsprechend konnte nach Stimulation der Zellen,

die das β -Casein-Promotorkonstrukt enthielten, mit Dexamethason oder Prolaktin Luziferaseaktivität gemessen werden, die infolge eines starken additiven Effekt durch gleichzeitige Stimulation mit beiden Substanzen erheblich erhöht werden konnte (Abb. 22). Im Gegensatz dazu konnte in Zellen, die das BDP1-Promotorkonstrukt enthielten, im Vergleich zum Leervektor nur eine minimale Luziferaseaktivität induziert werden, die keinen additiven Effekt im Falle von simultaner Stimulation aufwies.

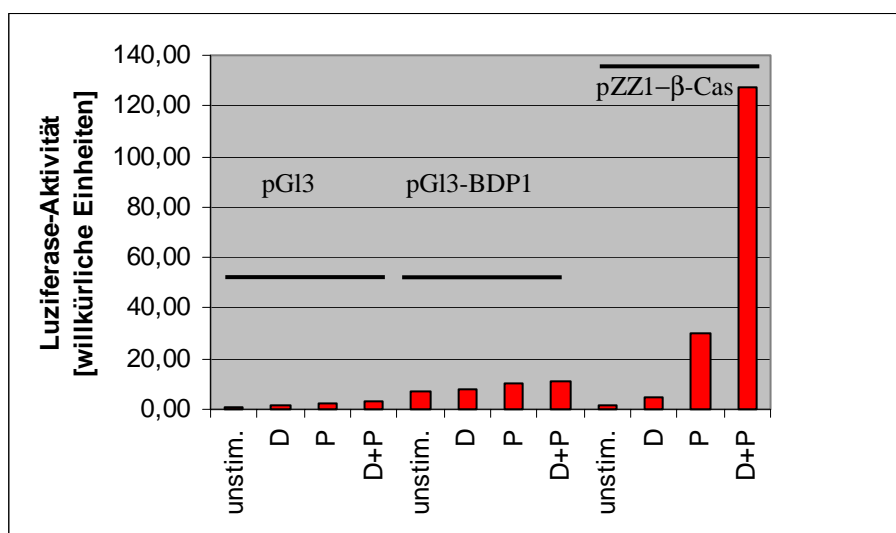


Abb. 22: Luziferaseaktivität unter der Kontrolle des β -Casein- bzw. BDP1-Promotors. NIH3T3-Zellen wurden mit einem Luziferase-Reporterkonstrukt des BDP1-Promotors (pG13-BDP1), dem entsprechenden Leervektor (pG13) oder einem β -Casein-Promotorkonstrukt (pZZ1- β -Cas) transfiziert und 48 h in serumfreiem Medium gehungert. Danach wurden die Zellen mit 1 μ M Dexamethason (D) und/oder 5 μ g/ml Prolaktin (P) für 8 h stimuliert und ein Luziferaseassay durchgeführt. Die Aktivität in unstimulierten und kontrolltransfizierten Zellen wurde als 1 definiert.

3.2.6 Analyse der Expression von BDP1 in Brustdrüsengewebe von Stat5-null Mäusen

Die Untersuchung von Promotorsequenzen mit Hilfe von Reporterassays ist häufig mit Schwierigkeiten verbunden und produziert mitunter falsch-negative Ergebnisse durch Repressoraktivitäten oder aufgrund zu kurzer Promotorsequenzen,

die zum Fehlen notwendiger positiv-regulatorischer Bereiche führen können. Aus diesem Grund wurde die Expression von BDP1 unter physiologischen Bedingungen in Stat5-null Mäusen untersucht, die einen der potentiellen Transkriptionsfaktoren, nämlich Stat5, nicht exprimieren. Brustdrüsengewebe laktierender Stat5-null Mäusen wurde freundlicherweise von Lothar Hennighausen, Bethesda, zur Verfügung gestellt. Da Stat5-null Mäuse unfruchtbar sind, wurde das Brustepithel ausgewachsener jungfräulicher Stat5-null Mäuse in das bereinigte Fettgewebe von Empfängerinnen transplantiert, um das Epithel dem Einfluss von Schwangerschaftshormonen auszusetzen (Miyoshi et al., 2001). Während das Brustdrüsengewebe von normalen Kontrollmäusen wie bereits gezeigt eine hohe Expression von BDP1 aufwies, war diese nicht nur in Stat5-null Mäusen stark vermindert, sondern auch in heterozygoten Mäusen bereits reduziert (Abb. 23). Diese Beobachtung im *in vivo*-System könnte für eine Stat5-kontrollierte Expression von BDP1 im murinen Brustdrüsengewebe während der Schwangerschaft sprechen.

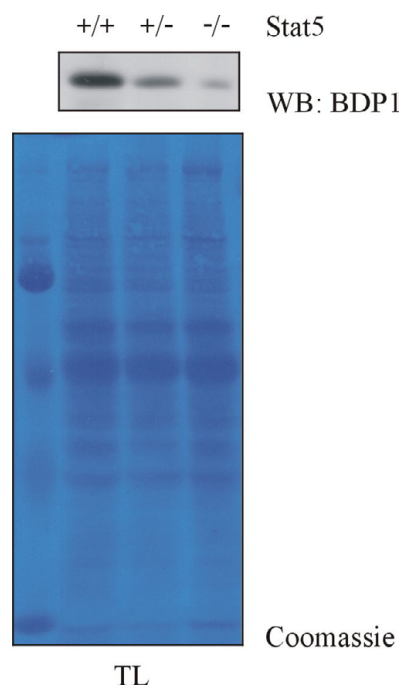


Abb. 23: Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe laktierender Stat5-null Mäuse. Das Brustdrüsengewebe von Stat5-null Mäusen (-/-), Stat5-heterozygoten Mäusen (+/-) oder normalen Kontrollmäusen (+/+) wurde am 1. Laktationstag entnommen, lysiert und 50 µg des Totallysates (TL) mittels SDS-PAGES aufgetrennt. Die Expression von BDP1 wurde im Westernblot (WB) mit Anti-BDP1-Antikörpern analysiert. Die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde anhand eines Coomassie-gefärbten Replik-Gels bestätigt.

3.2.7 Untersuchung von Stat3 als potentielltem Target von BDP1 während der Schwangerschafts-induzierten Brustentwicklung

Während die Signaltransduktion durch Stat5 ein essentieller Faktor für die Proliferation und Differenzierung des alveolaren Epithels im Brustgewebe in der Schwangerschaft darstellt (Miyoshi et al., 2001), konnte für Stat3 eine Rolle in der Involutionsphase des Brustgewebes gezeigt werden (Humphreys et al., 2002), die durch epitheliale Apoptose und umfangreiche Umgestaltung des Brustgewebes gekennzeichnet ist. Die Initiierung der Involution ist dabei durch eine Änderung der Aktivität von Stat5 und Stat3 charakterisiert. Zu Beginn der Involution kommt es zu einer schnellen Änderung des Phosphorylierungsstatus und damit der Aktivität von Stat3 und Stat5, die ein reziprokes Phosphorylierungsmuster aufweisen. Während die Phosphorylierung von Stat5 zu diesem Zeitpunkt abnimmt, nimmt die Tyrosinphosphorylierung von Stat3 zu. Diese Veränderungen können bereits 12 Stunden nach der Wegnahme der Nachkommen beobachtet werden (Li et al., 1997; Liu et al., 1996), und unterliegen somit einem schnellen und präzise kontrollierten Mechanismus.

Eine Möglichkeit zur Kontrolle der Stat-Phosphorylierung könnten Phosphatasen darstellen. Die Phosphorylierung von Stat3 weist im Verlauf der Brustentwicklung während der Schwangerschaft ein reziprokes Muster im Vergleich zur Expression von BDP1 auf (s. Abb. 21). Während der Laktation, also in der Zeit maximaler BDP1-Expression ist die Stat3-Phosphorylierung niedrig, ab dem Beginn der Involution dagegen nimmt die BDP1-Expression stark ab, während Stat3 phosphoryliert und damit aktiviert wird. Stat3 könnte somit ein potentielles Substrat für BDP1 darstellen, was im Folgenden im HEK 293-Überexpressionssystem überprüft werden sollte. Um zu untersuchen, ob Stat3 grundsätzlich von BDP1 dephosphoryliert werden kann, wurden HEK 293-Zellen mit BDP1-Konstrukten transfiziert und die Phosphorylierung von Stat3 nach Stimulation der Zellen mit Oncostatin M analysiert. Oncostatin M ist ein Zytokin der IL-6-Familie, das die Proliferation normaler und maligner Brustepithelzellen hemmen kann (Grant et al., 2001; Liu et al., 1998) und nach Bindung an seinen Rezeptor gp130 durch Aktivierung von Jak2 die Phosphorylierung von Stat3 bewirkt (Boulton et al., 1995). Weder die Expression von Wildtyp BDP1 noch der katalytisch inaktiven C/S-Mutante zeigte einen Einfluss auf die Oncostatin M-induzierte Stat3-Phosphorylierung. Somit stellt Stat3

wahrscheinlich kein Substrat für BDP1 dar, sondern wird mutmaßlich durch andere Phosphatasen bzw. regulatorische Mechanismen kontrolliert.

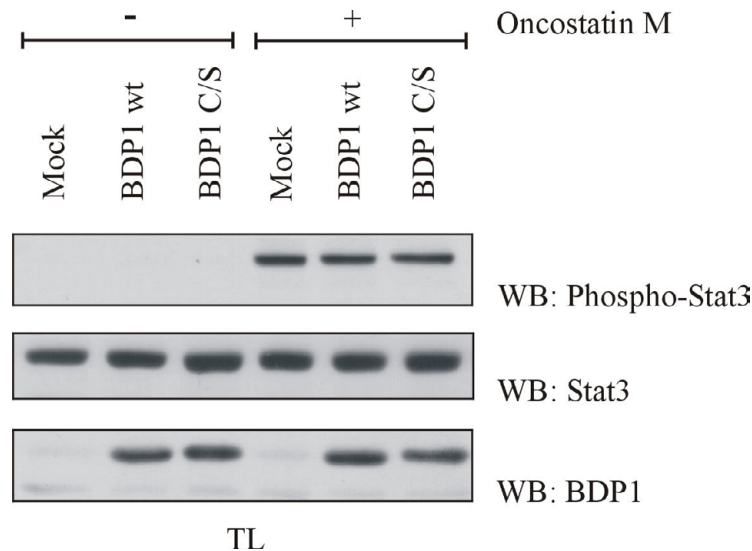


Abb. 24: Einfluss von BDP1-Expression auf die Oncostatin M-induzierte Phosphorylierung von Stat3. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 (BDP1 wt), der katalytisch inaktiven C/S-Mutante (BDP1 C/S) oder dem leeren Kontrollvektor transfiziert und 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 10 ng/ml Oncostatin M stimuliert und anschließend lysiert. 50 µg des Totallysates wurden im Westernblot (WB) mittels Anti-Phospho-Stat3-, Anti-Stat3- und Anti-BDP1-Antikörper analysiert.

3.3 Untersuchung der Interaktion von BDP1 mit dem Adaptormolekül Grb2

Die Mitglieder der PEST-Familie der Proteintyrosinphosphatasen zeichnen sich durch eine sogenannte PEST-Domäne aus, die neben einem erhöhten Anteil an Glutamat, Serin und Threonin auch prolinreiche Sequenzen enthält. Prolinreiche Sequenzen können von SH3-Domänen anderer Proteine gebunden werden und bilden somit Interaktionsmodule, die z.B. die Bindung von Enzymen an ihre Substrate ermöglicht. Charest und Kollegen berichteten für die Phosphatase PTP-PEST eine Interaktion mit dem Adaptormolekül Grb2, die über die SH3-Domänen von Grb2 und mehrerer prolinreicher Sequenzen von PTP-PEST vermittelt wird (Charest et al., 1997). Im

folgenden Kapitel sollte untersucht werden, ob eine entsprechende Bindung von BDP1 an Grb2 existiert und diese gegebenenfalls näher charakterisiert werden.

3.3.1 Koimmunopräzipitation von BDP1 mit Grb2 in HEK 293-Zellen

Um eine mögliche Bindung von BDP1 an Grb2 zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen mit Expressionskonstrukten der beiden Proteine transfiziert und ermittelt, ob Grb2 in einer Immunopräzipitation von BDP1 kopräzipitiert wird. Da das Adaptorprotein Grb2 neben zwei SH3-Domänen auch eine SH2-Domäne enthält, die die Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste vermittelt, wurden die Zellen außerdem mit dem unspezifischen Phosphataseinhibitor Pervanadat stimuliert, um BDP1 in einen Zustand maximaler Phosphorylierung zu überführen. Während in BDP1-Präzipitaten aus unstimulierten Zellen nur eine schwache Grb2-Bande detektiert werden konnte, die wahrscheinlich aus unspezifischer Bindung von Grb2 an die Protein-A-Sepharosebeads resultiert, konnte aus Pervanadat-stimulierten Zellen Grb2 in spezifischeren Mengen kopräzipitiert werden (Abb. 25). Hierbei schien die Bindung des Adaptorproteins an die Wildtyp-Form der Phosphatase stärker zu sein als an die katalytisch inaktive C/S-Mutante. Im parallel durchgeführten Kontrollexperiment mit Präimmenserum konnte Grb2 nicht kopräzipitiert werden.

3.3.2 Hyperphosphorylierung von BDP1 bei Koexpression von Grb2

Eine Analyse des Phosphotyrosinstatus von exogener BDP1 bei gleichzeitiger Expression von Grb2 zeigte, dass die Phosphatase bei Überexpression von Grb2 eine deutliche Tyrosinphosphorylierung aufwies, wobei die Wildtypform von BDP1 stärker phosphoryliert war als die katalytisch inaktive C/S-Mutante (Abb. 25). Um zu überprüfen, ob diese Phosphorylierung von der Konzentration an exogenem Grb2 abhängig war, wurden steigende Menge eines Grb2-Expressionskonstruktes mit einer konstanten Konzentration des Wildtyp BDP1-Konstruktes in HEK 293-Zellen exprimiert und der Phosphotyrosinlevel der Phosphatase analysiert. Während BDP1 ohne die gleichzeitige Expression von Grb2 keine detektierbare Phosphorylierung erkenne ließ, konnte bereits nach der Transfektion von 0.1 µg des Grb2-Expressionskonstruktes eine deutliche Tyrosinphosphorylierung von BDP1 gezeigt

werden. Ab der Transfektion von 0.5 μg des Grb2-Konstruktes befand sich sowohl die Expression von Grb2 als auch das Phosphorylierungsniveau von BDP1 auf einem maximalen Level (Abb. 26).

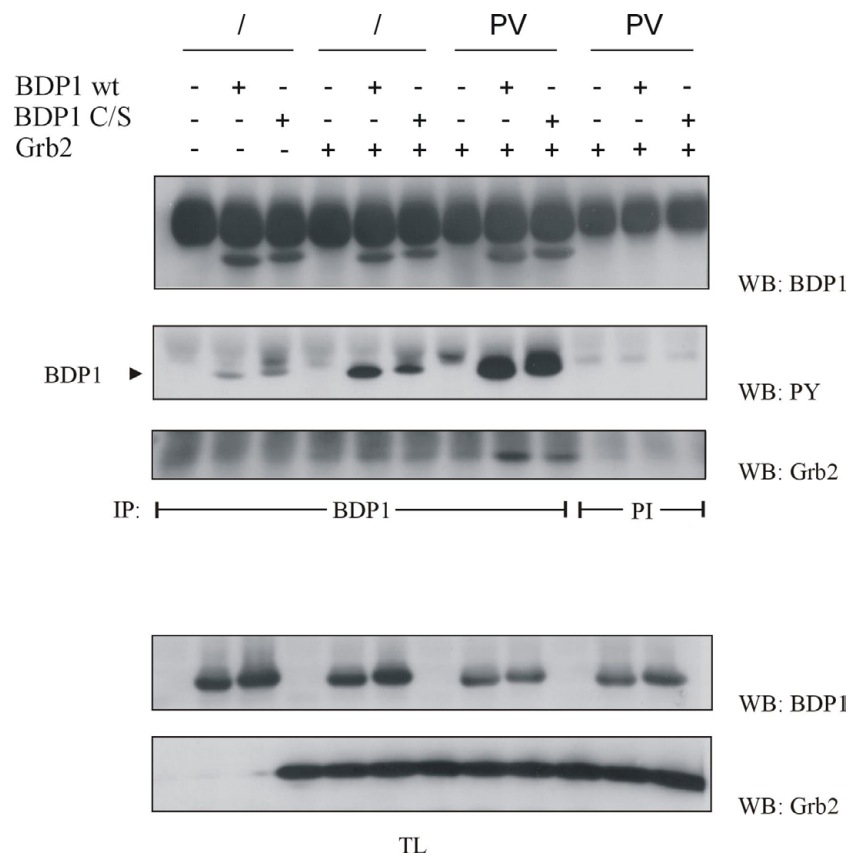


Abb. 25: Koexpression und Kopräzipitation von BDP1 und Grb2 in HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 (BDP1 wt), der katalytisch inaktiven C/S-Mutante, Grb2 oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert. Nach der Stimulation mit 100 μM Pervanadat für 20 min wurden die Zellen lysiert und BDP1 mit einem Anti-BDP1-Antikörper immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment mit dem entsprechenden Präimmunsereum (PI) durchgeführt. Die Präzipitate sowie 50 μg des Totallysates (TL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-BDP1-, Anti-Phosphotyrosin (PY)- oder Anti-Grb2-Antikörpern in der Immunoblotanalyse (WB) detektiert.

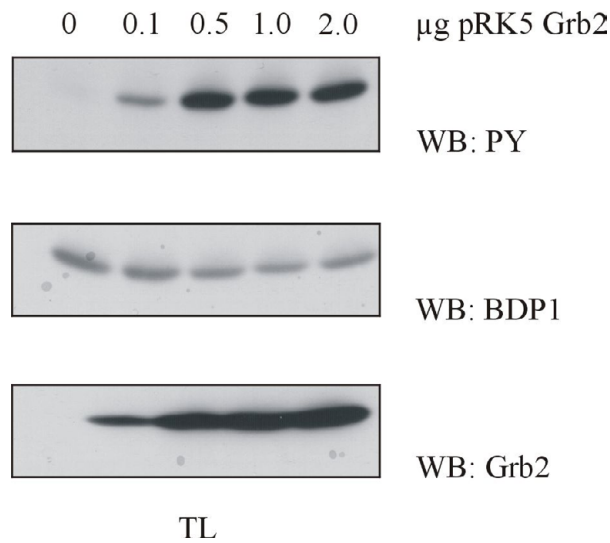


Abb. 26: Phosphorylierung von BDP1 in Abhängigkeit von der Menge an kotransfiziertem Grb2-Konstrukt in HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit 1 µg pcDNA3 BDP1 wt sowie den angegebenen Mengen pRK5 Grb2 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und 30 µg des Totallysates (TL) im Westernblot (WB) mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-BDP1- und Anti-Grb2-Antikörpern analysiert.

3.3.3 Einfluss der Expression verschiedener Grb2-Deletionskonstrukte auf die Phosphorylierung von BDP1

Um zu untersuchen, welche Domänen des Adaptorproteins Grb2 bei der Vermittlung der Hyperphosphorylierung von BDP1 eine Rolle spielen, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Grb2 mit der Phosphatase koexprimiert (Abb. 27). Während die Expression eines Grb2-Konstrukt mit Deletion der C-terminalen SH3-Domäne (Grb2 Δ C-SH3) genau wie des vollständigen Grb2-Proteins zur Phosphorylierung von BDP1 führte, resultierte die Deletion der N-terminalen SH3-Domäne (Grb2 Δ N-SH3) ebenso wie eine partielle Deletion des N-Terminus (Grb2 Δ N2-SH3) zum Verlust dieser Eigenschaft. Somit scheint die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 entscheidend für die Vermittlung der Phosphorylierung von BDP1 zu sein.

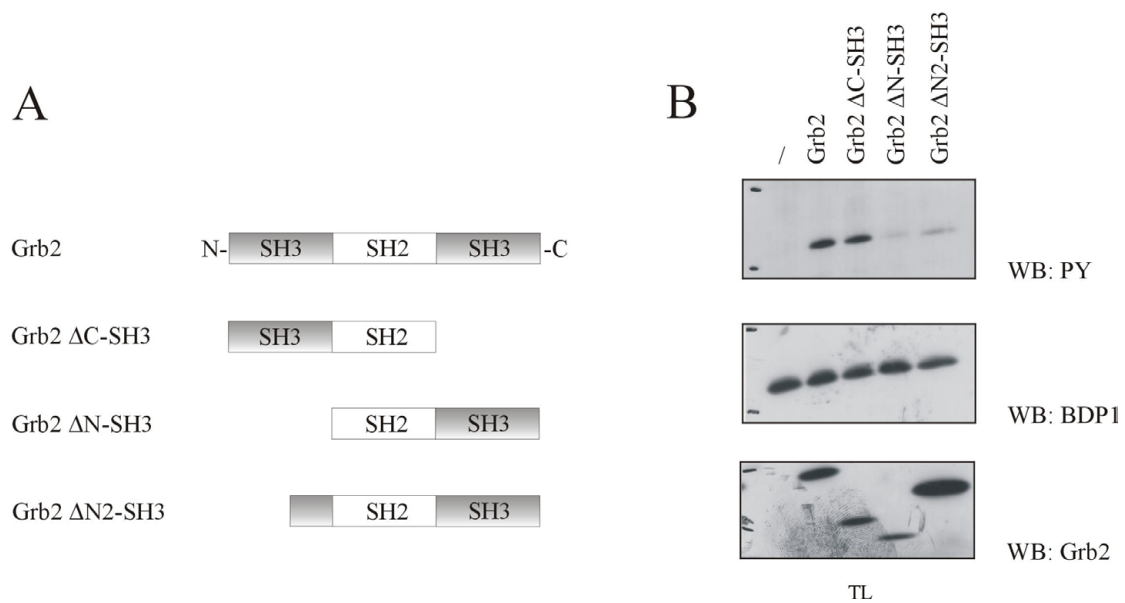


Abb. 27: Koexpression verschiedener Grb2-Deletionskonstrukte mit BDP1 in HEK 293-Zellen. A, Schematische Darstellung der verwendeten Grb2-Konstrukte. B, HEK 293-Zellen wurden mit 1 μ g BDP1 sowie 1 μ g des angegebenen Grb2-Konstruktes transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und 30 μ g des Totallysates (TL) im Westernblot (WB) mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti-BDP1- oder Anti-Grb2-Antikörpern analysiert.

3.3.4 Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Grb2-vermittelte Phosphorylierung von BDP1

Grb2 als reines Adaptormolekül besitzt keine enzymatische Aktivität und kann somit nicht direkt für die Hyperphosphorylierung von BDP1 verantwortlich sein. Ein möglicher Mechanismus für die Vermittlung der Phosphorylierung könnte die Rekrutierung einer Kinase durch Grb2 in die unmittelbare Nähe von BDP1 sein, die die Phosphatase dann phosphoryliert. Zur Überprüfung dieser Hypothese und zur Ermittlung möglicher Kinasekandidaten wurden HEK 293-Zellen, die BDP1 und Grb2 koexprimierten und somit BDP1 in der hyperphosphorylierten Form enthielten, mit verschiedenen Kinaseinhibitoren behandelt und die Auswirkung auf die BDP1-Phosphorylierung untersucht. Während die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren für die Kinasen Syk (Piceatannol), EGFR (AG1478) und c-src (PP1) beziehungsweise

dem inhibitorischen HER2-Antikörper 2C4 keine Auswirkungen auf den Phosphotyrosinlevel von BDP1 zeigte, bewirkte der unspezifische Tyrosinkinaseinhibitor Genistein eine komplette Blockade der Phosphorylierung der Phosphatase. Desweiteren konnte mit dem Abl-Inhibitor Imatinib die BDP1-Phosphorylierung zumindest teilweise blockiert werden, womit c-Abl einen potentiellen Kandidaten als BDP1-phosphorylierende Kinase in dem beschriebenen System darstellt.

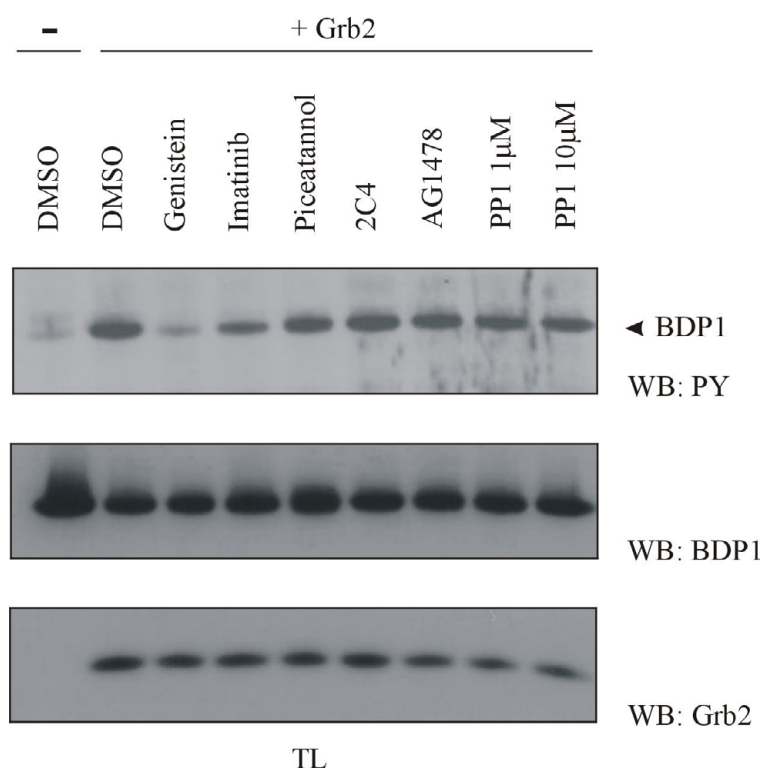


Abb. 28: Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Grb2-vermittelte Phosphorylierung von BDP1. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 und Grb2 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 100 µM Genistein, 20 µM Imatinib, 80 µM Piceatannol, 100 nM 2C4, 250 nM AG1478 oder 1 bzw. 10 µM PP1 für 1 h inkubiert und danach lysiert. 30 µg des Totallysates (TL) wurden mittels Immunoblotanalyse (WB) mit Anti-Phosphotyrosin (PY), Anti-BDP1- oder Anti-Grb2-Antikörpern analysiert.

3.3.5 Untersuchung der Rolle von c-Abl in der Grb2-vermittelten BDP1-Phosphorylierung

Da der Abl-Inhibitor STI571 die Phosphorylierung von BDP1 bei gleichzeitiger Expression von Grb2 zumindest teilweise blockieren konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob c-Abl tatsächlich eine Rolle bei der Grb2-vermittelten Hyperphosphorylierung von BDP1 spielen könnte. Hierzu wurden HEK 293-Zellen mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1 und c-Abl sowie einer Kinase-

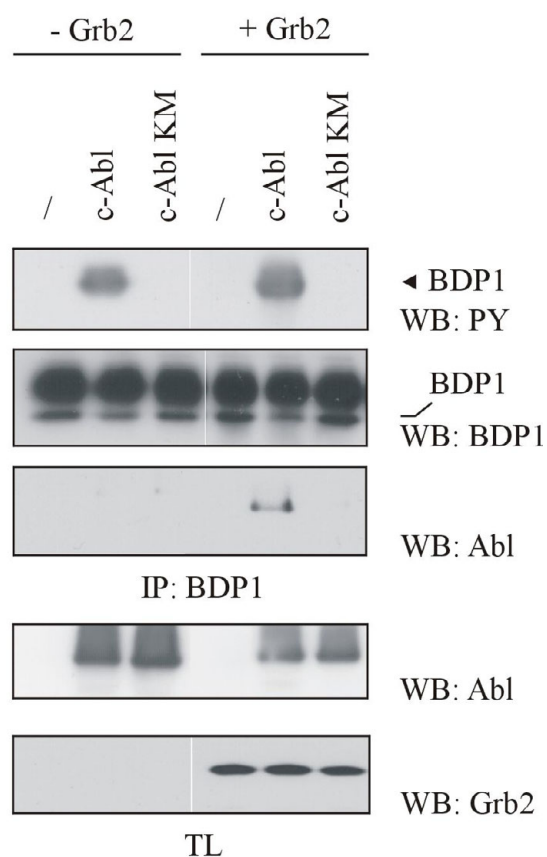


Abb. 29: Phosphorylierung von BDP1 durch c-Abl in Abhängigkeit von Grb2-Koexpression. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Wildtyp BDP1, Wildtyp c-Abl (c-Abl), einer Kinase-inaktiven Mutante (c-Abl KM) oder einem leeren Kontrollvektor (/) transfiziert und die Phosphorylierung von BDP1 in Abhängigkeit von Grb2-Koexpression untersucht. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert und BDP1-Präzipitate sowie 30 µg Totallysat (TL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Westernblotanalyse (WB) mit Anti-Phosphotyrosin (PY)-, Anti- BDP1-, Anti-Abl- oder Anti-Grb2-Antikörpern.

inaktiven KM-Mutanten von c-Abl transfiziert und die Phosphorylierung von BDP1 in Abhängigkeit von der Koexpression von Grb2 analysiert. Während die Expression von c-Abl bereits eine starke Phosphorylierung der Phosphatase bewirkte, konnte die Koexpression von Grb2 den Tyrosinlevel von BDP1 sogar noch leicht erhöhen. Gleichzeitig konnte in den Grb2-exprimierenden Zellen c-Abl mit BDP1 kopräzipitiert werden. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass c-Abl zumindest teilweise für die Grb2-vermittelte BDP1-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte.

4 Diskussion

Zwar haben sich Proteintyrosinphosphatasen in den letzten Jahren immer mehr als wichtiges regulatorisches Element der Phosphotyrosin-vermittelten Signaltransduktion erwiesen, über die Rolle einzelner Phosphatasen bei der Regulation spezifischer physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozesse ist jedoch noch wenig bekannt. Eine wichtige Bedeutung kommt diesen Enzymen bei der Negativregulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTK_n) zu, die grundlegende zelluläre Ereignisse wie Wachstum, Migration oder Differenzierung steuern. Eine Deregulation dieser Prozesse z.B. durch unkontrollierte Kinaseaktivität kann unter Umständen zur Entstehung schwerwiegender Krankheiten wie Krebs führen, so dass die Entdeckung von Kinase-regulierenden Phosphatasen auch von therapeutischem Interesse sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Proteintyrosinphosphatase BDP1 in der Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinase HER2 untersucht. Ein weiteres Schwerpunktthema bildete die Bedeutung von BDP1 bei den Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen der murinen Brustdrüse während der Schwangerschaft. Außerdem wurde die Interaktion von BDP1 mit dem Adaptorprotein Grb2 untersucht.

4.1 Negativregulation der HER2-vermittelten Signaltransduktion durch BDP1

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits mehrere Phosphatasen in die Negativregulation der RTK EGFR impliziert. Dies schließt die Rezeptorphosphatasen RPTP σ und LAR (Kulas et al., 1996; Suarez Pestana et al., 1999) sowie die zytoplasmatischen PTPn SHP-1, PTP1B und TCPTP ein (Flint et al., 1997; Tenev et al., 1997a; Tiganis et al., 1998a). Im Gegensatz dazu konnte bisher keine Phosphatase identifiziert werden, die für die Inaktivierung von der eng verwandten RTK HER2 verantwortlich ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BDP1 die Signaltransduktion von HER2 regulieren kann. Die Phosphorylierung von HER2 erwies sich als sensitiv gegenüber der katalytischen Aktivität von BDP1. So verminderte die Erhöhung der zellulären BDP1-Aktivität durch Überexpression die Liganden-induzierte Phosphorylierung von HER2 in HEK 293-Zellen (s. 3.1.3). Andererseits führte die Expression einer katalytische inaktive C/S-Mutante in HEK 293-Zellen (s. 3.1.3) sowie die Unterdrückung der endogenen BDP1-Expression in der humanen Brustkrebszelllinie T47D zu einer Erhöhung der HER2-Phosphorylierung (s. 3.1.8). Der Effekt der verminderten BDP1-Expression in T47D-Zellen war im Vergleich zu den erzielten Ergebnissen der

Überexpressionsstudien in HEK 293-Zellen eher moderat, was vermutlich auf die Komplexität der *in vivo* Situation zurückzuführen ist. So ist anzunehmen, dass wie im Falle des eng verwandten EGFR mehrere Phosphatasen zusammenarbeiten, um eine strikte und doch fein abgestimmte Regulation des HER2-Signals zu gewährleisten.

Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, dass die Phosphatasefamilie nur eine kleine Anzahl von Mitgliedern besitzt, die eine eher unspezifische „Wächterfunktion“ über die Gesamtphosphorylierung der Zelle ausüben, haben die Forschungen der letzten Jahre ein entgegengesetztes Bild ergeben. Eine Vielzahl an strukturellen, biochemischen und genetischen Studien veranschaulichte, dass PTPn *in vivo* eine außerordentliche Substratspezifität besitzen und dadurch spezifische Signaltransduktionswege und physiologische Prozesse regulieren (Tonks and Neel, 2001). In dieser Arbeit wurde die Spezifität von BDP1 für HER2 durch das Unvermögen der Phosphatase verdeutlicht, weder den mit HER2 eng verwandten EGFR noch den IGF1R signifikant dephosphorylieren zu können (s.3.1.4). Interessanterweise konnte dennoch in einigen Experimenten eine geringfügige Verminderung der EGFR-Phosphorylierung in der Gegenwart exogener BDP1 beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür könnte ein indirekter Einfluss von BDP1 auf die Subfraktion des EGFR sein, der im EGFR-HER2-Heterodimer assoziiert ist und somit in geringerem Maße durch den inhibierten Bindungspartner transphosphoryliert werden kann.

Ein weiterer Punkt, der für die Spezifität von BDP1 für die HER2-Phosphorylierung spricht, sind die erzielten Ergebnisse mit der Kontrollphosphatase HePTP (s. 3.1.4), die bei gleichem Überexpressionslevel nicht in der Lage war, die Phosphorylierung von HER2 zu beeinflussen. Die direkte Konsequenz aus einer Beeinträchtigung der Aktivierung von RTKn ist die ausbleibende Initiierung der Rezeptor-proximalen Signalweiterleitung mittels Rekrutierung und Phosphorylierung von Signalmolekülen (Palka et al., 2003). Für das Adaptormolekül Shc konnte eine Bindung an und Phosphorylierung durch den aktivierten HER2-Rezeptor gezeigt werden (Segatto et al., 1993). Außerdem wurde für Shc eine Rolle in der HER2-vermittelten Tumorigenese beschrieben (Dankort et al., 2001). In HEK 293-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von BDP1-Überexpression auf die EGF-induzierte Shc-Phosphorylierung beobachtet werden (s.3.1.5). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von Shc in dem benutzten System vorwiegend durch den EGFR erfolgt, der durch die Überexpression von BDP1 nicht oder nur marginal in seiner Aktivität beeinträchtigt wurde. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass durch die Expression exogener BDP1 nur die Phosphorylierung spezifischer Tyrosine vermindert wird, so dass die Bindung und Phosphorylierung von Shc unbeeinflusst bleibt.

Im Gegensatz zu Shc wurde die Phosphorylierung von Gab1 durch die exogene BDP1 nahezu vollständig verhindert (s. 3.1.5). Obwohl eine direkte Bindung von Gab1 an und

Phosphorylierung durch HER2 noch nicht gezeigt wurde, wird Gab1 in neueren Veröffentlichungen als Effektor von HER2 beschrieben und scheint für die HER2-getriebene Transformation von Zellen notwendig zu sein (Settle et al., 2003; Yamasaki et al., 2003). Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Gab1 im HEK 293-System nach Stimulation mit EGF vornehmlich durch Rezeptoren in HER2-enhaltenden Heterodimeren phosphoryliert wird, dessen Inhibierung sich in der verminderten Gab1-Phosphorylierung widerspiegelt.

Die Dimerisierung und Aktivierung von RTKs wie HER2 oder dem EGFR führt letztlich zur Aktivierung von MAPKs, die das Signal in den Nukleus weiterleiten und dort die Expression von Effektorgenen regulieren (Chang and Karin, 2001). Der am besten bekannte Signalweg, der in der Aktivierung von MAPKs resultiert, führt über das Adaptorprotein Shc, Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplex und Aktivierung der kleinen GTPase Ras (Ravichandran, 2001). Zusätzlich zu diesem Shc-involvierenden Signalweg wurde kürzlich Gab1 als weiteres Signaltransduktionsmolekül identifiziert, das das Signal von RTKs mit der Aktivierung von MAPK verbindet (Rodrigues et al., 2000; Yamasaki et al., 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von BDP1 in HEK 293-Zellen zu einer 50%-igen Reduktion der Aktivität der zwei MAPKs ERK2 und JNK1 führt. Die vorangegangene Beobachtung, dass BDP1 zwar die Phosphorylierung von Gab1 aber nicht von Shc blockieren kann, führt zu der Vermutung, dass die partielle Inhibierung der MAPK-Aktivität auf den Ausfall der Signalweiterleitung durch Gab1 zurückzuführen ist und somit nur noch der Shc-involvierende Signalweg zum Tragen kommt.

4.2 Mechanismus der Inhibierung des HER2-Signalweges durch BDP1

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass BDP1 das Potential zur Negativregulation des HER2-Rezeptors selbst, sowie auch der Rezeptor-proximalen Signalweiterleitung besitzt. Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist jedoch weiterhin ungeklärt. Eine naheliegende Möglichkeit ist eine Rekrutierung von BDP1 zu aktivierten Rezeptorkomplexen und die direkte Dephosphorylierung von HER2 durch die Phosphatase. Einen ersten Hinweis hierfür bietet die beobachtete Kopräzipitation von HER2 mit BDP1-Fusionsproteinen in Lysaten von humanen SkBr3-Brustkrebszellen (s. 3.1.9). Auch die beobachtete Koexpression von BDP1 und HER2 in einer Reihe von Brustkrebszelllinien und in murinen Tumoren (s. 4.1.7) könnte dafür sprechen, dass HER2 ein physiologisches Substrat von BDP1 darstellt.

Obwohl die gezeigte Reduktion der Gab1-Phosphorylierung wohl eher als Konsequenz aus der Dephosphorylierung und Inaktivierung von HER2 resultiert, kann nicht völlig

ausgeschlossen werden, dass Gab1 selbst ein Substrat von BDP1 darstellt und von der Phosphatase dephosphoryliert wird. Interessanterweise ist Gab1 das zentrale Element eines positiven „feedback loop“, der zur Stabilisierung und Verstärkung des ursprünglichen EGFR-Signals beiträgt (Rodrigues et al., 2000). Sollte Gab1 eine vergleichbare Funktion in der HER2-Signaltransduktion besitzen, so könnte BDP1 durch die Kontrolle der Gab1-Phosphorylierung einen solchen positiven „feedback loop“ regulieren oder sogar unterbinden und so indirekt den Aktivierungsstatus von HER2 beeinflussen.

Eine weitere mechanistische Überlegung betrifft die enzymatische Aktivierung von BDP1. Für einige PTPn konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität durch Mechanismen wie Phosphorylierung oder Substratbindung reguliert wird. So wird z.B. SHP1 nach NGF-Stimulation von PC12-Zellen phosphoryliert und aktiviert (Vambutas et al., 1995). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen jedoch nicht auf eine Aktivierung oder Inaktivierung von BDP1 nach EGF-Stimulation von HEK 293-Zellen schließen (s. 3.1.10), so dass die inhibitorische Wirkung von BDP1 wohl in diesem Falle mutmaßlich über Relokalisation der Phosphatase und Rekrutierung zum Substrat vermittelt wird.

4.3 BDP1 – ein Tumorsuppressor?

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben deutlich gemacht, dass die Entstehung von Tumoren mit einer unkontrollierten Proliferation und einer gleichzeitigen Reduktion der Apoptoserate verbunden ist. Auf molekularer Ebene resultiert die Tumorentstehung aus einer sukzessiven Akkumulation von Mutationen der Gene essentieller regulatorischer Enzyme, die einerseits onkogenes Potential besitzen können, andererseits aber auch Tumorsuppressoren sein können. So wurde deutlich, dass onkogene Proteine und Tumorsuppressoren in den gleichen Signalwegen agieren können, dabei aber im Falle der onkogenen Proteine positiv auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium wirken, während Tumorsuppressoren diese Vorgänge inhibieren können (El-Deiry, 2003).

Das onkogene Potential von *her2* scheint ausschließlich in der Amplifikation des Gens und der daraus resultierenden Überexpression und konstitutiven Aktivierung der RTK HER2 begründet zu sein. So konnten im Gegensatz zum *egfr*-Gen bisher keine aktivierenden Punktmutationen von *her2* in humanen Tumoren gefunden werden (Holbro et al., 2003). Allein das konstitutive Signal des ansonsten unveränderten Rezeptors scheint für die Erhaltung der proliferativen Eigenschaften von Tumorzellen essentiell zu sein, wie Experimente mit HER2-Blockadeantikörpern (Sliwkowski et al., 1999) oder HER2-spezifischen Inhibitoren (Traxler et al., 2001) gezeigt haben. Das in dieser Arbeit vorgestellte

Potential von BDP1 zur Inhibierung von HER2 könnte auf eine Bedeutung der Phosphatase als potentiellen Tumorsuppressor hindeuten. Eine Untersuchung des Einflusses von BDP1 auf die tumorigenen Eigenschaften der Kinase in HER2-überexprimierenden Systemen wird in zukünftigen Experimenten somit von besonderem Interesse sein.

In der normalen Zelle können Tumorsuppressoren die Krebsentstehung und Progression kontrollieren und verhindern. In Krebszellen kommt es jedoch häufig zu Mutationen von Tumorsuppressorgenen, die die Aktivität des entsprechenden Genproduktes beeinträchtigt oder die Expression verhindert. Ein weiterer Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist die Methylierung spezifischer DNA-Sequenzen im Promotorbereich, die zur Stilllegung des Gens und damit zum Ausbleiben der Proteinsynthese führt (El-Deiry, 2003). Eine Untersuchung der BDP1-Expression und –Aktivität in Tumorproben würde somit weitere Hinweise zur potentiellen Tumorsuppressoreigenschaft von BDP1 geben.

In diesem Zusammenhang ist auch das Auftreten von 2 Splicevarianten von BDP1 von Interesse. Eine der Splicevarianten kodiert für eine um 320 bp verkürzte Phosphatase, bei der zwar die Exons 2-5 fehlen, das katalytische Zentrum jedoch intakt bleibt. Die zweite Splicevariante dagegen entbehrt nur das zweite Exon, auf Grund einer Leserahmenverschiebung kommt es jedoch zur Expression eines extrem verkürzten Proteins ohne katalytischem Zentrum (persönliche Mitteilung Sylvia Streit, diese Arbeitsgruppe). Die Analyse dieser Varianten und insbesondere ihres möglichen Einflusses auf die Funktion der Wildtyp-Phosphatase sowie das Vorkommen und Verhältnis der drei Isoformen in Tumorproben könnte weiteren Aufschluss über die potentiellen tumorsuppressiven Eigenschaften von BDP1 geben.

4.4 Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus während der Schwangerschaft

Die Differenzierung der Brustdrüse erfordert sowohl im Laufe des Wachstums und der Pubertät als auch während der Schwangerschaft das koordinierte Zusammenspiel einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Hormonen, die einerseits die morphologische Entwicklung, andererseits aber auch die funktionelle Differenzierung des Gewebes beeinflussen. Eine Störung dieser natürlichen Prozesse durch z.B. genetische Veränderung kann zur Entstehung von Brustkrebs führen. Da eine Vielzahl der Signale während der Brustentwicklung und –differenzierung durch Tyrosinphosphorylierung übertragen werden,

spielen PTKn und PTPn eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Brustepithelzellen.

In dieser Arbeit wurde die Expression von BDP1 während der Entwicklung der Brustdrüse der Maus im Verlauf der Schwangerschaft untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Proteinlevel von BDP1 in der Brustdrüse der jungfräulichen Maus zwar zunächst unterhalb der Detektionsgrenze lag, im Verlauf der Schwangerschaft jedoch zunahm und in der späten Laktationsphase ein Maximum erreichte. Nach dem Entfernen der Nachkommen, was zur Rückbildung des Brustdrüsengewebes führt und als Involutionsphase bezeichnet wird, konnte eine Abnahme der BDP1-Expression gezeigt werden (s. 3.2.1). Ähnliche Resultate fanden Aoki und Kollegen bei der Untersuchung der Expression von Phosphatasen auf RNA-Ebene in murinem Brustdrüsengewebe mittels RT-PCR-Analyse (Aoki et al., 1999). Die Ergebnisse dieser Studie, für die degenerierte Primer für die hochkonservierte Kernsequenz der Phosphatasedomäne benutzt wurden, zeigten eine Abnahme der Expression aller untersuchten Phosphatasen im Verlauf der Schwangerschaft bis zur Laktation, während in der Involutionsphase wieder eine Zunahme der Phosphataseexpression zu verzeichnen war. Lediglich die Expression von BDP1 verhielt sich in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit reziprok zur Expression der übrigen PTPn. Im Gegensatz zu dieser Arbeit konnte jedoch schon eine geringe basale BDP1-Expression auf RNA-Ebene detektiert werden, die sich im Verlauf der Schwangerschaft nur um das 2-3-fache steigerte. Diese Unterschiede in der RNA- und Proteinexpression könnten einerseits auf den unterschiedlich sensitiven Detektionsmethoden beruhen, andererseits durch die Existenz verschiedener Regulations- und Amplifikationsmechanismen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene begründet werden.

Die Frage nach der Ursache für die Erhöhung der BDP1-Expression im Laufe der Schwangerschaft konnte zunächst durch die Untersuchung der Lokalisation der Phosphatase im murinen Brustdrüsengewebe beantwortet werden. Eine immunhistologische Analyse von Gewebsschnitten zeigte eine spezifische Expression von BDP1 in den dukталen und alveolaren Epithelzellen (s.3.2.2). Die Tatsache, dass die Zahl dieser Zellen im Verlauf der Schwangerschaft bis zur Laktation um das 5-10-fache zunimmt (Hennighausen and Robinson, 2001), lieferte eine erste Erklärung für die detektierte erhöhte Expression von BDP1 im gesamten Brustgewebe.

Um die molekularen Ereignisse aufzuklären, die zur normalen Brustdrüsenentwicklung sowie zur Entstehung von Krebs beitragen können, haben sich *in vitro* Zellsysteme als wertvolle Hilfsmittel erwiesen. Die murine Brustepithelzelllinie HC11 stellt ein nützliches Modellsystem zur Untersuchung der Brustzellendifferenzierung dar. Diese Zellen können durch die Behandlung mit den laktogenen Hormonen Prolaktin und Dexamethason zur Differenzierung

und zur Produktion von Milchproteinen angeregt werden (Doppler et al., 1989). In diesem System konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Differenzierung der Epithelzellen zu einer Erhöhung der BDP1-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene führte (s. 3.2.3). Sowohl Prolaktin als auch Glukokortikoide, zu denen die synthetische Substanz Dexamethason gezählt wird, spielen eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Differenzierung der Brustdrüse. So ist die Proliferation und Differenzierung des sekretorischen Brustepithels abhängig von der Expression des Prolaktinrezeptors (Ormandy et al., 1997) und der Komponenten des Jak2/Stat5-Signalkomplexes (Liu et al., 1997), wie Studien mit Knockout-Mäusen der entsprechenden Proteine gezeigt haben. Der Einfluss des Glukokortikoidrezeptors auf die Entwicklung der Brustdrüse beruht auf mehreren verschiedenen molekularen Mechanismen. Während die Entwicklung des duktales System in der jungfräulichen murinen Brustdrüse von der Bindung des aktivierten Glukokortikoidrezeptors an entsprechenden Glukokortikoidrezeptor-Bindestellen in der Promotorregion Glukokortikoid-sensitiver Gene abhängig ist, scheinen die Prozesse der epithelialen Differenzierung und Laktation über die Protein-Protein-Interaktion des Glukokortikoidrezeptors mit verschiedenen Interaktionspartnern wie z.B. Stat5 reguliert zu werden (Reichardt et al., 2001). Die Relevanz der laktogenen Hormone im physiologischen Kontext könnte darauf hinweisen, dass die Expression von BDP1 nicht nur im HC11-System, sondern auch unter physiologischen Bedingungen in der murinen Brustdrüse unter der Kontrolle der laktogenen Hormone steht. Dies würde bedeuten, dass die erhöhte Detektion von BDP1 im Verlauf der Schwangerschaft nicht allein auf der quantitativen Vermehrung der Epithelzellen, sondern auch auf einer erhöhten Expression der Phosphatase unter der Kontrolle laktogener Hormone wie Prolaktin und Glukokortikoiden beruhen könnte.

Für diese Hypothese sprechen die Ergebnisse, die aus der Analyse der BDP1-Expression im Brustgewebe von Stat5-null bzw. Stat5-heterozygoten Mäusen erzielt wurden. Da Stat5-null Mäuse unfruchtbar sind, wurde das Brustepithel ausgewachsener jungfräulicher Stat5-null Mäuse in das leere Fettgewebe normaler Empfängermäuse transplantiert, um das Gewebe so dem Einfluss von Schwangerschaftshormonen auszusetzen (Liu et al., 1997). Zwar entwickelt das Stat5-null Brustepithel Dukte, die Bildung von Alveoli sowie die Expression von Milchproteinen bleibt jedoch aus, so dass die verminderte Detektion von BDP1 in diesem Gewebe wahrscheinlich auch auf die reduzierte Anzahl epithelialer Zellen zurückzuführen ist (s. 3.2.6). Im Gegensatz dazu sind Stat5-heterozygote Mäuse fertil und zeigen eine normale Differenzierung der Brustdrüse (Lothar Hennighausen, Bethesda, persönliche Mitteilung). Somit beruht die reduzierte Detektion von BDP1 in Stat5-heterozygotem Brustgewebe wahrscheinlich tatsächlich auf einer verminderten Expression der Phosphatase. Da Stat5 ein zentraler Signalüberträger des Prolaktin- und Glukokortikoidrezeptors, aber auch einer Reihe

von Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. des EGFRs (Rebsamen et al., 2000) oder HER4 ist (Jones et al., 1999), kann auf das ursprüngliche Expressions-regulierende Signal jedoch nicht zurückgeschlossen werden.

4.5 Expressionskontrolle von *bdp1*

Die Expression von Genen wird durch eine komplexe Maschinerie aus negativen und positiven Transkriptionsfaktoren reguliert. Eines der am besten untersuchten Gene im Zusammenhang mit Brustentwicklung ist das β -casein-Gen. β -Casein ist ein Milchprotein und bildet zusammen mit Kalzium und Phosphat die Casein-Mizellen der Milch. Die Expression von β -casein steigt ebenso wie die der verwandten α -, γ -, δ - und κ -caseine während der Schwangerschaft und Laktation und sinkt in der Involutionsphase der Brustdrüse wieder auf das Normalniveau ab (Travers et al., 1996). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der β -casein-Promotor auf eine Reihe von Stimuli reagiert, unter denen sich z.B. Prolaktin, Glukokortikoide oder die extrazelluläre Matrix befinden (Doppler et al., 2000). Prolaktin induziert die β -casein-Expression über den Jak2/Stat5-Signalweg, wobei die Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an zwei Stat5-Bindestellen im Promotorbereich des β -casein-Gens erfolgt (Happ and Groner, 1993). Trotz der Existenz von mehreren Glukokortikoidrezeptor-Bindestellen im β -casein-Promotor aktivieren Glukokortikoide diesen nicht direkt sondern über eine Protein-Protein-Interaktion des aktivierten Glukokortikoidrezeptors mit Stat5, was zu einer synergistischen Genaktivierung führt (Stocklin et al., 1996). Neben den bereits genannten enthält der β -casein-Promotor außerdem Bindestellen für C/EBP- und YY1-Transkriptionsfaktoren (Rosen et al., 1999).

Die Analyse der potentiellen Promotorregion von BDP1 zeigte, dass sich in der 5'-gelegenen DNA-Region vor dem transkriptionellen Start von *bdp1* eine Stat5- und zwei Glukokortikoidrezeptor-Bindestellen befinden (s. 3.2.4). Obwohl die Untersuchung der Promotorregion mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays keine Sensitivität gegenüber Prolaktin- und Glukokortikoid-Stimulation ergab, ist die funktionelle und regulatorische Integrität dieser Transkriptionsfaktor-Bindestellen nicht völlig auszuschließen. So wurden die Experimente in NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt, die auf Grund ihrer leichten Transfizierbarkeit und der endogenen Expression des Prolaktin- und Glukokortikoidrezeptors ein gutes Testsystem darstellten. Zwar konnte die Aktivität des zur Kontrolle verwendeten β -casein-Promotors durch Stimulation mit laktogenen Hormonen induziert werden, trotzdem ist nicht auszuschließen, dass in diesem Zellsystem wichtige regulatorische Komponenten nicht

exprimiert werden, die in HC11-Zellen die Induktion der *bdp1*-Expression durch laktogene Hormone regeln.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass sich in der 3'-Region nach dem transkriptionellen Start des *bdp1*-Gens weitere regulatorische Sequenzen befinden, die in den verwendeten Reporterkonstrukten nicht berücksichtigt wurden. Beispielsweise wurde in dem Glukokortikoid-induzierbaren *glutaminsynthase*-Gens eine Glukokortikoidrezeptor-Bindestelle innerhalb des ersten Introns des Gens gefunden, die für die Induzierbarkeit des Gens verantwortlich ist (Gaunitz et al., 2002). Eine zukünftige genauere Untersuchung des *bdp1*-Promotors sollte somit auch die 3'-Region nach, sowie einen größeren Bereich der 5'-Region vor dem transkriptionellen Start einschließen.

Für die funktionelle Relevanz der gefundenen Stat5-Bindestellen könnte die verminderte Expression von BDP1 im Brustdrüsengewebe von Stat5-null bzw. Stat5-heterozygoten Mäusen sprechen, wenn auch dieses Ergebnis keine Aussage darüber zulässt, ob die Expression der Phosphatase in direkter oder eher indirekter Abhängigkeit von Stat5 steht.

4.6 Potentielle Funktion von BDP1 im Brustdrüsengewebe der Maus während der Schwangerschaft

Zwar wird für PTPn eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Brustdrüse angenommen, die Zahl der Publikationen zu diesem Thema ist jedoch bis heute gering. Bisher konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Behandlung von Brustdrüsengewebe *ex vivo* mit dem unspezifischen Phosphataseinhibitor Vanadat zur Blockade der epithelialen Differenzierung führt und abnormale Proliferation sowie Apoptose begünstigt (Gallo-Hendrikx et al., 2001). Bei PTP-LAR-defizienten Mäusen wurde desweiteren eine Beeinträchtigung der terminalen alveolaren Differenzierung beobachtet, was auf eine Bedeutung dieser Phosphatase in der späten Schwangerschaftsphase hindeutet (Schaapveld et al., 1997). Für die zytoplasmatische Phosphatase SHP-2 wurde eine Rolle bei der Regulierung der Prolaktin-stimulierten Aktivität von Jak2 und Stat5 postuliert (Chughtai et al., 2002; Schaapveld et al., 1997).

Aufgrund des Expressionsmusters von BDP1 wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst vermutet, dass Stat3 ein Substrat von BDP1 sein könnte. Stat3 wird spezifisch zu Beginn der Involutionsphase aktiviert und ist essentiell für den normalen Ablauf von Apoptose und Involution in der Brustdrüse (Chapman et al., 1999). Da die Expression und somit die Gesamtaktivität von BDP1 genau reziprok zur Aktivität von Stat3 verläuft (s. 3.2.1 und) (Liu et al., 1996), hätte BDP1 als Negativregulator von Stat3 fungieren und die Phosphorylierung und damit Aktivität von Stat3 bis zum Beginn der Involution kontrollieren können. Da die

Expression exogener BDP1 in HEK 293-Zellen jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat3 zeigte (s. 3.2.7), ist Stat3 wahrscheinlich kein Substrat von BDP1 und wird durch andere Phosphatasen oder Mechanismen reguliert.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass BDP1 den Signalweg der RTK HER2 negativregulatorisch beeinflussen kann, so dass sich die Frage stellt, ob dies eventuell auch eine Rolle der Phosphatase in der Brustdrüse sein könnte. HER2 wird in Epithel- und Stromazellen der jungfräulichen Brustdrüse und im lobuloalveolaren Epithel der schwangeren und laktierenden Maus exprimiert (DiAugustine et al., 1997; Schroeder and Lee, 1998; Sebastian et al., 1998). Ähnliche zelluläre sowie temporäre Expressionsmuster wurden für den EGFR (DiAugustine et al., 1997), HER3 und HER4 berichtet (Sebastian et al., 1998), wobei die Expression von HER4 während der Schwangerschaft am stärksten zu sein scheint (Schroeder and Lee, 1998). Die EGFR-Liganden EGF, TGF α und Amphiregulin werden sowohl in jungfräulichem als auch im Brustgewebe schwangerer Mäuse exprimiert (Schroeder and Lee, 1998). Andererseits konnten signifikante Mengen des HER3- und HER4-Liganden Neuregulin1 nur während der Schwangerschaft detektiert werden (Yang et al., 1995). Diese Expressionsunterschiede von EGFR-Familienmitgliedern und ihrer Liganden deuten auf vielschichtige Funktionen der Rezeptorfamilie während der Brustdrüsenentwicklung hin. Während für den EGFR eine Rolle bei der duktalem Proliferation und Morphogenese in der Pubertät vorgeschlagen wurde (Schroeder and Lee, 1998), scheint HER2-Aktivität für die späten Stadien der lobuloalveolaren Entwicklung und für die Laktation wichtig zu sein. Dies wurde anhand der Expression eines dominant-negativen HER2-Konstruktes im Brustepithel transgener Mäuse gezeigt (Jones and Stern, 1999). Da die Aktivität von HER2 somit genau in den Schwangerschaftsphasen entscheidend zu sein scheint, in denen die Expression und damit die zelluläre Gesamtaktivität von BDP1 am höchsten ist, scheint HER2 auf den ersten Blick kein Kandidat für die Negativregulation durch BDP1 zu sein. Andererseits führt die Überexpression und konstitutive Aktivierung von HER2 im Brustepithel transgener Mäuse zum Ausbleiben der terminalen Differenzierung (Lazar et al., 2000), was unterstreicht, dass sowohl die Unterdrückung als auch ein erhöhtes HER2-Signal zur Störung des normalen Entwicklungsprozesses der Brustdrüse führen kann. Somit könnte BDP1 für die Feinregulation des HER2-Signals in der entscheidenden Phase des Differenzierungsprozesses verantwortlich sein. In zukünftigen Experimenten könnte eine Untersuchung der HER2-Phosphorylierung in BDP1-null Mäusen hierzu näheren Aufschluss geben.

4.7 Die Bindung von BDP1 an Grb2 und deren Bedeutung für die Interaktion mit c-Abl

Die Weiterleitung von Signalen von Zelloberflächenrezeptoren in das Zellinnere erfolgt in der Regel durch Signalkaskaden, die mittels Interaktion von Effektorproteinen generiert werden. Diese Proteinmodule gehören unter anderem zur Gruppe der Adaptorproteine, die keine eigene Enzymaktivität besitzen und über spezifische Bindemotive Wechselwirkungen zwischen Signalmolekülen vermitteln. Ein bekanntes Beispiel ist das Adaptormolekül Grb2, das aus einer zentralen SH2-Domäne und zwei flankierenden SH3-Domänen besteht. Genetische und biochemische Studien zeigten, dass über Grb2 die Aktivierung von Ras durch Tyrosin-phosphorylierte Rezeptoren erfolgt. Dabei bindet Grb2 über die SH2-Domäne an spezifische Phosphotyrosinreste aktivierter Rezeptoren und mit einer SH3-Domäne an Sos, einem Guaninnukleotidaustauschfaktor für das kleine G-Protein Ras, wodurch dieses aktiviert und somit die MAPK-Kaskade initiiert wird (Tari and Lopez-Berestein, 2001).

Eine der wenigen Phosphatasen für die eine Interaktion mit Grb2 gezeigt wurde, ist PTP-PEST. Diese Phosphatase, die wie BDP1 zur sogenannten PEST-Phosphatasefamilie gehört, besitzt fünf Prolin-reiche Sequenzen, von denen vier spezifische Bindungsstellen für die beiden SH3-Domänen von Grb2 darstellen. Durch die Bindung von PTP-PEST an Grb2 kann die Phosphatase zum aktivierten EGFR rekrutiert werden, wobei die Bedeutung dieses Vorganges noch nicht aufgeklärt ist (Charest et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogene BDP1 im HEK 293-System ebenfalls an Grb2 binden kann (s. 3.3.1). Diese Interaktion kommt jedoch wahrscheinlich über die SH2-Domäne von Grb2 und einem phosphorylierten Tyrosinrest von BDP1 zustande, da sie nur nach Stimulation der Zellen mit dem unspezifischen Phosphataseinhibitor Pervanadat, d.h. bei maximaler Phosphorylierung von BDP1 nachgewiesen werden konnte. Ganz ähnliche Unterschiede in der Art der Bindungsmechanismen wurde bei der Interaktion der PEST-Familienphosphatasen mit der Kinase Csk (c-src Kinase) gezeigt. Während PEP (Cloutier and Veillette, 1996) und PTP-PEST (Davidson et al., 1997) über eine Prolin-reiche Sequenz an die SH3-Domäne von Csk binden, wird die Bindung von BDP1 und Csk über die SH2-Domäne der Kinase und zwei phosphorylierte Tyrosine in der nicht-katalytischen Domäne der Phosphatase vermittelt (Wang et al., 2001). Trotz dieser unterschiedlichen Bindungsarten scheinen sowohl BDP1 als auch PEP in Kooperation mit Csk die Aktivität von src-Kinasen inhibitorisch zu regulieren (Gjorloff-Wingren et al., 1999; Wang et al., 2001).

Überraschenderweise führte die Koexpression von Grb2 mit BDP1 zu einer Hyperphosphorylierung der Phosphatase. Dieser Effekt war abhängig von der N-terminalen SH3-Domäne des Adaptormoleküls, da die Deletion dieser Domäne die Aufhebung des

Effekts bewirkte (s.3.3.3). Für die Entstehung der Hyperphosphorylierung von BDP1 sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Zum einen scheint BDP1 eine Autodephosphorylierungsaktivität zu besitzen, was aus der Phosphorylierung der katalytische inaktiven C/S-Mutante geschlossen werden kann (s. 3.1.1). Die Bindung von Grb2 an die bereits phosphorylierte Phosphatase könnte zur sterischen Hinderung des Autodephosphorylierungsmechanismus führen und BDP1 so vor der Dephosphorylierung schützen. Das gleiche Szenario wäre denkbar, falls BDP1 der Regulation durch eine weitere Phosphatase unterlegen ist, wofür es jedoch bis heute weder aus dieser noch aus anderen Arbeiten Hinweise gibt. Außerdem wäre durch diese Mechanismen die Rolle der SH3-Domäne von Grb2 nicht zu erklären.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass Grb2 mittels seiner SH3-Domäne an eine Kinase bindet, die durch diese Interaktion in die unmittelbare räumliche Nähe der gleichfalls an Grb2 gebundenen Phosphatase gebracht wird und diese dann phosphorylieren könnte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Hyperphosphorylierung durch den unspezifischen Kinaseinhibitor Genistein nahezu vollständig, durch den Abl-Inhibitor Imatinib zumindest teilweise unterdrückt wird (s. 3.3.4). Auch die Beobachtung, dass die Phosphorylierung von BDP1 durch c-Abl durch die Koexpression von Grb2 im HEK 293-Überexpressionssystem noch verstärkt werden kann, und c-Abl nur bei gleichzeitiger Expression von Grb2 mit BDP1 kopräzipitiert (s. 3.3.5), spricht für eine Funktion von Grb2 als Brückenglied für eine Interaktion zwischen BDP1 und c-Abl. In bereits veröffentlichten Arbeiten wurden unabhängig voneinander Bindungen von c-Abl an Grb2 bzw. BDP1 gezeigt. So beschreibt eine Veröffentlichung, dass die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin die Assoziation von Grb2 mit c-Abl bewirkt (Renshaw et al., 2000). In diesem Zusammenhang interessanter sind jedoch die Ergebnisse, die Cong und Kollegen berichten (Cong et al., 2000). Die Studie beschreibt die Interaktion von BDP1 mit c-Abl, die durch die Bindung von BDP1 an das Adaptormolekül PSTPIP1 vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass BDP1 nur in Gegenwart von PSTPIP1 mit c-Abl assoziiert und von c-Abl phosphoryliert wird. Bezüglich der physiologischen Relevanz dieser Interaktion diskutieren Cong und Kollegen eine Rolle bei der Modifikation des Zytoskeletts, da sowohl für c-Abl (McWhirter and Wang, 1993; Van Etten et al., 1994) als auch für PSTPIP1 (Spencer et al., 1997; Wu et al., 1998) zuvor bereits eine Bedeutung bei der zytoskeletalen Organisation berichtet wurde.

Die physiologische Relevanz der hier beschriebenen Interaktion zwischen BDP1, Grb2 und c-Abl bleibt noch zu klären und bietet Raum für weitere Untersuchungen. Da Grb2 ein Adaptormolekül in Signalwegen diverser Rezeptortyrosinkinasen ist, wäre z.B. eine Rekrutierung des BDP1/Grb2/c-Abl-Komplexes zu aktivierten Rezeptoren und eine Rolle bei der Signalweiterleitung denkbar. Ebenso wäre vorstellbar, dass diese Interaktion bei der

zytoskeletalen Reorganisation von ähnlicher Bedeutung ist, wie sie bereits für den PSTPIP1-enthaltenden Komplex diskutiert wurde.

5 Zusammenfassung

Die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiges Schlüsselement bei der Regulation zellulärer Signalwege und wird durch antagonistisch wirkende Proteintyrosinkinasen und Proteintyrosinphosphatasen in einem dynamischen Gleichgewicht gehalten. Trotz der Erkenntnis, dass Phosphatasen an der Regulation essentieller zellulärer Vorgänge beteiligt sind, ist über die Funktion und Regulation individueller Phosphatasen nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische Rolle der Proteintyrosinphosphatase BDP1 untersucht werden. Einen Schwerpunkt bildete hierbei die Negativregulation der Rezeptortyrosinkinase HER2 sowie der HER2-vermittelten Signaltransduktion durch BDP1. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von BDP1 die Liganden-induzierte Tyrosinphosphorylierung von HER2 und des Adaptorproteins Gab1 inhibierte und die Aktivierung von MAP-Kinasen reduzierte. Dagegen erhöhte die Unterdrückung der endogenen BDP1-Expression den Phosphorylierungsstatus von HER2. Die Koexpression von BDP1 und HER2 in Brustkrebszelllinien sowie die Assoziation von HER2 mit einer Substratbindenden Mutante von BDP1 deuten zusätzlich darauf hin, dass BDP1 ein Regulator der Aktivität von HER2 ist und damit die erste Phosphatase, die mit der Kontrolle des HER-Signals in Verbindung gebracht wird.

Weiterhin wurde die BDP1-Expression während der schwangerschaftsinduzierten Differenzierung der murinen Brustdrüse analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass BDP1 in duktalem und alveolarem Brustepithelzellen exprimiert wird. Die Expression der Phosphatase konnte während der Differenzierung der Brustepithelzelllinie HC11 durch Prolaktin und Dexamethason induziert werden. Zusammen mit der Existenz von Stat5- und Glukokortikoidrezeptor-Bindestellen in der Promotorregion von *bdp1* sowie der verminderten Expression der Phosphatase im Brustgewebe Stat5-defizienter Mäuse weist dies auf eine Expressionskontrolle des BDP1-Gens durch Schwangerschaftshormone hin und suggeriert eine Rolle der Phosphatase im Differenzierungsprozess der Brustdrüse.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Bindung von BDP1 an das Adaptorprotein Grb2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zur Hyperphosphorylierung der Phosphatase führte. Dies konnte zumindest teilweise auf eine Grb2-vermittelte Wechselwirkung von BDP1 mit der Tyrosinkinase c-Abl zurückgeführt werden.

Zusammengenommen liefern die vorgestellten Ergebnisse neue Daten zur Funktion, Expression und Regulation von BDP1 und tragen entscheidend zur Charakterisierung der biologischen Funktion dieser Phosphatase bei.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K. and Moller, N.P. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 7117-7136.
- Angers-Loustau, A., Cote, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A. and Tremblay, M.L. (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol*, **144**, 1019-1031.
- Aoki, N., Kawamura, M., Yamaguchi-Aoki, Y., Ohira, S. and Matsuda, T. (1999) Down-regulation of protein tyrosine phosphatase gene expression in lactating mouse mammary gland. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 669-675.
- Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y. and Ullrich, A. (1996) The novel protein-tyrosine phosphatase PTP20 is a positive regulator of PC12 cell neuronal differentiation. *J Biol Chem*, **271**, 29422-29426.
- Azios, N.G., Romero, F.J., Denton, M.C., Doherty, J.K. and Clinton, G.M. (2001) Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene*, **20**, 5199-5209.
- Barford, D., Flint, A.J. and Tonks, N.K. (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, **263**, 1397-1404.
- Baribault, H., Wilson-Heiner, M., Muller, W., Penner, J. and Bakhiet, N. (1997) Functional analysis of mouse keratin 8 in polyoma middle T-induced mammary gland tumours. *Transgenic Res*, **6**, 359-367.
- Barnea, G., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A.M., Canoll, P.D., D'Eustachio, P., Morse, B., Levy, J.B., Laforgia, S., Huebner, K. and et al. (1993) Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol*, **13**, 1497-1506.
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J.T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D.L., Marks, P. and et al. (1990) Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, **50**, 4087-4091.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-365.
- Boulton, T.G., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., Stahl, N. and Yancopoulos, G.D. (1995) STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a

- secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6915-6919.
- Bradshaw, J.M. and Waksman, G. (2002) Molecular recognition by SH2 domains. *Adv Protein Chem*, **61**, 161-210.
- Burden, S. and Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, **18**, 847-855.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R. and Watson, C.J. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, **13**, 2604-2616.
- Charest, A., Wagner, J., Jacob, S., McGlade, C.J. and Tremblay, M.L. (1996) Phosphotyrosine-independent binding of SHC to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. Evidence for extended phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain recognition specificity. *J Biol Chem*, **271**, 8424-8429.
- Charest, A., Wagner, J., Kwan, M. and Tremblay, M.L. (1997) Coupling of the murine protein tyrosine phosphatase PEST to the epidermal growth factor (EGF) receptor through a Src homology 3 (SH3) domain-mediated association with Grb2. *Oncogene*, **14**, 1643-1651.
- Charest, A., Wagner, J., Shen, S.H. and Tremblay, M.L. (1995) Murine protein tyrosine phosphatase-PEST, a stable cytosolic protein tyrosine phosphatase. *Biochem J*, **308** (Pt 2), 425-432.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. and Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sepharose as substrate. *J Immunol Methods*, **18**, 183-192.
- Cheng, J., Daimaru, L., Fennie, C. and Lasky, L.A. (1996) A novel protein tyrosine phosphatase expressed in lin(lo)CD34(hi)Sca(hi) hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **88**, 1156-1167.
- Chernoff, J., Schievella, A.R., Jost, C.A., Erikson, R.L. and Neel, B.G. (1990) Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2735-2739.

- Chughtai, N., Schimchowitsch, S., Lebrun, J.J. and Ali, S. (2002) Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells. *J Biol Chem*, **277**, 31107-31114.
- Cloutier, J.F. and Veillette, A. (1996) Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J*, **15**, 4909-4918.
- Cobb, M.H., Boulton, T.G. and Robbins, D.J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul*, **2**, 965-978.
- Cohen, P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci*, **17**, 408-413.
- Collett, M.S. and Erikson, R.L. (1978) Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 2021-2024.
- Conboy, J., Kan, Y.W., Shohet, S.B. and Mohandas, N. (1986) Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9512-9516.
- Cong, F., Spencer, S., Cote, J.F., Wu, Y., Tremblay, M.L., Lasky, L.A. and Goff, S.P. (2000) Cytoskeletal protein PSTPIP1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation. *Mol Cell*, **6**, 1413-1423.
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1990) Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7280-7284.
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1989) cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5257-5261.
- Cote, J.F., Turner, C.E. and Tremblay, M.L. (1999) Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem*, **274**, 20550-20560.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. and et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.
- Cunningham, B.A. (1995) Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 628-633.

- Daly, R.J. (1999) Take your partners, please--signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth Factors*, **16**, 255-263.
- Dankort, D., Jeyabalan, N., Jones, N., Dumont, D.J. and Muller, W.J. (2001) Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins. *J Biol Chem*, **276**, 38921-38928.
- Davidson, D., Cloutier, J.F., Gregorieff, A. and Veillette, A. (1997) Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Biol Chem*, **272**, 23455-23462.
- de Melker, A.A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H. and Borst, J. (2001) c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci*, **114**, 2167-2178.
- Denu, J.M. and Dixon, J.E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 633-641.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.
- DiAugustine, R.P., Richards, R.G. and Sebastian, J. (1997) EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2**, 109-117.
- Doherty, J.K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J.P. and Clinton, G.M. (1999) The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10869-10874.
- Doppler, W., Geymayer, S. and Weirich, H.G. (2000) Synergistic and antagonistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. Mechanisms of cross-talk between signalling pathways. *Adv Exp Med Biol*, **480**, 139-146.
- Doppler, W., Groner, B. and Ball, R.K. (1989) Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 104-108.
- Dosil, M., Leibman, N. and Lemischka, I.R. (1996) Cloning and characterization of fetal liver phosphatase 1, a nuclear protein tyrosine phosphatase isolated from hematopoietic stem cells. *Blood*, **88**, 4510-4525.

- El-Deiry, W.S. (2003) *Tumor Suppressor Genes*. Humana Press.
- Fang, K.S., Barker, K., Sudol, M. and Hanafusa, H. (1994) A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J Biol Chem*, **269**, 14056-14063.
- Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J. and Lemmon, M.A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*, **11**, 507-517.
- Fiorini, M., Alimandi, M., Fiorentino, L., Sala, G. and Segatto, O. (2001) Negative regulation of receptor tyrosine kinase signals. *FEBS Lett*, **490**, 132-141.
- Flint, A.J., Tiganis, T., Barford, D. and Tonks, N.K. (1997) Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1680-1685.
- Flores, E., Roy, G., Patel, D., Shaw, A. and Thomas, M.L. (1994) Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, **14**, 4938-4946.
- Freeman, R.M., Jr., Plutzky, J. and Neel, B.G. (1992) Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11239-11243.
- Gallo-Hendrikx, E., Murray, S.A., Vonderhaar, B.K. and Xiao, Z.X. (2001) Vanadate disrupts mammary gland development in whole organ culture. *Dev Dyn*, **222**, 354-367.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Ward, C.W. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, **110**, 763-773.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 211-218.
- Garton, A.J. and Tonks, N.K. (1999) Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *J Biol Chem*, **274**, 3811-3818.
- Gaunitz, F., Heise, K., Schumann, R. and Gebhardt, R. (2002) Glucocorticoid induced expression of glutamine synthetase in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 1026-1032.
- Gebbink, M.F., van Etten, I., Hateboer, G., Suijkerbuijk, R., Beijersbergen, R.L., Geurts van Kessel, A. and Moolenaar, W.H. (1991) Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett*, **290**, 123-130.

- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1-15.
- Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M., Williams, S., Hammi, D. and Mustelin, T. (1999) Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. *Eur J Immunol*, **29**, 3845-3854.
- Grandis, J.R., Melhem, M.F., Barnes, E.L. and Tweardy, D.J. (1996) Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, **78**, 1284-1292.
- Grant, S.L., Douglas, A.M., Goss, G.A. and Begley, C.G. (2001) Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors*, **19**, 153-162.
- Graves, J.D., Campbell, J.S. and Krebs, E.G. (1995) Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann N Y Acad Sci*, **766**, 320-343.
- Gu, M.X., York, J.D., Warshawsky, I. and Majerus, P.W. (1991) Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5867-5871.
- Guan, K.L. and Dixon, J.E. (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem*, **266**, 17026-17030.
- Gullick, W.J. (1994) A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. *Eur J Cancer*, **30A**, 2186.
- Guy, G.R., Yusoff, P., Bangarusamy, D., Fong, C.W. and Wong, E.S. (2002) Dockers at the crossroads. *Cell Signal*, **14**, 11-20.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. and Carraway, K.L., 3rd. (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8132-8136.
- Hackel, P.O., Gishizky, M. and Ullrich, A. (2001) Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem*, **382**, 1649-1662.
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 184-189.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Happ, B. and Groner, B. (1993) The activated mammary gland specific nuclear factor (MGF) enhances in vitro transcription of the beta-casein gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **47**, 21-30.
- Hariharan, I.K., Chuang, P.T. and Rubin, G.M. (1991) Cloning and characterization of a receptor-class phosphotyrosine phosphatase gene expressed on central nervous system axons in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11266-11270.
- Hashimoto, N., Zhang, W.R. and Goldstein, B.J. (1992) Insulin receptor and epidermal growth factor receptor dephosphorylation by three major rat liver protein-tyrosine phosphatases expressed in a recombinant bacterial system. *Biochem J*, **284** (Pt 2), 569-576.
- Hennighausen, L. and Robinson, G.W. (2001) Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell*, **1**, 467-475.
- Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N.E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, **284**, 99-110.
- Huang, K., Sommers, C.L., Grinberg, A., Kozak, C.A. and Love, P.E. (1996) Cloning and characterization of PTP-K1, a novel nonreceptor protein tyrosine phosphatase highly expressed in bone marrow. *Oncogene*, **13**, 1567-1573.
- Hubbard, S.R., Mohammadi, M. and Schlessinger, J. (1998) Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **273**, 11987-11990.
- Humphreys, R.C., Bierie, B., Zhao, L., Raz, R., Levy, D. and Hennighausen, L. (2002) Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology*, **143**, 3641-3650.
- Humphreys, R.C. and Hennighausen, L. (2000) Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene*, **19**, 1085-1091.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hynes, N.E. and Stern, D.F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 165-184.

- Jallal, B., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992) Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu-overexpressing human tumor cells. *J Biol Chem*, **267**, 4357-4363.
- Jiang, Y.P., Wang, H., D'Eustachio, P., Musacchio, J.M., Schlessinger, J. and Sap, J. (1993) Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region. *Mol Cell Biol*, **13**, 2942-2951.
- Jones, F.E. and Stern, D.F. (1999) Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene*, **18**, 3481-3490.
- Jones, F.E., Welte, T., Fu, X.Y. and Stern, D.F. (1999) ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol*, **147**, 77-88.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W. and Burgess, A.W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, **284**, 31-53.
- Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1990) Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7000-7004.
- Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K. and Bohmer, F.D. (1998) Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem*, **273**, 24839-24846.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. and Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.
- Kim, Y.W., Wang, H., Sures, I., Lammers, R., Martell, K.J. and Ullrich, A. (1996) Characterization of the PEST family protein tyrosine phosphatase BDP1. *Oncogene*, **13**, 2275-2279.
- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M. and Yarden, Y. (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4995-5000.

- Kolibaba, K.S. and Druker, B.J. (1997) Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F217-248.
- Kolmodin, K. and Aqvist, J. (2001) The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett*, **498**, 208-213.
- Kovalenko, M., Denner, K., Sandstrom, J., Persson, C., Gross, S., Jandt, E., Vilella, R., Bohmer, F. and Ostman, A. (2000) Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem*, **275**, 16219-16226.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. and 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**, 9193-9197.
- Krueger, N.X., Streuli, M. and Saito, H. (1990) Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J*, **9**, 3241-3252.
- Kulas, D.T., Goldstein, B.J. and Mooney, R.A. (1996) The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **271**, 748-754.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D.E., Tonks, N.K., Schlessinger, J., Fischer, E.H. and Ullrich, A. (1993) Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem*, **268**, 22456-22462.
- Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D. and Schlessinger, J. (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J*, **8**, 421-427.
- Lazar, H., Baltzer, A., Gimmi, C., Marti, A. and Jaggi, R. (2000) Over-expression of erbB-2/neu is paralleled by inhibition of mouse-mammary-epithelial-cell differentiation and developmental apoptosis. *Int J Cancer*, **85**, 578-583.
- Lee, J., Dull, T.J., Lax, I., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1989) HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *EMBO J*, **8**, 167-173.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B. and Yarden, Y. (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*, **12**, 3663-3674.

- Li, M., Lewis, B., Capuco, A.V., Laucirica, R. and Furth, P.A. (2000) WAP-TAg transgenic mice and the study of dysregulated cell survival, proliferation, and mutation during breast carcinogenesis. *Oncogene*, **19**, 1010-1019.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L. and Furth, P.A. (1997) Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3425-3430.
- Liu, F. and Chernoff, J. (1997) Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J*, **327** (Pt 1), 139-145.
- Liu, J., Hadjokas, N., Mosley, B., Estrov, Z., Spence, M.J. and Vestal, R.E. (1998) Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine*, **10**, 295-302.
- Liu, X., Robinson, G.W. and Hennighausen, L. (1996) Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol*, **10**, 1496-1506.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A. and Hennighausen, L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*, **11**, 179-186.
- Lombroso, P.J., Murdoch, G. and Lerner, M. (1991) Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7242-7246.
- Luna, E.J. and Hitt, A.L. (1992) Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science*, **258**, 955-964.
- Maekawa, K., Imagawa, N., Nagamatsu, M. and Harada, S. (1994) Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase containing a membrane-binding domain and GLGF repeats. *FEBS Lett*, **337**, 200-206.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K., Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C. and et al. (1994) Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers. *J Biol Chem*, **269**, 2075-2081.

- Matthews, R.J., Cahir, E.D. and Thomas, M.L. (1990) Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4444-4448.
- McCann, A.H., Dervan, P.A., O'Regan, M., Codd, M.B., Gullick, W.J., Tobin, B.M. and Carney, D.N. (1991) Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, **51**, 3296-3303.
- McWhirter, J.R. and Wang, J.Y. (1993) An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J*, **12**, 1533-1546.
- Milarski, K.L., Zhu, G., Pearl, C.G., McNamara, D.J., Dobrusin, E.M., MacLean, D., Thieme-Sefler, A., Zhang, Z.Y., Sawyer, T., Decker, S.J. and et al. (1993) Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, **268**, 23634-23639.
- Miyoshi, K., Shillingford, J.M., Smith, G.H., Grimm, S.L., Wagner, K.U., Oka, T., Rosen, J.M., Robinson, G.W. and Hennighausen, L. (2001) Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol*, **155**, 531-542.
- Mizuno, K., Hasegawa, K., Katagiri, T., Ogimoto, M., Ichikawa, T. and Yakura, H. (1993) MPTP delta, a putative murine homolog of HPTP delta, is expressed in specialized regions of the brain and in the B-cell lineage. *Mol Cell Biol*, **13**, 5513-5523.
- Moller, N.P., Moller, K.B., Lammers, R., Kharitonov, A., Sures, I. and Ullrich, A. (1994) Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7477-7481.
- Mosinger, B., Jr., Tillmann, U., Westphal, H. and Tremblay, M.L. (1992) Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 499-503.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R. and Leder, P. (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, **54**, 105-115.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M. and Brugge, J.S. (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*, **19**, 6845-6857.

- Ogata, M., Sawada, M., Kosugi, A. and Hamaoka, T. (1994) Developmentally regulated expression of a murine receptor-type protein tyrosine phosphatase in the thymus. *J Immunol*, **153**, 4478-4487.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, **110**, 775-787.
- Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B. and Hynes, N.E. (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol*, **18**, 5042-5051.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. and Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, **19**, 3159-3167.
- Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N. and Kelly, P.A. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, **11**, 167-178.
- Ostman, A. and Bohmer, F.D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol*, **11**, 258-266.
- Ostman, A., Yang, Q. and Tonks, N.K. (1994) Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9680-9684.
- Palka, H.L., Park, M. and Tonks, N.K. (2003) Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem*, **278**, 5728-5735.
- Parsons, J.T. and Parsons, S.J. (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 187-192.
- Perkins, L.A., Larsen, I. and Perrimon, N. (1992) corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell*, **70**, 225-236.
- Persson, C., Engstrom, U., Mowbray, S.L. and Ostman, A. (2002) Primary sequence determinants responsible for site-selective dephosphorylation of the PDGF beta-receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *FEBS Lett*, **517**, 27-31.

- Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M. and Buckley, S. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, **366**, 473-475.
- Pot, D.A., Woodford, T.A., Remboutsika, E., Haun, R.S. and Dixon, J.E. (1991) Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, **266**, 19688-19696.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, **8**, 11-31.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4878-4884.
- Ravichandran, K.S. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, **20**, 6322-6330.
- Rebsamen, M.C., Arrighi, J.F., Juge-Aubry, C.E., Vallotton, M.B. and Lang, U. (2000) Epidermal growth factor induces hypertrophic responses and Stat5 activation in rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 599-610.
- Reichardt, H.M., Horsch, K., Grone, H.J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N. and Schutz, G. (2001) Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol*, **145**, 519-527.
- Renshaw, M.W., Lewis, J.M. and Schwartz, M.A. (2000) The c-Abl tyrosine kinase contributes to the transient activation of MAP kinase in cells plated on fibronectin. *Oncogene*, **19**, 3216-3219.
- Resh, M.D. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, **76**, 411-413.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M. and Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **19**, 5548-5557.
- Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H. and Schlessinger, J. (2000) A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*, **20**, 1448-1459.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.

- Rosen, J.M., Wyszomierski, S.L. and Hadsell, D. (1999) Regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Nutr*, **19**, 407-436.
- Ruivenkamp, C., Hermsen, M., Postma, C., Klous, A., Baak, J., Meijer, G. and Demant, P. (2003) LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12-21. *Oncogene*, **22**, 3472-3474.
- Ruivenkamp, C.A., van Wezel, T., Zanon, C., Stassen, A.P., Vlcek, C., Csikos, T., Klous, A.M., Tripodis, N., Perrakis, A., Boerrigter, L., Groot, P.C., Lindeman, J., Mooi, W.J., Meijer, G.A., Scholten, G., Dauwerse, H., Paces, V., van Zandwijk, N., van Ommen, G.J. and Demant, P. (2002) PtpRJ is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Sccl and is frequently deleted in human cancers. *Nat Genet*, **31**, 295-300.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **19**, 183-232.
- Sap, J., D'Eustachio, P., Givol, D. and Schlessinger, J. (1990) Cloning and expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6112-6116.
- Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S. (1992) A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci*, **103 (Pt 1)**, 131-143.
- Schaapveld, R.Q., Schepens, J.T., Robinson, G.W., Attema, J., Oerlemans, F.T., Fransen, J.A., Streuli, M., Wieringa, B., Hennighausen, L. and Hendriks, W.J. (1997) Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Dev Biol*, **188**, 134-146.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B. and Parsons, J.T. (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5192-5196.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-225.
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, **110**, 669-672.
- Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, **9**, 383-391.
- Schroeder, J.A. and Lee, D.C. (1998) Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ*, **9**, 451-464.

- Sebastian, J., Richards, R.G., Walker, M.P., Wiesen, J.F., Werb, Z., Derynck, R., Hom, Y.K., Cunha, G.R. and DiAugustine, R.P. (1998) Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth Differ*, **9**, 777-785.
- Segatto, O., Pelicci, G., Giuli, S., Digiesi, G., Di Fiore, P.P., McGlade, J., Pawson, T. and Pelicci, P.G. (1993) Shc products are substrates of erbB-2 kinase. *Oncogene*, **8**, 2105-2112.
- Settle, M., Gordon, M.D., Nadella, M., Dankort, D., Muller, W. and Jacobs, J.R. (2003) Genetic identification of effectors downstream of Neu (ErbB-2) autophosphorylation sites in a Drosophila model. *Oncogene*, **22**, 1916-1926.
- Shackleford, G.M., MacArthur, C.A., Kwan, H.C. and Varmus, H.E. (1993) Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in Wnt-1 transgenic mice by insertional activation of int-2/Fgf-3 and hst/Fgf-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 740-744.
- Shaw, G. (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays*, **18**, 35-46.
- Shawver, L.K., Slamon, D. and Ullrich, A. (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, **1**, 117-123.
- Shen, S.H., Bastien, L., Posner, B.I. and Chretien, P. (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature*, **352**, 736-739.
- Shen, Y., Lyons, P., Cooley, M., Davidson, D., Veillette, A., Salgia, R., Griffin, J.D. and Schaller, M.D. (2000) The noncatalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **275**, 1405-1413.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- Sliker, L.J., Martensen, T.M. and Lane, M.D. (1986) Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **261**, 15233-15241.
- Sliwowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M. and Fox, J.A. (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol*, **26**, 60-70.

- Soos, M.A., Field, C.E., Lammers, R., Ullrich, A., Zhang, B., Roth, R.A., Andersen, A.S., Kjeldsen, T. and Siddle, K. (1992) A panel of monoclonal antibodies for the type I insulin-like growth factor receptor. Epitope mapping, effects on ligand binding, and biological activity. *J Biol Chem*, **267**, 12955-12963.
- Sorby, M. and Ostman, A. (1996) Protein-tyrosine phosphatase-mediated decrease of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation in high cell density cultures. *J Biol Chem*, **271**, 10963-10966.
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. and Lasky, L.A. (1997) PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol*, **138**, 845-860.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. and Groner, B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, **383**, 726-728.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Hall, L.R., Schlossman, S.F. and Saito, H. (1988) A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen. *J Exp Med*, **168**, 1523-1530.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Tsai, A.Y. and Saito, H. (1989) A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8698-8702.
- Stuckey, J.A., Schubert, H.L., Fauman, E.B., Zhang, Z.Y., Dixon, J.E. and Saper, M.A. (1994) Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature*, **370**, 571-575.
- Su, B. and Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol*, **8**, 402-411.
- Suarez Pestana, E., Tenev, T., Gross, S., Stoyanov, B., Ogata, M. and Bohmer, F.D. (1999) The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Oncogene*, **18**, 4069-4079.
- Sun, H. and Tonks, N.K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, **19**, 480-485.
- Swarup, G., Kamatkar, S., Radha, V. and Rema, V. (1991) Molecular cloning and expression of a protein-tyrosine phosphatase showing homology with transcription factors Fos and Jun. *FEBS Lett*, **280**, 65-69.
- Sweeney, C., Lai, C., Riese, D.J., 2nd, Diamonti, A.J., Cantley, L.C. and Carraway, K.L., 3rd. (2000) Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer. *J Biol Chem*, **275**, 19803-19807.

- Tari, A.M. and Lopez-Berestein, G. (2001) GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol*, **28**, 142-147.
- Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A.V., Ullrich, A. and Bohmer, F.D. (1997a) Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J Biol Chem*, **272**, 5966-5973.
- Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A.V., Ullrich, A. and Bohmer, F.D. (1997b) Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J Biol Chem*, **272**, 5966-5973.
- Tiganis, T., Bennett, A.M., Ravichandran, K.S. and Tonks, N.K. (1998a) Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, **18**, 1622-1634.
- Tiganis, T., Bennett, A.M., Ravichandran, K.S. and Tonks, N.K. (1998b) Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, **18**, 1622-1634.
- Tiganis, T., Kemp, B.E. and Tonks, N.K. (1999) The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, **274**, 27768-27775.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988a) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, **263**, 6731-6737.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988b) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, **263**, 6722-6730.
- Tonks, N.K. and Neel, B.G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 182-195.
- Travers, M.T., Barber, M.C., Tonner, E., Quarrie, L., Wilde, C.J. and Flint, D.J. (1996) The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology*, **137**, 1530-1539.
- Traxler, P., Bold, G., Buchdunger, E., Caravatti, G., Furet, P., Manley, P., O'Reilly, T., Wood, J. and Zimmermann, J. (2001) Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Med Res Rev*, **21**, 499-512.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 205-215.

- Trowbridge, I.S. and Thomas, M.L. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, **12**, 85-116.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. and et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Vambutas, V., Kaplan, D.R., Sells, M.A. and Chernoff, J. (1995) Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and activation of Src homology-containing protein-tyrosine phosphatase 1 in PC12 cells. *J Biol Chem*, **270**, 25629-25633.
- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- Van Etten, R.A., Jackson, P.K., Baltimore, D., Sanders, M.C., Matsudaira, P.T. and Janmey, P.A. (1994) The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol*, **124**, 325-340.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A.,

- Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. and Zhu, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Wakao, H., Gouilleux, F. and Groner, B. (1995) Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J*, **14**, 854-855.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. and Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J*, **14**, 4267-4275.
- Walton, K.M., Martell, K.J., Kwak, S.P., Dixon, J.E. and Largent, B.L. (1993) A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase is expressed during neurogenesis in the olfactory neuroepithelium. *Neuron*, **11**, 387-400.

- Wang, B., Lemay, S., Tsai, S. and Veillette, A. (2001) SH2 domain-mediated interaction of inhibitory protein tyrosine kinase Csk with protein tyrosine phosphatase-HSCF. *Mol Cell Biol*, **21**, 1077-1088.
- Wiley, H.S. and Burke, P.M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic*, **2**, 12-18.
- Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405.
- Woodford-Thomas, T.A., Rhodes, J.D. and Dixon, J.E. (1992) Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, **117**, 401-414.
- Wu, Y., Spencer, S.D. and Lasky, L.A. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J Biol Chem*, **273**, 5765-5770.
- Yaffe, M.B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 177-186.
- Yamasaki, S., Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Hibi, M. and Hirano, T. (2003) Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2. *Oncogene*, **22**, 1546-1556.
- Yan, H., Grossman, A., Wang, H., D'Eustachio, P., Mossie, K., Musacchio, J.M., Silvennoinen, O. and Schlessinger, J. (1993) A novel receptor tyrosine phosphatase-sigma that is highly expressed in the nervous system. *J Biol Chem*, **268**, 24880-24886.
- Yang, Q. and Tonks, N.K. (1991) Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5949-5953.
- Yang, X.H., Seow, K.T., Bahri, S.M., Oon, S.H. and Chia, W. (1991) Two Drosophila receptor-like tyrosine phosphatase genes are expressed in a subset of developing axons and pioneer neurons in the embryonic CNS. *Cell*, **67**, 661-673.
- Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K.M., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (1995) Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol*, **131**, 215-226.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 127-137.

- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988a) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 443-478.
- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988b) Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*, **27**, 3113-3119.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P. and Lim, W.A. (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE*, **2003**, RE8.
- Zhang, W.R., Hashimoto, N., Ahmad, F., Ding, W. and Goldstein, B.J. (1994a) Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphate family. *Biochem J*, **302** (Pt 1), 39-47.
- Zhang, Z.Y. (1998) Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **33**, 1-52.
- Zhang, Z.Y., Wang, Y. and Dixon, J.E. (1994b) Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1624-1627.

7 Abkürzungen

''	Sekunde
'	Minute
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDP1	brain derived phosphatase 1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C/S	Cystein zu Serin mutiert
c-Abl	zelluläre Form von v-Abl
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
c-jun	zelluläres Homolog von v-jun
CMV	Cytomegalo Virus
CTH	C-terminale Homologiedomäne
D/A	Glutamat zu Alanin mutiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EF-2A	Elongation factor 2A
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB	avian erythroblastosis virus oncogene B
FCS	Fötale Kälberserum

g	Gramm
Gab1	Grb2-associated binder 1
GAS	γ -interferon activated sequence
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GRE	glucocorticoid response element
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes, entionisiertes Wasser
HA	Hemagglutinin
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-
HER	Humaner EGFR
Ig	Immunoglobulin
IGF1	insulin-like growth factor 1
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MBP	Myelin basic protein
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase

min	Minute
MMTV	mouse mammary tumor virus
Mock	Kontrolltransfiziert
n	Nano
NDF	neu differentiation factor
Neo ^r	Neomycine resistance
OD	optische Dichte
p.a.	Per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Polyoma middle T antigen
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
pSR	pSuperRetro Vektor
PTB	Phosphotyrosin-bindend
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PY	Phosphotyrosin
RNAi	RNA interference
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.A.	Standardabweichung
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src homology
SHP-2	SH2-containing PTP-2
siRNA	short interfering RNA
Sos	Son of sevenless
c-Src	Homologue to v-src (sarcoma viral oncogene)

SV40- TAg	simian virus 40 large T antigen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	transforming growth factor alpha
TL	Totallysat
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Einheit für enzymatische Aktivität
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-Abl	Onkogen des Abelson leukaemia Virus
WB	Westernblot
wt	Wildtyp

Lebenslauf

Name: Miriam Gensler
Geburtsdatum: 27. Juli 1974
Geburtsort: Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Ferdinand-Maria-Str. 32, 80639 München

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschule Röhmschule Kaiserslautern
1984 – 1993 Gymnasium an der Burgstrasse Kaiserslautern
1993 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1993 – 2/1999 Studium der Lebensmittelchemie
Universität Kaiserslautern

5/1998 – 2/1999 Diplomarbeit zum Thema „*In-vitro* Untersuchungen estrogener Effekte mit Hilfe der zell- und molekularbiologischen Methoden RT-PCR, Reporterassay und Bandshiftassay“
Universität Kaiserslautern, Fachbereich Lebensmittelchemie & Umwelttoxikologie, Prof. Dr. G. Eisenbrand

4/1999 – 9/2003 Promotion zum Thema „Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Proteintyrosinphosphatase BDP1“
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung Molekularbiologie, Prof. Dr. A. Ullrich

Veröffentlichung

9/2003 Miriam Gensler, Marcus Buschbeck und Axel Ullrich
„Negative regulation of HER2 signaling by the PEST-type protein tyrosine phosphatase BDP1“
Journal of Biological Chemistry, *eingereicht*

Danksagung

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

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Aufnahme in seine Gruppe und die Vergabe des interessanten Themas sowie die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Betreuung durchzuführen. Besonders danke ich ihm für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, seine Unterstützung sowie die Freiheit, meine eigenen Gedanken und Ideen zu verfolgen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Technischen Universität Kaiserslautern zu betreuen. Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Vilsmaier, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, den Vorsitz meiner Promotionskommission zu übernehmen.

Mein herzlicher Dank gebührt Prof. Dr. Lothar Hennighausen für die fachliche Unterstützung sowohl in Form von Ratschlägen als auch durch die Bereitstellung von Geweben, Antikörpern und Konstrukten im Rahmen meines Maus-Projektes.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen, die mich während meiner Promotion fachlich unterstützt haben. Hierbei möchte ich an erster Stelle den Mitgliedern des Freitagseminars Lars Anders, Marcus Buschbeck, Marta Murgia, Andreas Roidl und Anja Ruschel für die konstruktive Kritik und Auseinandersetzung mit meinen Daten danken. Marcus Buschbeck danke ich außerdem für die Hilfe und Mitarbeit im HER2-Projekt sowie zusammen mit Anja Ruschel für die Korrektur dieses Manuskripts. Ich möchte auch nicht vergessen, mich bei meinen ehemaligen Kollegen Johannes Bange, Jens Ruhe und Norbert Prenzel zu bedanken, die mich besonders zu Beginn meiner Promotion unterstützten.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen aus Labor G27/28 Sylvia Streit, Renate Hornberger und Marcus Buschbeck für die freundschaftliche und lockere Atmosphäre sowie die stete Hilfsbereitschaft.

Natürlich möchte ich allen jetzigen und früheren Kollegen danken, mit denen ich auch nach der Arbeit schöne und vor allem lustige Stunden verbracht habe; es war mir ein Fest!

Mein größter Dank gilt schließlich meinen Eltern, die mir meine langjährige Ausbildung durch ihre immerwährende Unterstützung ermöglichten.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich in der Zeit von April 1999 bis September 2003 in der Abteilung für Molekularbiologie des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 27.10.03

Miriam Gensler