

**Lehrstuhl für Genetik  
der Technischen Universität München**

# **Relevanz von genetischen Determinanten für die Progression von Krebs**

**Sylvia Streit**

**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.rer.nat. Erwin Grill

**Prüfer der Dissertation**

1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Alfons Gierl
2. Hon.-Prof. Dr.rer.nat. Axel Ullrich  
(Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
3. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Martin Hrabé de Angelis

**Die Dissertation wurde am 23.01.2004 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.03.2004  
angenommen.**



Meinen Eltern und Brüdern

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Transiente Tyrosinphosphorylierung zur Weiterleitung von Signalen	1
1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2 Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)	4
1.1.3 Substrate von Rezeptortyrosinkinasen	4
1.1.4 MAP-Kinase Kaskaden und die Regulation der Genexpression	5
1.1.5 Liganden der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptoren	6
1.1.6 Der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptor 4 (FGFR4)	7
1.2 Tumorentstehung durch unkontrollierte Signalübertragung	9
1.2.1 Die Rolle der unkontrollierten Expression von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung	10
1.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTKn bei der Entstehung von Krankheiten	11
1.3 Tyrosinphosphatasen	13
1.3.1 Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTPn)	14
1.3.2 Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen	15
1.3.3 Der katalytische Mechanismus von Proteintyrosinphosphatasen	17
1.3.4 Physiologische Funktion von Tyrosinphosphatasen	19
1.4 Zielsetzung	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Bezugsquellennachweis	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Enzyme	24
2.1.3 Radiochemikalien	24
2.1.4 „Kits“ und Sonstiges	24
2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden	25
2.1.6 Medien und Puffer	25
2.1.7 Zellkulturmedien	25
2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	26
2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	27
2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide	29
2.2 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke	31
2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke	31

2.2.3	Enzymatische Behandlung von DNA	31
2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	32
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	32
2.2.6	DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien	32
2.2.7	Gezielte Mutagenese von DNA	33
2.2.8	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	33
2.2.9	Sequenzierung von DNA	34
2.2.10	Arbeiten mit RNA	34
2.2.11	Arbeiten mit cDNA-Arrays	36
2.2.12	Southern-Analyse	38
2.2.13	FGFR4 Allel Bestimmung in Tumorproben	39
2.2.14	Klonierungsstrategie des FGFR4 Arg388 knock-in	40
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	40
2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	40
2.3.2	Mykoplasmentest	41
2.3.3	Transfektion von Säugerzellen	41
2.3.4	Stimulation von Zellen	42
2.3.5	ES-Zellkultur	42
2.4	Proteinanalytische Methoden	43
2.4.1	Triton X100-Lyse von Zellen	43
2.4.2	Proteinbestimmung	43
2.4.3	Immunpräzipitation von Proteinen	44
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.4.5	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.4.6	Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	45
2.4.7	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	45
2.4.8	Immundetektion (Immunoblotanalyse)	45
2.5	Zellbiochemische Untersuchungen	45
2.5.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine	45
2.5.2	Bestimmung der <i>in vitro</i> -Phosphataseaktivität gegenüber pNPP	46
2.5.3	Immunhistochemie	46
2.5.4	Inhibierung der Genexpression mittels siRNA-Oligonukleotiden	47
2.6	Statistik	48
2.7	Prinzip der Etablierung von knock-in Mäusen	48

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1 Die Bedeutung des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus in der Tumorentwicklung	51
3.1.1 Verteilung des FGFR4 Allels in Patienten mit Karzinomen des Plattenepithels	52
3.1.2 Expressionsanalyse des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen der Mundrachenhöhle	54
3.1.3 Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumorprogression	56
3.1.4 FGFR4 ist ein prognostischer Faktor in Melanomen	59
3.2 Analyse des FGFR4 Arg388 Allels <i>in vivo</i>	61
3.2.1 Genotypisierung von verschiedenen Maus-Stämmen	61
3.2.2 Expressionsanalyse des murinen FGFR4 in Brusttumoren von transgenen Mäusen	63
3.2.3 Etablierung eines FGFR4 Arg388 knock-in Maus-Modells	64
3.2.3.1 Generierung des Gene-Targeting Konstruktes	64
3.2.3.2 ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion	65
3.2.3.3 Chimärenanalyse	67
3.3 Untersuchungen von genetischen Veränderungen in Brustkrebs	67
3.3.1 Vereinigung von cDNA aus mehreren Brustkrebszelllinien	68
3.3.2 Untersuchung von 13 Proteinen in 19 Brustkrebszelllinien auf genetische Veränderungen	69
3.3.3 Verteilung der EGFR- und HER2-Polymorphismen in Brust- und Plattenepithelkarzinomzelllinien	70
3.3.4 Expression von EGFR und HER2 in Plattenepithelkarzinomzelllinien	71
3.3.5 Korrelation der EGFR und HER2 Genotypen mit klinischen Parametern bei Plattenepithelkarzinompatienten	72
3.4 Analyse der neuen Sequenz-Varianten der PTP-PEST	74
3.4.1 Identifizierung der Val322Ile, Thr573Ala und Glu706Lys Polymorphismen im Gen von PTP-PEST	74
3.4.2 Bestimmung des PTP-PEST Genotyps in verschiedenen Tumorzelllinien	76
3.4.3 Verteilung der PTP-PEST Allele in Tumorpatienten und in gesunden Individuen	77
3.4.5 Die Polymorphismen in PTP-PEST führen zu unterschiedlicher Phosphatase-Aktivität	79

3.5	Charakterisierung der Rolle von Phosphatasen mit Hilfe der siRNA-Technologie	81
3.5.1	Identifizierung von Substraten mittels 2D-Gelelektrophorese	81
3.5.2	cDNA Array Analyse in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen	85
3.5.3	Untersuchungen zur Rolle von SHP-1 in Brustkrebs	87
3.5.3.1	Einfluss von SHP-1 auf die Totalphosphorylierung in MCF-7 Zellen	87
3.5.3.2	Einfluss von verminderter SHP-1 Expression auf die $\beta$ -Heregulin- induzierte Totalphosphorylierung in MCF-7	89
3.5.3.3	Untersuchung der HER2- und HER3- Phosphorylierung bei Repression endogener SHP-1	91
3.5.3.4	Untersuchung der Spezifität der positivregulatorischen Wirkung von SHP-1	92
3.5.3.5	Analyse der $\beta$ -Heregulin-induzierten Phosphorylierung von Adapterproteinen bei Repression endogener SHP-1	94
3.5.3.6	Aktivität von MAPK in MCF-7 Zellen mit verminderter SHP-1 Expression	95
3.5.3.7	Repression der SHP-1 Expression in SKBr3 Zellen	96
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
4.1	Das FGFR4 Arg388 Allel trägt zu einer beschleunigten Tumorprogression bei	98
4.2	Das FGFR4 Arg388 Maus-Modell	101
4.3	Die Bedeutung der EGFR und HER2 Polymorphismen in Plattenepithelkarzinomen	103
4.4	Die Funktion der PTP-PEST Polymorphismen bei der Aktivierung der Phosphatase	105
4.5	Identifizierung von Substraten mittels cDNA Array Analyse und 2D- Gelelektrophorese	107
4.6	SHP-1 als Regulator der HER2 Aktivierung	109
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>131</b>
	<b>Nachwort</b>	<b>134</b>

## 1 Einleitung

Für die Entwicklung eines multizellulären Organismus und den Erhalt seiner funktionalen Integrität muss jede Zelle die Möglichkeit haben, mit ihrer mittelbaren und unmittelbaren Umgebung zu kommunizieren und auf verschiedenste Signale mit den entsprechenden intrazellulären Programmen zu reagieren. Auf diese Weise werden wichtige Prozesse wie z.B. die Zell-Proliferation, -Differenzierung und Apoptose, aber auch Zellbewegung (Motilität), Adhäsion und Zell-Stoffwechsel reguliert. Die Signale werden hierbei häufig durch lösliche, diffundierende, aber auch durch membranständige Liganden, die Zelloberflächerezeptoren aktivieren, vermittelt. Die Rezeptortyrosinkinasen (RTKn), deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität bei der Signalübertragung in die Zelle eine außerordentlich wichtige Rolle spielt, bilden eine der Hauptklassen der Zelloberflächenrezeptoren (van der Geer *et al.*, 1994). Diese leiten durch reversible Tyrosinphosphorylierungen von Adapterproteinen oder zytoplasmatischen Tyrosinkinasen extrazelluläre Signale in die Zelle bis zum Zellkern weiter. Diese reversiblen Phosphorylierungsreaktionen stellen ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der Kontrolle der Gen-Aktivität und den davon abhängigen physiologischen Prozessen dar.

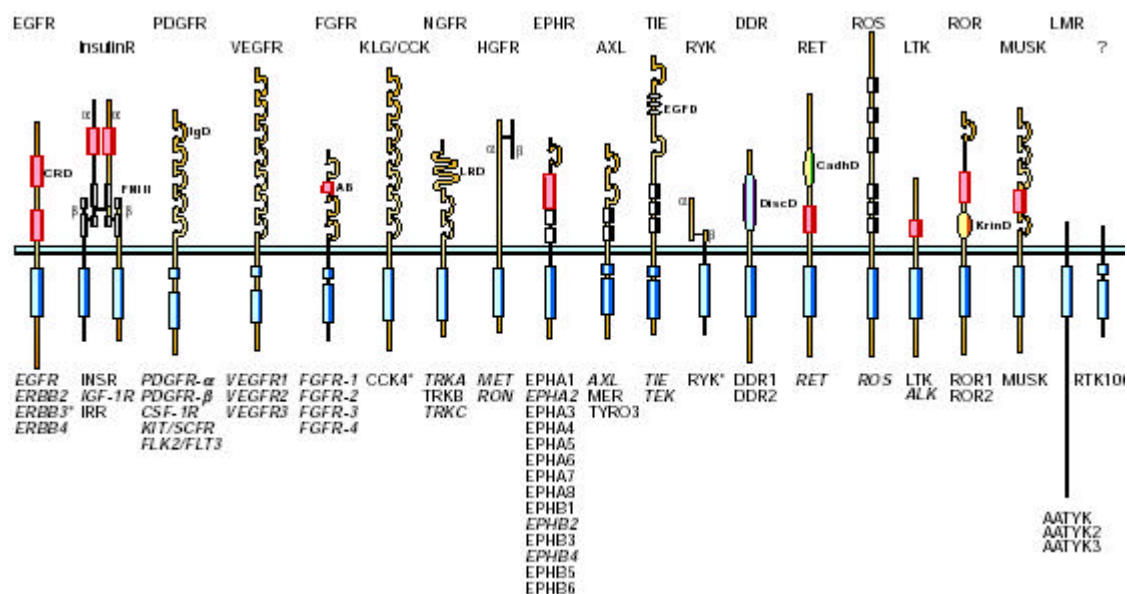
### 1.2 Transiente Tyrosinphosphorylierung zur Weiterleitung von Signalen

Transiente Phosphorylierungen finden in der Zelle hauptsächlich an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten statt. Tyrosinphosphorylierungen sind dabei nur mit einem Anteil von 0.05% bis 0.1% an der Gesamtphosphorylierung in der Zelle beteiligt. Trotzdem ist dieser Mechanismus einer der wichtigsten zur intrazellulären Signalübertragung (Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995). Zwei Klassen von Proteinen sind notwendig, um die reversible Tyrosinphosphorylierung zu kontrollieren. Proteintyrosinkinasen (PTKn) übertragen Phosphatgruppen auf Tyrosinreste, während Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) Phosphatreste von Tyrosinresten entfernen (Sun, 1994; Streuli, 1996). In beiden Proteinklassen gibt es sowohl membranständige als auch zytosolische Vertreter.



### 1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen setzen sich aus einer glykosilierten, extrazellulären Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil zusammen, die durch eine einzelne helikale Membrandomäne verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der verschiedenen RTKs ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Sequenzmotive aus. Diese strukturellen Unterschiede werden zur Einteilung und Zusammenfassung der mehr als 50 bekannten RTKs in 20 verschiedene Unterfamilien verwendet (van der Geer *et al.*, 1994; Plowman *et al.*, 1994; Blume-Jensen, 2001), die in Abb. 1 gezeigt sind. Beispielsweise besitzt die Familie der FGF (Fibroblast Growth Factor)-Rezeptoren drei Immunglobulin ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Bereich, während Mitglieder der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor Familie sich durch zwei Cysteine-reiche Regionen in ihrer extrazellulären Domäne auszeichnen.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen RTK-Familien.** Die Abbildung zeigt 20 Unterfamilien, in welche Rezeptortyrosinkinasen auf Grund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (Blume-Jensen and Hunter 2001).

Der zytoplasmatische Bereich der RTKs wird in die Juxtamembranregion, die sich unmittelbar an die Transmembrandomäne anschließt, die Kinasedomäne und den carboxyterminalen Bereich unterteilt (Ullrich and Schlessinger 1990). Die ca. 250-300

Aminosäuren lange, bei allen RTKs konservierte Kinasedomäne besitzt eine ATP-Bindungsstelle und katalysiert die Autophosphorylierung des Rezeptors und die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Substrate (Yarden und Ullrich, 1988).

Bei den Mitgliedern der FGF- und PDGF (Platelet derived Growth Factor)-Rezeptor Familien ist die Kinasedomäne durch eine Insertionssequenz, die mehrere Autophosphorylierungs- und Substratbindungsmotive aufweist (Malarky *et al.*, 1995), unterbrochen. Der carboxyterminale Bereich dagegen ist nur wenig konserviert zwischen den einzelnen Rezeptoren. Auch hier finden sich in der Regel eine Reihe von Autophosphorylierungsstellen und hochspezifische Substratbindungsmotive, über die sich die verschiedenen Funktionen der RTKs definieren können.

Weiterhin kann die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste auch zur Regulierung der Tyrosinkinaseaktivität des jeweiligen Rezeptors beitragen (Margolis *et al.*, 1989; Margolis *et al.*, 1990).

Vier Mitglieder der Familie der humanen FGF-Rezeptoren sind bisher identifiziert worden (Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Partanen J. *et al.*, 1991). Die Homologie der primären Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Rezeptoren liegt zwischen 55-72%. Durch alternatives Spleißen der mRNA der FGFRn 1, 2 und 3 werden zusätzliche strukturelle Unterschiede möglich. So sind sowohl lösliche als auch membrangebundene FGF-Rezeptoren mit einer, zwei oder drei Immunglobulin (IG)-Domänen oder einer veränderten C-terminalen Hälfte der dritten IG-Domäne beschrieben worden (Johnson und Williams, 1993). Im Gegensatz dazu existieren vom FGFR4 nur intrazelluläre Spleiß-Varianten ohne Transmembrandomäne oder mit einem verkürzten Carboxy-Terminus (van Heumen *et al.*, 1999).

Die EGF-Rezeptor Familie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGF-Rezeptor (HER, ErbB1; Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu; Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3; Kraus *et al.*, 1989) und HER4 (ErbB4; Plowman *et al.*, 1994). Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie sind häufig mit der Entstehung von Krebs beim Menschen in Zusammenhang gebracht worden (Ullrich *et al.*, 1984; Pierce *et al.*, 1991; Lemoine *et al.*, 1992). So findet sich eine erhöhte Gen-Aktivität der EGFRs bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungenkarzinomen (Prigent und Lemoine, 1992). Eine besonders wichtige Rolle spielt die Amplifikation und/oder erhöhte Aktivität des HER2 Genes in Ovarial- und Brustkarzinomen, in denen sie mit einer schlechten Überlebensprognose der betroffenen Patienten in Verbindung steht (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989).

### 1.1.2 Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)

Der Aktivierung von RTKn liegt die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren zu Grunde. Das bisher wichtigste Modell beschreibt eine Liganden-induzierte Konformationsänderung, die die Rezeptor-Dimerisierung ermöglicht (Greenfield *et al.*, 1989). Bivalente Liganden, wie z.B. PDGF oder EGF, binden zwei Rezeptormoleküle und bilden so Rezeptorkomplexe (Gullick, 1994; Tzahar *et al.*, 1997). In jedem Fall führt die Rezeptor-Dimerisierung zur *trans*-Phosphorylierung der Rezeptoren durch deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (Ullrich und Schlessinger, 1990).

Die Gruppe der FGF-Liganden gehört zu einer Klasse von monovalenten Molekülen, die nur jeweils ein Rezeptor-Molekül binden können (Schlessinger *et al.*, 1995). Zudem kann FGF seine entsprechenden Rezeptoren nur aktivieren, wenn lösliches oder membrangebundenes Heparin vorhanden ist (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Studien zur Kristall-Struktur des FGF-Heparin-Rezeptor Komplexes haben gezeigt, dass Heparin FGF-Moleküle binden kann und auf diese Weise eine Brücke zwischen zwei FGF-Rezeptoren bildet (Plotnikov *et al.*, 1999). Aber nicht nur die Homodimerisierung von RTKn spielt eine Rolle bei der Signal-Vermittlung, sondern auch die Bildung von Heterodimeren, wie am Beispiel der EGF-Rezeptor Familie gezeigt wurde (Wallasch *et al.*, 1995). Auch für die Familie der FGF-Rezeptoren konnte Heterodimerisierung gezeigt werden. Allerdings ist die Bedeutung der Heterodimere noch weitgehend ungeklärt (DiGabriele *et al.*, 1998).

### 1.1.3 Substrate von Rezeptortyrosinkinasen

Nach ihrer Aktivierung initiieren RTKn durch die Assoziation mit spezifischen Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden und geben dadurch den externen Stimulus an zytoplasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiter. Die Bindung von interagierenden Proteinen erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste durch SH2 (src-homology2)-Domänen (Mayer und Baltimore, 1993; Pawson, 1995) oder auch durch PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh *et al.*, 1995). Die Selektivität dieser Interaktionen wird hierbei durch die SH2- oder PTB-Domäne und die das phosphorylierte Tyrosin umgebenden Aminosäuren bedingt (Songyang, 1993; van der Geer *et al.*, 1995). Weiterhin besitzen viele Signalproteine auch SH3 (src homology 3)-Domänen, welche an prolinreiche Sequenzen in Proteinen binden können (Yu *et al.*, 1994). Ein wichtiger Vertreter der Signalproteine, die zum Beispiel bei der mitogenen Signalübertragung von Bedeutung

sind, ist das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) (Lowenstein *et al.*, 1992). Mit Hilfe seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTKs wie z.B. dem EGFR aber auch mit Phosphotyrosinen von anderen Adapterproteinen wie SHC und Gab1 interagieren. Über seine SH3 Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless), wodurch nach Rezeptoraktivierung eine Translokation von Sos zur Zellmembran in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras hervorgerufen wird (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Der von Sos katalysierte GTP/GDP-Austausch von Ras führt zu dessen Aktivierung, was eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation hat (Downward, 1997).

Ein anderes Adapterprotein, das besonders in der Signaltransduktion durch FGF Rezeptoren eine wichtige Funktion besitzt, ist das myristylierte, membranassoziierte SNT-1/FRS2 (Wang *et al.*, 1996; Kouhara *et al.*, 1997). Aktivierung von SNT-1/FRS2 durch den FGFR1 bindet Grb2-SOS, das wiederum Ras zum FGFR1 rekrutiert. Auf diese Weise wird das FGFR vermittelte Signal an den Ras/MAP-Kinase Signalweg gekoppelt (Kouhara *et al.*, 1997). Die Phosphatidyl-Phosphatase PLC $\gamma$  ist ein weiteres Signalmolekül, das in der FGFR Signalkaskade von Bedeutung ist. Aktivierte PLC $\gamma$  hydrolysiert Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphate, so dass die „second messenger“ IP $_3$  und DAG entstehen. PLC $\gamma$  wurde als ein 150 kDa Phosphoprotein identifiziert, das spezifisch nach FGF-1 Simulation an den FGFR1 bindet (Burgess *et al.*, 1990). Die Bedeutung der PLC $\gamma$  Aktivierung durch FGF ist aber noch nicht genau bekannt, da eine FGFR Mutante, die nicht mehr mit PLC $\gamma$  interagieren kann, keine veränderten biologischen Eigenschaften zeigt (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994).

### 1.1.4 MAP-Kinase Kaskaden und die Regulation der Genexpression

Nach der Stimulation von RTKs spielt die Grb2/Sos-vermittelte Aktivierung von Ras eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort (Downward *et al.*, 1997). Membranassoziiertes und aktiviertes Ras führt zur Interaktion mit der Serin-/ Threoninkinase Raf-1 und somit zur Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran, wodurch Raf-1 phosphoryliert und aktiviert wird (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). Anschließend phosphoryliert Raf-1 die Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 (MAP/ERK Kinasen 1 und 2) an bestimmten Serinresten, die nachfolgend wieder die MAP Kinasen (mitogen activated protein) ERK1 und ERK2 aktivieren. Diese wandern daraufhin in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren an Serinresten phosphorylieren (Robinson und Cobb, 1997) .

Parallel zur ERK/MAP Kinase Kaskade gibt es in eukaryontischen Systemen noch andere MAP Kinase Kaskaden, die je nach Stimulus die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen. Es handelt sich dabei um die zu den ERK1 und ERK2 homologen Kinasen JNK1 und JNK2 (c-jun N-terminal Kinase 1 und 2), und die nach ihrer scheinbaren Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran und Reddy, 1998). Die Aktivierung der ERK und JNK MAP Kinase Kaskaden führt innerhalb kürzester Zeit zur Transkription der sogenannten „*immediate early*“ Gene c-fos und c-jun, welche bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen von großer Bedeutung sind.

### 1.1.5 Liganden der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptoren

In den letzten Jahren hat sich die Familie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren als die wahrscheinlich größte Familie unter den Peptid-Wachstumsfaktoren herausgestellt. Bis heute konnten 19 verschiedene Mitglieder dieser Familie in menschlichen Geweben identifiziert werden (Xie *et al.*, 1999). Die Funktionen der FGFs reichen von der Stimulierung des Wachstums einer Vielzahl von Zelltypen bis zur Wirkung als Angiogenese Faktoren und neurotrophische Liganden.

Die beiden wichtigsten Vertreter der FGF Familie, die auch als erste entdeckt wurden, sind FGF-1 (aFGF) und FGF-2 (bFGF). Sie zeigen die größte Expressionsbreite in den verschiedenen menschlichen Gewebetypen. Beide Faktoren wurden aufgrund ihres mitogenen Potentials gegenüber Fibroblasten aus der Hirnanhangdrüse und Gehirngewebe gewonnen. In der Zwischenzeit ist sowohl FGF-1 als auch FGF-2 aus einer Reihe von verschiedenen anderen Geweben isoliert worden und es konnte gezeigt werden, dass sich das mitogene Potential beider Faktoren auf eine große Anzahl verschiedener Zelltypen erstreckt (Burgess und Maciag, 1989). Besonders interessant ist, dass beide Faktoren sowohl beim Wachstum als auch bei der Steuerung der Mortalität von Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen (Burgess und Maciag, 1989; Folkam und Klagsbrun, 1987). Beides sind Prozesse, die der Angiogenese zu Grunde liegen, und daher für die Versorgung eines wachsenden Tumors essentiell sind. Weiterhin besitzen weder FGF-1 noch FGF-2 ein Signalpeptid, das für die klassischen sekretorischen Prozesse in der Zelle notwendig ist (Jaye *et al.*, 1986; Bugler *et al.*, 1991). Ein weiterer Unterschied zu anderen Liganden der RTK Familie sind außerdem nukleäre Translokationssignale in der Aminosäuresequenz von FGF-1 und FGF-2 (Imamura *et al.*, 1990; Bugler *et al.*, 1991), die für die mitogenen Eigenschaften von FGF-1 von essentieller Bedeutung sind (Imamura *et al.*, 1990). Weitere FGFs sind FGF-3 (INT-2),

dessen Gen ursprünglich als bevorzugte Insertionsstelle für den MMTV-Virus identifiziert wurde (Goldfarb *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1986). FGF-3 scheint hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert zu werden und konnte noch nicht in normalem, adulten Geweben nachgewiesen werden (Stamp *et al.*, 1993). FGF-4 und FGF-6 (K-FGF, HST) wurden bei der Suche nach Genen aus Magentumoren und Karposi-Sarkomen, die NIH3T3 Zellen transformieren können, entdeckt (Taira *et al.*, 1987). Die genaue biologische Rolle ist noch nicht bekannt. Auch FGF-5 wurde auf der Suche nach Tumorgenen gefunden, die NIH3T3 Zellen transformieren können (Zhan *et al.*, 1988), während FGF-7 (KGF) als wichtiges Mitogen für Keratinozyten identifiziert wurde (Finch *et al.*, 1989). FGF-7 ist außerdem, zusammen mit dem erst kürzlich identifizierten FGF-19, das einzige Mitglied der FGF-Familie, das nur einen spezifischen FGF-Rezeptor aktivieren kann (Ornitz *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1999). Mitglieder der FGF-Familie spielen häufig eine herausragende Rolle bei der Tumorentwicklung, da sie sowohl als Onkogene zur Tumorentstehung beitragen, wie auch als Angiogenese Faktoren die weitere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen positiv beeinflussen können. Dieses belegt auch die häufig erhöhte Expression von Genen der FGFs in verschiedenen Tumortypen, wie zum Beispiel in Nieren-, Brust- und Harnblasenkrebs.

### 1.1.6 Der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptor 4 (FGFR4)

Der FGFR4 wurde vor zehn Jahren aus der cDNA der Zelllinie K562 (multiple myelomische Leukämie) kloniert (Partanen *et al.*, 1991). Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% homolog zu den vorher bereits identifizierten FGFR1 und FGFR2 (Dionne *et al.*, 1990) und besitzt die charakteristischen strukturellen Komponenten der FGFR Proteinfamilie, wie z.B. drei Immunglobulindomänen im extrazellulären Teil und eine zweigeteilte Kinasedomäne (siehe auch 1.1.1). Die Chromosomenlokalization für den FGFR4 ist nicht eindeutig geklärt. Armstrong und Mitarbeiter (1992) haben den FGFR4 durch *in situ* Hybridisierungen im Chromosomabschnitt 5q33-qter lokalisiert, ein Bereich der durch Chromosomentranslokationen eine Funktion bei Lymphomen und Leukämien zu haben scheint. Andererseits wurde durch die Untersuchung von 18 Genen im Chromosomabschnitt 5q gezeigt, dass der FGFR4 mit hoher Wahrscheinlichkeit in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gen DRD1 angesiedelt ist (Warrington *et al.*, 1992) und sich damit im Chromosomabschnitt 5q35-qter befindet.

Das Expressionsmuster des FGFR4 unterscheidet sich deutlich vom dem des FGFR1, FGFR2 und auch von dem des FGFR3, der ebenfalls aus der cDNA der Zelllinie K562 kloniert wurde

(Keegan *et al.*, 1991). In 17-18 Wochen alten humanen Fötus und im adulten humanen Organismus wird der FGFR4 in mittlerer Stärke in Niere, im Verdauungssystem, in der Bauchspeicheldrüse, in der Milz und in der Leber exprimiert, während er in großen Mengen in der Lunge vorkommt (Hughes, 1997; Partanen *et al.*, 1991). Im Gefäßsystem des Blutkreislaufs wird der FGFR4 besonders häufig in der Media exprimiert (Hughes, 1996), die hauptsächlich durch die glatte Muskulatur gebildet wird. Interessanterweise konnte in Maus-Embryonen während der Entwicklung der Muskelzellen gezeigt werden, dass der FGFR4 auch hier stark exprimiert wird (Stark *et al.*, 1991).

In den letzten Jahren sind funktionelle Besonderheiten die den FGFR4 von den anderen Mitgliedern der FGFR Proteinfamilie unterscheiden, gefunden worden. Expression von FGFR1 in FGFR-negativen L6 Ratten Myoblasten induziert nach Stimulation mit FGF-1 die Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ , SHC, ERK-1, ERK-2 und FRS2, während in FGFR4 exprimierenden L6 Zellen nur sehr schwache oder gar keine Aktivierung dieser Proteine zu beobachten ist (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Auch die Fähigkeit der Rezeptoren die Zellproliferation in BaF3 Zellen zu aktivieren unterscheidet sich deutlich. Während die Proliferation von BaF3/FGFR1 Zellen sehr stark und von BaF3/FGFR3 Zellen etwas schwächer durch FGF1 aktiviert wird (Ornitz und Leder, 1992; Wang *et al.*, 1994), ist in BaF3/FGFR4 Zellen keine Zellproliferation gefunden worden (Wang *et al.*, 1994). Weiterhin können L6/FGFR1- und L6/FGFR2-Zellen in Weichagar eingebettet wachsen („Soft Agar Assay“; Parameter für die Zelltransformation), wogegen L6/FGFR4-Zellen keine Kolonien in Weichagar bilden (Shaoul *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite wird FGFR4 durch Heparin aktiviert und ist damit das erste Beispiel für eine RTK, die durch ein Polysaccharid stimuliert werden kann (Gao und Goldfarb, 1995).

Über die biologische Funktion des FGFR4 ist noch wenig bekannt. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass Umlagerungen im Actin-Zytoskelett (*membrane ruffling*), die nach Stimulation durch FGF-1 in Brust-Krebs Zellen, aber nicht in normalen Brust-Epithelzellen erfolgen, durch den FGFR4 kontrolliert werden (Johnston *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der FGFR4 eine Funktion in der Zellmigration besitzt.

Eine andere Möglichkeit die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen ist die Generierung von Mäusen, in denen das Gen ausgeschaltet wird (*Knock-Out* Mäuse). Während die Blockierung des FGFR1 lethal ist (Deng *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994) und die des FGFR3 zu verlängerten Knochen der Extremitäten in Mäusen führt, erzeugt die Inhibierung des FGFR4 Genes einen „milden“ Phänotyp, der durch einen verstärkten Cholesterin Stoffwechsel charakterisiert ist (Yu *et al.*, 2000). Eine Doppelmutante, in der das FGFR4 und

das FGFR3 Gen ausgeschaltet ist, resultiert dagegen in einer dramatisch reduzierten Alveogenese in der Lunge (Weinstein *et al.*, 1998).

Die häufig beobachtete starke Expression von FGFR4 in Brust-, Pankreas- und Nieren-Karzinomen (Penault-Llorca *et al.*, 1995; Jaakola *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1991) lässt auf eine wichtige Funktion des FGFR4 in der Tumorgenese schließen. Allerdings haben Experimente mit einem *in vivo* Pankreas-Karzinom Modell ergeben, dass weder die Überexpression noch die Blockierung des FGFR4 Gens einen Einfluss auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen hat (Olson *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der FGFR4 nicht in der Tumorentstehung, sondern in der weiteren Progression von Bedeutung ist. Interessanterweise haben Olson und Mitarbeiter gezeigt, dass in dem Pankreas-Karzinom der FGFR4 erst in einem späten Tumorstadium aktiviert wird.

### **1.2 Tumorentstehung durch unkontrollierte Signalübertragung**

Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch eine erhöhte Zellteilungsrate, den Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontaktinhibition und der Fähigkeit zur Metastatisierung aus. Diese Eigenschaften werden während der Tumorentwicklung in einem mehrstufigen Prozess, der durch die Akkumulation von sowohl angeborenen als auch im Laufe der Zeit hinzugekommenen Gen-Defekten ausgelöst wird, erworben (Kinzler und Vogelstein, 1996). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Gene, die in der positiven als auch negativen Regulation des Zellwachstums eine entscheidende Rolle spielen. Gen-Defekte sind Veränderungen der Chromosomen z.B. durch Translokationen ganzer Chromosom-Abschnitte, Verlust von Chromosomenabschnitten, aber auch die Vervielfältigung von Genen oder die Veränderung der Nukleotidsequenz einzelner Gene durch Punktmutationen, Insertionen oder Verlust von Nukleotiden. Alle diese Gen-Veränderungen verursachen Störungen in der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, indem sie entweder die Aktivität von Proteinen der Signalketten erhöhen oder deren negative Regulatoren blockieren.

Häufig sind die Phosphotyrosinkinase, die wachstumsstimulierende Signale in die Zelle weiterleiten, die zentralen Punkte, an denen die Regulation versagt (Hanahan und Weinberg, 2000).



### 1.2.1 Die Rolle der unkontrollierten Expression von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung

Die Überexpression von Tyrosinkinasen und im besonderen von RTK kann eine Krebszelle hypersensitiv gegenüber sehr geringen Mengen eines bestimmten Wachstumsfaktors machen, die normalerweise nicht ausreichen, um die Zell-Proliferation zu stimulieren (Alimandi *et al.*, 1997). Zum Beispiel wurde in Brust- und Blasenkarzinomen (Neal *et al.*, 1990; Nicholson *et al.*, 1991) eine stark erhöhte Menge des EGF Rezeptors gefunden und mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Das gleiche gilt für die Gen-Amplifikation eines anderen Mitglieds der EGF Rezeptor Familie, HER2, in Brust-Karzinomen (Slamon *et al.*, 1987). Die Überexpression des PDGF-Rezeptors wurde in astrozytischen Hirn-Tumoren gefunden (Hermanson *et al.*, 1992) und beeinflusst hier die Neuentwicklung von Blutgefäßen (Fleming *et al.*, 1992). Daneben führt die Überexpression von Tyrosinkinasen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Signalketten (DiFiore *et al.*, 1987). Dies ist dadurch zu erklären, dass auf der Zelloberfläche ein dynamisches Gleichgewicht zwischen inaktiven Rezeptor-Monomeren und aktiven Rezeptor-Dimeren vorliegt. Dieses Gleichgewicht wird entweder durch stabilisierende Liganden oder durch die Überproduktion von Rezeptoren zum Dimer verschoben.

Neben der unkontrollierten Bildung von Rezeptoren wird aber oft auch die Überexpression von Liganden beobachtet. Dieses gilt sowohl für Liganden der EGF Familie, EGF und TGF $\alpha$ , als auch für PDGF (Tateishi *et al.*, 1990; Rusch *et al.*, 1993; Hermanson *et al.*, 1992).

Auch die unkontrollierte Bildung von FGFs und FGF Rezeptoren ist in vielen Tumorarten beschrieben worden. In Karzinomen gibt es im einfachsten Fall zwei mögliche Quellen für FGFs: die Tumorzellen selber, oder das sie umgebende Stromagewebe. FGFs können also sowohl in einem parakrinen als auch einem autokrinen Prozess auf beide Zellarten einwirken. Dabei gibt es drei denkbare Mechanismen: erstens, FGFs werden von den Tumorzellen überexprimiert; zweitens, die Stromazellen werden durch den Tumor angeregt FGFs zu produzieren; drittens, die Tumorzellen werden durch das Stroma zur vermehrten FGF Expression angeregt. Ein Beispiel für eine parakrine und autokrine Wirkung von FGFs kann man in Glioblastomen finden. FGF-2 wird von 94% aller Glioblastome aber nicht im normalen Gehirn exprimiert, und korreliert mit der Ausprägung der Erkrankung (Takahashi *et al.*, 1992). Da FGF Rezeptoren sowohl in den Tumorzellen als auch in den Stromazellen gefunden wurden (Takahashi *et al.*, 1991) ist es nicht überraschend, dass in diesem Fall FGF-2 sowohl autokrin das Tumorwachstum stimulieren kann als auch parakrin die Angiogenese

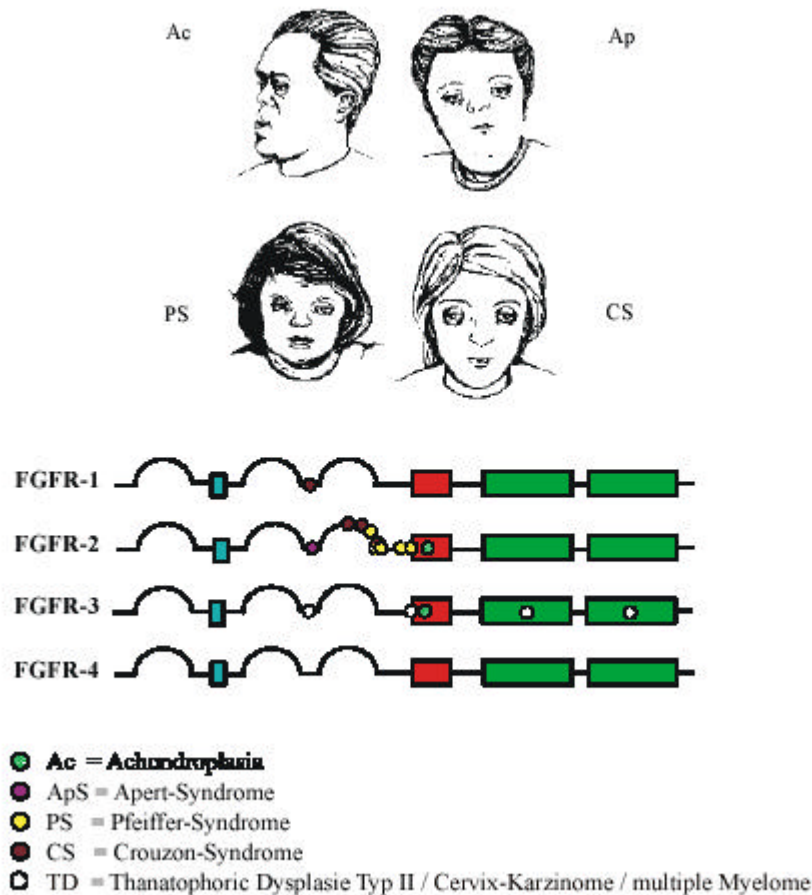
durch das umgebende Gewebe beschleunigt. Daneben sind aber auch FGF-Rezeptoren in vielen Tumortypen stärker exprimiert als in den korrespondierenden normalen Geweben. Zum Beispiel in Melanomen (Ahmed *et al.*, 1997), in Hirn- (Morrison *et al.*, 1994), in Brust- (Yoshimura *et al.*, 1998), in Prostata- (Giri *et al.*, 1999) und in Schilddrüsen-Tumoren (Shingu *et al.*, 1998). Interessanterweise können FGFs und ihre Liganden aber auch eine negative Wirkung auf die Tumorentwicklung haben, so dass sie nicht immer eindeutig als Onkogene oder Tumorsuppressorgene bezeichnet werden können. Zum Beispiel ist in vielen Brusttumoren ein stark erhöhtes FGF-2 Niveau gegenüber dem normalen Brustgewebe gefunden worden. Innerhalb der Gruppe der Patienten zeigte sich aber, dass erhöhte FGF-2 und FGFR Spiegel mit einer guten klinischen Prognose und verlängerten Überlebenszeiten korreliert (Colomer *et al.*, 1997; Yiangou *et al.*, 1997). In anderen Tumortypen dagegen ist eine erhöhte FGF-2 oder FGFR1 Expression mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert (Salven *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995; Bredel *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTKs bei der Entstehung von Krankheiten

Schon seit einigen Jahren ist die wichtige Funktion von RTKs bei der Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs, bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Gen-Amplifikation von HER2 aber auch die Überexpression anderer RTK einen wichtigen Schritt während der Tumorentstehung darstellt. Auch Sequenzveränderungen, die nur in den Tumorzellen zu finden sind (somatische Mutationen) konnten unter anderem im FGF Rezeptor II (Markovitz *et al.*, 1995) und im FGF Rezeptor 3 nachgewiesen werden (Capellen *et al.*, 1999). Neben dieser wichtigen Rolle von somatischen Mutationen während der Tumorentwicklung wurden in vielen RTK-Familien auch Keimbahnmutationen identifiziert, die zu schweren Krankheitsbildern führen. So ist besonders die Familie der FGF Rezeptoren ein markantes Beispiel für RTKs, deren Veränderungen zu dominanten, autosomal vererbten Krankheiten führen. Es sind über 50 Mutationen in den drei FGF Rezeptoren 1-3 gefunden worden, die krankhafte Veränderungen in den Skelettknochen auslösen (Fig.2).

90 Prozent aller zwergwüchsigen Menschen (Achondroplasie) besitzen z.B. eine Punktmutation im FGFR3 Gen, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin in der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des Rezeptors führt. Es wird angenommen, dass diese stark geladene Aminosäure in der sonst hydrophoben Umgebung der Zellmembran zu einer verstärkten Signalbildung durch den Rezeptor beiträgt (Webster und Donoghue, 1996).

Andere Mutationen in den FGFR 1 und 2 konnten in Patienten mit craniosynostotischen Syndromen, wie z.B. Apert, Jackson-Weiss, Crouzon und Pfeiffer gefunden werden (Webster und Donoghue, 1997). Alle diese Veränderungen in der Nukleotidsequenz der entsprechenden Gene haben eine verstärkte Signal-Kapazität durch die Rezeptoren zur Folge.



**Abb. 2 Keimbahn-Mutationen in den FGF-Rezeptoren 1, 2 und 3.** Schematisch ist die Struktur der vier FGF-Rezeptoren dargestellt. Mutationen im FGFR3, die in der neonatal lethalen Thanatophorischen Dysplasie TypII vorkommen, werden selten auch somatisch in Cervix-Karzinomen und multiplen Myelomen gefunden. Weiterhin ist eine Zuordnung der FGFR Genotypen mit den durch sie verursachten Entwicklungsstörungen dargestellt (nach Muenke & Schell; 1995).

Ein anderes Beispiel für eine RTK, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von vererblichen Krankheiten spielt, ist RET. In zwei verschiedenen Syndromen wurden Veränderungen im RET Gen gefunden. MEN2 ist eine autosomal vererbte Krankheit, die durch die Entstehung von medulären Thyroid-Karzinomen definiert ist und sich durch Mutationen, die die Aktivität des RET Rezeptors erhöhen, auszeichnet. Andererseits besitzen 50% aller Patienten der Hirschsprung Krankheit Punktmutationen, die die Rezeptor-Aktivität von RET blockieren, oder zeigen einen totalen Verlust des RET Genes (Edery *et al.*, 1997). In

diesem Fall führt also die Aktivierung oder Inhibierung einer RTK zu zwei völlig unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Alle bisher beschriebenen Veränderungen von Genen sind äußerst selten und die Krankheiten, die durch sie hervorgerufen werden, betreffen nur einen kleinen Teil der Bevölkerung. Die sehr zahlreichen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) dagegen sind die häufigsten genetischen Variationen zwischen Individuen. Sie treten mit einer statistischen Häufigkeit von mindestens 1/1000 auf, d.h., dass sich die Nukleotidsequenz zweier nicht verwandter Individuen in etwa drei Millionen Positionen unterscheidet. SNPs sind evolutionär alte und stabile Mutationen und in menschlichen Populationen weit verbreitet. Ihre Verteilung ist unterschiedlich und wird mit etwa 1 pro 500 Nukleotide für extragenetische und mit 1 pro 2000 Nukleotiden für intragenetische Regionen angegeben (Halushka *et al.*, 1999).

Es wird vermutet, dass die individuelle Verteilung der SNPs unter anderem für Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und unterschiedliche Therapieerfolge innerhalb der Bevölkerung verantwortlich ist, da das Vorhandensein bestimmter SNPs mit einem erhöhten Risiko für eine Reihe von Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, Diabetes usw. (Brookes *et al.*, 1999) korreliert. Weiterhin ist seit langem bekannt, dass SNPs und andere DNA Variationen in Genen für Medikamente-metabolisierende Enzyme (z.B. die Familie der Cytochrom P450-Proteine) Nebenwirkungen, Verträglichkeit und Effizienz von zahlreichen Medikamenten beeinflussen können (Linder *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1999). Deshalb ist die Kenntnis dieser SNPs essentiell für das Verständnis der an der Krankheitsentstehung beteiligten Gene und deren (Fehl)-Funktionen.

### 1.3 Tyrosinphosphatasen

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

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

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

### 1.3.1 Rezeptortyrosinphosphatasen (RPTPn)

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

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

Charakteristisch für die Klasse II membranständiger Phosphatasen sind die Immunglobulin- und Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen innerhalb des extrazellulären Proteinbereichs. Hierbei handelt es sich um für Zelladhäsionsmoleküle typische Strukturelemente, wie sie beispielsweise in L1/Ng-CAM oder N-CAM (Williams und Barclay, 1988; Cunningham, 1995) zu finden sind. Dieser Untergruppe werden die Phosphatasen LAR, PTP $\sigma$ , PTP $\delta$ , PTP $\mu$  sowie PTP $\kappa$  zugeordnet.

Als extrazelluläres Strukturmerkmal weisen Klasse-III-RPTPn charakteristischerweise ausschließlich Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen in unterschiedlicher Anzahl auf. Für die Mehrzahl der Mitglieder dieser Familie ist weiterhin das Vorhandensein von nur einer Phosphatasedomäne kennzeichnend. Entsprechend dieser Strukturmerkmale werden PTP $\beta$

(Krueger *et al.*, 1990), DEP-1 (Ostman *et al.*, 1994), SAP-1 (Matozaki *et al.*, 1994) dieser Familie zugeordnet.

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

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

### 1.3.2 Zytoplasmatische Tyrosinphosphatasen

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

Die zytoplasmatischen Phosphatasen PTP1B (Charbonneau *et al.*, 1989) und TC-PTP (Cool *et al.*, 1989) weisen am Carboxyterminus einen hydrophoben Sequenzbereich auf, dem für die Verankerung von PTP1B im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Frangioni *et al.*, 1992) bzw. TC-PTP im perinukleären Raum (Cool *et al.*, 1990) eine maßgebliche Rolle zukommt. Die unmittelbare Lokalisation von PTP1B am ER scheint für die Regulation der katalytischen Aktivität von Bedeutung zu sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die durch eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protease vermittelte proteolytische Spaltung von PTP1B zu deren Freisetzung vom ER führt und dies mit einer Zunahme der katalytischen Aktivität einhergeht. Ähnlich wurde für TC-PTP eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Entfernung des carboxyterminalen Segmentes beobachtet (Cool *et al.*, 1990).

Eine weitere Gruppe von intrazellulären Phosphatasen definiert sich durch das Vorhandensein einer sogenannten Ezrin-ähnlichen Domäne. Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Motiv mit Homologie zu Proteinen wie Bande 4.1-Protein, Ezrin, Radixin oder Talin (Conboy *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1992), die am Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Die Untergruppe dieser Phosphatasen wird durch die Mitglieder MEG-1 (Gu *et al.*,

1991), PTP-H1 (Yang *et al.*, 1991), PTPD1 (Möller *et al.*, 1994) sowie PTP-BAS (Maegawa *et al.*, 1994) gebildet. Der Aufbau und die Umstrukturierung des Zytoskeletts geht in vielen Fällen mit der Tyrosinphosphorylierung verschiedener, mit dem Zytoskelett kolokalisierender und assoziierender Proteine einher (Luna und Hitt, 1992), wobei zahlreiche Komponenten des Zytoskeletts direkte Substrate für Tyrosinkinasen darstellen (Daniel und Reynolds, 1997).

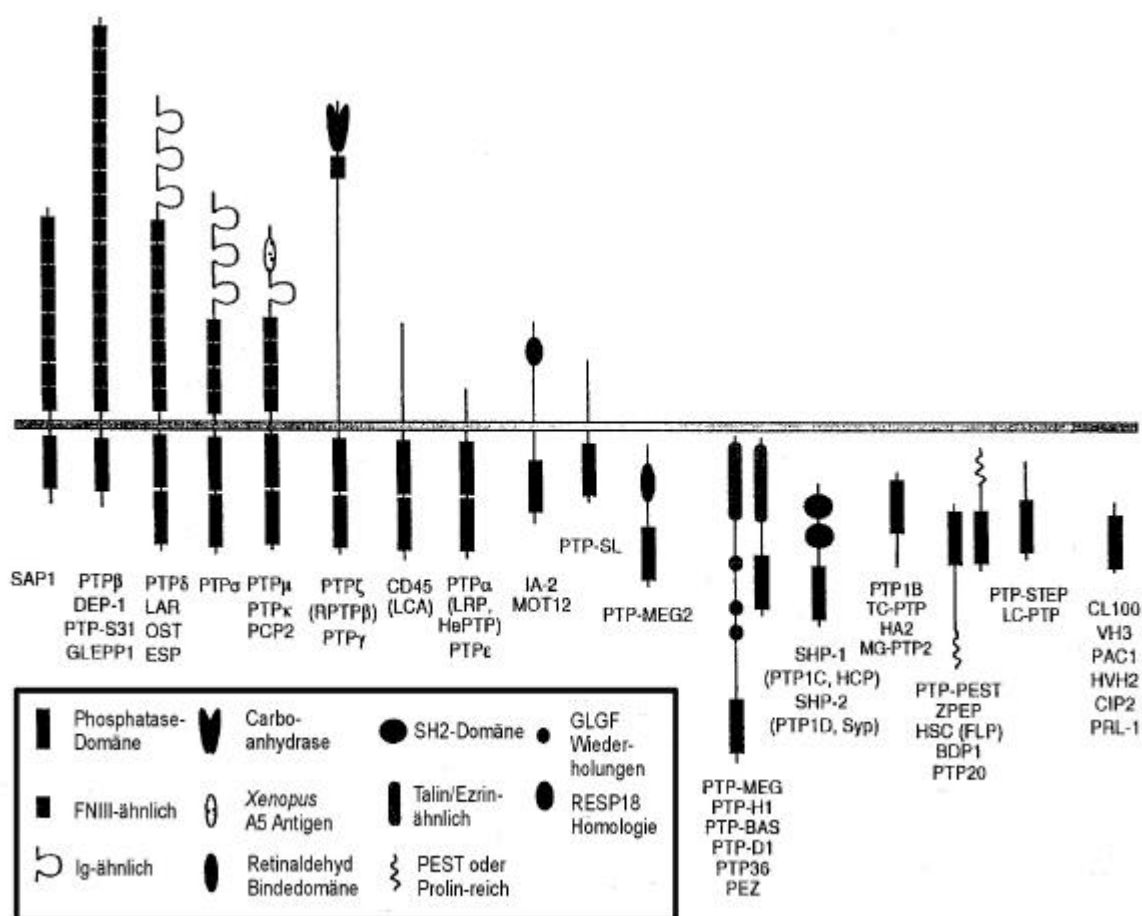
Als ein weiteres Strukturmerkmal finden sich in den Phosphatasen Corkscrew (Csw; Perkins *et al.*, 1992), SHP-1 (Shen *et al.*, 1991) und SHP-2 (Freeman *et al.*, 1992) zwei N-terminale Src Homologie 2 (SH2)-Domänen. Diese für phosphorylierte Tyrosinreste spezifischen und hochaffinen Bindungsdomänen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

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

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

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

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



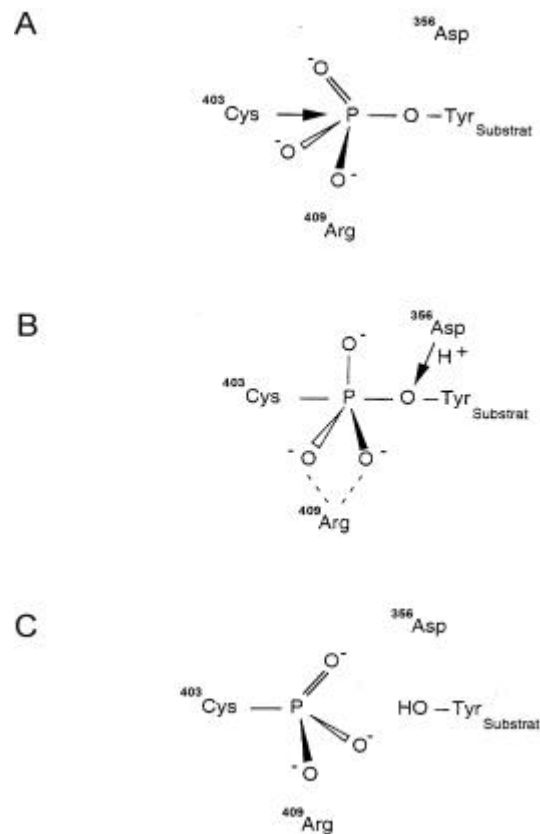
**Abb. 3: Schematische Darstellung der Familie der Proteintyrosinphosphatasen.** Die Abbildung gibt einen Überblick über die Familie der Proteintyrosinphosphatasen mit den Unterfamilien der Rezeptortyrosinphosphatasen sowie den zyttoplasmatischen Phosphatasen und den eine Sonderrolle einnehmenden „Dual-spezifischen“ Phosphatasen (nach Sugen Inc.).

### 1.3.3 Der katalytische Mechanismus von Proteintyrosinphosphatasen

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



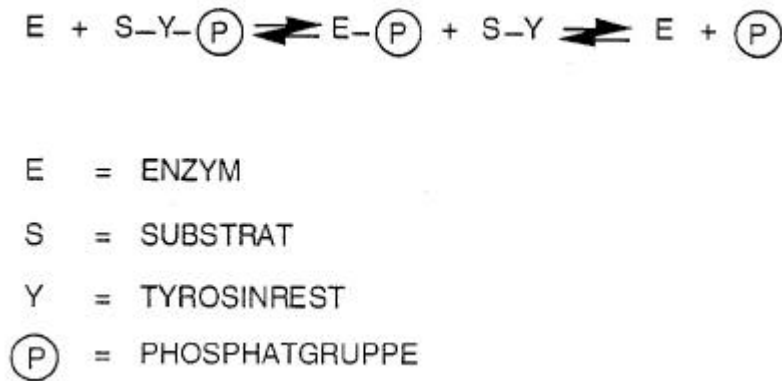
Mechanismus der enzymatischen Reaktion von Phosphatasen, welcher mittels biochemischer Analysen insbesondere an der *Yersinia* PTPase aufgeklärt wurde (Zhang und Dixon, 1994; Zhang *et al.*, 1994b).



**Abb. 4: Der Katalysemechanismus von Proteintyrosinphosphatasen.** Die Numerierung der an der Reaktion beteiligten Aminosäuren entspricht der Position in der Tyrosinphosphatase von *Yersinia*. Weitere Erläuterungen zu dieser Abbildung finden sich im Text.

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

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



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

### 1.3.4 Physiologische Funktion von Tyrosinphosphatasen

Zahlreiche Untersuchungen belegen die essentielle Funktion der Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen sowie der Tyrosinphosphorylierung von zellulären Substraten für die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden (Segatto *et al.*, 1990; Calaib *et al.*, 1995). Die Dephosphorylierung der Kinasen durch Phosphotyrosinphosphatasen sollte daher zur Termination des durch den jeweiligen Rezeptor vermittelten Signals führen. Tatsächlich lässt sich ein Effekt bei Koexpression von PTP1B auf die transformierende Aktivität des HER2-Onkogens neu beobachten (Brown-Shimer *et al.*, 1992). Eine Rolle dieser Phosphatase im Rahmen der Insulin-vermittelten Signaltransduktion zeichnete sich bereits zu Beginn der Neunziger Jahre ab, als eine signifikante Verzögerung der insulinabhängigen Zellteilung nach Injektion gereinigter PTP1B in *Xenopus* Oozyten (Tonks *et al.*, 1990) und damit einhergehend eine Reduktion der durch den Insulinrezeptor vermittelten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate beobachtet wurde. Über kristallographische, kinetische und Peptidbindungsstudien wurden die im Aktivierungssegment des Insulin-Rezeptors lokalisierten Phosphotyrosinreste

pY1162 und pY1163 als die an der Wechselwirkung maßgeblich beteiligten, aber auch von PTP1B dephosphorylierten Aminosäuren identifiziert (Salmeen *et al.*, 2000). Bei der ebenfalls durch PTP1B vermittelten Dephosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats-1 (IRS-1) kommt Grb2 eine die Interaktion beider Proteine stabilisierende Rolle zu (Goldstein *et al.*, 2000). Die physiologische Relevanz dieser Phosphatase im Kontext der Insulinrezeptor-vermittelten Signaltransduktion wurde in PTP1B-*Knock-out*-Mäusen hervorgehoben, die sich sowohl durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin als auch durch eine verstärkte Resistenz gegenüber Fettleibigkeit auszeichnen (Elchebly *et al.*, 1999; Klamon *et al.*, 2000). Unter Verwendung katalytisch inaktiver, aber zur Bindung potentieller Substrate noch befähigter „Substrat-Trapping-Mutanten“ wurde das an mitogenen und adhäsionsvermittelten Signaltransduktionskaskaden beteiligte Protein p130cas als Substrat von PTP-PEST identifiziert (Garton *et al.*, 1996, 1997). Hinsichtlich dieser Phosphatase homozygot negative Fibroblasten wiesen eine erhebliche Zunahme an Fokalkontakten bei gleichzeitig verringerter Zellmotilität auf, die zumindest zum Teil auf erhöhte Tyrosinphosphorylierung von p130cas, aber auch von Paxillin und FAK zurückzuführen ist (Angers-Loustau *et al.*, 1999). Neben dieser Bedeutung für Zelladhäsion und Migration konnte für PTP-PEST eine regulatorische Funktion gegenüber der Tyrosinkinase c-Abl gezeigt werden. Unter Vermittlung durch das mit beiden Proteinen interagierende Molekül PSTPIP-1, selbst ein Substrat von c-Abl, wird PTP-PEST zu beispielsweise nach PDGF-Stimulation aktiviertem und damit phosphoryliertem c-Abl rekrutiert und hat durch Dephosphorylierung die Inaktivierung dieser Kinase zur Folge (Cong *et al.*, 2000).

Deutliche Hinweise auf die physiologische Funktion der zytoplasmatischen Tyrosinphosphatase SHP-1 ergaben sich aus der Charakterisierung der sogenannten „Motheaten- und Viable Motheaten-Maus“, deren Phänotyp - Immunschwäche und zahlreiche Abnormalitäten im hämatopoietischen Zellsystem - auf verschiedene Mutationen in dem für SHP-1 kodierenden Genlocus zurückgeführt wird und die Bedeutung dieser Phosphatase im Rahmen der Hämatopoese unterstreicht (Shultz *et al.*, 1993). Insgesamt nimmt SHP-1 im Rahmen der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelten Signaltransduktion eine negativ regulatorische Rolle ein. So induziert der Erythropoietinrezeptor nach Ligandenstimulation die Aktivierung bestimmter Vertreter der JAK-Kinasefamilie und wird im Rahmen eines Rückkopplungsmechanismus von diesen ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert. SHP-1 bindet mittels der SH2-Domänen an den phosphorylierten Rezeptor, vermittelt dort die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der assoziierten JAK-Kinasen und leitet somit die Termination des proliferativen Signals ein (Klingmüller *et al.*,

1995). Eine analoge Funktion in der durch Ligandenbindung induzierten Signalkaskade wurde auch für den Interleukin-3-Rezeptor identifiziert (Yi *et al.*, 1993). Die Tyrosinphosphorylierung von SHP-1 durch Aktivierung des CSF-1- (Yeung *et al.*, 1992) und des T-Zellrezeptors (Lorenz *et al.*, 1994) lassen eine Funktion von SHP-1 in der Signalübertragung auch dieser Rezeptoren vermuten. Deutlich ließ sich die Assoziation von SHP-1 mit der Rezeptortyrosinkinase RET zeigen. Koexpression von SHP-1 führte zu einer verminderten Autophosphorylierung dieses Protoonkogens und hatte eine verringerte Aktivierung von Erk2 sowie die Inhibition der PKB/Akt-Phosphorylierung zur Folge (Hennige *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte eine starke und direkte Assoziation von SHP-1 mit der phosphorylierten Rezeptortyrosinkinase Ros nachgewiesen werden, die durch die N-terminale SH2-Domäne von SHP-1 und dem Phosphotyrosinrest pY2267 der Kinase vermittelt wird. Überexpression dieser zytoplasmatischen Phosphatase führt zur Dephosphorylierung von Ros und zur starken Verringerung Ros-abhängiger Proliferation und Transformation (Keilhack *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu SHP-1 kommt SHP-2 als dem zweiten Vertreter dieser Gruppe eine eher positiv regulatorische Funktion bei der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen zu (Noguchi *et al.*, 1994). SHP-2 ist dabei maßgeblich in die zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 führenden Signaltransduktionswege involviert. Die Überexpression von Deletionsformen oder katalytisch inaktiven Mutanten führte daher zu einer deutlichen Inhibition des Zellwachstums nach Ligandenstimulation. In Zusammenhang mit der positiven Funktion von SHP-2 bei der Signalübertragung steht die Beobachtung, dass SHP-2 als Adapter fungiert (Li *et al.*, 1994) und als solcher die Bindung von Grb2 beispielsweise an den PDGF-Rezeptor vermitteln kann. Ebenfalls durch Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante konnte die Bedeutung von SHP-2 für die Aktivierung auch der c-Jun N-terminalen Kinase JNK nach Stimulierung des Insulin- sowie des EGF Rezeptors gezeigt werden, wobei SHP-2 oberhalb von Sos positiv regulatorisch auf den Ras-Signaltransduktionsweg Einfluss nimmt (Fukunaga *et al.*, 2000). Die Assoziation von SHP-2 mit dem SHP-Substrat 1 (SHPS-1)/SIRP-1 alpha, der die spezifische Erkennung der SHPS-1-Phosphotyrosinreste pY449 bzw. pY473 durch die NH<sub>2</sub>- bzw. COOH-terminale SH2-Domänen zugrunde liegt (Takada *et al.*, 1998), wurde unter anderem nach der Fibronektin-induzierten Vernetzung von Integrinen beobachtet und vermittelt hierbei die durch Integrin-Stimulation initiierte Aktivierung der MAP-Kinasen sowie Veränderungen der Zellmorphologie (Tsuda *et al.*, 1998). Der Ausbildung des SHP-2/SHPS-1-Komplexes kommt auch im Rahmen der LPA-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase eine wichtige Rolle zu und wird hier sehr wahrscheinlich durch

einen Rho-abhängigen Signalweg unter Beteiligung von FAK und Src-Kinasen vermittelt (Takeda *et al.*, 1998).

### 1.4 Zielsetzung

Im Zuge der Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurden zahlreiche genetische Veränderungen identifiziert, deren Bedeutung jedoch bislang nur in wenigen Fällen bekannt ist. Ein in dieser Arbeitsgruppe gefundener Polymorphismus im Gen des humanen FGFR4, dem an Position 388 der Austausch eines Glycins gegen einen Argininrest zugrunde liegt, konnte mit der Progression von Brust- und Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht werden. Zudem wurde eine veränderte Motilität für die FGFR4 Arg388 Variante exprimierende Brustkrebszelllinien gezeigt. Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war es, die Bedeutung dieses Polymorphismus auch für andere Tumorarten zu hinterfragen. Ferner sollte ein Maus-Modell etabliert werden, mit dem der Einfluss des FGFR4 Arg388 Allels auf die Tumorentwicklung *in vivo* untersucht werden kann. Weiterhin sollte auch in Genen, die für Signaltransduktionsprozesse wichtig sind, nach genetischen Veränderungen in Tumorzellen gesucht werden.

Eine wichtige Gruppe an Signalübertragung beteiligter Proteine stellt dabei die Gruppe der Proteintyrosinphosphatasen dar. Trotz der Vielzahl der bislang identifizierten Mitglieder dieser Proteinfamilie ist die physiologische Bedeutung in nur verhältnismäßig wenig Fällen beschrieben. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Substrate von Tyrosinphosphatasen durch verschiedene Methoden zu identifizieren und hierdurch die biologische Funktion von Phosphatasen insbesondere im Kontext von Brustkrebs zu evaluieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	Gibco, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, 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
Chloroquine	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma (Taufkirchen)
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Hämalaun	Fluka (Schweitz)
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranidose)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Gibco, Eggenstein
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
pNPP (para-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg

Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Aldrich (Steinheim)
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

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

### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Klenow-DNA-Polymerase	Biolabs, New England
Lysozym	Roche, Mannheim
Mung-Bean-Nuklease	Biolabs, New England
PCR-Beats	Pharmacia, Freiburg
ProteinaseK	Sigma, Taufkirchen
Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Biolabs, New England
	Boehringer, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase	Promega, USA
	Roche, Mannheim

### 2.1.3 Radiochemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	>5000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dATP}$	>5000 Ci/mmol

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

### 2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

Deckgläser (24x60mm)	Menzel-Gläser
DNA-Längenstandards	Eurogentec, Belgien
BigDye Terminator V2.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
ECL Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.

## 2 Material und Methoden

---

Mega Prime DNA Labelling Kit, Rediprime™II random prime labelling system	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Objektträger	Menzel-Gläser
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Pharmacia, Freiburg
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories (USA)
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (human, rekombinant)	Intergen (San Francisco)
β-Heregulin	R&D Systems, USA

### 2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E.coli* Bakterien

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

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

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

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

### 2.1.7 Zellkulturmedien

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

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

RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin

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

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO



### 2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50 280 1,5	mM mM mM	BES NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6.96 (NaOH)
Citratpuffer	100	mM	Citronensäure-Monohydrat pH 6.0 (NaOH)
Denhardt (100x)	2,0 2,0 2,0	% % %	Polyvinylpyrrolidon Ficoll BSA
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25 0,25 30,0 100,0	% % % mM	Bromphenolblau Xylencyanol Glyzerin EDTA pH 8,0
HBS (2x)	46,0 274 1,5	mM mM mM	HEPES pH 7,5 NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,00 (NaOH)
HNTG-Puffer	20,0 150 0,1 10,0 10,0	mM mM % % mM	HEPES pH 7,5 NaCl Triton X-100 Glycerin Tetra-Natrium-Pyrophosphat
KCM (5x)	500 150 250	mM mM mM	KCl CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub>
Laemmli-Puffer (2x)	187,5 6,0 30,0 0,01 5,0	mM % % % %	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glyzerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
MOPS (10x)	200,0 80,0 10,0	mM mM mM	Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat EDTA pH 8,0 pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	500,0 50,0 1,5 0,5	mM mM M %	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH8,0 NaCl Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7 2,7 80,9 1,5	mM mM mM mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 (HCl)

## 2 Material und Methoden

---

RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
SSC (20x)	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
TAE (10x)	400	mM	Tris/Acetat
	10	mM	EDTA pH 8,0 (Eisessig)
TBE (10x)	400	mM	Tris
	10	mM	EDTA pH 8,0
	890	mM	Borsäure
TE	10,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1	mM	EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918,0	mM	Glycin
	1,0	%	SDS

### 2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

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

#### 2.1.9.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> 298 F'	F <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup> , Lambda <sup>r</sup> , recA <sup>-</sup> , tonA <sup>-</sup> , lacI	R. du Bridge, Genentech, USA
<i>E.coli</i> CJ236	dut <sup>-</sup> , ung <sup>-</sup> , thi <sup>-</sup> , relA <sup>-</sup> , (pCJ 105 Camr)	Kunkel, 1985
<i>E.coli</i> DH5α F'	F'/endA1, hsd17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Stratagene
<i>E.coli</i> XL-1 Blue F'	F'/Tn10proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lac1q, d(lacZ), M15/ recA1, endA1, gyrA69 (Nal <sup>r</sup> ), thi, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, relA1, lac	Bullock et al., 1987

#### 2.1.9.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BT20	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-19

BT474	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-20
BT483	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-121
BT549	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-122
Dal	humane Brustkarzinomzellen	G. Natali, Italien
DU-4475	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-123
MCF7	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610030)
MDA-MB-175	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-25
MDA-MB-231	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-26
MDA-MB-361	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-27
MDA-MB-415	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ (610031)
MDA-MB-435S	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-129
MDA-MB-436	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-130
MDA-MB-453	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-131
MDA-MB-468	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-132
SK-BR-3	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-30
T47D	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-133
ZR-75-1	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1500
ZR-75-30	humane Brustkarzinomzellen	ATCC CRL-1504
HEK-293	humane embryonale Nierenfibroblasten, mit Adenovirus transformiert	ATCC CRL-1573

### 2.1.9.3 Antikörper

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

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
$\alpha$ EGFR-108.1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne von humanem EGFR	Lax <i>et al.</i> , 1989
$\alpha$ EGFR-UBI	Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytosmatischen Domäne als Fusionsprotein	UBI, Lake Placid

$\alpha$ ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz, Biotech., Inc.
$\alpha$ FGFR-4	Kanninchen polyklonal gegen Peptid im Carboxy-Terminus	Santa Cruz
$\alpha$ HER2-13D	Maus, monoklonal, gegen die extra-zelluläre Domäne von humanem HER2	Bühring, d. AG.
$\alpha$ HER2-JL	Kaninchen, polyklonal, gegen C-Terminus von HER2	J. Lee, Genentech, USA
$\alpha$ PTP-H1-NT	Kaninchen, polyklonal, gegen N-Terminus von PTP-H1	R. Lammers, d. AG.
$\alpha$ PTP-PEST	Kanninchen, polyklonal, gegen C-Terminus von PTP-PEST	R. Lammers, d. AG
$\alpha$ SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 carboxyterminalen AS des humanem SHC als GST-Fusionsprotein	R. Lammers, d. AG.
$\alpha$ SHP-1	Kaninchen, polyklonal, gegen C-Terminus von SHP-1	R. Lammers, d. AG.
$\alpha$ SHP-1	Maus, monoklonal, gegen C-Terminus von SHP-1	Transduction Laboratories
$\alpha$ SHP-2	Maus, monoklonal, gegen N-Terminus von $\alpha$ SHP-2	Transduction Laboratories
$\alpha$ Phospho-ERK1/ERK2	Kaninchen, polyklonal, gegen phosphorylierte (Thr202/Tyr204) und damit aktivierte p44/42 MAP Kinase	New England Biolabs
$\alpha$ VSV p5d4	Maus, monoklonal, gegen VSV-Epitop (AS-Sequenz: YTDIEMNRLGL)	R. Lammers, d.AG.

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

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

### 2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

#### 2.1.10.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBS II SK+	ColE1 ori, Amp <sup>r</sup> , LacZ, f1(+) <sup>IG</sup> , SK-MCS	Stratagene, Kalifornien

pRK5	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , f1 ori, CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, San Franzisco
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , f1 ori CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman, 1989

### 2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pRKs PEST WT	die gesamte PTP-PEST	Martin Treder, d. AG
pRK5 PEST MT1	PTP-PEST mit Ile an Position 322	diese Arbeit
pRK5 PEST MT2	PTP-PEST mit Ala an Position 573	diese Arbeit
pRK5 PEST MT3	PTP-PEST mit Lys an Position 706	diese Arbeit

### 2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide

Sequenz	Name
- GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATACG <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung der FGFR4 Transmembrandomäne	TM(s) FGFR4
- AGAGGGAAGCGGGAGAGCTTCTGCACAGTGG <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung der FGFR4 Transmembrandomäne	TM(as)
- CGTGGACAACAGCAACCCCTG <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung der murinen FGFR4 Transmembrandomäne	mF4TMs
- GCTGGCGAGAGTAGTGGCCAC <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung der murinen FGFR4 Transmembrandomäne	mF4TMas
- AGAGCGCCAGCCCTCTGACGTCCA <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung der HER2 Transmembrandomäne	H2-TMs
- TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung der HER2 Transmembrandomäne	H2-TMas
- GGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCC <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung der extrazellulären Domäne des EGFR	Es
- CCTGTGCAGGTGATGTTTCATGG <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung der extrazellulären Domäne des EGFR	Eas
- GAAATTAACACTGAAAACATGG <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung des Val322Ile	PEST-964s

Polymorphismus der PTP-PEST - GCCGGTCCTTGGTGGTTTTGGAGG <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung des Val322Ile	PEST-964as
Polymorphismus der PTP-PEST - GGACATGTAACGTGGTCATTTTCATGG <i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung des Val322Ile	PEST-1717s
Polymorphismus der PTP-PEST - GGCAGCAGAACTGTGGCACTTGC <i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung des Val322Ile	PEST-1717as
Polymorphismus der PTP-PEST	

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

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

### 2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

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

### 2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA

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

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden oder über Nacht bei Temperaturoptimum des Enzyms.

#### 2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

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

#### 2.2.3.3 Phosphorylierung von 5'-Enden

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

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

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

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

### 2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

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

### 2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

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

#### 2.2.7.1 Herstellung von uracilhaltiger, einzelsträngiger pRK5/pcDNA3 DNA

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

#### 2.2.7.2 Synthese des mutierten Stranges

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids zum uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen: 200 ng einzelsträngige DNA, 2-3 pmol phosphoryliertes Oligomer, 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem 90°C warmen Heizblock 2 min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von 30°C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1 µl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1µl), 1 µg T4-Gen 32 Protein (0,5 µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1 µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschließend 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl TE gestoppt. 10 µl Aliquots wurden zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien genutzt.

### 2.2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

#### 2.2.8.1 PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten

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



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

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in dem Thermocycler „Progene“ der Firma Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet, wobei die hier angeführte Hybridisierungstemperatur exemplarisch und grundsätzlich von den Oligomersequenzen abhängig ist.

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

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.2.11.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

### 2.2.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

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

### 2.2.9 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzanalyse wurde der „Big Dye Ready Reaktion Terminator Cycle Sequencing Kit“ von ABI PRISM™ (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Weiterstadt) und den Macintosh Programmen ABI PRISM™ „310 Genetic Analyser“ Vers. 2.1.5 und „Sequencing Analyser“ Vers.3.4.1.

### 2.2.10 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore™-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

#### 2.2.10.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation der RNA erfolgte nach Puissant und Houdebine {Puissant, 1990 #1023} durch Extraktion der RNA mittels saurem Phenol.

Die Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen bis zu 80%iger Konfluenz wachsen gelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 2 ml Puffer GTC (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M Mercaptoethanol, 10 mM EDTA) pro Platte. Nach einigen Minuten wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Schabers abgelöst und mehrmals mit Hilfe einer Spritze durch eine Kanüle (0.9 x 95 mm) gepresst, um die DNA zu scheren. Es wurde 1 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0, 10 ml Wasser-gesättigtes Phenol und 2 ml Chloroform hinzugegeben, wobei nach Zugabe jeder einzelnen Lösung stark gemischt wurde (Vortex). Das Gemisch wurde für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 10 ml Isopropanol versetzt. Anschließend wurde wieder für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde durch sehr starkes Vortexen in 2 ml 4 M LiCl resuspendiert, wobei nicht das gesamte Pellet wieder aufgelöst werden konnte. Es wurde erneut wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS aufgenommen. 2 ml Chloroform wurden zugesetzt, und es wurde wiederum zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 3 Volumen Ethanol und 0.3 M Natriumacetat, pH 6.0 versetzt und für 30 min auf Ethanol/Trockeneis inkubiert. Abschließend wurde die RNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

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

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

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

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

### 2.2.10.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

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

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

### 2.2.10.4 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde die cDNA-Synthese nach der Hybridisierung der RNA mit einem spezifischen Oligomer und die PCR-Amplifikation der synthetischen cDNA in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Um eventuelle Kontaminationen mit DNA auszuschließen wurde jeder Versuchsansatz mit einer Negativkontrolle durchgeführt, wobei die RNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O ersetzt wurde.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

0,6 µl	dNTP-Mix (10mM)
0,6 µl	„sense“-Oligomer (20pmol)
0,6 µl	“anti-sense” Oligomer (20pmol)
2,5 µl	10x Taq-Polymerase Puffer
0,3 µl	RNase Inhibitor (40E/µl)
16,5 µl	H <sub>2</sub> O
1,0 µl	AMV-Reverse Transkriptase, ca 0,3E
1,0 µl	RNA (1µg/µl)

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Pipettieren des Ansatzes 10 min bei 50°C inkubiert. In dieser Zeit findet die cDNA Synthese statt. Anschließend wurden 2µl Taq-Polymerase (0,5E) in den Reaktionsansatz pipettiert und die Amplifikation gestartet.

### 2.2.11 Arbeiten mit cDNA-Arrays

#### 2.2.11.1 Konstruktion der cDNA-Arrays

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

#### 2.2.11.2 Prähybridisation der cDNA-Arrays

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

W1:	
10% SDS	50ml
20x SSC	500ml
Bidest. H <sub>2</sub> O	4,45l

W2:	
10% SDS	50ml
20x SSC	50ml
bidest. H <sub>2</sub> O	4,9l

### Prehybridisierungslösung:

100x Denhardt	50ml
20x SSC	250ml
0,5M NaPO <sub>4</sub> , pH6.8	100ml
100mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10ml
Bidest. H <sub>2</sub> O	90ml

### 2.2.11.3 Radioaktive Markierung der cDNA

Die cDNA-Proben wurden mit <sup>33</sup>P markiert. Dieses Radioisotop hat den Vorteil, dass es nicht so stark überstrahlt wie <sup>32</sup>P. Zur Markierung wurde der „Megaprime DNA Labeling Kit“ von Amersham-Pharmacia verwendet und leicht modifiziert.

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

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

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

dGTP	2	µl
dCTP	2	µl
dTTP	2	µl
Reaktionspuffer	2.5	µl
Klenow-Enzym	1.5	µl
α- <sup>33</sup> P-ATP	5	µl (50 µCi)

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

### 2.2.11.4 Hybridisation

Die gereinigte <sup>33</sup>P-markierte cDNA wurde mit COT-DNA (Gibco, U.S.A.) inkubiert. Diese DNA bindet besonders stark an repetitive Sequenzen und blockiert somit jene Sequenzen der cDNA, die bei Hybridisation mit den Arrays unspezifische Signale verursachen könnten. Hierzu wurde die 150 µl markierte cDNA mit 40 µl 20 x SSC, 2 µl 10% SDS und 10 µl COT-DNA (1 mg/ml) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 68°C inkubiert. Danach wurde der Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, der vorher auf 70°C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA versetzt wurde. Für den Beginn der Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer auf den cDNA-Arrays ohne Temperaturverlust gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C und Rotation der Hybridisierungsröhrchen für minimal 16 h.

### Hybridisierungspuffer:

20x SSC	250ml
10% SDS	10ml
Bidest H <sub>2</sub> O	740ml

### Waschen der cDNA-Arrays

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Arrays folgendermaßen gewaschen:

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

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

### 2.2.11.5 Auswertung der cDNA-Arrays

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

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

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

### 2.2.12 Southern-Analyse

Für die Southern-Analyse wurde die in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennte DNA auf einen Nylonmembran (Hybond N+) nach der Methode von Southern (1975) transferiert. Die einzelsträngige DNA bindet an den Filter und wird durch Backen des Filters permanent an diesen fixiert.

#### 2.2.12.1 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt durch Kapillarkräfte. Das Agarosegel wurde auf die minimal notwendige Größe zurechtgeschnitten, 45 min denaturiert (1.5M NaCl; 0.5N NaOH) und anschließend 45 min neutralisiert (1.5M NaCl; 0.5M Tris pH 8.0). Auf eine gesockelte Glasplatte, die sich in einer mit 10x SSC gefüllten Glaswanne befand, wurden drei Lagen in 10x SSC getränktes und zurechtgeschnittenes 3MM Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt, so dass sie über den Rand der Glasplatte hingen. Darauf wurden 2 weitere, ebenfalls mit 10x SSC getränkte 3MM Whatmanpapiere in Gelgröße gelegt. Das Agarosegel wurde auf das oberste Whatmanpapier gebracht und mit einer in 10x SSC angefeuchteten Nitrozellulose gleicher Größe bedeckt. Anschließend wurden etwa 20 Lagen trockenes 3MM Whatmanpapier aufgelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose vom Agarosegel abgezogen, unter UV-Licht die Geltaschen markiert und 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

#### 2.2.12.2 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit DNA

Die gebackenen Nitrozellulosefilter wurden mindestens 3 h bei 65°C in einer Vorhybridisierungslösung (7% SDS, 0,01% BSA, 1mM EDTA, 200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, gescherte Heringssperm-DNA) inkubiert. Die radioaktive Sonde wurde für 5 min bei 100°C hitzedenaturiert und zur Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Rotationshybridisierungssofen. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie mit 0.4x SSC und 1% SDS gewaschen.

Danach erfolgte die Exposition der Filter auf Röntgenfilmen in Kassetten mit Verstärkerfolie bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.13 FGFR4 Allel Bestimmung in Tumorproben

Von den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden  $8\mu\text{m}$  dicke Schnitte zur Isolierung von genomischer DNA verwendet. Die Schnitte wurden in den jeweiligen Laboratorien angefertigt aus denen die Proben stammten.

#### 2.2.13.1 Isolierung genomischer DNA aus Paraffinschnitten

Um Kontaminationen zu vermeiden wurden alle Pipettierschritte mit gestopften Spitzen durchgeführt. Jede Probe wurde 2x mit Xylol extrahiert um das Paraffin zu entfernen. Dazu wurde 1ml Xylol in jedes Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Das Gewebe wurde durch Zentrifugation (5 min, RT, 13000rpm) pelletiert und das Xylol entfernt. Nach dieser organischen Extraktion folgten zwei Waschschriffe mit 100% Ethanol um das Lösungsmittel zu entfernen. Die Proben wurden anschließend in einem Heizblock getrocknet.

Zu den getrockneten Proben wurden je  $200\mu\text{l}$  ProteinaseK-Puffer, der  $200\mu\text{g/ml}$  ProteinaseK enthält gegeben und für 3 Stunden bei  $55^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um die Proteinase zu inaktivieren erfolgte danach eine 10 minütige Inkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$ . Zur Aufbewahrung wurde die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.2.13.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen und Gewebe

Bei der Isolierung von Zellulärer DNA aus ES-Zellen und DNA aus Mausschwänzen wurde unterschiedlich verfahren.

Auf einer 24-Lochplatte gewachsenen ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und über Nacht mit  $500\mu\text{l}$  Lyse-Puffer ( $0.2\%$  SDS,  $100\text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0,  $200\text{mM}$  NaCl,  $5\text{mM}$  EDTA pH 8.0,  $200\mu\text{g/ml}$  ProteinaseK) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit  $500\mu\text{l}$  Isopropanol nach 3-4 h Schütteln gefällt. Der DNA-Faden wurde über Nacht in  $100\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bei  $55^{\circ}\text{C}$  gelöst.

Das Gewebe wurde über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  mit  $500\mu\text{l}$  ProteinaseK-Puffer ( $0.2\%$  SDS,  $100\text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0,  $200\text{mM}$  NaCl,  $5\text{mM}$  EDTA pH 8.0,  $200\mu\text{g/ml}$  ProteinaseK). Anschließend wurden  $250\mu\text{l}$  Phenol und  $250\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben und geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit  $500\mu\text{l}$  Isopropanol versehen. Nach mehrmaligem Invertieren und Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die DNA getrocknet. Die DNA wurde in etwa  $300\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bei  $55^{\circ}\text{C}$  für mindestens 2 h gelöst.

#### 2.2.13.3 FGFR4 Allel Bestimmung durch PCR Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP)

Aufgrund der hohen Anzahl der durchgeführten PCR Reaktionen und um mögliche Überkreuzreaktionen zu vermeiden, wurden Ready•To•Go™ PCR-Beads (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Diese enthalten bereits alle nötigen Reagenzien, außer Primer und DNA, für eine  $25\mu\text{l}$  PCR-Reaktion.

Bei einem Endvolumen von  $25\mu\text{l}$  enthält jeder Ansatz:

1,5U	Taq-Polymerase
10mM	Tris-HCl pH9.0
50mM	KCl
1,5mM	$\text{MgCl}_2$
200 $\mu\text{M}$	je dNTPs (dGTP, dATP, dCTP und dTTP)

Dazu wurden zugegeben:

2µl	DNA
0,5µl	„sense“-Oligomer
0,5µl	„anti-sense“-Oligomer
22µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Es wurde zusätzlich eine Reaktion mit H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle durchgeführt.

Die Synthesereaktion wurde in einem Thermocycler „Progen“, der Firma Techne (Cambridge) durchgeführt.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

Erste Denaturierung:	3 min	95°C
Amplifikation 35 Zyklen:	45 sek	72°C
	45 sek	94°C
Letzte Synthese:	5 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Amplifikation wurde der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym MvaI (5E/25µl) versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Die dabei entstandenen Produkte des Restriktionsverdau wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Acrylamid ist ein Monomer das zu langen Ketten polymerisiert. Bei Zugabe von Methylenbisacrylamid werden die Ketten quervernetzt. Nach Zugabe von 1/250 10% APS und 1/1000 TEMED wurde die Polymer-Lösung (16,5ml 2%iges Methylenbisacrylamid; 33,3ml 30%iges Polyacrylamid und 5,5ml 10xTBE) zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter getrennt waren. Die Größe der linearisierten DNA-Fragmente wurde im Vergleich zu einem Längenstandard (1kb DNA-Leiter, Gibco) ermittelt. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6x Laufpuffers versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 190-270 Volt innerhalb von 3-4 Stunden. Nach 10 minütigem Färben in einer Ethidiumbromidlösung (etwa 12µl/l einer Stocklösung von 10mg/ml in 1xTBE Puffer) konnten die DANN Banden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Floureszenz unter UV-Licht ( $\lambda=302\text{nm}$ ) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters photographiert (Polaroid 667) werden.

### 2.2.14 Klonierungsstrategie des FGFR4 Arg388 knock-in

Für die Generierung dieses *Targeting*-Konstrukts wurde ein 12.5kb großes genomisches Fragment, das Exon 2-12 des murinen FGFR4 umspannt, in einen pBS-Vektor kloniert. Zunächst wurde der Polymorphismus über gezielte Mutagenese eingefügt. Dazu wurde ein 320bp großes Eco72-Esp3I Fragment rausgeschnitten und in einen pcDNA3 Vektor kloniert. Nach erfolgter Mutagenese wurde dieses Fragment Eco72-KpnI rausgeschnitten und in den Ausgangsvektor, der Eco72-KpnI verdaut wurde religiert. Zum Einfügen der Selektionskassette wurde an einer ScaI-Schnittstelle eine NotI-ClaI-Schnittstelle über ein Oligonukleotid eingefügt. Zusätzlich musste eine ClaI-Schnittstelle im pBS-Vektor schneiden, auffüllen (blunt) und religieren entfernt werden. Die pBS LoxP Neotk LoxP Kassette wurde anschließend über NotI und ClaI eingeführt.

## 2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden

die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Zellzählgerät (Coulter Electronics, USA).

### 2.3.2 Mykoplasmentest

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

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

### 2.3.3 Transfektion von Säugerzellen

#### 2.3.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit  $\text{CaCl}_2$  und einer BES 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 h nach der Transfektion.

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

#### 2.3.3.2 Oligofektamin-Transfektion

Das Transfektionsreagenz Oligofektamin lagert sich spontan an Oligonukleotide an und bildet Transfektionskomplexe. Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$ /6-Loch-Schale ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 3  $\mu\text{l}$  Oligofektamin und 15  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium sowie eine Lösung B mit 10  $\mu\text{l}$  siRNA-Oligonukleotide in 175  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Zellen einmal mit 2 ml serumfreiem Medium gewaschen, anschließend 800  $\mu\text{l}$  serumfreies Medium zugegeben und nach der Inkubationszeit der Transfektionsansatz zugegeben. Nach 4 h im Brutschrank wurde das Medium mit serumhaltigen Medium ausgetauscht und für weitere 20 h inkubiert. Für Stimulationen wurde dann das Transfektionsmedium abgenommen und durch serumfreies DMEM ersetzt.



### 2.3.3.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz

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

### 2.3.4 Stimulation von Zellen

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

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

<u>Faktor:</u>	<u>Konzentration:</u>
EGF	50 ng/ml
$\beta$ -Heregulin	50 ng/ml

Zur Inhibition von PTPn wurden die Zellen jeweils mit frisch hergestellter Peroxyvanadat-lösung (POV) behandelt. Dazu wurde 968  $\mu$ l einer 100 mM Natriumorthovanadat-lösung mit 34  $\mu$ l 30%iger  $H_2O_2$  versetzt, in einer Verdünnung von 1:100 auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

### 2.3.5 ES-Zellkultur

#### 2.3.5.1 Kultivieren von ES-Zellen

In dieser Arbeit wurden ES-Zelllinien E14 (Hooper *et al.*, 1987) verwendet. ES-Zellen sollten aus Differenzierungsgründen möglichst immer auf *Feeder*-Zellen kokultiviert werden, da die *Feeder*-Zellen nicht nur differenzierungsinhibierende Faktoren produzieren, sondern auch Rezeptoren für das Adhären von ES-Zellen. Um den pluripotenten Phänotyp zu erhalten, wurden die ES-Zellen zusätzlich in Gegenwart von *Leukimia Inhibitory Faktor* (Lif, GibcoBRL) bei einer Konzentration von 1000 U/ml kultiviert (Williams *et al.*, 1988, Moreau *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1988).

ES-Zellmedium: DMEM (high glucose), 2 mM Glutamin, 1000U/ml Lif, 0.1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% FKS (hitzeinaktiviert für 30 min bei 55°C).

#### 2.3.5.2 Elektroporation von ES-Zellen

Eingefrorene ES-Zellen wurden auf einer 6cm *Feeder*-Platte aufgetaut, tags darauf Medium gewechselt und am nächsten Tag 1:4 verdünnt. Nach 2 weiteren Tagen wurden sie 1:2 auf frische *Feeder* gegeben und 24h später für die Elektroporation vorbereitet. Die ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und nochmals mit kaltem PBS gewaschen. Pro Elektroporation wurden  $4 \times 10^7$  ES-Zellen und 100 $\mu$ g zuvor linearisiertes *Tageting*-Plasmid in einem Endvolumen von maximal 800 $\mu$ l in eiskalten PBS gemischt. Die Elektroporation wurde in einem Gene Pulser bei 240V und 500 $\mu$ F durchgeführt und sollte eine Zeitkonstante von etwa 6msec ergeben. Nach 10 min Inkubation in der Küvette bei RT wurden die ES Zellen vorsichtig in ES-Zellmedium überführt und auf 8 10cm Platten ausgesät. Einen Tag nach der Elektroporation wurde das Medium gewechselt und am zweiten mit der Selektion begonnen. Als positive Selektion wurde G418 mit einer Endkonzentration

von 200µg/ml und als negative Selektion Gancyclovir (2µM) eingesetzt. Jeden Tag wurde das Selektionsmedium gewechselt und nach 6-8 Tagen Selektion wurden resistente Einzelklone sichtbar.

### 2.3.5.3 Expandieren und Analyse der ES-Einzelklone

360 resistente Einzelzellklone wurden sodann unter dem Binokular mit einer 20µl Pipette einzeln gepickt und auf 96-Lochplatten in 100µl Trypsin bei 37°C für 30 min inkubiert, um die Zellen zu vereinzeln. Anschließend wurden sie zusammen mit *Feeders* auf eine 24-Lochplatte gegeben und weiter mit G418 selektioniert. Nach 5 Tagen wurden die ES-Zellklone eingefroren. Dazu wurden 3 Tropfen Trypsin in jedes Loch gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1ml Einfriermedium (10% DMSO in Zellmedium) dazugegeben und 0.5ml davon bei -80°C eingefroren. Die restlichen 0.5ml blieben auf der Platte und wurden mit 1.5ml ES-Zellmedium verdünnt. 4-5 Tage später wurden die Klone in 500µl Lyse-Puffer über Nacht bei 37°C lysiert. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zugabe von 500µl Isopropanol gefällt, 3-4 h geschüttelt und der DNA-Faden in 100µl H<sub>2</sub>O über Nacht bei 55°C gelöst. Anschließend wurden 20µl DANN in einem Reaktionsansatz von 30µl Gesamtvolumen mit 20 U Enzym über Nacht verdaut. Die verdaute DANN wurde auf einem Agarose-gel aufgetrennt und die Klone mittels Southern-Blot analysiert.

## 2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.4.1 Triton X100-Lyse von Zellen

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

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorffreaktionsgefäß 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 Eppendorffreaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

### 2.4.2 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 (100-2000µg Protein/ml) eingesetzt.

### 2.4.3 Immunpräzipitation von Proteinen

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

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

### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung bestimmt wird. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einen kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

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

### 2.4.5 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-DE) verbindet zwei verschiedene elektrophoretische Trenntechniken miteinander und ermöglicht somit eine umfassendere Trennung von komplexen Gemischen als die jeweilige Technik alleine. Die Kombination umfasst die isoelektrische Fokussierung (IEF) in der 1. Dimension, wobei eine Diskriminierung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten erfolgt, mit der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese in der 2. Dimension, wobei die Proteine entsprechend ihren molekularen Massen getrennt werden. Hierbei kann ein einzelnes Protein mehrere, meist dicht beieinanderliegende Spots verursachen, was sich durch einen variablen Grad an chemischer oder posttranslationaler Modifikation erklären lässt. Als 1. Dimension wurden käufliche IEF-Gelfolien (Immobiline DryStrips, Amersham Pharmacia, pH 4-7) verwendet Die Fokussierungstreifen wurden nach der IEF und Äquilibrierung mit SDS-Probenpuffer auf das 2. Gel (2. Dimension) übertragen.

### 2.4.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

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

### 2.4.7 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

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

### 2.4.8 Immundetektion (Immunoblotanalyse)

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

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die 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 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach viermal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

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

## 2.5 Zellbiochemische Untersuchungen

### 2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 24 bis 48 h in serumfreiem Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit unterschiedlichen

Wachstumsfaktoren stimuliert. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin ( $\alpha$ PY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot analysiert.

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

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

pNPP Puffer: 25 mM MES (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 Zelllysate wurden mit Phosphatasen-spezifischen Antikörpern angereichert und mit 150  $\mu$ l des pNPP Puffers bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von NaOH wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption der Lösung bei 405 nm in einer Mikrotiterplatte mit einem Plattenphotometer (Dynatech MR 500) bestimmt.

### 2.5.3 Immunhistochemie

Die Dicke der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte für die Immunhistochemie betrug 3-4  $\mu$ m. Die Schnitte wurden in einem etwa 40°C warmen Wasserbad geglättet und auf Objektträger gebracht. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 46°C getrocknet. Schnitte für eine Hämatoxylin/Eosin Färbung wurden für 20 min bei 65°C getrocknet.

Die Methode wurde mit Hilfe des Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, USA) durchgeführt. Die sogenannte ABC-Technik beruht auf der außerordentlich hohen Affinität des Glycoproteins Avidin zu dem Vitamin Biotin. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin und die meisten Proteine, einschließlich Antikörper und Enzyme. Diese Aspekte ermöglichen makromolekulare Komplexe die zwischen Avidin und biotinylierten Enzymen geformt werden können. Die Methode beinhaltet die Behandlung der Schnitte mit dem ersten Antikörper, gefolgt von dem biotinylierten sekundären Antikörper und dann den vorgeformten Avidin und biotinylierten Meerrettich-Peroxidase Komplex (ABC). Zur Lokalisation der Peroxidase in den Gewebeschnitten wurde als Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma) verwendet.

Die Schnitte für die ABC-Peroxidase Methode wurden zunächst für zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol/Xylol, 100% Ethanol, 80% Ethanol, 60% Ethanol, 40% Ethanol und destilliertes Wasser) für je 2 min hydratisiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 min in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS-Puffer inkubiert. Zur Denaturierung der Antigene wurden die Schnitte zweimal 6 min in Citratpuffer in einer Mikrowelle (Panasonic) bei 700 Watt gekocht. Nun wurden die Schnitte bei RT mit verdünntem Normalserum inkubiert. Nach 20 min wurde das überschüssige Normalserum mit Filterpapier abgesaugt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 Stunde. Als optimale Verdünnung des Anti-FGFR4-Antikörpers stellte sich nach Testen verschiedener Verdünnungen das Verhältnis von 1:100 heraus. Um die Absorption der Antikörper an Plastik oder Glas zu verhindern wurden sie in 1% BSA in PBS-Puffer verdünnt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper für 20-30 min bei RT. Daraufhin wurde das Vectastain Elite ABC-Reagenz auf die Schnitte gegeben und 30 min inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils ein dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer. Die Lokalisation der Peroxidase erfolgte dann mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin, das für 10 min auf die Schnitte gegeben wurde. DAB erzeugt

rotbraune Präzipitate in den Gewebeschnitten. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun (0.4% Hämalaun, 10% Kalialaun in 2% Eisessig) für 1 min. Gespült wurde zunächst mit destilliertem Wasser, dann mit warmem Leitungswasser.

Die Schnitte wurden mit Kaiser's Glycerin Gelatine und Deckgläsern eingedeckt. Durch die Intensität der braunen Präzipitate konnte auf die Stärke der Expression der Proteine geschlossen werden.

Als Negativkontrolle für die FGFR4 Expression wurden einige Schnitte zusätzlich mit einem „Blocking-Peptid“ (Santa Cruz Biotechnologie) inkubiert. Das Peptid bindet an den Primärantikörper, der damit nicht mehr an die Schnitte binden kann. Dazu wurde das Peptid 1:50 verdünnt, 15 min. mit dem Antikörper inkubiert und dann wie gewohnt auf die Schnitte gegeben.

### 2.5.4 Inhibierung der Genexpression mittels siRNA-Oligonukleotiden

Unter „*RNA interference*“ versteht man den Prozess einer sequenzspezifischen, postranskriptionellen Inhibierung der Genexpression, welche durch sogenannte doppelsträngige siRNAs induziert wird, die zu einer Sequenz des auszuschalteten Gens homolog sind. Diese siRNAs führen zu einer mRNA-Degradation und somit einer spezifischen Unterdrückung der Genexpression. Im Idealfall führt dies zur vollkommenen Eliminierung des entsprechenden Proteins in der Zelle und kommt einem „knock out“ des Gens gleich. Die Sequenzen geeigneter siRNAs zur Suppression eines Gens wurden anhand der cDNA Sequenz und eines Computerprogramms ermittelt. Die Synthese der siRNA-Duplices erfolgte durch die Firma Dharmacon (USA). Die lyophilisierten siRNAs wurden durch Lösen in 1 ml RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt.

Die Transfektion von siRNAs in Zellen erfolgte mit Lipofectamin™ 2000 bzw. mit Oligofectamine™ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ausgesät, wobei die Zellzahl bezüglich der Transfektionseffizienz für die verwendeten Zellen zuvor optimiert worden ist. Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 10 µl der jeweiligen siRNA transfiziert. In Abhängigkeit von der Abundanz des Zielproteins und dessen Halbwertszeit war bei funktioneller siRNA ein „knockdown“-Phänotyp nach 1-4 Tagen detektierbar.

Sequenzen verwendeter siRNAs (5'>3')

GL2 Luciferase „sense“ siRNA	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
„antisense“ siRNA	UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT
SHP-1-1 „sense“ siRNA	GGCUGGCUUCUGGGAGGAGdTdT
„antisense“ siRNA	CUCCUCCCAGAAGCCAGCCdTdT
SHP-1-2 „sense“ siRNA	CCUAGGAGUGCCCCAUUCUdTdT
„antisense“ siRNA	AGAAUGGGGCACUCUUAGGdTdT
PTPσ „sense“ siRNA	CGUCAUCGCCUAUGACCACdTdT
„antisense“ siRNA	GUGGUCAUAGGCGUAGACGdTdT
PTP-H1 „sense“ siRNA	CGAAGGGGAUCAAUUCGUGdTdT
„antisense“ siRNA	CACGAUUUGAUCCCCUUCGdTdT
LAR-1 „sense“ siRNA	GCAGCUGCGUUCAGGUGCCdTdT
„antisense“ siRNA	GGCACCUGAACGCAGCUGCdTdT

LAR-2

„sense“ siRNA  
“antisense” siRNA

CCGGCCCCUCUGUGGCCAGdTdT  
CUGGCCACAGAGGGGCCGGdTdT

### 2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm Winstat (Zierenberg) durchgeführt. Die Gültigkeit der Nullhypothese zur Verteilung der Genotypen in den einzelnen Subgruppen wurde mit dem Chi-Test untersucht. Aufgrund der kleinen Anzahl der homozygoten FGFR4 Atg388 Träger wurden diese mit den heterozygoten FGFR4 Arg388 Trägern zusammengefasst. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier aufgetragen und mit einer Log-Rank Statistik verglichen. Allen Tests wurde ein Signifikanz-Level von  $\alpha=0.05$  zu Grunde gelegt.

### 2.7 Prinzip der Etablierung von knock-in Mäusen

Die erforderlichen Schritte zur Generierung von knock-in Mäusen wurde in Abbildung schematisch dargestellt.

Zunächst ist es notwendig, den genomischen Mauslokus zu klonieren. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die gewünschten  $\lambda$ -Phagen aus einer Phagen-Bank, die das ganze Maus-Genom mit Fragmenten von etwa 12-15kb abdeckt, mit entsprechenden Sonden isoliert werden. Alternativ werden Cosmid-Banken (Insertgrößen 40-50kb) oder zunehmend BAC-Klonbanken (Insertgrößen etwa 100kb) verwendet, wobei die einzelnen Klone auf Filter mit definierten Koordinaten aufgetragen sind. Für die Suche nach den entsprechenden Klonen eignen sich sowohl Proben die Teile der cDNA des gewünschten Gens abdecken, als auch Proben aus dem Intron-Bereich.

Beim konditionalem knock-in wird die Genstruktur zunächst nur minimal mit sogenannten loxP-Stellen verändert (Abremski *et al.*, 1981), um so die endogene Genexpression unbeeinflusst zu lassen. Dabei wird die Neo-Kassette, die zusätzlich für die Deletion des Resistenzmarkers noch von zwei loxP-Stellen flankiert sein kann, entweder in ein größeres Intron oder außerhalb des Gens in dem untranskribierten Bereich gesetzt. LoxP-Stellen sind 34bp lange Erkennungssequenzen für Cre-Rekombinase, so dass DNA-Bereiche, die von zwei dieser Stellen flankiert sind effizient durch Cre-Rekombinase ausgeschnitten werden. Dies erfolgt durch Kreuzen von solchen knock-in Mäusen mit Cre-transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase ubiquitär (Sauer und Hendersson, 1988), gewebespezifisch oder induzierbar exprimieren (Orban *et al.*, 1992, Kühn *et al.*, 1995). Für die homologe Rekombination in ES-Zellen wird der Selektionsmarker von beiden homologen Armen flankiert, die erfahrungsgemäß zusammen mindestens 6kb ergeben soll.

Für das *Gene-Targeting* wird die linearisierte DNA in eine totipotente Maus ES-Zelllinie eingebracht und resistente ES-Zellklone selektiert. Die ES-Zellen werden immer in Gegenwart von sogenannten embryonalen Fibroblasten (*Feeder*) gehalten, die die Totipotenz der ES-Zellen während der *in vitro*-Manipulation erhalten soll. Die ES-Klone werden mit Neomycin positiv und mit Gancyclovir, einem Nukleotidanalogen, welches von der TK phosphoryliert wird, negativ selektiert. Durch die homologe Rekombination wird der Bereich zwischen den beiden Armen ins Genom integriert und die übrigen Bereiche des Vektors gehen verloren. Dann werden etwa 360 Einzelklone gepickt, expandiert und die Klone mittels Southern Blot und einem charakteristischen Restriktionsverdau auf homologe Rekombination getestet. Die Proben müssen sich außerhalb der Arme für die homologe Rekombination befinden, um so sicherstellen zu können, dass die resultierenden Banden im Southern Blot nicht durch illegitime Rekombination zufällig entstehen. Die Proben sollen außerdem keine repetitiven Sequenzen enthalten und neben dem Wildtyp-Fragment ein charakteristisches DANN-Fragment erkennen, welches nach der homologen Rekombination zum Beispiel durch das Einbringen einer charakteristischen Restriktions-Erkennungsstelle generiert wird. Positive

ES-Klone werden expandiert und mit einer internen Neo-Probe analysiert, um zusätzliche Integration ausschließen zu können.

Einige solcher manipulierten hemizygoten ES-Zellen werden in Blastozysten mikroinjiziert, die üblicherweise aus C57BL/6 Mäusen isoliert werden. Jeweils 8 bis 10 mikroinjizierte Blastozysten werden in jedes Uterushorn einer pseudoschwangeren Ammenmaus transferiert, die synchron zum Entwicklungsstand der transferierten Blastozysten ist. Daraus entwickeln sich chimäre Tiere, deren Grad an Chimarismus anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden kann, da die C57BL/6 Empfängerembryos eine schwarze Fellfarbe und die mikroinjizierte ES-Klone in der Regel eine Agouti-Fellfarbe ergeben. Der Genotyp der verwendeten ES-Klone ist männlich, homozygot für die Fellfarbe Agouti (AA) und heterozygot für das veränderte Allel (+/-). Es ist wichtig anzumerken, dass Agouti dominant gegenüber der Fellfarbe von C57/BL6 (aa) ist.

Durch das Rückkreuzen der so erhaltenen Chimären mit C57BL/6 Mäusen erhält man in der Regel viele schwarze Nachkommen, die Wildtyp für das entsprechende Gen sind. Agouti Nachkommen sind potenziell hemizygot für das gewünschte Allel, was durch Genotypisierung getestet werden kann. Der Genotyp der Agouti Nachkommen ist in jedem Fall Agouti/Non-Agouti (A/a), sichtbar durch die braune Fellfarbe, und bei einer idealen Verteilung zu 50% hemizygot für das veränderte Allel.

Werden hemizygote knock-in Mäuse untereinander verpaart, sollte die Weitergabe des Allels gemäß den Mendelschen Regeln erfolgen, wobei 25% homozygot, 50% hemizygot für das veränderte Allel und 25% Wildtyp-Nachkommen sind.

Bei konditionalen knock-in Mäusen müssen dann noch homo- oder hemizygote Mäuse mit Cre-transgenen Tieren gekreuzt werden, um die Selektionskassette herauszuschneiden. Da die eingekreuzte Cre-transgene Maus wieder ein Wildtyp-Allel mitbringt, müssen heterozygote Mäuse wiederum untereinander verpaart werden, um vollständige homozygote knock-in Mäuse zu generieren.



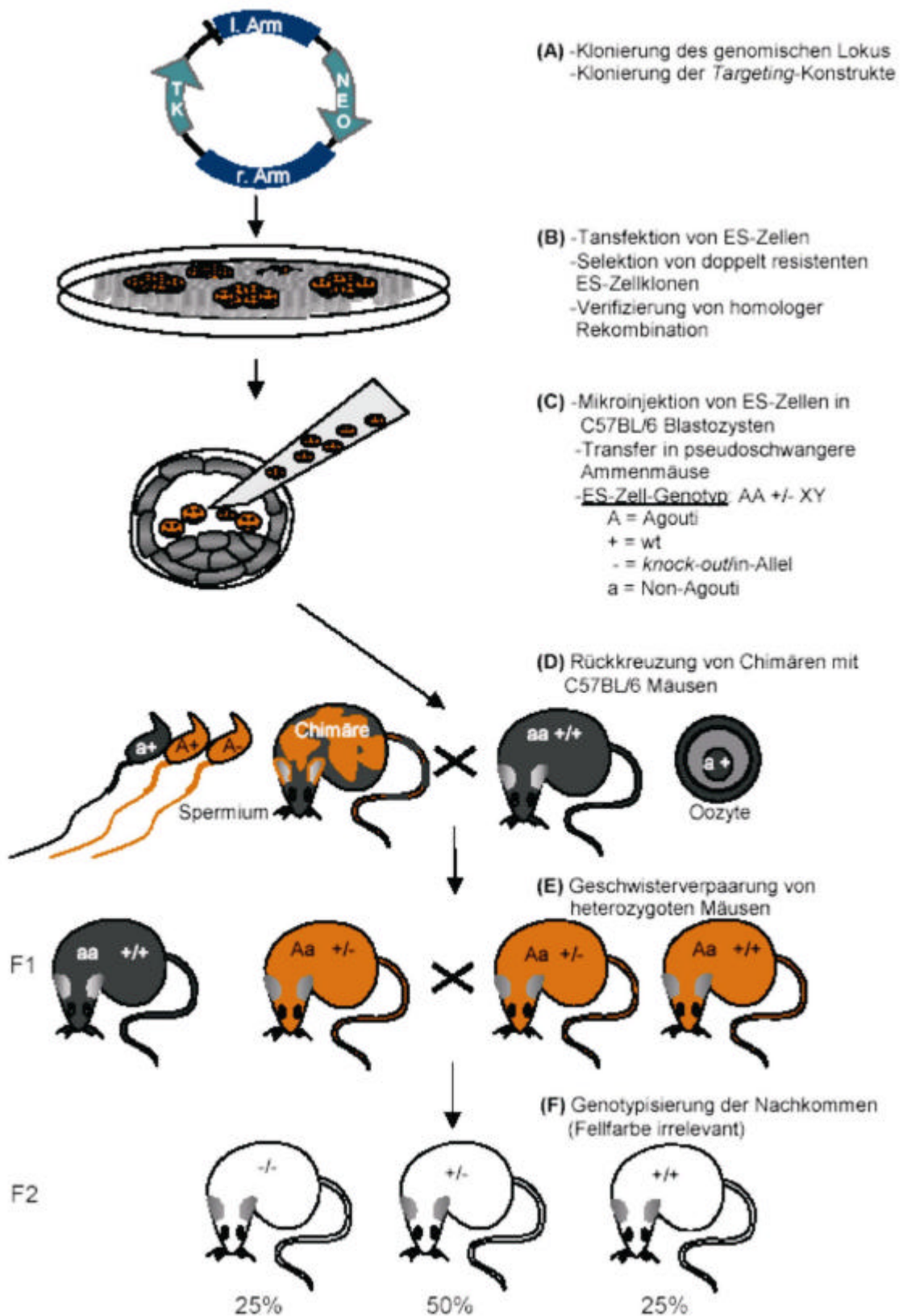
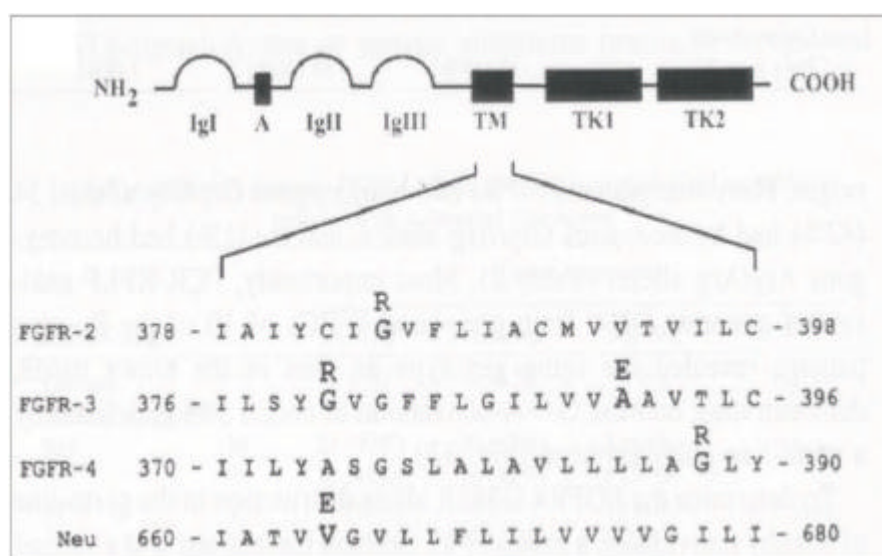


Abb. 5: Schematische Darstellung der Etablierung von *knock-in* Mäusen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Bedeutung des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus in der Tumorentwicklung

Die Fehlregulation von Tyrosinkinassen und –phosphatasen, die sowohl durch veränderte Expression als auch durch Mutation des jeweiligen Gens hervorgerufen werden kann, spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung vieler Krankheiten. In dieser Arbeitsgruppe konnten zwei Punktmutationen in dem für den FGFR4 kodierenden Gen nachgewiesen werden (J. Bange). Bei einer dieser Mutationen handelt es sich um den Austausch von Thyminidin zu Adenosin an Position 943 der Nukleotidsequenz, wodurch an Aminosäureposition 297 ein Aspartatrest zu Valin überführt wird. Diese Änderung in der Aminosäuresequenz wurde erstmals durch Ron *et al.*, (1993) beschrieben. Die zweite Punktmutation betrifft mit der Aminosäure 388 die Transmembranregion des FGFR4. Hier wird an Position 1217 ein Guanidin durch Adenosin ersetzt, was zu einem Austausch des für die hydrophobe Aminosäure Glycin stehenden Codons GGG gegen das für die stark hydrophile Aminosäure Arginin stehende Codon AGG führt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung von RTK Transmembrandomänen.** Punktmutationen, die zu Veränderungen der Aminosäuresequenz und zu schweren Entwicklungsstörungen oder Krebs führen, sind hervorgehoben und die jeweilige neue Aminosäure angegeben.

Punktmutationen in der Transmembrandomäne sind darüber hinaus auch für den FGFR2 sowie den FGFR3 beschrieben worden. Sie sind äußerst selten und mit schweren Entwicklungsstörungen verbunden (Wilkie *et al.*, 1995).

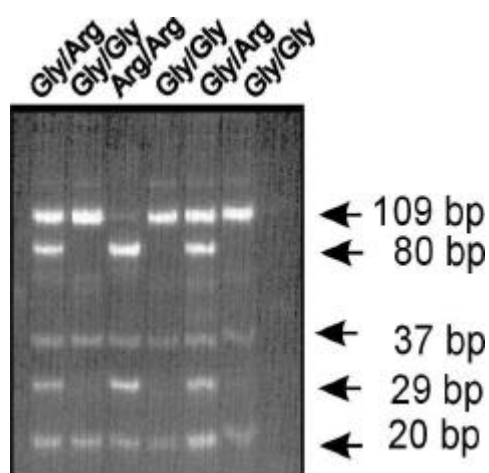
Auch für Neu/ErbB2, einem Mitglied der EGF Rezeptor Familie, ist der Austausch von Alanin gegen Glutamat im Bereich der transmembranären Region bekannt, welche wurde in Glioblastomen von Ratten gefunden wurde (Bargmann *et al.*, 1988). All diesen Veränderungen ist mit dem FGFR4 Arg388 Allel die Einführung einer stark geladenen Aminosäure in die hydrophobe Umgebung der Zellmembran gemeinsam (Abb.6).

In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das FGFR4 Arg388 Allel bei Brustkrebspatientinnen mit einer deutlich reduzierten rezidivfreien Zeit korreliert ( $p=0.01$ ). Außerdem wurde das Arg388 Allel mit einer schlechteren Prognose bei Darmkrebs in Verbindung gebracht (Bange *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen legen eine Rolle des FGFR4 bei der Progression der Krebserkrankung nahe. Sie wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit näher charakterisiert.

#### 3.1.1 Verteilung des FGFR4 Allels in Patienten mit Karzinomen des Plattenepithels

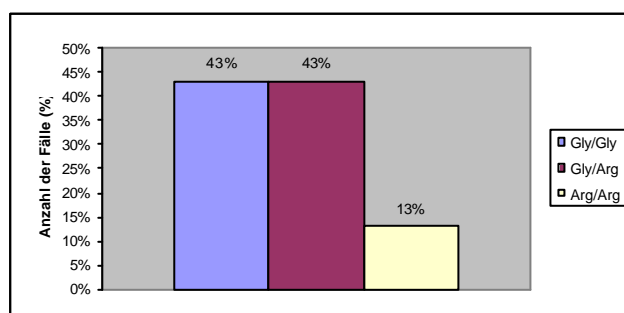
Um zu untersuchen, ob dem FGFR4 Arg388 Allel nicht nur in Brust- und Darmtumoren, sondern auch in anderen Tumortypen eine Rolle zukommt, sollte des weiteren der FGFR4 Genotyp eines Kollektivs an Plattenepithelkarzinomen aus der Mundrachenhöhle (Pathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität, München) bestimmt werden. Dazu wurde die genomische DNA aus 104 in Paraffin eingebetteten Karzinomen isoliert (2.2.13.1), die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (2.2.13.3). Diese Art der Analyse ist möglich, da durch den Guanidin/Adenosin Austausch ein zusätzliches Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym MvaI im FGFR4 Gen gebildet wird. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde ein 168 Basenpaar (bp) großes Fragment, welches die Transmembrandomäne des FGFR4 einschließt, in einer PCR-Reaktion amplifiziert und das PCR Produkt mit der Restriktionsendonuklease MvaI verdaut. Nach Auftrennung über ein 12%iges Polyacrylamidgel konnten die beiden Allele aufgrund der spezifischen Bandenmuster identifiziert werden (Abb.7).

Bei für das Gly388 Allel homozygoten Patienten wurde ein PCR-Produkt gebildet, welches von dem Enzym MvaI an zwei Stellen erkannt und daher in drei Fragmente der Länge 22, 37 und 109 Basenpaare (bp) gespalten wurde (Abb. 7, Gly/Gly).



**Abb. 7: Analyse des FGFR4 Genotyps durch Restriktionsverdau.** Genomische DNA der jeweiligen Patienten wurde als *Template* in den entsprechenden PCR-Reaktionen verwendet, um ein 168 bp großes PCR-Produkt zu erzeugen. Dieses wurde 1 h mit 0.5 U des Restriktionsenzym *Mva*I bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden durch ein 12%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Der Polymorphismus an Position 1217 der Nukleotidsequenz hat die Entstehung der bereits erwähnten, zusätzlichen *Mva*I-Schnittstellen (CCAGG) in dem 108 bp großen Fragment zur Folge. Endonukleolytische Spaltung an dieser Stelle ließ das 108 bp-Fragment in ein 29 sowie ein 80 bp langes DNA-Molekül übergehen. In bezüglich des FGFR4-Allels heterozygoten Patienten wurde das große Fragment daher zur Hälfte, bei Patienten mit homozygot mutiertem Allel vollständig in die beiden Teilfragmente überführt. Die Analyse des Restriktionsverdaus ergab daher für erstere fünf (Abb. 7, Gly/Arg), für letztere vier Banden (Abb. 7, Arg/Arg).



**Abb. 8: FGFR4 Allel Verteilung in 104 Plattenepithelkarzinomen.** Die Allelverteilung wurde durch PCR-RFLP an genomischer DNA aus Tumorgewebe bestimmt.

Aus den so getesteten Kollektiv wiesen 59 Patienten Tumore mit dem Arg388 Allel auf, 46 davon in einer heterozygoten und 13 in einer homozygoten Form (Abb.8). 45 Patienten waren homozygot für das FGFR4 Gly388 Allel. Die prozentuale Verteilung der FGFR4 Allele ist in Abb. 8 graphisch dargestellt.

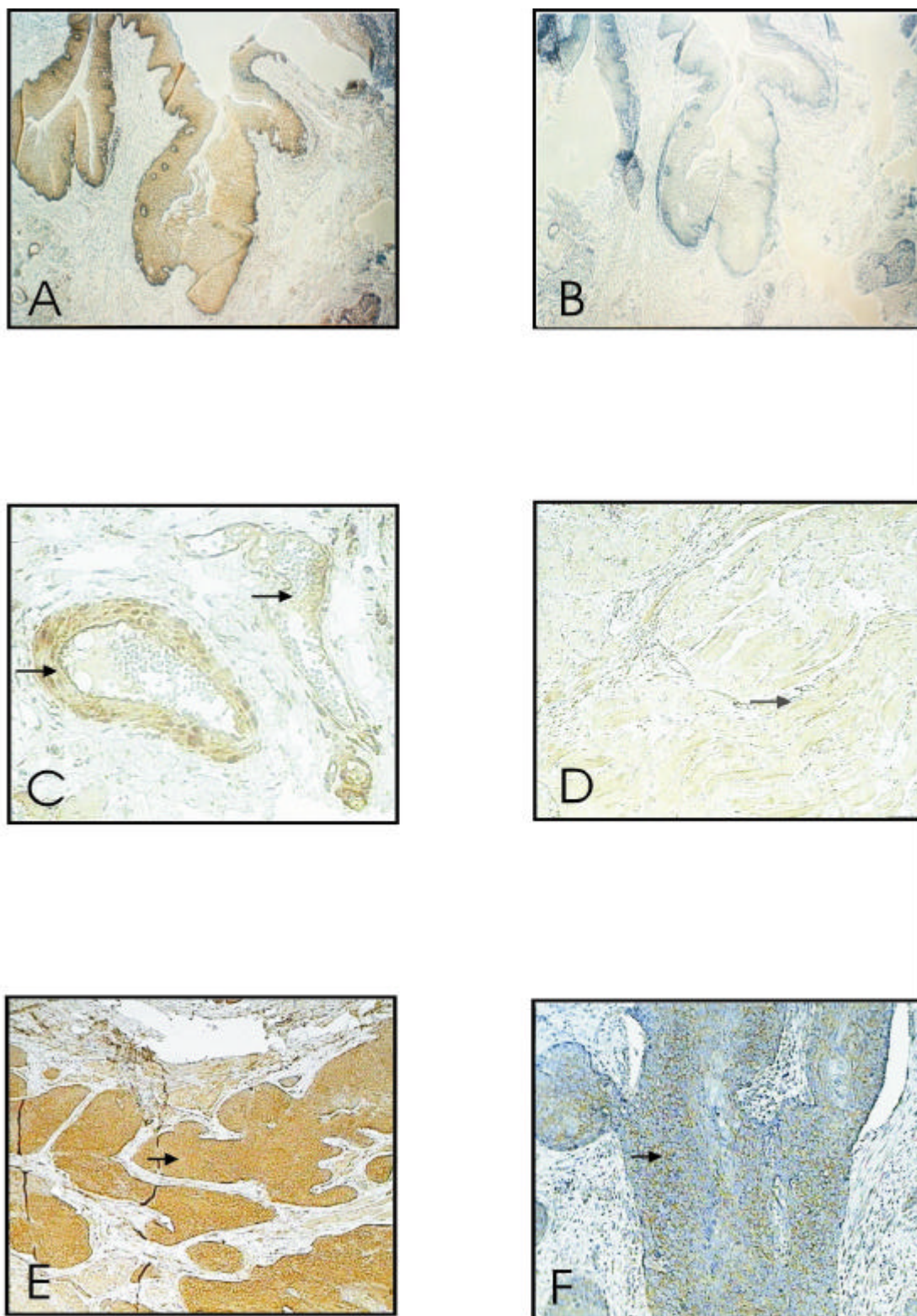
#### 3.1.2 Expressionsanalyse des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen der Mundrachenhöhle

Aufgrund früherer Beobachtungen, die eine Korrelation zwischen dem Auftreten des FGFR4 Arg388 Allels und einer starken Expression dieses Rezeptors belegen (Bange *et al.*, 2002), wurde die FGFR4 Expression in allen 104 Plattenepithelkarzinomen mittels Immunhistochemie analysiert. Dazu wurden von den Paraffinblöcken 4µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und auf Objektträger übertragen. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem „Vectastain-Elite-ABC-Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich wurden im Klinikum Großhadern von jeder Resektion Hämatoxylin/Eosin Färbungen angefertigt, wobei die Zellkerne durch das Hämatoxylin blau und das Zytoplasma durch Eosin rosa gefärbt wurden. Diese Färbetechnik ermöglichte eine genauere Charakterisierung des Gewebes, bei der das invasive Karzinom vom umliegenden gesunden Gewebe deutlich abgegrenzt werden konnte.

Um die Spezifität des Anti-FGFR4-Antikörpers (Santa Cruz) zu bestätigen, wurde zusätzlich zu den mit Antikörper allein behandelten Proben (Abb. 9A) ein gegen diesen gerichtetes „*blocking-peptide*“ eingesetzt. Die Aminosäuresequenz des Peptids entsprach dabei der Bindungsstelle des Antikörpers am Protein, wodurch dieser bei Spezifität und Peptidüberschuss nicht mehr an endogenem FGFR4 binden konnte und eine Färbung des Gewebes somit unterblieb (Abb. 9B).

Alle Schnitte wiesen eine sehr starke Färbung der Myocyten aus Arteriolen und Venen auf, die daher im folgenden bei der Graduierung der FGFR4-Expression als interne Kontrolle dienten. Ferner konnte eine starke Färbung der Skelettmuskulatur (Abb. 9D), sowie eine schwache bis mäßige Färbung in Fibroblasten und in den Speicheldrüsen beobachtet werden (Abb. 9C). Entsprechend der Intensität der Färbungen im Bereich des invasiven Tumorgewebes wurden Tumore in solche mit starker, mittlerer und schwacher Expression graduiert.

Abb. 9E gibt ein Beispiel für starke FGFR4 Expression, in Abb. 9F hingegen ist ein Tumor mit schwacher FGFR4-Expression zu sehen. Insgesamt zeigten von den 109 untersuchten Plattenepithelkarzinomen 17 eine hohe, 59 eine mittlere und 28 eine niedrige Expression



**Abb. 9: Immunhistochemische Analyse des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen.** Gewebeschnitte von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen wurden mit Anti-FGFR4-Antikörper immunhistologisch angefärbt (A-F). Die Zellgegenfärbung erfolgte anschließend mit Eosin. In A und B wurde die Spezifität des Antikörpers mit einem „blocking-peptide“ nachgewiesen. C, D zeigt die Expression des FGFR4 in Arteriolen und Venen (C) sowie in der Muskulatur (D). E und F zeigen Beispiele für eine starke (E) und schwache (F) Expression des FGFR4. Die Aufnahmen wurden mit 20- oder 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

### 3.1.3 Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumorprogression

Die weit verbreitete Expression des FGFR4 in Karzinomen der Mundrachenhöhle und des Oropharynx lassen eine Beteiligung dieser Rezeptortyrosinkinase in der Tumorentwicklung vermuten. Zudem wurde das Auftreten des Arg388 Allels dieser Kinase mit einer schlechteren Prognose bei Brust- und Darmkrebspatienten in Verbindung gebracht (Bange *et al.*, 2002). Um die Rolle des FGFR4 und insbesondere des Arg388 Allels in der Progression von Plattenepithelkarzinomen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Genotypisierung und der Expressionsanalysen mit den klinische Patientendaten verglichen. Diese setzen sich aus dem TNM Status (Tumorgröße; Nodal- oder Lymphknotenstatus; Metastasenstatus), der Überlebenszeit und dem Differenzierungsgrad des Tumors zusammen. Die Tumorstadieneinteilung wird von I-IV gewichtet. Bei der Karzinomgraduierung wird zwischen wenig sowie undifferenzierten (G3,4) und moderat bis gut ausdifferenzierten Tumoren (G1,2) unterschieden. Je undifferenzierter dabei das Gewebe eines Tumors ist, umso größer ist seine Wachstumsgeschwindigkeit und Bösartigkeit.

#### Plattenepithelkarzinome

FGFR4 Allele		Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg
Durchschnittsalter (Jahre)		56	57	54
Geschlecht	M	36 (80%)	35 (76%)	13 (100%)
	F	9 (20%)	11 (24%)	
Stadium	I	6 (13%)	7 (15%)	1 (8%)
	II	7 (16%)	3 (7%)	2 (15%)
	III	7 (16%)	9 (20%)	2 (15%)
	IVA	19 (42%)	26 (57%)	8 (61%)
	IVB	6 (13%)	1 (2%)	
Differenzierung	1	1 (2%)	2 (4%)	
	2	25 (56%)	22 (48%)	4 (31%)
	3	19 (42%)	22 (48%)	9 (29%)
FGFR4 Expression	gering	10 (22%)	12 (26%)	6 (46%)
	mittel	28 (62%)	25 (54%)	6 (46%)
	hoch	7 (16%)	9 (20%)	1 (8%)

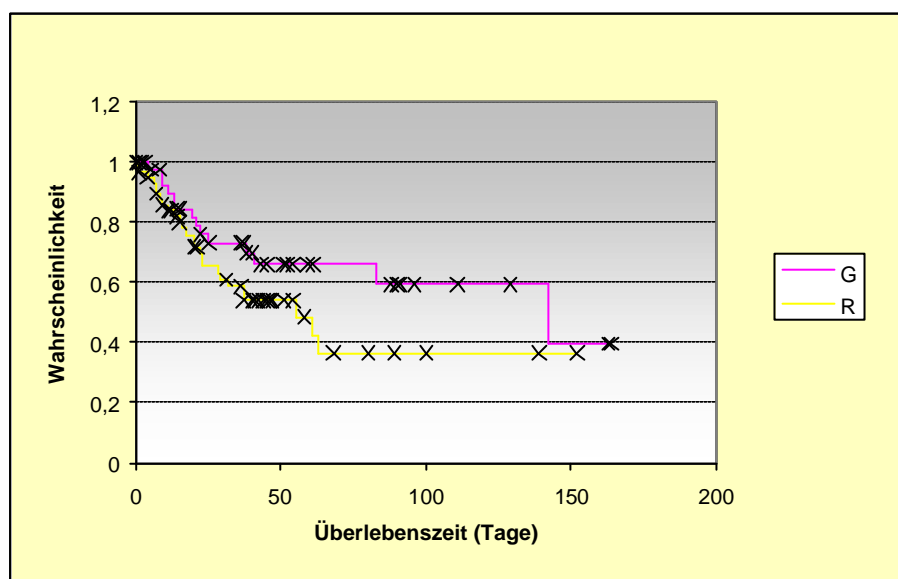
**Tab. 1: Zusammenfassung zwischen den FGFR4 Genotypen und klinischen Parametern.** Das Stadium umfasst die Tumorgröße, den Lymphknotenbefall und Fernmetastasen (gemäß UICC).

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der FGFR4-Genotypen in den Plattenepithelkarzinomen in Korrelation zu den verschiedenen klinischen Prognosefaktoren, deren Bestimmung am

Klinikum Großhadern gemäß den Richtlinien der UICC (*Union Internationale Contre Le Cancer*) durchgeführt wurde.

In dem hier zugrundeliegenden Kollektiv konnte dabei keine statistisch bedeutsame Korrelation zwischen Genotyp und Expression mit klinischen Parametern wie Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad gefunden werden.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Arg388 Allels auf das Überleben der 104 Patienten untersucht, wobei 40 Personen diese Kollektivs innerhalb der Beobachtungszeit verstarben. Dazu wurde die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der FGFR4 Allel-Verteilung in einem Diagramm nach Kaplan-Meier aufgetragen und die statistische Signifikanz durch einen Log-Rank Test berechnet. Dabei konnte zwar die Tendenz zu einer schlechteren Prognose für Patienten mit dem Arg388 Allel beobachtet werden, allerdings war diese noch nicht statistisch signifikant (Abb.10).

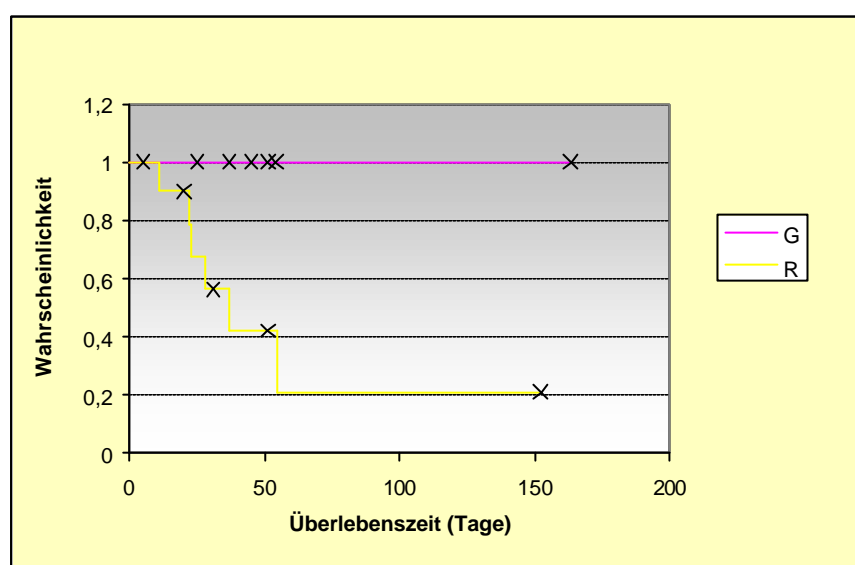


**Abb. 10: Log-Rank Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Karzinomen des Plattenepithels in Abhängigkeit zur FGFR4 Allelverteilung.** In der Gruppe der 59 Patienten mit mindestens einem Arg388 Allel gab es 26 Todesereignisse, während in der Gruppe der 45 Patienten mit ausschließlich dem FGFR4 Gly388 Allel 14 Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben. G: FGFR4 Gly Allel, n=45; R: FGFR4 Arg Allel, n=59.

Daraufhin wurden die Patienten nach der Stärke ihrer FGFR4 Expression unterteilt und klinische Parameter in Patienten mit hoher Rezeptorexpression untersucht, da in dieser Gruppe der größte Einfluss des FGFR4 zu erwarten ist. Die Gegenüberstellung des Genotyps



mit dem Tumorstadium in dieser Gruppe (n=17) ergab für alle Patienten mit mindestens einem Arg388 Allel ein fortgeschrittenes Tumorstadium (p=0.023). Dabei wurden die frühen Stadien I und II, die noch keinen Lymphknotenbefall aufweisen und die fortgeschrittenen Stadien III, IVA und IVB zusammengefasst. Weiterhin zeigte die Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten, dass nur Patienten mit dem Arg388 Allel innerhalb des Beobachtungszeitraumes starben (Abb.11). Dazu wurde die Überlebenszeit in Abhängigkeit der FGFR4-Allelverteilung in einem Diagramm nach Kaplan-Meier aufgetragen, wobei sich ein p-Wert von 0.032 ergab.



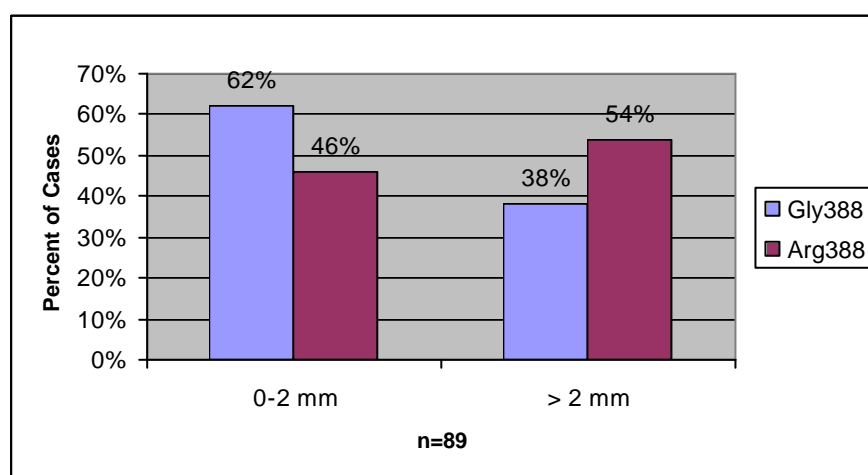
**Abb. 11: Kaplan-Meier Diagramm: Die Beziehung zwischen FGFR4 Allelen und dem rezidivfreien Überleben.** 17 Patienten mit einer starken FGFR4 Expression wurden für die Log-Rank Statistik herangezogen. Von den 10 Patienten mit einem Arg Allel starben 6 im Beobachtungszeitraum, wohingegen alle 7 Patienten mit dem Gly Allel den Beobachtungszeitraum überlebten.

Die hier präsentierten Untersuchungsergebnisse belegen, dass die Sequenzvariante Arg388 des FGFR4 mit einer deutlich beschleunigten Tumorprogression und einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht. Diese Befunde zeigen weiterhin, dass das FGFR4 Arg388 Allel neben Brust- und Darmkrebs auch in Plattenepithelkarzinomen eine Rolle spielt. Da die Bedeutung des Arg388 Allels auch in anderen Tumortypen bekräftigt werden konnte, macht deutlich, dass die hier gezeigten Beobachtungen nicht auf einem methodischen Fehler bei der Probenauswahl zurückzuführen sind. Auch wurde die

Beurteilung der immunhistochemischen Befunde der Primärtumoren von einem Pathologen bestätigt, so dass auch hier Fehler ausgeschlossen werden können.

#### 3.1.4 FGFR4 ist ein prognostischer Faktor in Melanomen

Um der Frage nachzugehen, ob das FGFR4 Arg388 Allel in noch weiteren Tumortypen zu einer stärkeren Tumorprogression beitragen kann, wurde die genomische DNA aus Paraffinschnitten eines Kollektivs von 89 Melanomen isoliert und mittels PCR-RFLP (2.2.13.1; 2.2.13.3) der FGFR4 Genotyp bestimmt. Die Paraffinschnitte wurden von der Dermatologischen Klinik in München zur Verfügung gestellt. Ähnlich wie bei den Plattenepithelkarzinomen gilt der TNM-Status (gemäß der UICC) als aussagekräftiger Faktor zur Tumorstadieneinteilung. In früheren Studien wurde gezeigt, dass dabei vor allem die Tumordicke ein wichtiger prognostischer Faktor für die Überlebensrate ist (Volkenandt *et al.*, 1999). Allgemein wurden dabei Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als 0.5 mm in einer Gruppe zusammengefasst, Tumore der Größe 0.5-2 mm bilden eine zweite Gruppe, der schließlich noch die dritte Gruppe mit Tumoren von mehr als 2 mm Durchmesser gegenübergestellt wird.

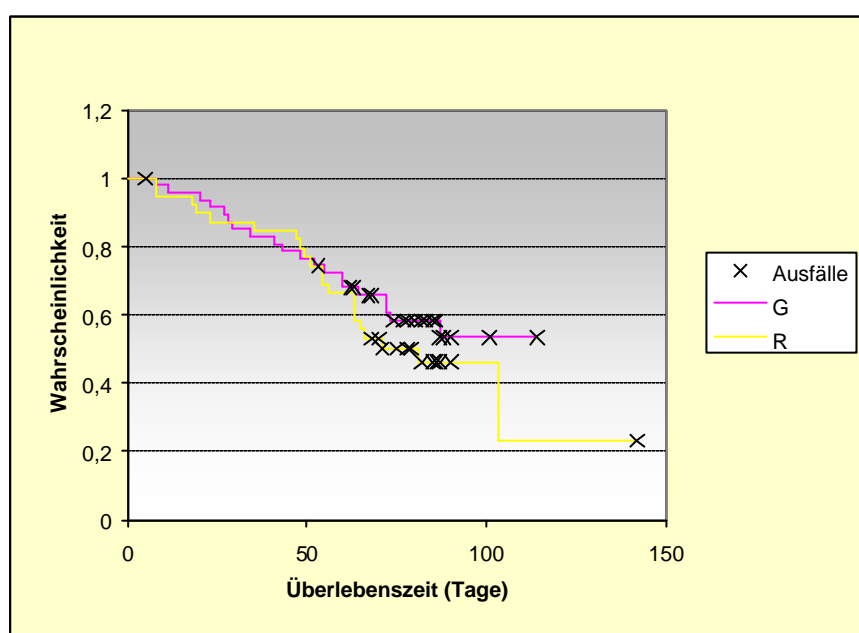


**Abb. 12: Das FGFR4 Arg388 Allel steht in Beziehung zu der Dicke von Melanomen.** In Paraffinschnitten von 89 primären Tumoren wurde die Dicke festgestellt und in drei Klassen eingeteilt (siehe oben). Zur Auswertung wurden die Tumore bis 2 mm zusammengefasst und den Tumoren über 2 mm gegenübergestellt.

Diese und andere Parameter sowie die Klassifizierung wurden an der Dermatologischen Klinik bestimmt und konnten für die hier erstellte Analyse verwendet werden. Die Verteilung der beiden FGFR4 Allele im Verhältnis zur Tumordicke ist in Abbildung 12 graphisch

dargestellt. Patienten mit einem Tumor von bis zu 2 mm Größe wiesen weitgehend das Gly388 Allel auf. Patienten hingegen mit Tumoren, die eine Dicke von 2 mm bereits überschritten und daher als besonders aggressiv und mit schlechter klinischer Prognose gelten, wurden zum Großteil als Träger des Arg388 Allels identifiziert.

Das verstärkte Auftreten des FGFR4 Arg388 Allels in Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium legte die Vermutung nahe, dass diese Patienten auch eine deutlich reduzierte Überlebenszeit haben. Durch eine Kaplan-Meier Kurve und einen Log-Rank Test wurde diese Hypothese überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 13 wiedergegeben.



**Abb. 13: Log-Rank Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Melanomen in Abhängigkeit zur FGFR4 Allel Verteilung.** In der Gruppe der 40 Patienten mit Arg388 gab es 21 Ereignisse, während in der Gruppe der 49 Patienten mit einem FGFR4 Gly388 Allel 21 Ereignisse vorgekommen sind. G: FGFR4 Gly Allel, n=49; R: FGFR4 Arg Allel, n=40.

Es zeigte sich, dass Patienten mit einem FGFR4 Arg388 eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben. Allerdings erreichte die statistische Analyse der 89 Patienten nicht die Signifikanz-Grenze von 0.05. Um eine statistisch signifikante Aussage machen zu können, muss daher die Anzahl der zu untersuchenden Patienten erhöht werden. Die Ergebnisse belegen aber, dass das FGFR4 Arg388 auch in anderen Tumortypen zur Tumorprogression beitragen kann.

### 3.2 Analyse des FGFR4 Arg388 Allels *in vivo*

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die FGFR4-Form mit einem Arginin an Position 388 und damit im Bereich der Transmembrandomäne (TM) einen Einfluss nicht nur auf die Entwicklung von Brust- und Darmkrebs, sondern auch auf die Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen und Melanomen hat. Zudem konnte für Arg388 Allel exprimierende Brustkrebszelllinien gegenüber Zellen, die das Glycin Allel exprimieren, eine erhöhte Migrationsfähigkeit beobachtet werden (Bange *et al.*, 2002). Im folgenden sollte daher nun die Funktion dieses FGFR4 Arg Allels im lebenden Organismus untersucht werden. Hierzu sollte ein dem humanen FGFR4 Arg388 Allel entsprechendes Maus-Derivat erzeugt und anstelle des endogenen FGFR4 Gly388 Allels in das Mausgenom eingefügt werden, ohne dabei die Struktur des murinen Genlokus zu verändern. Da der Polymorphismus sehr wahrscheinlich nicht alleine für den Austausch einer Krebserkrankung ursächlich ist, sollten die so generierten Mäuse mit etablierten, bereits allein Tumore bildenden Transgenen gekreuzt werden.

#### 3.2.1 Genotypisierung von verschiedenen Maus-Stämmen

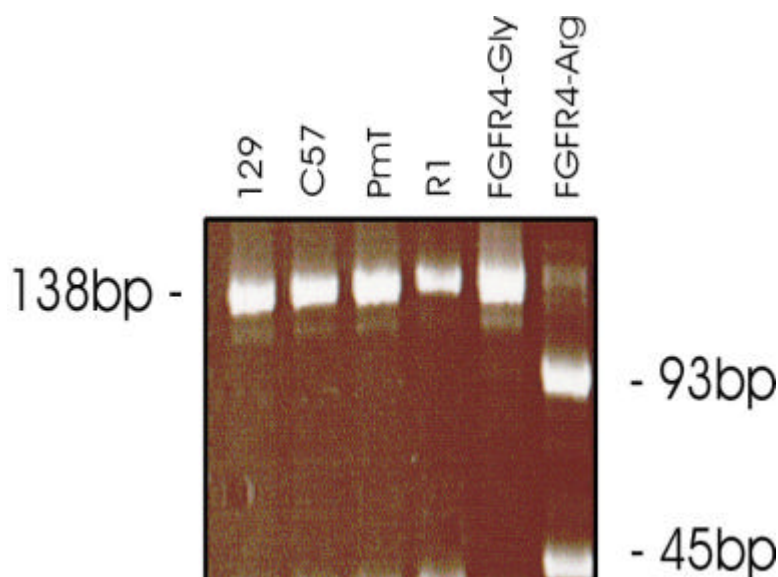
Um festzustellen, ob der FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus auf den murinen Rezeptor übertragen werden kann, wurde zunächst die Homologie der Proteinsequenz beider Spezies überprüft. Abbildung macht deutlich, dass die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne beider Rezeptoren zu 88% identisch sind.

<b>hFGFR4</b>	TAAAPE ARYTDIILYA SGSLALAVLL LLAGLYRGQA
<b>mFGFR4</b>	TTATPE ARYTDIILYV <u>SGSLVLLVLL LLAGVYHRQV</u>
	<b>TM</b>

**Abb. 13: Sequenzvergleich des humanen mit dem murinen FGFR4.** Die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des humanen FGFR4 ist zu 88% identisch mit der des murinen Rezeptors. hFGFR4: humaner FGFR4, mFGFR4: muriner FGFR4, TM: Transmembrandomäne.

Der murine FGFR4 besitzt dabei an gegenüber dem humanen Rezeptor vergleichbarer Stelle ein Glycin (Position 380 in der Maus), womit die Möglichkeit, dieses Glycin gegen ein Arginin auszutauschen, gegeben war.

Als nächstes musste überprüft werden, ob der Polymorphismus auch in Mäusen bereits natürlicherweise vorkommt. Dazu wurde die genomische DNA aus der Schwanzspitze zweier gängiger Mausstämme, 129 und C57BL/6, sowie der für das Onkogen PmT (*Polyomavirus-midlle T-antigen*) transgenen Maus isoliert (2.2.13.2). Auch wurde die genomische DNA der ES-Stammzelllinie R1 gewonnen und analysiert. Da im murinen Gen der entsprechende Nukleotidaustausch ebenfalls zu einer neuen Restriktionsschnittstelle für das Enzym MvaI führt, konnte auch hier die Genotypisierung mittels PCR-RFLP durchgeführt werden. Dazu wurde ein 138 bp großes Fragment durch PCR amplifiziert und mit dem Enzym MvaI verdaut. Der gesamte Ansatz wurde anschließend über ein nicht-denaturierendes 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt.



**Abb. 14: Genotypisierung mehrerer Maus-Stämme.** Genomische DNA wurde mittels PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym MvaI verdaut. Das Vorhandensein des Arg Allels in der Transmembrandomäne sollte das 138 bp große PCR-Produkt in ein 93 bp und ein 45 bp großes DNA-Fragment schneiden. Als Kontrolle dienten Plasmide mit dem murinen FGFR4 mit dem Glycin oder dem Arginin Allel.

Bei Vorliegen des Polymorphismus würde das 138 bp große PCR-Produkt diese eine MvaI-Schnittstelle aufweisen und zu zwei Fragmenten der Länge 93 und 45 bp verdaut werden. Dies wurde für das PCR-Produkt eines Kontrollplasmids gezeigt, welches die Kodierungssequenz für die Arg-Form des murinen FGFR4 trägt (Abb. 14, Spur 6). Im Fall des Kontrollplasmids mit murinem FGFR4-Glycin-Allel (Abb. 14, Spur 5) wie auch der verschiedenen Mausstämme und der ES-Stammzelllinie blieb das 138 bp-Fragment hingegen unverdaut (Abb. 14, Spuren 1-4). Diese Ergebnisse, die durch Sequenzierungen bestätigt

wurden, lassen erkennen, dass den untersuchten Mausstämmen ausschließlich das FGFR4-Glycin-Allel zugrunde liegt.

#### 3.2.2 Expressionsanalyse des murinen FGFR4 in Brusttumoren von transgenen Mäusen

Zur Etablierung eines geeigneten Maus-Modells musste weiterhin die Expression des FGFR4 in Maustumoren untersucht werden, da nur in FGFR4-exprimierenden Geweben eine Rolle des Rezeptors bei der Tumorentwicklung zu erwarten ist. Aufgrund der oben bereits erwähnten Bedeutung des FGFR4 Arg388 Allels in Zusammenhang mit Tumorprogression von Brustkrebspatienten sowie erhöhte Migrationsfähigkeit von Brustkrebszelllinien (siehe 3.2) standen insbesondere Brusttumoren im Fokus des Interesses. Es wurden daher Tumore von Mausstämmen untersucht, deren Transgen -HER2 oder andere Onkogene- unter der Kontrolle von gewebsspezifischen Promotoren gestellt und daher nur im Bereich des alveolären Brustepithels exprimiert wurde. (Muller *et al.*, 1988, Humphreys *et al.*, 2000, Baribault *et al.*, 1997, Shackelford *et al.*, 1993, Li *et al.*, 2000).



**Abb. 15: Expression von FGFR4 in murinen Brusttumoren transgener Mäuse.** Die Expression des murinen FGFR4 wurde auf mRNA-Ebene durch PCR-Amplifikation von cDNA ermittelt. Die gleichen cDNA-Proben wurden für die Analyse des „housekeeping“-Gens EF-2A eingesetzt.

Die Expressionsstärke wurde auf RNA-Ebene mittels Reverser-Transkriptase PCR (RT-PCR) gemessen. Hierzu wurde Total-RNA aus den Tumoren isoliert und in cDNA umgeschrieben (2.2.10.4). Als Kontrolle wurden die gleichen cDNA-Proben für die Analyse des „housekeeping“-Gens EF-2A eingesetzt. Die Ergebnisse dieser RT-PCR sind in Abb. 15 zu sehen.

Dabei ließ sich die Bande des murinen FGFR4 in den Brusttumoren von MMTV-neu, TGF $\alpha$ /Wnt, PmT und SV40-Tag, nicht aber in Wnt-transgenen Mäusen detektieren. Mäuse erstgenannter Gruppe eignen sich daher zur Kreuzung mit FGFR4 Arg Allel exprimierenden Tieren, um so dessen Bedeutung für die Progression von Brusttumoren zu unterscheiden. Die starke Expression in Lunge sowie das mäßige Vorkommen in Milz und Leber stimmen mit früheren Untersuchungen an humanem Fetus und adultem Organismus überein (Hughes *et al.*, 1997; Partanen *et al.*, 1991).

### 3.3.3 Etablierung eines FGFR4 Arg388 knock-in Maus-Modells

Um die Rolle des FGFR4 Arg388 Allels näher zu untersuchen, sollte ein Maus-Modell erstellt werden, das an Stelle des Glycin Allels ein Arginin Allel in der Transmembrandomäne trägt. Dazu sollte weder die Struktur des Gens noch die Expression des murinen Rezeptors verändert werden.

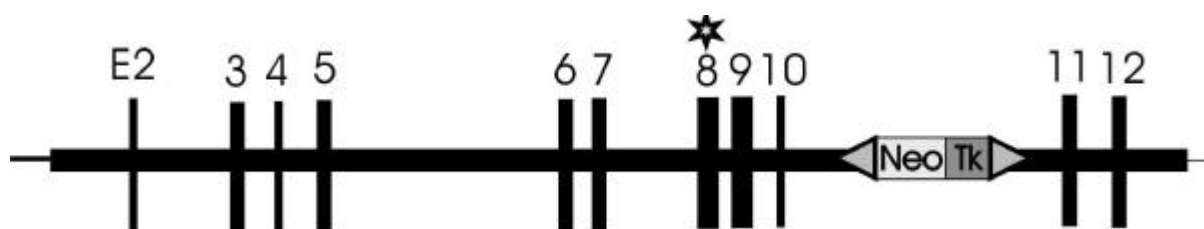
#### 3.2.3.1 Generierung des *Gene-Targeting* Konstruktes

Für die gezielte Veränderung der Primärstruktur von murinen Genen musste zunächst der zu untersuchende genomische Locus kloniert, die Exon-Intron-Struktur ermittelt und eine Restriktionskartierung durchgeführt werden. Die genomische Struktur des murinen FGFR4 war zu dieser Zeit größtenteils in der Datenbank *Celera* publiziert. Noch fehlende Nukleotidabschnitte sollten durch eigene Sequenzierungen vervollständigt werden.

Der murine FGFR4 Locus umfasst 18 Exons, wobei sich die Transmembrandomäne auf Exon 8 befindet. Um ein genomisches Fragment des Rezeptors zu erhalten, wurde mittels eines cDNA-Fragments, welches als Gensonde die Exons 8 bis 10 abdeckte, eine PAC-Bank untersucht (*RPCI mouse PAC library 21*). Fünf von den sieben hier als positiv erscheinenden Klonen wurden bestellt. Nach nochmaliger Hybridisierung im Southern Blot erwiesen sich zwei als positiv und wurden weiterverwendet (Daten nicht gezeigt).

Das Klonierungskonstrukt ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Das genomische FGFR4 Fragment wurde mit den Enzymen SpeI und SacII geschnitten und in einen pBS-Bluescript SK+ Vektor inkloniert. Das Fragment hatte eine Größe von 12.5 kb und umfasste die Exons 2-12. Die Aminosäure Glycin in der Transmembrandomäne auf Exon 8 wurde durch gezielte Mutagenese (2.2.7) in ein Arginin überführt. Die Selektionskassette, die von zwei loxP-Stellen flankiert war, wurde zwischen Exon 10 und 11 in die ScaI-Schnittstelle

kloniert. Sie kann somit bei Bedarf durch das Verpaaren mit Cre-transgenen Mäusen über das Cre-loxP-Rekombinationssystem aus dem Coliphagen P1 entfernt werden (Abremski *et al.*, 1981). Die Kasette wurde dabei so positioniert, dass sie sich nicht in näherer Umgebung der Verzweigungsstelle für das Spleißen befand. Dieses Konstrukt wurde in ES-Zellen eingebracht, um auf heterozygote ES-Zellklone selektionieren zu können.



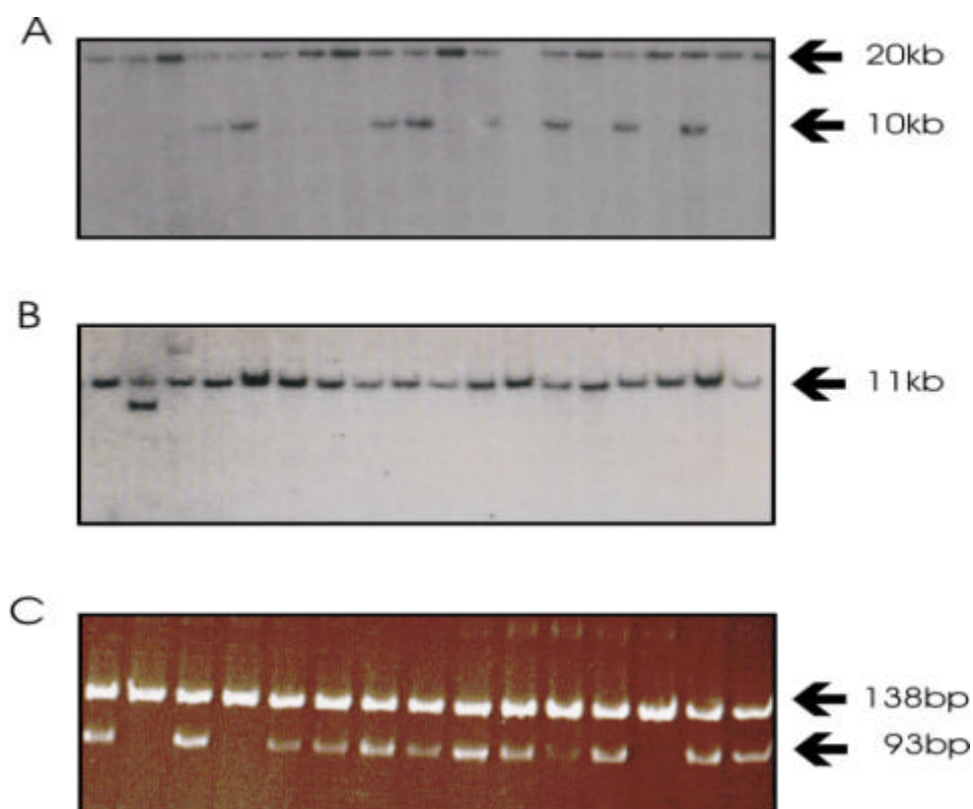
**Abb. 16: FGFR4 Arg388 knock-in Gene-Targeting Konstrukt.** Zwischen den Exons 10 und 11 wurde die Selektionskasette platziert. Diese ist von zwei loxP-Stellen für die spätere Deletion durch Kreuzung mit Cre-exprimierenden transgenen Mäuse flankiert. Neo: Neomycin-Resistenzkasette; TK: Thymidin-Kinase-Kasette; \*: Bereich der Transmembrandomäne.

#### 3.2.3.2 ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion

Das in 3.2.3.1 beschriebene *Targeting*-Konstrukt wurde linearisiert und mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht. Es wurden 360 Einzelzellklone gepickt und hinsichtlich homologer Rekombination analysiert. Die Frequenz der korrekten homologen Rekombination, gemessen mit einer 5'-externen Probe, lag bei 15% der im Southern Blot getesteten Einzelklone (Abb.17A). Positive ES-Zellklone wurden expandiert. Zufällige, illegitime Integrationen konnten durch eine Sonde, bestehend aus dem Gen für die Neomycin-Phosphotransferase ausgeschlossen werden (Abb.17B). Der Genotyp der positiven ES-Klone wurde noch einmal durch PCR-RFLP von genomischer DNA getestet (Abb. 17C).

Die Blastozysteninjektion wird als Serviceleistung am Institut durchgeführt, da der Erfolg der Injektion und der damit verbundenen Transfers in pseudoschwangere Empfängermäuse von professioneller Handhabung abhängt.





**Abb. 16: Analyse der ES-Zellklone.** (A) Exemplarisch ist hier die Southern Blot Analyse von hemizygoten ES-Zellklonen (zwei Fragmente) gezeigt, wobei die homologe Rekombination mit einer 5'-Probe verifiziert wurde. (B) Positiv rekombinierte ESA-Zellklone wurden zusätzlich mittels Southern Blot auf illegitime Rekombination mit einer Neomycin-Probe getestet. (C) Die Genotypisierung erfolgte über PCR-RFLP, wobei positive Klone ein zusätzliches Fragment mit einer Größe von 93bp erhalten.

Dabei werden aus superovulierten C57BL/6 Spendermäusen 2,5 Tage p.c. Blastozysten isoliert und jeweils 15 bis 20 manipulierte, hemizygoten ES-Zellen in deren Blastocoel mikroinjiziert. Etwa 16 bis 20 mikroinjizierte Blastozysten werden dann bilateral in die Uteri von pseudoschwangeren Empfängerinnen 2,5 p.c. transferiert. Nach 19 Tagen Trächtigkeit und einer weiteren Woche nach der Geburt kann der Anteil der manipulierten ES-Zelllinie an den Chimären abgeschätzt werden. Die männliche E14 ES-Zelllinie ergibt im Gegensatz zur schwarzen Fellfarbe der C57BL/6 Empfängerembryos eine bräunliche Färbung des Fells (Chinchilla). Nach weiteren 6 bis 7 Wochen sind die Mäuse fortpflanzungsfähig und können auf Keimbahntransmissivität getestet werden. Vier unabhängige ES-Zellklone, die von der E14 ES-Zelllinie abstammten, wurden in Blastozysten mikroinjiziert. Aus allen injizierten Klonen ergaben sich Tiere mit hochprozentigem Chimärismus.

### 3.2.3.3 Chimärenanalyse

Die Chimären wurden bei Erreichen der Geschlechtsreife mit C57BL/6 Tieren gepaart und die Nachkommen auf ihre Fellfarbe kontrolliert. Da das Allel (A) für die Fellfarbe der E14 ES-Zelllinie, die ursprünglich aus dem Mausstamm 129/Ola etabliert wurde (Hooper *et al.*, 1987), dominant gegenüber dem Allel der C57/BL6 (a) ist, sind nur die Nachkommen mit der Chinchilla-Fellfarbe potenziell heterozygote Mäuse. Die Fellfarbe lässt aber noch keine Aussage darüber zu, ob eine Chimäre während der Rückkreuzung mit C57BL/6 Mäusen das veränderte Allel in die Keimbahn transmittiert bzw. transmittieren kann. Statistisch zu erwarten tragen 50% der Nachkommen mit Chinchilla-Fellfarbe das veränderte Allel und 50% das Wildtyp-Allel aus den ES-Zellen. Es hat sich auch gezeigt, dass weibliche, hochprozentige Chimären zumeist keine Keimbahntransmission erlauben, da die für das *Gene-Targeting* verwendeten ES-Zellen einen männlichen Genotyp besitzen. Damit über weibliche Chimären Keimbahntransmission erreicht wird, muss das Y-Chromosom verloren gegangen und das X-Chromosom verdoppelt worden sein.

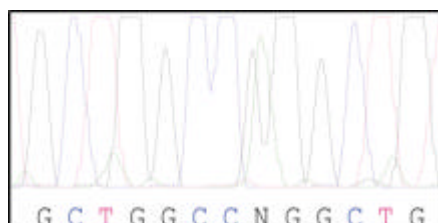
Das Rückkreuzen der annähernd hundertprozentigen Chimären resultierte in der Geburt von Nachkommen mit Chinchilla Fellfarbe. Diese wurden mittels PCR-RFLP genotypisiert. Das Rückkreuzen ergab bislang nur Nachkommen, die vom C57/BL6 Empfänger-Genotyp abstammen.

## 3.3 Untersuchungen von genetischen Veränderungen in Brustkrebs

In den vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure einen deutlichen Einfluss auf das Fortschreiten einer Krankheit haben kann. Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms rücken dessen Variabilität sowie funktionelle genetische Untersuchungen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Polymorphismen sind die häufigste Form von genetischen Veränderungen und werden sowohl in Studien als genetische Marker für Bevölkerungsvariation (Chakravarti *et al.*, 1999 und Chakravarti *et al.*, 1996) als auch im Kontext von Krankheiten untersucht (Lander *et al.*, 1996 und Kruglyak *et al.*, 1997). Sie dienen weiterhin als direkte funktionale Varianten in genetisch komplexen Erkrankungen wie Krebs (Collins *et al.*, 1997 und Risch *et al.*, 1996). Mit den folgenden Experimenten sollten weitere genetische Veränderungen identifiziert werden, die mit Brustkrebs in Verbindung stehen. Dabei wurden vor allem solche Gene analysiert, die im Rahmen der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen.

### 3.3.1 Vereinigung von cDNA aus mehreren Brustkrebszelllinien

Um in Korrelationsstudien für komplexe Erkrankungen zu aussagekräftigen Befunden zu gelangen bedarf es der Genotypisierungen von Proben in möglichst großem Maßstab (Sham *et al.*, 2002). In den folgenden Untersuchungen wurde daher, ausreichende Verfügbarkeit vorausgesetzt, cDNA von 19 Brustkrebszelllinien zur Analyse herangezogen. Diese erfolgte aufgrund der hohen Genauigkeit mittels direkter Sequenzierung. Um die Analysen zu beschleunigen, sollte versucht werden, nicht individuelle DNA-Proben zu untersuchen, sondern die DNA mehrerer Zelllinien vor der Amplifikation durch PCR zu vereinigen und die Gesamtheit der PCR-Produkte zu sequenzieren. Hierfür wurde zuvor anhand des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus ermittelt, wie viele Zelllinien maximal zusammengefasst werden können, um dennoch einen Basenaustausch in einer der Zelllinien detektieren zu können. Abbildung 18 zeigt das Sequenzierergebnis für einen Ausschnitt der FGFR4 Transmembrandomäne, wobei die cDNAs der Brustkrebslinien SKBr3, MDA-MB453 und MDA-MB-361 vor Durchführung der PCR vereinigt wurden.



**Abb. 18: „Pool“ von verschiedenen Brustkrebszelllinien.** Die cDNA dreier Zelllinien wurde vor der PCR zu gleichen Teilen gemischt und die PCR-Produkte anschließend sequenziert. Die Zelllinie MDA-MB-361 ist dabei heterozygot für den Gly388Arg Polymorphismus im FGFR4 Gen, wohingegen MDA-MB-453 und SKBr3 homozygot für das Arg388 Allel sind.

Die Zelllinien MDA-MB-453 und SKBr3 sind homozygot für das Gly388 Allel, MDA-MB-361 ist diesbezüglich heterozygot. Aus der Abbildung geht hervor, dass höchstens drei Zelllinien zusammengefasst werden dürfen, um genetische Veränderungen in noch einer Zelllinie durch Sequenzieren erfassen zu können. In den folgenden Untersuchungen wurden deshalb cDNAs von bis zu drei verschiedenen Zelllinien vor Durchführung des PCR-Amplifikationsschrittes vereinigt.

#### 3.3.2 Untersuchung von 13 Proteinen in 19 Brustkrebszelllinien auf genetische Veränderungen

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde eine Kollektion von 13 Genen ausgewählt, deren Proteine in Signalübertragungswegen eine wichtige Rolle spielen und daher auch im Rahmen von Krebserkrankungen durch genetische Veränderungen von Bedeutung sein könnten. Die analysierten Gene umfassen die Mitglieder der EGFR Familie, den IGF-1R, mig6, ein negativ Regulator des EGFR (Hackel *et al.*, 2001), die beiden Rezeptortyrosinphosphatasen LAR und PTP $\sigma$  sowie die zytoplasmatischen Tyrosinphosphatasen SHP-1, SHP-2 und PTP-1B. Fragmente von bis zu 900 bp Länge, die zusammen die gesamte Kodierungssequenz aller genannter Gene umfassen, wurden durch PCR amplifiziert und ausgehend vom jeweils entsprechendem PCR-Primer in beide Richtungen mit einem automatischen Einkapillar-Sequenzierer (ABI PRISM 310) sequenziert.

Insgesamt wurden in den 13 Genen 35 Polymorphismen und zwei Isoformen entdeckt. Von den 35 Polymorphismen führen 7 zu einem Aminosäureaustausch. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Da Polymorphismen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, auch funktionelle Modifikationen des Proteins zur Folge haben können, wurden vor allem diese im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert. Einer der beobachteten Polymorphismen entfällt auf die extrazelluläre Domäne des EGFR (Lys497Arg) und wurde erstmals 1993 von Moriai und Kollegen beschrieben. Im Bereich der Transmembrandomäne von HER2 führt ein Polymorphismus zum Austausch eines Valins zu einem Isoleucin (Val655Ile) (Papewalis *et al.*, 1991). In den Phosphatasen PTP $\sigma$  und SHP-2 wurden zwei bis dahin unbekannte Polymorphismen entdeckt. In PTP $\sigma$  liegt dieser im Kodon 1251 und hat den Übergang eines Histidins zu Glutaminsäure (His1251Glu) zur Folge, in SHP-2 wird infolgedessen im Bereich der SH2-Domäne ein Arginin durch ein Lysinrest (Arg47Lys) ersetzt. Drei Polymorphismen wurden im C-terminalen Bereich der Phosphatase PTP-PEST identifiziert und werden in einem späteren Kapitel näher beschrieben. In der zu PTP-PEST verwandten Phosphatase BDP-1 konnten zwei bis dahin unbekannte Isoformen entdeckt werden. Eine der Splicevarianten kodiert für eine um 320bp verkürzte Phosphatase, bei der trotz Fehlens der Exons 25 das katalytische Zentrum intakt bleibt. Die zweite Splicevariante entbehrt hingegen nur das zweite Exon, wird auf Grund einer Leserasterverschiebung jedoch nur als extrem verkürztes Protein ohne katalytisches Zentrum exprimiert ohne katalytisches Zentrum.

	<u>Kodierende Sequenz in bp</u>	<u>Stille Polymorphismen</u>	<u>Polymorphismen mit AS-Austausch</u>
EGFR	3,6	3	1
HER2	3,8	0	1
HER3	4	1	0
HER4	3,9	0	0
IGF-1R	4,1	2	0
Mig-6	1,4	1	0
LAR	5,7	7	0
PTP $\sigma$	5,8	7	1
PTP-1B	1,3	2	0
SHP-1	1,8	2	0
SHP-2	1,8	3	1
PTP-PEST	2,3	0	3
BDP-1	1,4	0	2 Isoformen

**Tab. 2: Analyse von 13 Genen auf Sequenzveränderungen.** Die untersuchte kodierende Region von 13 Genen in 19 Zelllinien umfasst etwa 800 Mb. Aufgeführt ist die Anzahl jener gefundenen Polymorphismen, die nicht zur Änderung der Aminosäure-(AS)sequenz führen (stille Polymorphismen), und solche, die den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben (Polymorphismen mit AS-Austausch).

### 3.3.3 Verteilung der EGFR- und HER2-Polymorphismen in Brust- und Plattenepithelkarzinomzelllinien

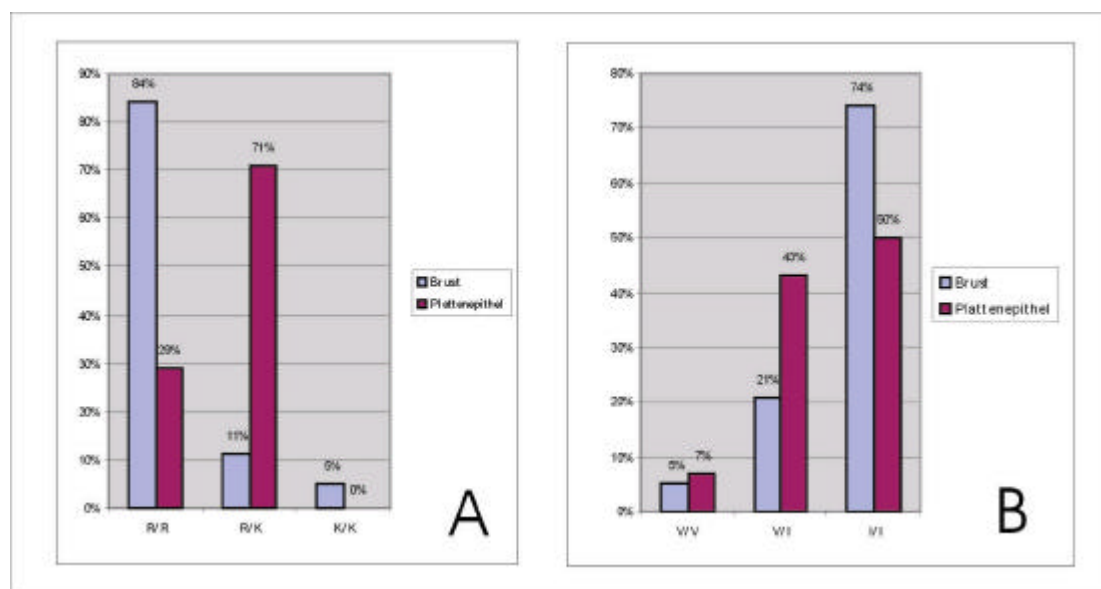
Zur näheren Charakterisierung jener Polymorphismen, die eine veränderte Aminosäuresequenz zur Folge haben, wurden alle 19 Brustkrebszelllinien noch einmal einzeln analysiert. Tabelle 3 fasst die Häufigkeiten der Polymorphismen in diesen Zelllinien zusammen.

	<u>Kodon</u>	<u>Domäne</u>	<u>AS-Austausch</u>	<u>Häufigkeit</u>
EGFR	497	Extrazelluläre Domäne	Arg →Lys	16%
HER2	655	TM-Domäne	Val→Ile	74%
PTP $\sigma$	1251	PTP-Domäne	His→Glu	5%
SHP-2	47	SH2-Domäne	Arg→Lys	5%

**Tab. 3: Häufigkeit der Polymorphismen welche die Aminosäure (AS) ändern in Brustkrebszelllinien.** Die Allel Verteilung wurde durch sequenzieren von 19 Zelllinien festgestellt. TM: Transmembrandomäne, PTP: Protein Tyrosin Phosphatase, SH2: src-homology2.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die oben gefundenen Polymorphismen auch in anderen Zelltypen vorkommen oder auf Brustkrebslinien beschränkt sind. Daher wurde eine Gruppe

von 14 Plattenepithelkarzinomzelllinien untersucht. Interessanterweise konnten nur die Polymorphismen in den Rezeptortyrosinkinasen, nicht aber in den Phosphatasen PTP $\sigma$  und SHP-2, gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass letztere entweder in Plattenepithelkarzinomen keine bedeutsame Rolle spielen oder aber die Anzahl der untersuchten Proben zu gering war.



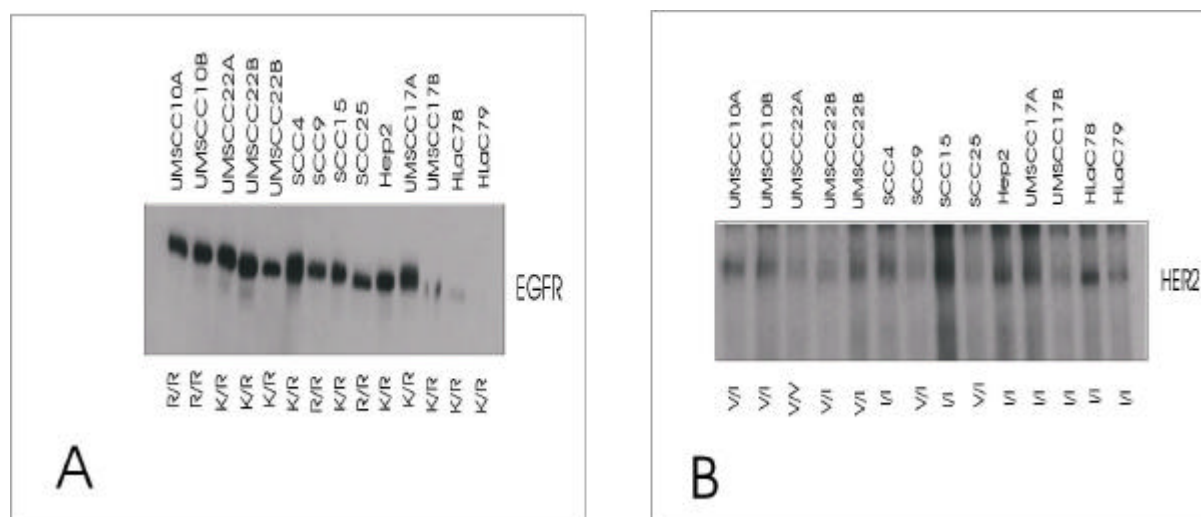
**Abb. 19: EGFR (Arg497Lys) und HER2 (Val655Ile) Allelverteilung in Krebszelllinien.** 19 Brustkrebs- und 14 Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden durch PCR-RFLP genotypisiert und die Häufigkeiten der entsprechenden EGFR- und HER2-Allele einander gegenübergestellt. R: Arg, K: Lys, V: Val, I: Ile

In Abbildung 19 wurde die Allelverteilung von EGFR (A) und HER2 (B) in den Brustkrebszelllinien mit der in den Plattenepithelkarzinomzelllinien verglichen. Dabei trat die Lysin-Variante des EGFR vor allem in Plattenepithelkarzinomzellen sehr gehäuft auf (74%), wohingegen der Polymorphismus von HER2 in beiden Gruppen etwa gleich stark vertreten ist.

#### 3.3.4 Expression von EGFR und HER2 in Plattenepithelkarzinomzelllinien

Da die Überexpression sowohl des EGFR als auch von HER2 in Plattenepithelkarzinomen mit einer schlechteren Prognose für die Patienten korreliert (Xia *et al.*, 1999 und Xia *et al.*, 1997), sollte die Rolle beider Rezeptoren bzw. Polymorphismen in entsprechenden Zelllinien näher untersucht werden. Im Falle des FGFR4 Gly388Arg Polymorphismen konnte gezeigt

werden, dass das FGFR4 Arg388 Allel verstärkt in Zelllinien mit hoher FGFR4-Expression auftritt (Bange *et al.*, 2002). Es sollte daher überprüft werden, ob ein derartiger Zusammenhang auch in Plattenepithelkarzinomzelllinien hinsichtlich des EGFR- und HER2-Polymorphismen gefunden werden kann. Dazu wurde die Expression beider Rezeptoren mittels Western Blot Analyse untersucht.



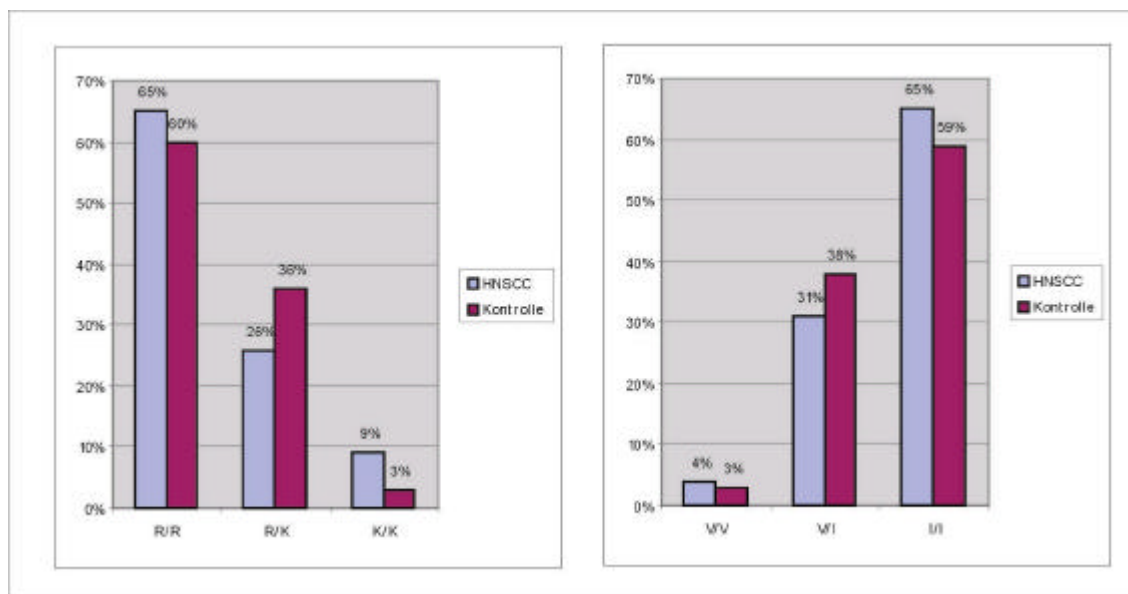
**Abb. 20: Expression von EGFR und HER2 in humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien.** Die Zelllinien wurden unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach der Lyse wurden Anti-EGFR- (A) und Anti-HER2- (B) Immunopräzipitate im Western Blot mit Anti-EGFR- bzw Anti-HER2-Antikörpern untersucht.

In Abbildung 20 sind die Expressionsmuster beider Rezeptoren zu sehen und durch die Genotypen ergänzt. Zwar wurden die Rezeptoren in einigen Plattenepithelkarzinomzelllinien stark exprimiert, es konnte jedoch keine Korrelation zwischen Expression und Genotyp nachgewiesen werden.

#### 3.3.5 Korrelation der EGFR und HER2 Genotypen mit klinischen Parametern bei Plattenepithelkarzinompatienten

Obwohl dem EGFR und HER2 infolge Amplifikation oder Überexpression eine wichtige Rolle in Plattenepithelkarzinomen zukommt, wurden Polymorphismen in diesem Tumoren noch nicht näher untersucht. Der HER2 Polymorphismus wurde bereits in Brustkrebspatienten mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Xie *et al.*,

2000), was für Blasen- und Darmkrebs jedoch nicht bestätigt werden konnte (Wang *et al.*, 2002, McKay *et al.*, 2002). Im Falle des EGFR wurde der Polymorphismus zwar in einigen pankreatischen Krebszelllinien und Tumorproben beobachtet (Moriai *et al.*, 1993), Studien, die diesen im Kontext von klinischen Parametern betrachten, wurden hingegen noch nicht durchgeführt.



**Abb. 21: Allel Verteilung des EGFR (Arg497Lys) und HER2 (Val655Ile) Polymorphismus in Plattenepithelkarzinompatienten und gesunden Individuen.** 100 Patienten mit Karzinomen des Plattenepithels der Mundrachenhöhle und 90 gesunde Individuen wurden mittels PCR-RFLP analysiert.

Um die Bedeutung dieser beiden Polymorphismen für die Progression von Tumoren des Plattenepithels näher zu charakterisieren, wurden 100 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundrachenhöhle (siehe oben) und 90 gesunde Individuen untersucht.

Die Genotypisierung beider Gruppen wurde mittels PCR-RFLP durchgeführt. Die Allelverteilung von Patienten und Kontrollen wurde in Abbildung 21 vergleichend dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die verschiedenen Allele bzw. Allelkombinationen von EGFR (A) und HER2 (B) in Patienten und Kontrollgruppe in etwa gleichem Ausmaß auftraten. Ein Einfluss jener Polymorphismen auf den Ausbruch der Erkrankung scheint daher eher weniger wahrscheinlich zu sein.

Auch die Untersuchung der Polymorphismen im Kontext klinischer Parametern führte zu keinen statistisch signifikanten Aussagen. Die Ile/Ile, Ile/Val und Val/Val Genotypen von HER2 traten in dieser Population mit einer Häufigkeit von 65%, 31% und 4% auf, wobei sich



keine Korrelation zwischen den Genotypen und dem Tumorstadium der Patienten ergab ( $p=0.72$ ), auch dann nicht, wenn Träger der Val/Val- und Val/Ile-Allelkombination zusammengefasst wurden ( $p=0.6$ ). Im Falle des EGFR betrug die Verteilung der Arg/Arg-, Arg/Lys- und Lys/Lys-Allelpaarungen 60%, 36% und 3%. Deren Korrelation mit dem Tumorstadium ergab einen  $p$ -Wert von 0.2, auch wenn die Genotypen mit einem oder zwei Lysin Allelen vereinigt wurden. Im Hinblick auf die Überlebenszeit der Patienten konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zum Lys497 Allel des EGFR ( $p=0.94$ ) bzw. dem HER2 Val655 Allel ( $p=0.13$ ) gefunden werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese beiden Polymorphismen zumindest in der hier betrachteten Population weder für den Ausbruch noch für die Progression von Plattenepithelkarzinomen verantwortlich sind. Sie wurden daher im folgenden nicht weiter untersucht.

#### **3.4 Analyse der neuen Sequenz-Varianten der PTP-PEST**

Eine Unterfamilie der zytoplasmatischen Tyrosinphosphatasen ist die PEST-Familie, bestehend aus den Mitgliedern BDP-1, PEP und PTP-PEST selbst. Diese Phosphatasen zeichnen sich durch eine gemeinsame Struktur aus, die neben einer N-terminalen katalytischen Domäne eine benachbart liegende, nichtkatalytische Domäne mit zahlreichen Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threoninresten umfasst. Der Prolin-reiche und hochkonservierte C-terminale Bereich der Mitglieder der PEST-Familie umfasst 20 Aminosäuren und wird als C-terminale Homologiedomäne (CTH) bezeichnet. PTP-PEST ist im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern ein ubiquitinär exprimiertes Protein. Die Prolin-reichen Sequenzen von PTP-PEST ermöglichen die Bindung der Phosphatase an  $p130^{Cas}$ , einem physiologischen Substrat von PTP-PEST, sowie an Paxillin, wodurch der Phosphatase eine mögliche Rolle bei der Regulation von Zell-Matrix-Kontakten, den sogenannten „*focal adhesions*“, Migration und Zytokinese zugeschrieben wird (Cote *et al.*, 1999, Angers-Loustau *et al.*, 1999, Shen *et al.*, 2000 und Garton *et al.*, 1999).

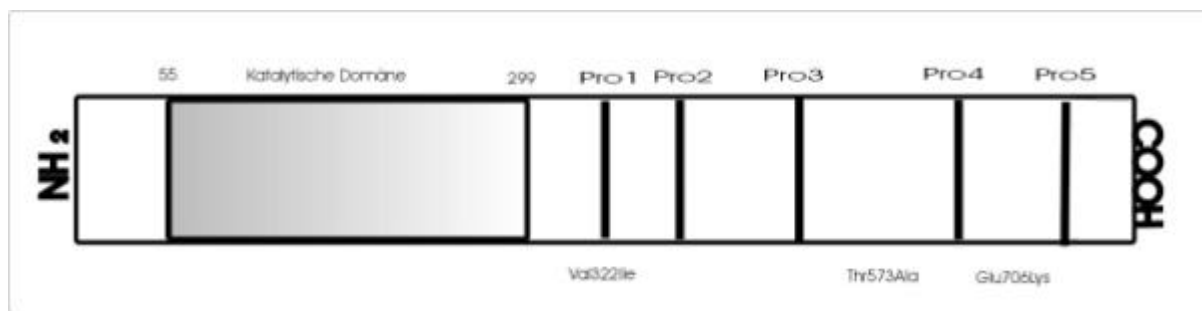
##### **3.4.1 Identifizierung der Val322Ile, Thr573Ala und Glu706Lys Polymorphismen im Gen von PTP-PEST**

Die Hypothese, dass Phosphatasen prinzipiell als Tumorsuppressoren wirken können, wurde vor einigen Jahren aufgestellt und geht auf die Beobachtung zurück, dass Phosphatasen als

Gegenspieler zu oftmals onkogenen Proteinkinasen auftreten (Li *et al.*, 1997; Parson *et al.*, 1998). Tatsächlich wurden für Phosphatasen kodierende Gene entdeckt, die in Tumoren durch somatische Mutationen inaktiviert wurden. Das wohl am besten charakterisierte Beispiel ist das Gen für die dual-spezifische Phosphatase PTEN/MMAC1, dessen Inaktivierung durch genetische Veränderungen beispielsweise in Melanomen, Glioblastomen, Prostata- und Lungentumoren entdeckt wurde (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997; Kohno *et al.*, 1998). Außerdem konnten Keimbahnmutationen in PTEN als Ursache einiger autosomal dominanter Krebsprädispositionen wie „Cowden Disease“ identifiziert werden (Liaw *et al.*, 1997; Nelen *et al.*, 1997; Eng, 1998; Kohno *et al.*, 1998).

In der zytoplasmatischen Phosphatase PTP-PEST wurden bislang drei genetische Veränderungen, die zu jeweils einem Aminosäureaustausch führten entdeckt. Einer dieser Polymorphismen wurde in verschiedenen Darmkrebszelllinien entdeckt, Hinweise auf funktionelle Veränderungen konnten jedoch nicht erbracht werden (Takekawa *et al.*, 1994). Die beiden anderen Polymorphismen wurden ohne weitere Beschreibung in eine Datenbank (PubMed) eingegeben.

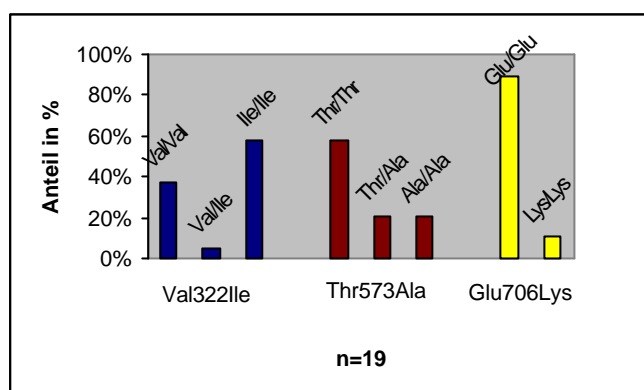
Um nach möglichen genetischen Veränderungen in dem PTP-PEST Gen im Zusammenhang mit Brustkrebs zu suchen, wurden entsprechende cDNAs diverser Brustkrebszelllinien sequenziert. Hierbei wurden drei Polymorphismen identifiziert. Einem liegt der Austausch von Guanidin zu Adenosin an Position 964 der Nukleotidsequenz von PTP-PEST zugrunde, wodurch das Kodon 322, welches für Valin steht, durch ein Isoleucin-Triplett ersetzt wird. Diese Änderung der Aminosäuresequenz ist bereits in oben genannter Datenbank beschrieben, weiterführende funktionelle Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Der zweite Polymorphismus weist an Position 1717 anstelle eines Adenosins ein Guanidin auf. Dies führt zum Austausch eines Threonins zu einem Alanin an Stelle 573 der Proteinsequenz. Im letzten Polymorphismus wird an Nukleotidposition 2116 ein Guanidin zu einem Adenosin überführt, wodurch der Austausch eines Glutaminsäurerestes durch ein Lysinrest an Aminosäureposition 706 herbeiführt. Die Positionen dieser drei Polymorphismen im Gen von PTP-PEST sind in Abb. 22 schematisch dargestellt.



**Abb. 22: Die Struktur der zytoplasmatischen Phosphatase PTP-PEST.** Die Zahlen beschreiben die Position der Aminosäuren. Nähere Erläuterungen zur Struktur finden sich im Text. Dargestellt sind die Positionen der Polymorphismen im C-terminalen Bereich.

### 3.4.2 Bestimmung des PTP-PEST Genotyps in verschiedenen Tumorzelllinien

Um die jeweilige Häufigkeit der genannten Polymorphismen zu ermitteln, wurde der Genotyp des PTP-PEST-Gens in 19 Brustkrebszelllinien bestimmt. Im Falle des Glu706Lys Polymorphismus erfolgte dies mittels Sequenzierung, für die beiden anderen Polymorphismen wurden Polymerase-Kettenreaktion Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP) Analysen durchgeführt. Letztere Art der Analyse war möglich, da im Falle des Val/Ile Austauschs ein zusätzliches Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym Bsp143I, im Falle der Thr573Ala Substitution eine Schnittstelle für das Enzym HpyCH4V gebildet wird. Unter Verwendung spezifischer Primer wurden kurze, die genannten Aminosäurepositionen umfassende DNA-Fragmente über PCR amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend mit dem jeweiligem Restriktionsenzym verdaut. Aufgrund der sich daraus ergebenden spezifischen Bandenmuster nach Auftrennung über ein 12%iges Polyacrylamidgel konnten die jeweiligen Allele identifiziert werden. Abbildung 23 fasst die Allelverteilung der 19 analysierten Brustkrebszelllinien zusammen.



**Abb. 23: Die Allelverteilung der PTP-PEST Polymorphismen (Val322Ile, Thr573Ala, Glu706Lys) in Brustkrebszelllinien.** cDNA der Zelllinien wurde mittels PCR-RFLP oder Sequenzierung untersucht.

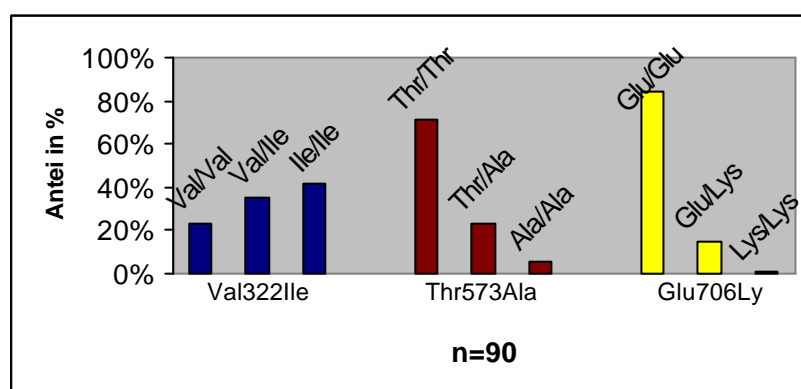
Um zu untersuchen, ob die oben beschriebenen Polymorphismen auch in anderen Tumortypen von Bedeutung sein können, wurde auf die gleiche Weise der PTP-PEST Genotyp von 14 Plattenepithelkarzinomzelllinien bestimmt. Dabei konnte folgendes festgestellt werden: Das Ile322 Allel trat in diesem Tumortyp mit etwa gleicher Häufigkeit (etwa 60%) wie in den Brustkrebszelllinien auf. Hingegen konnte das Ala573 Allel in nur einer der 14 untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien nachgewiesen werden, während es in 8 Brustkrebszelllinien zu finden war. Der Glu706Lys Polymorphismus trat in keiner analysierten Plattenepithelkarzinomzelllinien auf. Die Verteilung der hier ermittelten Genotypen unterschied sich somit teilweise erheblich von der der analysierten Brusttumorzelllinien. Auf Grund der geringen, nicht signifikanten Anzahl von Proben konnte aber noch keine abschließende Aussage über die allgemeine Verteilung der PTP-PEST Genotypen in diesen Tumortypen gemacht werden.

### 3.4.3 Verteilung der PTP-PEST Allele in Tumorpatienten und in gesunden Individuen

Das unterschiedliche Auftreten der PTP-PEST Ile322, Ala573 und Lys706 Allele in den getesteten Tumorzelllinien und die mögliche Rolle von PTP-PEST als Tumorsuppressor lassen mutmaßen, dass diesen Polymorphismen eine gewisse Bedeutung im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen zukommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in weiteren Untersuchungen der PTP-PEST Genotyp verschiedener Patientenkollektive bestimmt. Hierbei handelt es sich um zwei verschiedene Mammakarzinomkollektive (Klinik

der Technischen Universität München und Universitätsklinikum Chieti, Italien) sowie eine Patientengruppe mit Leberkarzinomen aus Darmstadt.

Es wurde cDNA aus insgesamt 90 primären Brustkarzinomen isoliert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Verteilung der verschiedenen PEST Genotypen in diesen primären Tumorproben wurde wiederum durch PCR-RFLP Analyse oder Sequenzierung entsprechender Genfragmente ermittelt. Dabei zeigte sich, dass 70 Patienten (77%) ein Ile322 Allel aufwiesen, während in 24 Tumoren (29%) ein Ala573 und in 15 Tumoren (16%) ein Lys709 Allel gefunden werden konnte. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 0.6 für das Ile322, 0.2 für das Ala573 und 0.1 für das Lys706 Allel. Die Allelverteilung der 90 analysierten Brustkarzinomproben ist in Abbildung 24 nochmals graphisch zusammengestellt.



**Abb. 24:** Die Val322Ile, Thr573Ala und Glu706Lys Allelverteilung von PTP-PEST in Brusttumoren. cDNA der Tumorproben wurde mittels PCR-RFLP oder Sequenzierung untersucht.

Um festzustellen, ob die PTP-PEST Polymorphismen nur in Tumorgewebe zu finden sind, es sich also um somatische Veränderungen handelt, wurde aus einem Kollektiv von 36 Patienten mit Leberkarzinomen die cDNA von Tumor- als auch von gesundem Gewebe untersucht. Hinsichtlich aller drei Polymorphismen entsprach die Allelverteilung des gesunden Gewebes der der Tumorproben. Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei den drei genannten Polymorphismen um Keimbahnmutationen handelt.

Die bisherigen Untersuchungen machen deutlich, dass die Ile322, Ala573 sowie Lys709 Allele nicht auf Tumorzelllinien beschränkt sind, sondern auch in Patientenproben verschiedener Tumortypen aufzufinden sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die neuen PEST Allele nicht somatischen Ursprungs und damit auf Tumorgewebe beschränkt,

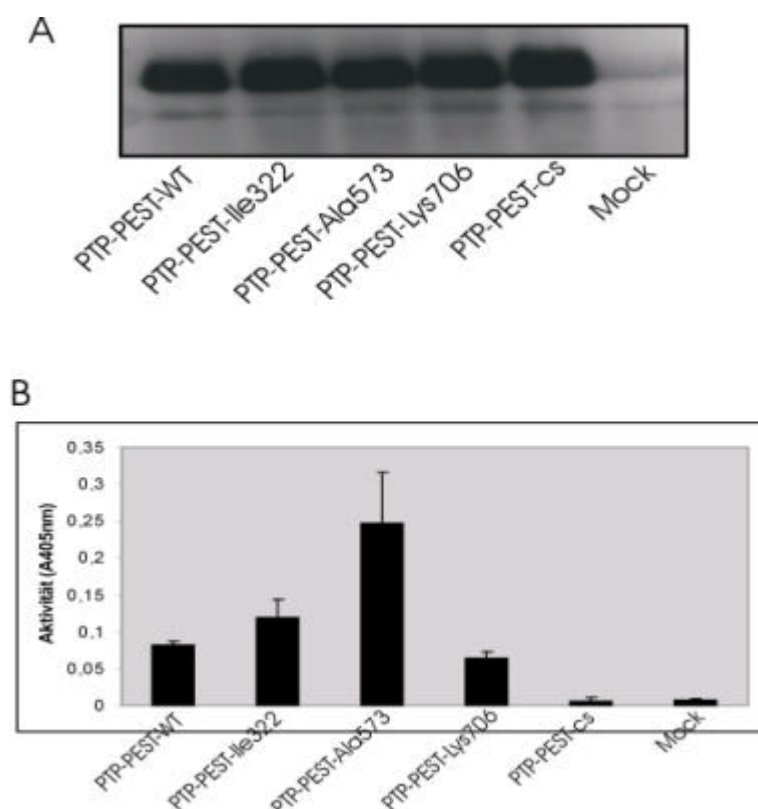
sondern in der Keimbahn der Patienten verankert sind. Aus diesen Beobachtungen resultierte die Frage, ob jene Allele für die Tumorentstehung ursächlich sein können und in diesen Patienten eine erbliche Prädisposition darstellen.

Zur Klärung sollte der PTP-PEST Genotyp eines Kollektivs unabhängiger Individuen ohne familiären Krebs hintergrund mit der bereits analysierten Brusttumoren verglichen werden. Die Untersuchungen an genomischer DNA wurden wiederum wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass von 73 auf den Val322Ile getesteten Individuen 54 mindestens ein Ile Allel trugen, was einem Anteil von 74% entsprach. Im Falle des Thr573Ala Polymorphismus wurde für 34%, nämlich 27 von 78 Individuen, ein Alanin Allel ermittelt.

Somit ergaben sich für die PTP-PEST Allele keine statistisch bedeutsamen Verteilungsunterschiede zwischen den Brustkarzinompatienten und den Kontrollindividuen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die PTP-PEST Varianten nicht mit Tumorentstehung verknüpft sind und keine erhöhten Risikofaktoren darstellen, an einem Brusttumor zu erkranken.

#### 3.4.5 Die Polymorphismen in PTP-PEST führen zu unterschiedlicher Phosphatase-Aktivität

Es drängte sich nun die Frage auf, ob die Polymorphismen in PTP-PEST funktionelle Veränderungen wie die Änderung der katalytischen Aktivität zur Folge haben. Hierzu wurden HEK 293 Zellen mit pRK5-Plasmiden transfiziert, die den jeweiligen Polymorphismus im PTP-PEST Gen trugen. Identische Immunpräzipitationen von PTP-PEST wurden zum einen zur Kontrolle der Transfektion gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 25A), zum anderen einem *in vitro*-Phosphatase-Assay mit pNPP als Substrat zugeführt (Abb. 25B).



**Abb. 25: Auswirkungen der Polymorphismen im PTP-PEST-Gen auf die Aktivität der Phosphatase.** HEK 293 Zellen wurden mit den verschiedenen PTP-PEST-Konstrukten transfiziert, in Triton X-100-Lysepuffer ohne Phosphataseinhibitoren lysiert und einer Immunpräzipitation mit polyklonalem anti-PTP-PEST-Antikörper unterzogen. (A) Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5% -iger SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die anschließende Immunoblotanalyse wurde mit demselben Antikörper durchgeführt ( $\alpha$ -PTP-PEST-CT). (B) Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präzipitate mit 10 mM pNPP-Lösung versetzt und bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Zunächst wurde bestätigt, dass immunpräzipitierte PTP-PEST eine Aktivität gegenüber pNPP als Substrat aufwies. Zellen, die mit einem Leervektor (mock) bzw. der cs-Mutante der Phosphatase transfiziert wurden, zeigten erwartungsgemäß keinem Umsatz des Substrats. Darüber hinaus ließ sich erkennen, dass die Polymorphismen einen zum Teil starken Einfluss auf die Aktivität ausüben. Während der Val322Ile Polymorphismus die Aktivität der Phosphatase um etwa 30% erhöhte, führte der Glu706Lys Polymorphismus zu einer Verringerung der Phosphataseaktivität. Besonders auffällig und bedeutend stärker war die Aktivitätszunahme durch den Thr573Ala Polymorphismus. Hier ließ sich eine Zunahme um mehr als 200% im Vergleich zur Wildtyp-Phosphatase messen. Die Aktivität von PTP-PEST kann demnach infolge der Polymorphismen sowohl positiv als auch negativ moduliert werden.

### **3.5 Charakterisierung der Rolle von Phosphatasen mit Hilfe der siRNA-Technologie**

Die Kontrolle und Regulation der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen ist von grundlegender Bedeutung für viele physiologische und pathophysiologische zelluläre Ereignisse. Im Rahmen der Kontrollmechanismen kommt der Gruppe der Proteintyrosinphosphatasen eine wichtige Rolle zu, da diese direkt oder zur Inaktivierung der Rezeptoren selbst sowie zur Inhibierung der Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden beitragen können (Ostman *et al.*, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden einige Phosphatasen im Hinblick auf genetische Veränderungen näher charakterisiert. Im folgenden sollte die Rolle von Phosphatasen bei Krebserkrankungen durch Identifizierung neuer Substrate auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Ansätze etabliert, die in den anschließenden Kapiteln näher beschrieben werden.

#### **3.5.1 Identifizierung von Substraten mittels 2D-Gelelektrophorese**

Der Begriff des Proteoms wurde 1995 von den Australiern M. Wilkins und K. Williams geprägt. Er bezeichnet die Gesamtheit der Proteine, die durch das Genom einer Zelle oder eines Organismus kodiert werden. Das Proteom ist ein dynamisches, sich ständig änderndes Gebilde. Proteomics ist die Analyse der gesamten Proteinmenge, die von einem Genom unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird. Es ist der direkte Weg, um Proteine in Zellen, Geweben und Organismen zu identifizieren und zu quantifizieren bzw. um zu untersuchen, welche posttranslationalen Modifikationen vorliegen. Die einzige Methode, die es zur Zeit ermöglicht, Proteine aus dem Proteom mit hoher Auflösung voneinander zu trennen, ist die 2D-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE). Die Proteinmuster werden in zweidimensionalen Gelen mit immobilisierten pH Gradienten (IPG), getrennt über Ladung (1. Dimension) und Masse (2. Dimension), dargestellt. Nach ihrer Färbung sind die im Gel aufgetrennten Proteine abhängig von der dort enthaltenen Menge als distinkte Akkumulation (Spots) sichtbar. Sie können herausgeschnitten, durch nachfolgenden enzymatischen oder chemischen Verdau in Peptide zerlegt und analysiert werden.

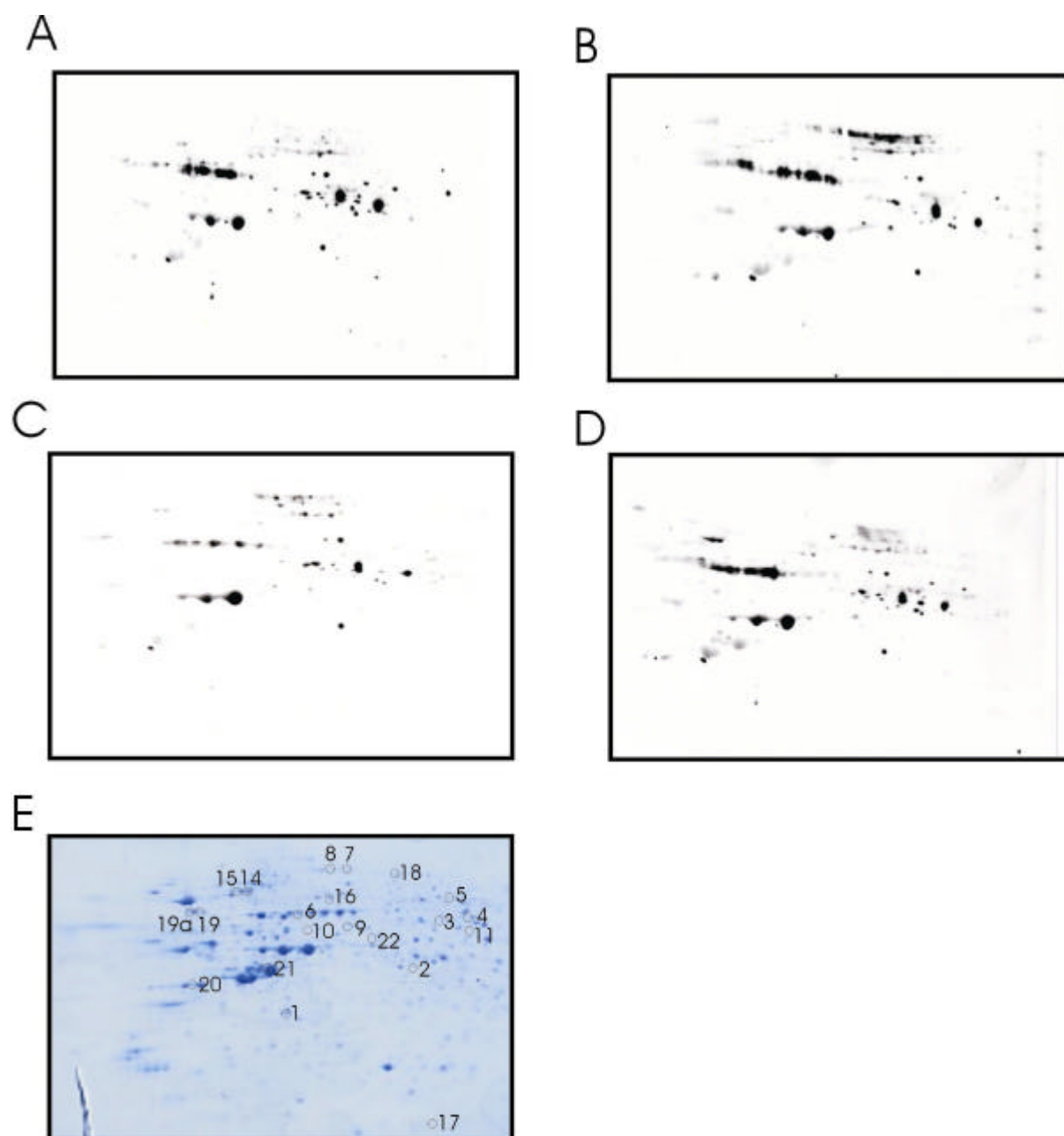
Um die Rolle ausgewählter Tyrosinphosphatasen zu untersuchen, wurden MCF-7 Brustkrebszellen mit siRNA-Oligonukleotiden gegen die Phosphatasen SHP-1, PTP-LAR und



PTP $\sigma$  transfiziert und damit die endogene Expression dieser Proteine unterdrückt. Als Kontrolle wurden Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden gegen Luciferase (GL2) transfiziert, einem Protein, das in humanen Zellen nicht exprimiert wird und somit als Negativkontrolle diente. Die Zellen wurden für 48 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert und anschließend lysiert. Das Gesamtlysat wurde mittels 2D-Gelelektrophorese über einen pH Gradienten von 4-7 aufgetrennt. Durch nachfolgende Immundetektion mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper konnte ein für jeden Ansatz spezifisches Muster an phosphorylierten Spots detektiert werden (Abb. 26).

Der vergleichende Quantifizierung der Immunoblots erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms „ProteomWeaver“, mit dem nach Abzug des Hintergrundes Spots mit erhöhter bzw. runterregulierter Tyrosinphosphorylierung identifiziert werden können. Derartige Proteinspots wurden aus dem mit Coomassie gefärbten Gel herausgeschnitten und unter Verwendung von Trypsin enzymatisch verdaut. Da die durch dieses Enzym vermittelte endoproteolytische Spaltung ausschließlich C-terminal zu basischen Aminosäureresten erfolgt, verfügen alle entstandenen Peptidfragmente am C-Terminus ein Lysin- oder Argininrest. Von den entstandenen Peptidfragmenten kann die Masse über MALDI-MS bestimmt werden und durch Vergleich mit annotierten Genen in entsprechenden Datenbanken das dazugehörige Gen ermittelt werden. Die letzten Schritte wurden in der Abteilung Lottspeich (MPI für Biochemie) durchgeführt. Die auf diese Weise identifizierten Proteine sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Jeweils im Vergleich zum Phosphorylierungsmuster der GL2-siRNA transfizierter Zellen stellten Spots 1-5 Proteine dar, die nach Inhibition der SHP-1 Expression eine verringerte Tyrosinphosphorylierung aufwiesen. Hingegen zeichneten sich Proteine der Spots 6-8 durch erhöhten Phosphorylierungsstatus aus. Repression von PTP $\sigma$  führte für Proteine der Spots 9-11 und 17 zu verminderter, für die der Proben 14-16 und 18-21 zu verstärkter Phosphorylierung. Ein ebenfalls erhöhter Phosphorylierungsgrad resultierte für Proteine der Spots 8 und 22 aus der Inhibition der Expression von PTP-LAR.

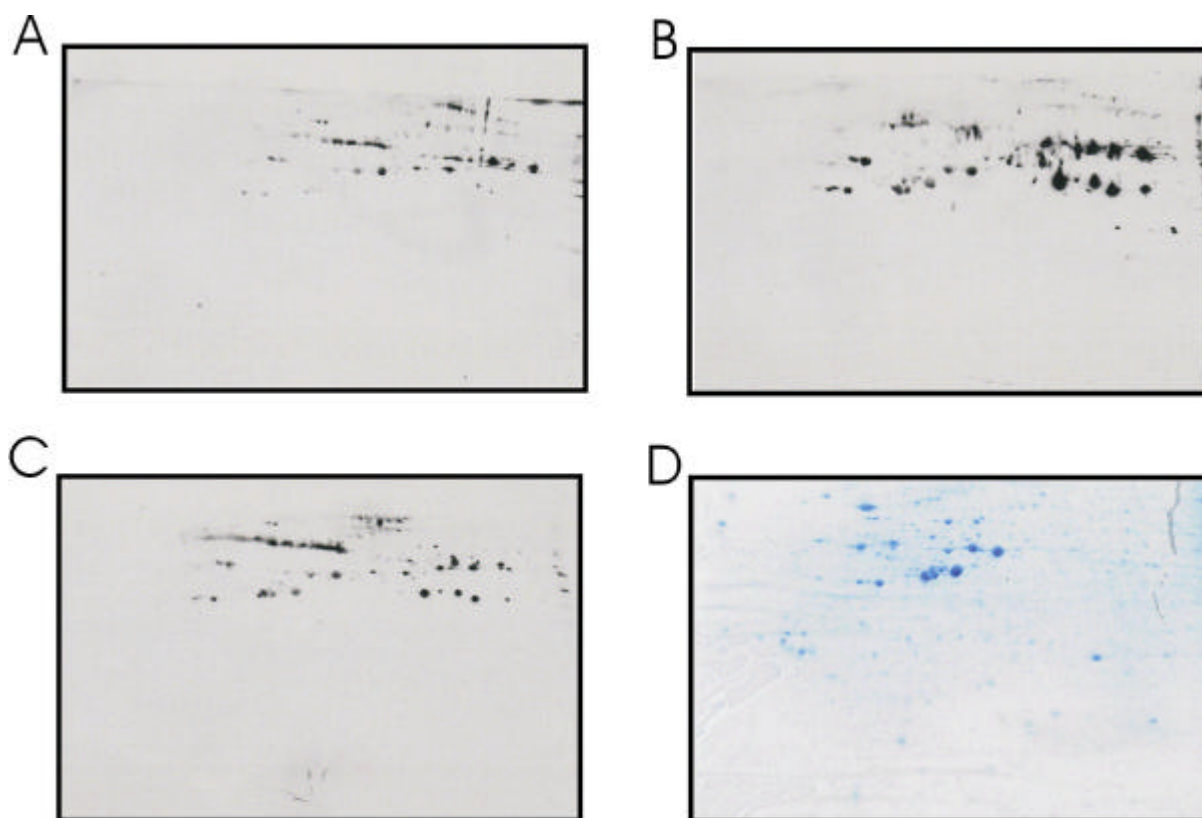


**Abb. 26: 2D-Gelelektrophorese des Proteoms siRNA-transfizierter MCF-7 Brustkrebszellen.** MCF7 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen Luciferase (A,E), SHP-1 (B), PTP-LAR (C) oder PTP- $\sigma$ (D) transfiziert, für 48 h in serumhaltigem Medium kultiviert und anschließend lysiert. Nach Auftrennung über 2D-Gelelektrophorese wurden die Zellysate mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern im Immunoblot analysiert (A-D). Die mit siRNAs gegen Luciferase transfizierten Zellen wurden für spätere Untersuchungen zusätzlich mit Coomassie gefärbt (E).

Spot	Protein	Acc.Nr	Masse	pI
1	guanine nucleotide binding protein G (I)	GBB2_HUMAN	38	5,6
2	ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT_HUMAN	48,8	6,57
3	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD_HUMAN	59,6	6,44
4	wie Sp3: glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD_HUMAN	59,6	6,44
5	WD-repeat protein 1	WDR1_HUMAN	66,8	6,17
6	<b>serum albumin bovine</b>	<b>ALBU_BOVIN</b>	<b>71</b>	<b>5,82</b>
7	glucosidase II	gj 2274968	107	5,7
8	wie Sp7: glucosidase II	gj 2274968	107	5,7
9	NADP-dependent malic enzyme	MAOX_HUMAN	64,7	5,79
10	copine III	CNE3_HUMAN	61	5,6
11	cytosol aminopeptidase	AMPL_HUMAN	53	6,29
14	alpha-actinin 4	AAC4_HUMAN	105	5,27
15	alpha-actinin1	AAC1_HUMAN	103	5,22
16	ATP dependent DNA helicase II	KU86_HUMAN	83	5,55
17	cofilin 1	COF1_HUMAN	18,7	8,22
18	programmed cell death 6 interacting protein	PD6I_HUMAN	96,6	6,13
19	78Da glucose regulated protein precursor	GR78_HUMAN	72,4	5,07
19a	wie Sp19: 78Da glucose regulated protein precursor	GR78_HUMAN	72,4	5,07
20	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1CR_HUMAN	47,9	5,34
21	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2_HUMAN	58,2	5,69
22	Keratin, type I cytoskeletal 18	K1CS_HUMAN	44	5,04

**Tab. 4: Über 2D-Gelelektrophorese identifizierte Proteine.** Spots wurden aus einem mit Coomassie gefärbten Gel herausgeschnitten und nach Trypsin-Verdau über MALDI-MS und Vergleich mit Datenbanken bestimmt.

Ein weiterer Ansatz sollte die potentielle Rolle von SHP-1 bei der Regulation der  $\beta$ -Heregulin-induzierten Signaltransduktion untersuchen. MCF-7 Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 sowie GL2 transfiziert, nach Stimulation mit  $\beta$ -Heregulin lysiert und die Lysate mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die nachfolgende Immundetektion mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper ließ für  $\beta$ -Heregulin-stimulierte Kontrollzellen erwartungsgemäß verstärkt phosphorylierte Proteinspots in Erscheinung treten (Abb. 27B). Inhibition der SHP-1 Expression hatte im Vergleich hierzu das Auftreten meist schwächer phosphorylierter Spots zur Folge (Abb. 27C). Allerdings wiesen die verschiedenen Blots unterschiedlich starke Immunfärbungen auf, was die Vergleichbarkeit und die Identifizierung spezifischer Blots stark erschwerte. Auch war die Coomassie-Färbung nur recht schwach (Abb. 27D) und die genaue Lokalisation einzelner Spots damit ebenfalls schwierig. Dieser Versuch muss daher wiederholt und dabei größere Proteinmengen eingesetzt werden.



**Abb. 27: 2D-Gelelektrophorese von MCF-7 Zellen nach Repression endogener SHP-1.** MCF-7 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligos gegen SHP-1 (C) und GL2 (A, B und D) transfiziert und nach Stimulation mit 20ng/ml  $\beta$ -Heregulin (B-D) lysiert. Das Gesamtlisat wurde mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und entweder in der Immunoblot-Analyse mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper untersucht (A-C) oder mit Coomassie angefärbt (D).

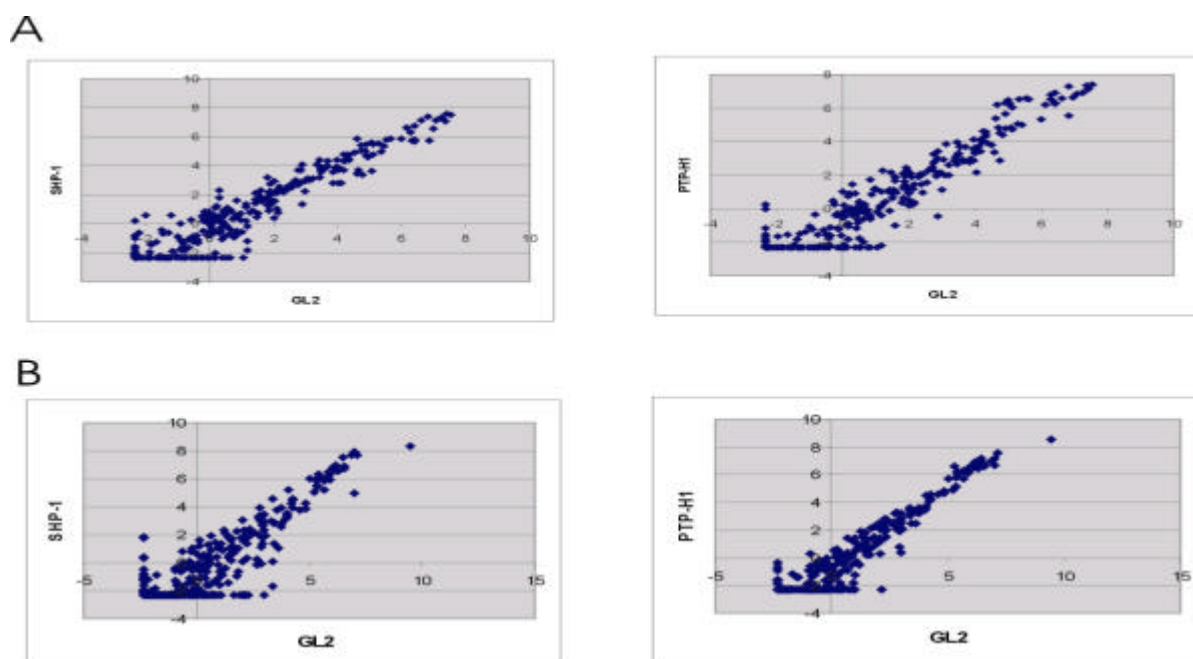
#### 3.5.2 cDNA Array Analyse in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Depletion einer Phosphatase und eine dadurch eventuell modulierte Signalkaskade zu einer Änderung der Genexpression führt. Dies kann wiederum Aufschluss über Rolle und Funktion der betreffenden Phosphatase geben. Grundlage der Array-Technologie ist eine Matrix, auf der Hunderte von Gensonden, d.h. einzelsträngige DNA-Moleküle bekannter Sequenz, in hoher Dichte angeordnet sind. Die spezifische Hybridisierung dieser Gensonden mit radioaktiv markierter cDNA ermöglicht so die simultane Analyse einer großen Anzahl von Genen, im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, die nur einen sehr geringen Probendurchsatz erlauben.

Dazu wurde die Expression der Phosphatasen SHP-1 und PTP-H1 mittels siRNA-Oligonukleotiden in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 unterdrückt, die mRNA daraufhin isoliert und Genexpressions-Analysen mit Hilfe der cDNA Array Technik

durchgeführt. Die Repression der Phosphataseexpression wurde mittels RT-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden für jede der Zelllinien die  $\log_2$ -transformierten Werte der siSHP-1/PTP-H1-Filter den die  $\log_2$ -transformierten Werte der siGL2-Filter in einem Punkt-Diagramm gegenübergestellt. Diese Darstellung ermöglicht einen Überblick über die unterschiedliche Expression der Gene nach Transfektion der Phosphatase spezifischen siRNA-Oligonukleotiden im Vergleich zur GL2-Kontrolle. Würden die Werte der Gene auf beiden Filtern übereinstimmen, d.h. wäre die Genexpression gleich, so würde sich in dem Diagramm eine Winkelhalbierende ergeben. Je größer aber die Expressionsunterschiede sind, desto mehr weichen diese Gene von der Winkelhalbierenden ab. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abb. 28 dargestellt.

Die Daten der cDNA-Filter wurden mit Hilfe eines selbstgeschriebenen *Macros* in Microsoft Excel, wie unter Material und Methoden beschrieben, komplett ausgewertet. Durch die Depletion der Phosphatasen wurde die Expression einiger Phosphatasen induziert bzw. reduziert. Interessanterweise konnte nach Depletion beider Phosphatasen Gene identifiziert werden, die in beiden Zelllinien hoch- bzw. runterreguliert wurden. So wurde die Expression der Gene SGK und 51PK nach SHP-1 Depletion induziert, von MAPKAPK2 und BclXL reduziert. Das Ausschalten der PTP-H1 Expression führte zur Induktion des PRL-1 Gens und zur Reduktion von z.B. LKB1, CDK2, IRAK in beiden analysierten Zelllinien.



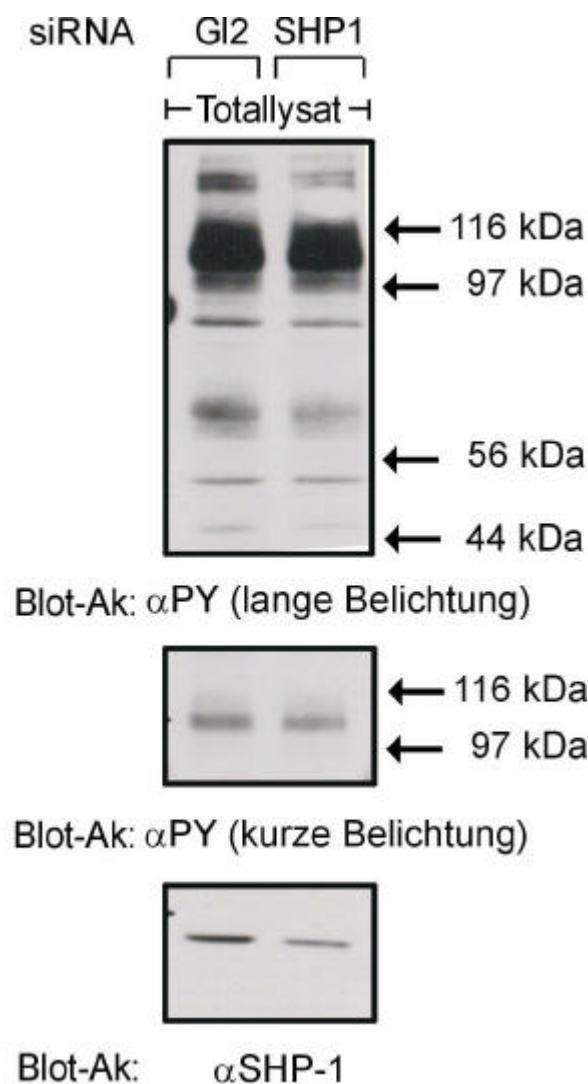
**Abb. 28:** Punkt-Diagramm der siSHP-1- bzw. siPTP-H1- und siGL2-Filter. Die normalisierten Werte der MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen sind in einer log-Transformation dargestellt.

### 3.5.3 Untersuchungen zur Rolle von SHP-1 in Brustkrebs

Die Funktion von SHP-1 als Negativregulator ist in Leukämie relativ gut charakterisiert worden (Wu *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SHP-1 mit dem EGFR interagiert und an dessen Negativregulation beteiligt ist (Tomic *et al.*, 1995; Tenev *et al.*, 1997; Keilhack *et al.* 1998). Aus der Literatur ist aber ebenfalls bekannt, dass die Expression einer katalytisch inaktiven Form von SHP-1 in der humanen Fibroblastenzelllinie 293 zur Unterdrückung der von EGF oder Serum hervorgerufene mitogene Antwort führt (Su *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass SHP-1 auch eine positivregulatorische Funktion übernehmen kann, wie es bereits für die verwandte Phosphatase SHP-2 beschrieben wurde (Streuli, 1996).

#### 3.5.3.1 Einfluss von SHP-1 auf die Totalphosphorylierung in MCF-7 Zellen

Um die Rolle von SHP-1 in Brustkrebszellen zu untersuchen, wurden zunächst einige Brustkrebszellen auf die Expression dieser Phosphatase hin untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigten besonders SKBr3, MCF-7, BT20 und MDA-MB-468 eine starke Expression, was mit früheren Ergebnissen auf mRNA-Ebene übereinstimmt (Ypi *et al.*, 2000). Aufgrund vergleichsweise guter Transfizierbarkeit wurde für weitere Experimente die Zelllinie MCF-7 ausgewählt. Zunächst sollte ermittelt werden, welchen Einfluss endogen vorhandene SHP-1 auf die Gesamttyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine hat.



**Abb. 29: Einfluss der SHP-1-Depletion auf den Gesamtphosphotyrosingehalt in MCF-7 Zellen.** MCF-7 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 und Luciferase (GL2) transfiziert und für 24 h in serumhaltigem Medium kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und 50 µg Totallysat (TL) in einer Immunoblotanalyse (WB) mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper untersucht. Die Depletion der SHP-1 Expression wurde mittels Anti-SHP-1-Antikörpern bestätigt.

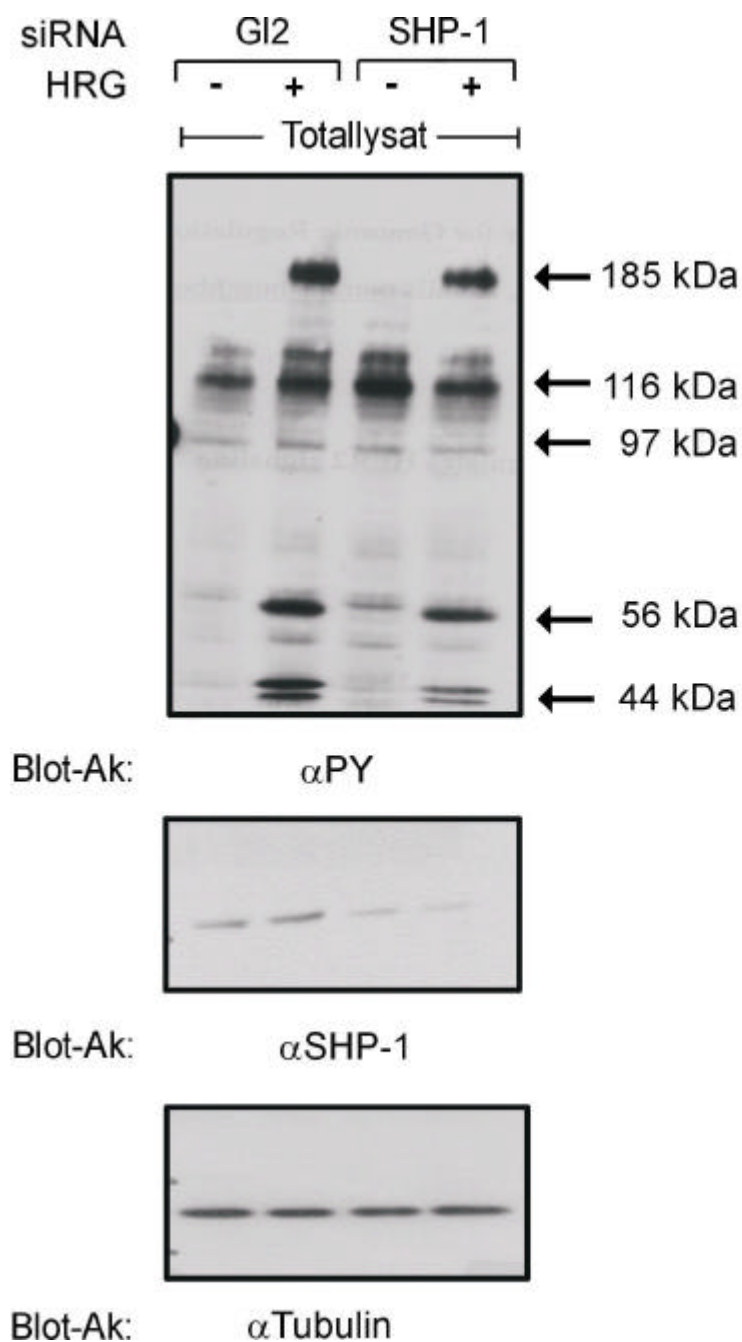
In MCF-7 Zellen wurde dazu die Expression von SHP-1 durch Transfektion entsprechender siRNA-Oligonukleotide unterdrückt. Nach 24-stündiger Kultivierung in serumhaltigem Medium wurden die Zellen lysiert und die Gesamtllysate mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die nachfolgende Immundetektion mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper zeigte, dass durch Repression endogener SHP-1-Expression die Phosphorylierung einiger Proteine abnahm. Diese Ergebnisse bekräftigen die zum Teil in der Literatur beschriebenen Daten, dass endogene SHP-1 einen positivregulatorischen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener zellulärer Proteine ausüben kann.

#### 3.5.3.2 Einfluss von verminderter SHP-1 Expression auf die $\beta$ -Heregulin-induzierte Totalphosphorylierung in MCF-7

Da der durch  $\beta$ -Heregulin initiierte Signaltransduktionsweg in MCF-7 Zellen gut charakterisiert ist (Vadalamudi *et al.*, 1999; Atlas *et al.*, 2003; Stoica *et al.*, 2003), wurde dies weiter untersucht, ob SHP-1 in dieser Signalkaskade eine Rolle spielt. Dazu wurden MCF-7 Zellen mit SHP-1 spezifischen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und nach  $\beta$ -Heregulin-Stimulation lysiert. Die Immundetektion mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper ergab für  $\beta$ -Heregulin-stimulierte Zellen ein spezifisches Muster an phosphorylierten Banden. Das Molekulargewicht der am stärksten phosphorylierten Banden wurde zu 185 kDa, 116 kDa, 56 kDa und 44 kDa bestimmt. Während die Phosphorylierung der 116 kDa-Bande durch Repression der SHP-1 Expression nur mäßig beeinflusst wurde, zeigten die Banden mit dem Molekulargewicht von 185 kDa, 56 kDa und 44 kDa eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungsgrades. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die endogene Expression von SHP-1 einen Einfluss auf die  $\beta$ -Heregulin-vermittelte Signalübertragung hat und den Phosphorylierungsstatus verschiedener zellulärer Proteine beeinflussen kann.

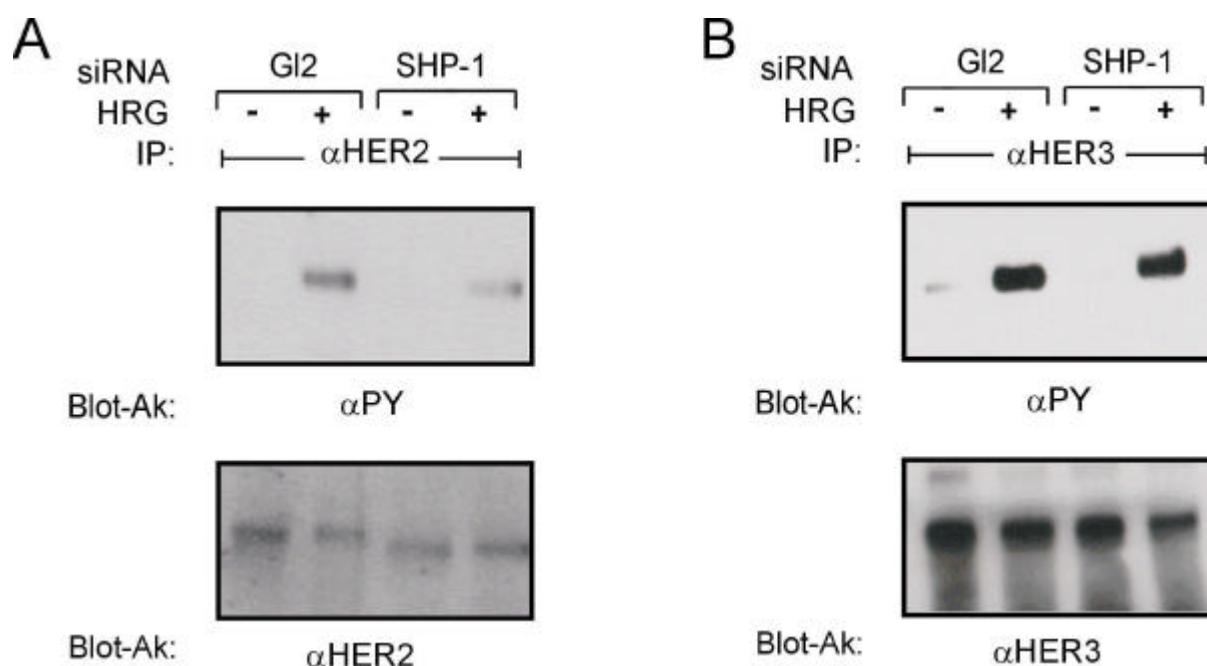




**Abb. 30: Einfluss verminderter SHP-1 Expression auf den Gesamtphosphotyrosingehalt in MCF-7 Zellen.** MCF-7 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 transfiziert und für 24 h in serumhaltigem Medium gehalten. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und 50  $\mu$ g Totallysat (TL) in einer Immunoblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- und Anti-SHP-1-spezifischen Antikörpern untersucht. Das Vorliegen gleicher Proteinmengen wurde mit Tubulin-spezifischem Antikörper bestätigt.

### 3.5.3.3 Untersuchung der HER2- und HER3- Phosphorylierung bei Repression endogener SHP-1

In weiteren Experimenten sollte nun genauer untersucht werden, ob es sich bei der 185 kDa großen Bande um ein Heterodimer aus HER2 und HER3 handelt und die Phosphorylierung beider Proteine von SHP-1 beeinflusst wird. Hierzu wurden wiederum MCF-7 Brustkrebszellen zur Kontrolle mit GL2- sowie mit SHP-1-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, Immunpräzipitationen von HER2 und HER3 durchgeführt und der Phosphorylierungsstatus beider Präzipitate in Abhängigkeit der SHP-1 Expression verglichen.

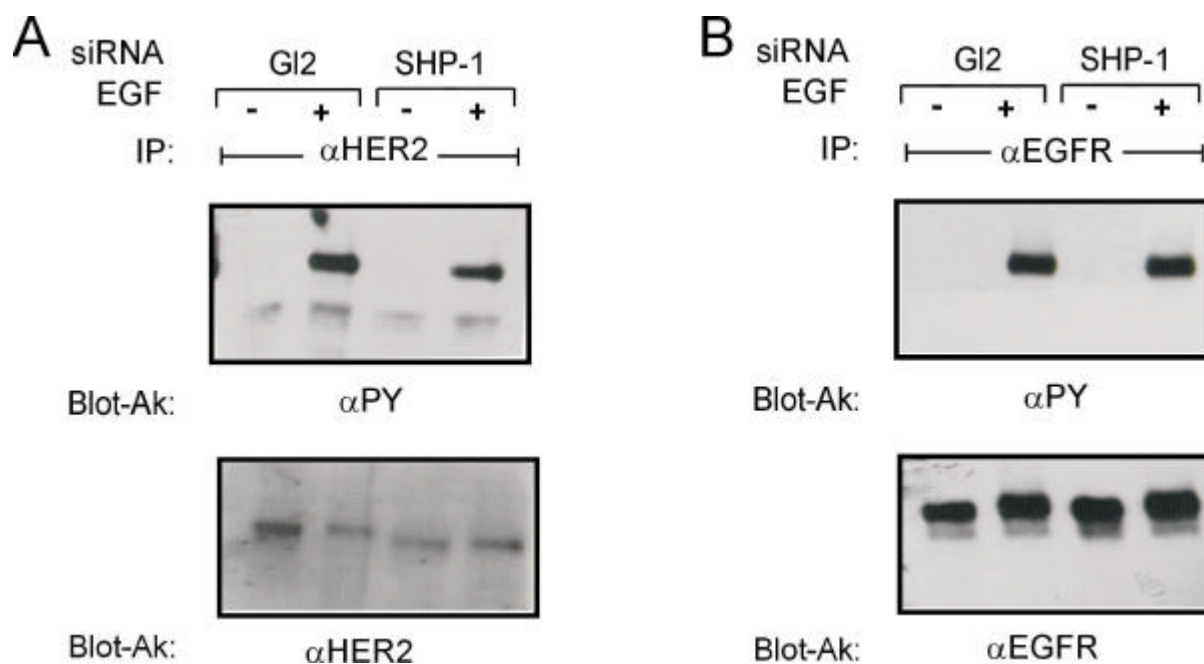


**Abb. 31: Einfluss von SHP-1 auf Phosphotyrosingehalt von HER2 und HER3 nach b-Heregulin-Stimulation.** MCF-7 Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden für SHP-1 transfiziert und 48 Stunden gehungert. Nach Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml  $\beta$ -Heregulin für 8 min wurden die Zellen lysiert und mit einem Anti-HER2- (A) bzw. Anti-HER3-Antikörper (B) immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden zunächst mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY) im Western Blot immundetektiert. Nach Ablösen dieses Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers wurde mit einem Anti-HER2- (A) bzw. Anti-HER3-Antikörper (B) nachdetektiert.

Aus Abb. 31 geht hervor, dass durch Stimulation mit  $\beta$ -Heregulin die Phosphorylierung beider Rezeptortyrosinkinasen induziert werden konnte. Während sich jedoch die Phosphorylierung von HER3 als SHP-1-unabhängig erwies, hatte die Repression dieser

Phosphatase eine deutliche Abschwächung der  $\beta$ -Heregulin-induzierten HER2-Phosphorylierung zur Folge.

Um zu klären, ob dieser scheinbar für HER2 spezifische Effekt auch bei der Bildung und Aktivierung anderer HER2-Heterodimere zu beobachten ist, wurden MCF7 Zellen in einem analogen Experiment mit EGF stimuliert.

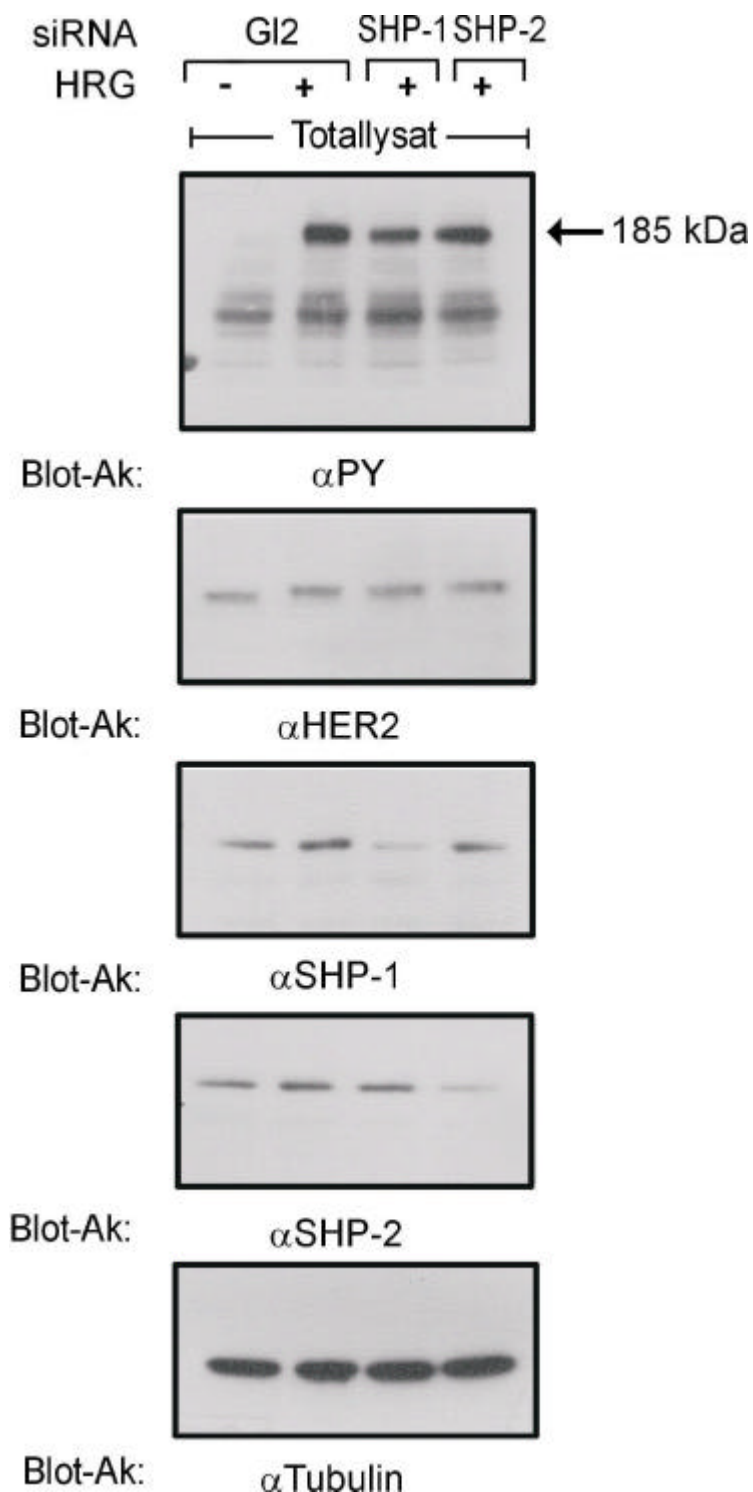


**Abb. 32: Der positivregulatorische Effekt von SHP-1 ist spezifisch für HER2.** A und B, MCF7 Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden für SHP-1 transfiziert, für 48 h in serumfreien Medium gehungert und nach Stimulation mit 5 ng/ml EGF für 5 min lysiert. A: Anti-HER2-Immunopräzipitate wurden im Western Blot mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern und nach dessen Entfernung mit Anti-HER2-Antikörpern analysiert. B: Anti-EGFR-Immunopräzipitate wurden im Western Blot zunächst mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern analysiert und schließlich mit Anti-EGFR-Antikörpern nachdetektiert.

Wie in Abb. 32 zu sehen ist, führte die Repression von SHP-1 auch nach EGF-Stimulation zu einer deutlich verringerten Zunahme der HER2-Tyrosinphosphorylierung, während die Induktion der EGFR-Phosphorylierung unverändert bleibt. Diese Ergebnisse lassen klar erkennen, dass das positivregulatorische Potential von SHP-1 in Bezug auf die HER2-Phosphorylierung vom HER2-Bindungspartner in heterodimeren Komplexen unabhängig ist.

#### 3.5.3.4 Untersuchung der Spezifität der positivregulatorischen Wirkung von SHP-1

Da die Phosphatase SHP-2 sehr eng mit dem Enzym SHP-1 verwandt ist, wurde im Folgendem untersucht, ob auch die Inhibierung der SHP-2-Expression einen Einfluss auf die HER2-Phosphorylierung hat oder dieser Effekt spezifisch für SHP-1 ist.



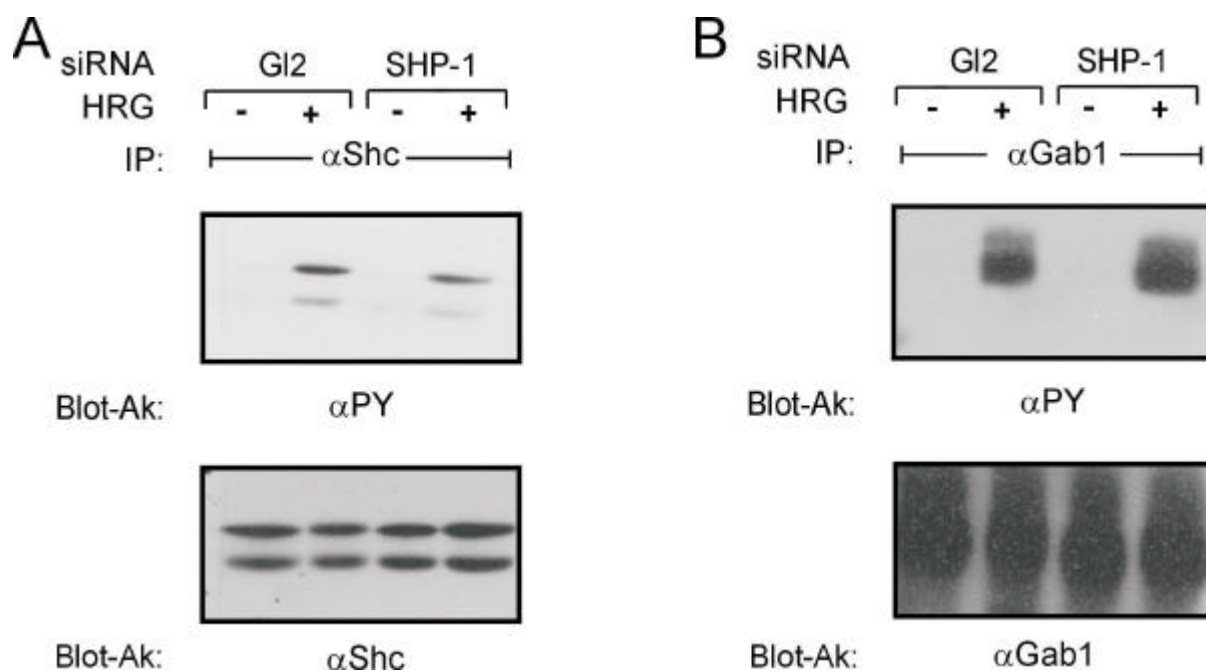
**Abb. 33: Der positivregulatorische Effekt ist spezifisch für SHP-1.** MCF-7 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 und SHP-2 transfiziert und für 48 h in serumfreiem Medium gehungert. Nach Stimulation mit 20 ng/ml  $\beta$ -Heregulin für 8 min wurden die Zellen lysiert und 50  $\mu$ g Totallysat mit Anti-Phosphotyrosin- (PY)- und Anti-HER2-Antikörpern analysiert. Die Expression endogener SHP-1 und SHP-2 wurde mit spezifischen Antikörpern gegen SHP-1 und SHP-2 ermittelt. Gleiche Proteinmengen wurden mit Anti-Tubulin-Immunoblotanalyse bestätigt.

Dazu wurden MCF-7 Zellen zusätzlich mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-2 transfiziert und wiederum mit  $\beta$ -Heregulin stimuliert. Im Gegensatz zur starken Verminderung der HER2-Tyrosinphosphorylierung nach SHP-1 Repression wurde bei Erniedrigung der SHP-2 Expression die Phosphorylierung der Kinase, wenn überhaupt, nur marginal beeinträchtigt (Abb. 33). Diese Ergebnisse lassen erwarten, dass der positivregulatorische Effekt von SHP-1 spezifisch ist.

#### 3.5.3.5 Analyse der $\beta$ -Heregulin-induzierten Phosphorylierung von Adapterproteinen bei Repression endogener SHP-1

Aktiviert RTKs rekrutieren und phosphorylieren eine Reihe von Adapterproteinen und initiieren dadurch Signalkaskaden, die letztlich in spezifischen zellulären Antworten resultieren (Schlessinger, 2000). Aufbauend auf den vorangegangenen Ergebnissen, die zeigten, dass SHP-1 die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase HER2 positiv beeinflussen kann, sollte im folgenden untersucht werden, ob die Repression von SHP-1 auch die Rezeptor-proximale Signalweiterleitung von HER2 beeinträchtigt. In diesem Zusammenhang wurde die  $\beta$ -Heregulin-induzierte Phosphorylierung der Adapterproteine Shc und Gab1 in An- und Abwesenheit endogener SHP-1 in MCF-7 analysiert. Während sowohl die 46 und die 52 kDa-Form von Shc durch die durch Repression der SHP-1 Expression in ihrer Tyrosinphosphorylierung erniedrigt wurde, wurde die Phosphorylierung von Gab1 nicht beeinflusst (Abb. 34).

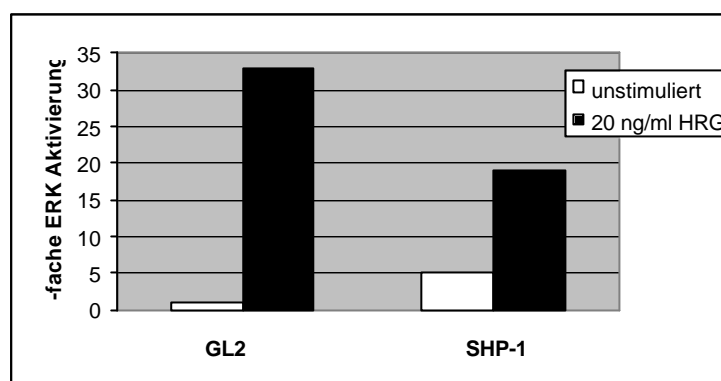
Wie in Abb. 34 zu entnehmen ist, weisen die beiden 46 und 52 kDa großen Shc-Formen in SHP-1 reprimierten Zellen eine deutlich verringerte Phosphorylierungszunahme nach  $\beta$ -Heregulin Stimulation auf, wohingegen die Phosphorylierung von Gab1 nicht beeinflusst wurde.



**Abb. 34: Einfluss der SHP-1 Expression auf die  $\beta$ -Heregulin-induzierte Phosphorylierung der Adapterproteine Shc und Gab1.** MCF-7 Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 transfiziert und in serumfreien Medium für 48h gehungert. Nach Stimulation mit 20 ng/ml HRG für 8 min wurden die Zellen lysiert. Anti-Shc- (A) und Anti-Gab1-Immunopräzipitate (B) wurden im Westernblot mit Anti-Phosphotyrosin- (PY), Anti-Shc- oder Anti-Gab1-Antikörper untersucht.

### 3.5.3.6 Aktivität von MAPK in MCF-7 Zellen mit verminderter SHP-1 Expression

Da in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden konnte, dass bei Unterdrückung der SHP-1 Expression in MCF-7 Zellen die  $\beta$ -Heregulin-induzierte Phosphorylierung von HER2 sowie des Adapterproteins Shc stark vermindert wurde, sollte im folgenden die eventuelle Auswirkung reprimierter SHP-1 Expression auf die Aktivierung der MAPK ERK2 untersucht werden. Der Aktivierungszustand der MAPK wurde dabei unter Verwendung eines für die aktivierte Form spezifischen Antikörpern im Western Blot ermittelt. Wie in Abb. 35 zu erkennen, führte die Stimulation von MCF-7 Zellen mit  $\beta$ -Heregulin zu einer starken Aktivierung von ERK2. Diese Aktivierung wurde durch Verminderung der SHP-1 Expression auf fast 50% reduziert. All die Ergebnisse zeigen, dass die Repression endogener SHP-1 nicht nur auf Rezeptorebene die Phosphorylierung von HER2 selbst, sondern auch die Rezeptorproximale Signalweiterleitung wie Phosphorylierung von Adapterproteinen und Aktivierung von MAP-Kinasen beeinflusst.

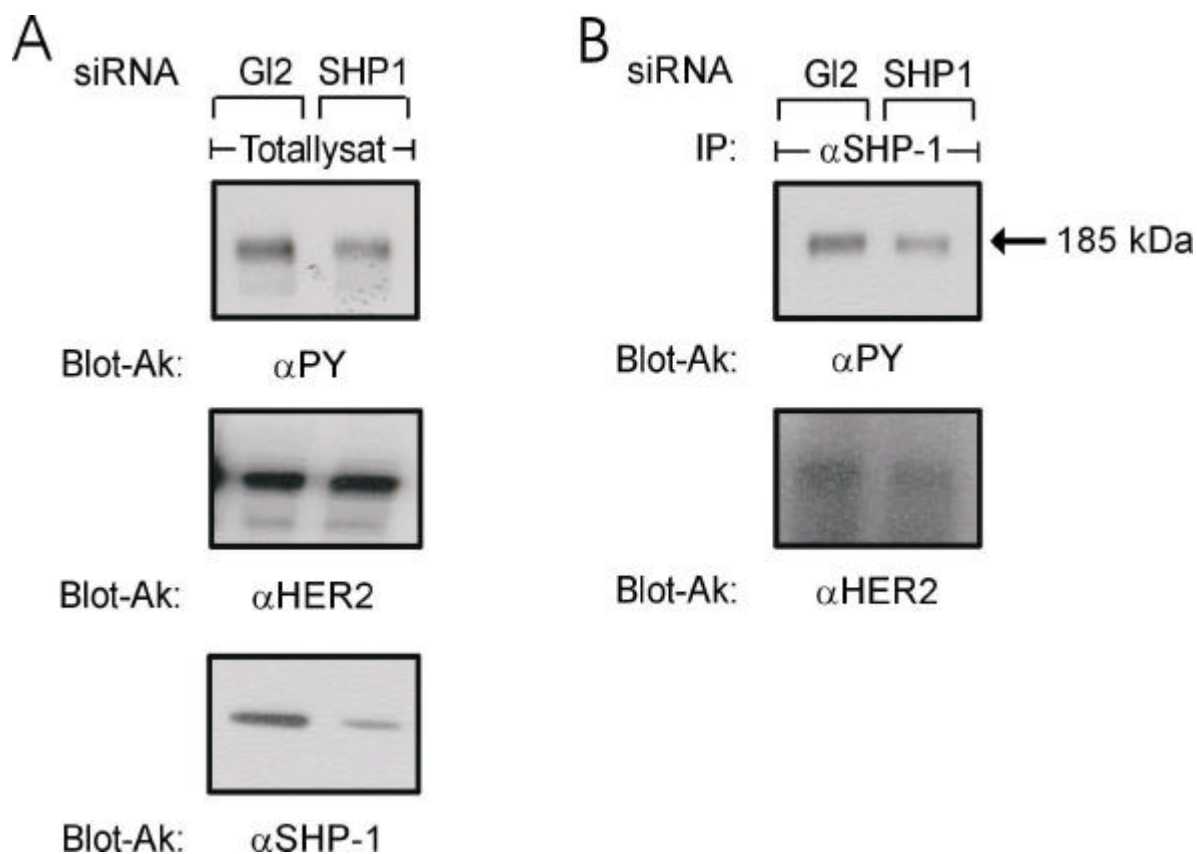


**Abb. 35: Aktivität der MAP-Kinase ERK2 in MCF-7 mit verminderter SHP-1 Expression.** MCF7 Zellen wurden siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 transient transfiziert und für 48 h in serumfreiem Medium gehungert. Die Zellen wurden mit 20ng/ml  $\beta$ -Heregulin (HRG) stimuliert, lysiert und das Totallysat im Immunblot mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern für aktivierte ERK2 analysiert. Die Aktivität der Kinase in unstimulierten und kontrolltransfizierten Zelle wurde als 1-fach definiert.

### 3.5.3.7 Repression der SHP-1 Expression in SKBr3 Zellen

Um erste Hinweise darauf zu bekommen, ob die positivregulatorischen Effekte durch verminderte SHP-1 Expression auf die Zelllinie MCF-7 beschränkt oder ein allgemeingültiges Phänomen darstellen, wurde eine zweite Zelllinie untersucht. Ausgewählt wurde hierfür die Brustkrebszelllinie SKBr3, da sie eine hohe SHP-1 Expression aufweist, sich relativ gut transfizieren lässt und bekanntermaßen HER2 überexprimiert. Zunächst wurde überprüft, ob die Depletion der SHP-1 Expression auch hier eine Verringerung der HER2-Aktivierung zur Folge hat. Dazu wurden Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, nach 48-stündiger Kultivierung in serumfreiem Medium lysiert und das Totallysat mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Aus Abb. 36A kann man ersehen, dass ebenso wie in MCF-7 Zellen auch in SKBr3 Zellen die Repression endogener SHP-1 Expression zu einer verminderten HER2-Aktivierung führt. Um zu prüfen, ob SHP-1 direkt an HER2 oder eher in die Rezeptor-vermittelte, proximale Signalkaskade eingreift, wurden anschließend *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wiederum mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und 48 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert. Nach Immunpräzipitation mit einem SHP-1-spezifischen Antikörper konnte in GL2-transfizierten Zellen ein stark phosphoryliertes Protein von ca. 185 kDa kopräzipitiert werden, wohingegen in SHP-1-depletierten Zellen eine nur bedeutend schwächere Bande derselben Größe detektierbar war.



**Abb. 36: Einfluss verminderter SHP-1 Expression auf HER2-Phosphorylierung und Kopräzipitation beider Proteine in SKBr3 Zellen.** SKBr3 Brustkrebszellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SHP-1 transfiziert und für 48 h gehungert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und 50  $\mu$ g Totallysat (TL) in einer Immunoblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- bzw. Anti-HER2-spezifischen Antikörpern untersucht (A). Die Depletion der SHP-1 Expression wurde mittels Anti-SHP-1-Antikörpern ermittelt (A). Immunpräzipitierte SHP-1 wurde mit Anti-Phosphotyrosin (PY)- bzw. Anti-HER2-spezifischen Antikörpern analysiert.

Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die positivregulatorische Wirkung von SHP-1 auf die Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinase HER2 ein für mehrere Zelllinien zutreffendes Phänomen darstellt und möglicherweise auf einer direkten Bindung beider Proteine beruht.



## 4 Diskussion

Die Entwicklung einer Zelle vom normalen zum neoplastischen Zustand ist ein vielstufiger Prozess, an dem Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind. Die beiden Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) EGFR und HER2 sind Beispiele für Signalmoleküle, die eine dominierende Funktion bei der Entstehung von Brustkrebs besitzen. Eine Deregulation von Signaltransduktionsprozessen kann durch Mechanismen wie Amplifikation, Überexpression oder Mutation von Signalmolekülen verursacht werden. Als weitere wichtige regulatorische Elemente, besonders in der Phosphotyrosin-vermittelten Signaltransduktion, haben sich Proteintyrosinphosphatasen erwiesen. Über die Rolle einzelner Phosphatasen bei der Regulation spezifischer physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozesse ist noch wenig bekannt, eine wichtige Bedeutung kommt diesen Enzymen jedoch bei der Regulation von RTKn zu, die grundlegende zelluläre Ereignisse wie Wachstum, Migration oder Differenzierung steuern.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle von bereits bekannten sowie von neu identifizierten genetischen Veränderungen in Signalmolekülen untersucht. Ein weiteres Schwerpunktthema bildete die Charakterisierung ausgewählter Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) in Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

### 4.1 Das FGFR4 Arg388 Allel trägt zu einer beschleunigten Tumorprogression bei

In vorangegangenen Untersuchungen wurde für die Arg388-Variante des FGFR4 eine deutliche Überrepräsentanz in Brustkrebspatienten mit HER2 Überexpression gezeigt und diese im Vergleich zu Trägern des FGFR4 Gly388 Allels mit einer signifikant verringerten rezidivfreien Überlebenszeit in Patienten mit axiliären Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht. Eine übereinstimmende Beziehung zwischen dem FGFR4 Arg Allel und klinisch prognostischen Faktoren wurde weiterhin in Darmkrebs gefunden.

Im Zuge dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der FGF Rezeptor 4 in 17 (16%) von 104 untersuchten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen stark, in 59 (57%) mittel und in 28 (27%) Patienten wenig exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Untersuchungen von Brustkrebspatienten, in denen ebenfalls häufig eine starke Expression von FGFR4 oder eine Amplifikation des FGFR4-Gens gefunden wurde (Jaakkola, *et al.*,

1993; McLeskey *et al.*, 1994). Die erhöhte Expression des Rezeptors in Plattenepithelkarzinomen legt die Vermutung nahe, dass dieses Gen ähnlich wie HER2 zur Tumorentstehung beitragen kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch in diesem Tumortyp das Arg388 Allel insbesondere in Patienten mit starken FGFR4 Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Weiterhin wurde eine übereinstimmende Beziehung zwischen dem Auftreten des Arg388 Allels und prognostischen Faktoren in Melanomen gefunden.

Mutationen in RTKn sind oftmals Ursache für schwere Erkrankungen oder Entwicklungsstörungen beim Menschen. In mindestens 10 Rezeptortyrosinkinase-Familien sind in den letzten Jahren somatische oder vererbliche Sequenzvarianten identifiziert worden. Die FGF Rezeptoren sind ein besonderes Beispiel für eine Familie von RTKn, in denen Keimbahnmutationen zu autosomal dominant vererbten humanen Syndromen führen. In der Keimbahn von Patienten mit Zwergwuchs oder craniosynostischen Syndromen, z.B. Crouzon, Pfeiffer, Apert und Jackson-Weiss, sind über 50 verschiedene Mutationen in den Genen für FGFR1, FGFR2 und FGFR3 bekannt (Webster & Donoghue, 1997). Die meisten craniosynostischen Syndrome werden dabei durch Mutationen in der extrazellulären Domäne des FGFR2 verursacht, während Zwergwüchsigkeit das Ergebnis von vererblichen Mutationen im FGFR3 ist. Achondroplasie, die häufigste Form von Zwergwuchs beim Menschen, wird durch eine Glycin→Arginin Substitution in der Transmembrandomäne des FGFR3 ausgelöst, die der Glycin→Arginin Substitution im FGFR4 ähnlich ist. Interessanterweise sind bis heute im FGFR4-Gen keine weiteren Mutationen, die mit Entwicklungsstörungen oder der Krebsentwicklung assoziiert sind, gefunden worden (Gaudenz *et al.*, 1998), so dass die hier gezeigten Ergebnisse erstmals eine Diskussion über die Funktion von FGFR4 Sequenzvarianten in der humanen Pathogenese zulassen.

Mutationen in den FGF Rezeptoren wurden aber nicht nur in den genannten Entwicklungsstörungen gefunden. In jüngerer Zeit wurden somatische Mutationen im FGFR3 auch in Blasen- und Cervixkarzinomen sowie und in multiplen Myelomen identifiziert (Chesi *et al.*, 1997; Capellen *et al.*, 1999). Allen diesen Mutationen ist gemeinsam, dass sie im Unterschied zur Gly388Arg Mutation im FGFR4 äußerst selten sind (Allelfrequenz < 0.1%) und deshalb keine signifikante Auswirkung auf sehr häufige Krankheiten haben. Die FGFR4 Gly388Arg-Variante dagegen wurde in 50% der normalen Bevölkerung entweder in hetero- oder homozygoter Form gefunden und weist damit eine sehr hohe Frequenz auf (Bange *et al.*, 2002). Es handelt sich also um einen sogenannten “*susceptibility polymorphism*” oder

Prädispositions-Polymorphismus, der für die Gesamtbevölkerung von großer Bedeutung sein kann.

Die genaue biologische Rolle der FGF Rezeptoren und im besonderen des FGFR4 in der Tumorentstehung ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt, und eine Reihe von gegensätzlichen Untersuchungen sind in den letzten Jahren veröffentlicht worden. Erhöhte Expression von FGF Rezeptoren wurde unter anderem in Brustkrebs (Jaakkola *et al.*, 1993; McLeskey *et al.*, 1994; Jacquemier *et al.*, 1994), Bauchspeicheldrüsenkarzinomen (Leung *et al.*, 1994), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Berger *et al.*, 1999) und Magenkarzinomen (Shin *et al.*, 2000) gefunden. Die spezifische Inhibierung der FGF Rezeptor Aktivität durch dominant negative Mutanten oder „*anti-sense*“ Technik führt zur Reduzierung des Zellwachstums von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* (Yayon *et al.*, 1997; Wang & Becker, 1997). Weiterhin hat die exogene Überexpression verschiedener FGF-Liganden in NIH3T3 Fibroblasten den Verlust der Kontaktinhibition sowie eine Inhibition des Tumorwachstums nach Injektion in immundefiziente Nacktmäuse zur Folge (Li *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse deuten eine positive Wirkung der FGF Liganden und ihrer Rezeptoren auf die Tumorentwicklung an. Auf der anderen Seite zeigen verschiedene Arbeiten, dass einzelne Vertreter der FGF Rezeptoren und deren Liganden inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum haben können. So verursacht die exogene Expression von zum Beispiel FGFR2IIIb, einer spezifischen Spleiß-Variante des FGFR2, in Prostata- oder von FGF-2 in einer Brustkrebszellen eine Verringerung der Tumorgenität (Korah *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997). Interessanterweise hat die Expression von FGF-2 in diesem System keinen Einfluss auf die Zellproliferation, sondern nur auf Parameter, welche die Fähigkeit zur Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen.

Für den FGFR4 konnte in vielen Veröffentlichungen der letzten Jahre neben der bereits erwähnten erhöhten Expression in Brust- und anderen Tumoren gezeigt werden, dass FGF8b, ein Ligand mit besonderer Spezifität für den FGFR4, häufig in Tumor- und benachbarten Stromagewebe stark exprimiert wird. Dies gilt sowohl für Brust- als auch für Prostatakarzinome. Zusätzlich ergaben diese Untersuchungen, dass in Tumoren mit hoher FGF8b Expression immer auch FGFR4 vorhanden ist. Da aber der FGFR4 im Gegensatz zu den FGF Rezeptoren 1, 2 und 3 in allen bisher getesteten Zellsystemen keine mitogenen Eigenschaften gezeigt hat (Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Shaoul *et al.*, 1995), ist die Funktion dieses Rezeptors sehr wahrscheinlich nicht im Rahmen der initialen Tumorentstehung oder der weiteren Zellproliferation, sondern eher in den Prozessen zu suchen, welche die Metastasierung von Tumoren ermöglichen. Die beobachtete Assoziation

des FGFR4 Arg388 Allels mit einer beschleunigten Tumorprogression lässt weiterhin vermuten, dass Tumore mit diesem Allel zu einer beschleunigten Metastasierung neigen. Der Prozess der Metastasierung ist durch vielfältige Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirtsgewebe gekennzeichnet. Diese sind Migration und Deformierbarkeit von Zellen, die Produktion von Proteasen, Zellproliferation sowie Tumorangiogenese. In diesem Zusammenhang konnte bereits von J. Bange (diese Arbeitsgruppe) gezeigt werden, dass Zellen der Brustkrebslinie MDA-MB-231 mit exogen exprimiertem Gly388-FGFR4 im Gegensatz zu Zellen mit der FGFR4 Arg388-Variante eine verringerte Migrationsfähigkeit aufweisen. In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen stehen die hier in Zusammenhang mit den Plattenepithelkarzinomen gemachten Beobachtungen, dass Patienten, die eine starke Expression des FGFR4 Gly388 Allels zeigen, hauptsächlich frühe Tumorstadien mit noch nicht befallenen Lymphknoten aufweisen. Dieser Zusammenhang wird des Weiteren durch die Korrelation des FGFR4 Arg388 Polymorphismus mit einer beschleunigten Tumorprogression in Brust-, Plattenepithel-, und Darmkrebs sowie Melanomen unterstrichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sequenzvariante FGFR4 Arg388 mit einer beschleunigten Progression in allen bisher untersuchten Tumortypen korreliert. Diese Ergebnisse weisen dabei auf einen neuen Mechanismus innerhalb der Tumorentwicklung hin, in dem in einem ersten Schritt durch exogene oder endogene Faktoren die Tumorbildung induziert, die weitere Progression hingegen durch vererbliche genetische Parameter beeinflusst wird.

### **4.2 Das FGFR4 Arg388 Maus-Modell**

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass das FGFR4 Arg388 Allel im Kontext verschiedener Tumorarten stark mit einer schlechteren Prognose für die entsprechenden Patienten korreliert ist. Dabei kann man vermuten, dass der Rezeptor und insbesondere jene Allel-Variante im Prozess der Metastasierung eine Rolle spielt.

Diese Beobachtungen sollten in einem Maus-Modell eingehender untersucht werden. Bereits in früheren *in vivo* Analysen wurde für Zellen der Brustkrebslinie MDA-MB-231, die mit einem für die FGFR4 Gly388-Variante kodierenden Virus infiziert wurden, eine Inhibition des Tumorwachstums in BalbC Nu/Nu Mäusen beobachtet. Mit Leervirus infizierte Kontrollzellen zeigten hingegen ein starkes Tumorwachstum in diesem Modell. Wie im Falle der Zellmigration wurde auch dieser inhibierende Effekt des FGFR4 durch die Einführung von Arg388 in der Transmembrandomäne teilweise aufgehoben (J. Bange, diese

Arbeitsgruppe). Dieser inhibitorische Effekt der MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zelllinie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hängt möglicherweise mit einer verstärkten Adhäsion an benachbarte Zellen oder die Wachstumsunterlage zusammen. Interessanterweise konnte für den FGFR1 die Aktivierung durch einige Adhäsionsmolekülen wie N-cadherin, L1 oder N-CAM gezeigt werden (Doherty *et al.*, 1996). Es ist daher möglich, dass auch der FGFR4 mit anderen membrangebundenen Proteinen derselben oder einer benachbarten Zelle interagiert. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich beobachtet, dass Zell-Matrix-Interaktionen und die Metastasierung von Pankreas-Tumoren durch einen N-CAM-FGFR4 Komplex reguliert werden (Cavallaro *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde eine verringerte N-CAM Expression mit einer schlechteren Prognose für einige Tumortypen in Verbindung gebracht (Fogar *et al.*, 1997), und Rip1Tag2 transgene Mäuse, die Pankreas-Tumore entwickeln, zeigen eine erhöhte Metastasierung nach Kreuzung mit N-CAM *knock-out* Mäusen (Hanahan *et al.*, 1985). Aus diesen Beobachtungen schließend könnte die Wechselwirkung von N-CAM mit dem FGFR4 die Inhibition der Disseminierung potentiell metastasierender Zellen von Primärtumor zur Folge haben. Die Kreuzung einer FGFR4-Arg388-Maus mit Tieren der eben beschriebenen Maus-Modelle würde es daher gestatten, die biologische Bedeutung dieses Polymorphismus insbesondere im Zusammenhang mit Metastasierung näher zu untersuchen.

Die Notwendigkeit zur Kreuzung einer FGFR4 Arg388-Maus mit Tieren etablierter transgener Maus-Modelle ergibt sich ferner aus der Tatsache, dass der FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus nicht initial mit dem Ausbruch der Erkrankung, sondern vielmehr mit der Tumorprogression assoziiert zu sein scheint (Bange *et al.*, 2002). Letzteres stünde wiederum in Einklang mit der vermeintlichen Rolle im Rahmen der Metastasierung.

Zur Etablierung eines geeigneten Maus-Modells für den FGFR4 Arg388 Polymorphismus war es daher wichtig zu zeigen, dass in gängigen Mausstämmen an entsprechender Stelle in der Transmembrandomäne des murinen FGFR4 ausschließlich Glycin und keine Substitution durch Arginin vorkommt. Auch musste sichergestellt werden, dass in Tumoren dieser für die Kreuzung geeigneten Mäuse mit Transgenen wie MMTV-neu, TGF $\alpha$ /Wnt oder SV40-Tag der FGFR4 in hinreichenden Maße exprimiert wird, da nur in expressionspositiven Geweben eine grundlegende Rolle des Rezeptors bei der Tumorentwicklung zur erwarten ist. Von den untersuchten Brusttumoren transgener Mäuse zeigten 4 eine detektierbare Expression auf mRNA-Ebene, was mit vorangegangenen Studien in humanen Brusttumoren einhergeht. Demnach wären diese Modelle geeignet, den Einfluss des Arg Allels in der Progression von Brusttumoren zu untersuchen.

Für weitere Untersuchungen ist auch das transgene MMTV-FGF8b Maus-Modell von Interesse (Daphna-Iken *et al.*, 1998). Der Ligand FGF8 tritt in vier verschiedenen Isoformen auf, wobei die Isoform FGF8b mit dem größten Transformations- und Tumorgenitätspotential verbunden zu sein scheint (Mac Arthur *et al.*, 1995; Kouhara *et al.*, 1994). Der FGF8b kann sowohl die „c“ Isoformen des FGFR2-III und des FGFR3-III als auch den FGFR4 aktivieren (Mac Arthur *et al.*, 1995; Blunt *et al.*, 1997). Da die Isoformen der FGF Rezeptoren 2 und 3 in Brusttumoren meist eine nur geringe Expression aufweisen (Marsh *et al.*, 1999), scheint in diesem Tiermodell dem FGFR4 eine bedeutende Rolle bei der Signalweiterleitung von FGF8b zuzukommen und somit das Tumorwachstum zu beeinflussen. Weiterhin von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist der FGF19, ein Ligand der FGF Rezeptoren, der als einzigstes Mitglied seiner Familie eine besondere Spezifität für den FGFR4 zeigt (Xie *et al.*, 1999). Neueste Untersuchungen ergaben, dass transgene Mäuse, die FGF19 in Skelettmuskel überexprimieren, Leberkarzinome entwickeln (Morimoto *et al.*, 2003). Obwohl FGFR4 *knock-out* Mäuse keine auffälligen Veränderungen im Aufbau der Lunge zeigen, gibt es doch Hinweise darauf, dass der Rezeptor im Cholesterin- und Gallensäuremetabolismus eine Rolle spielt (Yu *et al.*, 2000). So scheint FGF19 über den FGFR4 die Expression von CYP7A1, einem wichtigen Enzym in der Gallensäure-Synthese, zu unterdrücken (Holt *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass der FGFR4 zum einen den alleinigen Rezeptor für FGF19 darzustellen scheint und zum anderen eine wichtige Rolle in Stoffwechselfvorgängen der Leber spielt, macht auch dieses Tier-Modell im Hinblick auf den Polymorphismus zu einem interessanten Forschungsprojekt.

### **4.3 Die Bedeutung der EGFR und HER2 Polymorphismen in Plattenepithelkarzinomen**

Seit der Entschlüsselung des humanen Genoms fällt das Augenmerk immer mehr auf Gene oder genetische Abschnitte, deren Veränderung in Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten wie Krebs stehen. Mutationen sind dabei die häufigste Form genetischer Veränderungen, sie sind häufig mit einer veränderten Funktion des Proteins assoziiert. Die Beteiligung von Mutationen in RTKn bei der Entstehung oder dem Fortschreiten von Krebs wurde bereits für zehn Familien beschrieben (Webster und Donoghue, 1997). Aber auch die mutationsbedingte Inaktivierung von Phosphatasen, die als Tumorsuppressoren agieren können, kann zur Entwicklung von Krebs beitragen, wie dies bereits ausführlich für die Phosphatase PTEN beschrieben ist (Dahia, 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde in Brustkrebs mittels Sequenzierung nach genetischen Veränderungen in Genen gesucht, die an der Phosphotyrosin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Innerhalb der untersuchten etwa 800 kb konnten fünf Gene mit Polymorphismen identifiziert werden, die mit einer Änderung in der Aminosäuresequenz einhergingen. Da die Polymorphismen der beiden RTKs EGFR und HER2 in den untersuchten Zelllinien sehr häufig auftraten und die Überexpression dieser Rezeptoren mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen diskutiert wird (Xia *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1997), wurde das oben beschriebene Kollektiv von Plattenepithelkarzinomen sowie Gewebe einer Kontrollgruppe ohne Krebserkrankung auf diese Polymorphismen hin untersucht. Das häufige Auftreten und die Tatsache, dass sich die Allelfrequenzen in der Kontroll- und Patientengruppe nur marginal unterschieden, deuten darauf hin, dass die Polymorphismen für die Entstehung der Erkrankung kaum von Bedeutung sind. Sie können aber durchaus in der Tumorprogression eine Rolle spielen. Im Fall von HER2 entsprach die Allelverteilung etwa der aus früheren Untersuchungen von Brustkrebspatienten (Xie *et al.*, 2000). Die Korrelation des Polymorphismus mit klinischen und prognostischen Parametern brachte allerdings im Gegensatz zur damaligen Brustkrebsstudie keine statistisch signifikante Assoziation hervor. Diese Beobachtungen stimmen wiederum mit früheren Erhebungen an Blasen- und Darmkrebspatienten überein, in denen ebenfalls keine Korrelation mit klinischen Parametern gefunden werden konnte (McKay *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass der Polymorphismus in der Transmembrandomäne von HER2 lediglich in Brustkrebs als prognostischer Marker verwendet werden kann.

Der Polymorphismus im Gen des EGFR wurde in früheren Studien mit einer veränderten Signalweiterleitung in Verbindung gebracht (Moriai *et al.*, 1994). CHO-Zellen, die den Rezeptor mit dem aus dem Polymorphismus resultierendem Lysinrest exprimieren, zeigten eine verminderte Wachstumsantwort auf Stimulation mit den Liganden EGF und TGF $\alpha$ . Auch eine schwächere Aktivierung der Protoonkogene FOS, JUN und MYC konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Allelvarianten zelluläre Prozesse unterschiedlich regulieren und demnach die Möglichkeit haben, das Fortschreiten der Krebserkrankung zu beeinflussen. In der untersuchten Gruppe von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen konnte allerdings keine Assoziation des EGFR Polymorphismus mit einer schlechteren Prognose der Patienten gefunden werden. Die mangelnde Korrelation könnte daran liegen, dass der beschriebene Effekt, der durch Überexpression im Zellkultursystem gefunden wurde, im lebendem Organismus von anderer

Seite ausgeglichen wird. Zudem erklärt die mangelnde Assoziation mit Patientendaten die Beobachtung, dass dieser Polymorphismus in der Bevölkerung weit verbreitet ist und offenbar keinen Einfluss auf den gesunden Träger hat.

### **4.4 Die Funktion der PTP-PEST Polymorphismen bei der Aktivierung der Phosphatase**

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben deutlich gemacht, dass die Entstehung von Tumoren mit einer unkontrollierten Proliferation und einer gleichzeitigen Reduktion der Apoptoserate verbunden ist. Auf molekularer Ebene resultiert die Tumorentstehung aus einer sukzessiven Akkumulation von Mutationen in Genen essentieller regulatorischer Enzyme, von denen manche über onkogenes Potential verfügen, andere aber auch als Tumorsuppressoren fungieren können. Es wurde deutlich, dass onkogene Proteine und Tumorsuppressoren in gleichen Signalwegen agieren können, Onkogene dabei aber positiv auf Tumorentstehung und Tumorwachstum wirken, während Tumorsuppressoren diese Vorgänge inhibieren können. In normalen Zellen können Tumorsuppressoren die Krebsentstehung und Progression kontrollieren und verhindern. In Krebszellen jedoch liegen Tumorsuppressorgene häufig in mutierter Form vor, welche die Aktivität des entsprechenden Genprodukts beeinträchtigt oder verhindert (El-Deiry *et al.*, 2003).

Da Phosphatasen als Gegenspieler von Kinasen mit oftmals onkogenem Potential wirken können, wird ihnen eine mögliche Rolle als Tumorsuppressoren zugeschrieben (Li *et al.*, 1997; Parson *et al.*, 1998). Im Zuge dieser Doktorarbeit konnten in dem für die Phosphatase PTP-PEST kodierendem Gen drei Polymorphismen identifiziert werden, welche eine Änderung der Aminosäuresequenz im Protein zur Folge haben. An Position 322 des Proteins wird ein Valin durch ein Isoleucin ersetzt, an Position 573 ein Threonin durch Alanin und an Stelle 706 eine Glutaminsäure durch Lysin ausgetauscht. Diese Sequenzvariationen waren nicht auf Zelllinien beschränkt, sondern konnten auch in verschiedenen Kohorten von Krebspatienten identifiziert werden. Die Allelfrequenz der einzelnen Polymorphismen war dabei sehr unterschiedlich. Während der Val322Ile Austausch eine relativ hohe Frequenz aufwies, kamen die Thr573Ala und Glu706Lys Polymorphismen deutlich seltener vor. Generell gibt es Faktoren, die initial an der Tumorentstehung beteiligt sind und daher in Tumorpatienten mit deutlich höherer Frequenz als in der Gesamtbevölkerung gefunden werden. Beispiele für diese Gruppe sind die Keimbahnmutationen in BRCA1 und BRCA2 (Futreal *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995). Andererseits gibt es Faktoren, die keine direkte



Auswirkung auf die Entstehung des Tumors haben, aber zum Beispiel die Metastasierung begünstigen. Als Vertreter dieser Gruppe kann die GTPase RhoC genannt werden (Clark *et al.*, 2000). Sie übernimmt in der Metastasenbildung muriner Melanomzellen eine wichtige Rolle, hat aber keinen Einfluss auf das Zellwachstum des primären Tumors. Ähnlich wie RhoC haben die Polymorphismen in PTP-PEST keine Konsequenzen für die Entstehung von Tumoren. Dies wird aus der gleichen Verteilung der Allele in der Gruppe der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe deutlich. Weiterhin deutet die hohe Allelfrequenz des Val322Ile Polymorphismus an, dass dieses Allel keine negativen Auswirkungen auf ihren gesunden Träger hat.

Mutationen in Genen von Phosphatasen sind bereits oft mit schweren Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht worden. So ist der zytosolischen Phosphatase PTP-1B eine Rolle im Insulinmetabolismus durch Dephosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Insulin-Rezeptors zuzuordnen (Salmeen *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Punktmutationen im PTP-1B-Gen zu einer verstärkten Glukose-Toleranz und somit zu einem erhöhten Risiko führen, an Diabetes zu erkranken (Echwald *et al.*, 2002; Mok *et al.*, 2002). Zudem konnten Mutationen im Gen der Rezeptortyrosinphosphatase CD45 mit einer Anfälligkeit der Betroffenen für Multiple Sklerose und einer speziellen Immunschwächekrankheit assoziiert werden (Jacobsen *et al.*, 2000; Kung *et al.*, 2000).

Mutationen in Phosphatasen konnten aber auch mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Die wohl am besten charakterisierte Phosphatase in diesem Zusammenhang stellt die dual-spezifische Phosphatase PTEN dar. Diese kann als Gegenspieler des PI-3-Kinase/Akt-Signalweges einen negativen Einfluss auf physiologische Prozesse wie Zellwachstum und -migration nehmen (Dahia, 2000). Eine Störung dieser Tumorsuppressor-Funktion durch somatische Deletionen oder Keimbahnmutationen wurde bereits in verschiedenen Tumortypen und im Cowden-Syndrom beschrieben (Li *et al.*, 1997; Liaw *et al.*, 1997). Aber auch in den Genen für die Phosphatasen P2A und PP1 sind genetische Veränderungen in verschiedenen Tumoren identifiziert worden (Kohno *et al.*, 1999; Takakura *et al.*, 2000; Calin *et al.*, 2000).

Starke Hinweise für die physiologische Relevanz der hier in PTP-PEST identifizierten Polymorphismen im Zusammenhang mit Tumorentstehung ergab sich aus den Untersuchungen zur Phosphatase-Aktivität. Um dem eventuellen Einfluss der drei Polymorphismen auf den Aktivitätsstatus von PTP-PEST zu analysieren, wurde –wie unter 3.4.4 beschrieben– die Sequenzvariationen in das Gen dieser Phosphatase eingeführt und die entsprechenden Mutanten in Zellen mit PTP-PEST-freiem Hintergrund exprimiert. Dabei

konnte festgestellt werden, dass die Polymorphismen die Aktivität der Phosphatase sowohl positiv als auch negativ modulieren können. Während der Glu706Lys Polymorphismus die Aktivität von PTP-PEST um etwa 20% erniedrigt, führt das Einfügen des Isoleucinrestes an Position 322 zu einer 40%igen Erhöhung der Aktivität gegenüber der Wildtyp-Phosphatase. Den deutlichsten Unterschied jedoch führte der Thr573Ala Polymorphismus herbei, der die Aktivität um das Dreifache steigerte. Die Tatsache, dass die Thr573Ala und Glu706Lys Polymorphismen relativ selten in der Bevölkerung auftreten, spricht für deren starken Einfluss auf die Phosphatase-Aktivität. Dass die Polymorphismen die Aktivität sowohl positiv als auch negativ regulieren können, könnte den Beobachtungen entsprechen, dass sowohl der *knock-down* als auch die Überexpression von PTP-PEST die Migration von Fibroblasten inhibieren kann (Angers-Loustau *et al.*, 1999; Garton und Tonks, 1999). Dies deutet darauf hin, dass die Expression und besonders auch die Aktivität gut reguliert sein müssen um die geeignete Balance aufrechtzuerhalten.

Betont werden soll an dieser Stelle noch einmal, dass sich alle drei Polymorphismen im Bereich der katalytischen inaktiven, prolinreichen Domäne befinden. Der deutliche Einfluss der Polymorphismen auf die Phosphataseaktivität lässt somit schließen, dass der prolinreichen Domäne eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktivität von PTP-PEST zukommt. Für eine Reihe anderer Phosphatasen wurde bereits gezeigt, dass nicht-katalytische Domänen zur Regulation der Aktivität beitragen können. So werden z.B. SHP-1 und SHP-2 durch eine intramolekulare Interaktion zwischen der PTP- und der SH2-Domäne reguliert (Dechert *et al.*, 1994; Lechleider *et al.*, 1993; Pluskey *et al.*, 1995). Auch TC-PTP wird durch Deletion des nicht-katalytischen Bereichs aktiviert (Cool *et al.*, 1990). Es ist also zu konstatieren, dass die in dieser Arbeit gefundenen Polymorphismen in PTP-PEST einen inhibitorischen wie auch stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der Phosphatase haben, was die Funktion des Proteins deutlich ändern und einen Beitrag zur Erkrankung von Tumorzellen leisten könnte.

### **4.5 Identifizierung von Substraten mittels cDNA Array Analyse und 2D-Gelelektrophorese**

Für eine Reihe von PTPn wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktivität von RTKn bzw. deren Substrate und Signalwege besitzen (Ostman und Bohmer, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Ansätze etabliert, um neue Substrate von Phosphatasen zu identifizieren. Mit Hilfe der siRNA-Strategie, mit der die Expression eines Gens weitgehend unterdrückt werden kann, was zu einem sogenannten *knockdown*-Phänotyp

führt, konnte ein Einblick in die mögliche Funktion einiger ausgewählter Phosphatasen erhalten werden. Im Gegensatz zu Strategien mit dominant negativen Mutanten können dabei auch Effektoren, die durch eine Interaktion unabhängig von der katalytischen Aktivität reguliert werden, erfasst werden. Ein generelles Problem dagegen bei der Identifizierung von Substraten mittels siRNA kann in der Wahl des Zeitfensters liegen, in dem die Analysen durchgeführt werden. So kann man zwar gut den Zeitpunkt der maximalen Depletion eines Proteins bestimmen, jedoch ist eine Aussage darüber möglich, wie lange es dann dauert, bis daraus resultierende Effekte auftreten, oder ob diese durch andere Signalmoleküle kompensiert werden. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Transfektionseffizienz der siRNA-Oligonukleotide. Zwar konnte diese in den Experimenten annähernd gleich gehalten werden, jedoch lässt sich unter Verwendung eines kürzlich publizierten Vektors, der eine transiente oder stabile Expression von siRNA-Oligonukleotiden erlaubt (Brummelkamp *et al.*, 2001), die Transfektionseffizienz sowie die Reproduzierbarkeit sicherlich noch erhöhen.

Die Funktion eines Proteins bei der Regulation zellulärer Prozesse kann auch Auswirkungen auf die Expression anderer Gene haben. In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Suppression der Phosphatasen SHP-1 und PTP-H1 in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen zu einer induzierten bzw. reprimierten Expression einiger Genen führt.

Mittels 2D-Gelelektrophorese konnte auf anderer Seite gezeigt werden, dass die Depletion von Phosphatasen auch die Tyrosinphosphorylierung einiger Proteine in der Zelle verändert. So konnte nach Depletion der Phosphatasen SHP-1, LAR und PTP $\sigma$  in MCF-7 Zellen eine Reihe von Proteinen mit erhöhter oder verminderter Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte nach Repression endogener PTP $\sigma$  eine verstärkte Phosphorylierung von PAK2 (*p21-activated kinase*) beobachtet werden. Den Kinasen der PAK-Familie wird eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Aktin-Gerüsts zugeschrieben (Renkema *et al.*, 2002) und PAK2 im besonderen eine wachstumshemmende Funktion in Epithelzellen (Wilkes *et al.*, 2003). Die Phosphatase PTP $\sigma$  besitzt in ihrer extrazellulären Domäne eine zelladhäsions-ähnliche Domäne, wodurch ihr eine Funktion beim Anhaften der Zelle an den Untergrund zugeschrieben werden kann. Demnach könnte PTP $\sigma$  für die Phosphorylierung von PAK2 verantwortlich sein, was nach Depletion der Phosphatase das Wachstum verstärkt inhibieren würde. Diese Aussage wird gestützt durch die Tatsache, dass auch die Phosphorylierung von Alpha-Aktinin-4 verstärkt wird, einem Protein, in dessen Abwesenheit die Zell-Beweglichkeit verstärkt wird (Kos *et al.*, 2003).

Auch nach Repression endogener SHP-1 Expression konnten einige Proteine mit veränderter Tyrosinphosphorylierung entdeckt werden. Interessanterweise ging die Phosphorylierung der

Beta-2 Untereinheit des G-Proteins zurück. G-Proteine sind als Modulatoren oder Überträgern von verschiedenen transmembranären Signalsystemen involviert, wobei die Beta- und Gamma-Kette für die GTPase-Aktivität und dem Austausch von GDP durch GTP verantwortlich sind. Diese Beobachtung spricht für eine Rolle von SHP-1 in der Signalweiterleitung proximal der Transmembrandomäne.

Generell zeigt sich die kombinierte Strategie aus siRNA-Technologie und cDNA-Filteranalyse oder 2D-Gelelektrophorese durchaus als nützlich, Gene zu identifizieren, die mit einem Zielprotein in Zusammenhang stehen.

### **4.6 SHP-1 als Regulator der HER2 Aktivierung**

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits mehrere Phosphatasen für die Negativregulation des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor impliziert. Dies schließt die Rezeptortyrosinphosphatasen PTP $\sigma$  und LAR (Suarez Pestana *et al.*, 1999; Mooney *et al.*, 1997) sowie die zytoplasmatischen PTPn SHP-1, PTP1B und TCPTP ein (Flint *et al.*, 1997; Tomic *et al.*, 1995; Tenev *et al.*, 1997; Tiganis *et al.*, 1998). Dass Phosphatasen auch in der Positivregulation der Signalweiterleitung involviert sein können, wurde bisher eingehend an der Phosphatase SHP-2 verdeutlicht. Diese kann innerhalb eines Multiprotein-Komplexes mit Gab1 interagieren und positiv die EGF-induzierte MAPK Aktivität regulieren (Shi *et al.*, 1998). Auch für SHP-1 gibt es bereits Hinweise darauf, dass diese Phosphatase als Positivregulator wirken kann. So wurde ein positiver Effekt überexprimierter SHP-1 in 293-Zellen auf die EGF- oder seruminduzierte Zellteilung beobachtet (Su *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SHP-1 einen regulatorischen Einfluss auf die Signaltransduktion von HER2 hat, da sich die Phosphorylierung von HER2 als sensitiv gegenüber endogener SHP-1-Aktivität erwies. So verminderte die Unterdrückung der zellulären SHP-1 Expression die Liganden-induzierte Phosphorylierung von HER2 in der Brustkrebszelllinie MCF-7. Dieser in Gegensatz zu Überexpressionsstudien an Phosphatasen eher moderate, aber deutliche und reproduzierbare Effekt ist vermutlich auf die Komplexität der *in vivo* Situation zurückzuführen. So ist anzunehmen, dass zur strikten und zugleich fein modulierten Regulation von HER2-Signalen mehrere Phosphatasen zusammenwirken. Zudem konnte in diesem Zellsystem die Expression der Phosphatase durch die siRNA-Technologie nicht zu 100% unterdrückt werden.

Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, dass die Familie der Phosphatasen eine nur kleine Anzahl von Mitgliedern mit eher unspezifischer „Wächterfunktion“ gegenüber der

Gesamtphosphorylierung der Zelle umfasst, haben Forschungen der letzten Jahre ein entgegengesetztes Bild ergeben. Eine Vielzahl an strukturellen, biochemischen und genetischen Studien veranschaulichte, dass PTPn *in vivo* eine außerordentliche Substratspezifität besitzen und dadurch spezifisch Signaltransduktionswege und physiologische Prozesse regulieren (Tonks *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde die gegenüber HER2 gezeigte Spezifität von SHP-1 dadurch bekräftigt, dass die Blockierung endogener SHP-1 Expression wohl mit einer verringerten Phosphorylierung von HER2 einherging, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der eng verwandten Familienmitglieder EGFR und HER3 hat. Ein weiterer Punkt, der für die Spezifität von SHP-1 gegenüber der HER2-Phosphorylierung spricht, sind die erzielten Ergebnisse mit der strukturell sehr ähnlichen Phosphatase SHP-2, die bei gleicher Repression keine veränderte Phosphorylierung von HER2 zur Folge hat.

Für das Adaptermolekül Shc konnte eine Bindung an und Phosphorylierung durch den aktivierten HER2-Rezeptor gezeigt werden (Segatto *et al.*, 1993). Außerdem wurde für Shc eine Rolle in der HER2-vermittelten Tumorgenese beschrieben (Dankort *et al.*, 2001). Für MCF-7 Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss von SHP-1 Repression auf die  $\beta$ -Heregulin-induzierte Shc-Phosphorylierung beobachtet werden. Diese Beobachtung stützt die bisherigen Veröffentlichungen, dass Shc eine Rolle in der HER2-vermittelten Signaltransduktion spielt.

Im Gegensatz zu Shc wurde die Phosphorylierung von Gab1 durch die Unterdrückung endogener SHP-1 Expression nicht beeinträchtigt. Während Gab1 in neueren Veröffentlichungen als Effektor von HER2 beschrieben wird und für die HER2-getriebene Transformation von Zellen notwendig zu sein scheint, konnte eine direkte Bindung von Gab1 an und Phosphorylierung durch HER2 bislang noch nicht gezeigt werden (Settle *et al.*, 2003; Yamasaki *et al.*, 2003). Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Gab1 in MCF-7 Zellen nach Stimulation mit  $\beta$ -Heregulin vornehmlich durch Heterodimerisierungspartner von HER2 phosphoryliert wird, deren Aktivität nicht durch Repression endogener SHP-1 beeinflusst wird.

Die Dimerisierung und Aktivierung von RTKs wie HER2 oder dem EGFR führt letztlich zur Aktivierung von MAPKs, die das Signal in den Nukleus weiterleiten und dort die Expression von Effektorgenen regulieren (Chang *et al.*, 2001). Der am besten bekannte Signalweg, der in der Aktivierung von MAPKs resultiert, führt über das Adaptermolekül Shc und schließt die Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplex sowie die Aktivierung der kleinen GTPase Ras ein (Ravichandran *et al.*, 2001). Zusätzlich zu diesem Shc-involvierenden Signalweg wurde

kürzlich Gab1 als weiteres Signaltansduktionsmolekül identifiziert, welches das durch RTKn vermittelte Signal mit der Aktivierung von MAPKn verbindet (Rodrigues *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der SHP-1 Expression zu einer starken Reduktion der Aktivität der MAPKn ERK1/2 führt. Die vorangegangene Beobachtung, dass SHP-1 zwar die Phosphorylierung von Shc nicht aber von Gab1 beeinflussen kann, führt zu der Vermutung, dass die partielle Inhibierung der MAPK-Aktivität auf den Ausfall der Shc-vermittelten Signalweiterleitung zurückzuführen ist. In Einklang stehen diese Ergebnisse mit Publikationen über SHP-2, in denen beschrieben wird, dass die Bindung zwischen SHP-2 und Gab1 zwar essentiell für die Signalweiterleitung ist, Gab1 selbst aber kein Substrat für SHP-2 darstellt (Shi *et al.*, 2000; Cunnick *et al.*, 2002).

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SHP-1 das Potential zur Positivregulation des HER2-Rezeptors sowie der Rezeptor-proximalen Signalweiterleitung nicht nur in MCF-7, sondern auch in SKBr3 Zellen besitzt. Der genaue Mechanismus ist jedoch weiterhin ungeklärt. Eine naheliegende Möglichkeit ist die Rekrutierung von SHP-1 zu aktivierten Rezeptorkomplexen. Einen ersten Hinweis hierfür bietet die beobachtete Kopräzipitation von HER2 mit SHP-1 in SKBr3 Zellen. Eine weitere mechanistische Überlegung betrifft die enzymatische Aktivierung von SHP-1. Für einige Phosphatasen konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität durch Mechanismen wie Phosphorylierung oder Substratbindung reguliert wird. So wird beispielsweise SHP-1 nach NGF-Stimulation in PC12-Zellen phosphoryliert und damit aktiviert (Vambutas *et al.*, 1995). In dieser Arbeit konnte jedoch keine Phosphorylierung der Phosphatase nach Stimulation mit  $\beta$ -Heregulin beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität von SHP-1 in diesem Falle wohl vorwiegend über Relokalisation der Phosphatase und Rekrutierung zum Substrat vermittelt wird.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, genetische Faktoren, die mit der Progression von Krebserkrankungen in Verbindung stehen könnten, zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Im Fokus des Interesses stand dabei zunächst ein kürzlich identifizierter Polymorphismus im Gen der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 4*). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bedeutung dieses Gly388Arg Polymorphismus für Plattenepithelkarzinome und Melanome demonstriert werden. So konnte der Aminosäureaustausch in verschiedenen Patientenkollektiven mit einer deutlich beschleunigten Tumorprogression sowie einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass dem FGFR4 und insbesondere dessen Arg388-Variante eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener Tumortypen zukommt.

Um die Bedeutung des Polymorphismus *in vivo* noch näher zu charakterisieren, wurde ein Maus-Modell mit dem Arg388-Austausch an homologer Stelle des murinen FGFR4 etabliert. Zur Anwendung eines „*knock-in*“-Ansatzes unter Beibehaltung der Genstruktur mussten im Vorfeld Expressionsanalysen und Genotypisierungen des Maus-FGFR4 in verschiedenen Mausstämmen durchgeführt werden.

Über den FGFR4 hinaus wurden 13 weitere Proteine in insgesamt 19 verschiedenen Brustkrebszelllinien auf genetische Veränderungen hin untersucht. Neben zahlreichen stillen Mutationen konnten dabei in den Genen für EGFR, HER2 sowie den Phosphatasen PTP $\sigma$ , SHP-2 und PTP-PEST insgesamt sieben Polymorphismen, die mit einer Änderung der Aminosäuresequenz einhergingen, identifiziert werden. Ferner wurden für die Phosphatase BDP-1 zwei bislang unbekannte Isoformen entdeckt. Da der EGFR und HER2 in Zusammenhang mit Krebserkrankungen bekanntermaßen eine wichtige Rolle einnehmen, wurden die Polymorphismen dieser beiden Gene im bereits oben beschriebenen Kollektiv von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen näher analysiert.

Ebenso wurden die neu entdeckten Polymorphismen Thr573Ala und Glu706Lys sowie die bereits beschriebene Sequenzvariante Val322Ile im Gen von PTP-PEST näher charakterisiert. Dabei hat sich gezeigt, dass es sich bei diesen Polymorphismen um Keimbahnmutationen handelt, die mit sehr unterschiedlicher Frequenz in Krebspatienten auftreten. Biochemische Untersuchungen ergaben für diese Aminosäuresubstitutionen einen jeweils sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Phosphataseaktivität.

Neben dieser im Rahmen der genetischen Analyse identifizierten Proteine sollte die Funktion weiterer Phosphatasen näher betrachtet und dabei insbesondere nach neuen Substraten

gesucht werden. Unter Anwendung der siRNA-Technologie wurden hierzu verschiedene Phosphatasen depletiert und daraus resultierende Veränderungen auf Protein- sowie mRNA-Ebene mittels 2D-Gelelektrophorese und cDNA-Array-Methode analysiert. In genaueren Untersuchungen der zytosolischen Phosphatase SHP-1 konnte erstmals deren Bedeutung als Positivregulator auf die durch HER2 vermittelte Signalkaskade in Brustkrebszellen gezeigt werden. Repression dieser Phosphatase hatte nicht nur eine Verminderung der Aktivität von HER2 selbst, sondern auch eine Phosphorylierungsabnahme des Adapterproteins Shc sowie die Verringerung der MAPK-Aktivität zur Folge.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erlauben eine vertiefte Diskussion über die Bedeutung von bekannten wie vor allem auch neu identifizierten Sequenzvarianten in RTKs und PTPs im Kontext der Pathogenese humaner Tumoren. Zudem konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der siRNA-Technologie die Rolle von Phosphatasen im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen sehr gut näher charakterisiert werden kann.



## 6 Literaturverzeichnis

Abremski, K. and S. Gottesman (1981). "Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda." *J Mol Biol* **153**(1): 67-78.

Ahmed, N. U., M. Ueda, et al. (1997). "Expression of fibroblast growth factor receptors in naevus-cell naevus and malignant melanoma." *Melanoma Res* **7**(4): 299-305.

Alimandi, M., L. M. Wang, et al. (1997). "Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors." *Embo J* **16**(18): 5608-17.

Angers-Loustau, A., J. F. Cote, et al. (1999). "Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts." *J Cell Biol* **144**(5): 1019-31.

Angers-Loustau, A., J. F. Cote, et al. (1999). "Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion." *Biochem Cell Biol* **77**(6): 493-505.

Armstrong, E., J. Partanen, et al. (1992). "Localization of the fibroblast growth factor receptor-4 gene to chromosome region 5q33-qter." *Genes Chromosomes Cancer* **4**(1): 94-8.

Azemar, M., M. Schmidt, et al. (2000). "Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo." *Int J Cancer* **86**(2): 269-75.

Bange, J., D. Prechtel, et al. (2002). "Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele." *Cancer Res* **62**(3): 840-7.

Barford, D., A. J. Flint, et al. (1994). "Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B." *Science* **263**(5152): 1397-404.

Bargmann, C. I. and R. A. Weinberg (1988). "Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(15): 5394-8.

Bargmann, C. I. and R. A. Weinberg (1988). "Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion." *Embo J* **7**(7): 2043-52.

Baribault, H., M. Wilson-Heiner, et al. (1997). "Functional analysis of mouse keratin 8 in polyoma middle T-induced mammary gland tumours." *Transgenic Res* **6**(6): 359-67.

Barnard, D., B. Diaz, et al. (1998). "Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms." *Oncogene* **17**(12): 1539-47.

Barnea, G., M. Grumet, et al. (1994). "Close similarity between receptor-linked tyrosine phosphatase and rat brain proteoglycan." *Cell* **76**(2): 205.

Berger, W., U. Setinek, et al. (1999). "Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells." *Int J Cancer* **83**(3): 415-23.

Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* **411**(6835): 355-65.

Blunt, A. G., A. Lawshe, et al. (1997). "Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) receptors by alternatively spliced FGF-8 ligands." *J Biol Chem* **272**(6): 3733-8.

- Bredel, M., I. F. Pollack, et al. (1997). "Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high-grade gliomas." *Clin Cancer Res* **3**(11): 2157-64.
- Brookes, A. J. (1999). "The essence of SNPs." *Gene* **234**(2): 177-86.
- Brown-Shimer, S., K. A. Johnson, et al. (1992). "Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene." *Cancer Res* **52**(2): 478-82.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* **296**(5567): 550-3.
- Bugler, B., F. Amalric, et al. (1991). "Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor." *Mol Cell Biol* **11**(1): 573-7.
- Burgess, W. H., C. A. Dionne, et al. (1990). "Characterization and cDNA cloning of phospholipase C-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* **10**(9): 4770-7.
- Burgess, W. H. and T. Maciag (1989). "The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins." *Annu Rev Biochem* **58**: 575-606.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." *Mol Cell Biol* **15**(2): 954-63.
- Calin, G. A., M. G. di Iasio, et al. (2000). "Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms." *Oncogene* **19**(9): 1191-5.
- Cappellen, D., C. De Oliveira, et al. (1999). "Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas." *Nat Genet* **23**(1): 18-20.
- Cavallaro, U., J. Niedermeyer, et al. (2001). "N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling." *Nat Cell Biol* **3**(7): 650-7.
- Chakravarti, A. (1998). "It's raining SNPs, hallelujah?" *Nat Genet* **19**(3): 216-7.
- Chakravarti, A. (1999). "Population genetics--making sense out of sequence." *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 56-60.
- Chang, J. L., Y. P. Tsao, et al. (2001). "The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix." *J Biomed Sci* **8**(2): 206-13.
- Charbonneau, H., N. K. Tonks, et al. (1989). "Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5252-6.
- Charbonneau, H., N. K. Tonks, et al. (1988). "The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7182-6.
- Charest, A., J. Wagner, et al. (1996). "Phosphotyrosine-independent binding of SHC to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. Evidence for extended phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain recognition specificity." *J Biol Chem* **271**(14): 8424-9.
- Charest, A., J. Wagner, et al. (1997). "Coupling of the murine protein tyrosine phosphatase PEST to the epidermal growth factor (EGF) receptor through a Src homology 3 (SH3) domain-mediated association with Grb2." *Oncogene* **14**(14): 1643-51.

- Charest, A., J. Wagner, et al. (1995). "Murine protein tyrosine phosphatase-PEST, a stable cytosolic protein tyrosine phosphatase." *Biochem J* **308** ( Pt 2): 425-32.
- Chesi, M., E. Nardini, et al. (1997). "Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3." *Nat Genet* **16**(3): 260-4.
- Clark, E. A., T. R. Golub, et al. (2000). "Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC." *Nature* **406**(6795): 532-5.
- Collins, F. S., M. S. Guyer, et al. (1997). "Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation." *Science* **278**(5343): 1580-1.
- Colomer, R., J. Aparicio, et al. (1997). "Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma." *Br J Cancer* **76**(9): 1215-20.
- Conboy, J., Y. W. Kan, et al. (1986). "Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9512-6.
- Cong, F., S. Spencer, et al. (2000). "Cytoskeletal protein PSTPIP1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation." *Mol Cell* **6**(6): 1413-23.
- Cool, D. E., N. K. Tonks, et al. (1990). "Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7280-4.
- Cool, D. E., N. K. Tonks, et al. (1990). "Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7280-4.
- Cool, D. E., N. K. Tonks, et al. (1989). "cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5257-61.
- Cote, J. F., C. E. Turner, et al. (1999). "Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST." *J Biol Chem* **274**(29): 20550-60.
- Coussens, L., T. L. Yang-Feng, et al. (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science* **230**(4730): 1132-9.
- Cunnick, J. M., S. Meng, et al. (2002). "Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2." *J Biol Chem* **277**(11): 9498-504.
- Cunningham, B. A. (1995). "Cell adhesion molecules as morphoregulators." *Curr Opin Cell Biol* **7**(5): 628-33.
- Dahia, P. L. (2000). "PTEN, a unique tumor suppressor gene." *Endocr Relat Cancer* **7**(2): 115-29.
- Daniel, J. M. and A. B. Reynolds (1997). "Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function." *Bioessays* **19**(10): 883-91.
- Dankort, D., B. Maslikowski, et al. (2001). "Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1540-51.

- Daphna-Iken, D., D. B. Shankar, et al. (1998). "MMTV-Fgf8 transgenic mice develop mammary and salivary gland neoplasia and ovarian stromal hyperplasia." *Oncogene* **17**(21): 2711-7.
- Dechert, U., M. Adam, et al. (1994). "Characterization of protein tyrosine phosphatase SH-PTP2. Study of phosphopeptide substrates and possible regulatory role of SH2 domains." *J Biol Chem* **269**(8): 5602-11.
- Deng, C. X., A. Wynshaw-Boris, et al. (1994). "Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization." *Genes Dev* **8**(24): 3045-57.
- Denu, J. M., D. L. Lohse, et al. (1996). "Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2493-8.
- Denu, J. M., G. Zhou, et al. (1995). "The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase." *Biochemistry* **34**(10): 3396-403.
- Dhanasekaran, N. and E. Premkumar Reddy (1998). "Signaling by dual specificity kinases." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1447-55.
- Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, et al. (1987). "erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells." *Science* **237**(4811): 178-82.
- DiGabriele, A. D., I. Lax, et al. (1998). "Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor." *Nature* **393**(6687): 812-7.
- Dionne, C. A., G. Crumley, et al. (1990). "Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors." *Embo J* **9**(9): 2685-92.
- Doherty, P. and F. S. Walsh (1996). "CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth." *Mol Cell Neurosci* **8**(2-3): 99-111.
- Downward, J. (1997). "Cell cycle: routine role for Ras." *Curr Biol* **7**(4): R258-60.
- Echwald, S. M., H. Bach, et al. (2002). "A P387L variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired serine phosphorylation of PTP-1B in vitro." *Diabetes* **51**(1): 1-6.
- Edery, P., C. Eng, et al. (1997). "RET in human development and oncogenesis." *Bioessays* **19**(5): 389-95.
- Elchebly, M., P. Payette, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." *Science* **283**(5407): 1544-8.
- El-Deiry, W. S. (2003). "The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity." *Oncogene* **22**(47): 7486-95.
- Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." *Science* **286**(5439): 487-91.
- Fang, K. S., K. Barker, et al. (1994). "A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain." *J Biol Chem* **269**(19): 14056-63.
- Feng, S., F. Wang, et al. (1997). "Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells." *Cancer Res* **57**(23): 5369-78.
- Finch, P. W., J. S. Rubin, et al. (1989). "Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth." *Science* **245**(4919): 752-5.

Fleming, T. P., A. Saxena, et al. (1992). "Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors." *Cancer Res* **52**(16): 4550-3.

Flint, A. J., T. Tiganis, et al. (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1680-5.

Flores, E., G. Roy, et al. (1994). "Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase." *Mol Cell Biol* **14**(7): 4938-46.

Fogar, P., D. Basso, et al. (1997). "Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias." *Anticancer Res* **17**(2B): 1227-30.

Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Vascular physiology. A family of angiogenic peptides." *Nature* **329**(6141): 671-2.

Frangioni, J. V., P. H. Beahm, et al. (1992). "The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence." *Cell* **68**(3): 545-60.

Freeman, R. M., Jr., J. Plutzky, et al. (1992). "Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11239-43.

Fukunaga, K., T. Noguchi, et al. (2000). "Requirement for protein-tyrosine phosphatase SHP-2 in insulin-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase." *J Biol Chem* **275**(7): 5208-13.

Futreal, P. A., Q. Liu, et al. (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." *Science* **266**(5182): 120-2.

Gao, G. and M. Goldfarb (1995). "Heparin can activate a receptor tyrosine kinase." *Embo J* **14**(10): 2183-90.

Garton, A. J., M. R. Burnham, et al. (1997). "Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition." *Oncogene* **15**(8): 877-85.

Garton, A. J., A. J. Flint, et al. (1996). "Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6408-18.

Garton, A. J. and N. K. Tonks (1999). "Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST." *J Biol Chem* **274**(6): 3811-8.

Gaudenz, K., E. Roessler, et al. (1998). "Analysis of patients with craniosynostosis syndromes for a pro246Arg mutation of FGFR4." *Mol Genet Metab* **64**(1): 76-9.

Ghosh, A. K., D. B. Shankar, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of human FGF8 alternative messenger RNA forms." *Cell Growth Differ* **7**(10): 1425-34.

Giri, D., F. Ropiquet, et al. (1999). "Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer." *Clin Cancer Res* **5**(5): 1063-71.

Goldfarb, M., R. Deed, et al. (1991). "Cell transformation by Int-2--a member of the fibroblast growth factor family." *Oncogene* **6**(1): 65-71.

- Goldstein, B. J., A. Bittner-Kowalczyk, et al. (2000). "Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein." *J Biol Chem* **275**(6): 4283-9.
- Greenfield, C., I. Hiles, et al. (1989). "Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor." *Embo J* **8**(13): 4115-23.
- Gu, M. X., J. D. York, et al. (1991). "Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5867-71.
- Guan, J. L. and D. Shalloway (1992). "Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation." *Nature* **358**(6388): 690-2.
- Guan, K. L., R. J. Deschenes, et al. (1991). "Cloning and expression of a yeast protein tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* **266**(20): 12964-70.
- Gullick, W. J. (1994). "A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two." *Eur J Cancer* **30A**(14): 2186.
- Hackel, P. O., M. Gishizky, et al. (2001). "Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal." *Biol Chem* **382**(12): 1649-62.
- Halushka, M. K., J. B. Fan, et al. (1999). "Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis." *Nat Genet* **22**(3): 239-47.
- Hanahan, D. (1985). "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes." *Nature* **315**(6015): 115-22.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hengge, A. C., G. A. Sowa, et al. (1995). "Nature of the transition state of the protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction." *Biochemistry* **34**(43): 13982-7.
- Hennige, A. M., R. Lammers, et al. (2001). "Inhibition of Ret oncogene activity by the protein tyrosine phosphatase SHP1." *Endocrinology* **142**(10): 4441-7.
- Hermanson, M., K. Funa, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops." *Cancer Res* **52**(11): 3213-9.
- Holgado-Madruga, M., D. R. Emlet, et al. (1996). "A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling." *Nature* **379**(6565): 560-4.
- Holt, J. A., G. Luo, et al. (2003). "Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis." *Genes Dev* **17**(13): 1581-91.
- Hooper, M., K. Hardy, et al. (1987). "HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells." *Nature* **326**(6110): 292-5.
- Hughes, S. E. (1996). "Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries." *Cardiovasc Res* **32**(3): 557-69.
- Hughes, S. E. (1997). "Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues." *J Histochem Cytochem* **45**(7): 1005-19.

- Humphreys, R. C. and L. Hennighausen (2000). "Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer." *Oncogene* **19**(8): 1085-91.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* **80**(2): 225-36.
- Hunter, T. and B. M. Sefton (1980). "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(3): 1311-5.
- Imamura, T., K. Engleka, et al. (1990). "Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence." *Science* **249**(4976): 1567-70.
- Jaakkola, S., P. Salmikangas, et al. (1993). "Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers." *Int J Cancer* **54**(3): 378-82.
- Jacobsen, M., D. Schweer, et al. (2000). "A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis." *Nat Genet* **26**(4): 495-9.
- Jacquemier, J., J. Adelaide, et al. (1994). "Expression of the FGFR1 gene in human breast-carcinoma cells." *Int J Cancer* **59**(3): 373-8.
- Jaye, M., R. Howk, et al. (1986). "Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization." *Science* **233**(4763): 541-5.
- Jia, Z., D. Barford, et al. (1995). "Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B." *Science* **268**(5218): 1754-8.
- Johnson, D. E. and L. T. Williams (1993). "Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family." *Adv Cancer Res* **60**: 1-41.
- Johnston, C. L., H. C. Cox, et al. (1995). "bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement." *Biochem J* **306** ( Pt 2): 609-16.
- Kavanaugh, W. M., C. W. Turck, et al. (1995). "PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine." *Science* **268**(5214): 1177-9.
- Keegan, K., D. E. Johnson, et al. (1991). "Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4): 1095-9.
- Keilhack, H., M. Muller, et al. (2001). "Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1." *J Cell Biol* **152**(2): 325-34.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-70.
- Klaman, L. D., O. Boss, et al. (2000). "Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice." *Mol Cell Biol* **20**(15): 5479-89.
- Klingmuller, U., U. Lorenz, et al. (1995). "Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals." *Cell* **80**(5): 729-38.
- Kohno, T., S. Takakura, et al. (1999). "Alterations of the PPP1R3 gene in human cancer." *Cancer Res* **59**(17): 4170-4.

- Korah, R. M., V. Sysounthone, et al. (2000). "Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells." *Cancer Res* **60**(3): 733-40.
- Kos, C. H., T. C. Le, et al. (2003). "Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease." *J Clin Invest* **111**(11): 1683-90.
- Kouhara, H., Y. R. Hadari, et al. (1997). "A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway." *Cell* **89**(5): 693-702.
- Kouhara, H., M. Koga, et al. (1994). "Transforming activity of a newly cloned androgen-induced growth factor." *Oncogene* **9**(2): 455-62.
- Kraus, M. H., W. Issing, et al. (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9193-7.
- Krueger, N. X., M. Streuli, et al. (1990). "Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases." *Embo J* **9**(10): 3241-52.
- Kruglyak, L. (1997). "The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies." *Nat Genet* **17**(1): 21-4.
- Kuhn, R., F. Schwenk, et al. (1995). "Inducible gene targeting in mice." *Science* **269**(5229): 1427-9.
- Kung, C., J. T. Pingel, et al. (2000). "Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease." *Nat Med* **6**(3): 343-5.
- Lander, E. S. (1996). "The new genomics: global views of biology." *Science* **274**(5287): 536-9.
- Lechleider, R. J., S. Sugimoto, et al. (1993). "Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor." *J Biol Chem* **268**(29): 21478-81.
- Lemoine, N. R., D. M. Barnes, et al. (1992). "Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer." *Br J Cancer* **66**(6): 1116-21.
- Leung, H. Y., W. J. Gullick, et al. (1994). "Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer." *Int J Cancer* **59**(5): 667-75.
- Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* **275**(5308): 1943-7.
- Li, P. P., A. Nakanishi, et al. (2000). "Role of simian virus 40 Vp1 cysteines in virion infectivity." *J Virol* **74**(23): 11388-93.
- Li, R. Y., F. Gaits, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of an SH2-containing protein tyrosine phosphatase is coupled to platelet thrombin receptor via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G-protein." *Embo J* **14**(11): 2519-26.
- Li, Y., C. Basilico, et al. (1994). "Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors." *Mol Cell Biol* **14**(11): 7660-9.
- Liaw, D., D. J. Marsh, et al. (1997). "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome." *Nat Genet* **16**(1): 64-7.
- Lin, R. Y., P. A. Argenta, et al. (1995). "Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients." *Clin Cancer Res* **1**(3): 327-31.



Linder, M. W., R. A. Prough, et al. (1997). "Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency." *Clin Chem* **43**(2): 254-66.

Lombroso, P. J., G. Murdoch, et al. (1991). "Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7242-6.

Lorenz, U., K. S. Ravichandran, et al. (1994). "Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1824-34.

Lowenstein, E. J., R. J. Daly, et al. (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." *Cell* **70**(3): 431-42.

Luna, E. J. and A. L. Hitt (1992). "Cytoskeleton-plasma membrane interactions." *Science* **258**(5084): 955-64.

MacArthur, C. A., A. Lawshe, et al. (1995). "FGF-8 isoforms differ in NIH3T3 cell transforming potential." *Cell Growth Differ* **6**(7): 817-25.

MacArthur, C. A., A. Lawshe, et al. (1995). "FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development." *Development* **121**(11): 3603-13.

Maegawa, H., S. Ugi, et al. (1994). "Insulin receptor kinase phosphorylates protein tyrosine phosphatase containing Src homology 2 regions and modulates its PTPase activity in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **199**(2): 780-5.

Malarkey, K., C. M. Belham, et al. (1995). "The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors." *Biochem J* **309** ( Pt 2): 361-75.

Margolis, B., F. Bellot, et al. (1990). "Tyrosine kinase activity is essential for the association of phospholipase C-gamma with the epidermal growth factor receptor." *Mol Cell Biol* **10**(2): 435-41.

Margolis, B., S. G. Rhee, et al. (1989). "EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling." *Cell* **57**(7): 1101-7.

Markowitz, S., J. Wang, et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." *Science* **268**(5215): 1336-8.

Marsh, S. K., G. S. Bansal, et al. (1999). "Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer." *Oncogene* **18**(4): 1053-60.

Matozaki, T., T. Suzuki, et al. (1994). "Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers." *J Biol Chem* **269**(3): 2075-81.

Matthews, R. J., D. B. Bowne, et al. (1992). "Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences." *Mol Cell Biol* **12**(5): 2396-405.

Maurel, P., U. Rauch, et al. (1994). "Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7): 2512-6.

McKay, J. A., J. F. Loane, et al. (2002). "c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer." *Br J Cancer* **86**(4): 568-73.

McLeskey, S. W., I. Y. Ding, et al. (1994). "MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands." *Cancer Res* **54**(2): 523-30.

Mok, A., H. Cao, et al. (2002). "A single nucleotide polymorphism in protein tyrosine phosphatase PTP-1B is associated with protection from diabetes or impaired glucose tolerance in Oji-Cree." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(2): 724-7.

Moller, N. P., K. B. Moller, et al. (1994). "Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7477-81.

Mooney, R. A., D. T. Kulas, et al. (1997). "The protein tyrosine phosphatase LAR has a major impact on insulin receptor dephosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **235**(3): 709-12.

Moriai, T., M. S. Kobrin, et al. (1994). "A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 10217-21.

Moriai, T., M. S. Kobrin, et al. (1993). "Cloning of a variant epidermal growth factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **191**(3): 1034-9.

Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997). "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 174-9.

Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997). "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 174-9.

Muenke, M. and U. Schell (1995). "Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders." *Trends Genet* **11**(8): 308-13.

Muller, W. J., E. Sinn, et al. (1988). "Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene." *Cell* **54**(1): 105-15.

Neal, D. E., L. Sharples, et al. (1990). "The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer." *Cancer* **65**(7): 1619-25.

Nicholson, S., J. Richard, et al. (1991). "Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup." *Br J Cancer* **63**(1): 146-50.

Noguchi, T., T. Matozaki, et al. (1994). "Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation." *Mol Cell Biol* **14**(10): 6674-82.

Olson, D. C., C. Deng, et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptor 4, implicated in progression of islet cell carcinogenesis by its expression profile, does not contribute functionally." *Cell Growth Differ* **9**(7): 557-64.

Orban, P. C., D. Chui, et al. (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6861-5.

Ornitz, D. M. and P. Leder (1992). "Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3." *J Biol Chem* **267**(23): 16305-11.

Ornitz, D. M., J. Xu, et al. (1996). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family." *J Biol Chem* **271**(25): 15292-7.

- Ostman, A. and F. D. Bohmer (2001). "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases." *Trends Cell Biol* **11**(6): 258-66.
- Ostman, A., Q. Yang, et al. (1994). "Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9680-4.
- Palka, H. L., M. Park, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1." *J Biol Chem* **278**(8): 5728-35.
- Papewalis, J., A. Nikitin, et al. (1991). "G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene." *Nucleic Acids Res* **19**(19): 5452.
- Partanen, J., T. P. Makela, et al. (1991). "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern." *Embo J* **10**(6): 1347-54.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." *Nature* **373**(6515): 573-80.
- Penault-Llorca, F., F. Bertucci, et al. (1995). "Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer." *Int J Cancer* **61**(2): 170-6.
- Perkins, L. A., I. Larsen, et al. (1992). "corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso." *Cell* **70**(2): 225-36.
- Peters, G., A. E. Lee, et al. (1986). "Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus." *Nature* **320**(6063): 628-31.
- Pierce, J. H., P. Arnstein, et al. (1991). "Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells." *Oncogene* **6**(7): 1189-94.
- Plotnikov, A. N., S. R. Hubbard, et al. (2000). "Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity." *Cell* **101**(4): 413-24.
- Pluskey, S., T. J. Wandless, et al. (1995). "Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains." *J Biol Chem* **270**(7): 2897-900.
- Pot, D. A., T. A. Woodford, et al. (1991). "Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* **266**(29): 19688-96.
- Prigent, S. A. and N. R. Lemoine (1992). "The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands." *Prog Growth Factor Res* **4**(1): 1-24.
- Ravichandran, K. S. (2001). "Signaling via Shc family adapter proteins." *Oncogene* **20**(44): 6322-30.
- Renkema, G. H., K. Pulkkinen, et al. (2002). "Cdc42/Rac1-mediated activation primes PAK2 for superactivation by tyrosine phosphorylation." *Mol Cell Biol* **22**(19): 6719-25.
- Risch, N. and K. Merikangas (1996). "The future of genetic studies of complex human diseases." *Science* **273**(5281): 1516-7.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 180-6.
- Rogers, S., R. Wells, et al. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* **234**(4774): 364-8.

Ron, D., R. Reich, et al. (1993). "Fibroblast growth factor receptor 4 is a high affinity receptor for both acidic and basic fibroblast growth factor but not for keratinocyte growth factor." *J Biol Chem* **268**(8): 5388-94.

Rusch, V. W., K. S. Albain, et al. (1993). "Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small-cell lung cancer after concurrent induction chemoradiotherapy. A Southwest Oncology Group trial." *J Thorac Cardiovasc Surg* **105**(1): 97-104; discussion 104-6.

Salmeen, A., J. N. Andersen, et al. (2000). "Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." *Mol Cell* **6**(6): 1401-12.

Salven, P., L. Teerenhovi, et al. (1999). "A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma." *Blood* **94**(10): 3334-9.

Sauer, B. and N. Henderson (1988). "The cyclization of linear DNA in *Escherichia coli* by site-specific recombination." *Gene* **70**(2): 331-41.

Schlessinger, J., I. Lax, et al. (1995). "Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?" *Cell* **83**(3): 357-60.

Segatto, O., F. Lonardo, et al. (1990). "The role of autophosphorylation in modulation of erbB-2 transforming function." *New Biol* **2**(2): 187-95.

Segatto, O., G. Pelicci, et al. (1993). "Shc products are substrates of erbB-2 kinase." *Oncogene* **8**(8): 2105-12.

Settle, M., M. D. Gordon, et al. (2003). "Genetic identification of effectors downstream of Neu (ErbB-2) autophosphorylation sites in a *Drosophila* model." *Oncogene* **22**(13): 1916-26.

Shackleford, G. M., C. A. MacArthur, et al. (1993). "Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in Wnt-1 transgenic mice by insertional activation of int-2/Fgf-3 and hst/Fgf-4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 740-4.

Sham, P., J. S. Bader, et al. (2002). "DNA Pooling: a tool for large-scale association studies." *Nat Rev Genet* **3**(11): 862-71.

Shaoul, E., R. Reich-Slotky, et al. (1995). "Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways." *Oncogene* **10**(8): 1553-61.

Shen, S. H., L. Bastien, et al. (1991). "A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases." *Nature* **352**(6337): 736-9.

Shen, Y., P. Lyons, et al. (2000). "The noncatalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation in vivo." *J Biol Chem* **275**(2): 1405-13.

Shi, Z. Q., D. H. Yu, et al. (2000). "Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1526-36.

Shin, E. Y., B. H. Lee, et al. (2000). "Up-regulation and co-expression of fibroblast growth factor receptors in human gastric cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(9): 519-28.

Shingu, K., M. Fujimori, et al. (1998). "Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 in thyroid diseases: difference between neoplasms and hyperplastic lesions." *Endocr J* **45**(1): 35-43.

- Shintani, S., K. Matsuo, et al. (1999). "Intragenic mutation analysis of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in malignant human oral keratinocytes." *Cancer Res* **59**(16): 4142-7.
- Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, et al. (1993). "Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene." *Cell* **73**(7): 1445-54.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**(4785): 177-82.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* **244**(4905): 707-12.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* **244**(4905): 707-12.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." *Cell* **72**(5): 767-78.
- Spivak-Kroizman, T., M. A. Lemmon, et al. (1994). "Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation." *Cell* **79**(6): 1015-24.
- Stamp, G., V. Fantl, et al. (1992). "Nonuniform expression of a mouse mammary tumor virus-driven int-2/Fgf-3 transgene in pregnancy-responsive breast tumors." *Cell Growth Differ* **3**(12): 929-38.
- Stark, K. L., J. A. McMahon, et al. (1991). "FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse." *Development* **113**(2): 641-51.
- Streuli, M. (1996). "Protein tyrosine phosphatases in signaling." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 182-8.
- Streuli, M., N. X. Krueger, et al. (1989). "A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8698-702.
- Stuckey, J. A., H. L. Schubert, et al. (1994). "Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate." *Nature* **370**(6490): 571-5.
- Su, L., Z. Zhao, et al. (1996). "Positive effect of overexpressed protein-tyrosine phosphatase PTP1C on mitogen-activated signaling in 293 cells." *J Biol Chem* **271**(17): 10385-90.
- Suarez Pestana, E., T. Tenev, et al. (1999). "The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells." *Oncogene* **18**(28): 4069-79.
- Sun, H. and N. K. Tonks (1994). "The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling." *Trends Biochem Sci* **19**(11): 480-5.
- Taira, M., T. Yoshida, et al. (1987). "cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 2980-4.
- Takada, T., T. Matozaki, et al. (1998). "Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation." *J Biol Chem* **273**(15): 9234-42.

- Takahashi, J. A., M. Fukumoto, et al. (1992). "Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas." *J Neurosurg* **76**(5): 792-8.
- Takahashi, J. A., H. Suzui, et al. (1991). "Gene expression of fibroblast growth factor receptors in the tissues of human gliomas and meningiomas." *Biochem Biophys Res Commun* **177**(1): 1-7.
- Takakura, S., T. Kohno, et al. (2000). "Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers." *Oncogene* **19**(6): 836-40.
- Takeda, H., T. Matozaki, et al. (1998). "Lysophosphatidic acid-induced association of SHP-2 with SHPS-1: roles of RHO, FAK, and a SRC family kinase." *Oncogene* **16**(23): 3019-27.
- Tateishi, M., T. Ishida, et al. (1990). "Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung." *Cancer Res* **50**(21): 7077-80.
- Tenev, T., H. Keilhack, et al. (1997). "Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera." *J Biol Chem* **272**(9): 5966-73.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-12.
- Tiganis, T., A. M. Bennett, et al. (1998). "Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1622-34.
- Tomic, S., U. Greiser, et al. (1995). "Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C." *J Biol Chem* **270**(36): 21277-84.
- Tonks, N. K., M. F. Cicirelli, et al. (1990). "Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in *Xenopus* oocytes." *Mol Cell Biol* **10**(2): 458-63.
- Tonks, N. K., C. D. Diltz, et al. (1988). "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." *J Biol Chem* **263**(14): 6731-7.
- Tonks, N. K., C. D. Diltz, et al. (1988). "Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." *J Biol Chem* **263**(14): 6722-30.
- Tonks, N. K. and B. G. Neel (2001). "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 182-95.
- Trowbridge, I. S. and M. L. Thomas (1994). "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development." *Annu Rev Immunol* **12**: 85-116.
- Tsuda, M., T. Matozaki, et al. (1998). "Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases." *J Biol Chem* **273**(21): 13223-9.
- Tzahar, E., R. Pinkas-Kramarski, et al. (1997). "Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network." *Embo J* **16**(16): 4938-50.
- Ullrich, A., L. Coussens, et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* **309**(5967): 418-25.

- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* **61**(2): 203-12.
- Vainikka, S., V. Joukov, et al. (1994). "Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR-1." *J Biol Chem* **269**(28): 18320-6.
- Vambutas, V., D. R. Kaplan, et al. (1995). "Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and activation of Src homology-containing protein-tyrosine phosphatase 1 in PC12 cells." *J Biol Chem* **270**(43): 25629-33.
- van der Geer, P., T. Hunter, et al. (1994). "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 251-337.
- van der Geer, P. and T. Pawson (1995). "The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction." *Trends Biochem Sci* **20**(7): 277-80.
- van Heumen, W. R., C. Claxton, et al. (1999). "Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine." *IUBMB Life* **48**(1): 73-8.
- Wallasch, C., F. U. Weiss, et al. (1995). "Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3." *Embo J* **14**(17): 4267-75.
- Wang, J. K., G. Gao, et al. (1994). "Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials." *Mol Cell Biol* **14**(1): 181-8.
- Wang, J. K., H. Xu, et al. (1996). "Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras." *Oncogene* **13**(4): 721-9.
- Wang, L., T. Habuchi, et al. (2002). "No association between HER-2 gene polymorphism at codon 655 and a risk of bladder cancer." *Int J Cancer* **97**(6): 787-90.
- Wang, Y. and D. Becker (1997). "Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth." *Nat Med* **3**(8): 887-93.
- Warrington, J. A., S. K. Bailey, et al. (1992). "A radiation hybrid map of 18 growth factor, growth factor receptor, hormone receptor, or neurotransmitter receptor genes on the distal region of the long arm of chromosome 5." *Genomics* **13**(3): 803-8.
- Webster, M. K. and D. J. Donoghue (1996). "Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia." *Embo J* **15**(3): 520-7.
- Webster, M. K. and D. J. Donoghue (1997). "FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing." *Trends Genet* **13**(5): 178-82.
- Weinstein, M., X. Xu, et al. (1998). "FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung." *Development* **125**(18): 3615-23.
- Wilkes, M. C., S. J. Murphy, et al. (2003). "Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8878-89.
- Wilkie, A. O., G. M. Morriss-Kay, et al. (1995). "Functions of fibroblast growth factors and their receptors." *Curr Biol* **5**(5): 500-7.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." *Annu Rev Immunol* **6**: 381-405.

- Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." *Nature* **378**(6559): 789-92.
- Xia, W., Y. K. Lau, et al. (1997). "Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **3**(1): 3-9.
- Xia, W., Y. K. Lau, et al. (1999). "Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members." *Clin Cancer Res* **5**(12): 4164-74.
- Xie, D., X. O. Shu, et al. (2000). "Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk." *J Natl Cancer Inst* **92**(5): 412-7.
- Xie, M. H., I. Holcomb, et al. (1999). "FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4." *Cytokine* **11**(10): 729-35.
- Yamaguchi, T. P., K. Harpal, et al. (1994). "fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation." *Genes Dev* **8**(24): 3032-44.
- Yamasaki, S., K. Nishida, et al. (2003). "Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2." *Oncogene* **22**(10): 1546-56.
- Yang, Q., D. Co, et al. (1993). "Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* **268**(23): 17650.
- Yang, X. H., K. T. Seow, et al. (1991). "Two Drosophila receptor-like tyrosine phosphatase genes are expressed in a subset of developing axons and pioneer neurons in the embryonic CNS." *Cell* **67**(4): 661-73.
- Yarden, Y. and J. Schlessinger (1987). "Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor." *Biochemistry* **26**(5): 1443-51.
- Yarden, Y. and A. Ullrich (1988). "Growth factor receptor tyrosine kinases." *Annu Rev Biochem* **57**: 443-78.
- Yayon, A., Y. S. Ma, et al. (1997). "Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases." *Oncogene* **14**(25): 2999-3009.
- Yeung, Y. G., K. L. Berg, et al. (1992). "Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated in tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1." *J Biol Chem* **267**(33): 23447-50.
- Yi, T. L., J. L. Cleveland, et al. (1992). "Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13." *Mol Cell Biol* **12**(2): 836-46.
- Yiangou, C., J. J. Gomm, et al. (1997). "Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance." *Br J Cancer* **75**(1): 28-33.
- Yoshimura, N., H. Sano, et al. (1998). "The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer." *Clin Immunol Immunopathol* **89**(1): 28-34.
- Yu, C., F. Wang, et al. (2000). "Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4." *J Biol Chem* **275**(20): 15482-9.
- Yu, H., J. K. Chen, et al. (1994). "Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains." *Cell* **76**(5): 933-45.



Zhan, X., B. Bates, et al. (1988). "The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors." *Mol Cell Biol* **8**(8): 3487-95.

Zhang, Z. Y. and J. E. Dixon (1994). "Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **68**: 1-36.

Zhang, Z. Y., Y. Wang, et al. (1994). "Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1624-7.

Zhang, Z. Y., Y. Wang, et al. (1994). "The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis." *Biochemistry* **33**(51): 15266-70.

## 7 Abkürzungen

,	Minute
?	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAM	Cell Adhesion Molecule
CDNA	komplementäre DNA
CHD	CAM Homology Domain
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton (relative Molmasse)
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
g	Gramm
G-418	Genetecin
Gab1	Grb2-associated binder-1
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HER2, 3, 4	humaner EGFR 2, 3, 4
HRG	$\beta$ -Heregulin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> Obidest	zweifach destilliertes Wasser
IG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LPA	Lysophosphatidylsäure
$\mu$	micro
m	milli
M	Molar
M	molar (Mole pro Liter)
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MEK	MAP/ERK Kinase
ml	Milliliter
Min	Minute
mRNA	messenger RNA
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCR-RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PmT	Polyomavirus-middle T-Antigen
PnPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
PTB	Phosphotyrosine binding
PTK (n)	Proteintyrosinkinase (n)
PTP(n)	Protein-Tyrosinphosphatase(n)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK(n)	Rezeptortyrosinkinase(n)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SHC	(Src homology 2 domain-containing)
	transforming protein 1
SH2,3-Domäne	Src Homologie 2,3 Domäne
SHP-1,2	SH2-containing PTP-1,2
siRNA	small interfering RNA

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNT-1	suc1-associated neurotrophic factor target
Sog.	sogenannt
Sos	Son of sevenless
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymsaktivitätseinheit (Unit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro (Gesamt-)Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-)Volumen
w/w	Masse pro (Gesamt-)Masse
z.B.	zum Beispiel

## Nachwort

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Axel Ullrich für sein großes Interesse und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Axel Ullrich für die besonderen Freiräume und für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen danken, die mit einer hervorragenden Atmosphäre im Labor und vielen Erlebnissen verbunden waren.

Sehr herzlich möchte ich auch Prof. Dr. Gierl für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu betreuen.

Ein großes Dankeschön an alle momentanen und früheren Mitglieder der Arbeitsgruppe Ullrich für die vielen Diskussionen, guten Ratschlägen und natürlich für viele unvergessliche Feste. Mein besonderer Dank gilt Johannes Bange für die Betreuung in der Anfangsphase der Arbeit, sowie die erfolgreiche und motivierende Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich dabei bei meinen „Office“-Kollegen Oliver und Stefan für die hervorragende und freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei Jens bedanken für seine wunderbare Unterstützung.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie für die nie endende Unterstützung.