

**Untersuchungen zur Rolle der
Proteintyrosinphosphatase PTP α im
Mammakarzinomsystem**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Technischen Universität München**

vorgelegt von

**Martin S. Treder
aus Erlangen**

München, 2003

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Technischen Universität München,
Lehrstuhl für Genetik**

**Untersuchungen zur Rolle der
Proteintyrosinphosphatase PTP α im
Mammakarzinomsystem**

Martin S. Treder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

2. apl. Prof. Dr. Axel Ullrich, Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

Die Dissertation wurde am 04.02.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.04.2003 angenommen.

1.	Einleitung	1
1.1.	Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung	1
1.2.	Proteintyrosinkinassen	3
1.2.1.	Rezeptortyrosinkinassen	3
1.2.2.	Intrazelluläre Tyrosinkinassen	4
1.3.	Proteintyrosinphosphatasen	6
1.3.1.	Klassifizierung der PTPn	7
1.3.2.	Der Katalysemechanismus der PTPn	10
1.3.3.	Physiologische Funktion der PTPn	11
1.3.4.	Regulation der PTPn	13
1.3.5.	PTP α	16
1.3.6.	Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Bezugsquellennachweis	19
2.1.1.	Chemikalien	19
2.1.2.	Enzyme	20
2.1.3.	Radiochemikalien	20
2.1.4.	Liganden und Wachstumsfaktoren	21
2.1.5.	"Kits" und Sonstiges	21
2.2.	Medien und Puffer	21
2.2.1.	Medien für E.coli Bakterien	21
2.2.2.	Zellkulturmedien	22
2.2.3.	Stammlösungen und Puffer	22
2.3.	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	24

2.3.1. Bakterienstämme	24
2.3.2. Zelllinien	24
2.3.2.1. Elternzelllinien	24
2.3.2.2. Virusproduzierende Zelllinien	26
2.3.2.3. Stabile Zelllinien	26
2.3.3. Antikörper	28
2.4. Plasmidvektoren und Oligonukleotide	30
2.4.1. Ausgangsvektoren	30
2.4.2. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren	30
2.4.3. Zur Mutagenese verwendete Oligonukleotide	31
2.5. Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke	31
2.5.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke	31
2.5.3. Enzymatische Behandlung von DNA	31
2.5.3.1. Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	31
2.5.3.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden	31
2.5.3.3. Phosphorylierung von 5'-Enden	31
2.5.3.4. Auffüllen überhängiger 5'-Enden mit Klenow-Polymerase	31
2.5.3.5. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	32
2.5.4. Gelelektrophorese von DNA	32
2.5.4.1. Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel	32
2.5.5. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.5.6. DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien	32
2.5.6.1. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	32
2.5.6.2. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	33

2.5.7. Dauerkulturen von <i>E.coli</i> Bakterien	33
2.5.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA	33
2.5.9. DNA-Mutagenese	33
2.5.9.1. Herstellung von uracilhaltiger Einzelstrang M 13 DNA	33
2.5.9.2. Synthese des mutierten DNA-Stranges	34
2.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	34
2.6.1. PCR-Amplifikation von DNA	34
2.6.2. Aufreinigung von PCR-Produkten	35
2.6.3. Klonierung von PCR-Produkten	35
2.7. cDNA Arrays	35
2.8. Proteinanalytische Methoden	36
2.8.1. Lyse von Zellen mit Triton X-100	36
2.8.2. Proteinbestimmung	36
2.8.3. Immunpräzipitation von Proteinen	37
2.8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.8.5. Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	37
2.8.6. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	38
2.8.7. Immundetektion (Western-Blot Analyse)	38
2.8.8. <i>In vitro</i> Phosphataseaktivität gegenüber pNPP	38
2.8.9. c-src <i>in vitro</i> Kinaseassay	39
2.9. Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	39
2.9.1. Allgemeine Zellkulturtechniken	39
2.9.2. Mykoplasmentest	40
2.9.3. Transfektion von Säugerzellen	40
2.9.3.1. Transfektion von Säugerzellen mit Kalziumphosphat	40

2.9.3.2. <i>Transfektion von Säugerzellen mit der DOSPER Methode</i>	41
2.9.3.3. <i>Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine®</i>	41
2.9.3.4. <i>Bestimmung der Transfektionseffizienz</i>	42
2.9.4. <i>Retroviraler Gentransfer und Selektion in Säugerzellen</i>	42
2.9.5. <i>Immunfluoreszenz</i>	43
2.9.6. <i>Zellzählexperimente</i>	43
2.9.7. <i>Stimulation der DNA-Synthese [(³H)-Thymidin-Einbau]</i>	43
2.9.8. <i>FACS Analyse</i>	44
2.9.9. <i>Stimulation von Zellen</i>	44
3. Ergebnisse	45
3.1. cDNA-Array Analyse	45
3.1.1. <i>Brustkrebszelllinien</i>	47
3.1.2. <i>Primäres Brustgewebe</i>	48
3.2. cDNA-Array Validierung	52
3.2.1. <i>mRNA Expression</i>	52
3.2.2. <i>Protein Expression</i>	52
3.3. Funktionelle Untersuchungen zu PTPα	54
3.3.1. <i>Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems</i>	55
3.3.2. <i>Retrovirales Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem</i>	56
3.3.3. <i>Erzeugung Transaktivator-stabiler Brustzelllinien</i>	59
3.3.4. <i>Erzeugung induzierbar exprimierender PTPα-Brustzelllinien</i>	61
3.3.5. <i>Charakterisierung induzierbar exprimierender PTPα-Brustzelllinien</i>	62
3.4. Funktionsanalyse von PTPα in Mammakarzinomzelllinien	67
3.4.1. <i>Proliferationsassays</i>	67
3.4.2. <i>FACS-Analyse</i>	69

3.4.3. cDNA-Array-Analysen	70
3.4.3.1. Genregulation nach <i>tTA</i> -Induktion	71
3.4.3.2. Genregulation nach <i>PTPα</i> -Induktion	72
3.4.3.3. Gruppieren der Gene auf der Basis ihrer Expressionsdaten ("Cluster")	74
3.4.4. c-src Aktivität	77
3.4.5. Der Einfluß von <i>PTPα</i> auf den IGF-1 Signalweg	78
4. Diskussion	82
4.1. cDNA-Array Analyse	83
4.2. cDNA-Array Validierung	84
4.3. Funktionelle Untersuchungen zu <i>PTPα</i>	85
4.3.1. Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems	85
4.3.2. Retrovirales Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem	87
4.3.3. Erzeugung Transaktivator-stabiler Brustzelllinien	88
4.3.4. Erzeugung induzierbar exprimierender <i>PTPα</i> -Brustzelllinien	89
4.3.5. Charakterisierung induzierbar exprimierender <i>PTPα</i> -Brustzelllinien	90
4.4. Funktionsanalyse von <i>PTPα</i> in Mammakarzinomzelllinien	93
5. Zusammenfassung	99
6. Literatur	101

1. Einleitung

Die Basis für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus bildet ein sehr komplexes Kommunikationssystem, welches Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und Zelladhäsion koordiniert und kontrolliert. Die Kommunikation zwischen Zellen kann sowohl durch sekretierte, lösliche Komponenten, als auch durch direkten Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakt erfolgen. Sekretierte, lösliche Stoffe sind zum Beispiel Hormone, Zytokine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, welche durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche oben genannte Prozesse regulieren. Die Liganden-Rezeptor Bindung initiiert spezifische Signalkaskaden die zur Regulation der Genexpression und den daraus resultierenden biochemischen und physiologischen Vorgängen führen.

Die gezielte Phosphorylierung von Tyrosinresten spielt eine zentrale und wesentliche Rolle in verschiedenen Signalkaskaden. Dabei ist ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung durch Tyrosinkinase (TKn) und Dephosphorylierung durch Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) in der physiologisch normal funktionierenden Zelle von wesentlicher Bedeutung. Die kovalente Modifikation eines Proteins durch eine spezifische, Tyrosinkinase-vermittelte Phosphorylierung wird somit durch die enzymatische Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen zu einem kontrollierten, reversiblen Prozess. Störungen im Ablauf der Signalübertragung durch Änderung dieses Gleichgewichtes, wie beispielsweise durch UV-Strahlung oder Chemikalien, können drastische Veränderungen im feinen Regelwerk der Zelle bewirken und möglicherweise zu pathophysiologischen Veränderungen führen (wie z.B. Krebs) (Aaronson, 1991).

1.1. Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung

Signalübertragung durch Tyrosinphosphorylierung kann über zwei unterschiedliche Rezeptorgruppen erfolgen (van der Geer, 1994). Die erste Gruppe bilden Rezeptoren mit einer intrinsischen Tyrosinkinase Aktivität, welche durch Ligandenbindung auf der extrazellulären Seite aktiviert werden. Beispiele sind die Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (EGF-Rezeptor) oder den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-1 (IGF-1-Rezeptor). Die zweite Rezeptor-Gruppe besitzt keine intrinsische Tyrosinkinase Aktivität und muß daher mit bestimmten zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, den Janus

Kinasen, über ihre intrazelluläre Domäne assoziieren (Neel und Hunter, 1997). Beispiele sind Zytokinrezeptoren für Interferone oder Interleukine, welche die zytoplasmatischen Janus Kinasen rekrutieren.

Die Aktivierung von spezifischen Signalwegen wird durch die einzelnen RTKn bestimmt. Sie aktivieren oder rekrutieren eine bestimmte Gruppe von Proteinen und initiieren somit eine charakteristische Signalkaskade, die den externen Stimulus über diese zytoplasmatischen oder Zellkern-lokalisierten Zielproteine weitergibt. Die an aktivierte Rezeptoren bindenden Proteine lassen sich in solche mit und solche ohne enzymatische Aktivität einteilen. Die Bindung dieser Proteine erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste über SH2 (src homology 2)-Domänen (Pawson, 1995) oder PTB (phosphotyrosine-binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh et al., 1995). Eine Assoziation von Signalproteinen an ihre Rezeptoren kann jedoch auch unabhängig von diesen Domänen erfolgen (Castagnino et al., 1995). Adaptorproteine sind Signaltransduktionsmoleküle ohne enzymatische Aktivität und werden meistens durch mehrere Protein-Interaktionsdomänen ausgezeichnet. Oft binden sie spezifisch an einzelne RTKn oder RTKn Unterklassen, wie z.B. IRS1-4, welche mit den Insulin oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Rezeptoren assoziieren und spezifische Effektoren zu den aktivierten Rezeptoren und/oder an die Zellmembran bringen. Wichtige Effektormoleküle mit intrinsischer enzymatischer Aktivität sind zum Beispiel die Phosphatidylinositol-3' (PI-3') Kinase, Ras GAP, Phospholipase C γ (PLC γ) oder die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 (Vogel et al., 1993).

Es existieren verschiedene Mechanismen, die zur Spezifität unterschiedlicher RTK-Signalkaskaden und damit zur Diversität der zellulären Antwort führen: Spezifität wird auf der Ebene der Liganden-Rezeptor Interaktion ermöglicht, durch das Repertoire an Substraten und Signaltransduktionsmolekülen, die mit dem aktivierten Rezeptor assoziieren können, durch die Intensität und Dauer eines biochemischen Signals sowie durch das Vorhandensein von gewebespezifischen Signalmolekülen.

Proteintyrosinphosphatasen tragen mit ihrer enzymatischen Aktivität zu diesem komplexen, intrazellulären Netzwerk nicht nur als Antagonisten der Tyrosinkinase bei. Die bisher identifizierten Beispiele machen deutlich, daß PTPn auch als positive Regulatoren eine Rolle spielen. Obwohl sich die Zahl der bisher identifizierten Proteintyrosinphosphatasen ständig erweitert, konnte nur für wenige PTPn eine physiologische Funktion beschrieben werden.

1.2. Proteintyrosinkinasen

1.2.1. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK_n) sind Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und wesentlich an der Regulation der Zellteilung, Zelldifferenzierung und bei Stoffwechselfvorgängen beteiligt. RTK_n können auf Grund ihrer strukturellen Organisation in 19 Untergruppen aufgeteilt werden (siehe Abb. 1).

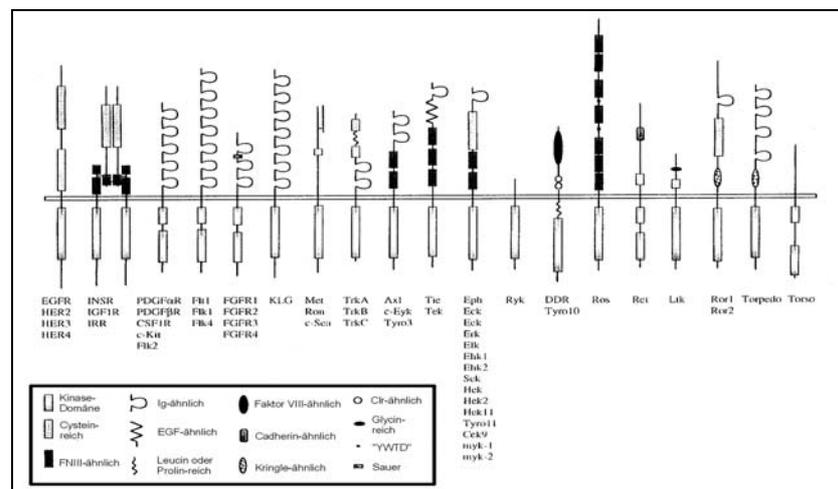


Abb. 1: Die unterschiedlichen RTK Familien. Die Abbildung zeigt die 19 Untergruppen, in welche RTK_n auf Grund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (SUGEN, 1996).

Alle RTK_n können in drei strukturelle Bereiche aufgeteilt werden: ein extrazelluläres Segment, eine kurze transmembranäre Domäne und ein intrazellulärer Bereich. Das extrazelluläre Segment ist verantwortlich für die Ligandenbindung und wird durch eine sehr große strukturelle Vielfalt charakterisiert. Der intrazelluläre Bereich verfügt bei allen RTK_n über die Tyrosinkinase Aktivität (van der Geer et al., 1994; Plowman et al., 1994).

Trotz der strukturellen Vielfalt der RTK_n erfolgt die Aktivierung der Rezeptoren nach einem gemeinsamen Grundprinzip. Liganden-induzierte Dimerisierung der RTK_n spielt eine kritische Rolle bei der Aktivierung der intrazellulären katalytischen Domäne (Yarden und Schlessinger, 1987). Die Bindung des Liganden hat eine Konformationsänderung zur Folge, welche zur Dimerisierung der Rezeptormonomere führt (Greenfield et al., 1989). Die beiden katalytischen Domänen der RTK Monomere sind dadurch in der Lage eine gegenseitige intramolekulare Transphosphorylierung an zytoplasmatischen Tyrosinresten durchzuführen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Lemmon und Schlessinger, 1994). Die Kinase Domäne

wird durch die Transphosphorylierung der essentiellen Tyrosinreste aktiviert, kann dann weitere Tyrosinreste phosphorylieren und ermöglicht schließlich die Assoziation und Tyrosinphosphorylierung der zellulären Substrate (Weiss und Schlessinger, 1998). Die Dimerisierung der RTKs ist nicht auf die Bildung von Homodimeren beschränkt. Es konnte eine Reihe von Heterodimeren innerhalb einer RTK-Unterklasse beobachtet werden. Die am besten charakterisierten Heterodimere sind die der EGFR-Familie zwischen dem EGF-Rezeptor, HER2, HER3 und HER4 (Wallasch et al., 1995). Gleichmaßen können verschiedene Liganden mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenen Rezeptoren innerhalb einer Unterklasse binden (Prigent und Lemoine, 1992).

1.2.2. Intrazelluläre Tyrosinkinasen

Die intrazellulären Tyrosinkinasen haben keine extrazellulären und auch keine transmembranären Bereiche. Sie können im Zytoplasma, an der inneren Seite der Membran oder im Zellkern lokalisiert sein. Die intrazellulären Kinasen können auf Grund ihrer strukturellen Homologie in eine Reihe von Untergruppen aufgeteilt werden. Sie unterscheiden sich in der Struktur und Funktion. Viele dieser Kinasen spielen eine Rolle im Zellwachstum und einige wurden als Onkogene identifiziert; Beispiele sind die Mitglieder der SRC-Familie *v-src*, *v-yes*, *v-fgr*, und *v-FPS/FES* oder *v-abl*.

Diese Kinasen sind in der Signaltransduktion an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Extrazelluläre Signale werden durch die Aktivierung von RTKs oder Transmembranrezeptoren ohne intrinsische Tyrosinekinaseaktivität ins Zellinnere geleitet. Die intrazellulären Tyrosinkinasen spielen hier eine wesentliche Rolle: sie können mit RTKs oder den inaktiven Rezeptoren assoziieren. Zum Beispiel sind intrazelluläre Tyrosinkinasen bei der Aktivierung von T- und B-Zellen über den T-Zell- und B-Zell-Rezeptorkomplex beteiligt (Weiss und Littman, 1994; Mustelin und Burn, 1993). Extrazelluläre Signale, die durch die Aktivierung intrazellulärer Kinasen vermittelt werden, sind jedoch nicht auf lösliche Faktoren beschränkt, sondern beinhalten auch Effekte der Zell-Zell Adhäsion und der Interaktion mit der extrazellulären Matrix. So besitzt die an fokalen Adhäsionspunkten lokalisierte Kinase FAK eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion von Zelladhäsionsmolekülen der Integrin-Familie (Schaller und Parsons, 1993; Juliano und Haskill, 1993).

Intrazelluläre Tyrosinkinasen der SRC-Familie enthalten neben der Kinasedomäne noch weitere Strukturelemente, wie die Src-Homologie (SH) Domänen 2 und 3, welche die

Wechselwirkung der Kinasen mit anderen Proteinen und/oder deren Lokalisation in der Zelle regulieren. Die SH2-Domänen ermöglichen die Assoziation mit tyrosinphosphorylierten Proteinen bedingt durch die spezifische Sequenz in der Nähe des Phosphotyrosins (Pawson und Schlessinger, 1993; van der Geer und Hunter, 1994; Pawson, 1995; Songyang et al., 1993). SH3 Domänen binden an Prolin-reiche Sequenzen und sind häufig in die Lokalisation von Proteinen an der Plasmamembran oder dem Zytoskelett der Zelle involviert (Cohen et al., 1995; Morton und Campbell, 1994; Mayer und Baltimore, 1993).

Neben den Kinase-, SH2-, und SH3 Domänen können andere Sequenzen der einzelnen Untergruppen von intrazellulären Tyrosinkinase für die zelluläre Lokalisation und/oder der Aktivität von Bedeutung sein. Myristoylierung ist eine irreversible Modifikation eines Glyzinrestes im N-terminalen Bereich von Src Kinasen die es ihnen erlaubt mit der Plasmamembran zu assoziieren (Resh, 1994). Palmitoylierung von Lck und Fyn verstärkt die Verankerung dieser Proteine mit der Membran, weil sie mit Proteinen interagieren können, die an der Plasmamembran durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker gebunden sind (Paige et al., 1993; Shenoy-Scaria et al., 1993). Palmitoylierung von Src wurde bisher noch nicht beschrieben; die basischen N-terminalen Reste tragen zu einer Stabilisierung von Src an der Membran bei (Resh, 1994).

Den N-terminalen Bereichen der Lipid Modifikation der Src Kinasen folgt eine sogenannte "Unique"-Domäne. Diese Domäne ist sehr stark konserviert, was bedeutet, daß dieser Bereich für spezielle Funktionen (wie Protein-Protein Interaktionen) der jeweiligen Kinase verantwortlich sein könnte (Courtneidge, 1994; Cooper, 1990). Der "Unique"-Domäne folgt die Kinase Domäne, die etwa 250 Aminosäuren lang ist und eine ATP-Bindungsstelle mit einem GXGXXGX(15-20)K Motiv beinhaltet. Der Lysin-Rest (K295 von c-src) ist absolut notwendig für die katalytische Aktivität der Kinase. Alle intrazellulären Tyrosinkinase (wie auch die RTKn) haben eine wichtige Autophosphorylierungsstelle in der Kinase Domäne (Y416 von c-src, Y394 von Lck), die für die katalytische Aktivität von Bedeutung ist: wenn sie zu Phenylalanin mutiert wird, kann die Aktivität *in vitro* und *in vivo* reduziert werden (Ferracini und Brugge, 1990; Hjermstad et al., 1993).

Der C-terminale Bereich der Src Kinasen ist sehr stark konserviert, unterscheidet sich aber deutlich von den viralen Vertretern. Ein bestimmter phosphorylierter Tyrosinrest dieses Bereiches, welcher bei den viralen Sequenzen fehlt, ist von großer Bedeutung (Y527 von c-src, Y535 von c-Yes, und Y511 von c-Fgr). Dieses Tyrosin wirkt negativ auf die Regulation der Kinasen indem es die Fixierung der Kinasen in einer inaktiven Konformation bewirkt. Dabei findet eine intramolekulare Bindung des Phosphotyrosinrests an die SH2 Domäne

desselben Moleküls statt, wobei die SH3 Domäne eine konformationsstabilisierende Funktion besitzt (Brown und Cooper, 1996; Hubbard, 1999). Die Abwesenheit des C-terminalen Phosphotyrosins bei den viralen Vertretern erklärt teilweise die großen Aktivitätsunterschiede zwischen den zellulären und viralen Kinasen. Die Phosphorylierung des Y527 von c-src erfolgt durch die Kinase CSK (Carboxyterminale Src Kinase) (Nada et al., 1991). CSK selbst zeigt große Ähnlichkeit zu den Kinasen der Src-Familie, besitzt aber im Gegensatz zu diesen weder Palmitoylierungs- oder Myristoylierungssignale noch einen negativ-regulatorischen Carboxyterminus.

Die Aktivität der Src Kinasen kann zusätzlich über Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten reguliert werden (S12, S17, T34, T46 und S72 in den N-terminalen- oder "Unique"-Domänen von c-src). Die Rolle dieser Phosphorylierungen muß noch aufgeklärt werden (Taylor und Shalloway, 1993; Stover et al., 1994).

1.3. Proteintyrosinphosphatasen

Jeder Prozess der durch reversible Tyrosinphosphorylierung bestimmt wird, setzt die Regulation der dazugehörigen Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) voraus. Es hat sich gezeigt, daß PTPn kritische Enzyme für die normale und auch die pathologische Zellphysiologie darstellen. Seit der Identifizierung der ersten PTP (PTP-1B, Tonks et al., 1988), konnte eine große und sehr diverse Familie dieser Enzyme klassifiziert werden (Tonks, 1996). Mehr als 75 PTP Gene konnten mittlerweile der PTP Familie zugeordnet werden, einschließlich der dual-spezifischen Tyrosinphosphatasen. Eine Schätzung der PTPn im gesamten humanen Genom beläuft sich sogar auf etwa 500 (Hooft van Huijsduijnen, 1998). PTPn wurden nicht nur in Säugern sondern auch in anderen Organismen, wie beispielsweise *Xenopus*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium*, Hefe, Prokaryonten und Viren nachgewiesen werden. In den letzten Jahren konnte ein großer Fortschritt in der Identifizierung und Charakterisierung der PTPn, der Bindungspartner der Rezeptor PTPn (RPTPn), sowie der Agonisten und Antagonisten der intrazellulären PTPn verzeichnet werden. PTPn sind daher ins Visier der therapeutischen Möglichkeiten für die Behandlung von einer Reihe von Krankheiten wie Krebs oder Diabetes gerückt.

1.3.1. Klassifizierung der PTPn

Wie auch bei den PTKn können die PTPn auf Grund ihrer zellulären Lokalisation in zwei große Untergruppen aufgeteilt werden: die Rezeptor PTPn und die intrazellulären PTPn (siehe Abb. 2).

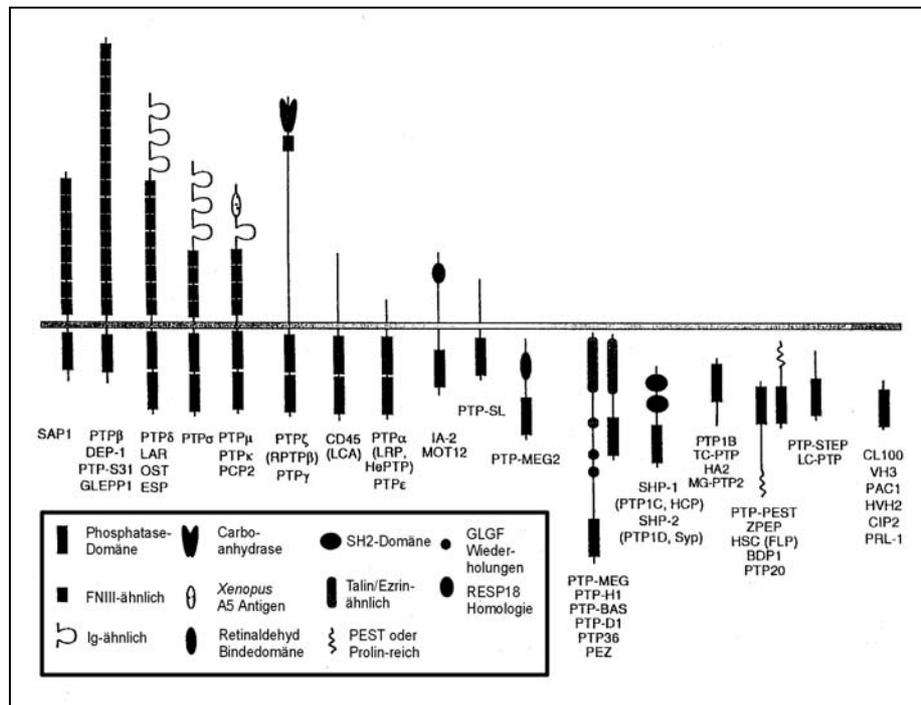


Abb. 2: Die unterschiedlichen PTP Familien. Die Abbildung zeigt die transmembranären und intrazellulären Untergruppen der PTPn (SUGEN, 1996).

Die Rezeptor PTPn sind hochmolekulare Enzyme, besitzen eine Transmembrandomäne, eine extrazelluläre Domäne und zwei intrazelluläre PTP-Domänen. Die Struktur und Größe der extrazellulären Domäne ist sehr divers, wohingegen die intrazellulären katalytische Domänen stark konserviert sind. Die erste (N-Terminale) PTP-Domäne hat bei weitem mehr katalytische Aktivität als die zweite. Die Funktion der zweiten Domäne ist noch unaufgeklärt, wird aber als regulatorische Einheit diskutiert. Nur wenige RPTPn haben nur eine einzelne PTP-Domäne (z.B. die humane PTPβ oder *drosophila* PTP10D). Rezeptor PTPn können auf Grund ihrer extrazellulären Domänen zusätzlich in fünf weitere Gruppen aufgeteilt werden (Moury und Dixon, 1994). Die Klasse 1 der RPTPn umfaßt die CD45 Familie die ausschließlich im hämatopoetischen System exprimiert wird. CD45 wurde als erste transmembranäre PTP charakterisiert und es konnte gezeigt werden, daß sie eine notwendige Rolle in der Signal Transduktion von B- und T-Zellen spielt. CD45 kann die Src-

Kinase p56^{lck} in T-Zellen und in B-Zellen die Kinase lyn dephosphorylieren, und sie dadurch aktivieren (Trowbridge und Thomas, 1994; Yanagi et al., 1996).

Die RPTPn der Klasse 2 sind die LAR-ähnlichen PTPn (z.B. *drosophila* DLAR, humane LAR, PTP σ und PTP δ) und die MAM-Domänen PTPn (PTP κ , PTP μ oder PCP2). Die LAR-ähnlichen PTPn werden durch die Kombination von Immunglobulin-ähnlichen und Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen innerhalb des extrazellulären Bereiches charakterisiert. Solche Strukturen sind kennzeichnend für neurale Zelladhäsionsmoleküle wie L1/NgCAM oder N-CAM (Cunningham, 1995). Die meisten LAR-ähnlichen PTPn werden im neuronalen Gewebe exprimiert und spielen eine fundamentale Rolle in der neuronalen Entwicklung. LAR wird an der Zelloberfläche als ein Komplex aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Unterheiten exprimiert, der durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins entsteht. Die sogenannte E-Untereinheit von LAR enthält damit einen großen Bereich der extrazellulären Domäne, während sich die P-Untereinheit aus einem kurzen extrazellulären Segment, der transmembranären Domäne und dem gesamten intrazellulären Bereich zusammensetzt (Serra-Pages et al., 1994; Aicher et al., 1997). Die MAM-Domänen PTPn werden durch eine MAM-Domäne, eine Immunglobulin-ähnliche und mehreren Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen innerhalb des extrazellulären Bereiches charakterisiert und wurden mit homophiler Zell-Zelladhäsion und dem Cadherin/Cateninsystem in Verbindung gebracht (Brady-Kalnay et al., 1995; Fuchs et al., 1996; Wang et al., 1996).

Die RPTPn der Klasse 3 weisen ausschließlich mehrere Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen auf (z. B. OST-PTP, *drosophila* DPTP10 und DPTP99A, humane PTP β , SAP-1 und DEP-1). Für die Mehrzahl der Mitglieder dieser Familie ist weiterhin das Vorhandensein von nur einer Phosphatasedomäne kennzeichnend (Krueger et al., 1990; Östman et al., 1994; Matozaki et al., 1994; Yang et al., 1991; Hariharan et al., 1991).

Dagegen gehören die hier bearbeitete PTP α und PTP ϵ der Klasse 4 an. Sie haben sehr kurze extrazelluläre Bereiche ohne erkennbare Homologien zu bekannten Strukturmotiven (Krueger et al., 1990; Matthews et al., 1990; Sap et al., 1990; Kaplan et al., 1990; Jirik et al., 1990). RPTPn der Klasse 5 haben eine sogenannte Carbonanhydrase Domäne und eine Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich. Die Carbonanhydrase Domäne weist eine Homologie zu dem Enzym Carbonanhydrase auf, die essentiellen Aminosäuren für die katalytische Aktivität sind jedoch nicht konserviert. Beispiele sind PTP γ und PTP ξ (RPTP β) (Barnea et al., 1993; Levy et al., 1993). Eine lösliche Form des

extrazellulären Bereiches der PTP ζ wurde als Phosphacan, ein Chondroitin Sulfat Proteoglycan, im Gehirn identifiziert (Shitara et al., 1994).

Die intrazellulären PTPn haben eine einzelne katalytische Domäne, die in den meisten Fällen von speziellen Sequenzen flankiert wird. Diese Bereiche kodieren für Protein-Protein Interaktionsdomänen die für die Lokalisation dieser Enzyme in bestimmten Bereichen des Zytoplasma oder des Nukleus verantwortlich sind Flores et al., 1994).

Die beiden PTPn PTP-1B und TC-PTP enthalten einen carboxyterminalen, hydrophoben Sequenzbereich, der PTP-1B im Endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. TC-PTP im perinukleären Raum verankert (Frangioni et al., 1992; Cool et al., 1990). Eine andere Untergruppe der intrazellulären PTPn (PTP-H1, PTP-MEG1, PTP-D1, PTP36 und PTP-BAS) wird durch spezifische Motive gekennzeichnet mit Homologien zu Proteinen, welche am Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (Bande 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Talin) (Sato et al, 1992). Die Präsenz dieser Domänen deutet daher auf eine Interaktion mit Komponenten des Zytoskeletts und auf eine mögliche regulatorische Rolle dieser PTPn beim Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts hin (Möller et al, 1994; Maekawa et al, 1994; Saras et al, 1994). Diese PTPn werden zusätzlich durch sogenannte GLGF-Domänen gekennzeichnet. Die Bindung zwischen PTP-BAS und FAS-1 (ein transmembranärer Rezeptor) wird durch eine der fünf GLGF-Domänen von PTP-BAS vermittelt (Sato et al., 1995). Zwei der intrazellulären Tyrosinphosphatasen, SHP-1 und SHP-2, haben je zwei SH2 Domänen an ihren N-Termini und diese wirken sich negativ auf die PTP Aktivität aus. Diese Domänen dienen außerdem dazu die PTPn an aktivierte RTKn oder an andere PTKn zu binden. SHP-1 wirkt negativ-regulatorisch auf die Zytokin-Rezeptor Signaltransduktion, und obwohl PTPn generell als negative Regulatoren der Tyrosinphosphorylierungs-vermittelten Signaltransduktion anzusehen sind, ist die verwandte SHP-2 für eine positive Weiterleitung des Signals bei einigen RTKn erforderlich (Vogel et al., 1993; Streuli, 1996). Die ungefähr 500 Aminosäuren umfassenden PEST-Motive wurden unter anderem bei den intrazellulären PTPn PTP-PEST und BDP-1, und der im Zellkern lokalisierten Phosphatase PEP identifiziert (Yang et al., 1993; Flores et al., 1994). Diese Motive wurden auch in anderen Proteinen mit diversen Funktionen identifiziert und vermittelt deren schnelle Degradierung (Rogers et al., 1986). Ob dieses Motiv bei den PTPn die gleiche Rolle spielt ist noch ungeklärt.

Eine zusätzliche Untergruppe der intrazellulären PTPn sind die dual-spezifischen PTPn. Sie können Serin/Threonin und Tyrosinreste dephosphorylieren. Die erste dual-spezifische PTP,

VH-1, wurde im *vaccinia* Virus identifiziert (Guan et al., 1991). Danach konnte gezeigt werden das Cdc25 von *S. cerevisiae* auch eine dual-spezifische PTP ist. Cdc25p konnte Phosphotyrosin- und Phosphothreoninreste von der Kinase Cdc2 dephosphorylieren. Außerdem konnte eine sogenannte CH2 Domäne (nicht-katalytische Cdc25p Homologie Domäne) in eine Gruppe von dual-spezifischen PTPn, welche insbesondere die MAP Kinasen dephosphorylieren, identifiziert werden (Keyse, 1998).

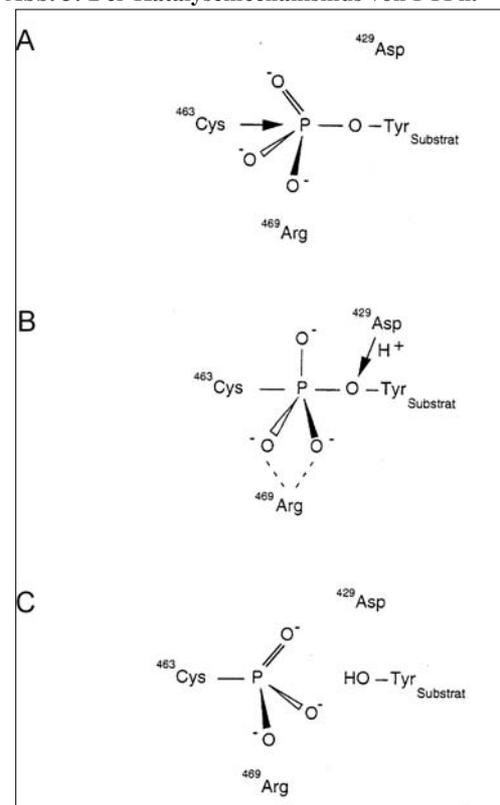
1.3.2. Der Katalysemechanismus der PTPn

Alle PTPn haben mindestens eine katalytische Domäne von ungefähr 240 Aminosäuren mit der charakteristischen Sequenz des aktiven Zentrums: (I/V)HCXXGXXR(S/T). Diese Sequenz wird oft als das C(X)₅R Motiv bezeichnet (Dixon, 1995). Die Kristallstrukturen einiger PTPn erlauben entscheidende Einblicke in den Katalysemechanismus der PTPn (Barford et al., 1994; Stuckey et al., 1994; Yuvaniyama et al., 1996).

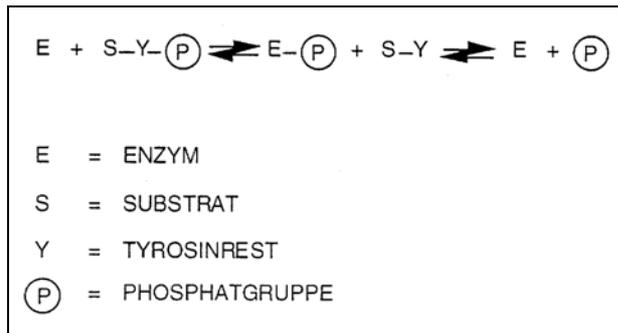
Ein radioaktiv markiertes Phosphocystein-Intermediat der PTP1 (Ratte) und der humanen LAR konnte mit einer Denaturierungsmethode gezeigt werden. Daraus wurde klar, daß die Bildung dieses Intermediats transient ist und daß sie essentiell auf das Cystein angewiesen ist (Guan und Dixon, 1991; Pot und Dixon, 1992). Die Bindung des Substrats an die PTPn führt zu einem nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des Cysteinrestes an das Phosphatom des modifizierten Tyrosinrestes (Abb. 3).

Dies resultiert in der Ausbildung dieses Intermediats, stabilisiert durch die Guanidinogruppe des essentiellen Arginins im katalytischen Zentrum. Das Substrat wird von einem Asparaginsäurerest, der als katalytische Säure fungiert, protoniert. Ein katalytisch wichtiges Aspartat befindet sich in einem flexiblen "Loop" etwa 30-40 Aminosäuren N-terminal der für die Katalyse notwendigen Cysteins im aktiven Zentrum. Dieser Bereich wird nach der Bindung des Substrats an das Enzym durch eine Konformationsänderung in den Bereich des aktiven Zentrums gebracht. Diese Schritte resultieren in dem

Abb. 3: Der Katalysemechanismus von PTPn.



kovalenten Thiophosphat-Intermediat und einem freien, dephosphorylierten Substrat. Die PTP wird nun durch eine Hydrolyse des kovalenten Enzym-Phosphat-Intermediats regeneriert, so daß am Ende organisches Phosphat als zweites Produkt freigesetzt wird (Denu et al., 1995; Lohse et al, 1997; Denu et al, 1996). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei den dual-spezifischen Phosphatasen gemacht (Zhou et al., 1994). Man kann die Reaktion mit einer einfachen Gleichung folgendermaßen beschreiben:



1.3.3. Physiologische Funktion der PTPn

Die zentrale Rolle der Phosphotyrosin-vermittelten Signalübertragung läßt vermuten, daß die Dephosphorylierung der modifizierten Tyrosinreste von großer Bedeutung ist. Eine Verschiebung des Phosphotyrosin Gleichgewichts beeinflusst normales Zellwachstum and kann zu zellulärer Transformation führen. Mutationen in der extrazellulären Domäne der PTP γ können beispielsweise die Fähigkeit dieser PTP auf externe Signale zu reagieren beeinträchtigen (Wary et al., 1993). Die Verschiebung dieses Gleichgewichts ist somit die Basis transformierter Zellen und metabolischen Krankheiten wie Diabetes. Es konnte gezeigt werden das PTP-1B Transformationen bedingt durch die onkogenen PTKn Neu oder Src blockieren kann (Zhang, 1998; Woodford-Thomas et al., 1992). Aus diesen frühen Experimenten wurde die Hypothese der Tumorsuppressoren aufgestellt; d.H. der Verlust oder die Inaktivierung beider Kopien der PTP Gene könnte zu einer Steigerung des Phosphotyrosingehalts gewisser zellulärer Proteine führen (Klarlund, 1985). Starke Fehlfunktion des Immunsystems bedingt durch Mutationen in SHP-1 sind die Ursache für den "*motheaten*"-Phenotyp der Maus (Shultz et al., 1993). SHP-1 ist ein wichtiger negativer Regulator der Zytokine. Der Verlust von SHP-1 führt zu einem erhöhten Phosphotyrosingehalt und verstärkter Proliferation (Klingmuller et al., 1995). Die intrazelluläre PTP-BAS bindet an den Carboxy-Terminus von Fas und inhibiert Fas-

generierte Signale die zu Apoptose führen würden (Sato et al., 1995). Überexpression der PTP1 inhibiert mitogene Signale von IL-3 (Gelderloos und Anderson, 1996).

Da PTPn die Antagonisten der normalen und onkogenen PTKn sind, hat man angenommen, daß zumindest einige PTPn als Tumorsuppressorgene funktionieren können. PTEN weist Mutationen in einigen sporadischen Tumoren, einschließlich Brust, Gehirn und Prostata auf. (Li et al, 1997; Liaw, et al., 1997). PTP γ wurde als Tumorsuppressor diskutiert. Das Gen wurde auf Chromosom 3p21 lokalisiert, eine Region, die häufig in Karzinomen der Niere und Lunge verändert identifiziert wurde (LaForgia et al., 1991; Wary et al, 1993).

Die dual-spezifischen PTPn der Säuger haben sich als zentrale Regulatoren der mitogenen Signalwege und des Zellzyklus herausgestellt. Während cdc25 Cyclin-abhängige Kinasen (CDKn) aktivieren kann (Gautier et al., 1991), ist KAP/Cdi in der Lage sie zu inaktivieren (Poon und Hunter, 1995). Es konnte auch gezeigt werden, daß einige dual-spezifischen PTPn MAP Kinasen dephosphorylieren und dadurch inaktivieren können (Cho et al., 1996).

Es gibt vermehrt Hinweise darauf, daß manche PTPn die Wirkung der PTKn nicht inhibieren, sondern potentiieren können. Das würde zu einer Verstärkung des mitogenen Signals, und somit zur zellulären Transformation führen. Cdc25A, ein Regulator des Zellzyklus, greift am Anfang des Zellzyklus ein und reguliert den G1/S-Übergang (Hoffmann et al., 1994). Cdc25 dephosphoryliert Thr14 und Tyr15 von cdc2, aktiviert dadurch den cdc2/cyclin B Komplex und fördert die Mitose (Millar und Russell, 1992). Cdc25A kooperiert mit Ha-ras in der onkogenen Transformation von primären Fibroblasten und wird oft in primären Brusttumoren überexprimiert, was auf onkogene Aktivität schliessen läßt. Cdc25A ist außerdem ein Substrat des Protoonkogens *c-myc*, des adenoviralen E1A Onkogens und des E7 Onkogens des humanen Papillomavirus Typ 16 (Galaktionov et al, 1995, 1996; Spitkovsky et al., 1996; Katich et al., 2001). CD45 oder PTP α könnten ebenfalls eine Rolle in der zellulären Transformation spielen. Sie sind in der Lage potentiell onkogene PTKn der Src-Familie zu aktivieren. Die Überexpression dieser PTPn könnte folglich zu einem transformierten Phenotyp beitragen (Sun und Tonks, 1994). Eine erhöhte mRNA Expression von PTP α konnte in fortgeschrittenen Kolonkarzinoma detektiert werden; die onkogenen Eigenschaften dieser PTP könnten zur Tumorigenese in Kolonkarzinoma beitragen (Tabiti et al., 1995). SHP-2 und *corkscrew* (*drosophila* Homolog) sind positive Mediatoren für eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie Insulin oder PDGF (Perkins et al., 1992; Noguchi et al., 1994). PTP PRL-1 der Ratte wirkt positiv auf das Zellwachstum (Diamond et al, 1994). Überexpression der humanen Formen von PRL-1 (PTP

CAAX1 und PTP CAAX2) in Epithelzellen führten zu einem transformierten Phenotyp in der Kultur und zu Tumorwachstum in Nacktmäusen (Cates et al., 1996). Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß das Pflanzenonkogen *rolB* von *Agrobacterium rhizogenes* für ein Protein mit PTP Aktivität kodiert (Filippini et al., 1996).

Mehrere PTPn wurden als negative Regulatoren des Insulin Signalweges diskutiert und somit mit Typ-II Diabetes in Verbindung gebracht: PTP-1B (Ahmad et al., 1995; Kenner et al., 1996; Salmeen et al., 2000), PTP LAR (Kulas et al., 1995; Zhang, W.-R. et al., 1996), und PTP α (Möller et al., 1995; Lammers et al., 1997).

Eine Reihe von Mikroorganismen hat komplexe Strategien für die Nutzung der Signalwege des Wirts entwickelt. Das Vaccinia Virus exprimiert eine für die virale Transkription und Infektivität essentielle dual-spezifische PTP, VH1 (Liu et al., 1995). Die Myxoma- und Shope Fibroma Viren exprimieren ebenfalls essentielle dual-spezifische PTPn (Mossman et al., 1995). Die pathogenen Yersinia Bakterien (*Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*) sekretieren eine Tyrosinphosphatase die essentiell für die bakterielle Virulenz ist. Ein Substrat der Yersinia PTPn ist p130^{cas}, lokalisiert in Zell-Matrix Kontaktpunkten des Wirts (Black und Bliska et al., 1997; Guan und Dixon, 1990). *Salmonella typhimurium*, der Erreger von Typhus und verschiedenen Lebensmittelvergiftungen, sekretiert eine für die Virulenz wichtige PTP (Kaniga et al., 1996). PTP Aktivität wurde auch in *Leishmania donovani* (Cool und Blum, 1993), *Trypanosoma brucei*, und *cruzi* (Bakalara et al., 1995a,b) sowie in *Mycobacterium tuberculosis* (Koul et al., 2000) detektiert. Diese Studien unterstreichen die Bedeutung der PTP Regulation in normalen Zellen.

1.3.4. Regulation der PTPn

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den RTKn und den transmembranären PTPn läßt vermuten, daß die RPTPn möglicherweise auch durch Liganden moduliert werden könnten. Die Ligandenbindung bei RPTPn repräsentiert nur eine von vielen möglichen Regulationsmechanismen. Serin/Threoninphosphorylierung (den Hertog et al., 1995; Tracy et al., 1995), Tyrosinphosphorylierung (Su et al., 1996; Toledano-Katchalski und Elson, 1999), Proteolyse (Aicher et al., 1997), Alternatives Spleißen oder 5'-Exon Usage (Kozieradzki et al., 1997), und Sauerstoffradikale (Barrett et al., 1999; Gross et al., 1999) sind Beispiele publizierter Regulationsmechanismen der PTP-Familie (siehe Abb. 4).

Die Tyrosinphosphorylierung des C-terminalen Y798 der PTP α und der entsprechende Tyrosinrest der PTP ϵ kreiert eine Bindungsstelle für das Adaptormolekül Grb2 (jedoch ohne Sos Rekrutierung) (den Hertog und Hunter, 1996; Su et al., 1996; Toledano-Katchalski und Elson, 1999). Die Mutation dieses Tyrosinrests (Y798F) der PTP α verändert die Eigenschaften dieser PTP in PC12 Zellen (Su et al, 1996) und in NIH3T3 Zellen (Lammers et al., 2000; Zheng et al., 2000), und deutet darauf hin, daß die Tyrosinphosphorylierung dieses Rests von großer regulatorischer Bedeutung ist.

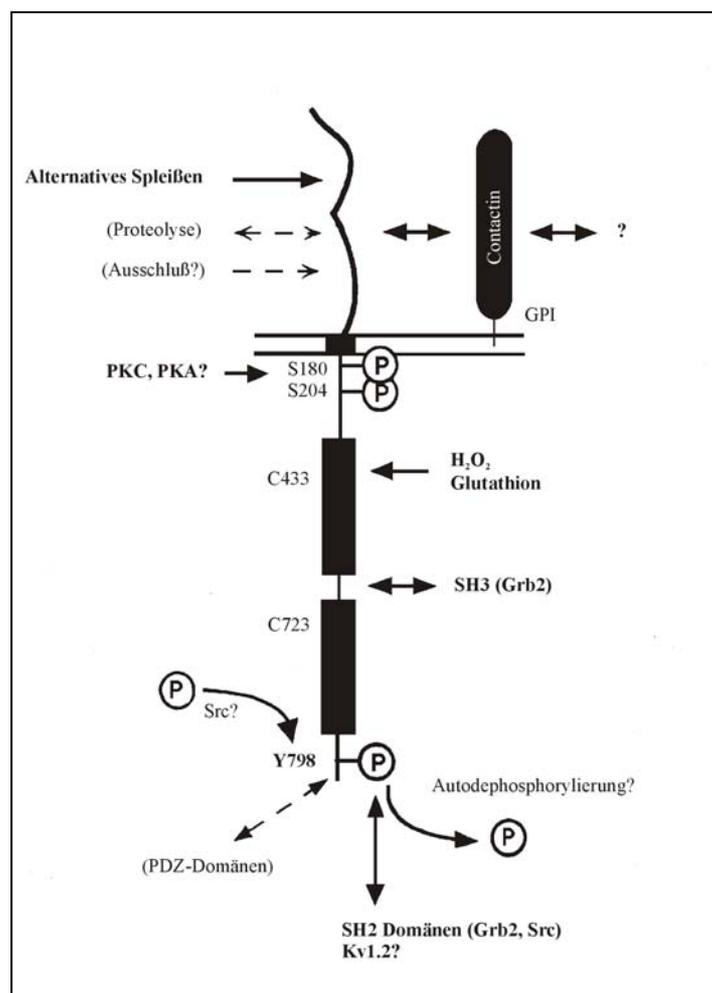


Abb. 4: Regulationsmechanismen der PTPn.

Interaktionen mit unlöslichen Liganden für RPTPn wurden bisher häufig beschrieben. CD45 beteiligt sich an zahlreichen Interaktionen in *cis* und in *trans* (Trowbridge und Thomas, 1994). PTP α assoziiert in *cis* mit dem GPI-verankerten Adhäsionsmolekül contactin (Zeng et al., 1999), während PTP ξ mit contactin in *trans* assoziiert (Peles et al., 1998). Andere RPTPn beteiligen sich an homophilen Interaktionen mit den gleichen RPTPn von Nachbarzellen, an

Interaktionen mit neuronalen Zell-adhäsionsmolekülen (CAMs), oder an Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Bedeutung dieser RPTP Interaktionen und der daraus resultierenden physiologischen Relevanz ist bisher unklar. Es gibt auch nur ein Beispiel löslicher Liganden für RPTPn. Eine Interaktion mit starker Affinität zwischen PTP ξ und den Zytokinen Pleiotrophin und Midkine konnte nachgewiesen werden (Maeda et al., 1999; Maeda und Noda, 1998). Pleiotrophin bindet an PTP ξ und inhibiert die intrinsische PTP Aktivität. Diese Beobachtung könnte den stimulatorischen Effekt von Pleiotrophin auf die Tyrosinphosphorylierung von β -catenin erklären. Pleiotrophin ist somit das erste Beispiel einer in vivo Regulation durch einen physiologischen und löslichen Liganden (Meng et al., 2000).

Wie das Beispiel der PTP ξ und Pleiotrophin zeigt, könnte die Ligandenbindung eine Aktivitätsregulation bei RPTPn bewirken. Diese Regulation könnte durch Konformationsänderungen der RPTPn, die den Zugang zu/von verschiedenen Substraten möglich machen, bedingt sein, und somit eine verändertes Milieu an der Membran schaffen. Eine zweite Möglichkeit, welche aber die erste keineswegs ausschließt, wäre eine durch die Ligandenbindung beeinflusste potentielle Oligomerisation der RPTPn. Die Dimerisierung und die daraus resultierenden regulatorischen Konsequenzen wurde erstmals mit CD45 diskutiert. Durch die Verkoppelung von CD45 durch Chimeren (Desai et al., 1993) oder Antikörper (Trowbridge und Thomas, 1994) konnte gezeigt werden, daß die Aktivität dieser PTP durch die Dimerisierung negativ beeinflusst wurde. Die erzwungene Homodimerisierung von CD45 (durch die T-Zell Rezeptor Signalkaskade; Desai et al., 1993) und auch der PTP α (durch c-src kinase Aktivität; Jiang et al., 1999) führte zu einem Aktivitätsverlust. Durch Kristallstruktur Studien der N-terminalen PTP Domäne von PTP α konnte gezeigt werden, daß ein inhibitorischer Keil der PTP Monomere für die negative Regulation dieser PTP durch Dimerisierung verantwortlich ist (Bilwes et al., 1996). Der Keil eines Monomers fügt sich in das aktive Zentrum des anderen Monomers ein und blockiert somit den Zugang des Substrates. Mutation dieses Keils bewirkten eine Aufhebung der Homodimerisierungs-induzierten Inhibitionen und lieferten einen starken Hinweis für eine Rolle des Keils in der Homodimerisierungs-induzierten Inhibition dieser RPTPn (Jiang et al., 1999; Majeti et al., 1998). Eine inaktivierende Punktmutation in diesem inhibitorischen Keil (E613R) der CD45 in Mäusen resultierte in einer Aktivierung der Lymphozyten, die dann zu Lymphoproliferation und spontaner Autoimmunität, und schließlich dem Tod führte (Majeti et al., 2000). Diese Mäuse unterstreichen die Bedeutung der Regulation von CD45 durch

Homodimerisierung, und durch strukturelle Homologien auch die Regulation anderer RPTPn mit einem inhibitorischen Keil, wie beispielsweise PTP α .

Heterodimerisierungen zwischen dem inhibitorischen Keil einer RPTP und der C-terminalen PTP Domäne einer zweiten RPTP wären ebenfalls von regulatorischer Bedeutung (Wallace et al., 1998). Heterodimerisierungen der RPTPn könnten eine Grundlage der komplexen genetischen Interaktionen, wie man sie zwischen den Drosophila RPTPn beobachten konnte, darstellen (Desai et al., 1997).

1.3.5. PTP α

Es konnte gezeigt werden, daß PTP α in der zellulären Differenzierung eine Rolle spielt und verschiedene Merkmale deuten auf eine potentielle Relevanz für Zelltransformation. Überexpression von PTP α wurde in fortgeschrittenen humanen Kolonkarzinoma beschrieben (Tabiti et al., 1995). Die PTP mit der größten Homologie, PTP ϵ , wurde mit Brusttumoren der Maus in Verbindung gebracht. Tumore initiiert durch HER2/neu oder Ha-v-Ras, aber nicht durch c-myc oder int-2 zeigten erhöhte PTP ϵ mRNA Expression, und konstitutive PTP ϵ Expression erhöhte das Brustkrebsrisiko in transgenen Mäusen (Elson und Leder, 1995b; Elson, 1999).

PTP α ist eine transmembranäre Phosphatase mit einer sehr kurzen extrazellulären Domäne (123 Aminosäuren) und zwei intrazellulären PTP Domänen. Im Gegensatz zu anderen PTPn konnte bei PTP α eine geringe Aktivität der C-terminalen Domäne nachgewiesen werden, die jedoch wesentlich schwächer ist als die N-terminale Aktivität. PTP α wird in sehr vielen Geweben exprimiert und wurde bisher mit zahlreichen Signalwegen, wie beispielsweise der Insulin-vermittelten Übertragung, in Verbindung gebracht. Obwohl publiziert wurde, daß PTP α in *cis* mit dem GPI-verankerten Adhäsionsmolekül contactin assoziiert (Zeng et al., 1999), konnte bisher noch kein aktivitätsregulierender Ligand für PTP α identifiziert werden. Ein PKC-vermittelter Regulationsmechanismus verstärkt die Aktivität der PTP α durch Serinphosphorylierungen der Serine 180 und 204 im juxtamembranären Bereich (den Hertog et al., 1995; Tracy et al., 1995).

PTP α kann an einem spezifischen Tyrosinrest (Y789) durch c-src phosphoryliert werden, wodurch eine Bindungsstelle für die SH2 Domäne des Adaptorproteins Grb2 entsteht (Zheng et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß eine simultane Assoziation von Grb2 (welches Ras reguliert) mit PTP α und mit Sos (aktiviert Ras) höchstwahrscheinlich ausgeschlossen ist.

Das würde bedeuten das PTP α nicht in der Lage wäre Sos an die Membran zu rekrutieren und dadurch Ras zu aktivieren. Die Rekrutierung von Sos zur PTP α über Grb2 ist nicht die einzige Möglichkeit wie PTP α Ras beeinflussen könnte; möglicherweise wird Grb2 durch PTP α von Sos entzogen, oder Grb2 rekrutiert Grb2-Bindungspartner die dann von PTP α dephosphoryliert werden können. Eine Aktivierung von Ras durch PTP α wurde aber bislang noch nicht beschrieben (den Hertog et al., 1994; Su et al., 1996).

PTP α ist verantwortlich für die direkte Dephosphorylierung des inhibitorischen Phosphotyrosinrestes von c-src, wodurch eine Steigerung der c-src Aktivität hervorgerufen wird (den Hertog et al., 1993; Zheng et al., 1992; Zheng et al., 2000). Interessanterweise zeigen embryonale Fibroblasten transgener PTP α ^{-/-} Mäuse eine stark verringerte c-src Aktivität und eingeschränkter Integrin Funktion, wodurch Defekte in der Zelladhäsion sowie der Zellausbreitung entstehen. Diese konnten durch ektopische Expression der PTP α wieder hergestellt werden (Ponniah et al., 1999; Su et al., 1999), was bedeutet, daß PTP α eine Rolle in der Adhäsion von Fibroblasten spielt. Es konnte auch gezeigt werden, daß Überexpression der PTP α in Fibroblasten die Adhäsionseigenschaften beeinflusst (Möller et al., 1995; Harder et al., 1998). Andererseits ist die überexprimierte PTP α auch in der Lage das aktivierende pY416 von c-src zu dephosphorylieren und könnte dadurch auch inhibitorisch auf c-src-vermittelte Signalprozesse einwirken (Zheng et al., 2000).

Erhöhte Aktivität der SRC-Kinasen in transformierten Zellen wurde schon mehrmals beschrieben (Maa et al., 1995; Muthuswamy et al., 1994; Ottenhoff-Kalff et al., 1992). Eine aktivierende somatische Mutation in Kolonkarzinoma, basierend auf einem Stopkodon, direkt vor dem inhibitorischen Phosphotyrosin Y530 des humanen c-src, erhöht c-src Aktivität, wirkt transformierend, tumorigen und fördert die Metastasierung (Irby et al., 1999). Interessanterweise konnte eine erhöhte c-src Aktivität in Brust- und Kolontumoren beobachtet werden (Cartwright et al., 1990; Ottenhoff-Kalff et al., 1992), und c-src ist in der Lage die Signale der EGFR-Familie zu potentiieren (Tice et al., 1999).

1.3.6. Zielsetzung

Es wurde gezeigt, daß die in Brusttumoren hoch-regulierte PTP α die SRC-Kinasen c-src und c-fyn aktiviert, und daß diese Phosphatase eine Rolle in der Integrin-vermittelten Signalübertragung und in der Zelladhäsion spielen kann. Die Eigenschaften der PTP α lassen daher vermuten, daß diese PTP möglicherweise an der Förderung der neoplastischen

Transformation oder der Fortschreitung der Brusttumoren beteiligt sein könnte. Die Bedeutung der PTP α für das Tumorwachstum wurde mittels Wildtyp und dominant-negativer Mutanten mit einem (von unserer Arbeitsgruppe modifizierten) Tetrazyklin-induzierbarem System in Brustkrebszelllinien untersucht, um eine potentielle Rolle in der Onkogenese zu prüfen.

Die postulierte Tumorsuppressorfunktion von PTPn sollte im Mammakarzinomsystem untersucht werden. Die Studie besteht aus einem molekulardiagnostischen Teil, in welchem die Genexpressionen der PTP α in Tumorzelllinien und Biopsien mit Hilfe der "cDNA-Array"-Technologie untersucht werden, und einen funktionsanalytischen Teil, um die Relevanz von Expressionsabnormitäten mittels gezielter Manipulation zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1. Bezugsquellennachweis

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
BES (N, N-Bis[2-Hydroxyl]2-aminoethansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DOSPER	Roche, Mannheim
Doxyzyklin	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Essentielle Aminosäuren	Gibco-BRL, Eggenstein
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco-BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco-BRL, Eggenstein
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranidose)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Gibco-BRL, Eggenstein
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine	Gibco-BRL, Eggenstein
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco-BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	Gibco-BRL, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (para-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Taufkirchen

Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco-BRL, Eggenstein
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco-BRL, Eggenstein
Trypton	Difco, Detroit
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
X-Gal	Diagnostik Chemicals, USA

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a.-Qualität bezogen.

2.1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase C.I.A.P.)	MBI Fermentas, St.Leon- Rot
Gen-32-Protein	Roche, Mannheim
Klenow-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Lysozym	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim Biolabs, New England MBI Fermentas, St.Leon- Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
T4 DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
T7 DNA Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.3. Radiochemikalien

(γ - ³² P)-ATP	>5000 Ci/mmol
(α - ³⁵ S)-dATP	>1000 Ci/mmol
(α - ³³ P)-dATP	
[methyl- ³ H]-Thymidine	

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

2.1.4. Liganden und Wachstumsfaktoren

EGF (Human, rekombinant)	Intergen (San Francisco)
aFGF	Pepto Tech, USA
Insulin (Human, rekombinant)	Eli Lilly, Indianapolis
IGF-1	Becton Dickinson, USA
PDGF-BB	Roche, Mannheim
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen
Choleratoxin	Sigma, Taufkirchen

2.1.5. "Kits" und Sonstiges

DNA Längenstandards	Eurogentec, Belgien
ECL Kit	Amersham,
Braunschweig	
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham,
	Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, UK
	Sarstedt, Nümbrecht
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Polaroidfilm 667	Polaroid Corp., USA
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel

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

Bei Bedarf wurden den Medien nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	100	µg/ml

Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.2.2. Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien ebenso wie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco-BRL, Eggenstein und Fötales Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen bezogen. FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30 min auf 56°C erhitzt.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose, 5%, 10%, oder 20% FCS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat
- RPMI 1640, 10% oder 20% FCS, 2mM L-Glutamin
- Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, 10% FCS, 2mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin
- 50% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) mit 4,5 mg/ml Glukose, 50% HAM's F12 Medium, 5% Horseserum, 1mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 3.9 ml Insulin (40 I.E. / 500 ml Medium), 500 ng/ml Hydrocortison, 100 ng/ml Cholera toxin, 20 ng/ml EGF
- McCoy's 5a Medium, 10% oder 15% FCS
- L15 Leibovitz Medium, 5%, 10% bzw. 15% FCS
- Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO

2.2.3. Stammlösungen und Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Acrylamidlösung (30/0,8%)	30,0	%	Acrylamid (w/v)
	0,8	%	Bisacrylamid (w/v)
BBS (2x)	50	mM	BES
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄
	200	mM	NaCl
			pH 6,96 (NaOH)
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25	%	Bromphenolblau (w/v)
	0,25	%	Xylencyanol (w/v)
	30,0	%	Glycerin
	100	mM	EDTA pH 8,0
HBS (2x)	46,0	mM	HEPES pH 7,5
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄
	274	mM	NaCl
			pH 7,00 (NaOH/HCl)
HNTG-Puffer	20,0	mM	HEPES pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0,1	%	Triton X-100
	10,0	%	Glycerin
	10,0	mM	Tetra-Natrium-Pyrophosphat

Laemmli-Puffer (2x)	65,0	mM	Tris/HCl pH6,8
	3,0	%	SDS
	30,0	%	Glycerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β -Mercaptoethanol
MOPS (10x)	200	mM	Morphoinopropansulfonsäure
	80,0	mM	Natriumacetat
	100	mM	EDTA pH 8,0 pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	500	mM	Tris/HCl pH 8,0
	50,0	mM	EDTA pH 8,0
	1,5	mM	NaCl
	0,5	%	Triton X-100
PBG	1x		PBS
	0,5	%	BSA
	1x		Fisch-Gelatine
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl)
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycerin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
'Strip'-Puffer	62,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	2,0	%	SDS
	100	mM	β -Mercaptoethanol
TAE (10x)	400	mM	Tris/HCl pH 7,5
	50,0	mM	Natriumacetat
	10,0	mM	EDTA pH 8,0
TBE (10x)	890	mM	Tris/HCl pH 8,0
	890	mM	Borsäure
	20,0	mM	EDTA pH 8,0
TE (10:0,1)	10,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1	mM	EDTA pH 8,0
TES	10,0	mM	Tris/HCl pH 7,4
	5,0	mM	EDTA pH 8,0
	1,0	%	SDS
			in 0,1% DEPC H ₂ O

Tris-Glycin-SDS (10x)	248	mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918	mM	Glycin
	1,0	%	SDS
Triton X-100 Lyse-Puffer (Stammlösung)	50,0	mM	HEPES pH 7,5
	150	mM	NaCl
	1,0	%	Triton X-100
	10,0	%	Glycerin
	1,0	mM	EDTA pH 8,0
	10,0	mM	Tetra-Natrium-Pyrophosphat

2.3. Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

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

2.3.1. Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
<i>E.coli</i> 298 F'	F ⁺ , Kan ^r , Lamda ^r , recA ⁻ , tonA ⁻ , LacI ⁻	R. du Bridge, Genentech, San Francisco
<i>E.coli</i> DH5α F'	F'/endA1 hsd17 (r _k ⁻ m _k ⁻), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Stratagene
<i>E.coli</i> CJ236	dut ⁻ , ung ⁻ , thi ⁻ , relA ⁻ (pCJ 105 Camr)	Kunkel, 1985
<i>E.coli</i> XL-1 Blue F'	Tn10 proA ⁺ B ⁺ , lacIq D (lacZ) M15/recA1, endA1, gyr 96 (Nal ^r) thi hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺), supE44	Bullock, 1987

2.3.2. Zelllinien

2.3.2.1. Elternzelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
1.) HBL100	humane Brustdrüsenzellen	ATCC HTB-124
2.) MCF10A	humane Brustdrüsenzellen	ATCC CRL-10317
3.) BT20	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-19
4.) BT474	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-20

5.) BT549	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-122
6.) Dal	humane Brustkarzinomzellen	G. Natali, Italien
7.) DU-44-75	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-123
8.) MCF7	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610030)
9.) MDA-MB175	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-25
10.) MDA-MB231	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-26
11.) MDA-MB361	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-27
12.) MDA-MB415	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610031)
13.) MDA-MB435S	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-129
14.) MDA-MB436	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-130
15.) MDA-MB453	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-131
16.) MDA-MB468	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-132
17.) SKBr3	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-30
18.) T47D	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-133
19.) ZR-75-1	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1500
20.) ZR-75-30	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1504
21.) U373	humane Glioblastomazellen	SUGEN, USA
22.) U373-MG	humane Glioblastomazellen	ATCC HTB-17
23.) U1240	humane Glioblastomazellen	SUGEN, USA
24.) A431	humane epidermoide Karzinomzellen	ATCC CRL-1555
25.) A549	humane Lungenkarzinomzellen	ATCC CCL-185
26.) Hela S3	humane Zervikalkarzinomzellen	ATCC CCL-2.2
27.) OVCAR3	humane Ovarialkarzinomzellen	ATCC HTB-161
28.) COS7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
29.) HEK 293	humane embryonale Nierenfibroblasten,	ATCC CRL-1573

	transformiert mit humaner adenoviraler DNA Typ 5 (Ad 5)	
30.) NIH3T3 cl. 7	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
31.) RAT-1	immortalisierte Rattenfibroblasten	Genentech, USA
32.) PC12	Ratten-Phäochromocytomazellen	P. Cohen, Dundee
33.) Phoenix A	Verpackungszelllinie zur Herstellung amphotropher Retroviren	Nolan Labor, Stanford, USA

2.3.2.2. Virusproduzierende Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
Phoenix A-SFG-tcITE1-neo	produziert amphotrophe Retroviren mit der cDNA für Tetrazyklin-induzierbaren Transaktivator	diese Arbeit
Phoenix A-SFG-t7EC3M/PHS	produziert amphotrophe Retroviren ohne kodierende Sequenz	diese Arbeit
Phoenix A-SFG-t7EC3M/PHS <u>PTPα-wt</u>	produziert amphotrophe Retroviren mit der cDNA für die humane PTP α	diese Arbeit
Phoenix A-SFG-t7EC3M/PHS <u>PTPα-cc/ss</u>	produziert amphotrophe Retroviren mit der cDNA für die dominant-negative Mutante der humanen PTP α	diese Arbeit

2.3.2.3. Stabile Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
<i>MCF10A</i> -SFG-tcITE1-neo	MCF10A-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
<i>MCF10A</i> -SFG-tcITE1-SFG-t7EC3M/PHS	MCF10A-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
<i>MCF10A</i> -SFG-tcITE1-SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	MCF10A-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
<i>MCF10A</i> -SFG-tcITE1-SFG-t7EC3M/PHS-	MCF10A-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	diese Arbeit

PTP α cc/ss-VSV

BT549- SFG-tcITE1-neo	BT549-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
BT549- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS	BT549-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
BT549- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	BT549-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
BT549- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαcc/ss-VSV</u>	BT549-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	diese Arbeit
MCF7- SFG-tcITE1-neo	MCF7-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
MCF7- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS	MCF7-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
MCF7- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	MCF7-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
MCF7- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαcc/ss-VSV</u>	MCF7-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	diese Arbeit
MDA-MB453- SFG-tcITE1-neo	MDA-MB453-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
MDA-MB453- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS	MDA-MB453-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
MDA-MB453- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	MDA-MB453-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
MDA-MB453-	MDA-MB453-Zellen den Tetrazyklin -	diese Arbeit

SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαcc/ss-VSV</u>	induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	
SkBr3- SFG-tcITE1-neo	SkBr3-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
SkBr3- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS	SkBr3-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
SkBr3- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	SkBr3-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
SkBr3- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαcc/ss-VSV</u>	SkBr3-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	diese Arbeit
T47D- SFG-tcITE1-neo	T47D-Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend	diese Arbeit
T47D- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS	T47D -Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit Expressionskontrollplasmid infiziert	diese Arbeit
T47D- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαwt-VSV</u>	T47D -Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α wt-VSV infiziert	diese Arbeit
T47D- SFG-tcITE1- SFG-t7EC3M/PHS- <u>PTPαcc/ss-VSV</u>	T47D -Zellen den Tetrazyklin - induzierbaren Transaktivator exprimierend und mit PTP α cc/ss -VSV infiziert	diese Arbeit

2.3.3. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho- (3)-Tyrosinreste	Upstate Biotechnology, USA
IGF-1R C-20	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminale Domäne des humanen IGF-1R	Santa Cruz, USA
IGF-1R 24-31	Maus, monoklonal, gegen die extra-	K. Siddle

	zelluläre Domäne des humanen IGF-1R	
c-src GD11	Maus, monoklonal, gegen AS 82-169UBI, USA des humanen c-src	
c-src CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminale Domänen des humanen c-src	R. Lammers, d. AG.
PTP α B	Maus, monoklonal, gegen die intra- zelluläre Dömane der humanen PTP α	SUGEN, USA
PTP α D ₂	Maus, monoklonal, gegen die intra- zelluläre Dömane der humanen PTP α	SUGEN, USA
PTP α CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminale Domäne der PTP α	R. Lammers, d. AG.
PTP-H1 NT	Kaninchen, polyklonal, gegen N-terminale Domäne der PTP-H1	R. Lammers, d. AG.
PTP-MEG1 #418	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminale Domäne der PTP-MEG1	J. Ruhe, d. AG
hER α #184	Kaninchen, polyklonal, gegen AS 2-185 des humanen Estrogen Rezeptors	Santa Cruz, USA
VSV p5d4	Maus, monoklonal gegen VSV Sequenz (AS: YTDIEMNRLGL)	R. Lammers, Tübingen
α tTA	Kaninchen, polyklonal, gegen VP16 Anteil des Transaktivators (Affinitätsgereinigt)	Clontech, USA
VP16 (1-21) sc-7545	Maus, monoklonal, gegen C-terminale Aktivierungsdomäne von VP16	Santa Cruz, USA

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

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1:20000	Bio-Rad (München)
Ziege gegen Maus	1:10000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1:20000	Bio-Rad (München)
Kaninchen gegen Schaf	1:20000	Dianova

2.4. Plasmidvektoren und Oligonukleotide

2.4.1. Ausgangsvektoren

<u>Vektor</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
pBS II SK+	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl(+) _{IG} , SK(MCS)	Stratagene
pRK5	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promoter, SV40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, San Francisco
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promoter, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
SFG-tcITE1	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Minimalpromoter, 5'+3' Minimal LTR	D. Lindemann, Würzburg
SFG-t7EC3M/PHS	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Hyg ^r , CMV Minimalpromoter, 5'+3' Minimal LTR mit 7 Tet Operatoren 3' LTR	D. Lindemann, Würzburg

2.4.2. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz</u>
pRK5 β -gal	pRK5 mit cDNA des Enzyms β -Galaktosidase	d. AG.
SFG-tcITE1-neo	Retroviraler Transaktivator-exprimierender Tetrazyklin-induzierbarer Expressionsvektor mit Neo ^r	diese Arbeit
pcDNA3 PTP α	pcDNA3 mit hum. PTP α cDNA	diese Arbeit
pcDNA3 PTP α C433/732S	pcDNA3 mit hum. PTP α cDNA - Mutation der beiden katalytischen Cysteine zu Serin	diese Arbeit

Die Vektoren pcDNA3 PTP α , pcDNA3 PTP α C433/732S wurden mit einem VSV-tag modifiziert: Eine MluI-Schnittstelle wurde vor dem Stopkodon eingefügt und ein VSV-VSV Dimer wurde anschließend in diese Schnittstelle eingefügt.

SFG-t7EC3M/PHS PTP α	Tetrazyklin-induzierbarer retroviraler Expressionsvektor mit hum. PTP α cDNA	diese Arbeit
SFG-t7EC3M/PHS PTP α C433/732S	Tetrazyklin-induzierbarer retroviraler Expressionsvektor mit hum. PTP α cDNA Mutation der beiden katalytischen Cysteine zu Serin	diese Arbeit

2.4.3. Zur Mutagenese verwendete Oligonukleotide

PTP α cc/ss :

Domäne I - GGG GCC ATC GTG GTC CAC AGC AGT GCA GGT GTA GGG

Domäne II - CAC CCC ATC ACC GTG CAC AGC AGC GCC GGG GCA GGA

PTP ϵ cc/ss :

Domäne I - CAC GCT GGG CCC ATC GTG GTC CAC TCT AGC GCG GGC GTG
GGC

Domäne II - CAC CCC ATC ACC GTG CAC AGC AGT GCC GGA GCT GGG CGA

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke

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

2.5.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Plasmidpräparation im mittleren und großen Maßstab wurden die Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kits nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.3. Enzymatische Behandlung von DNA

2.5.3.1. Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden bei Temperaturoptimum. 1-5 μ g DNA wurden mit 5-10 Einheiten Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 μ l verdaut.

2.5.3.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden

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

2.5.3.3. Phosphorylierung von 5'-Enden

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide besitzen meistens an ihrem 5' Ende keine Phosphatgruppe. Um es der T4-DNA Ligase bei der *in vitro* Mutagenese zu ermöglichen, das Oligonukleotid mit dem neu synthetisierten DNA-Strang zu verknüpfen, muß eine

Phosphatgruppe mit Hilfe einer Polynukleotidkinase am 5'-Ende des Oligonukleotids angefügt werden.

200 pmol des Oligonukleotids wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in 1x Polynukleotidkinasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Spermidin, 10 mM EDTA pH 8,0) in Anwesenheit von 0,5 mM ATP und 10 E Polynukleotidkinase für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.5.3.4. Auffüllen überhängiger 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Zur Erzeugung von glatten Enden wurden 2-5 µg geschnittene DNA in NEB Puffer 2 (New England Biolabs) mit 2,5 mM dNTPs (jeweils) und mit 5 E Klenow-Polymerase für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Hitzeinaktivierung (10 min bei 75°C) gestoppt.

2.5.3.5. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5 fachen 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 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Die Ligation wurde anschließend hitzeinaktiviert (10 min bei 65°C). Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.5.4. Gelelektrophorese von DNA

2.5.4.1. Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 400 bp bis 14kbp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Das Gel wurde anschließend für 10 min mit 1x TBE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TBE entfärbt.

2.5.5. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte durch die Anwendung des QiAex II Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

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

2.5.6.1. Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (Chung und Miller, 1988; Chung und Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.5.6.2. Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetenter, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 50 min bei 37°C auf einem Schüttler geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden komplett auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.5.7. Dauerkulturen von *E.coli* Bakterien

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

2.5.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA

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

2.5.9. DNA-Mutagenese

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

2.5.9.1. Herstellung von uracilhaltiger Einzelstrang M 13 DNA

Transformierte CJ236 Bakterien wurden in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde mit 1×10^8 M13KO7 Phagen (Pharmacia, Freiburg) infiziert (MOI 20) und 4 h lang weiter geschüttelt. Dann wurde Kanamycin dazugegeben (3 mg/ml) und für 16 h bei 37°C geschüttelt. Danach enthielten die zur Infektion verwendeten M 13 Phagen die einzelsträngige DNA, an der die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren von 1,2 ml Kulturmedium gründlich aus dem

Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl 20% PEG/NaCl bei RT für 20 min präzipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Phagensediment wurde in 300 µl TE-Puffer 10/1 resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl puffergesättigtem Phenol/Chloroform mehrfach extrahiert. Nach Abtrennung der wäßrigen Phase wurde die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 200 µl 7,5 M NH₄Ac (pH 7,5) und 800 µl absoluten Äthanol gefällt und bei 4 °C mit 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl H₂O aufgenommen. Die Qualität der einzelsträngigen DNA wurde auf einem 1%igen Agarosegel ermittelt. Als Kontrolle auf Kontamination mit doppelsträngiger DNA, wurde 100 ng unverdautes Plasmid mit auf das Agarosegel aufgetragen.

2.5.9.2. Synthese des mutierten DNA-Stranges

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids zum uracil-haltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen:

200 ng einzelsträngige DNA

2-3-pmol phosphoryliertes Oligomer

1 µl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl)

in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem 90°C warmen Heizblock 2 min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von 30°C abgekühlt.

Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1 µl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1 µl), 1 µg T4-Gen 32 Protein (0,5 µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1 µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschließend 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl TE 10/1 gestoppt. Der Ansatz wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien genutzt.

2.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

2.6.1. PCR-Amplifikation von DNA

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA

1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol

1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol

5 µl 10x Taq Polymerase Puffer

(20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))

1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

1 µl Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)

ad 50 µl H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt. Die Ansätze wurden mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und die Synthesereaktion in einem "Therma Reactor" der Fa. Biometra durchgeführt. Folgende Bedingungen stellen ein Beispiel für das Syntheseprotokoll dar; die Hybridisierungstemperatur (XX) variiert von Oligomerpaar zu Oligomerpaar und wurde daher offengelassen.

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

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.6.2. beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.6.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe des "Spin Bind PCR Purification System" (Biozym) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.6.3. Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte effizient subklonieren zu können, wurden zusätzlich an den 5' Enden der Oligomere DNA-Sequenzen synthetisiert, die den Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen entsprechen. Nach Restriktionsverdau (2.5.3.1.) und Elution (2.5.5.) der gereinigten PCR-Produkte konnten diese in die entsprechend vorbereiteten Plasmide ligiert werden (2.5.3.5.).

2.7. cDNA Arrays

In pBluescript klonierte cDNA Sequenzen zwischen 200 bp und ca. 4000 bp Länge von 663 Genen (Tyrosin-Kinasen und -Phosphatasen, Serin/Threoninkinasen und -Phosphatasen, Proteasen, Wachstumsfaktoren, und Apoptose-assoziierte Gene u.a.) wurden mit einer Ausgangskonz. von 1µg/µl folgender Denaturierungslösung behandelt:

- (1) cDNAs vor Entnahme: 1 hr 37-42 °C; 1min 13000rpm Tischzentrifuge
- (2) 90µg (90 µl) cDNA: 10 min 100 °C
- (3) 10min Eis
- (4) 4,5µl 10 M NaOH
- (5) 10 min RT
- (6) 5,4 µl 7,4 M NH₄OAc pH5,3
- (7) 36 µl 30xSSC/Bromphenolblau

Die denaturierten Lösungen wurden in 96-Loch Platten pipettiert und als Duplikate in einer 4x4 Anordnung mit einem Gridder Roboter (BioGrid, England) auf die Nitrozellulose Membranen (HyBond-N, Pharmacia) aufgebracht.

Die hergestellten Membranen wurden in einem Hybridisierungsgefäß mit 15 ml Prehybridisierungslösung + 150 µl tRNA (Roche, 10 mg/ml) versetzt und in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersberg) mindestens 16h bei 68 °C unter ständigem durchmischen inkubiert.

2x Prehybridisierungslösung:

100xDenhardt	50 ml
20xSSC	250 ml
0,5M NaPO ₄ , pH 6,8	100 ml
100 mM Na ₄ P ₂ O ₇	10 ml
ddH ₂ O	90 ml

5µl cDNA wurden mit dem "Megaprime Kit" (Amersham) in einem Volumen von 25µl nach Angaben des Herstellers mit 5µl ³³P-ATP markiert. Nach Abschluss der Reaktion (ca. 5 Stunden) wurden die Proben mit Hilfe des "Nucleotide Removal Kit" (Qiagen) gereinigt und mit 400µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 eluiert.

Danach wurde 15 ml Hybridisierungspuffer + 150 µl tRNA (Roche, 10 mg/ml) auf 70 °C im Wasserbad erhitzt und die radioaktiv markierte und gereinigte cDNA Probe 10 min bei 100 °C denaturiert.

Hybridisierungspuffer:

20xSSC	250 ml
10% SDS	10 ml
ddH ₂ O	740 ml

Die cDNA Probe und der Hybridisierungspuffer wurden vermischt und gegen die Prehybridisierungslösung ausgetauscht. Dabei musste dringend darauf geachtet werden, daß die Temperatur in der Hybridisierungslösung konstant bleibt.

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 68 °C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie zweimal in 2xSSC, 0,1% SDS (2x 20 min, 42 °C) und zweimal in 0,2xSSC, 0,1% SDS (20 min, 42 °C; 60 min, 65 °C) gewaschen. Danach wurden sie 3x mit ddH₂O gespült und getrocknet.

2.8. Proteinanalytische Methoden

2.8.1. Lyse von Zellen mit Triton X-100

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 10,0 µg/ml Leupeptin, 1

mM PMSF, 10 mM Natriumfluorid, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10,00). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

2.8.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der "Micro BCA Protein Assay Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, und ist in Mikrotiterplatten durchführbar (Redinbaugh und Turley, 1986).

Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-2000 µg Protein/ml) eingesetzt.

2.8.3. Immunpräzipitation von Proteinen

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

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Antikörper und Protein, erleichtert (Hjelm *et al.*, 1972; Chenais *et al.*, 1977).

Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A-Sepharose und 1-5 µg MAK oder 3-10 µl PAK zu den Zellysaten gegeben und für 6-8 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% Triton X-100) gewaschen und in 30 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

2.8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach Ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergens SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekt werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodaß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung.

Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 13% nach 7,0%. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die

Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

<u>Protein</u>	<u>MG (in kd)</u>
Myosin	205,0
β-Galaktosidase	116,25
Phosphorylase b	97,4
BSA	66,2
Ovalbumin	42,7
Carboanhydrase	29,0
Trypsin-Inhibitor	21,5
Lysozym	14,4

2.8.5. Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

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

2.8.6. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

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

2.8.7. Immundetektion (Western-Blot Analyse)

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

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Western-Blot Analyse wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt.

Der Filter wurde u.N. bei 4 °C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach 4x15 min mit NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem zweiten Antikörper in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte,

Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (Amersham) wurde der Blot schließlich 4x15 min in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter für 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Striplösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoäthanol, 2% SDS) bei 50 °C für 1 h entfernt werden.

2.8.8. *In vitro* Phosphataseaktivität gegenüber pNPP

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

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

Die Zellyse erfolgte ohne die Phosphataseninhibitoren NaF und ortho-Vanadat. Erhaltene Zellysate wurden mit Phosphatase-spezifischen Antikörpern angereichert und mit 150 μ l des pNPP Puffers bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 N NaOH wurde die Reaktion gestoppt und anschließend konnte die Absorption der Lösung bei 405 nm in einer Mikrotiterplatte mit einem Plattenphotometer (Dynatech MR 500) bestimmt werden.

2.8.9. c-src *in vitro* Kinaseassay

C-src wurde aus den Zellysaten mit dem α -src CT Antikörper immunpräzipitiert, dreimal mit 1xHNTG und einmal mit 1xKinase Puffer (20 mM Hepes, pH 7,0; 10 mM MnCl₂) gewaschen. Die Immunpräzipitate wurden anschließend halbiert: eine Hälfte wurde mit 5 μ Ci γ ³²P-ATP und 5 μ g Enolase für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit 2x Laemmli-Pufferversetzt; die andere Hälfte wurde direkt mit Laemmli-Puffer vermischt. Die Proben wurden über 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die radioaktiv markierten Proben wurden auf einer Phosphoimagerplatte exponiert und ausgewertet, und die nicht-radioaktiven Proben wurden mit α -src CT Antikörper im Immunoblot detektiert.

Vorbehandlung der Enolase:

- Enolase mit Kinase-Puffer auf 5 μ g/ μ l verdünnen
- 20 μ l verdünnte Enolase mit 20 μ l Acetat-Puffer (50 mM Na-Acetat, pH3,3 in 50 mM Essigsäure) mischen
- 5 min bei 30°C inkubieren
- auf Eis abkühlen und bei -20°C lagern

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 gezüchtet. 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 Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem "Coulter Counter" Zellzählgerät (Coulter Electronics, USA).

2.9.2. Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen.

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

2.9.3. Transfektion von Säugerzellen

2.9.3.1. Transfektion von Säugerzellen mit Kalziumphosphat

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

BBS (2x):	50 mM	BES
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na_2HPO_4
	pH 6,96 (2M NaOH)	

Am Abend vor der Transfektion wurden pro 3,5 cm Schale 2×10^5 Zellen in 2 ml Medium ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Pro Transfektion wurden 4 μl Plasmid-DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit 86 μl Wasser und 10 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Vortexen 100 μl BBS (2x) zugetropft. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese in 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit normalem Medium oder serumfreiem Medium gewaschen und bis zur Verwendung für 24 Stunden bei 8% CO_2 inkubiert. Zur Transfektion von größeren Zellzahlen wurde die Menge des benötigten Präzipitats nach dem jeweiligen Mediumvolumen und nicht nach der Wachstumsfläche berechnet. Die zu transfizierenden Fibroblasten wurden in 4, 8 und 20 ml auf eine 6, 10 oder 15 cm Schale ausgesät, so daß jeweils das 2-, 4- oder 10-fache des oben beschriebenen Ansatzes transfiziert wurde.

Bei Ko-Transfektionen wurden die verschiedenen Expressionsplasmide im Gewichtsverhältnis 1:1 eingesetzt bzw. die Expressionsplasmide mit dem Kontrollplasmid auf jeweils insgesamt transfizierte DNA-Menge aufgefüllt.

Für die Herstellung viraler Überstände wurden Phoenix A Zellen nach dem Protokoll von G. Nolan mit Kalziumphosphat transfiziert. 2×10^6 Zellen wurden am Vorabend auf 6 cm Schalen ausgesät und 24 h später mit nach dem folgenden Protokoll transfiziert:

10 μ l Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l) wurde mit 439 μ l Wasser und 61 μ l einer 2,0 M CaCl_2 -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Vortexen 500 μ l 2x HBS (pH 7,0) zugetropft. Die Zellen wurden inzwischen mit 4 μ l 50 mM Chloroquine vorbehandelt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen gegeben und 8 h bei 37°C und 8% CO_2 inkubiert. Das Medium wurde 8 h und 24 h nach der Transfektion abgesaugt und mit frischem serumhaltigem Medium ersetzt. Nach der Transfektion wurde ausschließlich im S2-Labor gearbeitet.

2.9.3.2. Transfektion von Säugerzellen mit der DOSPER Methode

Eine weitere Transfektionsmethode von DNA in Säugerzellen basiert auf der Verwendung kationischer, liposomaler Reagentien. DOSPER (1,3-Di-Oleoyloxy-2-[6-Carboxy-spermyl]-propyl-amid) ist ein kationisches Lipid mit einer positiv geladenen Spermingruppe, welche mit negativ geladenen DNA-Molekülen assoziieren kann. Diese Bindung resultiert in einer Formation eines polykationischen Komplexes, welcher nicht-spezifisch an die Zelloberfläche adsorbiert. Daraufhin wird der DNA-Komplex von der Zelle aufgenommen.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Öffnung einer 6-Lochschale ausgesät. Zur Transfektion wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Ansatz A:

2 μ g DNA
 48 μ l HBS-Puffer
 50 μ l

Ansatz B:

15 μ l DOSPER-Lösung
 35 μ l HBS-Puffer
 50 μ l

HBS-Puffer: 20 mM Hepes (pH 7,4)
 150 mM NaCl

Ansatz B wurde zu Ansatz A pipettiert, leicht geschüttelt und anschließend für 15 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Serum-freiem Medium gewaschen und anschließend 1 ml dieses Mediums zugegeben. Danach wurden 60 μ l des Transfektionsansatzes auf die Zellen getropft und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Medium mit 20% FCS, so daß sich eine Endkonzentration von 10% FCS einstellte.

2.9.3.3. Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine®

Das polykationische Lipofectamine lagert sich, ähnlich wie DOSPER, an DNA an und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen. Wie bei der DOSPER Methode wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Öffnung einer 6-Lochschale ausgesät. Zur Transfektion wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Ansatz A:

20 µl Lipofectamine®
180 µl Serumfreies Medium
200 µl

Ansatz B:

4 µg DNA
196 µl Serumfreies Medium
200 µl

Ansatz B wurde zu Ansatz A pipettiert, leicht geschüttelt und anschließend für 45 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde zu den Ansätzen 1800 µl serumfreies Medium zugegeben, gemischt und die fertigen Transfektionsansätze auf die Zellen getropft (von welchen das Medium kurz davor abgesaugt wurde) und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Medium mit 20% FCS, so daß sich eine Endkonzentration von 10% FCS einstellte.

2.9.3.4. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test wurden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der β -Galaktosidase wie unter 2.8.3.1. - 2.8.3.3. beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen und 10 min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2%iger Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blau-färbung transfizierter Zellen 60 min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4mg/ml) inkubiert.

2.9.4. Retroviraler Gentransfer und Selektion in Säugerzellen

Am Vortag der Infektion wurden 2×10^5 Zielzellen auf 6 cm Schalen ausgesät. Zur Infektion wurde an den 24 h vorher transfizierten Phoenix A Zellen (Kalziumphosphat-Methode-siehe 2.8.3.1.) ein Medienwechsel vorgenommen und für 4 h bei 37°C weiter inkubiert. So gab man den Phoenix A Zellen Zeit infektiöse Viren zu bilden. Danach wurde dieses Medium mit einer 5ml Spritze abgenommen und durch frisches ersetzt. Das abgenommene Medium mit den frischgebildeten infektiösen Viren wurde nun mit einem 45 µm Filter sterilfiltriert, auf die Zielzellen pipettiert und bei für 4 h bei 37°C inkubiert. Das frische Medium auf den Phoenix A Zellen wurde ebenfalls erst nach 4 h für weitere Infektionen abgenommen, filtriert und auf die Zielzellen pipettiert. Die Inkubationszeit des Mediums auf den Phoenix A wurde mit 4 h optimiert, weil die Halbwertszeit der aktiven Viren so ein infektiöses Maximum erwarten ließ.

Nach der letzten Infektion wurden die infizierten Zielzellen mit frischem Medium und Tetrazyklin (1 µg/ml) versorgt und nach 1-2 Tagen (bei Erreichen annähernder Konfluenz) auf 15 cm Schalen umgesetzt. Nach einem weiteren Tag wurde mit der 10-15 tägigen (je nach Zelllinie) Selektion begonnen. Die Selektion erfolgte entweder mit 100 µg/ml Neomycin (für SFG-tcITE1 Infektionen) oder mit Hygromycin B (für SFG-t7EC3M/PHS Infektionen). Die Hygromycin B Konzentration variierte von 100-350 µg/ml je nach Zelllinie.

Nach der Selektionsphase wurden die resistenten Zellklone mittels Klonierungsringen oder Pipettenspitzen in 24-Loch- oder 12-Lochschalen überführt und weiter kultiviert. Die Klone wurden bei angemessener Dichte auf je 3 Löcher einer 6-Loch-Schale umgesetzt. Die Zellen in einem dieser Löcher wurden ohne Tetrazyklin kultiviert (Induktionskontrolle) und die Zellen in den beiden anderen Löchern wurden mit Tetrazyklin kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen des induzierten und des nicht induzierten Loches lysiert und anschließend

mit Immunpräzipitation (2.7.3.) und Western Blot (2.7.7.) analysiert. Die Zellen des 3. Loches (uninduziert) wurden eingefroren (2.8.1.).

2.9.5. Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz ermöglicht es durch Anwendung eines spezifischen primären Antikörpers und eines Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpers das betreffende Antigen in Zellen oder Geweben zu lokalisieren. 5000 MCF7 Zellen wurden in 12-Loch Schalen auf 12 mm Glasplättchen ausgesät, 6 Tage in An-, bzw. Abwesenheit von 2 µg/ml Tetrazyklin kultiviert, 2 mal mit kaltem PBS gewaschen, und entweder 10 min bei RT mit Formaldehyd (4% Formaldehyd, 0,125M Sucrose, 1xPBS) oder 5 min bei -20 °C mit Methanol, gefolgt von 30 Sekunden in Aceton fixiert. Danach wurde wiederum 2 mal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellmembran wurde mit 0,5% Saponin in 1xPBS/0,02% NaN₃ permeabilisiert und wiederum mit kaltem PBS gewaschen.

Die Formaldehyd-fixierten Zellen wurden mit einer Aldehydblockinglösung (100 mM Glyzin, 0,1% NaBorhydrid in 1xPBS pH 7,4-8,4) 10 min auf Eis behandelt um Autofluoreszenz der Aldehydseitenketten zu unterbinden. Danach wurde wieder mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 1 hr bei in einer feuchten Kammer in PBG + 5% Serum inkubiert um alle unspezifischen Bindungen abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (α VSV p5d4, 1:500 von 1 µg/µl in PBG+5%Serum) für 1 hr oder über Nacht. Ungebundener Antikörper wurde 3 mal 10 min mit PBS herausgewaschen. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 hr bei RT (α Maus-Cy3, 1:500 in PBG+5%Serum) erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS (10 min). In den nächsten drei Waschschriffen mit PBS wurde Benzamidin (1:1000 im mittleren Waschschriff) für die Kernfärbung beigemischt. Die Glasplättchen wurde mit dH₂O abgespült, mit der Zellseite nach unten auf einem Deckglas mit Mounting Medium fixiert und 1 Tag bei 4 °C getrocknet.

2.9.6. Zellzählexperimente

Infizierte Zellen wurden mit einem Zellzählmeßgerät analysiert um erste Anhaltspunkte über die Proliferationsrate von PTP α -stabilen Zellen zu gewinnen. Die Zelllinien wurden in verschiedenen Zelldichten (abhängig von der Wachstumsrate der Zellen) auf 10 cm Schalen ausgesät und 6 Tage mit oder ohne (=Induktion) Tetrazyklin kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA trypsiniert und in 5 ml Medium aufgenommen. 250 µl dieser Zellsuspension wurde dann mit 20 ml Isotonlösung vermischt und mit einem Zellzählmeßgerät gezählt (Coulter Counter, Coulter Electronics, USA).

2.9.7. Stimulation der DNA-Synthese [(³H)-Thymidin-Einbau]

Durch (³H)-Thymidin-Einbau kann die Menge an neusynthetisierter DNA gemessen und somit das mitogene Potential quantifiziert werden (Baserga, 1985). Dazu wurden Zellen in verschiedenen Dichten auf 12-Lochschalen ausgesät und dann in der Anwesenheit oder der Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. In jede Kulturöffnung wurde 0,5 µCi (Methyl-³H)-Thymidin pipettiert. Sechs Stunden später wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Proteine mit 0,5 ml 10% Trichloressigsäure pro Öffnung 20 min auf Eis ausgefällt. Nach Absaugen der Trichloressigsäure wurden Zellmembranen durch Zugabe von 200 µl 0,2 N NaOH/0,2% SDS lysiert und die freigesetzte, radioaktiv markierte DNA in Szintillationsröhrchen, in denen 10 ml Szintillationscocktail (Roth) vorgelegt worden waren, überführt. Schließlich

wurde mit 0,2 N HCl nachgespült und neutralisiert. Die Quantifizierung der eingebauten Radioaktivität erfolgte im ^3H -Kanal eines Szintillationszählers (Kontron).

2.9.8. FACS Analyse

Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl auf 100 mm Schalen ausgesät und sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von $2\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin kultiviert. Anschließend wurden sie mit Trypsin abgelöst, gezählt und 1×10^6 Zellen wurden in ein PE-Röhrchen überführt. Nach abzentrifugieren wurden sie mit einmal mit PBS gewaschen und schließlich in 1 ml Na-Citratpuffer resuspendiert (0,1% NaCitrat 1mg/ml; 0,1% Triton X-100 in ddH₂O). Die Zellkerne wurden in diesem hypotonischen Puffer mit 50 μl Propidiumiodid (1 mg/ml) für 60 min im dunkeln bei 4 °C angefärbt. Die Analyse erfolgte mittels eines FacsCalibur Durchflußzytometers (BD Biosciences) durch Anregung bei 488 nm mit einem Argon Laser und Detektion über einen 585 nm Bandpassfilter.

2.9.9. Stimulation von Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen und der Einfluß der PTP α auf jene untersucht werden (Kozma *et al.*, 1991).

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

<u>Faktor:</u>	<u>Konzentration:</u>	<u>Zeit:</u>
EGF	50 ng/ml	5 min
Heregulin	5 ng/ml	5 min
Insulin	5×10^{-7} M	5 min
IGF-1	25 ng/ml	5 min
aFGF		5 min
Pervanadat	0,1 mM	30 min

Zur Inhibition von PTPs wurden die Zellen jeweils mit frisch hergestellter Peroxyvanadatlösung (POV) behandelt. Dazu wurde 968 μl einer 100 mM Natriumorthovanadatlösung mit 34 μl 30%iger H₂O₂ versetzt (entspricht 0,1 mM Natriumorthovanadat und 3×10^{-7} M H₂O₂), in einer Verdünnung von 1:100 auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

3. Ergebnisse

Die reversible Phosphorylierung von Tyrosinresten ist ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der Steuerung von intrazellulären Signalkaskaden und den daraus resultierenden physiologischen Vorgängen. Dauer und Ausmaß dieser Tyrosinphosphorylierung werden durch ein streng kontrolliertes Gleichgewicht von Proteintyrosinkinasen (PTK_n) und Proteintyrosinphosphatasen (PTP_n) kontrolliert. Die Störung dieses empfindlichen Wechselspiels durch exogene Faktoren, Mutationen und/oder Überexpressionen daran beteiligter Komponenten kann zu Veränderungen im Signaltransduktionsnetzwerk führen, verbunden mit pathophysiologischen Konsequenzen wie Diabetes oder Krebs.

Im Rahmen des hier beschriebenen Teilprojektes sollte die postulierte Tumorsuppressorfunktion von Proteintyrosinphosphatasen (PTP_n) im Mammakarzinomsystem untersucht werden. Die Studie besteht aus einem molekulardiagnostischen Teil, in welchem die Genexpressionen von PTP_n in Tumorzelllinien und Biopsien mit Hilfe der "cDNA-Array"-Technologie untersucht werden, und einen funktionsanalytischen Teil, um die physiologische Bedeutung ausgewählter PTP_n in Brustkrebszelllinien mittels gezielter Manipulation zu untersuchen.

3.1. cDNA-Array Analyse

cDNA-Arrays eröffnen die Möglichkeit die Expression tausender unterschiedlicher Gene nicht nur in Zelllinien, sondern auch in gesundem und pathologischen Gewebe simultan zu analysieren. Die schnelle und kostengünstige Durchführung stehen dabei bei dieser Technologie im Vordergrund (Joussen und Huang, 2001). Als am besten geeignete Array-Trägermaterialien werden üblicherweise Nitrozellulose oder Glass verwendet. In der Regel werden bekannte cDNA Sequenzen auf die Nitrozellulose, bzw. bekannte Oligonukleotidsequenzen auf Glasträger als Sonden aufgebracht. Aus Geweben oder Zelllinien isolierte RNA wird als cDNA umgeschrieben, entweder radioaktiv oder fluoreszenzmarkiert und mit dem Array inkubiert. Die zu untersuchende cDNA bindet an komplementäre Sequenzen auf dem Array (eine sogenannte Hybridisierung) und kann über die radioaktive Markierung oder die Fluoreszenz an jedem einzelnen Punkt detektiert und quantifiziert werden. Die Verwendung von Nitrozellulose als Trägermatrize und die radioaktive Markierung der cDNA wird allgemein als die empfindlichste Detektionsmethode anerkannt (Schulze und Downard, 2000). Um die Expression der Phosphatasen auf

Transkriptionsebene mit Hilfe der cDNA-Technologie zu untersuchen, wurde als erstes eine Serie neuer Nitrozellulosemembranen, mit einer erheblich erweiterten Zahl in Zusammenhang mit Signaltransduktion interessanter Gene, hergestellt. Insgesamt wurden hierbei die Sonden von 663 Genen (Tyrosin-Kinasen und -Phosphatasen, Serin/Threoninkinasen und -Phosphatasen, Proteasen, Wachstumsfaktoren, und Apoptose-assoziierte Gene u.a.) auf die Membranen aufgebracht.

Die Sonden waren in pBluescript klonierte cDNA Sequenzen zwischen 200 bp und ca. 4000 bp Länge. Diese Sonden wurden als Duplikate in folgender 4x4 Anordnung auf die Filter aufgetragen:

2	6	2	3
1	4	7	5
7	8	3	6
1	5	4	8

Viele Gene wurden durch mehrere pBluescript-Sequenzen und folglich mehreren Sonden abgedeckt. Die Redundanz der Sonden und das Auftragen als Duplikate steigert die Reproduzierbarkeit der Signale und somit die Zuverlässigkeit der Daten.

Die Filter wurden mit den cDNAs der einzelnen Zelllinien hybridisiert, gewaschen, getrocknet

und auf einer Phosphoimagerplatte exponiert. Durch das Einlesen mit einem Phosphoimager konnte die Schwärzung der Signale ermittelt werden. Die Schwärzung von Pixeln in den erhaltenen Bilddateien wurde mit Hilfe des Programmes "Array Vision" anschließend in Signalintensität in Zahlen umgerechnet. Entsprechende Daten wurden in tabellarischer Form als Rohdaten im Excel-Format präsentiert. Die absolute Signalstärke der Sonden aller Arrays ist von einer Vielzahl von Parametern abhängig. Beispiele wären die Qualität der cDNA, die Effizienz der Markierungsreaktion, das Alter des radioaktiv markierten dATP, mögliche Verluste bei der Aufreinigung der Probe, die Hybridisierungsbedingungen, die Expositionszeit der Phosphoimagerplatte und die unterschiedliche Länge der cDNA Sonden durch die nur relative Bewertungen möglich sind. Daher ist es notwendig die Daten zu normalisieren um die Signale untereinander vergleichbar zu machen, d.H. jeder Wert wurde durch die Summe aller Werte des betreffenden Arrays geteilt.

Auf der Grundlage dieser Filter wurden 24 Brustzelllinien (21 Krebszelllinien und 3 immortalisierte Brustepithelzelllinien) und 44 Biopsien (38 Tumore und 6 normale Brustgewebe) analysiert. Abb. 5 zeigt Beispiele für die Hybridisierung dieser Filter mit der cDNA zweier Zelllinien.

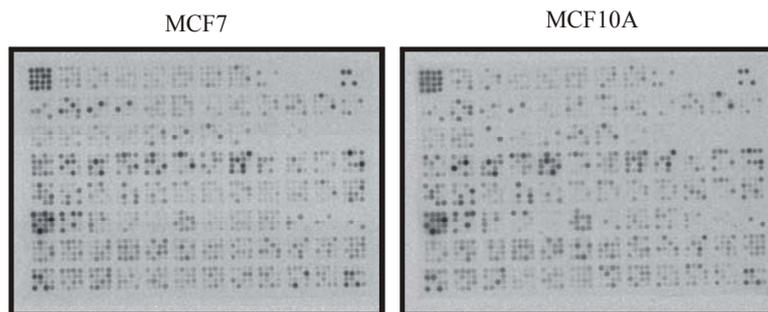


Abb. 5: cDNA-Arrays der eigens hergestellten Nitrozellulosefilter. Die Filter wurden mit radioaktiv-markierten (^{33}P -ATP) cDNAs der Zelllinien MCF7 (links) oder MCF10A (rechts) hybridisiert, gewaschen, getrocknet und anschließend 48 Stunden auf einer Phosphoimagerplatte exponiert. Die Signale wurden mit einem Phosphoimager quantifiziert und mit der "Array Vision" Software ausgewertet.

3.1.1. Brustkrebszelllinien

Das Expressionsmuster der PTP α wurde mit der cDNA-Array Technologie ermittelt und wird in Abb. 6 graphisch dargestellt. Eine Nitrozellulosemembran wie oben beschrieben wurde für jede einzelne cDNA der dargestellten Zelllinien hybridisiert, gewaschen, getrocknet und 48 Stunden auf einer Phosphoimagerplatte exponiert. Die Signale wurden mit einem Phosphoimager eingelesen, mit "Array Vision" quantifiziert und anschließend normalisiert. Dargestellt sind die Expressionsdaten dieser Tyrosinphosphatase in 24 Brustzelllinien. Die drei Zelllinien Ac745, MCF10A und HBL100 werden als immortalisierte nicht-tumorigene Zelllinien verstanden.

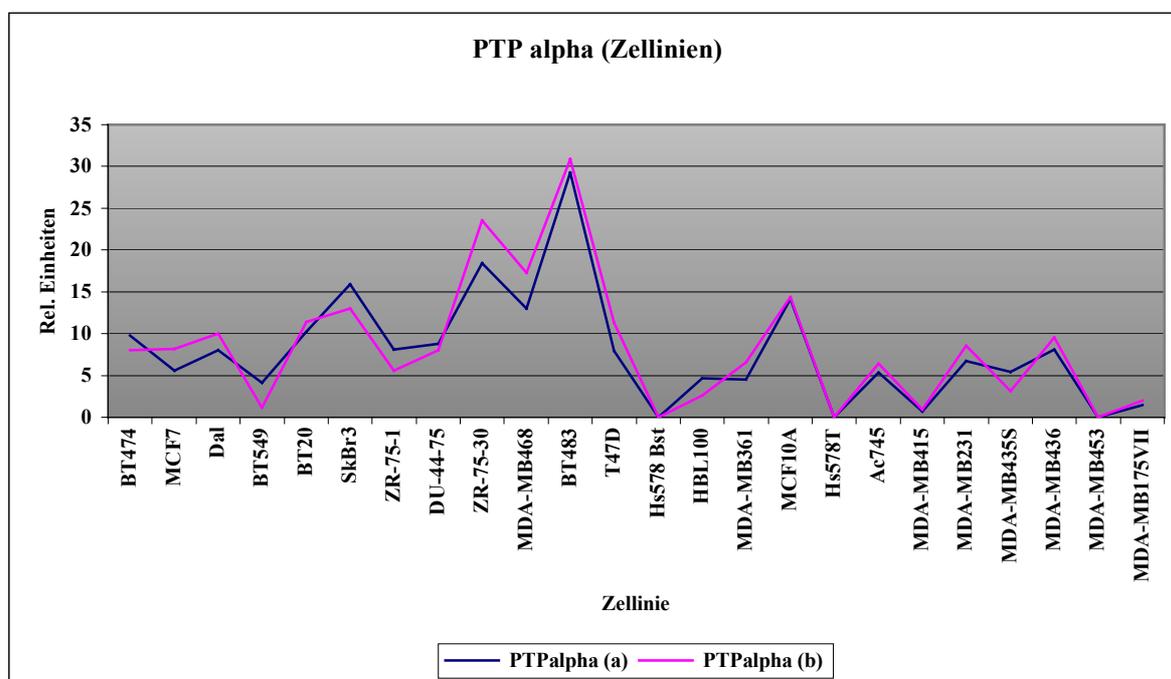


Abb. 6: cDNA-Array Analyse der PTP α Expression in Brustkrebszelllinien. Die ermittelten normalisierten Daten aus den Hybridisierungen mit den cDNAs der einzelnen Zelllinien wurde für beide PTP α Sonden (a) und (b) graphisch dargestellt. Die Abweichung der beiden Sonden untereinander ist sehr gering.

3.1.2. Primäres Brustgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 38 Biopsien von Brusttumoren und 6 Biopsien aus "normalem" Gewebe untersucht. Die normalen Biopsien konnten ihren entsprechenden Tumorbiosien aus den gleichen Patienten zugeordnet werden; d.H. ein Biopsiepaar aus 6 Patienten konnte analysiert werden. Diese Biopsien wurden einerseits verwendet um eine Expressionsanalyse der PTP α mittels cDNA-Arrays durchzuführen, und andererseits um anhand der verfügbaren klinischen Parametern entsprechende Korrelationen zu der Expression dieser Phosphatase herstellen zu können. Die Hybridisierung und die anschließende Auswertung der Nitrozellulosefilter wurde durchgeführt wie oben beschrieben.

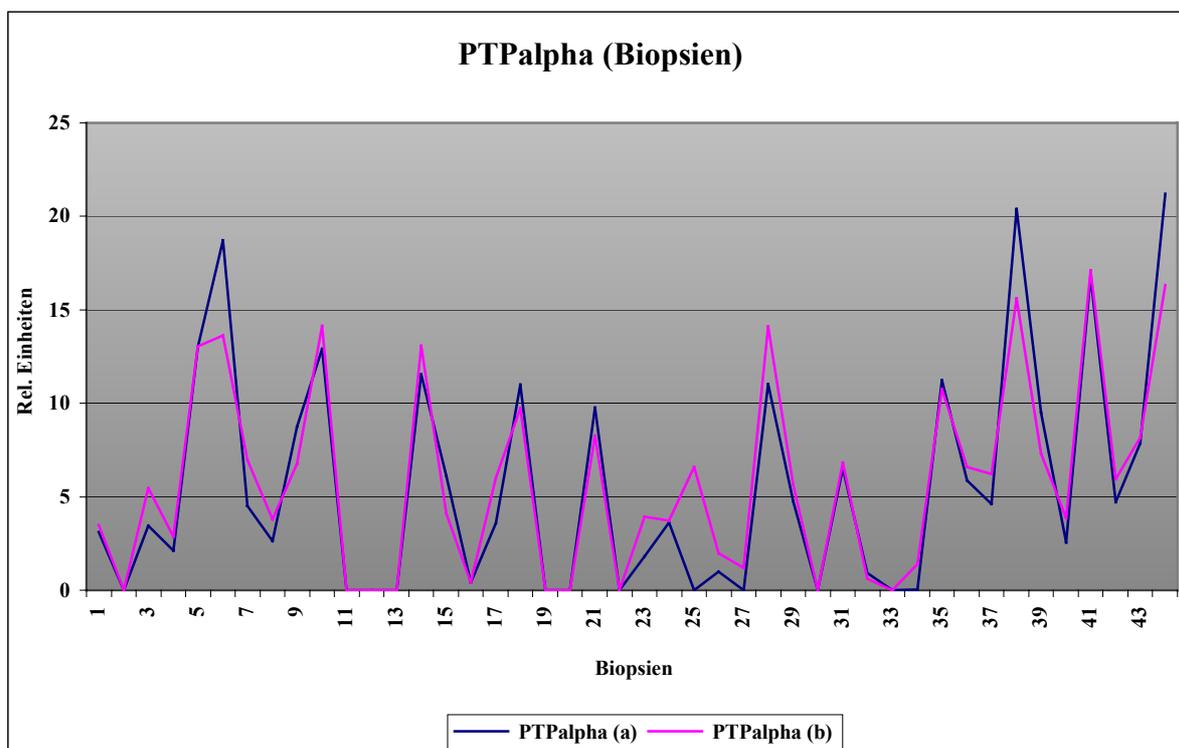


Abb. 7: cDNA-Array Analyse der PTP α Expression in Biopsien der Brust. Die ermittelten normalisierten Daten aus den Hybridisierungen mit den cDNAs der einzelnen Zelllinien wurde für beide PTP α Sonden (a) und (b) graphisch dargestellt. Die Abweichung der beiden Sonden untereinander ist sehr gering. Die Biopsien wurden von 1 bis 44 durchnummeriert. Genaue Beschreibungen hierzu wurden in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Expressionsdaten von Brustkrebszelllinien konnten zum einen denen immortalisierter Brustepithelzellen zum Vergleich gegenübergestellt werden. Dadurch läßt sich zeigen, daß PTP α in den meisten Brustkrebszelllinien (15/21) stärker exprimiert wird als in den

immortalisierten Brustepithelzelllinien, wie beispielsweise Ac745. Eine erhöhte Expression des PTP α Proteins wurde bereits in humanen Brust Tumoren (15/51 Tumore) beschrieben (Ardini et al, 2000). Eine höhere Expression der PTP α konnte auch in den Biopsien dieser Arbeit in einem vergleichbaren Verhältnis gezeigt werden: in 2 der 6 Biopsiepaare konnte eine stärkere Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Expression in 15 der 32 weiteren Tumorbiopsien war erhöht, konnte aber nicht direkt mit gesundem Gewebe aus dem gleichen Patienten verglichen werden.

Biopsie	Bezeichnung	Alter	Stadium	TNM	ER
1	Norm. Br 1356	-			
2	BC 1356	-			
3	Norm. 15153	-			
4	Tum. 15153	-			
5	Norm. 14860	-			
6	Tum. 14860	-			
7	Norm. 15856	-			
8	Tum. 15856	-			
9	Norm. 19044/93II	-			
10	Tum. 19044/93II	-			
11	Norm. 991	-			
12	Tum. 991	-			
13	10670/92	82	IIIB	T2N4M0	+
14	11697/92	67 †	IIIB	T2N4M0	+
15	10681/92	51	I	T1N0M0	0
16	6735/92	37	IV	T2N0M1	0
17	13932/92	45	IIIB	T4N2M0	0
18	12166/92	45	IIIB	T2N2M0	+
19	5382/92	56 †	IIIB	T4N2M0	0
20	8566/93	68			0
21	11820/92	41	IIIB	T4N4M0	0
22	14879/93	46	IIB	T3N0M0	+
23	16353/92	51	IIIB	T4N4M0	0
24	9354/93	49	IIIA	T2N2M0	0
25	10555/92	77 †	IIA	T2N2M0	+
26	8335/92	57			0
27	14724/93	48	III	T2N2M0	0
28	11218/93	59 †	IV	T2N3M2	+
29	10150/93	69	IIIB	T2N4M0	0
30	8786/93	77	II	T1N2M0	+
31	13316/93	71	IIIA	T2N2M0	+
32	9796/93	46	IIA	T2N0M0	+
33	8481/93	57 †	III	T2N2M0	0
34	8114/93	35	IIIB	T4N2M0	+
35	13232/93	61	IIIA	T2N4M0	0
36	11189/92T	-			
37	11526/92T	-			
38	12015/92	-			
39	12120/92T	-			
40	3637T	57	II+	T2N1M0	+
41	3638T	-	II+	T1N1M0	+
42	3631T	61	III+	T4N1-8M0	+
43	184T	80	I-0	T1N0M0	0
44	3640T	40	II+	T2N1M0	+

Tabelle 1: Patientendaten der Brustkrebsbiopsien. Die Biopsien wurden von 1-44 durchnummeriert. "Alter" bezieht sich auf das Alter des Patienten bei der Probeentnahme. Verstorbene Patienten wurden mit "†" gekennzeichnet. "TNM" ist eine Klassifizierung für das Tumorstadium (T), Lymphknotenmetastasierung (N) und Metastasierung zu anderen Bereichen des

Körpers (M). "ER" ist eine Einteilung in Estrogenrezeptor-positive (+) oder -negative (0) Tumoren auf Grund immunohistochemischer Analysen. Nichtangegebene Daten waren nicht verfügbar.

Die cDNA-Arrays eignen sich nicht nur um ein Expressionsprofil der PTP α anzufertigen, sondern auch um Expressionskorrelationen mit den übrigen ausgewählten Genen auf den Filtern anzustellen. Dabei konnte für diese PTP ein korrelierendes Expressionsprofil mit anderen signaltransduktorisch interessanten Genen ermittelt werden. Exemplarisch werden in der Abb. 8 die Expressionsdaten von PTP α und c-src, und in Abb. 9 die Expressionsdaten von PTP α und dem Estrogenrezeptor alpha graphisch dargestellt:

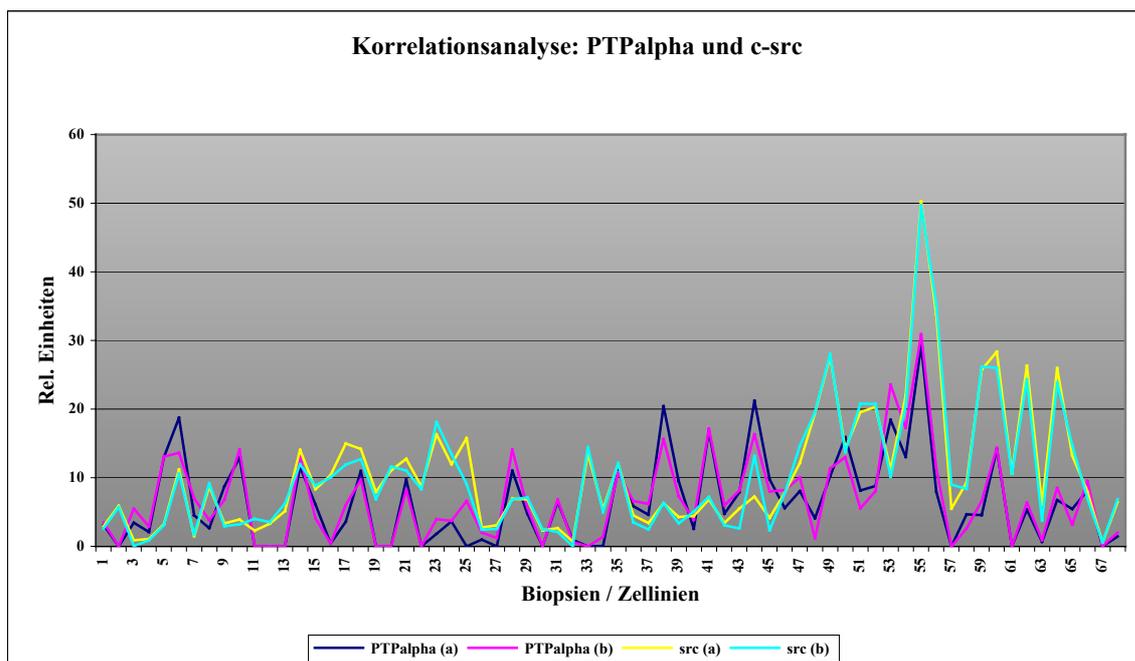


Abb. 8: cDNA-Array Analyse der PTP α Expression und c-src Expression. Die Tumorbiospien (1-44) und Brustzelllinien (45-68) sind identisch zu Abb.7 und Abb.6, wurden hier jedoch zusammen dargestellt. Auch in diesem Fall ist eine nur sehr geringfügige Abweichung der normalisierten Expressionsdaten beider Sonden festzustellen. Genaue Beschreibungen zu den Biopsien oder den Zelllinien sind in Tabelle 1, bzw. Tabelle 2 aufgeführt.

Wie schon in 1.3.6 beschrieben besteht ein direkter zellulärer Zusammenhang zwischen PTP α und c-src. In Fibroblasten (NIH3T3 und embryonale Fibroblasten aus PTP α ^{-/-}-Mäusen) konnte bisher die Dephosphorylierung des inhibitorischen C-terminalen Tyrosinrests von c-src (folglich die Aktivierung der Kinase) durch die Phosphatase und die Phosphorylierung des Y798 von PTP α durch c-src demonstriert werden. Eine hohe Proteinexpression und spezifische Aktivität von c-src wurde bisher für die Brustkrebszelllinien SkBr3, BT-483, MDA-MB 468 und MDA-MB 435S gezeigt (Egan et al, 1999). Bislang wurde aber keine entsprechende Expressionskorrelation zwischen PTP α und c-src auf Grund der Erkenntnisse in diesen untersuchten Zelllinien beschrieben. Eine Korrelationsanalyse zwischen den beiden

Genen ist in Abb. 8 dargestellt. Besonders bei den bereits erwähnten Zelllinien SkBr3, BT-483 und MDA-MB 468 konnte eine Expressionskorrelation nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Profil kann für die Biopsien nur bedingt festgestellt werden, wird aber bei den Zelllinien auffälliger (siehe auch Abb. 6).

Zelllinie	Bezeichnung	Zelllinie	Bezeichnung
45	BT474	57	Hs578 Bst
46	MCF7	58	HBL100
47	Dal	59	MDA-MB361
48	BT549	60	MCF10A
49	BT20	61	Hs578T
50	SkBr3	62	Ac745
51	ZR-75-1	63	MDA-MB415
52	DU-44-75	64	MDA-MB231
53	ZR-75-30	65	MDA-MB435S
54	MDA-MB468	66	MDA-MB436
55	BT483	67	MDA-MB453
56	T47D	68	MDA-MB175VII

Tabelle 2: Aufstellung der Brustkrebszelllinien. Die Zelllinien wurden von 45-68 durchnummeriert.

Ein korrelierendes Expressionsprofil konnte auch für PTP α und dem Östrogenrezeptor alpha festgehalten werden (siehe Abb. 9). Zwischen dem Östrogenrezeptor und dem Brusttumorstadium steht ein direkter Zusammenhang: fehlende Östrogenrezeptor-Expression wurde mit einer schlechten Prognose beim Brustkrebs in Verbindung gebracht und östrogenrezeptor-negative Zelllinien (z.B. BT549, MDA-MB 435S, MDA-MB 436, MDA-MB 231 und Hs578T) sind in der Regel invasiver als die estrogenrezeptor-positiven (Thompson et al, 1992). Die Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus könnte daher eine Korrelation zwischen der PTP α Expression und dem Tumorstatus zulassen.

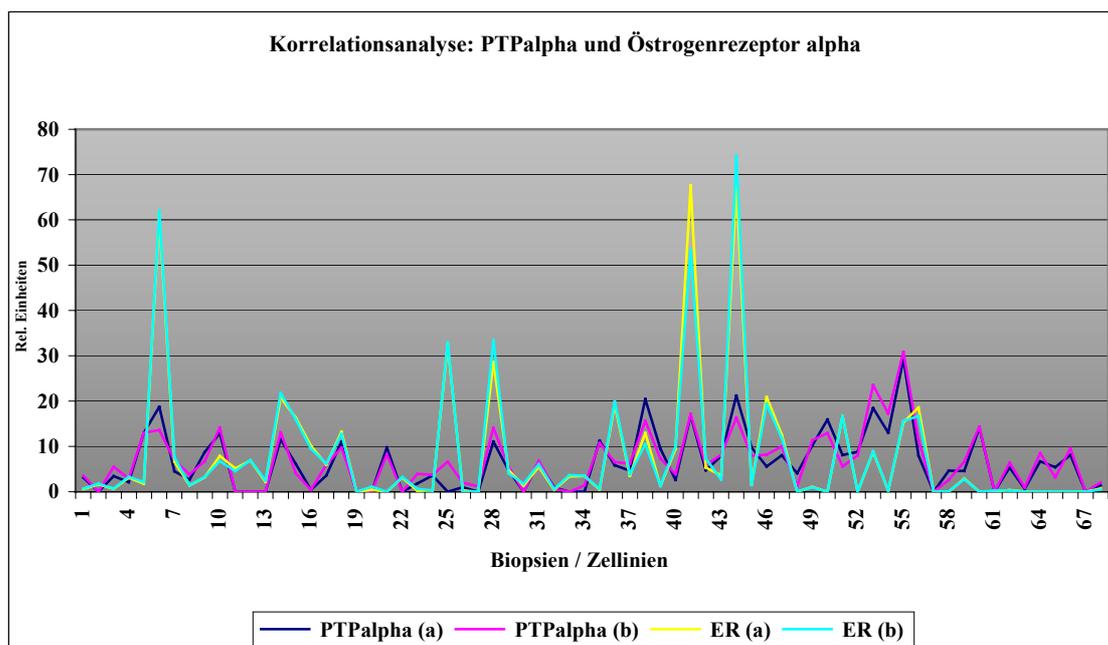


Abb. 9: cDNA-Array Analyse der PTP α Expression und Östrogenrezeptor- α Expression. Die normalisierten Daten der beiden PTP α und Östrogenrezeptor (ER) Sonden wurden für jede Zelllinie ermittelt und einzeln dargestellt. Die Tumorbiopsien (1-44) und die Brustzelllinien (45-68) wurden wie in Abb.8 aufgeführt.

3.2. cDNA-Array Validierung

3.2.1. mRNA Expression

Im folgenden wurden die mittels cDNA-Array-Technik erstellten Analysen für PTP α auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht. Northern Blot Analysen wurden mit 13 Zelllinien durchgeführt. Jeweils 3 μ g mRNA der entsprechenden Zelllinien wurden hierfür verwendet. Als Probe diente eine der gesamten Länge entsprechende Sequenz. Unter Berücksichtigung der β -actin Sonde konnte auch hier eine niedrigere PTP α Expression in der immortalisierten Zelllinie Ac745, und besonders hohe Expressionen in den Tumorzelllinien ZR-75-30 sowie BT-483 detektiert werden.

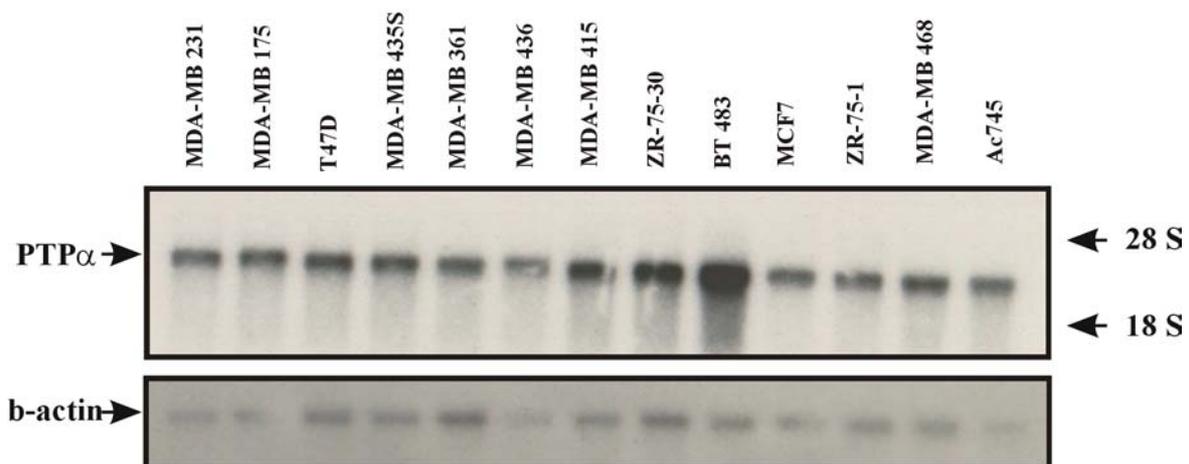


Abb. 10: Northern Blot Analyse von PTP α in ausgewählten Brustkrebszelllinien. Ac745 ist eine immortalisierte Zelllinie.

3.2.2. Protein Expression

Die Proteinexpression wurde mittels Immunpräzipitation und Western Blot Analyse untersucht. Auffällig sind hier die niedrigen Expressionen in den immortalisierten Epithelzelllinien (HBL100 und MCF10A) und die stärksten Expressionen in den östrogenrezeptor-positiven Zelllinien (BT474, Dal, MDA-MB 175, MDA-MB 361, T47D und ZR-75-30; siehe Abb. 11). PTP α konnte endogen in diesen Brustkrebszelllinien lediglich mit einer Mobilität von 130 kd ermittelt werden, da die 100 kd Isoform (nur N-glykosyliert) mit diesen Antikörpern nicht zu detektieren war. Bemerkenswert ist dabei die unterschiedliche

Mobilität in den untersuchten Zelllinien. Weil die 130 kDa Bande der N- und O-glykosylierten Isoform der Phosphatase entspricht, könnten die unterschiedlichen Mobilitäten variierende N- und O-glykosylierungsmuster darstellen. Die Zelllinie mit der höchsten PTP α Expression in den Arrays und in den Northern Blots (BT-483) wurde nicht im Western Blot analysiert, weil sich diese Zellen sehr langsam teilten und die für die Immunpräzipitation erforderliche Menge Gesamtzellysat somit nicht erreicht werden konnte.

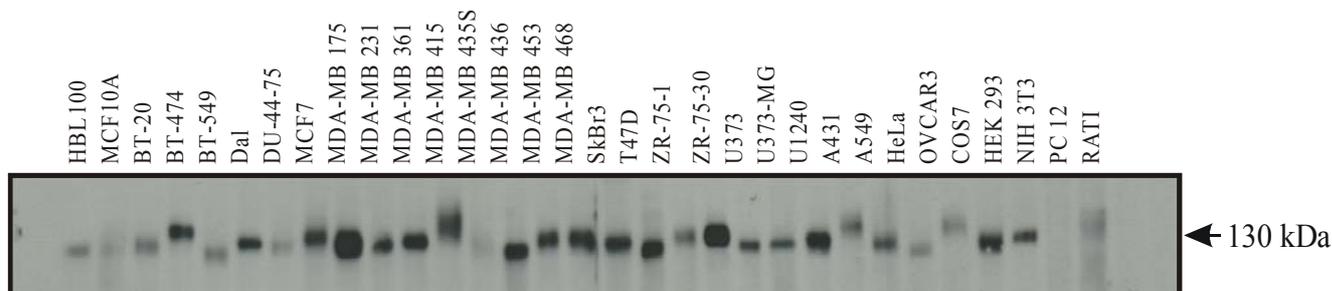


Abb. 11: Die Proteinexpression der PTP α in Brustkrebszelllinien. Die Zelllinien wurden bis ca. 70%-iger Konfluenz in ihren vorgeschriebenen Medien kultiviert. Nach der Zellyse wurde endogene PTP α mit monoklonalem Anti-PTP α -Antikörper (PTP α -D₂) immunpräzipitiert und mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte eine Immunoblotanalyse mit polyklonalem Anti-PTP α -Antikörper (PTP α -CT).

Die mRNA- und Protein-Expressionsdaten wurden densitometrisch quantifiziert um ihre Übereinstimmung mit den Expressionsdaten aus der Array-Analyse ermitteln zu können. Dieser Vergleich wird in Abb. 12 gezeigt. Eine große Übereinstimmung konnte bei den folgenden Zelllinien nachgewiesen werden: BT549, Dal, MCF7, MDA-MB 175, MDA-MB 231, MDA-MB 361, MDA-MB 415, MDA-MB 435S, MDA-MB 436, T47D und ZR-75-30.

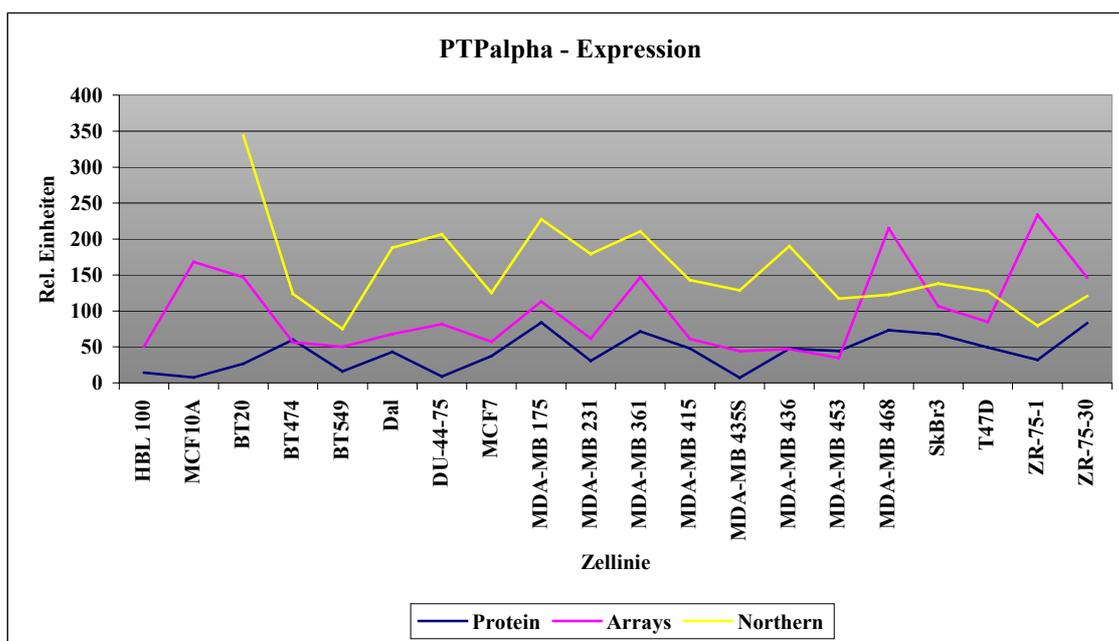


Abb. 12: Übereinstimmung der cDNA-Array-, Northern Blot- und Western Blot-Daten. Die Northern- und Western Blots wurden eingelese und densitometrisch quantifiziert. Die ermittelten Daten konnten somit den normalisierten cDNA-Array Werten graphisch zum Vergleich gegenüber gestellt werden.

Die Expressionskorrelation zwischen der PTP α und dem Östrogenrezeptor läßt sich auf Proteinebene zumindest für die Zelllinien sehr gut validieren. Für die überwiegende Mehrheit der Zelllinien konnte eine klare Übereinstimmung der Expressionsmuster beider Proteine erkannt werden. Östrogenrezeptor-positive Zelllinien scheinen daher auch mehr PTP α Protein zu exprimieren als die östrogenrezeptor-negativen.

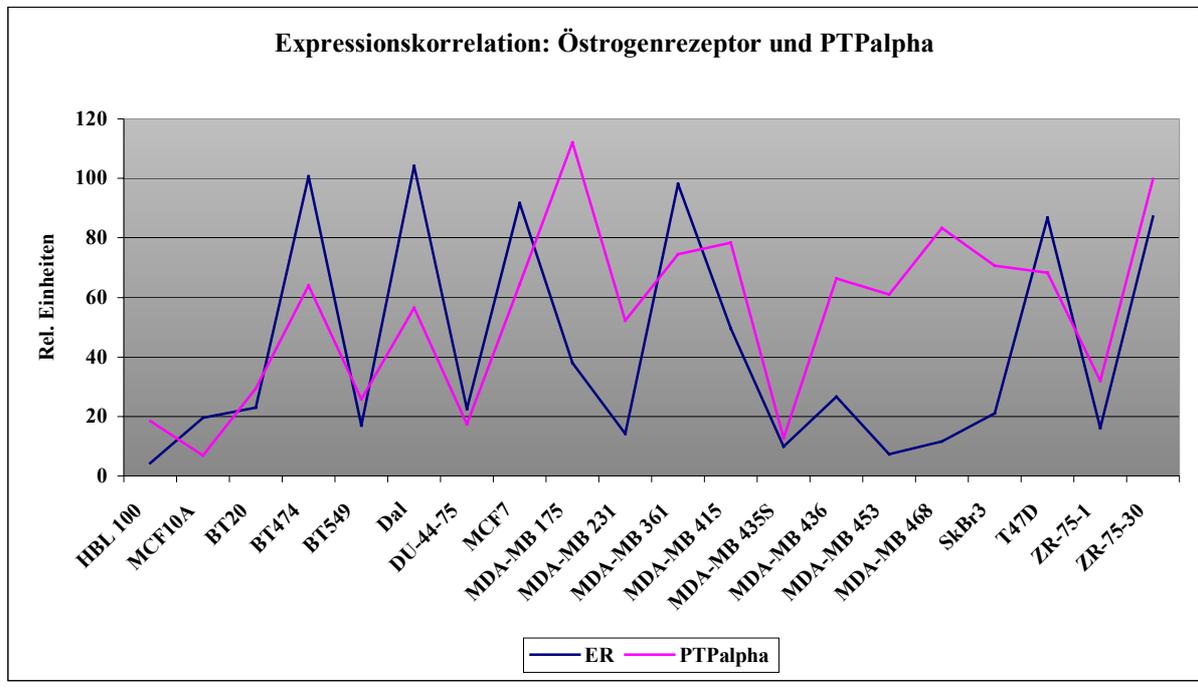


Abb. 13: Proteinvalidierung PTP α und Östrogenrezeptor.

3.3. Funktionelle Untersuchungen zu PTP α

Auf der Basis der über Array-Technologie ermittelten Korrelationsdaten und Befunde anderer, daß die in Brusttumoren hochregulierte PTP α Mitglieder der SRC-Kinase-Familie aktivieren kann, sollte PTP α hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der Förderung der neoplastischen Transformation oder der Fortschreitung von Brusttumoren untersucht werden. Die c-src-Aktivierung durch diese Phosphatase wurde bisher lediglich in Fibroblasten untersucht und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 14). Eine auf das Brustgewebe erweiterte Rolle wurde noch nicht bestätigt.

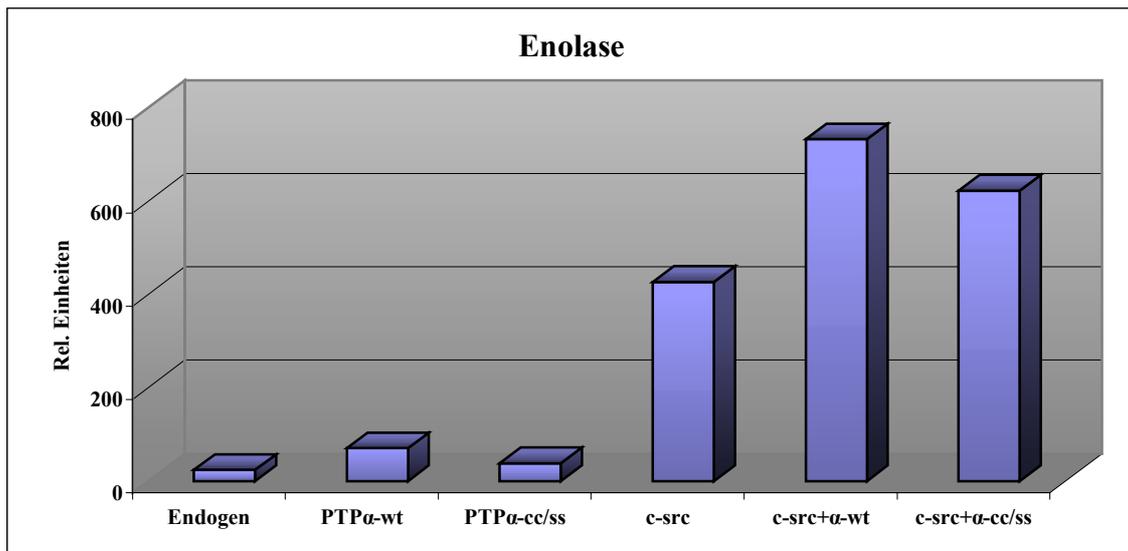


Abb. 14: Transienter c-src *in vitro* Assay in HEK-293. c-src wurde von Vektor-transfizierten (Endogen) oder transfizierten (c-src, PTPα wt, PTPα cc/ss alleine, oder c-src zusammen mit PTPα wt oder PTPα cc/ss) HEK-293 Zellen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mit γ - 32 P-ATP und dem exogenen Substrat Enolase inkubiert, über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit einem Phosphoimager quantifiziert.

Aufgrund der erhaltenen Daten wurde daher begonnen die PTPα und eine entsprechende katalytisch inaktive Mutante (die sogenannte "CS"-Mutante) in Mammakarzinomzelllinien induzierbar zu exprimieren, um deren Relevanz für krebscharakteristische Parameter zu untersuchen.

3.3.1. Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der PTPα sollten stabil exprimierende Brustkrebszelllinien erzeugt werden. Da sich konstitutive Expression in selbst sehr geringem Ausmaß für verschiedene zu untersuchende PTPs als toxisch erwies, mußte zunächst ein geeignetes induzierbares Genexpressionssystem entwickelt werden. Zu Beginn dieser Arbeit stand das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem zur Verfügung (Gossen und Bujard, 1992). Die Grundlage dieses Tet-Off Systems bildeten zwei Vektorkomponenten. Der erste Vektor trägt die von einem konstitutiv aktiven Promotor getriebene Transaktivator (tTA) Sequenz. Das zu untersuchende Zielgen wurde in den zweiten Vektor kloniert und konnte durch einen CMV-Minimalpromotor, dem zur Tetrazyklin-abhängigen Bindung von tTA sieben Tet-Operator-Sequenzen als Tetrazyklin-reguliertes Element vorgelagert sind, in seiner Expression reguliert werden. Der tTA bindet an dieses Tetrazyklin-regulierte Element in der Abwesenheit von Tetrazyklin und initiiert somit die Transkription des dahinterliegenden Zielgens durch Rekrutierung der eukaryontischen Polymerase II. Die

Kultivierung der Zellen in der Anwesenheit von Tetrazyklin führt zu einer Konformationsänderung des tTA. Die Bindung des tTA an den Promotor wird dadurch verhindert und die Expression des Zielgens unterdrückt.

Durch die Arbeit mit bestehenden und der Etablierung verschiedenster neuer Zelllinien wurden die Nachteile dieses Systems deutlich. Da sich Tumorzelllinien meist sehr schlecht transfizieren lassen, dieses System jedoch auf einen Gentransfer durch Transfektion angewiesen war, konnten eine Reihe interessanter Zelllinien nicht berücksichtigt werden. Das zweite Plasmid mit dem Zielgen konnte nur über eine Kotransfektion mit einem dritten Hygromycin-vermittelten Vektor selektioniert werden. Ein weiteres Problem lag in der Instabilität der induzierbaren Komponenten. Mit zunehmender Kultivierungsdauer der Zellen konnte eine Verringerung der Expressionsstärken von tTA und Zielgen, somit also eine Verringerung der Induzierbarkeit festgestellt werden. Auf Grund des konstitutiv aktiven Promotors konnte bei vielen Klonen eine unterschiedlich starke Basalaktivität des tTA detektiert werden. Diese Klone konnten in der Abwesenheit von Tetrazyklin zwar immer noch induziert werden, bei negativ-regulatorisch oder sogar toxischen Genen aber wäre das System bedingt durch die Basalaktivität nicht geeignet gewesen.

Ein geeignetes induzierbares Expressionssystem musste sich also durch eine verbesserte Stabilität der Komponenten und möglichst geringe Basalaktivität auszeichnen, zugleich aber auch den Gentransfer in ein möglichst breites Tumorzellspektrum mit hoher Effizienz erlauben. Diese Aspekte wurden durch die Verwendung eines auf retroviraler Basis beruhenden Expressionssystems gewährleistet. Der Gentransfer durch Infektion versprach nicht nur die Etablierung dieses Systems in weniger gut transfizierbaren Zelllinien, sondern auch die erforderliche Stabilität des Systems auf Grund der Integration in das Wirtsgenom.

3.3.2. Retrovirales Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem

Das verbesserte Tetrazyklin-induzierbare System basiert auf zwei SFG-Vektoren (Bueler und Mulligan, 1996), dem Prinzip des obigen Systems entsprechend. Ein Vektor trägt das unter einem CMV-Promotor kontrollierte tTA Gen und der andere Vektor trägt das unter einem Tetrazyklin-regulierbaren LTR-Promotor kontrollierte Zielgen (Lindemann et al, 1997). Der Ursprung des ersten Vektors war ein Tetrazyklin-induzierbares Ein-Vektor System, auf dem die Kodierungssequenzen des Zielgens und des tTA zusammengefaßt waren. Beide waren über eine IRES Sequenz miteinander verknüpft und wurden unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren CMV-Minimalpromotors als bicistronische mRNA exprimiert. Da

dieses ursprüngliche Ein-Vektor System nicht über ein Selektion ermöglichendes Resistenzgen verfügte, wurde eine Kodierungssequenz für Neomycin-Phosphotransferase an die Stelle des Zielgens gesetzt. Durch das daraus resultierende retrovirale Plasmid SFG-tcITE1-Neo konnten das Transaktivatorprotein und die Selektion ermöglichende Neomycin-Phosphotransferase von dem Tetrazyklin-induzierbaren Minimalpromotor kontrolliert werden (Ruhe, diese Arbeitsgruppe).

Der zweite Vektor trägt die Kodierungssequenz des Zielgens. Die multi-cloning-site wurde hier mit den Erkennungssequenzen NcoI, EcoRI, AscI, NruI, FseI, SacII, MluI, NotI und BamHI durch zwei zueinander komplementäre Oligonukleotiden für eine effizientere Einklonierung verschiedener Zielgene erweitert. Um eine Selektion dieses Plasmids ebenfalls zu ermöglichen, musste auch hier ein durch einen eigenen Promotor kontrolliertes Resistenzgen eingeführt werden. Das Gen für die Hygromycin-B Phosphotransferase wurde unter die Kontrolle des schwachen HSV-TK Promotors gestellt, um zu verhindern, daß die konstitutive Aktivität des Promotors oder möglichen Enhancer-Elemente zu einer höheren Basalexpression des Zielgens führen würden. Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung beider dem System zugrunde liegenden Plasmide:

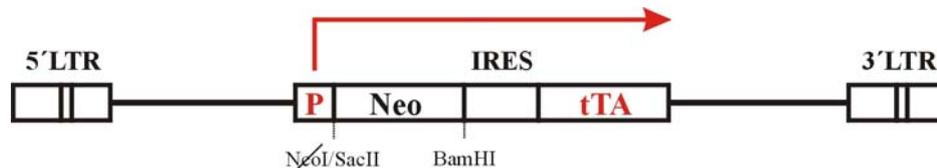


Abb. 15a: Schematische Darstellung des retroviralen Transaktivator-Plasmids SFG-tcITE1-Neo.

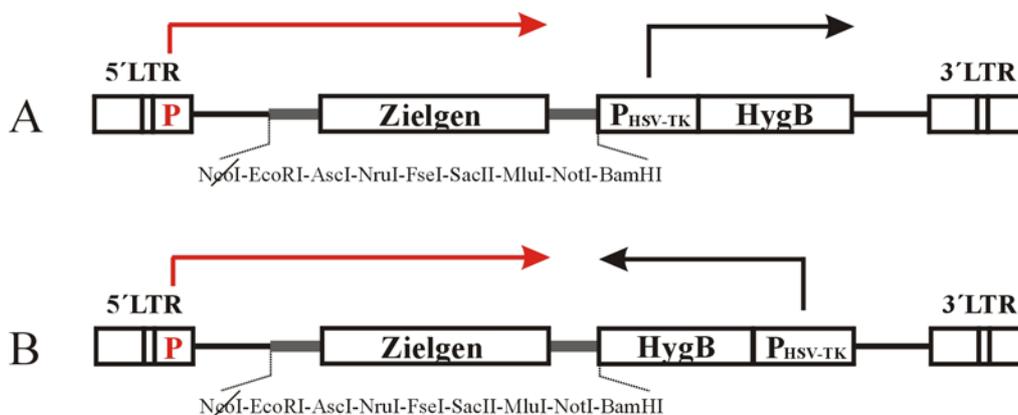


Abb. 15b: Schematische Darstellung der retroviralen Transaktivator-Plasmide SFG-t7EC3-MCS-PHS (A) und SFG-t7EC3-MCS-SHP (B).

Das Resistenzgen des Vektors SFG-t7EC3-MCS wurde in beiden Orientierungen zum Zielgen eingeführt. Die daraus resultierenden Vektoren SFG-t7EC3-MCS-PHS (gleiche Orientierung zum Zielgen) bzw. SFG-t7EC3-MCS-SHP (gegenläufige Orientierung zum Zielgen) wurden gegeneinander geprüft um eventuelle Einflüsse auf die Expression des Zielgens auszuschließen. Für diesen Zweck wurde die Kodierungssequenz der Tyrosinphosphatase PTP-H1 oder PTP-MEG1 in die multi-cloning-site kloniert und in die Verpackungszelllinie Phoenix E transfiziert. Die produzierten Retroviren wurden für Infektionen der stabilen Transaktivator-exprimierenden murinen Fibroblasten NIH3T3 herangezogen, mit Hygromycin-B selektioniert und durch Kultivierung ohne Tetrazyklin induziert. Nach der Lyse wurden die gleichen Lysatmengen über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem N-terminalen PTP-H1 oder einem C-terminalen PTP-MEG1 Antikörper detektiert (Abb. 16).

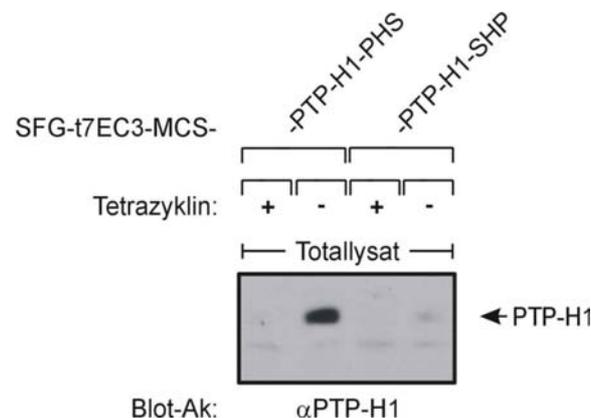


Abb. 16: Vergleich zwischen SFG-t7EC3-MCS-PHS und SFG-t7EC3-MCS-SHP anhand von PTP-H1. Die Orientierung des Resistenzgens Hygromycin-B-Phosphotransferase wurde durch die Tetrazyklin-induzierbare Expression von PTP-H1 und PTP-MEG1 in NIH3T3 Zellen überprüft (PTP-MEG1 wird nicht gezeigt). Die Kodierungssequenz der PTP-H1 wurde in die beiden Vektoren SFG-t7EC3-MCS-PHS und SFG-t7EC3-MCS-SHP kloniert und in Phoenix E Verpackungszellen transfiziert. Transaktivator-exprimierende NIH3T3 Zellen wurden mit den viralen Überständen infiziert, selektioniert und anschließend induziert. Gleiche Mengen des Zelllysates wurden über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem N-terminalen PTP-H1 Antikörper detektiert.

Aus diesem Experiment heraus ergaben sich zwei Erkenntnisse: zum einen konnte bei beiden Vektoren (SFG-t7EC3-MCS-PHS oder SFG-t7EC3-MCS-SHP) in Anwesenheit von Tetrazyklin keinerlei Basalaktivität für die Expression von PTP-H1 oder PTP-MEG1 festgestellt werden. Zum anderen war eine klar schwächere Expression des Zielgens durch den Vektor SFG-t7EC3-MCS-SHP zu bemerken. Aus diesen Gründen wurde für die weiteren Experimente die Verwendung des anderen Vektors (SFG-t7EC3-MCS-PHS) für die induzierbare Expression der PTP α als geeigneter gehalten.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß dem Aspekt der reduzierten Basalaktivität dadurch Rechnung getragen wurde, daß dem System mit der Expressionskontrolle des Transaktivators selbst ein zusätzliches Regulationselement eingeführt wurde und sich dieses in einer deutlich verringerten Basalexpression des eigentlichen Zielgens auswirkt. Es wurde somit ein System generiert, welches durch die Transaktivator-bedingte Abhängigkeit der beiden Promotoren nicht nur die Tetrazyklin-abhängige Expression des Zielgens, sondern auch des tTA über einen autoregulatorischen Loops regulieren kann.

3.3.3. Erzeugung Transaktivator-stabiler Brustzelllinien

Ein induzierbar-exprimierender Transaktivator-klon der Zelllinie MCF7 wird in Abb. 17a exemplarisch für alle Zelllinien dargestellt. Die stabilen Transaktivator-exprimierenden Zelllinien wurden auf ihre Induzierbarkeit hin untersucht. Nach einer Induktionsdauer von 6 Tagen (Kultivierung in Anwesenheit, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin) wurden die einzelnen Klone lysiert, gleiche Lysatmengen über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Dabei konnte mittels Western Blot Analyse mit einem Transaktivator-spezifischen Antikörper festgestellt werden, daß der autoregulatorische Loop des Vektors SFG-tcITE1-Neo keinerlei detektierbare Basalaktivität, d.H. mit diesem Antikörper detektierbare Expression des Transaktivators, zuließ.

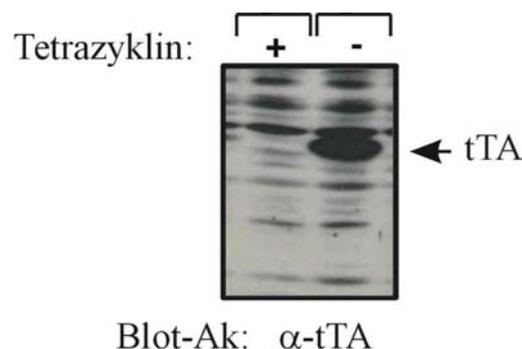


Abb. 17a: Stabil exprimierender Transaktivator (tTA)-Klon der Zelllinie MCF7. Der Klon wurde zu jeweils gleichen Zellzahlen ausgesät und entweder in Anwesenheit (+) oder in Abwesenheit (-) von Tetrazyklin (2µg/ml) 6 Tage kultiviert, anschließend lysiert und als Pärchen über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose konnte die Expression des Transaktivators (43kDa) mit einem VP-16-spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden.

Unter Verwendung des Transaktivator-kodierenden Plasmids wurden zunächst folgende, den Transkriptionsfaktor stabil exprimierende Zelllinien über Infektion hergestellt:

	Zelllinie	Zelltyp
1.	MDA-MB 231	Brustkrebs
2.	MDA-MB 361	Brustkrebs
3.	MDA-MB 435S	Brustkrebs
4.	MDA-MB 436	Brustkrebs
5.	MDA-MB 453	Brustkrebs
6.	MDA-MB 468	Brustkrebs
7.	BT 20	Brustkrebs
8.	BT 549	Brustkrebs
9.	ZR-75-1	Brustkrebs
10.	SKBr3	Brustkrebs
11.	T47D	Brustkrebs
12.	MCF7	Brustkrebs
13.	MCF10A	Immortalisiert

Zweierlei konnte hierbei beobachtet werden: die Infizierbarkeit der Zelllinien und auch die Induzierbarkeit der erhaltenen stabilen Klone gingen sehr weit auseinander. MDA-MB 468 und ZR-75-1 waren beispielsweise sehr schwer zu infizieren und konnten aus diesem wenig effizienten Gentransfer heraus auch sehr schlecht induziert werden. Bei anderen Zelllinien, wie beispielsweise BT-474 und ZR-75-30 war es nicht möglich mit diesem System stabil infizierte Transaktivator-exprimierende Klone zu erzeugen.

Eine Übersicht über die Induzierbarkeiten ausgewählter generierter Transaktivatorzelllinien wird in Abb. 17b gezeigt.

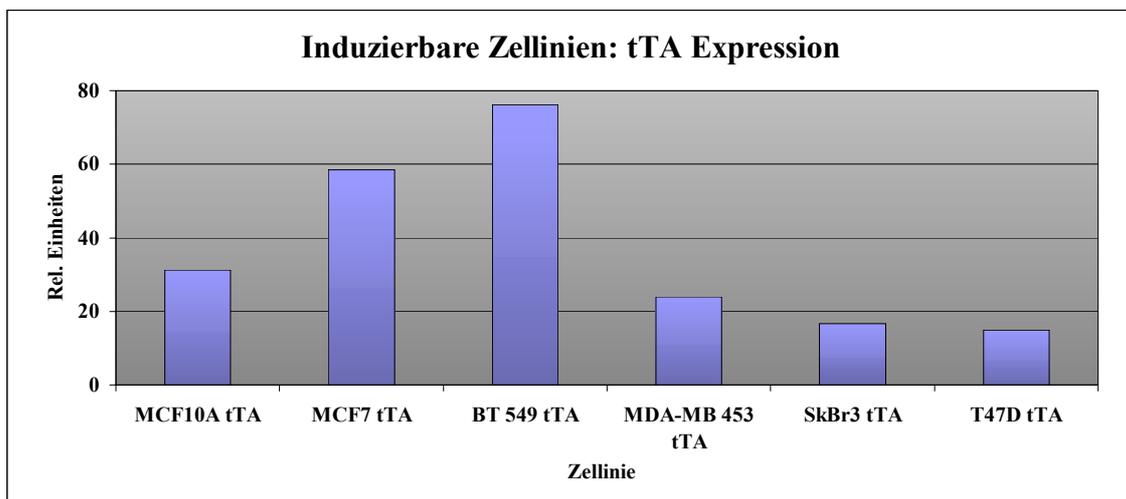


Abb. 17b: Stabil exprimierende Transaktivator (tTA) Zelllinien. Die Klone der abgebildeten stabilen Transaktivator-Zelllinien wurden wie in Abb. 19a beschrieben kultiviert und weiter behandelt. Die Signale wurden densitometrisch quantifiziert und als Induzierbarkeiten für jedes Pärchen eines Klones ausgewertet.

3.3.4. Erzeugung induzierbar exprimierender PTP α -Brustzelllinien

Für die Herstellung der PTP α Zelllinien mußte zunächst die Wild-Typ (wt) Form und eine katalytisch inaktive Mutante (cc/ss) bereitgestellt werden, um sie anschließend in den Vektor SFG-t7EC3-MCS-PHS als Zielgene einklonieren zu können. Die PTP α cc/ss-Mutante wurde der PTP α -wt und der am nächsten verwandten PTP ϵ im pNPP-Assay gegenübergestellt (Abb. 18). Dieser PTP-Assay zeigt deutlich, daß die cc/ss-Mutante der PTP α tatsächlich katalytisch inaktiv ist. Beide katalytisch essentiellen Cysteine wurden in diesem Falle mutiert, weil eine Restaktivität der PTP-Domäne II für PTP α schon mehrmals beschrieben wurde (Wang und Pallen, 1991). Eine höhere Aktivität der PTP ϵ im Vergleich zur PTP α zumindest mit dem artifiziellen Substrat pNPP konnte ebenfalls festgestellt werden.

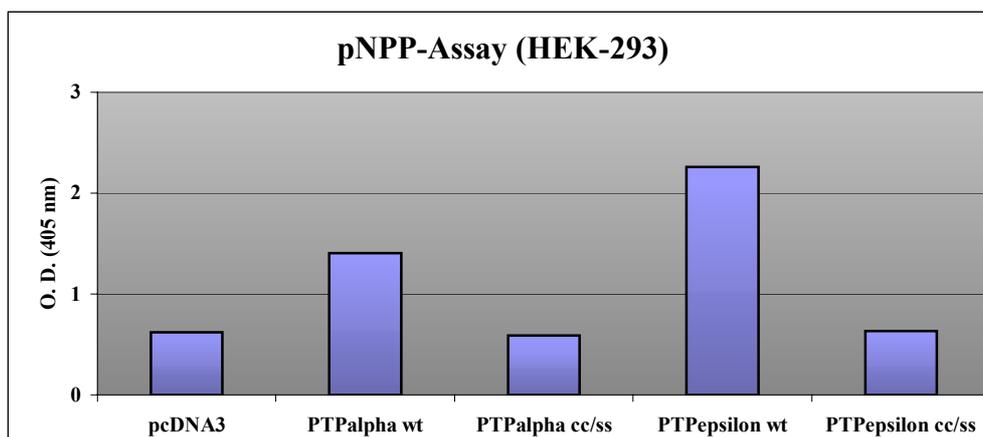


Abb. 18: Die *in vitro* Phosphataseaktivität der PTP α und PTP ϵ . Die *in vitro* Aktivität der PTP α -cc/ss Mutante wurde mit Hilfe von pNPP als artifizielles Substrat wie unter 2.7.8. beschrieben quantifiziert. PTP ϵ diente hierbei als nächste Verwandte der PTP α als Kontrolle. Gezeigt wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Bestimmungen.

Im Vorfeld wurde damit begonnen erhaltene Transaktivator-exprimierende Klone der einzelnen Zelllinien zu überprüfen, und in Bezug auf Induzierbarkeit, Infizierbarkeit und den bereits bekannten Expressionsdaten geeignete Klone auszusuchen. Relevante Transaktivator-stabile Brustzelllinien wurden im folgenden zur Infektion mit VSV-markierter PTP α -wt bzw. katalytisch inaktiver -cc/ss-Mutante induzierbar exprimierendem Sekundärplasmid (SFG-t7EC3-MCS-PHS) herangezogen. Zahlreiche Klone mußten in zeitlich aufwendigem Screening auf die Induzierbarkeit eines jeden Konstruktes hin getestet werden. Insgesamt wurden schließlich jedoch folgende doppelt-stabile (Transaktivator+Zielgen) Zelllinien generiert:

Abb. 19: Expressionskinetik des Transaktivators und des Zielgens. Die Zellen wurden, wie im Text beschrieben, behandelt und nach den angegebenen Zeiten das Tetrazyklin entzogen (+ = Kultivierung in Anwesenheit von Tetrazyklin). Immunpräzipitate und Gesamtzellsate wurden unabhängig voneinander über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot analysiert. Die dargestellte Expressionskinetik des Transaktivators und des Zielgens der Zelllinie MDA-MB453 konnte durch 5 weitere generierte Zelllinien bestätigt werden.

Die Expression des Transaktivators konnte frühestens nach drei Tagen Induktion mit diesem Antikörper detektiert werden. Auch bei den weiteren Zelllinien (BT-549, MCF7, MCF10A, SkBr3 und T47D) konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Ein Expressionsplateau wurde bereits nach vier Tagen erreicht. Das Zielgen konnte vor dem vierten Tag nach Entzug des Antibiotikums noch nicht detektiert werden. Eine schwache Expression der PTP α war erst ab dem fünften Tag zu detektieren. Im Falle der Zelllinie MDA-MB453 wurde die maximale Expressionsstärke am achten Tag nach der Induktion erreicht; in MCF7 aber, war dies bereits am sechsten Tag der Fall. In allen Zelllinien konnte die Induktion des Zielgens mit einer Verzögerung von einem Tag im Vergleich zur Induktion des Transaktivators beobachtet werden.

Auffällig war auch die klare induzierte Bande bei 110 kDa. Diese Isoform konnte endogen in keiner der Zelllinien detektiert werden und wurde hier deutlich schwächer exprimiert als die 130 kDa Form. Das Auftauchen dieser Variante ist wahrscheinlich auf die induzierte Überexpression der PTP α zurückzuführen.

Nach Kultivierung der Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin konnte somit klar gezeigt werden, daß dieses System keinerlei Basalaktivität zuließ. Weder die Expression des Transaktivators, noch die des Zielgens waren zu detektieren. Erst nach drei Tagen Tetrazyklin-Entzug konnte ausreichend genug Transaktivator in den Zellen gebildet werden, um einen gewissen erforderlichen Schwellenwert zu überschreiten, und somit dessen eigene Expression und die des Zielgens über die beiden Transaktivator-abhängigen Promotoren in detektierbarem Maße voranzutreiben. Um eine mögliche Feinregulierung des Systems zu erhalten, wurde die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Mengen an Antibiotikum untersucht (Abb. 20).

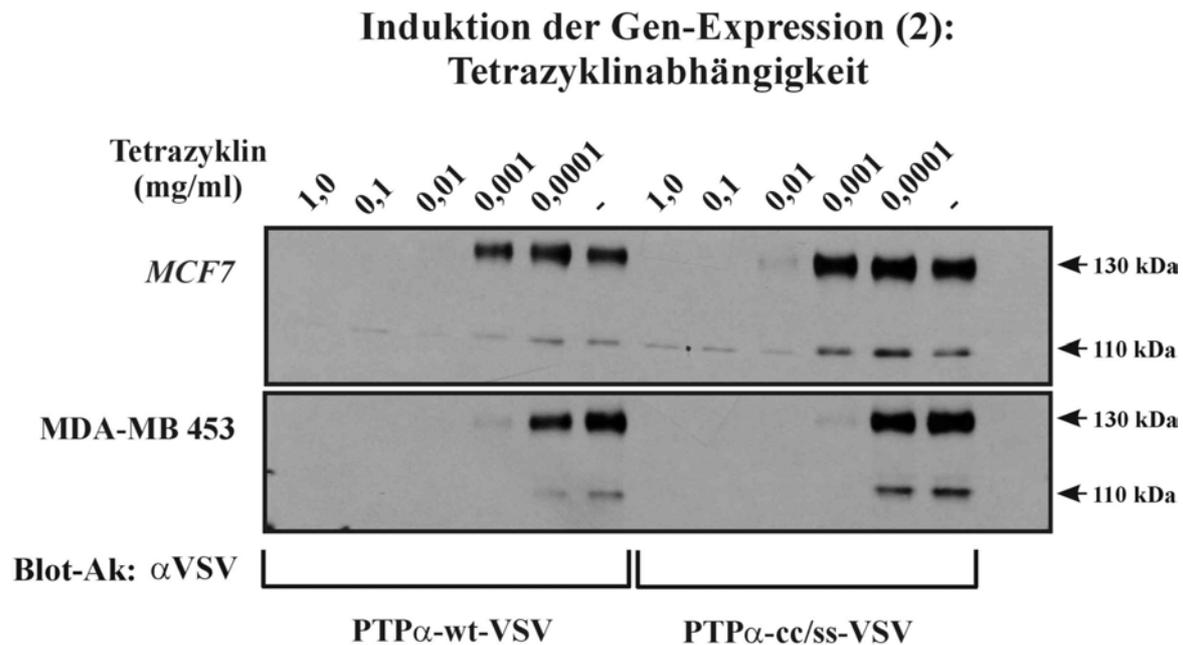


Abb. 20: Tetrazyklin-abhängige Expression des Zielgens. Die Zellen wurden in gleichen Zellzahlen ausgesät und mit den angegebenen Mengen des Antibiotikums Tetrazyklin für 6 Tage kultiviert. Die Immunpräzipitate wurden unabhängig voneinander über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot analysiert. Die dargestellte Tetrazyklinabhängigkeit der Zielgenexpression dieser beiden Zelllinien konnte durch 4 weitere generierte Zelllinien bestätigt werden.

Eine Tetrazyklin Konzentrationsreihe wurde herangezogen um eventuelle Abstufungen zwischen nicht detektierbarer und maximaler Expression des Zielgens erreichen zu können. Bei der Kultivierung mit Tetrazyklin von 1 μ g/ml bis 0,0001 μ g/ml konnte keinerlei Basalaktivität des Zielgens bei 1,0 und 0,1 μ g/ml detektiert werden. Die Zelllinien verhielten sich in ihrer Expression des Zielgens unterschiedlich. Eine höhere Konzentration war ausreichend (0,01 μ g/ml für die cc/ss-Mutante, bzw 0,001 μ g/ml für den wildtyp) um in den MCF7 Zellen zu Expression des Zielgens zu führen. Bei MDA-MB453 war in beiden Fällen bei 0,001 μ g/ml eine sehr schwache Expression zu detektieren. Diese Erkenntnisse belegen den erforderlichen theoretischen Schwellenwert für die konzentrationsabhängige Bindung des Antibiotikums an den Transaktivators. Bei Tetrazyklinkonzentrationen unter 0,01 μ g/ml ist nicht mehr genug Antibiotikum vorhanden um die exprimierten Transaktivatorproteine durch Bindung in eine Konformationsänderung zu zwingen, und folglich einen Beginn des autoregulatorischen Loops und der damit verbundenen Expression des Zielgens zu verhindern.

Die gezeigten Transaktivator Zelllinien wurden alle mit PTP α -wt bzw. PTP α -cc/ss Konstrukten infiziert, mit Hygromycin B selektioniert und monoklonal auf ihre Induzierbarkeit hin untersucht. Die PTP α -exprimierenden Zelllinien zeigen eine mit ihren

Transaktivator Klonen korrelierende Induzierbarkeit (siehe Abb. 17b). Abb. 21 zeigt eine Zusammenfassung dieser PTP α Zelllinien:

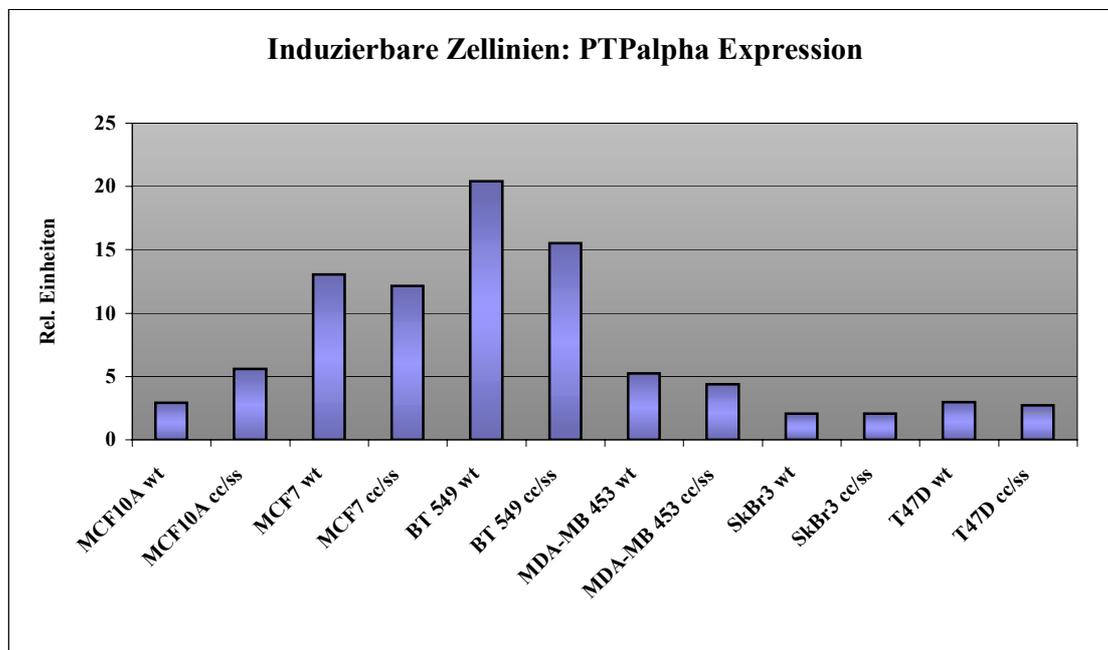


Abb. 21: Stabil exprimierende PTP α Zelllinien. Die Klone der abgebildeten stabilen PTP α -Zelllinien wurden zu jeweils gleichen Zellzahlen ausgesät, entweder in Anwesenheit (+) oder in Abwesenheit (-) von Tetrazyklin (2 μ g/ml) 6 Tage kultiviert und anschließend lysiert. PTP α wurde immunpräzipitiert und als Pärchen (+ oder - Tetrazyklin) über 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose konnte die Expression der Tyrosinphosphatase mit dem C-terminalen polyklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Die Signale wurden densitometrisch quantifiziert und als Induzierbarkeiten für jedes Pärchen eines Klones ausgewertet.

Die Tyrosinphosphatase PTP α gehört zu den RPTPn der Klasse 4 (siehe 1.3.1.) und ist daher mit ihrer Transmembrandomäne in die Plasmamembran eingebettet. Eine wichtige Eigenschaft der PTP α -wt und PTP α -cc/ss Konstrukte ist daher nicht nur die Aktivität, bzw. Inaktivität der Phosphatasendomänen (siehe Abb. 18), sondern auch die zelluläre Lokalisation des induzierbar exprimierten Proteins. Die Zellen wurden mit gleicher Zellzahl ausgesät, in Anwesenheit oder in Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert, und nach sechs Tagen mit Formaldehyd fixiert. Mittels Immunfluoreszenz konnte nach 6 Tagen Induktion der MCF7 Zellen durch die intensive Rotfärbung eine korrekte transmembranäre Lokalisation des induzierten Proteins nachgewiesen werden. Die untersuchten MCF7 Zellen zeigten alle einen deutlichen Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen. In den nicht induzierten Zellen konnte keine Rotfärbung, und daher keine Induktion der VSV-markierten Phosphatase detektiert werden (nicht gezeigt).

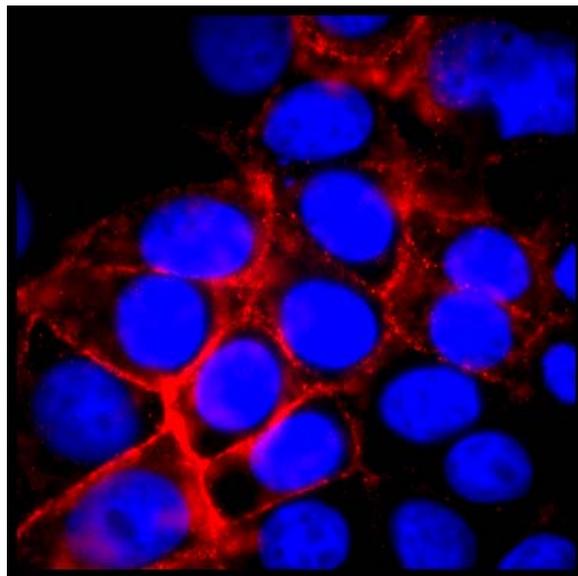


Abb. 22: Immunfluoreszenz gegen PTP α in MCF7. Die korrekte transmembranäre Lokalisation der induzierten und VSV-markierten PTP α wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft. MCF7 Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und mit anti-VSV monoklonalem Antikörper inkubiert (siehe 2.7.9). Die induzierten Zellen wurden anschließend im Immunfluoreszenzmikroskop bei entsprechenden Anregungswellenlängen unter 1000x Vergrößerung photographiert. Gezeigt ist ein Merge der induzierten PTP α -wt Zellen mit der Kernfärbung (blau) und der anti-VSV Transmembranfärbung (rot).

Die induzierbaren Zelllinien konnten durch die Zeit- und Konzentrationsreihen, sowie die Immunfluoreszenz Experimente Aufschluß über die Dynamik des induzierbaren Systems und die korrekte Lokalisation des Zielgens geben. Eine toxische Wirkung des Transaktivators für die zu induzierenden Zelllinien wurde bereits 1998 beschrieben (Gallia und Khalili, 1998). Zellmorphologische Beobachtungen der induzierten MCF7-tcITE1-Neo Zellen lieferten den ersten Hinweis für induktionsabhängige Effekte des Transaktivators. Die Transaktivator- oder PTP α -exprimierenden Zellen wurden zu gleichen Zellzahlen ausgesät und sechs Tage in Anwesenheit oder Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Ihre Morphologie wurde anschließend photographisch festgehalten. Nur bei den induzierten MCF7 Zellen konnte eine stark veränderte Morphologie (die Zellen erschienen angeschwollen) nach etwa vier Tagen festgestellt werden, eine Morphologie, die der mit TPA-differenzierter MCF7 Zellen sehr ähnlich sieht (Guilbaud et al, 1990). Es gilt jedoch festzuhalten, daß nicht alle induzierten MCF7 Zellen diese veränderte Morphologie gezeigt haben. Auch bei den Immunfluoreszenz Experimenten konnte nicht bei allen induzierten Zellen eine transmembranäre Rotfärbung detektiert werden. Da diese morphologischen Effekte der MCF7 Zellen mit einem weiteren Transaktivator Klon bestätigt werden konnten und durch PTP α -Induktion kein weiterer Effekt zu erkennen war, gehen diese morphologischen Veränderungen eindeutig auf die Induktion des Transaktivators zurück. Bei den anderen Zelllinien (MCF10A, BT549, MDA-

MB453, SkBr3 und T47D) sind jedoch keine induktionsbedingten morphologischen Unterschiede gesehen worden.

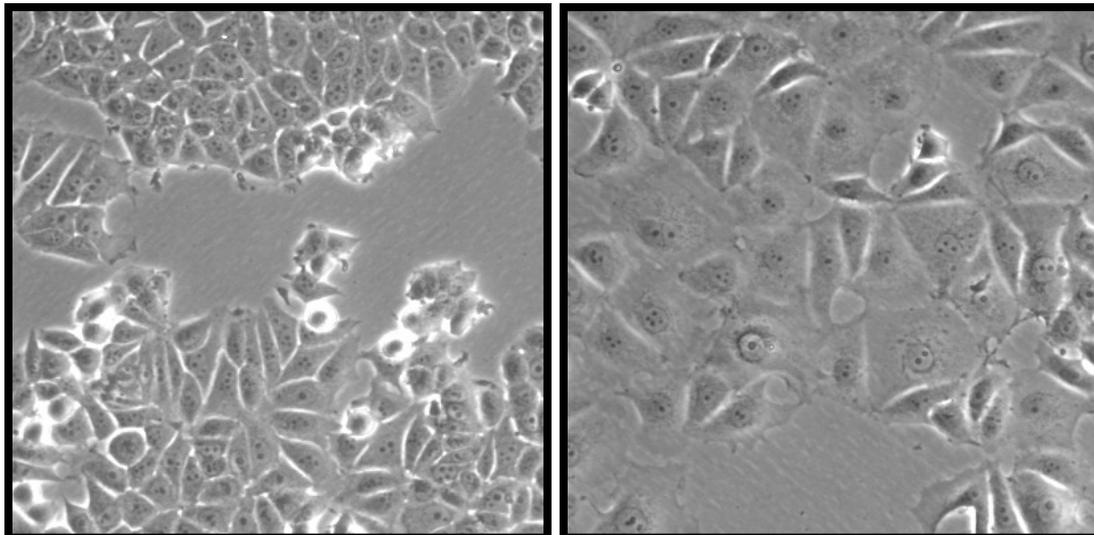


Abb. 23: MCF7 Zellmorphologie nach Induktion des Transaktivators und Zielgen. Stabile induzierbare MCF7-Transaktivator Zellen wurden 6 Tage in Anwesenheit von $2\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin (links) oder in Abwesenheit von Tetrazyklin induziert (rechts) kultiviert und anschließend unter 200facher Vergrößerung photographiert. Die Induktion des Transaktivators alleine war ausreichend um die Zellmorphologie der MCF7 Zellen zu ändern. Die induzierbare Expression von PTP α -wt oder PTP α -cc/ss hatte keinen Einfluß auf die Morphologie. Diese morphologischen Zellveränderungen nach der Induktion waren aufgrund in unterschiedlicher Zellzahl ausgesäter MCF7 Zellen nicht auf die Zelldichte zurückzuführen. Dieser Effekt konnte nur bei der Zelllinie MCF7 festgestellt werden.

3.4. Funktionsanalyse von PTP α in Mammakarzinomzelllinien

Da bisher noch keine Erkenntnisse über den Einfluß dieser Tyrosinphosphatase auf verschiedene zelluläre Parameter in Tumorzellen bekannt waren, wurden die in 3.3.4. beschriebenen PTP α -wt und PTP α -cc/ss Zelllinien zur weiteren Charakterisierung zu funktionsanalytischen Untersuchungen herangezogen.

3.4.1. Proliferationsassays

Die Auswirkung der induzierten Expression von PTP α -wt bzw. PTP α -cc/ss auf die Proliferation stabiler Brustkrebszelllinien wurde im Rahmen von Zellzählexperimenten und Thymidineinbauanalysen untersucht. Im Vorfeld konnte bereits eine verringerte Anzahl an Klonen nach Transfektion und zwei-wöchiger Selektionsphase in MCF7 Zellen beobachtet werden: es konnten stets mehr Mock-transfizierte Zellen im direkten Vergleich mit PTP α -transfizierten Zellen registriert werden. Diese proliferativen Unterschiede sollten mit den induzierbaren Zelllinien näher untersucht werden. Zusätzlich konnten bei den MCF7 Zellen Induktions-bedingte morphologische Unterschiede festgestellt werden. Die

Zellzählexperimente zeigten bereits nach Expression des Transaktivators alleine eine Verringerung der Proliferation im Vergleich zu den Ursprungszellen. Das Ausmaß dieser Wachstumshemmung war von der Induktionsstärke des Transaktivators abhängig. Die Reduktion des Zellwachstums wurde durch Induktion von PTP α -wt potenziert, wohingegen dieser Effekt nach Induktion der cc/ss-Mutante nicht im selben Maße zu beobachten war. Mittels Thymidineinbau konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Die geringere Wachstumsreduktion durch die Mutante könnte auf eine Restaktivität oder katalytisch-unabhängige Bindungspartner zurückzuführen sein.

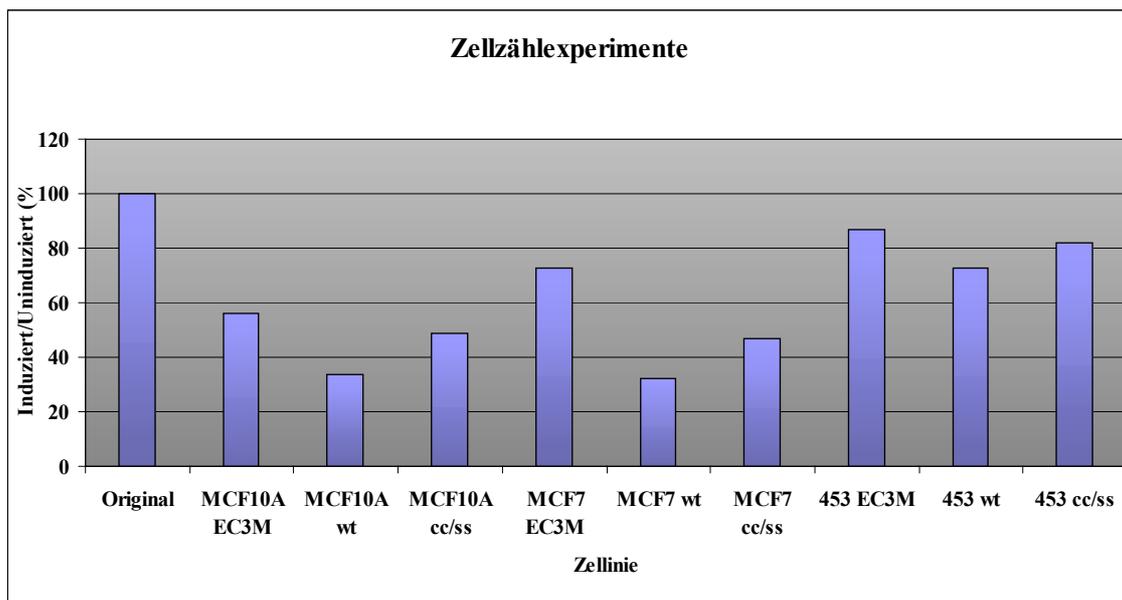


Abb. 24a: Proliferationsassays (I). Die Zelllinien wurden in gleicher Zellzahl auf 100 mm Schalen ausgesät, sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert und anschließend mit Trypsin von den Schalen gelöst. Die Zellen wurden in Isoton aufgenommen und wie unter 2.8.6. beschrieben mit einem Coulter Counter gezählt. "Original" bezieht sich auf das Wachstum der jeweiligen ursprünglichen Zelllinie. Die gezeigten Ergebnisse konnten in drei weiteren Experimenten bestätigt werden.

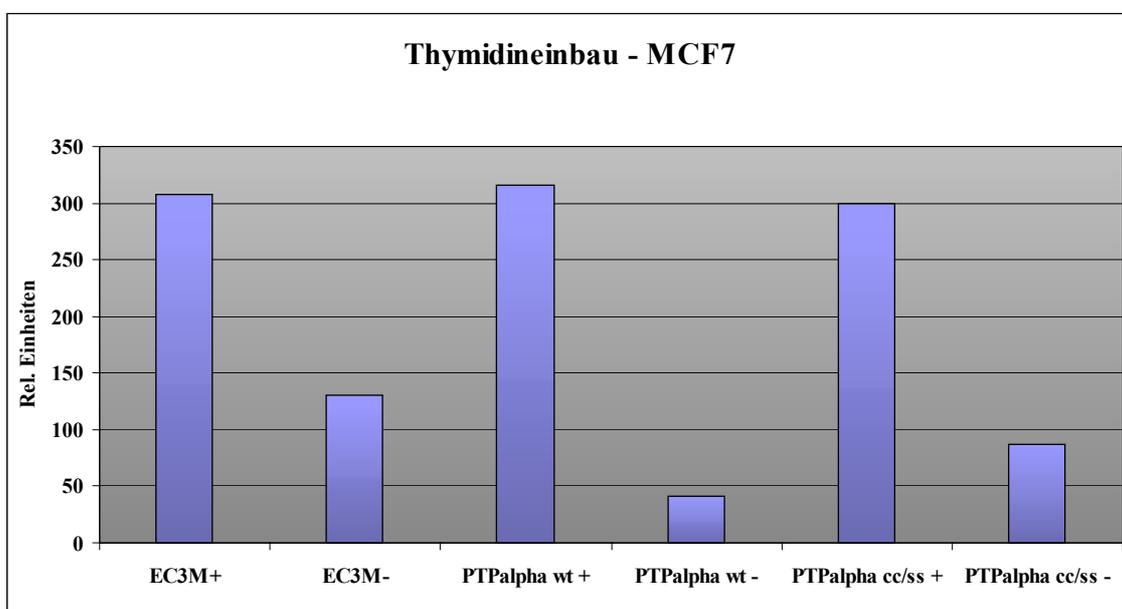


Abb. 24b: Proliferationsassays (II). Die Zelllinien wurden in gleicher Zellzahl in 12-Loch Schalen ausgesät und sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Danach wurden die Zellen wie unter 2.8.7. beschrieben weiterbehandelt und schließlich lysiert. Das inkorporierte (^3H)-Thymidin wurde mit einem Szintillationszähler quantifiziert. Die gezeigten Ergebnisse für MCF7 konnten mit allen anderen Zelllinien bestätigt werden.

3.4.2. FACS-Analyse

Die Beobachtungen aus den Proliferationsassays wurden durch Durchflußzytometrie weiter analysiert. In den Zellzyklusstudien zeigte sich nach induzierter Expression von PTP α -wt sowohl in MCF7, als auch in MCF10A eine verstärkte Arretierung in der G₁-Phase, was die in den Proliferationsstudien beobachtete Verringerung des Zellwachstums erklären könnte. Eine größere Anzahl der Zellen in der G₁-Phase konnte bereits nach Transaktivator-Induktion gemessen werden. Die Anzahl der Zellen in der G₁-Phase wurde jedoch nach Induktion von PTP α -wt weiter verstärkt. Abb. 25a zeigt ein "Overlay" der PTP α -wt induzierten MCF10A Zellen (links) und MCF7 Zellen (rechts). In der dazugehörigen Quantifizierung wird ein Anstieg der G₁-Phase um 17% bei den MCF10A Zellen und um 10% bei den MCF7 Zellen deutlich (Abb. 25b).

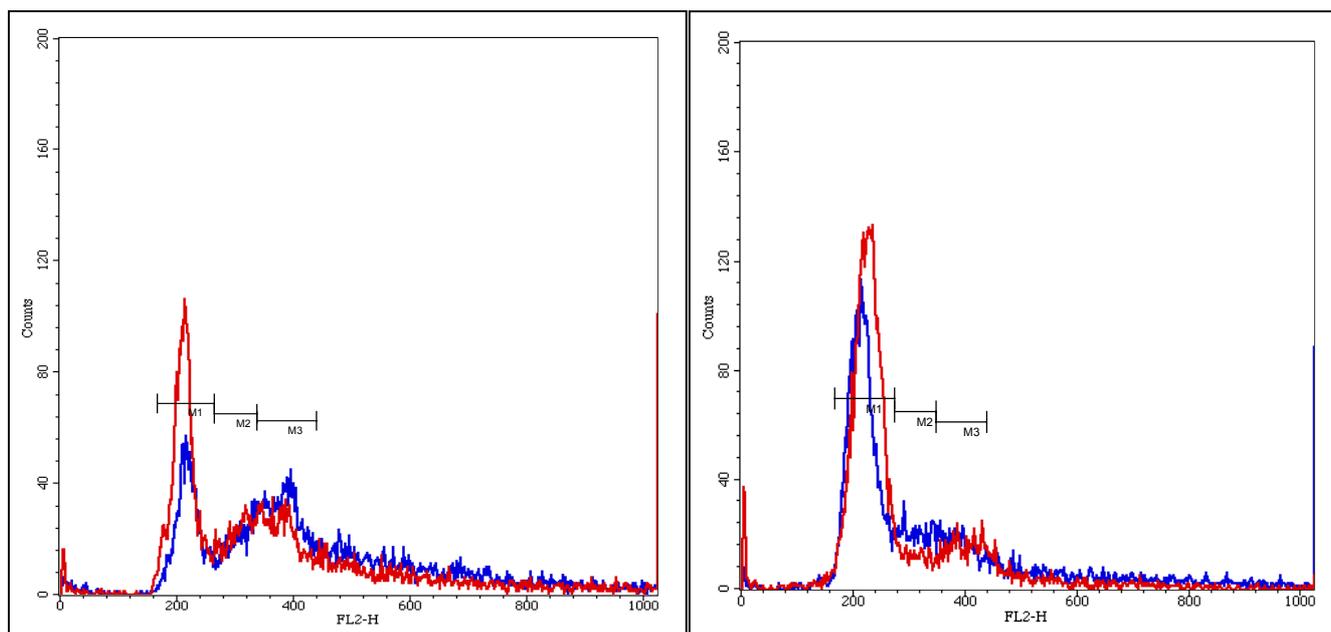


Abb. 25a: Zellzyklusanalyse (I). Induzierbare PTP α -wt-stabil exprimierende MCF10A Zellen (links) oder MCF7 Zellen (rechts) wurden in gleicher Zellzahl in 6-Loch Schalen ausgesät und sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden anschließend trypsinisiert, fixiert und mit Propidiumiodid angefärbt. Die DNA-Fluoreszenz konnte dann mittels Durchflußzytometrie ermittelt werden. Gezeigt ist ein "overlay" von nicht induzierten (blau) und sechs Tage induzierten (rot) Zellen.

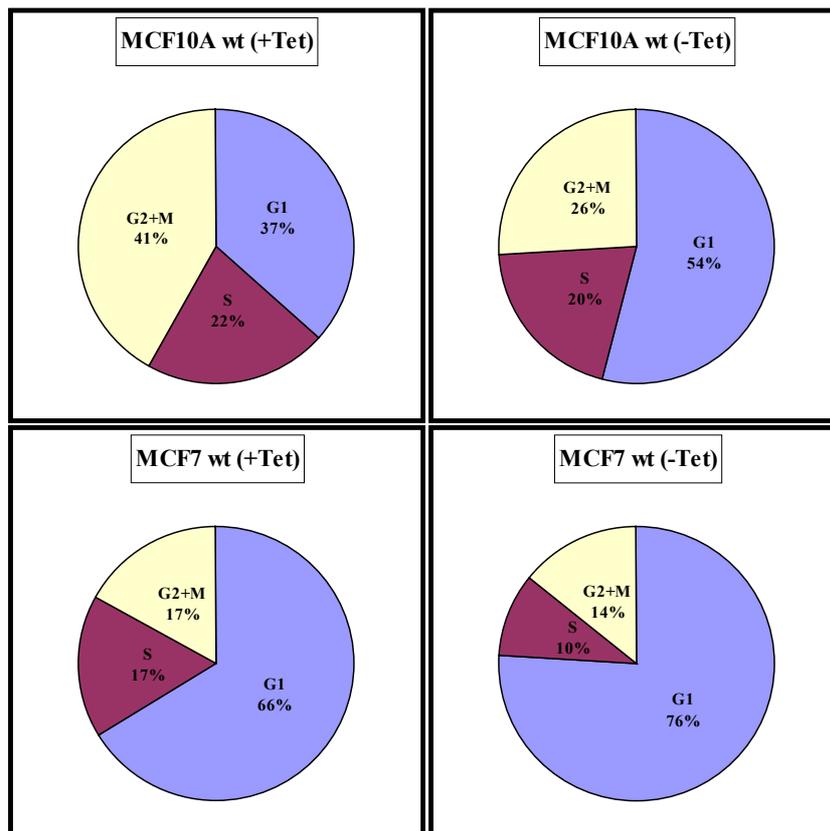


Abb. 25b: Zellzyklusanalyse (II). Die in Abb. (a) gezeigten "overlays" wurden mit Hilfe der gezeigten Marker quantifiziert und ausgewertet. Die Zunahme der G₁-Phase konnte somit in MCF10A (oben) und MCF7 (unten) Zellen gezeigt werden.

3.4.3. cDNA-Array-Analysen

Die PTP α Zelllinien wurden mittels cDNA-Arrays untersucht um einerseits unerwünschte genetische Effekte des induzierbaren Systems identifizieren zu können, und andererseits um einen Überblick über eventuelle PTP α -regulierte Genprozesse zu bekommen. Von jeder der sechs Transaktivator Zelllinien wurde eine weitere mit Sekundärplasmid infizierte, selektionierte und polyklonale Zelllinie ohne Zielgen erzeugt, und als Kontrolle zum Vergleich den beiden PTP α Zelllinien gegenüber gestellt. Somit konnten insgesamt 18 stabile Zelllinien (6 x PTP α -wt, 6 x PTP α -cc/ss und 6 x Kontrolle) analysiert werden. Weitere notwendige Kontrollen waren die Kultivierung der ursprünglichen Zelllinie in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin, um mögliche, durch das Antibiotikum bedingte unspezifische Expressions-veränderungen ausschließen zu können. Der Versuchsaufbau kann für jede Zelllinie anhand von MCF7 folgendermaßen dargestellt werden:

	Zelllinie	Tetrazyklin
1.	MCF7	+
2.	MCF7	-
3.	MCF7-t7EC3M	+
4.	MCF7-t7EC3M	-
5.	MCF7-t7EC3M-PTP α -wt	+
6.	MCF7-t7EC3M-PTP α -wt	-
7.	MCF7-t7EC3M-PTP α -cc/ss	+
8.	MCF7-t7EC3M-PTP α -cc/ss	-

3.4.3.1. Genregulation nach tTA-Induktion

Die Ursprungszelllinien und die erzeugten stabil exprimierenden Zelllinien wurden in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin kultiviert. Nach der Lyse der Zellen wurde aus der isolierten RNA cDNA präpariert und der cDNA-Array-Technologie zugeführt. Die Arrays wurden wie unter 3.1. beschrieben durchgeführt. Abb. 26 zeigt den Einfluß des Transaktivators auf die Genregulation nach sechs Tagen Induktion in den stabilen Zelllinien.

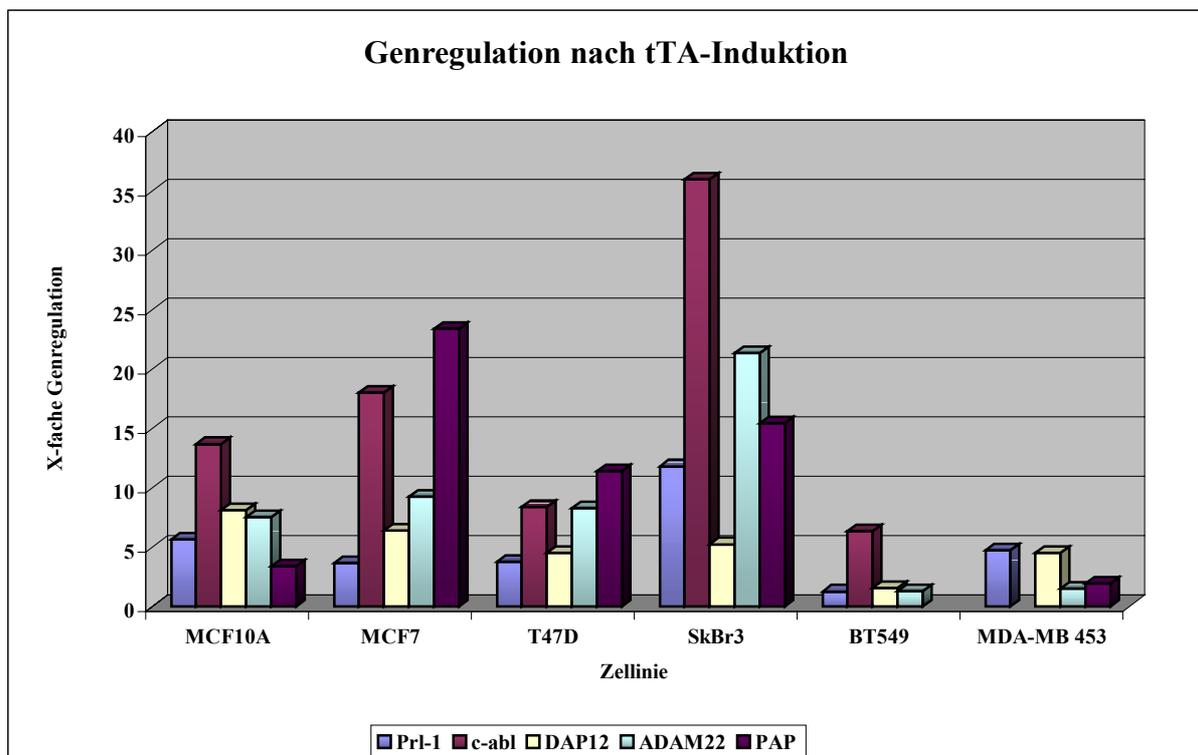


Abb. 26: Genregulation nach Transaktivator Induktion. Die Zelllinien wurden sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von 2 μ g/ml Tetrazyklin kultiviert und dann mit RNA-Lysepuffer lysiert; die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in den Arrays eingesetzt wie unter 3.1. beschrieben. Die ermittelten normalisierten Daten zeigen den Einfluß der nach Transaktivator-Induktion bedingten Genregulation, dargestellt als X-fache veränderte Genexpression der induzierten Transaktivator Zelllinie im Vergleich zu der nicht-induzierten Transaktivator Zelllinie.

Die Kultivierung der Ursprungszellen in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin führte zu keiner detektierbaren unterschiedlichen Genexpression auf der Basis dieser Arrays. Der direkte Vergleich mit den Transaktivatorzelllinien ließ jedoch klar erkennen, daß alleine die Induktion des Transaktivators für zahlreiche Veränderungen der Genexpression in diesen stabilen Zelllinien ausreichend war. Nach sechs Tagen Induktion konnte ein wesentlich stärkeres mRNA Transkript der folgenden Gene in allen Zelllinien detektiert werden: die Tyrosinphosphatase Prl-1, die Tyrosinkinase c-abl, das Adaptorprotein DAP12, die Metalloproteinase ADAM22 und die Phosphatase PAP. Andere Gene, wie beispielsweise die Metalloproteinasen ADAM9 und ADAM10 in MCF7 und T47D, wurden in einigen, aber nicht allen Zelllinien durch Transaktivator-Induktion verstärkt exprimiert. Nach Induktion des Transaktivators konnte nur verstärkte, aber nie verringerte Expression spezieller Gene beobachtet werden. Die verstärkte Expression einiger dieser Gene (Prl-1, c-abl und DAP12) nach Transaktivator-Induktion bestätigten auch die Beobachtungen von stabilen, EGFR induzierbar-exprimierenden MDA-MB453 und MCF10A Zellen (Baumgartner, diese Arbeitsgruppe). Ein weiterer Anhaltspunkt für Transaktivator-bedingtes verringertes Zellwachstum könnte die Expression des ribosomalen Proteins S9 sein. Besonders in den beiden Zelllinien MCF10A und MCF7 konnte ein stark verringertes Transkript dieses Gens detektiert werden. Diese Konsequenz könnte für die Zellen eine verringerte Proteinsynthese nach sich ziehen, da die Proteinsynthese und also auch die Anzahl der Ribosomen stark mit der Wachstumsrate der Zellen verknüpft ist.

3.4.3.2. Genregulation nach PTP α -Induktion

PTP α -bedingte Veränderungen der Genexpression waren im Vergleich zu den Transaktivator-bedingten Veränderungen verhältnismäßig gering. In Abb. 27 wird die Veränderung der Genexpression verschiedener Gene nach Induktion von PTP α -wt dargestellt.

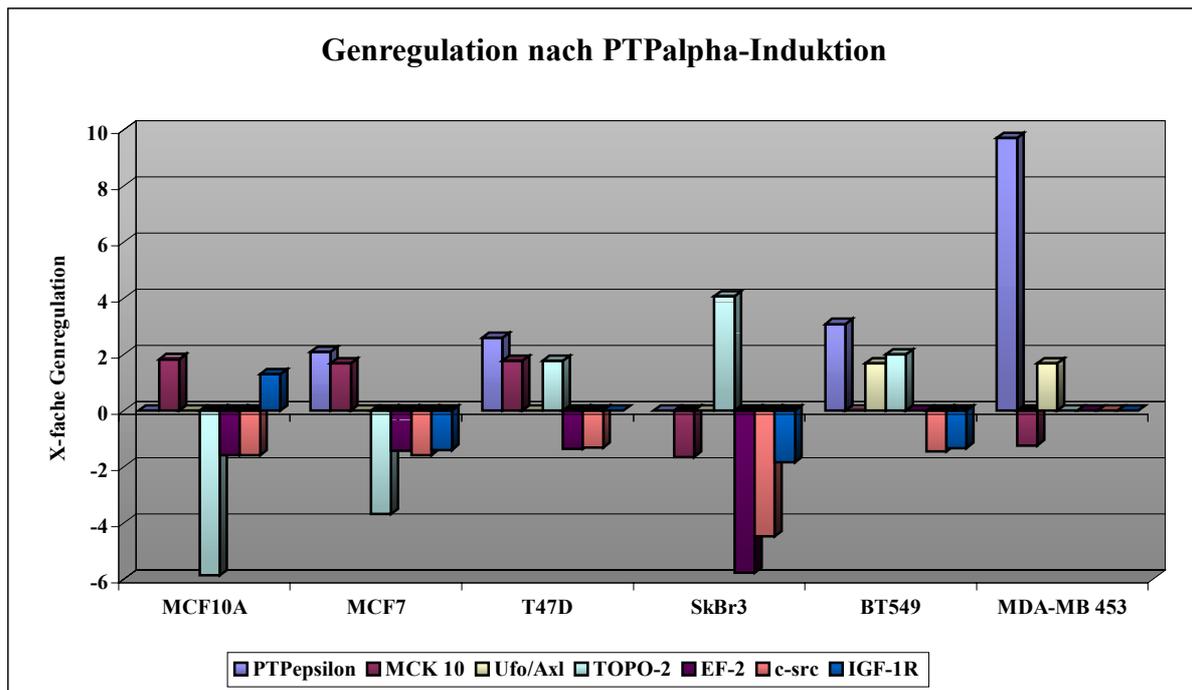


Abb. 27: Genregulation nach PTP α -wt Induktion. Die Zellen wurden wie in Abb. 28 beschrieben behandelt und mittels cDNA Arrays analysiert. Gezeigt ist die X-fache Veränderung der Genexpression ausgewählter Gene nach PTP α -wt Induktion auf der Basis der normalisierten Daten. Eine verringerte Genexpression wird durch Minuswerte und verstärkte Genexpression wird durch Pluswerte dargestellt.

Die auffälligsten Genregulationen waren die der Tyrosinphosphatase PTP ϵ , der RTKn MCK10, Ufo/Axl und IGF-1R, die Tyrosinkinase c-src, die Topoisomerase-2 und der Transkriptionsfaktor EF-2. Wie jedoch aus Abb. 27 zu erkennen ist, waren diese Veränderungen nicht einheitlich in allen Zelllinien zu beobachten; d.h. in einigen konnte eine verstärkte und in anderen eine verringerte Expression detektiert werden. PTP ϵ wurde in vier der sechs Zelllinien nach Induktion der PTP α verstärkt exprimiert. Dies könnte auf einen unspezifischen Effekt bei der Hybridisierung zurückzuführen sein, da diese Phosphatase die größte Homologie zur PTP α aufweist.

Eine niedrigere Expression der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-src als in den nicht-induzierten Zelllinien wurde in fünf der sechs Zelllinien nach PTP α -wt-Induktion detektiert. Die Aktivierung von c-src durch PTP α kann man sich durchaus als molekulares Gleichgewicht vorstellen. Überexpression des PTP α Wildtyps würden eine Verschiebung dieses Gleichgewichts in Richtung c-src-Aktivierung zur Folge haben, und die Zellen würden durch veränderte Genregulation das Gleichgewicht wieder herstellen. Dieser kompensatorische Effekt wäre entweder durch Inaktivierung oder durch verringerte Expression von c-src zu erzielen.

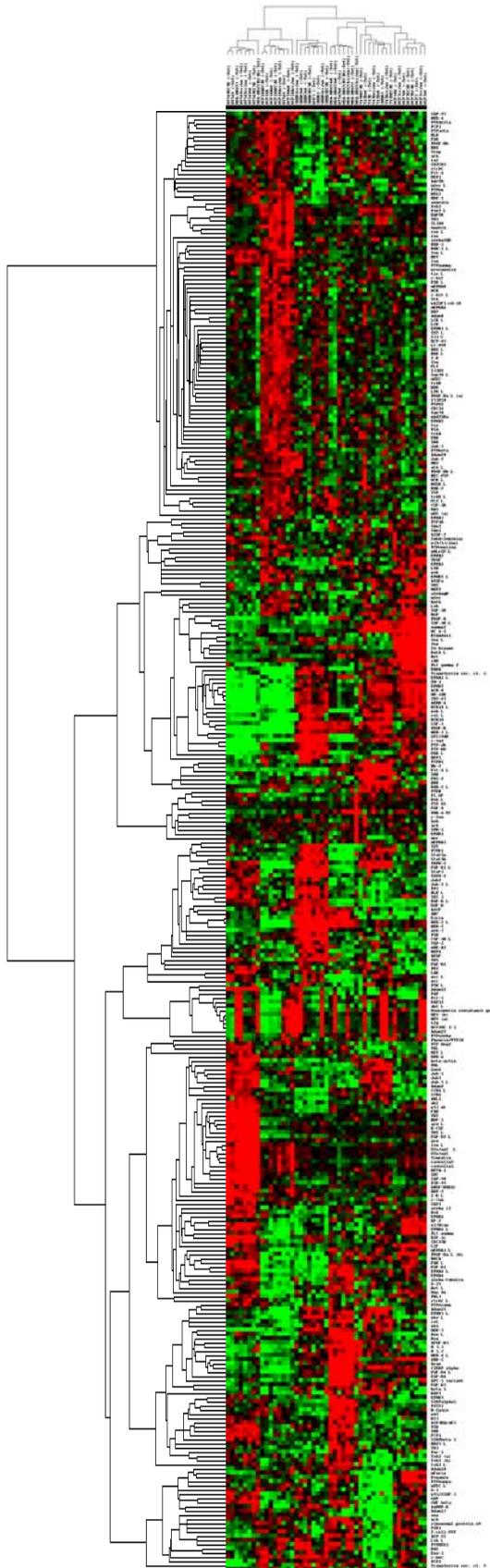
3.4.3.3. Gruppieren der Gene auf der Basis ihrer Expressionsdaten ("Cluster")

Um zu sehen welche Gene nach PTP α -Induktion ähnlich reguliert werden ist es möglich bestimmte Gene mit dem Programm "Cluster" zu gruppieren. Diese Analyse erlaubt einen Rückschluß zwischen gemeinsamer Regulation und potentieller gemeinsamer Funktion bestimmter Gene. Wenn die mit "Cluster" untersuchten Gene ein mit PTP α vergleichbares Muster zeigen, könnte man einen direkten Zusammenhang zwischen der induzierten PTP α -Überexpression und der Genregulation der in Frage kommenden Gene vermuten.

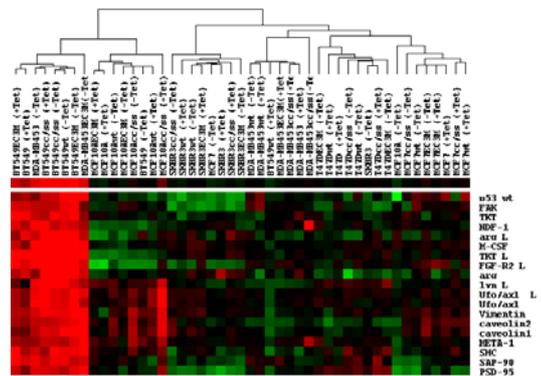
Mit einem weiteren Programm, "Treeview", kann man die verwendeten Gene (Sonden des Filters) graphisch als Dendrogramm darstellen, in dem die stark exprimierten Gene rot, die schwach exprimierten Gene grün, und die dazwischen liegenden Mittelwerte schwarz gezeigt werden. Jene Gene, welche miteinander durch kürzere Abstände verbunden sind, weisen ähnlichere Expressionsmuster auf, als solche mit längeren Abständen.

Die Kombination beider Programme erlaubt es durch benutzerdefinierte Parameter definierte Gengruppen zusammenzustellen. Dabei gilt es zu beachten, daß bestimmte Gene einer Gengruppe durch die Wahl unterschiedlicher Filter und durch das Verändern der mathematischen Algorithmen anderen Gengruppen zugeordnet werden können. Ein wichtiges Auswahlkriterium dieser Analyse war daher die Zuordnung bestimmter Gene zu Gruppen die sich durch das Verändern der Filtermöglichkeiten nicht mehr variieren ließ. Diese Gruppen wurden als stabile Gengruppen bezeichnet. Ein weiteres Kriterium der Gruppierung war der sogenannte Korrelationskoeffizient. Diese mathematische Größe bezeichnet die Ähnlichkeit der Expressionsprofile innerhalb einer Gruppe und variiert zwischen -1 (entgegengesetzte Expressionsprofile) bis +1 (für identische Expressionsprofile). Die dargestellten Gruppierungen wurden mit stabilen Gengruppen und Korrelationskoeffizienten von 0,7 oder höher angestellt.

a.) Gesamt



b.) Ufo/Axl



c.) HER3

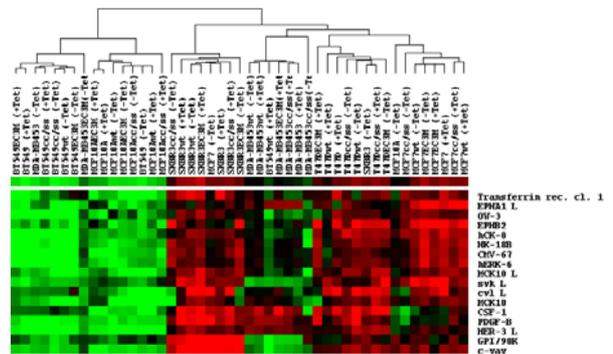


Abb. 28: Ausgewählte Gengruppen auf der Basis der Expressionsprofile. Die, mit den Programmen "Cluster" und "Treeview" analysierten cDNA-Array Daten, wurden als Gesamt-Dendrogramm (a) aller Gene betrachtet (Filter 80%).

Ausgewählte exemplarische Gengruppen wurden aus diesem Gesamt-Dendrogramm vergrößert herausgenommen (Ufo/Axl, bzw. HER3). Zusammengruppierte Gene weisen ähnliche Expressionsprofile auf. Für die Farbkodierung siehe Text.

Aus diesem Gesamt-Dendrogramm ist zu entnehmen, daß die Brustzelllinien durch ihre Expressionsdaten in verschiedene Gruppen eingeordnet werden können. Tumorigene oder metastasierende Zelllinien weisen unterschiedliche Gengruppen auf als beispielsweise die immortalisierten MCF10A Zellen (siehe die in den metastasierenden BT549 Zellen stärker exprimierte Ufo/Axl Gengruppe in Abb. 28b, oder die Her3 Gengruppe in Abb. 28c).

Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen wie PTP α finden sich in einer Gengruppe wieder. Dieses bedeutet, daß sich die Expressionsprofile solcher Gene nach Induktion der Phosphatase (und daher auch des Transaktivators) ähnlich verhalten müssen. Abb. 29 zeigt die Gengruppe der Gene die sich in den Ursprungszellen, und in den stabilen Zelllinien vor nach Induktion wie PTP α verhalten. Weil die gruppierten Gene nicht nur von der Induktion der Phosphatase, sondern auch des Transaktivators abhängig sind, korrelieren die zusammengruppierten Gene weitgehend mit den dargestellten Genen in Abb. 26. Prl-1, DAP12, c-abl und ADAM22 werden alleine durch Transaktivator-Induktion verstärkt exprimiert. Das Hygromycin-Resistenz Gen und der Transaktivator (tTA) bilden Positiv-Kontrollen für die Integration der viralen Vektoren in den Zellen und die Induzierbarkeit der Zellen.

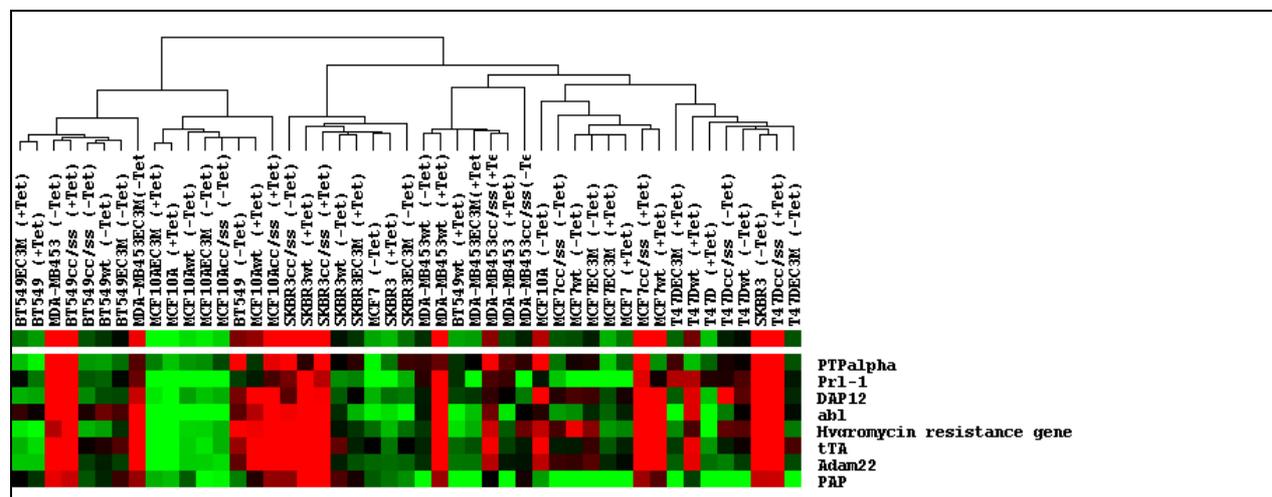


Abb. 29: PTP α Gengruppe. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Gesamtdendrogramm (Korrelationskoeffizient: 0,70).

3.4.4. c-src Aktivität

Bisher konnte eine Aktivierung der SRC-Kinasen c-src und c-fyn durch PTP α in embryonalen Fibroblasten und Gehirnllysaten transgener PTP α ^{-/-} Mäuse gezeigt werden (Ponniah et al., 1999). Die Aktivierung erfolgt über die Dephosphorylierung des inhibitorischen C-terminalen Tyrosins und der daraus resultierenden Konformationsänderung der Kinasen.

In vitro Kinase Assays mit dem exogenen c-src-Substrat Enolase sollten klären, ob eine auf das Brustgewebe erweiterte Rolle bestätigt werden konnte. Stabile, induzierbare MCF7 Zellen wurden nicht-induziert und induziert (6 Tage) lysiert, c-src wurde immunpräzipitiert und anschließend einem c-src Assay zugeführt. Die Lysate wurden aufgeteilt: eine Hälfte wurde als c-src Kontrolle über 10% SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Immunoblotanalyse mit polyklonalem Anti-c-src-Antikörper (c-src-CT) detektiert. Die andere Hälfte des Lysats wurde mit 5 μ g Enolase und 5 μ Ci γ ³²P-ATP inkubiert, ebenfalls über 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem Phosphoimager quantifiziert und mit dem quantifizierten c-src Protein abgeglichen.

Die Induktion des Transaktivators führte zu keinen Veränderungen der c-src Aktivität, aber nach Induktion von PTP α -wt konnte eine zweifache Zunahme registriert werden. Wie auch in HEK-293 Zellen (siehe Abb. 14), konnte auch hier eine weniger signifikante Aktivitätssteigerung mit PTP α -cc/ss detektiert werden.

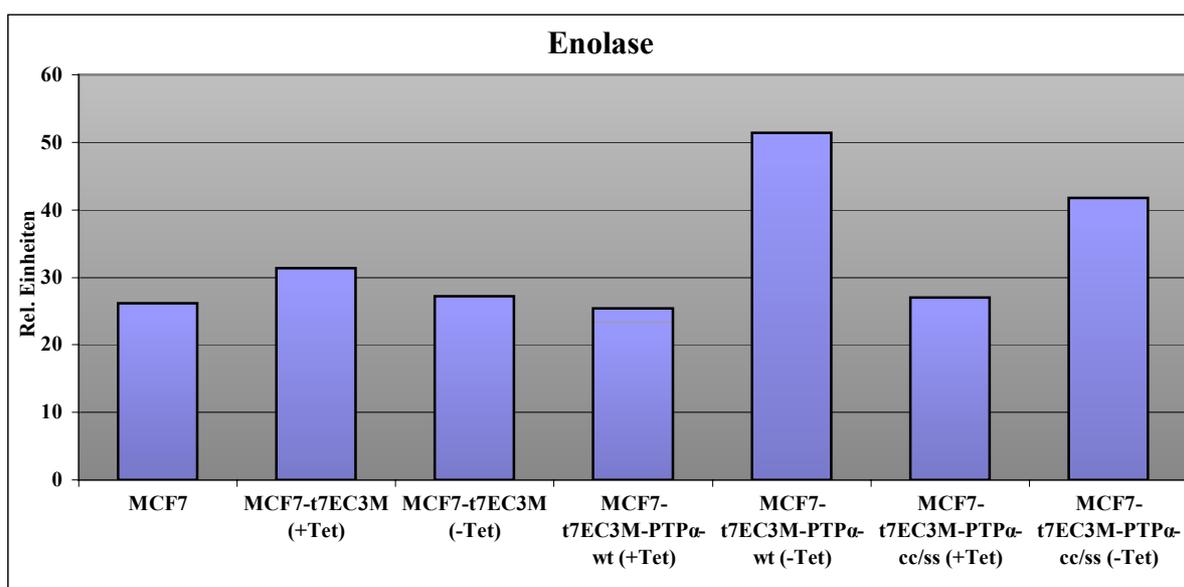


Abb. 30: c-src kinase Assay in MCF7 Zellen. Stabile induzierbare MCF7 Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät, sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von 2 μ g/ml Tetrazyklin kultiviert und lysiert. c-src wurde von allen Lysaten immunpräzipitiert. Zellysat von den Ursprungszellen (MCF7) diente hier als Kontrolle. Die Immunpräzipitate wurde mit γ ³²P-ATP und dem exogenen Substrat Enolase inkubiert, über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran

transferiert und anschließend mit einem Phosphoimager quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen.

3.4.5. Der Einfluß von PTP α auf den IGF-1 Signalweg

Eine Beeinträchtigung der Zellproliferation und ein verlangsamtes Fortschreiten des Zellzyklus bedingt durch PTP α -Aktivität konnten hier bisher gezeigt werden. Der Einfluß von PTP α auf diverse RTKs oder auch intrazellulären Kinasen (außer den SRC-Kinasen c-src und c-fyn) ist nachwievor sehr unklar. Eine Ausnahme bildet der Insulin-vermittelte Signalweg: es wurde bereits beschrieben, daß diese Phosphatase einen blockierenden Effekt auf den Insulinsignalweg in mehreren Zelltypen hat (Möller et al., 1995). Mehrere mitogene Signalwege wurden daher untersucht um die weiter oben beschriebenen Beobachtungen näher zu charakterisieren.

Zellstimulation wurde mit dem Liganden IGF-1 in MCF7 Zellen durchgeführt. Die ausgesäten Zellen wurden mit den Leervektor, PTP α -wt und PTP α -cc/ss Konstrukten transient transfiziert, für 24 Stunden mit serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit 25 ng/ml IGF-1 für 5 min inkubiert. Der IGF-1R und PTP α wurden nach der Zellyse immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. In den mit Leervektor und PTP α -cc/ss transfizierten Zellen konnte eine deutliche IGF-1R Tyrosinphosphorylierung nach 5 min Inkubation detektiert werden. Die mit Zellen PTP α -wt transfizierten Zellen zeigten eine reduzierte IGF-1R Tyrosinphosphorylierung zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 31, *oben*). Eine nachfolgende Immunoblotanalyse zeigt vergleichbare immunpräzipitierte Mengen an IGF-1R (Abb. 31, *Mitte*) und PTP α (Abb. 31, *unten*) nach der Lyse.

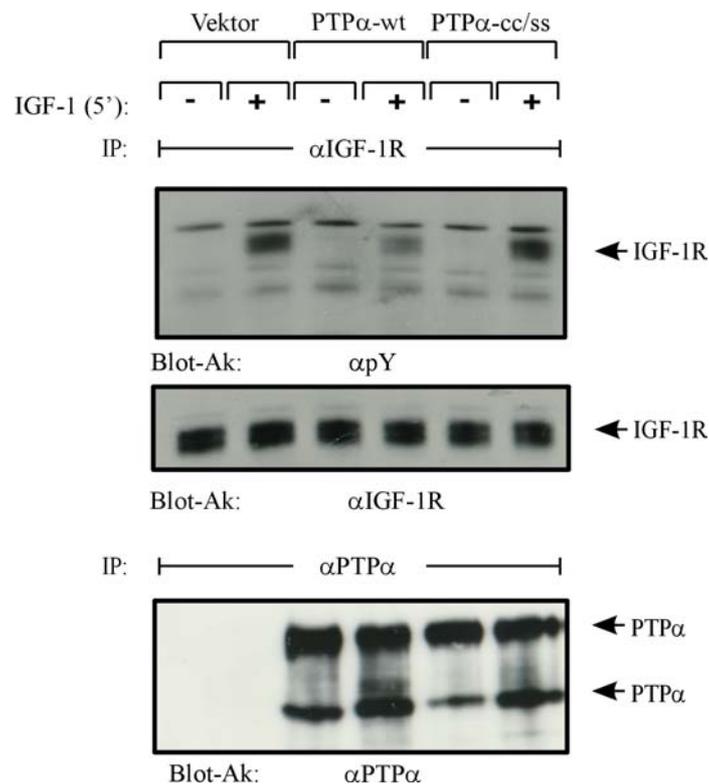


Abb. 31: Die Tyrosinphosphorylierung des IGF-1R nach Überexpression mit PTP α -wt. Leervektor, PTP α -wt und PTP α -cc/ss wurden transient in MCF7 Zellen überexprimiert, 24 Stunden mit Serum-freiem Medium inkubiert, danach für 5 min mit 25 ng/ml IGF-1 behandelt und anschließend lysiert. Nach der Zellyse wurde der IGF-1R mit monoklonalem Anti-IGF-1R-Antikörper (α IGF-1R 24-31) oder Anti-PTP α -Antikörper (α PTP α -D₂) immunpräzipitiert und die Proteine mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose erfolgte eine Immunoblotanalyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (α pY, oben) oder Anti-PTP α -Antikörper (α PTP α -CT, unten). Anschließend wurde der α pY Immunoblot mit polyklonalem Anti-IGF-1R-Antikörper (α IGF-1R-CT) immundetektiert.

Die Erkenntnisse aus den MCF7 Zellen sollten in HEK-293 Zellen bestätigt werden, da sich die Expression des IGF-1R endogen ebenfalls sehr gut nachweisen läßt. Diese Beobachtung in den MCF7 Zellen konnte aber mit transient transfizierten PTP α Konstrukten und identischer IGF-1 Stimulation in HEK-293 Zellen nicht reproduziert werden. Mit weiteren PTPn, als Kontrollen dienend, konnte ebenfalls kein Einfluß auf die IGF-1-vermittelte Tyrosinphosphorylierung des IGF-1R in HEK-293 demonstriert werden (Daten nicht gezeigt). Um die Ergebnisse aus den transient transfizierten MCF7 bestätigen zu können, wurden die stabilen PTP α induzierbar exprimierenden MCF7 Zellen herangezogen.

Diese Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät, sechs Tage induziert und 24 Stunden gehungert. Die Ursprungszellen wurden in An-, bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin oder Doxyzyklin (synthetisches Derivat von Tetrazyklin) als Kontrollen eingesetzt, um einen Einfluß auf die IGF-1-vermittelte Signalübertragung auszuschließen. 25 ng IGF-1 wurde, wie in Abb. 32, Bild A beschrieben, eingesetzt. Der IGF-1R wurde nach der Zellyse immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Bild A zeigt eine deutliche Stimulation des IGF-1R in den Ursprungszellen (MCF7), egal ob sie mit

t7EC3M-PTP α -wt, MCF7-t7EC3M-PTP α -cc/ss) wurden in gleicher Zellzahl ausgesät, sechs Tage in An-, bzw. Abwesenheit von 2 μ g/ml Tetrazyklin kultiviert und 24 Stunden gehungert. Die Zellen wurden wie markiert für 5 min mit 25 ng IGF-1 behandelt und anschließend lysiert. Nach der Zellyse wurde der IGF-1R mit monoklonalem Anti-IGF-1R-Antikörper (α IGF-1R 24-31) immunpräzipitiert und die Proteine mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose erfolgte eine Immunoblotanalyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (α pY, *Bild A*). Anschließend wurde der α pY Immunoblot mit polyklonalem Anti-IGF-1R-Antikörper (α IGF-1R-CT, *Bild B*) immundetektiert. Gleiche Mengen an Zellysat wurden mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit polyklonalem Anti-PTP α -Antikörper (α PTP α -CT, *Bild C*) oder monoklonalem Anti-Transaktivator-Antikörper (α VP16, *Bild D*) immundetektiert.

4. Diskussion

Der Beitrag zur Entstehung präinvasiver Tumoren oder die Beteiligung am Übergang zu malignen Formen der hier bearbeiteten PTP α ist bisher kaum beschrieben worden. Überexpression von PTP α wurde lediglich in fortgeschrittenen humanen Kolonkarzinoma diskutiert (Tabiti et al., 1995). Durch Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnte jedoch bereits eine wichtige Rolle dieser Tyrosinphosphatase in Signalübertragungsprozessen gezeigt werden. Die Dephosphorylierung des Insulinrezeptors durch PTP α in Insulinrezeptor-überexprimierenden BHK Zellen (Möller et al., 1995) oder HEK-293 Zellen (Lammers et al., 1997) wurde beschrieben. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß A431 Zellen nach PTP α -Überexpression eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung der Fokalkontakt Proteine Paxillin und FAK aufweisen, und durch eine erhöhte Zelladhäsion ausgezeichnet sind (Harder et al., 1995). Außerdem wurde die Bindung der SH2-Domäne des Adaptorproteins Grb-2 an das C-terminale phosphorylierte Y798 bereits 1994 von *Su et al* in L6 Myoblasten der Ratte demonstriert. Die Bedeutung dieser Bindung ist allerdings weiterhin unklar, weil die PTP α -Grb2 Bindung nicht zu einer Rekrutierung des Ras-aktivierenden Sos Proteins führt (Su et al., 1996). Eine zusätzliche Interaktion zwischen der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 und den Resten 469 bis 486 der PTP α könnte jedoch zu einer Blockierung der katalytischen Domäne, und somit zu einer verringerten Phosphataseaktivität führen (den Hertog und Hunter, 1996).

Am besten charakterisiert ist die Aktivierung der SRC-Kinasen c-src und c-fyn durch die PTP α -katalysierte Dephosphorylierung der inhibitorischen C-terminalen Tyrosinreste (Zheng et al., 1992). PTP α -Überexpression in murinen embryonalen P19 Karzinomazellen führt zu niedrigerer c-src Tyrosinphosphorylierung und erhöhter c-src Aktivität (den Hertog et al., 1993). Ein Einfluss auf c-src Aktivierung konnte später auch in PTP α -überexprimierenden A431 Zellen (Harder et al., 1998) und in embryonalen Fibroblasten transgener PTP α ^{-/-} Mäuse gezeigt werden (Ponniah et al., 1999; Su et al., 1999).

Hinsichtlich der Hypophosphorylierung des inhibitorischen C-terminalen Phosphotyrosins von c-src oder c-fyn, und der entsprechenden erhöhten Aktivität der SRC-Kinasen in transformierten Zelllinien, insbesondere in Kolon- und Brustkarzinoma (Reissig et al, 2000), stellte sich nun die Frage, ob eine Beteiligung der PTP α an der Förderung der neoplastischen Transformation oder der Fortschreitung von Brusttumoren auf Grund der oben beschriebenen Fähigkeiten zu vermuten ist.

4.1. cDNA-Array Analyse

Mit Hilfe der cDNA-Array Methode konnte ein Überexpression der PTP α in den analysierten Brustkrebszelllinien und uns zu Verfügung stehenden Brusttumorbiopsien demonstriert werden. Die Expressionsanalyse von Brustkrebszelllinien zeigte eine deutlich niedrigere Expression der Phosphatase in den immortalisierten Zelllinien Ac745 und HBL100. In der dritten immortalisierten Epithelzelllinie MCF10A, wurde eine erhöhte PTP α -Expression detektiert. Bei den Biopsien waren in 2 der 6 Biopsiepaare, bestehend aus normalen und Tumorgewebe aus den gleichen Patienten, und in 15 der weiteren 32 Tumorbiopsien erhöhte PTP α Werte ermittelt worden. Dies entspricht den Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe, die das Gesamtlysat aus Tumor- und normalem Gewebe von denselben Patienten paarweise mit einem Anti-PTP α Antikörper auf PTP α Protein analysierte und in 15 der 51 Brusttumore eine erhöhte Expression des PTP α Proteins feststellte (Ardini et al., 2000). Demzufolge kann eine erhöhte Expression dieser Phosphatase in 30-40% aller Tumorbiopsien nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse weisen auf eine potentielle Rolle der PTP α in der Tumorentstehung oder Progression hin.

Es stellte sich daher in Brustkrebszellen die Frage ob PTP α über c-src wirken könnte und eine regulatorische Rolle der SRC-Kinasen, wie bereits in Fibroblasten und A431 Zellen beschrieben (siehe oben), übernehmen könnte. Im Falle einer physiologischen Kontrollfunktion dieser Tyrosinphosphatase gegenüber c-src, wäre die hier gezeigte Expressionskorrelation zwischen PTP α und c-src in Brustkrebszelllinien und Brustbiopsien durchaus zu erwarten. Verschiedene humane PTPn wurden bisher mit c-src Aktivierung in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs in Verbindung gebracht, z.B. SHP-1 (Somani et al., 1997), SHP-2 (Walter et al., 1999), PTP-1B (Arregui et al., 1999) und PTP α (Zheng et al., 2000). Hohe Expressionen von PTP-1B Protein wurden im Gesamtzellysat der Zelllinien SkBr3, BT-483, MDA-MB 435S und MDA-MB 468 (die sich außer MDA-MB 435S auch durch hohe PTP α -Expression und erhöhter c-src-Aktivität auszeichnen) gemessen. In einer anschließenden Untersuchung konnte diese Arbeitsgruppe in MDA-MB 435S Zellen über Chromatographie und synthetische Peptide PTP-1B als einzige c-src-aktivierende PTP isolieren. Die Identifizierung der PTP-1B als primäre dephosphorylierende PTP von c-src in humanen Brustkrebszelllinien war die Schlußfolgerung aus diesen Experimenten (Bjorge et al., 2000). Diese Hypothese wird auch unterstützt durch die cDNA-Array Analyse und der Immunpräzipitationen in dieser Arbeit, welche eine sehr geringe PTP α -Expression in den MDA-MB 435S Zellen zeigten.

Der Östrogenrezeptor wird in stark differenzierten Brusttumoren exprimiert und gilt als klassischer Indikator für eine gute Krankheitsprognose, während in fortgeschrittenen und invasiveren Stadien niedrigere Expressionen zu detektieren sind (DeFazio et al., 2000). Die verfügbaren klinischen Daten der verwendeten Biopsien (Tabelle 1) zeigten eine direkte Korrelation zwischen PTP α und Östrogenrezeptor Expression. In 66,7% (8/12) der Biopsien, die durch eine hohe Expression der PTP α ausgezeichnet waren, konnte ein positiver Östrogenrezeptorstatus immunhistochemisch registriert werden. In jenen Biopsien mit einer niedrigen Expression der PTP α waren es nur 33,7% (5/14). Eine Analyse der cDNA-Array Daten und der Vergleich zwischen den immunpräzipitierten PTP α - und Östrogenrezeptorproteinen bestätigten auch in Brustkrebszelllinien diese Erkenntnisse.

Stimulation der östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D mit 17 β -Östradiol führte zu einer transkriptionellen Aktivierung des *bcl-2* Gens, dessen Produkt als Apoptoseinhibitor charakterisiert worden ist (Dong et al., 1999). In MCF7 Zellen konnte eine 17 β -Östradiol-stimulierte c-src- und MAPK-Aktivierung (Migliaccio et al., 1998), und in Östrogenrezeptor-transfizierten COS-7 und HEK-293 Zellen eine 17 β -Östradiol-stimulierte Tyrosinphosphorylierung des endogenen IGF-1R demonstriert werden (Kahlert et al., 2000). Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, daß der positive Östrogenrezeptorstatus wichtig für die Entstehung oder die Etablierung des Primärtumors sein könnte. Inwieweit die Expressionskorrelation mit PTP α in dieser Hinsicht von Bedeutung ist, muß in Zukunft noch geklärt werden.

4.2. cDNA-Array Validierung

cDNA-Arrays eignen sich speziell für umfangreiche Genexpressionsanalysen von Zelllinien oder Tumorbiopsien, weil veränderte Genexpressionen tausender ausgewählter Gene simultan in solchen Proben untersucht werden können. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten ist ein wichtiger Aspekt und kann durch viele unterschiedliche Parameter, wie die Qualität der eingesetzten cDNA oder die Sequenz der Sonde, beeinträchtigt werden. Es ist aus diesen Gründen also unerlässlich, daß die ermittelten Werte durch entsprechende Validierungsschritte wie Northern Blots (mRNA Expression) oder Western Blots (Protein Expression) bestätigt werden.

In den Northern Blots konnte die stärkste Expression der PTP α in den Zelllinien BT-20, MDA-MB 175 und MDA-MB 361 nachgewiesen werden. Die Analyse durch die Western Blots zeigte starke Expressionen in den Zelllinien MDA-MB 175 und ZR-75-30. Die

angestellten Validierungen der PTP α -Expression müssen in erster Linie die Expressionsprofile, nicht aber die absoluten ermittelten Werte der respektiven Validierungsmethode berücksichtigen. Der Vergleich der PTP α Expressionsprofile in allen untersuchten Brustzelllinien, liefert eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den cDNA-Array-, Northern Blot- und Western Blot Daten. Bei der Western Blot Validierung war es wichtig nicht nur mit Gesamtzellysat, sondern auch mit Immunpräzipitationen zu arbeiten, da die unterschiedlichen PTP α Expressionen der einzelnen Zelllinien im Gesamtzellysat nicht effektiv genug aufgezeigt werden können.

Es läßt sich festhalten, daß die cDNA-Array Analyse als eine sehr effektive Methode für die Genexpressionsanalyse eingesetzt werden kann. Die Validierung der Daten durch die Proteinexpression hat sich dabei besonders bewährt. Eine weitere mögliche Alternative und schnelle Validierungsmethode wäre die Real-Time-PCR, weil sie auch Quantifizierungen des zu untersuchenden Gens in der PCR-Reaktion ermöglichen würde.

4.3. Funktionelle Untersuchungen zu PTP α

4.3.1. Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems

Ein für den Gentransfer in Tumorzellen geeignetes stabiles Expressionssystem muß verschiedene Kriterien erfüllen. Alle zu integrierenden Komponenten müssen langfristig stabil in das Genom aufgenommen werden; d.H. die detektierbare Expression des Zielgens darf nicht nach Passagieren der Zellen abnehmen. Die Transfizierbarkeit der Zellen muß ebenfalls berücksichtigt werden. Für die hier zu bearbeitende Fragestellung ist ein infizierbares Gentransfersystem einem transfizierbaren System gegenüber immer im Vorteil, weil der Gentransfer in Tumorzellen im Vergleich zu Fibroblasten generell weniger effizient ist (Lindemann, et al., 1997). Aufgrund der weniger effizienten Transfizierbarkeit der Tumorzellen müssen die einzelnen Komponenten des Systems selektionierbar sein, um eine maximale Ausbeute an infizierten Zellen zu gewährleisten. Bei konstitutiv aktiven Promotoren und der dadurch getriebenen regulatorischen Proteine, wie der Transaktivator in diesem Fall, ist eine nicht zu detektierende basale Expression im uninduzierten Zustand unerlässlich (Shockett et al., 1995). Die sogenannte Basalaktivität führt bei der Expression von negativ-regulatorischen Zielgenen (wie Phosphatasen) zum Absterben oder zu einer Negativselektion der Zellen.

Die ersten Gehversuche mit induzierbarer Genexpression wurde mit dem Tetrazyklin-induzierbaren pUHD-Expressionssystem von Clontech durchgeführt (Gossen und Bujard, 1992). Mehrere der oben genannten Erfordernisse konnten jedoch durch dieses System in den untersuchten Tumorzelllinien nicht erfüllt werden. Besonders problematisch war hier die vom Zelltyp abhängige Instabilität der erhaltenen Klone, eine Erkenntnis die auch von anderen Gruppen beobachtet wurde (Blau und Rossi, 1999). Die detektierbare Basalaktivität im "ausgeschalteten" Zustand stellte in der Regel für die Expression von Tyrosinphosphatasen in den meisten Zelllinien die größte Herausforderung dar. Eine stark variierende Basalaktivität in unterschiedlichen Zelllinien (Vero, HeLa, PC12 und BHK; Brustkrebszelllinien wurden nicht untersucht), und eine unkontrollierte Promotoraktivität in konstitutiv-aktiven Transaktivator-Zelllinien (wie beispielsweise in BHK Zellen), wurden bereits beschrieben (Ackland-Berglund und Leib, 1994). Konstitutive Expression des Transaktivators hat einen weiteren Nachteil: die Basalaktivität konfrontiert die Zelle mit den toxischen Effekten des Transaktivators im nicht-induzierten Zustand und führt zu niedrigeren Transaktivator Mengen nach der Induktion. Bei einem direkten Vergleich zwischen konstitutiv-aktiven und autoregulatorischen Transaktivator Klonen in NIH3T3 Zellen, konnte in einem kleineren Anteil der konstitutiv-exprimierenden Klone die Expression des Transaktivators detektiert werden (18% vs. 90%). Der geringere Anteil an konstitutiv-exprimierenden Transaktivator-Klonen wurde durch die Basalaktivität des Transaktivators, der dadurch entstandenen Toxizität und dem Absterben von diesen Klonen erklärt (Shockett et al., 1995).

Es war aus diesen Gründen unbedingt notwendig ein virales, selektionierbares Expressionssystem mit einem autoregulatorischen Transaktivator heranzuziehen. Retroviraler Gentransfer ist nicht nur deutlich schneller, sondern auch effizienter durchzuführen, weil über 90% von zehntausenden Zellen (Zelllinien oder Primärzellen) infiziert werden können. Die Herstellung polyklonaler Zelllinien mit sehr unterschiedlichen Integrationsstellen kann damit in sehr kurzer Zeit bewerkstelligt werden (Springer und Blau, 1997). Dieses System zeichnete sich insbesondere durch eine höhere Stabilität der einzelnen Komponenten, eine im Vergleich zu den pUHD-Plasmiden verringerte Basalaktivität, und ein wesentlich erweitertes, infizierbares, Tumorzellspektrum aus.

4.3.2. Retrovirales Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem

Das Zwei-Vektor Genexpressionssystem der pUHD-Plasmide, bestehend aus einem Vektor der das CMV-Promotor kontrollierte tTA Gen und einem zweiten Vektor, der das unter einem Tetrazyklin-regulierbaren CMV-Minimalpromotors regulierte Zielgen trägt, wurde beibehalten. Diese Strategie des Gentransfers macht es möglich den Transaktivator zu exprimieren ohne die basale Expression des Zielgens zu beeinflussen.

Die Basis der hier verwendeten Vektoren bildeten die retroviralen SFG-Vektoren von *Lindemann et al.* Der ursprüngliche Transaktivator-exprimierende SFG-tcITE1 Vektor, ein Beispiel von mehreren induzierbaren Ein-Vektorsystemen ausgestattet mit dem Zielgen Luziferase, zeigte die höchste relative Induktion (133-fach) nach Transfektion in die Verpackungszelllinie BOSC23 und Infektion der Zelllinie NIH3T3 (*Lindemann et al.*, 1997). Das Zielgen dieses Vektors (das Luziferasegen) wurde gegen eine Neomycin-Phosphotransferase ausgetauscht, um die Selektion in einem möglichst breiten Wirtsspektrum zu ermöglichen. Ein Tetrazyklin-sensitiver CMV-Minimalpromotor treibt die Expression des Transaktivators und das über eine IRES Sequenz verbundene Resistenzgen, und bildet somit einen autoregulatorischen Loop, der die induzierbare Expression des unter seiner eigenen Kontrolle stehenden Transaktivators erlaubt. Ein autoregulatorischer Transaktivator Loop erlaubt eine effizientere Expression des Transaktivators, weil man die Nachteile des konstitutiv-exprimierten Transaktivators und der damit verbundenen Toxizität umgehen kann. Der induzierbare, autoregulatorische Transaktivator ermöglicht also die Möglichkeit Zellklone mit stärkerer Induktion generieren zu können (*Shockett et al.*, 1995).

Der ursprüngliche Vektor SFG-t7EC3 zeichnet sich durch Deletionen von CAAT Sequenzen und Enhancer Elementen im 5'LTR Bereich aus; diese Veränderungen führten, im Vergleich zu anderen Versionen dieses Vektors, zu einer geringfügigen, aber signifikanten Reduktion der basalen Luziferase Expression in NIH3T3 Zellen. Die erzielte relative Induktion dieses Vektors (32-fach) wurde zwar durch andere Versionen marginal übertroffen, aber die über das Luziferasegen detektierte Basalaktivität war hier am geringsten (*Lindemann, et al.*, 1997). Nach der Erweiterung der aus drei Restriktionsenzymen bestehenden Multi-Cloning-Site des Vektors SFG-t7EC3 (jetzt umbenannt in SFG-t7EC3-MCS), wurde zusätzlich das Resistenzgen für die Hygromycin-B-Phosphotransferase eingeführt. Die Einklonierung des Resistenzgens in beiden Richtungen ermöglichte den Einfluss auf die Expression des Zielgens. Die NIH3T3 Experimente mit PTP-H1 und PTP-MEG1 zeigten in beiden Fällen keinen detektierbaren Einfluß des Resistenzgen-treibenden Promotors auf die Expression der

Zielgene. In den Experimenten mit dem, der Transkription des Zielgens entgegengesetzte HSV-TK Promotor (SFG-t7EC3-MCS-SHP), konnte eine deutlich verringerte Expression der untersuchten Zielgene festgestellt werden. Dieser Effekt kann durch einen mögliche Antisense-Effekt des in entgegengesetzter Richtung gebildeten Transkripts erklärt werden. Der Vektor SFG-t7EC3-MCS-PHS erwies sich dadurch als geeigneter um stärkere Induktionen des Zielgens zu erzielen.

4.3.3. Erzeugung Transaktivator-stabiler Brustzelllinien

Das, durch die Verwendung von retroviralen Vektoren für den Gentransfer theoretisch erweiterte Zellinienspektrum, ließ sich auch praktisch bestätigen. Ein sehr breites Angebot konnte zusätzlich zu den in 3.3.3. erwähnten Brustzelllinien mit dem Vektor SFG-tcITE1-neo stabil infiziert werden: die Fibroblasten NIH3T3, RAT1 und HEK-293, die Glioblastomazelllinien U373 und U373-MG, die Melanomazelllinien WM 266-4 und WM 902-B, sowie C2C12 und PC12.

Die Charakterisierung der hergestellten Transaktivatorklone zeigte, daß der Transaktivator nach der Induktion nur in den induzierten Zellen der einzelnen Klone in ausreichender Menge exprimiert wurde, um im Western-Blot detektiert werden zu können. Ein Vorteil des viralen Vektors ist die ausschließliche Integration einer Kopie nach der retroviralen Infektion, während bei der Transfektion mehrere Plasmide die basale Genexpression in der Zielzelle steigern können (Hofmann et al., 1996). Somit erfüllte der autoregulatorische Loop des Transaktivators seine Aufgabe und ließ keine Basalaktivität zu.

Zelluläre Unterschiede in Infizierbarkeit und Induzierbarkeit sorgten für Limitierungen des retroviralen Systems. Obwohl der Infektions-vermittelte Gentransfer im Vergleich zu Transfektion eine erweitertes Zellspektrum zuließ, konnten nicht von allen PTP α -relevanten Zelllinien Transaktivatorklone hergestellt werden. Die Zelllinien ZR-75-30 und BT474 zeichnen sich durch erhöhte PTP α - und c-src-Expression, und positiven Östrogenrezeptorstatus aus. In diesen Zelllinien war es jedoch nicht möglich induzierbare Transaktivatorklone herzustellen. Da sich der Gentransfer in den Zelllinien ZR-75-1, SkBr3 und T47D mit SFG-tcITE1-neo als schwierig erwies, könnte ein mögliche Ursache in der langsamen Wachstumsrate dieser Zellen zu suchen sein. Die Infektion der schnellwachsenden Zelllinien, wie beispielsweise MCF10A, MCF7, BT549 oder die weiteren oben erwähnten Tumorzelllinien, erwies sich als sehr effizient und die Isolierung induzierbarer Transaktivatorklone als unproblematisch. Nicht-tumorigene Zelllinien wie Fibroblasten

(HEK-293, NIH3T3, RAT1) oder andere (C2C12, PC12) konnten ebenfalls schnell erzeugt werden. Die Infizierbarkeit der Zelllinien schien sich in der Induzierbarkeit der erhaltenen Klone wiederzuspiegeln. Schwer zu infizierende Zelllinien konnten nur schwache Induktionen des Transaktivators aufweisen, bei leicht zu infizierenden Zelllinien war es umgekehrt. Die Infizierbarkeit der Zellen, und somit das zur Verfügung stehende infizierbare Zellspektrum, kann durch die Expression bestimmter zellulärer Proteine, als Oberflächenrezeptoren dienend, definiert werden. Ein retrovirales Genom enthält mindestens drei Gene: *gag*, *pol* und *env*; das Gen *env* kodiert die Proteine der Virushülle, die für die Infektion essentielle charakteristische Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzelle erkennen (Coffin und Varmus, 1996). Das *env* Gen der hier verwendeten amphiotropen Verpackungszelllinie Phoenix A stammen ursprünglich von dem Moloney Maus Leukämie Virus und kodiert das Glykoprotein gp70. Der entsprechende Zellrezeptor für amphiotrophe Retroviren ist der Natrium-abhängige Phosphat Transporter Ram1 (Miller, 1996); inwiefern sich die Ram1 Expression zwischen den Brustkrebszelllinien unterscheidet ist unklar, aber entscheidend für den Gentransfer.

4.3.4. Erzeugung induzierbar exprimierender PTP α -Brustzelllinien

Der Herstellung stabiler Transaktivatorklone der bereits erwähnten Zelllinien folgte eine weitere Infektion mit dem SFG-t7EC3-MCS-PHS Leervektor oder einer der beiden SFG-t7EC3-MCS-PTP α Vektoren. Durch diese zweite Infektion wurde das zu Verfügung stehende Zellinienspektrum weiter eingeschränkt. Während die induzierbare Expression des Zielgens in Zelllinien wie MCF10A, MCF7 oder BT549 ohne Basalaktivität mit sehr guter Induktion zu detektieren war, mußten in den Zelllinien SkBr3 oder T47D wesentlich mehr Hygromycin-B-resistente Klone untersucht werden, um das Zielgen zu detektieren. Die Induktionsstärke in diesen Zelllinien war auch erheblich geringer als in MCF7 oder BT549. Von anderen Zelllinien, die sich sehr effizient mit dem ersten Virus infizieren ließen und nachweislich Transaktivator induzierbar exprimierten, konnten keine PTP α -exprimierenden Klone isoliert werden. Beispiele wären die Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 361, MDA-MB 436, MDA-MB 468 und ZR-75-1. BT-20 und MDA-MB 435S bildeten extreme Beispiele, weil im Falle beider Zelllinien keine Zellen nach der Sekundärinfektion mit diesem System überlebt haben. Bisher konnten keine vergleichbaren Beobachtungen für doppelt retroviral-infizierten Zelllinien gemacht werden. Inwieweit die Rezeptorexpression durch die primäre

Infektion verändert wurde, und ob die primäre Infektion aus diesem Grund Konsequenzen für die sekundäre Infektion hat, ist unbekannt. Eine mögliche Alternative wäre der Gentransfer mit zwei, sich in der Expression der *env*-Proteine sich unterscheidenden Retroviren, oder die Infektion mit komplementären viralen Ansätzen; beispielsweise könnte die primäre Infektion retroviral und die sekundäre Infektion adenoviral durchgeführt werden. Denkbar wäre auch der Austausch der *env*-Sequenz mit Teilen eines bekannten Oberflächenrezeptors. So könnten Zellen mit bestimmten Charakteristika, wie für den Erythropoietinrezeptor gezeigt, gezielt infiziert werden (Kasahara et al., 1994).

4.3.5. Charakterisierung induzierbar exprimierender PTP α -Brustzelllinien

Durch den Zeitverlauf der Transaktivator-Induktion konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Während der induzierte Transaktivator in dem ursprünglichen pUHD System in HeLa Zellen typischerweise bereits nach 12 Stunden detektiert werden konnte und nach 24 Stunden sein Expressionsmaximum erreicht hatte (Gossen et al., 1994), wurde die maximale Expression des Zielgens (β -Galaktosidase) in primären murinen Myoblasten bereits nach 48 Stunden detektiert (Hofmann et al., 1996). Die Expressionskinetik der hier verwendeten Brustzelllinien zeigte längere Induktionszeiten des Transaktivators und der beiden PTP α Konstrukte. Zahlreiche Kopien des konstitutiv exprimierten Transaktivators liegen auch im "ausgeschalteten" Zustand in den Zellen vor; ihre Bindung an die Tet Operator (TetO) Sequenzen wird lediglich durch die Präsenz des Tetrazyklins behindert (Gossen et al., 1995). Ein auf einem autoregulatorischen Loop basierendes Expressionssystem, wie die SFG-Vektoren, benötigt wesentlich mehr Zeit um detektierbare Induktionen des Transaktivators und des Zielgens zu erreichen. In dem Ruhezustand sind in der Zelle deutlich weniger Kopien des Transaktivators vorhanden und sie werden durch die Anwesenheit von Tetrazyklin an der TetO Bindung blockiert. Nach Entfernung des Antibiotikums muß der Loop durch die wenigen Moleküle in Gang gesetzt und vorangetrieben werden. Um eine detektierbare Expression des autoregulatorischen Transaktivators zu erzielen, benötigt dieser Vorgang etwa 24 Stunden mehr Induktionszeit als der konstitutive Transaktivator. Die Verwendung eines "Tet-On"-Systems könnte die verlangsamte Induktionskinetik teilweise kompensieren, weil die Notwendigkeit der Eliminierung des Effektors aus den Zellen wegfallen würde. Eine Zugabe des Effektors wäre kinetisch günstiger als eine Wegnahme (Gossen et al., 1993).

Das Zielgen kann erst dann detektiert werden, wenn ausreichend Transaktivator gebildet wurde um die TetO Bindestellen in ausreichendem Maße zu besetzen und die Transkription voranzutreiben. Die PTP α -Expression konnte nach vier Tagen in den meisten Zelllinien detektiert werden und erreichte dann ein Induktionsplateau. Erwartungsgemäß war die induzierte PTP α -Expression direkt proportional zu der induzierten Transaktivator-Expression der einzelnen Zelllinien.

Aufgrund der vorgetragenen Argumente würde man einen Einfluß des Antibiotikums auf die Induktionskinetik erwarten, weil die Anwesenheit der Tetrazyklinmoleküle durch die Bindung an den Transaktivator und die daraus resultierende Konformationsänderung darüber entscheiden würde, wieviele Transaktivator Proteine für eine Bindung an die TetO Sequenzen zur Verfügung stünden (Hinrichs et al., 1994). Eine Abhängigkeit der Tetrazyklinkonzentration konnte tatsächlich in den Zellen beobachtet werden. Die Expression des Zielgens war bei allen induzierten Zellen mindestens bis 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin nach dem sechsten induzierten Tag nicht zu detektieren. Die abnehmende Tetrazyklinkonzentration führt, über die Beeinflussung der Promotoraktivität, zu einer exponentiell ansteigenden Transkription des Zielgens, und sollte es somit ermöglichen dessen Expression zwischen 0 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin über mehrere Potenzen zu regulieren (Gossen und Bujard, 1992). Während in MDA-MB 453 Zellen PTP α auch mit 0,001 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin nicht zu detektieren war, war diese Menge für die Expression in MCF7 Zellen schon ausreichend. Es ist durchaus denkbar, daß die willkürliche Integration der Retroviren im Wirtsgenom an bestimmten aktiveren Stellen für stärkere basale Transkription sorgen könnte (Hennighausen et al., 1995). Es gilt festzuhalten, daß dieser retrovirale Ansatz eine Zehnerpotenz weniger Tetrazyklin für die Repression des Transaktivators und der davon abhängigen Transkription des Zielgens als das konstitutive System erforderte (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1993). Diese Beobachtung ist direkt auf die deutlich niedrigere Kopienzahl des Transaktivators in den nicht-induzierten Zellen zurückzuführen.

Es konnten keine morphologischen Beeinträchtigungen durch die Verwendung des Antibiotikums Tetrazyklin bei der Kultivierung der hier verwendeten Zellen gemacht werden. Die eingesetzten Mengen liegen etwa 1000fach unter zytotoxischen Konzentrationen und die andauernde Präsenz im Zellmedium kann durchaus auch bei kommerziell erhältlichen Medien gegeben sein (Gossen und Bujard, 1992). Auch bei transgenen Tierexperimenten mit unterschiedlichen Tetrazyklinsystemen konnten keine negativen Effekte des Antibiotikums erkannt werden (Furth et al., 1994; Shockett et al., 1995).

Ein möglicher toxischer Einfluß des Transaktivators wurde bereits in der Hamster Glioblastomazelllinie HJC-15 mit einem vergleichbaren autoregulatorischen Loop beschrieben. Korrelierend mit der detektierbaren induzierten Transaktivatorexpression erschienen die ersten morphologischen Veränderungen der HJC-15 Zellen nach 48 Stunden Induktion. Die Zellen nahmen eine aufgequollene und teilweise sogar eine binukleäre Morphologie an. Nach mehr als 72 Stunden konnten Zellen mit mehr als zwei Nuklei beobachtet werden. Diese morphologischen Veränderungen der HJC-15 Zellen wurden auch in anderen Zellen gemacht haben (Gallia und Khalili, 1998). Mikroskopische Analyse der Zelllinien ließ nach sechs Tagen Induktion signifikante morphologische Unterschiede lediglich bei den MCF7 Zellen erkennen. Diese Effekte basierten nicht auf unterschiedlichen Zelldichten, weil Experimente mit variierenden Zellzahlen nach sechs Tagen Induktion vergleichbar flache, vergrößerte Zellen gezeigt haben. Selbst die stark induzierbaren BT549 Klone erschienen unverändert. Der Transaktivator, im insbesondere die VP16 Domäne, wird schon seit längerem als ein potentiell toxisches Element diskutiert. Man muß natürlich bedenken, daß regulatorische Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, ihre physiologischen Funktionen nur dann optimal erfüllen können, wenn die intrazelluläre Konzentration auf ein definiertes Fenster beschränkt wird. Ein Hinweis auf mögliche Toxizität ist die nach eigenen Angaben niedrige Kopienzahl des Transaktivators in den stabilen pUHD HeLa Zellen (weniger als 10,000 Kopien), die nicht im Western Blot, sondern nur im "Gel Mobility Shift Assay" detektierbar sind (Gossen und Bujard, 1992). Erklärungsversuche wiesen aufgrund der Rekrutierung der transkriptionellen Maschinerie auf das Absterben von moderaten und stark exprimierenden Transaktivatorclonen hin (Hofmann et al, 1996). Die Notwendigkeit für sechs Induktionstage um angemessene Zielgenexpressionen zu erzielen resultiert in einem Plateau der Transaktivatorexpression bereits nach vier Tagen. Eine physiologisch unverändertes Verhalten dieser Zellen könnte daher durch die starke Transaktivatorexpression nicht mehr gewährleistet sein. Aus diesen Gründen ist es sicherlich von Vorteil, schwächere Transaktivator-exprimierende Klone für die sekundäre Infektion auszuwählen, und die autoregulatorische Transaktivatorexpression muß hinsichtlich der für das Zielgen ausreichenden Kopienzahl nach der Induktion weiter charakterisiert werden.

4.4. Funktionsanalyse von PTP α in Mammakarzinomzelllinien

Die Zellzähl- und Thymidineinbauexperimente bestätigten einen wachstumsreduzierenden Effekt des induzierbaren Systems. Bei den mit Leervektor infizierten Transaktivator Klonen konnte eine deutliche Verringerung der Wachstumsrate über den Induktionszeitraum von sechs Tagen registriert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in HJC-15 Zellen (Gallia und Khalili, 1998) und in S2-6 Zellen (Shockett et al, 1995) gemacht. In diesen Fällen konnte die Veränderung der Wachstumsrate bereits nach 48 Stunden registriert werden. Mittels FACS-Analyse wurde versucht die reduzierte Wachstumsrate der Zellen zu erklären. In den MCF10A und MCF7 Zellen konnte eine signifikante Zunahme der Zellpopulation in der G₁-Phase nach sechs Tagen Induktion gemessen werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den autoregulatorisch-exprimierenden HJC-15 Transaktivatorzellen (Gallia und Khalili, 1998). Eine andere Studie mit konstitutiv exprimierenden Zellen zeigte keinen Einfluß der induzierten Transaktivatorexpression auf die Phasen des Zellzyklus (Qin und Barsoum, 1997). Veränderungen des Zellzyklus könnten somit nur in den größeren Transaktivatormengen bildenden, autoregulatorischen Systemen vorbehalten sein.

Die cDNA-Analyse lieferte Hinweise auf die Transaktivator-bedingten Effekte in den hier verwendeten Zelllinien. Eine Induktion der Transaktivatorzellen ohne Zielgen führte zu signifikant verstärkten Expressionen der folgenden Gene: Prl-1, c-abl, DAP12, ADAM22 und PAP.

Prl-1: ist eine farnesylierte Tyrosinphosphatase, wird hauptsächlich im Zellkern als ein "immediate-early" Gen exprimiert und wurde bisher mit der Kontrolle von Zellproliferation in einigen oder Differenzierung in anderen Geweben in Verbindung gebracht (Kong et al, 2000; Peters et al., 2001). Ein direkter Zusammenhang zwischen zellulärem Stress und Prl-1 Expression wurde noch nicht berichtet.

c-abl: kann durch verschiedene Stress-bedingte Stimuli aktiviert werden (Echari und Pendergast, 2001). Interessanterweise wird die Transkription des p73 Proteins von c-Abl stabilisiert und seine pro-apoptotische Funktion dadurch aktiviert (Wang und Ki, 2001). SHP-1 wird nach genotoxischem Stress von den Kinasen c-abl und lyn aktiviert, und diese Phosphatase wurde bereits als essentieller Mediator für Somatostatin-induzierte Apoptose in MCF7 und T47D Zellen diskutiert (Yoshida und Kufe, 2001; Thangaraju et al., 1999).

DAP-12: wurde zunächst als ein transmembranäres 12 kDa Adaptorprotein mit einem ITAM (Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotif) in hämatopoietischen Zellen beschrieben, scheint aber auch in anderen Geweben exprimiert zu werden. Aktiviertes

DAP12 führt zu einer Signalweiterleitung über Cbl, PLC, Syk oder ZAP-70 (Campbell und Colonna, 1999), und spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose (McVicar et al., 1998).

ADAM-22: ist eine transmembranäre Disintegrin Metalloprotease und verfügt merkwürdigerweise über keine Metalloprotease Aktivität. Die Disintegrin-Domäne ermöglicht eine Funktion als Integrinrezeptor und der große zytoplasmatische Teil könnte für die Signalweiterleitung von Bedeutung sein (Sagane et al., 1999). Bestimmte Funktionen dieser Protease sind bisher noch nicht charakterisiert worden.

PAP: Eine inverse Korrelation zwischen der Expression dieser Tyrosinphosphatase und dem Wachstum mehrerer Prostatakrebszelllinien wurde bisher beschrieben. Überexpression nach Transfektion führte zu langsameren Wachstumsraten in Kulturschalen und in Soft-Agar Assays, zu verringerter Tyrosinphosphorylierung von HER2 und niedrigen Tumorstadiums in Tiermodell (Lin et al., 2001).

Inwieweit diese Effekte mit der, in der Literatur beschriebenen Toxizität des Transaktivators, und den hier beobachteten Wachstumsreduktionen zusammenhängen, ist unklar. Proapoptotische Genregulationen aufgrund des induzierten zellulären Stresses durch den Transaktivator sind noch nicht diskutiert worden. Möglich wäre aber auch die unspezifische Hybridisierung zwischen den induzierten Komponenten (der Transaktivator und das Hygromycin-Resistenz Gen) und den Sonden dieser Gene, resultierend in stärkeren Signalen. Derartige Kreuzreaktionen wären durch die Verwendung alternativer SONDENSEQUENZEN, entweder durch Oligonukleotide oder cDNA-Fragmenten, näher zu untersuchen.

Der negative Einfluß auf das Zellwachstum konnte bei den induzierten Brustkrebszelllinien nach Expression der beiden PTP α Konstrukte, insbesondere der Wildtyp Form, weiter verstärkt werden. Einerseits korreliert PTP α Expression mit c-src Expression, eine Überexpression der PTP α konnte in Brusttumoren und -krebszelllinien nachgewiesen werden, und Überexpression führt zu erhöhter c-src Aktivität in Fibroblasten und in MCF7 Zellen. Andererseits reduziert die Überexpression die Wachstumsrate der Brustkrebszelllinien. Verschiedene Überlegungen sind möglich um diesen vermeintlichen Widerspruch zu erklären.

Eine Wachstumsreduktion resultierend aus der Überexpression der Phosphatase und der einhergehenden Aktivierung von c-src wurde bereits in A431 und COS-7 Zellen nach Behandlung mit dem tumorspezifischen, zytotoxischen Somatostatin Analogon TT-232 beschrieben. TT-232 Stimulation führte zur Komplexbildung zwischen PI 3-kinase, PKC δ

und PTP α . Die Aktivierung der Phosphatase, bedingt durch die PKC δ -vermittelte Phosphorylierung der Serinreste 180 und 204, führte über c-src- zu Erk/MAPK Aktivierung (Stetak et al., 2001a). Diese Komplexbildung in den TT-232-behandelten A431 Zellen war notwendig für die Blockade des G₁/S Übergangs im Zellzyklus und der daraus resultierenden Wachstumsreduktion (Stetak et al., 2001b).

Aufgrund biochemischer Analysen wurde PTP α jedoch als wichtigste c-src-aktivierende PTP in Brustkrebszelllinien ausgeschlossen (Egan et al., 1999), und in der Brustkrebszelllinie MDA-MB 435S wurde PTP-1B als wichtigste c-src-aktivierende PTP isoliert (Bjorge et al., 2000). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist es möglich, daß die PTP α -bedingte c-src Aktivierung eine andere Rolle in sich unterscheidenden zellulären Zusammenhängen spielt. Überexpression von HER2, beispielsweise, ist tumorigen in Fibroblasten (Di Fiore et al., 1987) und führt zu Wachstumsreduktion und Differenzierung in MCF7 Zellen (Giani et al., 1998). Obwohl zahlreiche Ergebnisse für c-src als Substrat der PTP α sprechen, ist es möglich das weitere, bislang noch nicht identifizierte Substrate nach Dephosphorylierung ein reduziertes Zellwachstum erklären könnten. Die hier untersuchten Biopsien und Zelllinien stammen von Brusttumoren die bereits klinisch erfaßt werden konnten. Es ist also möglich, daß die erhöhte PTP α -Expression ein Überrest aus früheren Tumorstadien sein könnte, und das PTP α für die Hyperplasie oder Dysplasie wichtig ist. Interessanterweise führt die transgene Expression der PTP ϵ , die der PTP α am nächsten verwandte PTP, zu vermehrten malignen Brusttumoren; diese Tumore zeigen aber sehr niedrige PTP ϵ -Expression, ein Hinweis darauf, daß die Phosphatase wahrscheinlich in früheren Tumorstadien eine Rolle spielt oder sehr kontrolliert exprimiert werden muß (Elson, 1999). Vergleichbare Studien sind mit PTP α noch nicht durchgeführt worden.

Die erhöhte PTP α -Expression könnte auch die Folge eines unbekanntem tumorigenen Stimulus darstellen. Es konnte bisher bereits gezeigt werden, daß die für die ERK-Inaktivierung verantwortlichen dual-spezifischen Phosphatasen durch den ERK-aktivierenden Stimulus induziert werden (Brondello et al., 1997). Ebenso ist bekannt, daß PTP-LAR und PTP-1B nach HER2 Überexpression in epithelialen Brustzelllinien verstärkt exprimiert werden (Zhai et al, 1993), und daß PTP-LAR HER2-Transformation unterdrücken kann (Zhai et al., 1995).

Die prämitotische Serinphosphorylierung von PTP α durch eine bisher unbekannte Serin-threonin-kinase (möglicherweise PKC δ) hat eine reduzierte Grb2 Bindung an Y789 zur Folge, und die CDC2-Phosphorylierung von c-src im N-terminalen Bereich führt zu

verringertes Bindung der SH2-Domäne und dem eigenen Y527 (Shenoy et al., 1992). Da die c-src SH2-Domäne für Y789 der PTP α im Gegensatz zu Y527 eine höhere Affinität aufweist, würde die reduzierte Grb2-Bindung und die N-terminale c-src Phosphorylierung das Y789 für die c-src Interaktion freigeben. Durch die gleichzeitige zweifache Aktivitätssteigerung der Serinphosphorylierten PTP α und der anschließenden Dephosphorylierung von Y527 kann die Kinaseaktivität von c-src gesteigert werden (Zheng und Shalloway, 2001). Sollte die c-src Aktivierung für den G₂-M Übergang von Bedeutung sein, würden stringente Kontrollmechanismen dieser Kinase zu erwarten sein. Dazu gehören die im N-terminalen Bereich phosphorylierende CDC2, die aktivierende PTP, und die PTP α -phosphorylierende STK. Inwieweit die PTP α -Dimerisierung für die Bindung von Grb2 oder die Phosphorylierung durch STKn, und letztendlich auch die Aktivierung von c-src, beeinflussen kann, ist noch ungeklärt (Zheng et al., 2002). Außerdem konnte eine Ko-lokalisierung zwischen PTP α und c-src in den Fokalkontakten von NIH3T3 Zellen gezeigt werden; die Bindung von Grb2 an Y789 spielt hier eine entscheidende Rolle (Lammers et al., 2000). Eine verringerte Grb2 Bindung an PTP α könnte demzufolge alternative Lokalisationen in der Zellmembran, und somit weitere Wirkungsstätten zulassen.

Der genregulatorische Effekt der Transaktivator-Induktion ist als starker Hintergrund festzuhalten. Durch Stress oder mitogene Stimuli verursachte Genregulationen sind häufig nur im niedrigeren Bereich (z.B. 2-3-fach) zu beobachten. Tyrosinphosphatasen, die in den Zellen in weniger Kopien als Tyrosinkinase vorhanden sind, bilden hier keine Ausnahme. Kleinere, aber dennoch wichtige, Genregulationen könnten also durch einen starkeren Hintergrund maskiert werden.

In fünf der sechs untersuchten Zelllinien konnte eine niedrigere c-src Expression nach PTP α -Induktion mittels cDNA-Analysen detektiert werden. Da die erhöhte PTP α Expression auch zu erhöhter c-src Aktivität in der Zelle führt, ist es durchaus möglich, daß die induzierten Zellen dies über die verringerte Kinase Expression kompensieren.

PTP ϵ , die PTP mit der größten Homologie zu PTP α , wurde in den meisten Zelllinien (4/6) nach PTP α -Induktion verstärkt exprimiert. Da die Sonden der Tyrosinphosphatasen aus den N-terminalen PTP Domänen stammen und diese Domänen die stärkste Homologie unter den einzelnen PTPn aufweisen, ist die erhöhte Expression wahrscheinlich durch unspezifische Hybridisierung zu erklären.

Die Genregulation der drei RTKn MCK10, Ufo/Axl und IGF-1R wurden in den Zelllinien weniger eindeutig beeinflusst. MCK10 und IGF-1R konnten sowohl in erhöhter, als auch in

verringertes Expression nachgewiesen werden. MCK10 (auch DDR1) wird durch die Bindung bestimmter Kollagene aktiviert und kann somit Zellproliferation und Metalloproteaseexpression beeinflussen (Vogel et al., 2000; Mohan et al., 2001).

Die IGF Liganden haben nicht nur eine starke mitogene Wirkung auf Brustkrebszelllinien, sondern auch auf viele andere Krebszelllinien (Rosen et al., 1991). Außerdem konnte ihnen ein anti-apoptotischer Effekt durch die Regulierung der Bcl und Bax Mengen nachgewiesen werden (Parrizas und LeRoith, 1997; Wang et al., 1998). Der IGF-1R wird in Brustkrebszelllinien überexprimiert (diese Arbeitsgruppe), weist erhöhte Kinaseaktivität auf, und seine Expression wird durch p53 supprimiert (Ohlsson et al., 1998; Resnik et al., 1998). Dieser Rezeptor ist daher ein wichtiger Mediator der Signalübertragung in Brustkrebszellen. Ufo/Axl wurde in BT549 und MDA-MB 453 Zellen verstärkt exprimiert. Eine Überexpression dieser Kinase wurde nicht nur in metastasierenden Prostata Zelllinien (Jacob et al., 1999), sondern auch in den hier untersuchten BT549 Zellen mittels Gengruppierungen nachgewiesen. Eine direkte Beteiligung von Ufo/Axl an Metastasierungsprozessen konnte aber bisher noch nicht gezeigt werden.

PTP α wurde bisher mehrfach in Zusammenhang mit Insulin Signalübertragung beschrieben. Verschiedene PTP α Modellsysteme, wie anti-adhäsive Effekte in BHK Zellen (Möller et al., 1995), die niedrigere Insulin-stimulierte Prolactin Promotoraktivität in GH4 Zellen der Hirnanhangdrüse (Jacob et al., 1998), oder die Rolle als negativer Regulator des Insulin-stimulierten Glukosetransports durch verringerte GLUT4 Expression (Cong et al., 1999), unterstützen diese Theorie. Direkte Substrate der Phosphatase konnten diesbezüglich noch nicht identifiziert werden. Der Insulinrezeptor wird auch in Brustkrebszelllinien exprimiert, konnte aber mit den vorhandenen Antikörpern in den hier verwendeten Zelllinien nicht detektiert werden. Dennoch könnte der Einfluß auf den Insulin-vermittelten Signalweg einen Anhaltspunkt für die, in der Zellzyklusanalyse oder den Proliferationsexperimenten beobachteten Effekte, darstellen.

Interessanterweise konnte in einigen der stabilen Zelllinien (4/6) eine PTP α -induzierte Genregulation des Rezeptors des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-1) festgestellt werden. Stimulationsexperimente mit dem IGF-1 Liganden in MCF7 Zellen zeigten eine PTP α -abhängige Dephosphorylierung des IGF-1R; weiterführende Experimente in HEK-293 Zellen oder mit den stabilen induzierbaren MCF7 Zellen konnten diese Beobachtung jedoch nicht bestätigen. Ein Einfluß der PTP α auf den IGF-1-vermittelten Signalweg wäre aber durchaus naheliegend: Der, dem Insulinrezeptor verwandte IGF-1R, wurde bereits mehrfach

als wichtiger Vermittler des G₁/S-Übergangs im Zellzyklus', mit Zellproliferation und auch Anti-Apoptose in Brustkrebszelllinien diskutiert (Werner und LeRoith, 1997).

Zusätzlich besteht zwischen den IGF-1- und Östrogen-vermittelten Signalwegen ein direkter Zusammenhang ("Cross-talk"): Behandlung von MCF7 Zellen mit 17 β -Östradiol führte zu gesteigerter IGF-1R-, IRS-1- und IRS-2 Proteinexpression; die erhöhte IRS-1 Proteinexpression konnte ebenfalls in T47D und ZR-75-1 gezeigt werden (Lee et al., 1999). Wenn MCF7 Zellen mit IGF-1 behandelt wurden, konnte nach 3 Stunden eine 80%ige und 60%ige Abnahme der Östrogenrezeptor-mRNA, bzw. -proteins verzeichnet werden (Stoica et al., 2000). Östrogenbehandlung von MCF7 Zellen kann die IGF-1 Effekte auf Cyclin D1 und Cyclin E Expression, sowie Phosphorylierung von pRB potenzieren. Alle drei Moleküle sind entscheidend für die Fortführung der G₁-Phase des Zellzyklus (Dupont et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, daß Östrogenrezeptor-positive Zellen vermehrt IGF-1R exprimieren (diese Arbeitsgruppe), und daß beide Signalwege in der Lage sind miteinander zu kommunizieren. Eine mögliche Rolle der PTP α in der IGF-1-vermittelten Signalübertragung und den daraus resultierenden Konsequenzen für den neoplastischen Prozess muß daher näher untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der PTP α im Mammakarzinomsystem zu untersuchen, da eine mögliche Beteiligung dieser Phosphatase an der Förderung der neoplastischen Transformation oder der Fortschreitung der Brusttumoren nicht beschrieben wurde.

In einem molekulardiagnostischen Teil konnte mittels cDNA-Arrays eine klare hoch-regulierte Expression der PTP α in etwa einem Drittel der primären Brusttumoren und in 15 der 21 analysierten Brustkrebszelllinien gezeigt werden. Eine starke Expressionskorrelation zwischen PTP α und der zytoplasmatischen RTK c-src, sowie zwischen PTP α und einem positiven Östrogenrezeptorstatus konnte ebenfalls gezeigt werden. Die anschließenden cDNA-Array Validierungen mit Northern-, bzw. Westernblots bestätigten diese Erkenntnisse, und bewiesen die Eignung der Arraymethodik für jene molekularen Untersuchungen.

Die Erkenntnisse aus dem molekulardiagnostischen Teil sollten mit einem funktionsanalytischen Teil mittels gezielter Manipulation von Brusttumorzellen überprüft werden.

Tetrazylin-induzierte Genexpression der PTP α -wt und der PTP α -cc/ss katalytisch inaktiven Mutante wurde in einer Reihe von Brustzelllinien etabliert. Ein für diesen Zweck modifiziertes retrovirales Zwei-Vektor System, getrieben durch einen autoregulatorischen Transaktivator-Feedbackloop, ermöglichte eine starke Induktion der Zielgene in einem erweiterten Zellspektrum ohne detektierbare Basalaktivität. Die Induktionsstärke der Transaktivatorklone führte zu spezifischen Genregulationen in den meisten Zelllinien (c-abl, PAP, Prl-1, ADAM22 und DAP12), und diese könnten einen potentiellen Zusammenhang zwischen dem beobachteten verringerten Zellwachstum der induzierten Zelllinien und der induzierten Expression des Transaktivators herstellen.

Weiterhin konnte durch die induzierte Genexpression der PTP α verringertes Zellwachstum aller untersuchten Brustkrebszelllinien, vermehrte Zellzahlen in der G₁-Phase der MCF10A und MCF7 Zellen, und Aktivierung von c-src in den MCF7 Zellen gezeigt werden. Erhöhte c-src Aktivität korrelierte mit einer verringerten c-src Expression, welche wahrscheinlich auf Herunterregulierung des Gens zurückzuführen ist.

Die Hochregulation der PTP α in Primärtumoren und Brustkrebszelllinien, die PTP α -vermittelte Wachstumsreduzierung und die Aktivierung von c-src in Brusttumorzelllinien,

sowie die Korrelation mit der c-src Expression und einem positiven Östrogenrezeptorstatus implizieren eine Beteiligung dieser Phosphatase in der Tumorigenese im Mammakarzinomsystem.

6. Literatur

Aaronson, S.A., Growth factors and cancer (1991) *Science*, **254**, 1146-1153

Ackland-Berglund, C.E. und Leib, D.A., Efficacy of Tetracycline-Controlled Gene Expression Is Influenced by Cell Type (1994) *BioTechniques*, **18**, 196-200

Ahmad, F., Li, P.-M., Meyerovitch, J. und Goldstein, B.J., Osmotic loading of neutralising antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20503-20508

Aicher, B., Lerch, M.M., Müller, T., Schilling, J. und Ullrich, A., Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 681-696

Ardini, E., Agresti, R., Tagliabue, E., Greco, M., Aiello, P., Yang, L.-T., Menard, S. und Sap, J., Expression of protein tyrosine phosphatase alpha (RPTP α) in human breast cancer correlates with low tumor grade, and inhibits tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* (2000) *Oncogene*, **19**, 4979-4987

Arregui, C.O., Balsamo, J. und Lilien, J., Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B (1999) *J. Cell. Biol.*, **143**, 861-873

Bakalara, N., Seyfang, A., Baltz, T. und Davis, C., *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity (1995a) *Exp. Parasitol.*, **81**, 302-312

Bakalara, N., Seyfang, A., Davis, C. und Baltz, T., Characterization of a life cycle-regulated membrane protein tyrosine phosphatase in *Trypanosoma brucei* (1995b) *Eur. J. Biochem.*, **234**, 871-877

Barford, D., Flint, A.J. und Tonks, N.K., Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B (1994) *Science*, **263**, 1397-1404

Barnea, G., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A.M., Canoll, P.D., D'Eustachio, P., Morse, B., Levy, J.B., Laforgia, S., Huebner, K., Musacchio, J.M., Sap, J. und Schlessinger, J., Identification of a carbonic anhydratase-like domain in the extracellular region of RPTP γ defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1497-1506

Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y, Yim, M.B. und Chock, P.B., Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 34543-34546

Bhandari, V., Lim, K.L. und Pallen, C.J., Physical and functional interactions between receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha and p59fyn (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8691-8698

- Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T. und Noel, J.P., Structural basis for inhibition of receptor-tyrosine phosphatase- α by dimerisation (1996) *Nature*, **382**, 555-559
- Bjorge, J.D., Pang, A. und Fujita, D.J., Identification of PTP-1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating of c-Src in several human breast cancer cell lines (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 41439-41446
- Black, D.S. und Bliska, J.B., Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions (1997) *EMBO J.*, **16**, 2730-2744
- Blau, H.M. und Rossi, F.M.V., Tet B or not tet B: Advances in tetracycline-inducible gene expression (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 797-799
- Brown, M.T. und Cooper, J.A., Regulation, substrates and functions of src (1996) *Biochem. Biophys. Acta*, **1287**, 121-149
- Bueler, H. und Mulligan, R.C., Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1 (1996) *Mol. Med.*, **2**, 545-555
- Campbell, K.S., Colonna, M., DAP12: a key accessory protein for relaying signals by natural killer cell receptors (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 631-636
- Cartwright, C.A., Meisler, A.I. und Eckhart, W., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 558-562
- Castagnino, P., Biesova, Z., Fazioli, F., Gill, G.N. und DiFiore, P.P., Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent (1995) *Oncogene*, **10**, 723-729
- Cates, C.A., Michael, R.L., Stayrook, K.R., Harvey, K.A., Burke, Y.D., Randall, S.K., Crowell, P.L. und Crowell, D.N., Prenylation of oncogenic human PTPCAAX protein tyrosine phosphatases (1996) *Cancer Lett.*, **110**, 49-55
- Chen, C. und Okayama, H., High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA (1987) *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. und Fudenberg, H.H., Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate (1977) *J. Immunol. Meth.*, **18**, 183-192
- Chung, C.T. und Miller, R.H., A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells (1988) *Nucl. Acid Res.*, **16**, 3580
- Chung, C.T. und Miller, R.H., Preparation and storage of competent Escherichia coli cells (1993) *Methods in Enzymol.*, **218**, 621-627
- Coffin, J. M. und Varmus, H. E., editors (1996) *Retroviruses* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)

- Cohen, G.B., Ren, R. und Baltimore, D., Modular binding domains in signal transduction proteins (1995) *Cell*, **80**, 237-248
- Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Lin, C.H., Sap, J. und Quon, M.J., Overexpression of protein tyrosine phosphatase-alpha (PTP-alpha) but not PTP-kappa inhibits translocation of GLUT4 in rat adipose cells (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **255**, 200-207
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Fischer, E.H. und Krebs, E.G., Expression of a human T-cell protein tyrosine phosphatase in baby hamster kidney cells (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7280-7284
- Cool, D.E. und Blum, J.J., Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani* (1993) *Mol. Cell. Biochem.*, **127/128**, 143-149
- Cooper, J.A., The *src* family of protein-tyrosine kinases. In *Peptides and protein phosphorylation* (ed. B.E. Kemps), S. 104. CRC Press, Florida
- Courtneidge, S.A., Non-receptor protein tyrosine kinases. In *Frontiers in molecular biology: protein kinases* (ed. J. Woodgett), S. 212. Oxford University Press
- Cunningham, B.A., Cell adhesion molecules as morphoregulators (1995) *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 628-633
- DeFazio, A., Chiew, Y.-E., Sini, R.L., Janes, P.W. und Sutherland, R.L., Expression of c-erbB Receptors, Heregulin and Oestrogen Receptor In Human Breast Cell Lines (2000) *Int. J. Cancer*, **87**, 487-498
- den Hertog, J., Pals, C.E., Peppelenbosch, M.P., Tertoolen, L.G., de Laat, S.W. und Kruijer, W., Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation (1993) *EMBO J.*, **12**, 3789-3798
- den Hertog, J., Sap, J., Pals, C.E.G.M., Schlessinger, J. und Kruijer, W., Stimulation of receptor protein tyrosine phosphatase alpha activity and phosphorylation by phorbol ester (1995) *Cell Growth Differ.*, **6**, 303-307
- den Hertog, J. und Hunter, T., Tight association of Grb2 with receptor protein-tyrosine phosphatase α is mediated by the SH2 and C-terminal SH3 domains (1996) *EMBO J.*, **15**, 3016-3027
- Denu, J.M., Zhou, G., Gou, Y. und Dixon, J.E., The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase (1995) *Biochemistry*, **34**, 3396-3403
- Denu, J.M., Lohse, D.L., Vjayalakshmi, J. und Dixon, J.E., Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **93**, 2493-2498
- Desai, D.M., Sap, J., Schlessinger, J. und Weiss, A., Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase (1993) *Cell*, **73**, 541-554

Desai, C.J., Krueger, N.X., Saito, H. und Zinn, K., Competition and cooperation among receptor tyrosine phosphatases control motoneuron growth cone guidance in *Drosophila* (1997) *Development*, **124**, 1941-1952

Diamond, R.H., Cressman, D.E., Laz, T.M., Abrams, C.S. und Taub, R., PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3752-3762

Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R. und Aaronson, S.A., erbB-2 is a Potent Oncogene When Overexpressed in NIH/3T3 Cells (1987) *Science*, **237**, 178-182

Dixon, J.E., Structure and catalytic properties of protein tyrosine phosphatases (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.*, **766**, 18-22

Dong, L., Wang, W., Wang, F., Stoner, M., Reed, J.C., Harigai, M., Samudio, I., Kladdé, M.P., Vyhldal, C. und Safe, S., Mechanisms of Transcriptional Activation of bcl-2 Gene Expression by 17 β -Estradiol in Breast Cancer Cells (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 32099-32107

Dupont, J., Karas, M. und LeRoith, D., The potentiation of Estrogen on Insulin-like Growth Factor I Action in MCF7 Human Breast Cancer Cells Includes Cell Cycle Components (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35893-35901

Echarri, A., Pendergast, A.M., Activated c-Abl is degraded by the ubiquitin-dependent proteasome pathway (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1759-1765

Egan, C., Pang, A., Durda, D., Cheng, H.-C., Wang, J.H. und Fujita, D.J., Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530 (1999) *Oncogene*, **18**, 1227-1237

Elson, A. und Leder, P., Protein tyrosine phosphatase ϵ (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 26116-26122

Elson, A., Protein tyrosine phosphatase ϵ increases the risk of mammary hyperplasia and mammary tumors in transgenic mice (1999) *Oncogene*, **18**, 7535-7542

Ferracini, R. und Brugge, J., Analysis of mutant forms of the c-src gene product containing a phenylalanine substitution of tyrosine 416 (1990) *Oncogene Res.*, **5**, 205

Filippini, F., Rossi, V., Marin, O., Trovato, M., Constantino, P., Downey, P.M. und Terzi, M., A plant oncogene as a phosphatase (1996) *Nature*, **379**, 499-500

Flores, E., Roy, G., Patel, D., Shaw, A. und Thomas, M.L., Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4938-4946

Frangioni, J.V., Beahm, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A. und Neel, B.G., The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence (1992) *Cell*, **68**, 545-560

- Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M. und Ullrich, A., Association of human protein-tyrosine phosphatase κ with members of the armadillo family (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 16712-16719
- Furth, P. A., St. Onge, L., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H. und Hennighausen, L., Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9302-9306.
- Galaktionov, K., Lee, A.K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M. und Beach, D., Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes (1995) *Science*, **269**, 1575-1577
- Galaktionov, K., Chen, X. und Beach, D., Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of *c-myc* (1996) *Nature*, **382**, 511-517
- Gallia, G.L. und Khalili, K., Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system (1998) *Oncogene*, **16**, 1879-1884
- Gelderloos, J.A. und Anderson, S.M., Overexpression of protein tyrosine phosphatase 1 (PTP1) alters IL-3 dependent growth and tyrosine phosphorylation (1996) *Oncogene*, **13**, 2367-2378
- Gershoni, J.M. und Palade, G.E., Protein blotting: principles and applications (1983) *Anal. Biochem.*, **131**, 1-15
- Giani, C., Casalini, P., Pupa, S.M., De Vecchi, R., Ardini, E., Colnaghi, M.I., Giordano, A. und Menard, S., Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation (1998) *Oncogene*, **17**, 425-432
- Gossen, M. und Bujard, H., Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547-5551
- Gossen, M., Bonin, A.L. und Bujard, H., Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements (1993) *TIBS*, **18**, 471-475
- Gossen, M., Bonin, A.L., Freundlieb, S. und Bujard, H., Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells (1994) *Curr. Opin. Biotech.*, **5**, 516-520
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H., Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells (1995) *Science*, **268**, 1766-1769
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J., A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA (1973) *Virology*, **52**, 456-467
- Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L. und McDonald, N., Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor (1989) *EMBO J.*, **8**, 4115-4123

Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neininger, A., Gaestel, M., Herrlich, P. und Böhmer, F.D., Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26378-26386

Guan, K.L., Broyles, S.S. und Dixon, J.E., A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus (1991) *Nature*, **350**, 359-362

Guan, K.L. und Dixon, J.E., Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia* (1990) *Science*, **249**, 553-556

Guan, K.L. und Dixon, J.E., Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 17026-17030

Guilbaud, N.F., Gas, N., Dupont, M.A. und Valette, A., Effects of differentiation-inducing agents on maturation of human MCF-7 breast cancer cells (1990) *J. Cell. Physiol.*, **145**, 162-172

Harder, K.W. und Jirik, F.R., Increased cell-substratum adhesion and activation of SRC-family kinases by protein tyrosine phosphatase alpha (Meeting abstract) (1995) *J. Cell. Biochem.*, Suppl. 19A:17

Harder, K.W., Moller, N.P.H., Peacock, J.W. und Jirik, F.R., Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates src family kinases and alters cell-substratum adhesion (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 31890-31900

Hariharan, I.K., Chuang, P.T. und Rubin, G.M., Cloning and characterization of a receptor-class phosphotyrosine phosphatase gene expressed on central nervous system axons in *Drosophila melanogaster* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11266-11270

Hennighausen, L., Wall, R. J., Tillmann, U., Li, M. und Furth, P. A., Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system (1995) *J. Cell. Biochem.*, **59**, 463-472

Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, A., Tovar, K., Hillen, W. und Saenger, W., Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance (1994) *Science*, **264**, 418-420

Hjelm, H., Hjelm, K. und Sjoquist, J., Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbant for isolation of immunoglobulins (1972) *FEBS Lett.*, **28**, 73-76

Hjermstad, S.J., Peters, K.L., Briggs, S.D., Glazer, R.I. und Smithgall, T.E., Regulation of the human *c-fes* protein tyrosine kinase (p93^{c-fes}) by its *src* homology 2 domain and major autophosphorylation site (Tyr-713) (1993) *Oncogene*, **8**, 2283-2292

Hofmann, A., Nolan, G.P. und Blau, H.M., Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5185-5190

Hoffmann, I., Draetta, G. und Karsenti, E., Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition (1994) *EMBO J.*, **13**, 4302-4310

Hoof van Huijsduijnen, R., Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest (1998) *Gene*, **225**, 1-8

Hubbard, S.R., Src autoinhibition: let us count the ways (1999) *Nature Struct. Biol.*, **6**, 711-714

Irby, R.B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J.M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D.J., Jove, R. und Yeatman, T.J., (1999) *Nat. Genet.*, **21**, 187-190

Jacob, K.K., Sap, J. und Stanley, F.M., Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase α Specifically Inhibits Insulin-increased Prolactin Gene Expression (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 4800-4809

Jacob, A.N.K., Kalapurakal, J., Davidson, W.R., Kandpal, G., Dunson, N., Prashar, Y. und Kandpal, R.P., A Receptor Tyrosine Kinase, Ufo/Axl, and Other Genes isolated by a Modified Differential Display PCR Are Overexpressed in Metastatic Prostatic Carcinoma Cell Line DU145 (1999) *Cancer Detection and Prevention*, **23**, 325-332

Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J.P., Sap, J. und Hunter, T., Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α (1999) *Nature*, **401**, 606-610

Jirik, F.R., Janzen, N.M., Melhado, I.G. und Harder, K.W., Cloning and chromosomal assignment of a widely expressed human receptor-like protein-tyrosine phosphatase (1990) *FEBS Lett.*, **273**, 239-242

Joussen, A.M. und Huang, S., Möglichkeiten einer Breitspektrumanalyse von Genexpressionsmustern mittels cDNA-Arrays (2001) *Ophthalmologe*, **98**, 568-573

Juliano, R.L. und Haskill, S., Signal transduction from the extracellular matrix (1993) *J. Cell. Biol.*, **120**, 577-586

Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R. und Grohe, C., Estrogen Receptor α Rapidly Activates the IGF-1 Receptor Pathway (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 18447-18453

Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J.B. und Galan, J.E., A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium* (1996) *Mol. Microbiol.*, **21**, 633-641

Katich, S.C., Zerfass-Thome, K. und Hoffmann, I., Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene (2001) *Oncogene*, **20**, 543-550

Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. und Williams, L.T., PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine (1994) *Science*, **268**, 1177-1180

Kenner, K.A., Anyanwu, E., Olefsky, J.M. und Kusari, J., Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 19810-19816

Keyse, S.M., Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **9**, 143-152

Klarlund, J.K., Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins (1985) *Cell*, **41**, 707-717

Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. und Lodish, H.F., Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals (1995) *Cell*, **80**, 729-738

Kong, W., Swain, G.P., Li, S. und Diamond, R.H., PRL-1 PTPase expression is developmentally regulated with tissue-specific patterns in epithelial tissues (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **279**, G613-21

Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y. und Ullrich, A., Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of Mycobacterium tuberculosis (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 5425-5432

Kozieradzki, I., Kundig, T., Kishihara, K., Ong, C.J., Chiu, D., Wallace, V.A., Kawai, K., Timms, E., Ionescu, J., Ohashi, P. et al., T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45 (1997) *J. Immunol.*, **158**, 3130-3139

Kozma, L.M., Rossomando, A.J., und Weber, M.J., Comparison of three methods for detecting tyrosine-phosphorylated proteins (1991) *Methods in Enzymol.*, **201**, 28-43

Krueger, N.X., Streuli, M. und Saito, H., Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases (1990) *EMBO J.*, **9**, 3241-3252

Kulas, D.T., Zhang, W.R., Goldstein, B.J., Furlanetto, R.W. und Mooney, R.A., Insulin receptor signaling is augmented by antisense inhibition of the protein tyrosine phosphatase LAR (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 2435-2438

Kunkel, T.A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 488-492

Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970) *Nature*, **227**, 680-685

LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Ganniz-Weston, L.A., Harris, C.C., Drabkin, H., Patterson, D., Croce, C.M., Schlessinger, J. und Huebner, K., Receptor protein-tyrosine phosphatase γ is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5036-5040

Lammers, R., Moller, N.P. und Ullrich, A., The transmembrane protein tyrosine phosphatase alpha dephosphorylates the insulin receptor in intact cells (1997) *FEBS Lett.*, **404**, 37-40

Lammers, R., Lerch, M.M. und Ullrich, A., The carboxy-terminal tyrosine residue of protein-tyrosine phosphatase alpha mediates association with focal adhesion plaques (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3391-3396

Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D. und Schlessinger, J., Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules (1989) *EMBO J.*, **8**, 421-427

Lee, S.Y. und Rasheed, S., A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA (1990) *Biotechniques*, **9**, 676-679

Lee, A.V., Jackson, J.G., Gooch, J.L., Hilsenbeck, S.G., Coronado-Heinsohn, E., Osborne, C.K. und Douglas, Y., Enhancement of Insulin-Like Growth Factor Signaling in Human Breast Cancer: Estrogen Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression *in vitro* and *in vivo* (1999) *Mol. Endocrinol.*, **13**, 787-796

Lehninger Biochemie (2001) Seite 430, ed. Nelson D. und Cox, M., *Springer Verlag*, 3.Auflage

Lemmon, M.A. und Schlessinger, J., Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 459-464

Levy, J.B., Canol, P.D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A.M., Huang, J.T., Cannizzaro, L.A., Park, S.H., Druck, T., Huebner, K., Sap, J., Ehrlich, M., Musacchio, J.M. und Schlessinger, J., The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the nervous system (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 10573-10581

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podyspanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittman, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. und Parsons, R., PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in brain, breast, and prostate cancer (1997) *Science*, **275**, 1943-1947

Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L.M., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C. und Parsons, R., Germline mutations of the PTEN gene in Cowden's disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome (1997) *Nature Genet.*, **16**, 64-67

Lin, M.F., Lee, M.S., Zhou, X.W., Andressen, J.C., Meng, T.C., Johansson, S.L., West, W.W., Taylor, R.J., Anderson, J.R., Lin, F.F., Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increases tumorigenicity of human prostate cancer cells (2001) *J. Urol.*, **166**, 1943-1950

Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S. und Mulligan, R.C., Versatile Retrovirus Vector Systems for Regulated Gene Expression In Vitro and In Vivo (1997) *Mol. Med.*, **3**, 466-476

Liu, K., Lemon, B. und Traktman, P., The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription *in vivo* and *in vitro* (1995) *J. Virol.*, **69**, 7823-7834

Lohse, D.L., Denu, J.M., Santoro, N. und Dixon, J.E., Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1 (1997) *Biochemistry*, **36**, 4568-4575

Maa, M.-C., Leu, T.-H., McCarley, D.J., Schatzman, R.C. und Parsons, S.J., Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-src: Implications for the etiology of multiple human cancers (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6981-6985

Maeda, N. und Noda, M., Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 203-216

Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T. und Noda, M., A receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth-factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12474-12479

Maekawa, K., Imagawa, N., Naito, A., Harada, S., Yoshie, O. und Takagi, S., Association of protein-tyrosine phosphatase PTP-BAS with the transcription-factor-inhibitory protein IkappaBalpha through interaction between the PDZ1 domain and ankyrin repeats (1999) *Biochem. J.*, **337**, 179-184

Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T. und Weiss, A., Dimerisation-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge (1998) *Science*, **279**, 88-91

Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T.G., Olson, J.L., Daikh, D.I., Killeen, N. und Weiss, A., An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity (2000) *Cell*, **103**, 1059-1070

Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K., Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C. und Kasuga, M., Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 2075-2081

Matthews, R.J., Cahir, E.D. und Thomas, M.L., Identification of an additional member of the protein tyrosine phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4444-4448

McVicar, D.W., Taylor, L.S., Gosselin, P., Willette-Brown, J., Mikhael, A.I., Geahlen, L.R., Nakamura, M.C., Linnemayer, P., Seaman, W.E., Anderson, S.K., Ortaldo, J.R. und Mason, L.H., DAP12-mediated Signal Transduction in Natural Killer Cells (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 32934-32942

Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. und Deuel, T.F., Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase beta/zeta (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2603-2608

Messing, J., New M13 vectors for cloning (1983) *Methods in Enzymol.*, **101**, 20-78

- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M. und Auricchio, F., Activation of the Src/p21^{ras}/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor (1998) *EMBO J.*, **17**, 2008-2018
- Millar, J.B. und Russell, P., The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase (1992) *Cell*, **68**, 407-410
- Miller, A.D., Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11407-11413
- Möller, N.P.H., Bach-Möller, K., Lammers, R., Kharitonov, A., Sures, I. und Ullrich, A., Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine-phosphatases containing ezrin-like domains (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7477-7481
- Möller, N.P.H., Möller, K.B., Lammers, R., Kharitonov, A., Hoppe, E., Wiberg, F.C., Sures, I. und Ullrich, A., Selective down-regulation of the insulin receptor signal by protein-tyrosine phosphatases alpha and epsilon (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23126-23131
- Mohan, R.R., Mohan, R.R., Wilson, S.E., Discoidin domain receptor (DDR) 1 and 2: collagen-activated tyrosine kinase receptors in the cornea (2001) *Exp. Eye Res.*, **72**, 87-92
- Morton, C.J. und Campbell, I.D., Molecular "Velcro" (1994) *Curr. Biol.*, **4**, 615-617
- Mossman, K., Ostergaard, H., Upton, C. und McFadden, G., Myxoma virus and Shope fibroma virus encode dual-specificity tyrosine/serine phosphatase which are essential for virus viability (1995) *Virology*, **206**, 572-582
- Mourey, R.J. und Dixon, J.E., Protein tyrosine phosphatases: characterization of extracellular and intracellular domains (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 31-39
- Mullis, K.B., und Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction (1987) *Methods in Enzymol.*, **155**, 335-350
- Mustelin, T. und Burn, P., Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes (1993) *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 215-220
- Muthuswamy, S.K., Siegel, P.M., Dankort, D.L., Webster, M.A. und Muller, W.J., Mammary tumors expressing the *neu* proto-oncogene possess elevated c-src tyrosine kinase activity (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 735-743
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A. und Nakagawa, H., Cloning of a complementary DNA for a protein tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60src (1991) *Nature*, **351**, 69-72
- Neel, B.G., und Hunter, T., Role of phosphatases in lymphocyte action (1997) *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 405-420
- Noguchi, T., Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y. und Kasuga, M., Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6674-6682

- Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H. und LeRoith, D., p53 regulates insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor expression and IGF-1-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1(1998) *Endocrinology*, **139**, 1101-1107
- Östman, A., Yang, Q. und Tonks, N.K., Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9680-9684
- Ottenhoff-Kalff, A.E., van Oirschot, B.A., Hennipman, A., de Weger, R.A., Staal, G.E. und Rijksen, G., (1995) *Breast Cancer Res. Treat.*, **33**, 245-256
- Paige, L.A., Nadler, M.J.S., Harrison, M.L., Cassady, J.M. und Geahlen, R.L., Reversible palmitoylation of the protein tyrosine kinase p56lck (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8669-8674
- Parrizas, M. und LeRoith, D., Insulin-like growth factor 1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product (1998) *Endocrinology*, **137**, 1355-1358
- Pawson, T., Protein modules and signalling networks (1995) *Nature*, **373**, 573-580
- Pawson, T. und Schlessinger, J., SH2 and SH3 domains (1993) *Curr. Biol.*, **3**, 434-442
- Perkins, L.A., Larsen, I. und Perrimon, N., *Corkscrew* encodes a putative tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso (1992) *Cell*, **70**, 225-236
- Peters, C.S., Liang, X., Li, S., Kannan, S., Peng, Y., Taub, R. und Diamond, R.H., ATF-7, a novel bZIP protein, interacts with the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase (2001) *J Biol Chem.*, **276**, 13718-13726
- Plowman, G.D., Ullrich, A., und Shawver, L.K., Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention (1994) *Drug News & Perspectives*, **7**, 334-339
- Ponniah, S., Wang, D.Z., Lim, K.L. und Pallen, C.J. Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTPalpha leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn (1999) *Curr. Biol.*, **9**, 535-538
- Poon, R.Y.C. und Hunter, T., Dephosphorylation of Cdk2 Thr¹⁶⁰ by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin (1995) *Science*, **270**, 90-93
- Pot, D.A. und Dixon, J.E., Active site labeling of a receptor-like protein tyrosine phosphatase (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 140-143
- Prigent, S.A. und Lemoine, N.R., The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands (1992) *Progress in Growth Factor Research*, **4**, 1-24
- Qin, X.Q. und Barsoum, J., Differential cell cycle effects induced by E2F1 mutants (1997) *Oncogene*, **14**, 53-62

Redinbaugh, M.G. und Turley, R.B., Adaptation of the bicinchonic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose (1986) *Anal. Biochem.*, **153**, 267-271

Reissig, D., Clement, J., Sanger, J., Berndt, A., Kosmehl, H. und Bohmer, F.D., Elevated activity and expression of Src-family kinases in human breast carcinoma tissue versus matchen non-tumor tissue (2001) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127**, 226-230

Resh, M.D., Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter (1994) *Cell*, **76**, 411-413

Resnik, J.L., Reichart, D.B., Huey, K., Webster, N.J. und Seely, B.L., Elevated insulin-like growth factor-1 receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer (1998) *Cancer Res.*, **58**, 1159-1164

Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M., Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis (1986) *Science*, **234**, 364-368

Rosen, N., Yee, D., Lippman, M.E., Paik, S. und Cullen, M.J., Insulin-like growth factors in human breast cancer (1991) *Breast Cancer Res. Treat.*, **18**, S55-S62

Sagane, K., Yamazaki, K., Mizui, Y. und Tanaka, I., Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 und ADAM23 (1999) *Gene*, **236**, 79-86

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase (1988) *Science*, **239**, 487-491

Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Tonks, N.T. und Barford, D., Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B (2000) *Mol. Cell*, **6**, 1401-1412

Sambrook, I., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1990)

Sap, J., D'Eustachio, P., Givol, D. und Schlessinger, J., Cloning and expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6112-6116

Saras, J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. und Gonez, L.J., Cloning and characterization of PTPL1, a protein tyrosine phosphatase with similarities to cytoskeletal-associated proteins (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 24082-24089

Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S., A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin (1992) *J. Cell Sci.*, **103**, 131-143

Sato, T., Irie, S., Kitada, S. und Reed, J.C., FAP1: a protein tyrosine phosphatase that associates with FAS (1995) *Science*, **268**, 411-415

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

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

Schulze, A. und Downard, J., Analysis of gene expression by microarrays: cell biologists' gold mine or minefield? (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 4151-4156

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

Shenoy, S., Chakalaparampil, I., Bagrodia, S., Lin, P.-H. und Shalloway, D., Role of p34 cdc2 -mediated phosphorylations in two-step activation of pp60 c-src during mitosis (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7237-7241

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

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

Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N. und Schatz, D.G., A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6522-6526

Somani, A.K., Bignon, J.S., Mills, G.B., Siminovitch, K.A. und Branch, D.R., Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21113-21119

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. und Cantley, L.C., SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences (1993) *Cell*, **72**, 767-778

Springer, M.L. und Blau, H.M., High-efficiency retroviral infection of primary myoblasts (1997) *Somatic Cell Mol. Genet.*, **23**, 203-209.

Stetak, A., Lankenau, A., Vantus, T., Csermely, P., Ullrich, A. und Keri, G., The Antitumor Somatostatin Analogue TT-232 Induces Cell Cycle Arrest through PKC δ and c-src (2001a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **285**, 483-488

Stetak, A., Csermely, P., Ullrich, A. und Keri, G., Physical and Functional Interactions between Protein Tyrosine Phosphatase α , PI 3-Kinase, and PKC δ (2001b) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **288**, 564-572

Stoica, A., Saceda, M., Fakhro, A., Joyner, M. und Martin, M.B., Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor-alpha gene expression (2000) *J. Cell Biochem.*, **76**, 605-614

- Stover, D.R., Liebetanz, J. und Lydon, N.B., Cdc2-mediated modulation of pp60^{c-src} activity (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26885-26889
- Streuli, M., Protein tyrosine phosphatases in signaling (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188
- Stuckey, J.A., Scheubert, H.L., Fauman, E.B., Zhang, Z.Y., Dixon, J.E. und Saper, M.A., Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5Å and the complex with tungstate (1994) *Nature*, **370**, 571-575
- Su, J., Batzer, A. und Sap, J., Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTP- α Is Tyrosine-phosphorylated and Associated with the Adaptor Protein Grb2 (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18731-18734
- Su, J., Yang, L.-T. und Sap, J., Association between receptor protein-tyrosine phosphatase RPTP- α and the Grb2 adaptor: dual Src homology (SH)2.SH3 domain requirement and functional consequences (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 28026-28096
- Su, J., Muranjan, M. und Sap, J., Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts (1999) *Curr. Biol.*, **9**, 505-511
- Sun, H. und Tonks, N.K., The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling (1994) *TIBS*, **19**, 480-485
- Tabiti, K., Smith, D.R., Goh, H.-S. und Pallen, C.J., Increased mRNA expression of the receptor-like protein tyrosine phosphatase α in late stage colon carcinomas (1995) *Cancer Lett.*, **93**, 239-248
- Taylor, S.J. und Shalloway, D., The cell cycle and c-Src (1993) *Curr. Opin. Gene Dev.*, **3**, 26
- Thangaraju, M., Sharma, K., Liu, D., Shen, S.H. und Srikant, C.B., Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis (1999) *Cancer Res.*, **59**, 1649-1654
- Tice, D.A., Biscardi, J.S., Nickles, A.L. und Parsons, S.J., Mechanism of biological synergy between cellular src and epidermal growth factor receptor (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1415-1420
- Toledano-Katchalski, H. und Elson, A., The transmembranal and cytoplasmic forms of protein tyrosine phosphatase epsilon physically associate with the adaptor molecule Grb2 (1999) *Oncogene*, **18**, 5024-5031
- Tonks, N.K., Protein tyrosine phosphatases and the control of cellular signaling responses (1996) *Adv. Pharmacol.*, **36**, 91-119
- Tonks, N.K., Diltz, C.D. und Fischer, E.H., Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 6722-6730

Tracy, S., Van der Geer, P. und Hunter, T., The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTPalpha, is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 10587-10594

Trowbridge, I.S. und Thomas, M.L., CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 85-116

Ullrich, A. und Schlessinger, J., Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity (1990) *Cell*, **61**, 203-212

Van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R.A., Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways (1994) *Ann. Rev. Cell Biol.*, **10**, 251-337

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. und Ullrich, A., Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation (1993) *Science*, **259**, 1611-1614

Vogel, W., Brakebusch, C., Fässler, R., Alves, F., Ruggiero, F. und Pawson, T., Discoidin Domain Receptor 1 Is Activated Independently of $\beta 1$ Integrin (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 5779-5784

Wallace, M.J., Fladd, C.A., Batt, J. und Rotin, D., The second catalytic domain of protein tyrosine phosphatase delta (PTP delta) binds to and inhibits the first catalytic domain of PTP sigma (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2608-2616

Wallasch, C., Weiss, U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing W. und Ullrich, A., Heregulin dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3 (1995) *EMBO J.*, **14**, 4267-4275

Walter, A.O., Peng, Z.Y. und Cartwright, C.A., The Shp-2 tyrosine phosphatase activates the Src tyrosine kinase by a non-enzymatic mechanism (1999) *Oncogene*, **18**, 1911-1920

Wang, H., Lian, Z., Lerch, M.L., Chen, Z., Xie, W. und Ullrich, A., Characterization of PCP-2, a novel receptor protein tyrosine phosphatase of the MAM domain family (1996) *Oncogene*, **12**, 2555-2562

Wang, J.Y., Ki, S.W., Choosing between growth arrest and apoptosis through the retinoblastoma tumour suppressor protein, Abl and p73 (2001) *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 666-673

Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Lee, W.L. und Wang, P.H., Insulin-like growth factor 1 modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells (1998) *Endocrinology*, **139**, 1354-1360

Wang, Y., und Pallen, C.J., The receptor-like protein tyrosine phosphatase HPTP α has two active catalytic domains with distinct substrate specificities (1991) *EMBO J.*, **10**, 3231-3237

Wary, K.K., Lou, Z., Buchberg, A.M., A homozygous deletion within the carbonic anhydrase-like domain of the PTPrg gene in murine L-cells (1993) *Cancer Res.*, **53**, 1498-1502

Weiss, A., und Littman, D.R., Signal transduction by lymphocyte antigen receptors (1994) *Cell*, **76**, 263-274

Werner, H. und Le Roith, D., The Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Signaling Pathways Are Important for Tumorigenesis and Inhibition of Apoptosis (1997) *Crit. Rev. Oncogenesis*, **8**, 71-92

Woodford-Thomas, T.A., Rhodes, J.D., Dixon, J.E., Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts (1992) *J. Cell Biol.*, **117**, 401-414

Yanagi, S., Sugawara, H., Kurosaki, M., Sabe, H., Yamamura, H. und Kurosaki, T., CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30487-30492

Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J. und Tonks, N.K., Cloning and expression of PTP-PEST (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 6622-6628

Yarden, Y. und Schlessinger, J., Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of purified epidermal growth factor receptors (1987) *Biochemistry*, **26**, 1443-1451

Yoshida, K. und Kufe, D., Negative regulation of the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase by protein kinase C delta in response to DNA damage (2001) *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1431-1438

Yuvaniyama, J., Denu, J.M., Dixon, J.E. und Saper, M.A., Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR (1996) *Science*, **272**, 1328-1331

Zeng, L., D'Alessandri, L., Kalousek, M.B., Vaughan, L. und Pallen, C.J., Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 707-714

Zhai, Y.-F., Beittenmiller, H., Wang, B., Gould, M.N., Oakley, C., Esselman, W.J. und Welsh C.W., Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene (1993) *Cancer Res.*, **53**, 2272-2278

Zhai, Y., Wirth, J., Kang, S., Welsh, C.W. und Esselman, W.J., LAR-PTPase cDNA transfection suppression of tumor growth of neu oncogene-transformed human breast carcinoma cells (1995) *Mol. Carcinog.*, **14**, 103-110

Zhang, W.R., Li, P.M., Oswald, M.A. und Goldstein, B.J., Modulation of insulin signal transduction by eutopic overexpression of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR (1996) *Mol. Endocrinol.*, **10**, 575-584

Zhang, Z.Y., Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics and mechanism of catalysis (1998) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 1-52

Zheng, X.M., Wang, Y. und Pallen, C.J., Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase (1992) *Nature*, **359**, 336-339

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

Zheng, X.M., Resnick, R.J. und Shalloway, D., Mitotic Activation of Protein-tyrosine Phosphatase α and Regulation of Its Src-mediated Transforming Activity by Its sites of Protein Kinase C Phosphorylation (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 21922-21929

Zheng, X.M. und Shalloway, D., Two mechanisms activate PTP α during mitosis (2001) *EMBO J.*, **20**, 6037-6049

Zhou, G., Denu, J.M., Wu, L. und Dixon, J.E., The catalytic role of Cys¹²⁴ in the dual specificity phosphatase VHR (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 28084-28090

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Herrn Prof. Axel Ullrich für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und sein großes Interesse an dieser Arbeit bedanken. Zudem gebührt Herrn Prof. Axel Ullrich mein besonderer Dank für die Freiräume beim Bearbeiten des Projektes, für seine Großzügigkeit und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jens Ruhe für die hervorragende Zusammenarbeit während der gesamten Dauer, insbesondere aber während der Anfangsphase dieser Arbeit, und die zahlreichen Diskussionen rund um das Thema Phosphatasen. Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Anil Koul für die erfolgreiche Kollaboration im Bereich der mykobakteriellen Tyrosinphosphatasen, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seiner immerwährenden Unterstützung. Weiterhin danke ich Frau Uta Eichelsbacher und Frau Renate Gautsch für die erfolgreiche Kollaboration in der Herstellung unzähliger Transaktivator- und PTP α -induzierbar exprimierende Zelllinien. Ein besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Irmi Sures, Herrn Dr. Pjotr Knyazev, Frau Tatjana Knyazev, Herrn Yuri Cheburkin und Herrn Yuri Knyazev für die Zusammenarbeit und Diskussionen im Bereich der RNA Isolierung und der DNA-Arrays. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Johannes Bange, Herrn Marc Sommer, Herrn Jan Eickhoff, Frau Miriam Gensler, Frau Sylvia Streit, Herrn Norbert Prenzel, Herrn Dr. Christian Wallasch, Frau Dr. Esther Zwick-Wallasch und Herrn Dr. Reimar Abraham für ausdauernde Diskussionen und zahlreiche gute Vorschläge.

Mein herzlicher Dank gilt allen momentanen und früheren MitarbeiterInnen der Abteilung, besonders meinem Labor G6/7, meinem ehemaligen Schreibzimmer für die hervorragende und freundschaftliche Atmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und vielen schönen Stunden auch nach der Arbeit.

Mein größter Dank gebührt meiner Frau Elke, die mich durch ihr Verständnis und ihre Ratschläge ständig motiviert hat und mir die schweren Zeiten erträglich machte, sowie meinen Eltern, die mir meine langjährige Ausbildung durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur Rolle der Proteintyrosinphosphatase PTP α im Mammakarzinomsystem" selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre außerdem, daß die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Desweiteren habe ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Martinsried, 24.09.02

Martin Treder

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Axel Ullrich in der Zeit von Januar 1997 bis September 2001 in der Abteilung für Molekularbiologie des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt.