

**Identifizierung eines neuen Interaktionspartners des  
HGF-Rezeptors c-Met: SHIP-1 spielt eine Schlüsselrolle  
bei der Vermittlung der HGF-induzierten  
Tubulogenese von Epithelzellen**

Vom Fachbereich Chemie der  
Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Monica Stefan  
geboren am 26.12.1968 in Bukarest (Rumänien)

2001

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: P. D. Dr. T. Tamura-Niemann

Tag der Promotion: 15. Februar 2001

*meinen Eltern*

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau P.D. Dr. T. Tamura für die Überlassung des Themas und für die stetige kompetente fachliche Betreuung und Beratung während der gesamten Zeit dieser Doktorarbeit.

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. W. Müller für die Betreuung dieser Arbeit und die entgegengebrachte Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. K.M. Weidner für die Bereitstellung verschiedener Hefevektoren und bei Dr. L. Rohrschneider für die cDNA für SHIP-1 bedanken. Dr. R. Niedenthal danke ich für die Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der Hefe-Arbeiten.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitgliedern des Labors, speziell Dr. Alexandra Koch und Dr. Annalisa Mancini, für ihre Diskussionsbereitschaft. Dr. Andrea Mohr danke ich ganz besonders, daß sie zu einem guten Arbeitsklima wesentlich beigetragen hat. Außerdem möchte ich mich bei Karsten Heidrich, Cosima Hakim, Regina Wilms und Roger Ritter für die technische Unterstützung bedanken.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich ganz herzlich, daß sie mich immer spüren lassen haben, daß sie an mich glauben. Für ihre beispielhafte Unterstützung und dafür, daß sie auch diesen Abschnitt meiner Ausbildung mit Interesse verfolgt haben, bin ich ihnen sehr verbunden.

Besonderen Dank möchte ich Thorsten Moltzen aussprechen - für seine stetige Hilfsbereitschaft, seine Geduld, sein Interesse und die vielen Aufmunterungen während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Andreas Bujak für die gemeinsamen Freizeitaktivitäten sowie den regen Gedankenaustausch und dafür, daß er „gelegentlich“ ein offenes Ohr für die Höhen und Tiefen dieser Arbeit hatte.

Schließlich gilt mein Dank allen, die mich auf meinem Weg immer ermutigt haben. Danny danke ich, daß er mit der richtigen Mischung aus Gutmütigkeit und Geduld für Entspannung zwischendurch gesorgt hat.

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die c-Met-vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen und dabei spezifische Signalwege zu charakterisieren.

Der Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor/“Scatter factor“ (HGF/SF) c-Met ist eine multifunktionelle Tyrosinkinase, deren Aktivierung pleiotropische Effekte, darunter Zellwachstum, Zellmigration, Morphogenese und Angiogenese, vor allem in Epithelzellen hervorruft.

Die von c-Met induzierte Morphogenese von Epithelgeweben ist ein essentieller Vorgang während der Embryogenese, bei dem sich Epithelzellschichten zu tubulären und alveolaren Strukturen falten. Die durch HGF/SF-Stimulation verursachte Tubulogenese von polarisierten Epithelzellen (z.B. MDCK) in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix stellt ein geeignetes *in vitro* Modellsystem für die *in vivo* Morphogenese diverser Epithelgewebe dar. Für die c-Met-spezifische Tubulogenese-Antwort sind spezifische Wechselwirkungen des Rezeptors mit seinen Bindungspartnern verantwortlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu bekannten Interaktionspartnern von c-Met wie PI 3'-Kinase, PLC- $\gamma$ , c-Src, Grb2 oder Gab1 zwei neue c-Met-bindende Proteine - die SH2-Domäne-haltige Inositol-5'-Phosphatase SHIP-1 und ein bisher unbekanntes Zinkfinger-Protein - mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert. SHIP-1 ist Bestandteil eines neuen c-Met-abhängigen Signaltransduktionsweges, der eine Schlüsselrolle bei der epithelialen Morphogenese *in vitro* spielt. Über seine N-terminale SH2-Domäne war SHIP-1 in der Lage, mit einem der beiden regulatorischen Phosphotyrosinreste (pY1356) innerhalb der c-Met-Multisubstrat-Bindungsstelle zu assoziieren. Die neue, HGF-abhängige Protein-Protein-Interaktion konnte sowohl *in vitro* (im GST-Bindungsexperiment) als auch unter physiologischen Bedingungen *in vivo* (durch Co-Immünpräzipitationsstudien) bestätigt werden.

Da c-Met - im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen - über eine einzige Multisubstratbindungsstelle verfügt, die zahlreiche c-Met-Effektoren rekrutiert, wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob diese Effektoren in der Lage sind, gleichzeitig mit c-Met zu assoziieren und auf diese Weise mehrere Signalkaskaden simultan zu aktivieren. Die durchgeführten *in vitro* Kompetitionsstudien ergaben, daß c-Met jeweils nur ein einziges Effektormolekül binden kann und daß innerhalb der c-Met-interagierenden Proteine eine Hierarchie der Bindungsaffinitäten existiert. Es kann also angenommen werden, daß c-Met-spezifische zelluläre Antworten wie z.B. die Tubulogenese von

Epithelzellen nicht auf die koordinierte Aktivierung und Integration mehrerer Signalkaskaden, sondern auf die Existenz spezifischer c-Met-Effektoren zurückzuführen ist. Einer davon ist der neu identifizierte c-Met-Bindungspartner SHIP-1. Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen bewirkte eine drastische Potenzierung und Beschleunigung der HGF-induzierten Tubulogenese-Antwort. Dagegen führte die Expression einer katalytisch inaktiven Form von SHIP-1 zur kompletten Hemmung der c-Met-spezifischen Tubulogenese in MDCK-Zellen. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß SHIP-1 über seine enzymatische Aktivität den zellulären Phosphoinositid-Metabolismus reguliert und dadurch die tubuläre Morphogenese von Epithelzellen moduliert.

Stichworte: Tyrosinkinase c-Met/ SH2-Domäne-enthaltende Inositol 5'-phosphatase SHIP-1/ verzweigte Tubulogenese

## Summary

The aim of this work was to investigate the c-Met mediated signal transduction and thereby to characterize particular signaling pathways specific to c-Met.

The receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is a multifunctional tyrosine kinase that induces pleiotropic effects upon activation, including cell growth, motility, morphogenesis and angiogenesis especially in epithelial cells.

The c-Met induced morphogenesis of epithelia is an essential process during embryonic development, at which the cells differentiate to form connected tubules or alveolar structures. When polarized epithelial cells (e.g. MDCK) are grown in a three dimensional collagen matrix the HGF/SF-induced tubulogenesis of these cells represents a suitable *in vitro* model system for the *in vivo* morphogenesis of different epithelia. Specific interactions of the receptor and its binding partners are responsible for the c-Met specific tubulogenesis response.

In addition to already known c-Met interacting proteins such as PI 3'-kinase, PLC- $\gamma$ , c-Src, Grb2 or Gab1 two novel c-Met binding proteins were identified in this work with the help of the Yeast Two-Hybrid system: the SH2-domain containing inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and a novel Zinc finger protein. SHIP-1 is part of a novel c-Met dependent signal transduction pathway which plays a key role in the induction of epithelial morphogenesis *in vitro*. SHIP-1 associates via its terminal SH2-domain with one of the two regulatory phosphotyrosine residues pY1356 within the multifunctional docking site of c-Met. The newly identified, HGF-dependent protein-protein-interaction could be verified *in vitro* (by GST-binding assay) and under physiological conditions *in vivo* (by co-immunoprecipitation studies).

In contrast to other receptor tyrosine kinases c-Met contains a unique multidocking site, which can recruit several effectors to c-Met. This observation raises the question whether different effectors can associate with c-Met at the same time and can activate many signaling cascades simultaneously. The performed *in vitro* competition studies revealed that c-Met can only bind to a single effector molecule at the same time. In addition the hierarchical binding of c-Met interacting proteins could be observed *in vitro*. Therefore it can be assumed that the c-Met-specific cellular responses (e.g. the tubulogenesis of epithelial cells) are not attributed to coordinative activation and integration of several different signaling cascades but to the existence of effectors specific for c-Met. One of them is the newly identified binding partner of c-Met SHIP-1. The overexpression of

SHIP-1 in MDCK cells drastically potentiated and accelerated the HGF-induced tubulogenesis response. In contrast the expression of a mutated SHIP-1 lacking catalytic activity led to complete inhibition of the c-Met-mediated tubulogenesis in MDCK cells. This result leads to the conclusion that the enzymatic activity of SHIP-1 regulates the cellular metabolism of phosphoinositides and thereby modulates the tubular morphogenesis of epithelial cells.

Key words: c-Met tyrosine kinase/ SH2-domain containing inositol 5'-phosphatase  
SHIP-1 /tubulogenesis

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
Häufig verwendete Abkürzungen.....	10
1. EINLEITUNG.....	13
1.1 Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen.....	13
1.1.1 Einführung in die Signalübertragung zwischen Zellen.....	13
1.1.2 Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen.....	14
1.1.3 Klassifizierung der Rezeptortyrosinkinasen.....	14
1.1.4 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen.....	16
1.1.5 Zelluläre Proteine, die an Rezeptortyrosinkinasen binden.....	18
1.1.6 Protein-Protein-Interaktionsdomänen.....	19
1.1.7 Die Vielfalt der Signalübertragungswege.....	21
1.1.7.1 Die Grb2-Sos-Ras-Raf-1-MAPK-Kaskade.....	21
1.1.7.2 Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase-Signalweg.....	22
1.1.7.3 Der Phospholipase C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )-Signalweg.....	23
1.1.7.4 Der Jak/STAT-Signalweg.....	24
1.2 Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/“Scatter factor“(HGF/SF)-Rezeptor c-Met.....	24
1.2.1 Biosynthese und Struktur des c-Met-Rezeptors.....	24
1.2.2 Biosynthese und Struktur des c-Met-Liganden HGF/SF.....	25
1.2.3 Biologische Funktionen des HGF/SF.....	26
1.2.3.1 HGF/SF-Effekte <i>in vivo</i> .....	27
1.2.3.2 HGF/SF-Effekte <i>in vitro</i> .....	28
1.2.3.2.1 Zellstreuung („Scattering“.....	28
1.2.3.2.2 Tubulogenese („branching morphogenesis“.....	29
1.2.4 Signalübertragung durch den c-Met-Rezeptor.....	29
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	32
2. & 3. MATERIAL UND METHODEN.....	35
2. Materialien.....	35
2.1 Chemikalien.....	35
2.2 Aminosäuren.....	40
2.3 Enzyme und ihre Puffer.....	41
2.4 Radioaktive Stoffe.....	41
2.5 Antikörper.....	42
2.6 Verwendete Kits.....	42
2.7 Weitere Materialien.....	42
2.8 Plasmide.....	43
2.8.1 Klonierungsvektoren.....	43
2.8.2 Expressionsvektoren für Bakterien.....	44
2.8.3 Expressionsvektoren für Hefen.....	44
2.8.4 Expressionsvektoren für Säugerzellen.....	44
2.8.5 Weitere Plasmide.....	44
2.9 Biologische Reagenzien.....	44
2.9.1 Bakterienstämme.....	44
2.9.2 Hefestämme.....	45

2.9.3 Zelllinien.....	45
2.10 Geräte.....	46
2.11 Nährmedien.....	47
2.11.1 Nährmedien für Bakterienkulturen.....	47
2.11.2 Nährmedien für Hefekulturen.....	48
2.11.3 Nährmedien für die Zellkultur.....	50
<b>3. Methoden.....</b>	<b>51</b>
3.1 DNA-Arbeiten.....	51
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	51
3.1.1.1 Verwendete Lösungen.....	51
3.1.1.2 Minipräparation von Plasmid DNA.....	52
3.1.1.3 Midipräparation (Maxipräparation).....	53
3.1.2 DNA-Präzipitation.....	54
3.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	54
3.1.4 DNA-Transformation in Bakterien, Calciumchlorid-Methode.....	54
3.1.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien/Calciumchlorid-Methode.....	55
3.1.4.2 DNA-Transformation.....	55
3.1.5 DNA-Transformation durch Elektroporation.....	56
3.1.5.1 Herstellung elektrokompeter Zellen.....	56
3.1.5.2 Elektroporation.....	56
3.1.6 Angewendete Methoden bei der Klonierung.....	57
3.1.6.1 Restriktionsenzymverdau.....	57
3.1.6.2. Dephosphorylierung 5'-überstehender Enden der DNA.....	57
3.1.6.3 Ligation.....	58
3.1.7 Elektrophorese in Agarosegelen.....	58
3.1.8 Präparative DNA-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	59
3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	60
3.1.10 Klonierung von PCR-Produkten.....	61
3.1.11 DNA-Sequenzierung.....	61
3.1.12 Southern Blot.....	62
3.1.12.1 Transfer der DNA vom Gel auf die Membran und Hybridisierung mit der DNA-Sonde.....	62
3.1.12.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit anschließender Aufreinigung der Sonden.....	63
3.2 RNA-Arbeiten.....	63
3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	63
3.2.2 RNA-Agarosegelelektrophorese.....	64
3.2.2.1 Vorbereitung des 1 %-igen, formaldehydhaltigen Agarosegels.....	64
3.2.2.2 Vorbereitung der RNA-Proben.....	65
3.2.3 Northern Blot.....	66
3.2.3.1 Transfer der RNA vom Agarosegel auf die Membran.....	66
3.2.3.2 Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	66
3.3 Protein-Arbeiten.....	67
3.3.1 Herstellung von Gesamtzellysaten für Immunblots.....	67
3.3.2 Herstellung von Zellysaten für Immunpräzipitationen und GST-Bindungsstudien.....	68
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	68
3.3.4 Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen; Coomassieblau-Färbung.....	69
3.3.5 Western Blot.....	70

3.3.6 Immunblot.....	71
3.3.7 Immunpräzipitation.....	72
3.3.8 Co-Immunpräzipitation.....	72
3.3.9 <i>In vitro</i> Kinase-Assay.....	73
3.3.10 Expression von rekombinanten Fusionsproteinen.....	74
3.3.10.1 GST-Fusionsproteine.....	74
3.3.10.2 His6-gekoppelte Proteine.....	75
3.3.11 GST-Bindungs-und Kompetitionsstudien.....	77
3.3.12 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	78
3.3.12.1 Hefestämme.....	80
3.3.12.2 Plasmide.....	80
3.3.12.3 cDNA-Genbibliothek.....	81
3.3.12.4 Hefetransformation.....	81
3.3.12.4.1 Hefetransformation der LexA-Konstrukte („small scale“-Transformation).....	81
3.3.12.4.2 Überprüfung der Expression der LexA-Fusionsproteine in transformierten Hefezellen.....	82
3.3.12.4.3 Transformation von cDNA-Genbanken in Hefen („Large scale“-Transformation).....	83
3.3.12.5 Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefen.....	84
3.3.12.6 Selektion von pVp16 aus dem pVp16-pBTM116-Gemisch.....	84
3.3.12.7 Elektrottransformation von Bakterien mit Hefe-DNA.....	84
3.3.12.8 Überprüfung und Quantifizierung der Interaktionen mittels <i>gfp</i> -Reporter-gen-Aktivierung.....	85
3.4 Arbeiten mit Zellkulturen.....	85
3.4.1 Kultivierung von adhärennten Zellen.....	85
3.4.2 Kultivierung von Suspensionszellen.....	86
3.4.3 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien.....	86
3.4.4 Herstellung von IL-3-konditioniertem Medium.....	87
3.4.5 Radioaktive Markierung von Zellen.....	87
3.4.6 Immunfluoreszenz.....	88
3.4.7 Zellstreuung („Scattering“)......	89
3.4.7.1 Giemsa-Färbung.....	89
3.4.7.2 Zellmigration.....	90
3.4.8 Morphogenese von epithelialen Zellen; Tubulogenese.....	90
3.4.9 Einführen von Fremd-DNA in Säugerzellen (Transfektion).....	90
3.4.9.1 Stabile Transfektion mit Superfect-Reagenz.....	90
3.4.9.2 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode.....	92
3.5 Konstruktion von Fusionsproteinen für die Expression in Bakterien.....	93
3.5.1 GST-Fusionsproteine.....	93
3.5.2 His6-gekoppelte Proteine.....	94
3.6 Herstellung von Konstrukten für Proteinexpression in Hefezellen.....	94
3.7 Herstellung von Konstrukten für Proteinexpression in Säugerzellen.....	95
4. ERGEBNISSE.....	96
4.1 Identifizierung zweier neuen Bindungspartner von c-Met durch Genbank-Screening im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	96
4.1.1 Klonierung von cDNA's kodierend für zwei neue c-Met-Bindungspartner aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattenhirnen.....	96
4.1.2 Die Interaktion von SHIP-1 mit c-Met ist abhängig von dessen Kinase-Aktivität, während das Zinkfinger-Protein unabhängig vom c-Met-phosphorylierungs-	

zustand an den Rezeptor bindet.....	102
4.1.3 Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1356 von c-Met stellt die SHIP-1-Bindungsstelle dar.....	103
4.1.4 Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1356 von c-Met stellt die Bindungsstelle für SHIP-1, Grb2 und Grb10 dar, während PI 3'-Kinase, Gab1, PLC- $\gamma$ , c-Src und Shc entweder an pY1349 oder an pY1356 binden.....	104
4.1.5 Bindungsspezifität von SHIP-1: SHIP-1 bindet an c-Met und c-Fms, aber nicht an c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor.....	106
4.2 Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktion zwischen c-Met und den neu identifizierten Bindungspartnern.....	107
4.2.1 Expression von SHIP-1-RNA in MDCK-, PC12- und Raji-Zellen.....	108
4.2.2 Expression des SHIP-1-Proteins in verschiedenen Epithelzelllinien wie MDCK, EFM-19 und EFM-192A.....	109
4.2.3 Expression der Zinkfinger-Protein-mRNA in verschiedenen murinen Gewebe.....	110
4.2.4 Überprüfung der c-Met/SHIP-1-Interaktion <i>in vivo</i> .....	112
4.2.4.1 Co-Immünpräzipitation von SHIP-1 und c-Met in transient transfizierten HEK293-Zellen.....	112
4.2.4.2 SHIP-1 bildet einen spezifischen Immunkomplex mit dem aktivierten c-Met-Rezeptor in MDCK-Zellen.....	113
4.2.5 <i>In vitro</i> Bindungsstudien.....	115
4.2.5.1 GST-SHIP-1 und das GST-Zinkfinger-Protein binden an phosphoryliertes c-Met <i>in vitro</i> .....	115
4.2.5.2 <i>In vitro</i> -Kompetitionsstudien: Die Bindungsaffinität von PI 3'-Kinase, SHIP-1, Grb2 und Gab1 an c-Met nimmt in der Reihenfolge Grb2>Gab1>SHIP-1>PI 3'-Kinase ab.....	116
4.3 Biologische Funktion von SHIP-1: SHIP-1 beeinflusst die c-Met-vermittelte Morphogenese der MDCK-Zellen.....	120
4.3.1 MDCK-Zellen dissoziieren, wandern und bilden verzweigte tubuläre Strukturen unter dem Einfluß von HGF.....	120
4.3.2 Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen.....	122
4.3.2.1 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf die DNA-Syntheserate .....	123
4.3.2.2 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf die HGF-induzierte Dissoziation und Wanderung von Zellen.....	125
4.3.2.3 Darstellung der Aktin-Filamente in Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen.....	126
4.3.2.4 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen beschleunigt ihre Tubulogenese-Antwort.....	128
4.3.5 Die Überexpression eines mutierten SHIP-1-Proteins ohne katalytische Aktivität in MDCK-Zellen hemmt deren HGF-induzierte Tubulogenese in dreidimensionaler Kollagenmatrix.....	130
4.3.6 Die Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen.....	132
4.3.6.1 Die Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen führt zur Hemmung der Tubulogenese-Antwort.....	133
5. DISKUSSION.....	135
5.1 SHIP-1 und das Zinkfinger-Protein wurden als neue Interaktionspartner von c-Met identifiziert.....	135
5.2 Die Interaktionen von PI 3'-Kinase, Grb2 und Gab1 mit c-Met wurden durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System und durch GST-Bindungsstudien bestätigt.....	138
5.3 Identifizierung und Charakterisierung der c-Met-Bindungsstellen von SHIP-1, PI 3'-Kinase und Grb2; Vergleich mit den Bindungsstellen dieser Effektoren innerhalb	

anderer Rezeptortyrosinkinasen.....	140
5.3.1 Grb2 und SHIP-1 haben eine identische Bindungsstelle innerhalb des c-Met-Rezeptors. Gilt das auch für andere Signalmoleküle, die beide Proteine zu binden vermögen?.....	142
5.4 Die Signalmoleküle PI 3'-Kinase, SHIP-1, Gab1 und Grb2 binden in vitro nicht gleichzeitig, sondern sequentiell an die Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met.....	143
5.5 Die Rolle von SHIP-1 bei der Übermittlung der HGF-induzierten Zellproliferation, Zellstreuung sowie der Tubulogenese von Epithelzellen.....	144
5.5.1 SHIP-1 hat keinen Einfluß auf die HGF-induzierte Proliferation und Streuung von MDCK-Zellen .....	146
5.5.2 Die Interaktion von SHIP-1 mit c-Met trägt entscheidend zur Übermittlung der Tubulogenese-Antwort in MDCK-Zellen bei.....	147
5.5.2.1 Der durch SHIP-1-Überexpression modulierte Phosphoinositid-Metabolismus in MDCK-Zellen reguliert ihre HGF-induzierte Tubulogenese-Antwort.....	149
5.6 Modell für die Rolle von SHIP-1 bei der Vermittlung der HGF-induzierten Morphogenese von MDCK-Zellen.....	152
6. LITERATUR.....	155
7. ANHANG.....	170

## Häufig verwendete Abkürzungen

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
Δ	ohne
φ	Durchmesser
A	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTP	BisTrisPropan
bzw.	beziehungsweise
c-	zellulär
C-	Carboxy-
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CIP	„calf intestine phosphatase“
cm	Zentimeter
cpm	„counts per minute“
D	Aspartat
DABCO	Diazabicyclooctan
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
EMEM	„Minimum Essential Medium-Eagle“
Erk	„Extracellular signal regulated kinase“
et al.	und andere
F	Phenylalanin
F-	filamentös
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
FAK	„Focal adhesion kinase“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
Gab	„Grb2-associated binder protein“
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Grb	„Growth factor receptor bound protein“
GST	Glutathion-S-Transferase

GT	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
H	Histidin
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
IP	Inositolphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid
IR	Insulinrezeptor
K	Lysin
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinozyten-Wachstumsfaktor
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat
m	murin; Milli-
M	Molar
mA	Milliampere
MBD	Met-bindende Domäne
MCS	„Multiple cloning site“
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MEK	„Mitogen-dependent Erk kinase“
Min.	Minuten
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„Messenger“ RNA
M	Methionin
MW	Molekulargewicht
μ	Mikro-
μF	Mikrofarad
n	nano
N	Asparaginsäure
N-	Amino-
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
NLS	Kernlokalisierungssignal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Phosphatidylinositol
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	Phosphotyrosin-bindende-
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	„Scatter Factor“
SH2	Src-Homologie 2
SH3	Src-Homologie 3
SHIP	SH2-Domäne-haltige Inositol-Phosphatase
sog.	sogenannt
Sos	„Son of sevenless“
STAT	„Signal transducer and activator of transcription“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
UV	Ultraviolett
v-	viral
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen

### 1.1.1 Einführung in die Signalübertragung zwischen Zellen

In vielzelligen Organismen wird durch ein kompliziertes Kommunikationssystem gewährleistet, daß Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel einer großen Anzahl von Zellen aufeinander abgestimmt sind.

Die Nachrichtenübertragung zwischen Zellen erfolgt zum Teil durch direkten Kontakt über „gap junctions“. Durch einen weiteren Mechanismus ist es möglich, daß Zellen, die nicht miteinander in unmittelbarem Kontakt stehen, über größere Entfernungen hinweg kommunizieren können. Bestimmte Zellen sezernieren Signalmoleküle, die zu anderen Zellen (sog. Zielzellen) gelangen und spezifische Reaktionen auslösen. Die Zielzellen besitzen entsprechende Rezeptoren für die Signalmoleküle. Ein Signalmolekül bewirkt erst dann bestimmte zelluläre Reaktionen, wenn es von einem spezifischen Rezeptorprotein gebunden worden ist.

Ein großer Teil der Signaltransduktionskaskaden funktioniert über die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten (Hunter, 1991) der darin involvierten Proteine. Durch Phosphorylierung werden sowohl Protein-Protein-Interaktionsdomänen geschaffen als auch Enzymaktivitäten reguliert.

90 % aller Proteinphosphorylierungen in der Zelle erfolgen an deren Serinresten, 10 % an Threoninresten. So spielen die Serin-Threonin-Kinasen im gesamten Zellmetabolismus eine wichtige Rolle. Dagegen sind nur 0,5 % aller Proteine in der Zelle an Tyrosinresten phosphoryliert. Das ist durch die sehr transiente Phosphorylierung erklärbar und war unter anderem ein Grund für die relativ späte Entdeckung dieser Art von Phosphorylierung (Hunter & Sefton, 1980). Zum ersten Mal wurde am Genprodukt pp60<sup>v-src</sup> eine Tyrosinspezifische Kinaseaktivität nachgewiesen, nachdem eine analytische Methode entwickelt worden war, um Phosphothreonin von Phosphotyrosin zu unterscheiden (Hunter & Sefton, 1980). Vorher wurde pp60<sup>v-src</sup> für eine Threoninkinase gehalten (Collett & Erikson, 1978; Erikson et al., 1979). Seit dieser Zeit wurde ein Vielzahl an Tyrosinkinasen gefunden. Sie werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: membranständige Rezeptortyrosinkinasen und Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen.

Zu Beginn einer zellulären Reaktion auf exogene Stimuli stehen oftmals Rezeptortyrosinkinasen, die durch Bindung von Liganden aktiviert werden. Dadurch werden extrazelluläre Vorgänge in intrazelluläre Signale umgewandelt. Den Rezeptoren nachgeschaltete Proteine in den jeweilig aktivierten Signalkaskaden führen zu definierten zellulären Antworten, die das Verhalten der Zielzelle ändern.

### 1.1.2 Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen

Alle Rezeptortyrosinkinasen haben einen N-terminalen extrazellulären Bereich von mehreren Hundert Aminosäuren; dieser Bereich ist N- und manchmal O-glykosyliert und beinhaltet charakteristische Cysteinfolgen und Strukturen. Innerhalb dieser Domäne liegt die Ligandenbindungsstelle.

An die extrazelluläre Domäne schließt sich die Transmembran-Domäne an, bestehend aus einer einzigen hydrophoben Transmembran- $\alpha$ -Helix; diese Domäne wird durch ein basisches Membrantransfer-Stopsignal abgeschlossen.

Daran schließt sich der zytoplasmatische Bereich an, bestehend aus einer membranahen (Juxtamembran-) Region, einer Kinasedomäne und einer carboxyterminalen Region, die wichtige regulatorische Aminosäuren beinhaltet. Bei einigen Rezeptor-Tyrosinkinasen ist die Kinase-Domäne durch ein Kinaseinsert unterbrochen (van der Geer et al., 1994).

Im allgemeinen bestehen die katalytischen Domänen der Tyrosinkinasen aus zwei Lappen (C-Lappen und N-Lappen), die einen Spalt bilden, der das Substrat und an  $Mg^{2+}$ -Ionen gebundenes ATP beherbergt. Der N-Lappen enthält die hochkonservierte Konsensussequenz GXGXXGX(15-20)K, die einen Teil der ATP-Bindungsstelle ausmacht. Das Ersetzen des Lysinrestes in dieser Sequenz zerstört die Kinase-Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Chou et al., 1987; Roussel et al., 1987; Honegger et al., 1987; Chen et al., 1987; Williams, 1989). Der C-Lappen enthält verschieden konservierte strukturelle Domänen:

- die katalytische Schleife (catalytic loop);
- die Aktivierungsschleife (activation loop): mit einem konservierten Aspartatrest, der essentiell für die katalytische Aktivität ist (Johnson et al., 1996). Seine Aufgabe ist es, das Proton der Hydroxylgruppe vom Tyrosinrest des Substrats abzuziehen (Bossmeyer, 1995). Die Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasen enthält ein bis drei phosphorylierbare Tyrosinreste. Ihre auf die Rezeptoraktivierung folgende Autophosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung, die den Zugang zum

## Einleitung

aktiven Zentrum ermöglicht (Hubbard, 1997). Die Phosphotyrosinreste tragen außerdem zur Stabilisierung der aktiven Konformation bei;

- das DFG-Triplett, das das höchstkonservierte Motiv in der katalytischen Domäne darstellt und als Metallionen-Bindungsstelle fungiert. Eine Mutation dieser Stelle führt zur Inaktivierung der Kinase (Cheng & Koland, 1998; Longley et al., 1999).

### 1.1.3 Klassifizierung der Rezeptortyrosinkinasen

Die Rezeptortyrosinkinasen lassen sich nach Ullrich & Schlessinger (1990) in vier Hauptklassen einteilen (s. Abbildung 1.1).

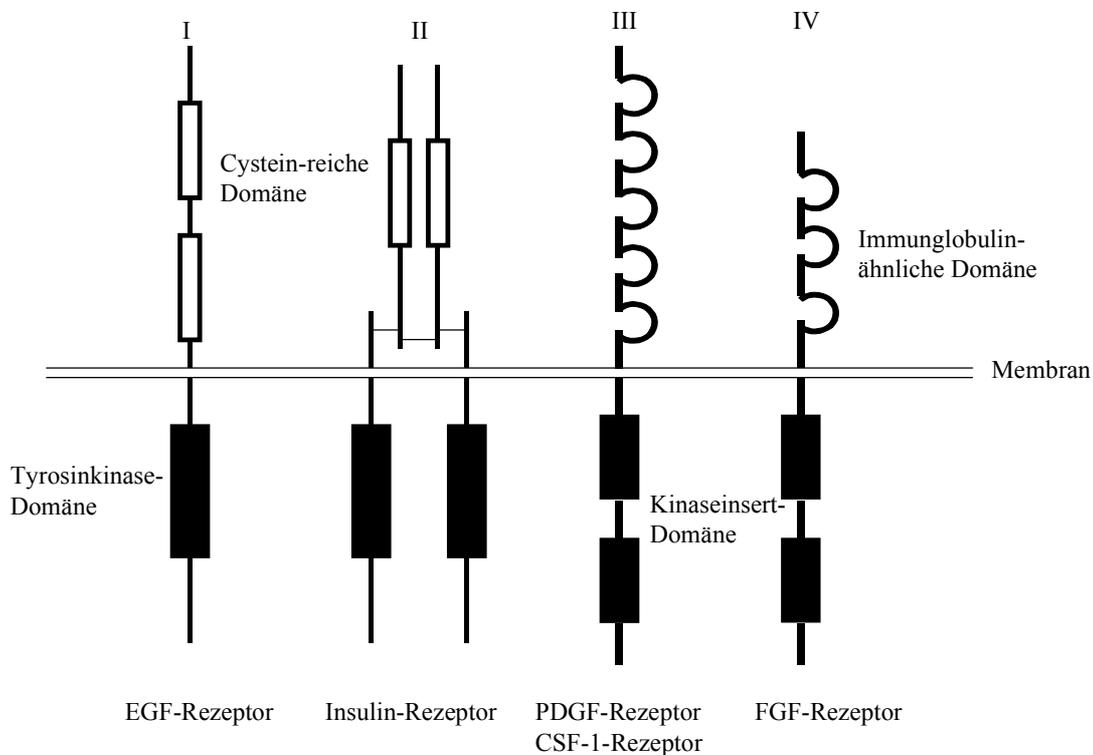


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der vier Hauptklassen von Rezeptortyrosinkinasen (nach Ullrich & Schlessinger, 1990)

Klasse I-Rezeptoren zeichnen sich durch zwei Cystein-reiche repetitive Sequenzen im extrazellulären Bereich aus. Diese Domänen dienen der Aufrechterhaltung der Struktur zur Ligandenbindung. Als Beispiel dient der Epidermale-Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor.

Klasse II-Rezeptoren sind heterotetramere Kinasen aus 2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Untereinheiten, die von Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Ein Vertreter dieser Klasse ist der Insulin-Rezeptor.

Klasse III- und Klasse IV-Rezeptoren zeichnen sich durch Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen aus. Die Klasse III-Rezeptoren verfügen über fünf solcher Domänen, die Klasse IV-Rezeptoren nur über drei. Zusätzlich zeigen beide Klassen Kinaseinsert-Domänen: die Kinasedomänen werden durch Insertionen von bis zu 120 Aminosäuren unterbrochen.

Als Beispiel für Klasse III-Rezeptoren dient der Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF)-Rezeptor. Die Klasse IV wird durch den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptor vertreten.

### 1.1.4 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Durch die Bindung eines spezifischen Liganden wird die Tyrosin-spezifische Proteinkinase-Aktivität des Rezeptors stimuliert und damit eine Kaskade von Signalen ausgelöst, die schließlich eine Änderung der physiologischen Aktivitäten der Zelle und/oder des Genexpressionsmusters bewirkt. Die von Rezeptortyrosinkinasen initiierten Signale beeinflussen viele zellulären Funktionen wie z.B. die Steuerung von Zellproliferation und -differenzierung, die Förderung des Zellüberlebens und die Änderung des Zellstoffwechsels.

Ligandenbindung an den jeweils spezifischen Rezeptor induziert die Dimerisierung des Rezeptors und die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne (Ullrich & Schlessinger, 1990). Die Phosphorylierungsstellen dienen der Aktivitätsregulation und der Bildung von Substratbindungsstellen (Panayotou & Waterfield, 1993). Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der Kinasedomäne des Insulin-Rezeptors (Hubbard et al., 1994) konnte der Aktivierungsmechanismus für Rezeptortyrosinkinasen erläutert werden. In unphosphoryliertem Zustand bindet die Hydroxylgruppe eines konservierten Tyrosinrestes in der Aktivierungsschleife an das aktive Zentrum. Durch Ligandeneinwirkung kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste innerhalb der Aktivierungsschleife, was eine Konformationsänderung zur Folge hat. Die neue Konformation des aktiven Zentrums wird dadurch stabilisiert, daß es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen einem Phosphotyrosinrest und einem am Grund der Bindungstasche gelegenen Argininrest kommt. Das heißt, die Struktur des aktiven Zentrums wird erst nach Autophosphorylierung stabilisiert, was eine komplette Aktivierung der Kinasefunktion zur Folge hat. Dadurch

## Einleitung

werden zusätzliche, regulatorische Tyrosinreste ebenfalls autophosphoryliert, die Bindungsstellen für SH2- (Src-Homologie Domäne 2) oder PTB- (Phosphotyrosin-bindende) Domänen enthaltende intrazelluläre Proteine darstellen (s. auch Abschnitt 1.1.6). Über diese zellulären Effektoren, die teilweise von der Rezeptortyrosinkinase auch phosphoryliert werden, wird das Signal weitergeleitet.

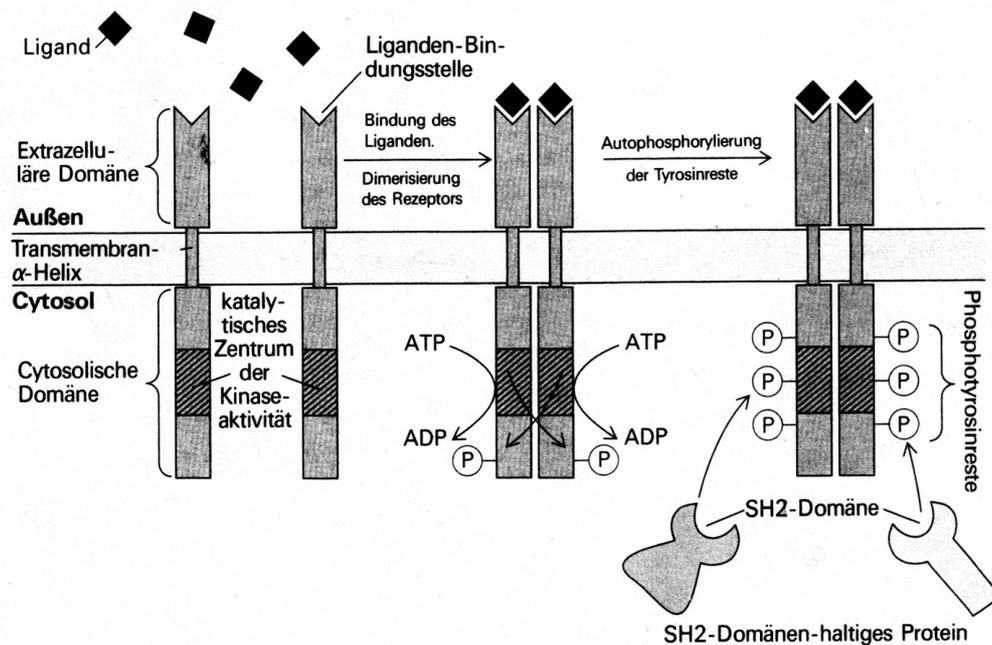


Abbildung 1.2: Aktivierungsmechanismus einer Rezeptortyrosinkinase nach Bindung ihres spezifischen Liganden. Die Dimerisierung, Autophosphorylierung und Bindung intrazellulärer Effektoren erfolgen wie im Text beschrieben (verändert nach Panayotou & Waterfield, 1993).

Neuere Daten (Schlessinger, 2000) zeigen, daß inaktive Rezeptor-Monomere im Gleichgewicht mit inaktiven sowie mit aktiven (phosphorylierten) Rezeptor-Dimeren in der Zelle liegen. Die Ligandenbindung stabilisiert dann die Konformation des aktiven Rezeptor-Dimers und erhöht dessen Proteinkinase-Aktivität. Die Mitglieder der Insulinrezeptor-Familie liegen schon im inaktiven Zustand als durch Disulfidbrücken gekoppelte Dimere vor. In der Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen inaktiven Dimeren und aktiven (phosphorylierten) Dimeren. Aber erst durch die Bindung des Liganden erfolgt die Stabilisierung der Konformation des aktiven Dimers und die Stimulation der vollen Proteinkinase-Aktivität (Schlessinger, 2000).

## 1.1.5 Zelluläre Proteine, die an Rezeptortyrosinkinasen binden

Wie bereits beschrieben (s. 1.1.4), dienen die Phosphotyrosinreste eines aktivierten Rezeptors als Bindungsstellen für SH2-Domänen- oder PTB-Domänen-haltige Proteine. Diese Proteine können in drei verschiedene Klassen unterteilt werden:

1. Adaptorproteine, die den aktivierten Rezeptor mit anderen Signalmolekülen verbinden, jedoch keine Eigenschaften eines Signalmoleküls besitzen. Dazu gehören die Mitglieder der „Growth factor receptor bound protein“ (Grb) - Gruppe (Grb2, Grb7, Grb10), die regulatorische Untereinheit (p85) der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI 3'-Kinase) sowie die Proteine Shc („SH2-containing and collagen-like“), c-Crk oder Gab1 („Grb2-associated binding protein-1“).
2. Proteine mit enzymatischer oder Enzym-regulatorischer Funktion. Zu dieser Klasse gehören GTPase-regulierende Faktoren, z.B. RasGAP, die katalytische Untereinheit (p110) der PI 3'-Kinase, Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) oder die Proteintyrosinphosphatase Syp.

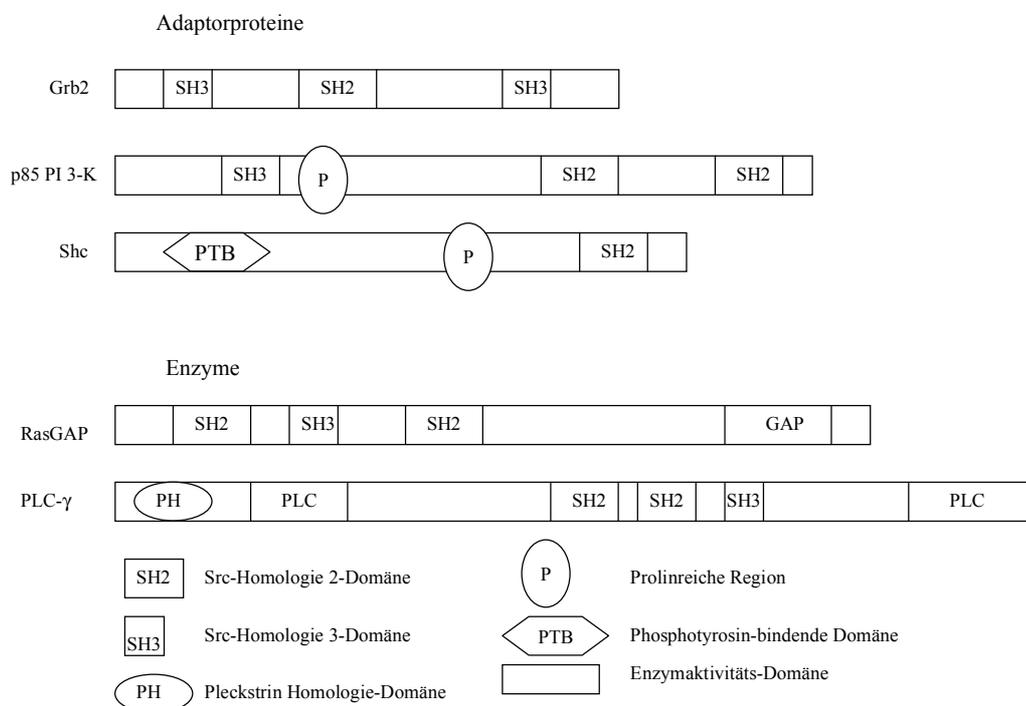


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Struktur motive einiger Rezeptortyrosinkinasen-bindender Proteine (nach Pawson, 1995)

3. Strukturproteine, die für Änderungen in der Organisation des Zytoskeletts verantwortlich sind. Dazu gehören z.B. Paxillin (Munshi et al., 2000) und  $\beta$ -Catenin (Cohen et al., 1999).

### 1.1.6 Protein-Protein-Interaktionsdomänen

Die Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen läuft meist über Phosphotyrosinreste ab. Für diese Bindung sind hauptsächlich SH2-Domänen und PTB-Domänen verantwortlich.

Die **Src-Homologie Domäne 2 (SH2)** ist ein Polypeptidabschnitt von ungefähr 100 Aminosäuren mit ca. fünf konservierten Regionen; sie bildet mit Phosphotyrosinresten ein stabiles Assoziat. Diese Art von Bindungsdomäne wurde erstmals von De Clue et al. (1987) für das Protein Src beschrieben. Die SH2-Domäne formt zwei Bindungstaschen in einer globulären Umgebung aus einem  $\beta$ -Faltblattkern mit zwei flankierenden  $\alpha$ -Helices (Booker et al. 1992; Overduin et al., 1992; Waksman et al., 1992). Zwischen den  $\alpha$ -helikalen und  $\beta$ -Strangstrukturen befinden sich variable Sequenzen mit Glycin- und Prolinresten, die zur Ausbildung von Schleifen befähigt sind. Die beiden Bindungstaschen umschließen einen Phosphotyrosinrest und einen weiteren spezifischen, oft hydrophoben Rest. Insgesamt bestimmen drei oder fünf auf das Phosphotyrosin folgende Aminosäurenreste die Spezifität der Bindung (Songyang et al., 1993).

Die **Src-Homologie-Domäne 3 (SH3)** spielt ebenfalls eine Rolle bei einigen Signalübertragungswegen (Clark et al., 1992). Sie besteht aus etwa 60 Aminosäuren mit ausgeprägten  $\beta$ -Strangstrukturen vor allem im zentralen Teil und wurde durch einen Homologievergleich der Mitglieder der Src-Kinase-Familie mit PLC- $\gamma$  und v-Crk entdeckt (Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988). Diese Domänen kommen außer in Signalmolekülen auch in aktinbindenden Proteinen (z.B. Spektrin) sowie in verschiedenen Myosinen vor. Die SH3-Domänen von Signalmolekülen binden zwar nicht phosphorylierungsabhängig, können aber gezielt Signale weiterleiten (van de Geer et al., 1994). Die SH3-Domäne bindet prolinreiche Motive einer Länge von etwa zehn Aminosäuren (Ren et al., 1993; Bar Sagi et al., 1993; Yu et al., 1994).

Die dreidimensionalen Strukturen mehrerer SH3-Domänen wurden aufgeklärt. Fünf antiparallele  $\beta$ -Faltblätter formen eine kompakte, faßartige Struktur. Auf einer Seite dieser Struktur bilden hochkonservierte, oft aromatische Aminosäuren die Oberfläche, die mit dem Liganden interagiert, der zu einer linksgängigen Prolinhelix angeordnet ist.

## Einleitung

---

Die **Phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domäne** wurde zunächst für das Protein Shc gefunden (Kavanaugh & Williams, 1994; Blaikie et al., 1994). Ein charakteristisches Merkmal für diese Domänen ist ihre  $\beta$ -Faltblattstruktur. PTB-Domänen bestehen aus einem sieben-strängigen  $\beta$ -Sandwich, das C-terminal von einer  $\alpha$ -Helix abgeschlossen wird (Zhou et al., 1996; Eck et al., 1996). Diese Domänen binden an Phosphotyrosin-enthaltende Motive mit der Konsensussequenz NPXpY (Zhou et al., 1995).

Die **Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne** besteht aus ungefähr 100 Aminosäuren (Musacchio et al., 1993). Diese Domänen binden an Phospholipide, die als sekundäre Botenstoffe an vielen Signalübertragungswegen beteiligt sind. Zum Beispiel wird die Akt-Proteinkinase, die essentiell für Antiapoptose-Signale ist, durch Bindung ihrer PH-Domäne an das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat aktiviert. Auch bei der Aktivierung des Integrin-Signaltransduktionsweges spielt die Interaktion mit PH-Domänen eine Rolle: das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat bindet an die PH-Domänen von Grp1 („general receptor for phosphoinositides“-1) und Cytohesin (Karlund et al., 1997). Durch Bindung an Phospholipide erfolgt die Translokation von PH-Domänen-haltigen Effektormolekülen an die Plasmamembran und damit ihre Aktivierung (Alessi et al., 1997; Anderson et al., 1998).

**WW-Domänen** bestehen aus 38 Aminosäuren, darunter viele hydrophobe, aromatische oder Prolinreste. Die Namensgebung geschah aufgrund der Anwesenheit zweier hochkonservierter Tryptophanreste. Die dreidimensionale Struktur dieser Domäne besteht aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die eine gebogene Oberfläche ausbilden (Macias et al., 1996). Ähnlich wie die SH3-Domäne bindet die WW-Domäne an prolinreiche Sequenzen mit dem Konsensusmotiv PPXY.

Die **PDZ-Domäne**: der Name leitet sich von den drei Proteinen her, bei denen diese Domäne zunächst entdeckt wurde. Es handelt sich um PSD-95 (Cho et al., 1992), DlgA (Drosophila disc-large Tumor Suppressor; Woods et al., 1991) und um das Tight-Junction-Protein ZO-1 (Itoh et al., 1993). Diese Domäne bindet an C-terminale Sequenzen eines Liganden (Doyle et al., 1996).

Die dreidimensionale Struktur umfaßt sechs  $\beta$ -Faltblätter und drei  $\alpha$ -Helices, die eine Umgebung für eine Tasche bilden, wo der Ligand gebunden wird (Doyle et al., 1996).

## 1.1.7 Die Vielfalt der Signalübertragungswege

Die Signale, die durch Bindung eines Liganden an eine spezifische Rezeptortyrosinkinase ausgelöst werden, werden durch die Rekrutierung von zellulären Effektoren an den aktivierten Rezeptor weitergeleitet und führen zu einer Vielzahl zellulärer Antworten.

Die Hauptsignalwege, die von Rezeptortyrosinkinasen ausgehen, werden in Abbildung 1.4 schematisch zusammengefaßt.

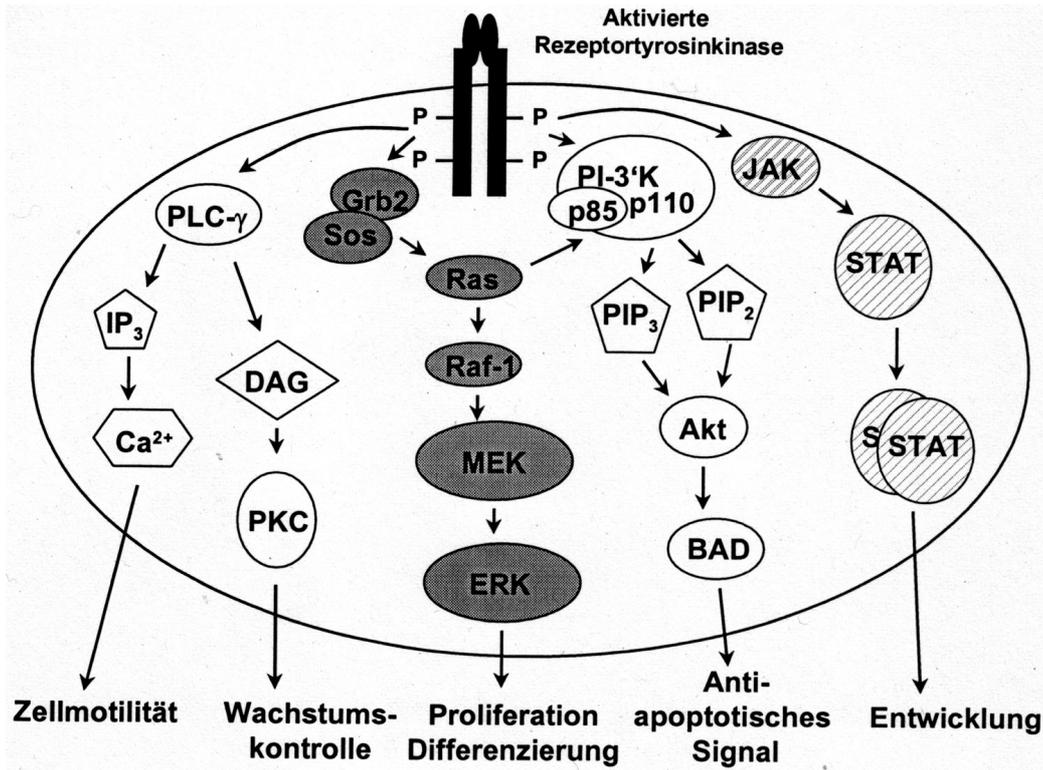


Abbildung 1.4: Hauptsignalwege aktivierter Rezeptortyrosinkinasen (nach Porter & Vaillancourt, 1998)

Die dargestellten Signalwege werden in den folgenden Abschnitten im einzelnen beschrieben.

### 1.1.7.1 Die Grb2-Sos-Ras-Raf-1-MAPK-Kaskade

Das Adaptorprotein Grb2 koppelt einen aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptor an die monomere, membran-assoziierte GTPase Ras. Grb2 bildet über seine SH3-Domäne konstitutiv einen Komplex mit dem Protein Sos (Son of Sevenless; Lowenstein et al.,

1992; Rozakis-Adcock et al., 1993; Egan et al., 1993). Durch die SH2-Domäne von Grb2 bindet der Grb2-Sos-Komplex an einen aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptor. Dadurch wird Sos, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, zur Plasmamembran transferiert und befindet sich dann in unmittelbarer Nähe zu seinem Substrat, dem membrangebundenen Ras-Protein. Durch den Austausch von GDP gegen GTP wird Ras aktiviert und bekommt eine hohe Bindungsaffinität zu der Serin/Threonin-Kinase Raf-1. Durch die Bindung von Ras an die N-terminale Domäne von Raf-1 wird dieses zur Plasmamembran rekrutiert und daraufhin aktiviert (Vojtek et al., 1993; Leever et al., 1994; Morrison & Cutler, 1997). Die Interaktion mit Ras ist jedoch nicht ausreichend für die stabile Aktivierung von Raf-1 (Traverse et al., 1993). Ein weiteres Protein, das an der Raf-Aktivierung beteiligt ist, ist das sog. 14-3-3 (Tzivion et al., 1998).

Das aktivierte Raf-1 wechselwirkt über seine katalytische C-terminale Domäne mit zwei MAPK (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase)-Kinasen, auch MEK-1 und MEK-2 genannt. MEK-1 und MEK-2 werden von Raf-1 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Crews & Erikson, 1993). MEK's sind doppelspezifische Proteinkinasen, die sowohl Threonin- als auch Tyrosinreste in dem Motiv TEY der beiden MAPK  $p42^{\text{MAPK}}$  und  $p44^{\text{MAPK}}$  phosphorylieren. Durch Phosphorylierung werden diese beiden Serin/Threonin-spezifischen Kinasen aktiviert und translozieren in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch spezielle Gene regulieren (Marais et al., 1993).

Aus genetischen Untersuchungen weiß man, daß diese in der Entwicklung hochkonservierte Signalkette physiologisch sehr bedeutsam ist. Deren Aktivierung führt zur Zellproliferation oder zur Differenzierung (Smith et al., 1986; Feig & Cooper, 1988; Cai et al., 1990; Koch et al., 1991).

### 1.1.7.2 Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase-Signalweg

Die PI 3'-Kinase ist ein Heterodimer aus einer regulatorischen Untereinheit p85, mit zwei SH2-Domänen und einer SH3-Domäne sowie einer katalytischen Untereinheit p110.

PI 3'-Kinase bindet über ihre SH2-Domänen direkt an Phosphotyrosinreste vieler aktivierter Rezeptortyrosinkinasen (van de Geer et al., 1994) und gelangt dadurch an die Plasmamembran, wo sich ihre Substrate befinden. Dort setzt sie Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat PI(3,4)P<sub>2</sub> bzw. Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat PI(3,4,5)P<sub>3</sub>

um (Auger et al., 1989).  $PI(3,4)P_2$  und  $PI(3,4,5)P_3$  bewirken die Membrantranslokation vieler Signalproteine, darunter die der Nicht-Rezeptor-Proteinkinasen Btk und Itk, der Serin/Threonin-Kinasen PDK1 und Akt (PKB). Auch PLC- $\gamma$  und Gab1 binden über ihre PH-Domänen an Phospholipide und gelangen dadurch an die Plasmamembran. Durch Membrantranslokation werden diese Proteine aktiviert (Schlessinger, 2000).

Eine wichtige zelluläre Antwort von PI 3'-Kinase ist die Stimulation des Zellüberlebens. Dieser Signalweg läuft über die aktivierte Proteinkinase B, PKB (Akt), die an das apoptotische Protein BAD bindet und es an Serinresten phosphoryliert. Das phosphorylierte BAD ist dann nicht mehr in der Lage, Heterodimere mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> zu bilden. Wenn diese zwei Proteine frei vorliegen, dann können sie Proliferationssignale in den Zellkern senden (Zha et al., 1996). Im Zellkern wird der Transkriptionsfaktor FKHR1 phosphoryliert, der die pro-apoptotische Genexpression hemmt (Schlessinger, 2000).

Die Aktivierung des PI 3'-Kinase-Signalwegs kann auch indirekt über das aktivierte GTP-gebundene Ras erfolgen (Rodriguez-Viciano et al., 1994).

### 1.1.7.3 Der Phospholipase C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )-Signalweg

Nach ihrer Aktivierung hydrolysiert PLC- $\gamma$  bevorzugt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  $PI(4,5)P_2$  zu 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $I(1,4,5)P_3$ ). Beide Produkte fungieren als sekundäre Botenstoffe in der Zelle. Das  $I(1,4,5)P_3$  bindet an spezifische intrazelluläre Substrate - dadurch werden intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Vorräte mobilisiert. Das freigesetzte  $Ca^{2+}$  bindet an Calmodulin, das seinerseits die Aktivierung der Enzyme der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Proteinkinase-Familie (PKC) bewirkt. DAG fungiert auch als Aktivator der PKC-Familie.

Zusätzlich bewirken sowohl  $I(1,4,5)P_3$  als auch DAG die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Karin & Hunter, 1995; Hunter, 2000).

### 1.1.7.4 Der Jak/STAT-Signalweg

STAT's (signal transducers and activators of transcription) werden durch viele aktivierte Zytokinrezeptoren phosphoryliert und dadurch aktiviert (Ihle, 1995). Sie binden entweder direkt über ihre SH2-Domänen oder indirekt über die sog. Janus-Kinasen (Jak) an aktivierte Rezeptoren. Für den PDGF-, den EGF- und den FGF-Rezeptor wurde eine schnelle Aktivierung von STAT's nachgewiesen.

STAT-Proteine bilden im aktivierten Zustand Homo- oder Heterodimere (Greenlund et al., 1995), die in den Kern translozieren, dort an ihre responsiven Sequenzen binden und dadurch die Transkription bestimmter Gene aktivieren. Auf diese Weise werden Proliferations- und Evolutionsvorgänge spezifisch reguliert.

## 1.2 Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/“Scatter factor“ (HGF/SF)-Rezeptor c-Met

### 1.2.1 Biosynthese und Struktur des c-Met-Rezeptors

Wie viele andere Rezeptortyrosinkinasen wurde zunächst das aktivierte Met-Protein - als Onkogenprodukt in Tumorigenesestudien - entdeckt. Das *met*-Onkogen wurde aus der humanen osteogenischen Sarkom-Zelllinie (HOS) nach deren Behandlung mit dem chemischen Karzinogen N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) isoliert (Blair et al., 1982; Cooper et al., 1984). Das Met-Onkogenprodukt ist das Ergebnis einer Chromosomentranslokation: der *met*-Locus auf Chromosom 7 fusioniert mit dem *tpr* („translocated promotor region“)-Locus auf Chromosom 1. Die N-terminale Tpr-Region im Tpr-Met-Fusionsprotein liefert ein Leucin-Zipper-Dimerisierungsmotiv; dadurch kommt es zur konstitutiven Aktivierung des Tpr-Met-Proteins (Park et al., 1986).

Die Isolierung der cDNA für Tpr-Met führte zur Identifizierung seines zellulären Homologs, des c-Met-Rezeptors (Park et al., 1987).

Das *met*-Protoonkogen kodiert für ein glykosyliertes Transmembran-Rezeptorprotein mit Tyrosin-spezifischer Kinase-Aktivität. Der murine c-Met-Rezeptor umfaßt 1393 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa. Er wird als eine einzige Polypeptidkette hauptsächlich von Epithel- und Endothelzellen synthetisiert. Diese wird anschließend partiell glykosyliert, was zur Entstehung eines Vorstufen-Proteins von 170

kDa führt (Gonzatti-Haces et al., 1988; Faletto et al., 1992). Durch erneute Glykosylierung wird eine Polypeptidkette von 190 kDa gebildet. Nach ihrer Sekretion wird diese proteolytisch gespalten; dabei entsteht der reife c-Met-Rezeptor, ein Heterodimer aus einer  $\alpha$  (50 kDa)-Untereinheit und einer  $\beta$  (140 kDa)-Untereinheit, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Gonzatti-Haces et al., 1988; Giordano et al., 1989). Der c-Met-Rezeptor verfügt über für Rezeptortyrosinkinasen typische strukturelle Eigenschaften (s. auch 1.1.2): die N-terminale  $\alpha$ -Kette ist extrazellulär und hochglykosyliert, während die  $\beta$ -Untereinheit aus einer extrazellulären Domäne, die die Ligandenbindungsstelle beinhaltet, einer einzigen Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Region, die die katalytische Domäne enthält, besteht. Im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen verfügt c-Met über eine lange extrazelluläre Domäne, die sowohl einzelne Cysteinreste als auch Cysteinfolgen beinhaltet (Park et al., 1987; s. Abbildung 1.5A).

### 1.2.2 Biosynthese und Struktur des c-Met-Liganden HGF/SF

Der Ligand für den c-Met-Rezeptor wurde auf zwei verschiedenen Weisen entdeckt: als Wachstums-fördernder Faktor für primäre Hepatozyten und Epithelzellen (Miyazawa et al., 1989; Nakamura et al., 1989) und als aus Fibroblasten hervorgehender Effektor für Zellbewegung und Zell-Zell-Interaktionen (Stoker et al., 1987; Gherardi et al., 1989; Weidner et al., 1991). Klonierung und Sequenzierung der Moleküle, die die beschriebenen Effekte ausübten, ergab, daß es sich um ein einziges Protein, nämlich um den Hepatozyten-Wachstumsfaktor/“Scatter factor“ (HGF/SF) handelt.

HGF/SF ist ein Glykoprotein von 92 kDa, das hauptsächlich von Zellen mesenchymalen Ursprungs sezerniert wird und keine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Wachstumsfaktoren aufweist. Dagegen besitzt HGF/SF eine 40 %-ige Homologie zu der Blut-Serinprotease Plasminogen (Miyazawa et al., 1989; Nakamura et al., 1989; Weidner et al., 1991).

Wie Plasminogen wird HGF/SF als Präpropeptid synthetisiert und posttranslational durch Urokinase oder andere Proteasen gespalten. Die posttranslationale Spaltung ist essentiell für die biologische Aktivität des HGF/SF und führt zur Entstehung eines Heterodimers aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die von Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Die leichte Kette (30 kDa) weist eine hohe Homologie zu Serinproteasen auf, verfügt aber

## Einleitung

selbst über keine katalytische Aktivität. Die schwere Kette (60 kDa) enthält eine sog. „Haarnadelschleife“ und vier sog. „Kringeldomänen“. Der N-terminale Teil sowie die erste und die zweite Kringeldomäne der schweren Kette sind notwendig für die Bindung an den Rezeptor (Matsumoto et al., 1991; Okigaki et al., 1992).

Abbildung 1.5 B faßt schematisch einige strukturelle Eigenschaften des HGF/SF zusammen.

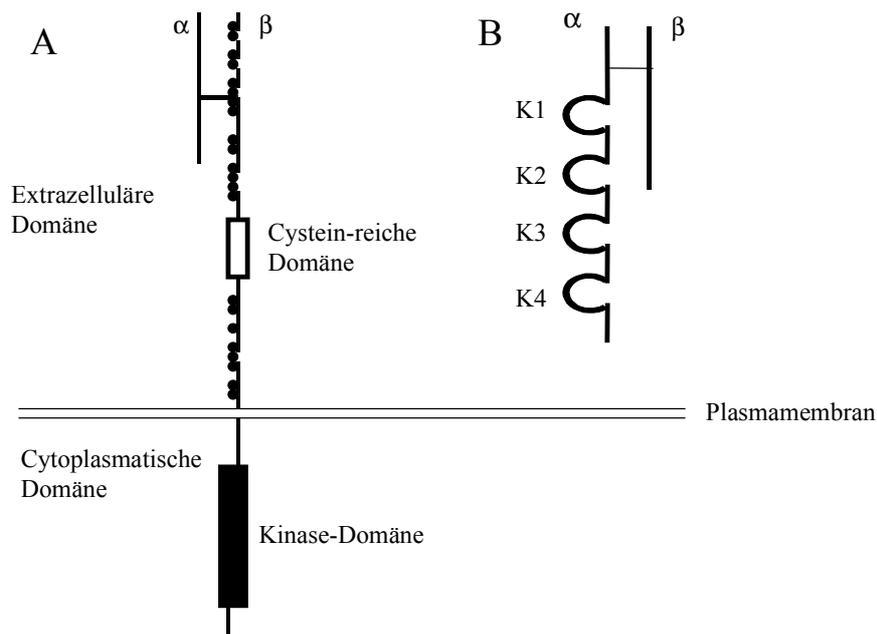


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des c-Met-Rezeptors und seines Liganden HGF/SF (nach Park et al., 1987; Birchmeier et al., 1995)

A: c-Met-Rezeptor - Cysteinreste innerhalb der extrazellulären Domäne sind als dunkle Kreise dargestellt

B: HGF/SF - K1-K4 : Kringel-Domänen

### 1.2.3 Biologische Funktionen des HGF/SF

HGF/SF bindet an seinen spezifischen Rezeptor c-Met, stimuliert dessen intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und löst dadurch eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden aus, die unter anderem die Proliferation, die Migration und die Morphogenese der Zielzellen beeinflussen.

HGF/SF übt pleiotropische Effekte auf diverse Epithelzellen, Melanozyten, Endothelzellen und hematopoetische Zelllinien aus (Rosen et al., 1990; Rubin et al., 1991; Mizuno et al., 1993). Zu diesen pleiotropischen Effekten gehören unter anderem die Zellstreuung (Stoker et al., 1987), das Zellwachstum (Nakamura et al., 1986; Rubin et al., 1991), die Angiogenese (Bussolino et al., 1992; Grant et al., 1993), die Morphogenese von Epithelzellen (Montesano et al., 1991; Tsafarty et al., 1992; Brinkmann et al., 1995) sowie morphologische Veränderungen von Neuronen (Maina et al., 1997). Zusätzlich fungiert HGF/SF als zytotoxischer Faktor, der das Wachstum spezifischer Tumorzellen inhibiert (Higashio et al., 1990; Shiota et al., 1992). Im Gegensatz dazu spielt eine abnormale HGF/c-Met-Signalübertragung eine signifikante Rolle bei der Stimulation des Wachstums von Tumoren und der Bildung von Metastasen (Rong et al., 1994).

### 1.2.3.1 HGF/SF-Effekte *in vivo*

Studien an Knockout-Mäusen ergaben, daß sowohl HGF/SF als auch sein Rezeptor c-Met eine essentielle Rolle in der Embryogenese spielen. HGF/SF<sup>-/-</sup> und c-Met<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp und sind nicht überlebensfähig. Sie sterben während der Embryonalentwicklung zwischen Tag E13 und E16,5. Beginnend mit dem Tag E12 zeigen Null-Mutanten phänotypische Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen: ihre Leber ist viel kleiner und histologisch disorganisiert; außerdem sind morphologische Veränderungen in der Plazenta, vor allem in der Labyrinth-Schicht zu verzeichnen. Charakteristisch für die HGF/SF<sup>-/-</sup>- und die c-Met<sup>-/-</sup>-Mutanten ist auch die Abwesenheit von speziellen Skelettmuskelgruppen, vor allem im Zwerchfell und in den Extremitäten. Das gibt einen Hinweis darauf, daß HGF/SF und sein Rezeptor c-Met die Ablösung und die Migration von Muskel-Vorläuferzellen aus dem Dermomyotom regulieren (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995).

Wie bereits beschrieben, ist HGF/SF ein potenter motogener und morphogener Faktor für Epithelzellen. Die Migrationsfähigkeit und die Morphogenese von Zellen sind für viele embryogenetische Vorgänge und für die Entstehung von Geweben essentiell. Diese Vorgänge beinhalten die strukturelle Organisation und Reorganisation von Einzelzellen und Zellverbänden. Morphogenese-Prozesse sind von spezieller Wichtigkeit in Epithelzellen: diese bilden *in vivo* zunächst zusammenhängende Zellschichten, die sich hinterher zu tubulären und alveolaren Strukturen falten. Aber auch im erwachsenen

Stadium spielt die Migration von Zellen eine Rolle, wie z.B. bei Entzündungsprozessen, bei der Geweberegeneration, der Wundheilung (Matsumoto & Nakamura, 1993; Nusrat, 1994) sowie bei der Metastasierung von Tumoren (Gherardi, 1991).

### 1.2.3.2 HGF/SF-Effekte *in vitro*

HGF/SF übt auch *in vitro* charakteristische Wirkungen auf Zielzellen aus. Dazu gehören die Streuung und die tubuläre Morphogenese von kultivierten Epithelzellen, auf die in den folgenden zwei Abschnitten eingegangen wird.

#### 1.2.3.2.1 Zellstreuung („Scattering“)

Epithelzellen in Kultur bilden zusammenhängende Kolonien aus flachen, miteinander in Zell-Zell-Kontakt stehenden Zellen. In polarisierten Epithelzellen (z.B. MDCK) sind die seitlichen Plasmamembranen durch „Tight junctions“, „Zonula adhaerens“ und Desmosomen miteinander verbunden. Die Zugabe von HGF/SF führt zum Bruch dieser interzellulären Kontakte; dadurch lösen sich innerhalb 4-6-stündiger HGF-Behandlung einzelne Zellen aus dem Zellverband ab, bekommen eine Fibroblasten-ähnliche Erscheinung und fangen (nach 6-stündiger HGF-Behandlung) an zu wandern (Stoker & Perryman, 1985; Dowrick et al., 1993).

Bei der Migration zeigen Zellen folgenden Ablauf morphologischer Veränderungen: die Verlängerung der Zellmembran durch Bildung von Ausläufern, die Anheftung an das Substratum, das Vorwärtsfließen des Zytoplasmas und das Nachziehen der restlichen Zelle. Während dieser ganzen Vorgänge werden Aktinfilamente in kontrollierter Weise auf- und abgebaut (Gherardi, 1991).

Die „Scattering“-Antwort von Epithelzellen wird nicht nur durch deren Stimulierung mit HGF/SF ausgelöst. Auch andere aktivierte Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. der EGF- (Epidermale Wachstumsfaktor) oder der KGF- (Keratinocyten-Wachstumsfaktor) Rezeptor sind in der Lage, ein Signal auszulösen, die Epithelzellen zur Dissoziation und Migration befähigt (Sachs et al., 1996).

### 1.2.3.2.2 Tubulogenese („branching morphogenesis“)

Ein charakteristischer Effekt von HGF/SF ist die Ausbildung von verzweigten Tubuli, wenn bestimmte polarisierte Epithelzellen (z.B. MDCK) in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix in Anwesenheit dieses Faktors kultiviert werden (Montesano et al., 1991). Die Tubulogenese-Antwort ist im Gegensatz zur Zellstreuung c-Met-spezifisch; keine andere aktivierte Rezeptortyrosinkinase kann das komplexe Differenzierungsprogramm in Gang setzen, das zur Morphogenese von Epithelzellen führt (Weidner et al., 1996).

Die Tubulogenese ist *in vivo* ein Evolutionsvorgang, der bei der Entstehung vieler Organe wie Lunge, Speicheldrüse, Milchdrüse, Niere und Pankreas stattfindet (Pollack et al., 1998). In dreidimensionaler Kollagenmatrix kultivierte MDCK-Zellen stellen ein *in vitro*-Modellsystem dar, das die Morphogenese von Epithelgeweben während der Embryonalentwicklung nachahmt.

In Abwesenheit von HGF/SF bilden MDCK-Zellen runde Zysten innerhalb des Kollagengels. Sie umgeben ein flüssigkeitsgefülltes Lumen und stehen lateral in Zell-Zell-Kontakt miteinander. Der Zusatz von HGF/SF bewirkt, daß sich die Zellen umorganisieren und verzweigte Tubuli mit einem durchgehenden, flüssigkeitsgefüllten Lumen innerhalb der Kollagenmatrix bilden. Sowohl die Zellen der Zysten als auch die der Tubuli sind polarisiert; ihre apikale Seite steht in Kontakt mit dem Lumen, während die basale Seite Kontakt zu der Kollagenmatrix hat (Pollack et al., 1998). Der Tubulogenese-Vorgang dauert 7-10 Tage und durchläuft mehrere Stadien (s. auch Diskussion).

### 1.2.4 Signalübertragung durch den c-Met-Rezeptor

Die Aktivierung von c-Met erfolgt nach dem typischen Mechanismus für Rezeptortyrosinkinasen (Schlessinger & Ullrich, 1992). Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung und zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors (Bottaro et al., 1991).

Die katalytische Schleife von c-Met enthält für Tyrosinkinasen typische, hochkonservierte Motive: einen konservierten Lysinrest an Position 1110 (die Zahlen gelten für den murinen c-Met-Rezeptor), dessen Mutation die ATP-Bindung verhindert, einen invarianten Aspartatrest an Position 1204, der das Proton der Hydroxylgruppe des Substrat-Tyrosins

## Einleitung

---

abzieht und das DFG-Triplett an Position 1222-1224, das die Metallionen-Bindungsstelle darstellt.



Abbildung 1.6: Aminosäuresequenz der katalytischen Schleife und der Aktivierungsschleife des murinen c-Met-Rezeptors. Konservierte Motive innerhalb der Rezeptortyrosinkinase-Familie sind unterstrichen. Die autophosphorylierbaren Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife und der für die Katalyse wichtige Aspartatrest in der katalytischen Schleife sind fett gedruckt.

Durch die Aktivierung kommt es zu einer kreuzweisen Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife des Rezeptors. Im Falle von c-Met ist der Tyrosinrest Y1235 die Hauptphosphorylierungsstelle; das benachbarte Tyrosin Y1234 wird ebenfalls phosphoryliert (Naldini et al., 1991). Die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife bewirkt eine erneute Konformationsänderung, die zur vollen Entfaltung der katalytischen Aktivität führt. Dadurch werden weitere, regulatorische Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors phosphoryliert, die Bindungsstellen für zelluläre Effektoren darstellen. Der c-Met-Rezeptor besitzt zwei regulatorische Tyrosinreste, die die sog. Multisubstrat-Bindungsstelle Y1349VHVNATY1356VNV ausmachen. Diese Multisubstrat-Bindungsstelle ist essentiell für die Weiterleitung der c-Met-Signale. „Knock-In“-Mausmutanten, bei denen durch Punktmutationen im *met*-Locus die 2 Tyrosine innerhalb dieser Stelle durch Phenylalanine ersetzt wurden, zeigen denselben Phänotyp wie c-Met<sup>-/-</sup>-Mutanten (Maina et al., 1996).

Die zwei Phosphotyrosine in der Multisubstrat-Bindungsstelle rekrutieren eine Reihe SH2-Domänen- oder PTB-Domänen-haltiger Proteine zum c-Met-Rezeptor. Dazu gehören die Adaptormoleküle Grb2 (Ponzetto et al., 1994), Shc (Pelicci et al., 1995) und Gab1 (Weidner et al., 1996), die p85-Untereinheit der PI 3-Kinase (Graziani et al., 1991) sowie Phospholipase C- $\gamma$ , c-Src (Ponzetto et al., 1994) und STAT3 (Boccaccio et al., 1998). Mit Ausnahme von Grb2 binden diese ganzen Signalmoleküle an beide Tyrosinreste der Multisubstratbindungsstelle; Grb 2 assoziiert selektiv nur mit pY1356.

Grb2 kann auch indirekt - über Shc - zum aktivierten c-Met-Rezeptor rekrutiert werden. Nach dessen Bindung an c-Met wird Shc an Tyrosinresten phosphoryliert, was zur Entstehung einer Grb2-Bindungsstelle (pY317VNV) führt (Pelicci et al., 1995), deren

## Einleitung

---

Aminosäurenabfolge identisch zu der Grb2-Bindungsstelle innerhalb von c-Met (pY1356VNV) ist.

Durch die Bindung von Grb2 an c-Met wird die Grb2-MAPK-Kaskade aktiviert, die hauptsächlich zur Zellproliferation führt. Außerdem ist die c-Met/Grb2-Interaktion essentiell für die HGF/SF-induzierte Tubulogenese-Antwort der MDCK-Zellen (Royal et al. 1997). An der c-Met-vermittelten Tubulogenese-Antwort sind außerdem Gab1 (Weidner et al., 1996), STAT3 (Boccaccio et al., 1998), PLC- $\gamma$  (Gual et al., 2000) und SHP-2 (Schaeper et al., 2000) in entscheidender Weise beteiligt.

In MDCK-Zellen ist die durch Bindung von Grb2 bzw. von Shc-Grb2 an c-Met hervorgerufene Aktivierung von Ras für die HGF-induzierte „Scattering“-Antwort essentiell. Die Expression von Ras-dominant-negativen Mutanten in diesen Zellen führte zur Hemmung der Zellstreuung (Hartmann et al., 1994).

Die Assoziation der p85-Untereinheit der PI 3'-Kinase mit dem c-Met-Rezeptor beeinflusst sowohl die Überlebensfähigkeit der Zellen als auch die „Scattering“-Antwort (Royal & Park, 1995). Die PI 3'-Kinase wechselwirkt mit dem kleinen G-Protein Rac, was zu dessen Aktivierung und der damit verbundenen gesteigerten Ausbildung von Lamellipodien führt. Dieser Vorgang trägt entscheidend zur Zellmigration bei (Ridley et al., 1992).

PI 3'-Kinase und PLC- $\gamma$  assoziieren sowohl direkt als auch indirekt - über Gab1 - mit dem aktivierten c-Met-Rezeptor (Maroun et al., 1999a; Bardelli et al., 1997).

Auch c-Src bindet an die beiden Phosphotyrosine innerhalb der Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met. Durch die Interaktion mit c-Met wird die Src-Kinase aktiviert; die Aktivierung von c-Src spielt eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der HGF-induzierten Zellmigration und Zelltransformation (Ponzetto et al., 1994; Rahimi et al., 1998).

Der aktivierte c-Met-Rezeptor rekrutiert - direkt oder indirekt (über Gab1) - auch den Transkriptionsfaktor STAT3 (Boccaccio et al., 1998). Nach dessen Tyrosin-phosphorylierung wandert STAT3 in den Zellkern und reguliert die Transkription bestimmter Gene. Die Aktivierung und die Translokation von STAT3 in den Zellkern sind für die Induktion der tubulären Morphogenese in MDCK-Zellen notwendig (Boccaccio et al., 1998).

In Abbildung 1.7 sind die wichtigsten strukturellen Merkmale und die Haupt-Signaltransduktionswege des c-Met-Rezeptors zusammengefaßt.

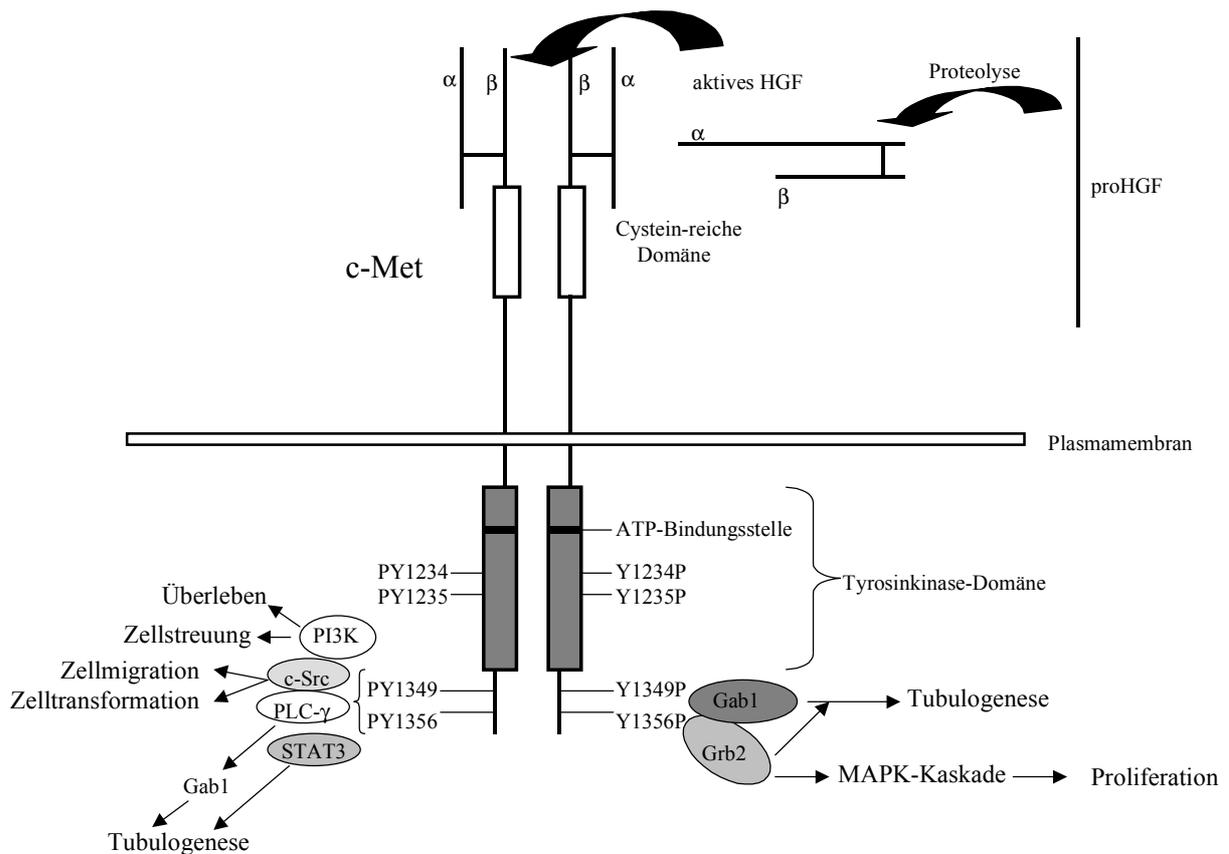


Abbildung 1.7: Wichtigste Strukturelemente und Signalwege des c-Met-Rezeptors. Dargestellt sind die extrazelluläre Cystein-reiche Domäne, die Tyrosinkinase-Domäne mit der ATP-Bindungsstelle, die Autophosphorylierungsstellen sowie die Hauptbindungsproteine

Die Vielfalt der c-Met-bindenden Effektoren gibt einen Hinweis auf die Komplexität der durch HGF/SF vermittelten Signale und erklärt die vielzähligen Effekte dieses Wachstumsfaktors in diversen Zielzellen.

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben, stellt die Proteinkinase c-Met einen multifunktionellen Rezeptor dar. Durch die Bindung des Liganden HGF/SF an den c-Met-Rezeptor und dessen nachfolgende Aktivierung werden multiple Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die zu unterschiedlichen zellulären Antworten führen, z.B. Zellwachstum, Schutz vor Apoptose, Zellmigration und Zelldifferenzierung. Es ist offensichtlich, daß die c-Met-Aktivierung die Integration multipler Signalwege zur Folge hat.

## Einleitung

---

c-Met unterscheidet sich von anderen Rezeptortyrosinkinasen einerseits durch die Anwesenheit einer einzigen Multisubstrat-Bindungsstelle, mit der alle bekannten c-Met-Effektoren assoziieren, andererseits durch die Fähigkeit, ein komplexes Differenzierungssignal auszulösen, das in Kollagengel kultivierte Epithelzellen zur Tubulogenese befähigt (s. Abbildung 1.8).

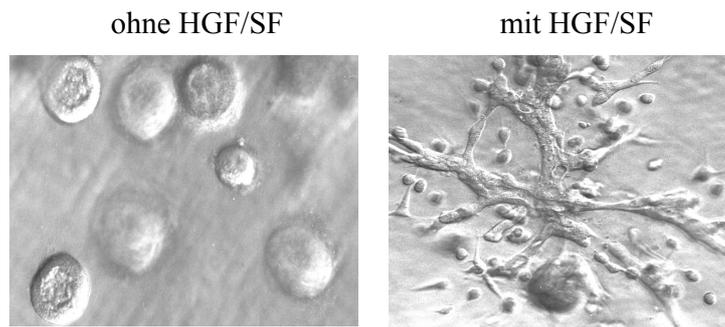


Abbildung 1.8: HGF-induzierte Tubulogenese von MDCK-Zellen in dreidimensionaler Kollagenmatrix. Die Zellen werden in einem Kollagengel eingebettet und so lange kultiviert, bis sie runde Zysten bilden. In Gegenwart von HGF/SF bilden sich innerhalb von ca. 7 Tagen verzweigte Tubuli aus den Zysten.

Die Tatsache, daß diese komplexe zelluläre Antwort von keiner anderen aktivierten Rezeptortyrosinkinase hervorgerufen wird, gibt Anlaß zu der Frage, ob es c-Met-spezifische Effektoren gibt, die an der Vermittlung dieser Antwort entscheidend beteiligt sind. Zusätzlich kann die Spezifität der c-Met-Signaltransduktion durch die koordinierte Aktivierung und Integration mehrerer unspezifischer (auch von anderen aktivierten Rezeptortyrosinkinasen verwendbarer) Signalwege entstehen.

Um die erste Frage beantworten zu können, sollten zunächst im Rahmen dieser Arbeit neue c-Met-Bindungspartner mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert werden, die bei der c-Met-spezifischen Signalweiterleitung eine Rolle spielen. Die zu Beginn der Arbeit bekannten c-Met-Effektoren wie z.B. PI 3'-Kinase, PLC- $\gamma$ , Grb2 oder Gab1 werden auch von vielen anderen Rezeptortyrosinkinasen gebunden. Das heißt, ihre nachgeschalteten Signalkaskaden sind nicht unbedingt spezifisch.

## Einleitung

---

Es galt auch zu überprüfen, ob die Spezifität der c-Met-Signaltransduktion auf die Integration mehrerer, gleichzeitig aktivierter Signalwege zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptortyrosinkinasen, die über zahlreiche Autophosphorylierungsstellen verfügen, so daß verschiedene Signalmoleküle gleichzeitig gebunden werden können, gibt es innerhalb von c-Met nur zwei regulatorische Autophosphorylierungsstellen, die die Multisubstrat-Bindungsstelle ausmachen und über die alle c-Met-Effektoren rekrutiert werden. Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die verschiedenen c-Met-Bindungsproteine gleichzeitig oder sequentiell mit der einzigen c-Met-Multisubstrat-Bindungsstelle zu assoziieren vermögen.

## MATERIAL UND METHODEN

### 2. Materialien

#### 2.1 Chemikalien

##### A

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Bio-Rad, München
6-Aminocapronsäure	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren, diverse	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aminotriazol	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatrium-Salz	Boehringer, Mannheim

##### B

Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bisacrylamid (N, N'-Methylenbisacrylamid)	Biorad, München
BisTrisPropan (BTP)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe

##### C

Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Caseinhydrolysat Pepton Nr.140	Gibco-BRL, Eggenstein

## Material und Methoden

---

Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholinchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau	Merck, Darmstadt

### D

dATP (2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat)	Gibco-BRL, Eggenstein
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
D-Ca-Pantothenat	Gibco-BRL, Eggenstein
dCTP (2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat)	Gibco-BRL, Eggenstein
dGTP (2'-Deoxyguanidin-5'-triphosphat)	Gibco-BRL, Eggenstein
dTTP (2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat)	Gibco-BRL, Eggenstein
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deoxycytidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deoxythymidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Denhardt's Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dGTP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dinatriummethyldiamintetraacetat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM-Medium	Gibco-BRL, Eggenstein
dNTP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim

### E

E-MEM (Minimum Essential Medium, Eagle)	Gibco-BRL, Eggenstein
EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium-Salz)	Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(□-aminoethylether)	Merck, Darmstadt
Eisennitrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim

## Material und Methoden

---

### F

Fötales Kälberserum	Gibco-BRL, Eggenstein
Folsäure	Gibco-BRL, Eggenstein
Formaldehyd 37 % (v/v)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt

### G

G418-Sulfat (Geneticin)	Gibco-BRL, Eggenstein
Gelatine	Roth, Karlsruhe
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	Gibco-BRL, Eggenstein
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumisothiocyanat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### H

Hefeextrakt	Gibco-BRL, Eggenstein
Hepes	Roth, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Gibco-BRL, Eggenstein
HPLC-Wasser	T.J. Baker, Deventer, Holland
Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF)	Roth, Karlsruhe

### I

i-Inositol	Gibco-BRL, Eggenstein
Indolacrylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe

### K

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
---------------	------------------

## Material und Methoden

---

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Gibco-BRL, Eggenstein
Kollagen, Typ I	Becton Dickinson, Frankfurt

### L

Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe

### M

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Maltose	Roth, Karlsruhe
May-Grünwald Farblösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	T.J.Baker, Deventer, Holland
N,N'-Methylenbisacrylsäureamid	Bio-Rad, München
Molekulargewichtsmarker, broad range	Biolabs, England
3-Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Moviol	Hoechst AG, Frankfurt

### N

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	ICN, Eschwege
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

## Material und Methoden

---

Natriumpyruvat	Gibco-BRL, Eggenstein
Nicotinamid	Roth, Karlsruhe
Ninhydrin	Serva, Heidelberg
Nonidet P40	Roche Diagnostics, Mannheim

### P

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Natriumsalz	Sebak, Aidenbach
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Gibco-BRL, Eggenstein
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 4000	Merck, Darmstadt
Proteinmarker	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### R

Riboflavin	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco-BRL, Eggenstein

### S

Salzsäure	Merck, Darmstadt
Silikonlösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptomycinsulfat	Sebak, Aidenbach
Superfect	Qiagen, Hilden

### T

Tetracyclin-Hydrochlorid	Roche Diagnostics, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Thiamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

Triton-X	Serva, Heidelberg
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

### U

Uracil	Roth, Karlsruhe
--------	-----------------

### X

X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranosid)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

### Y

Yeast Nitrogen Base (ohne Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)	Gibco-BRL, Eggenstein
--	-----------------------

### Z

Zinkchlorid	Merck, Darmstadt
-------------	------------------

## 2.2 Aminosäuren

L-Alanin	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Roth, Karlsruhe
L-Asparagin	Roth, Karlsruhe
L-Asparaginsäure	Roth, Karlsruhe
L-Cystein	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Roth, Karlsruhe
L-Isoleucin	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

L-Lysin	Roth, Karlsruhe
L-Methionin	Roth, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Roth, Karlsruhe
L-Valin	Roth, Karlsruhe

### 2.3 Enzyme und ihre Puffer

Restriktionsendonukleasen wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), Biolabs (England) und Stratagene (Heidelberg) bezogen und mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) wurde von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Die verwendeten DNase I, die Proteinase K, die T4-DNA-Ligase und das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I sind von Roche Diagnostics, Mannheim.

RNASin ist von Stratagene, Heidelberg.

Die Taq-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von Stratagene, Heidelberg, bezogen.

### 2.4 Radioaktive Stoffe

[ <sup>125</sup> J] anti-Maus IgG aus Schaf (500-2000 Ci/mmol)	ICN, Eschwege
[ <sup>125</sup> J] anti-Kaninchen IgG aus Schaf (500-2000 Ci/mmol)	ICN, Eschwege
α-[ <sup>32</sup> P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin (10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig

### 2.5 Antikörper

anti-Met	monoklonal	Upstate, Lake Placid, USA
anti-Met	polyklonal	Santa Cruz Biotechnol., USA
anti-Myc (9E10)	monoklonal	Santa Cruz Biotechnol., USA
anti-Phosphotyrosin (4G10)	monoklonal	Upstate, Lake Placid, USA
anti-SHIP	polyklonal	Santa Cruz Biotechnol., USA

Das anti-LexA Kaninchen-Immunsersum ist eine Gabe von Dr. M. Funk, Medigene, Martinsried.

### 2.6 Verwendete Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Mini Kit (Endonuklease-freie Reinigung)	QIAGEN, Hilden
Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Jet Nick Probe Purification after Labeling Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Megaprime DNA Labeling Kit RPN 1606/7	Amersham Buchler, Braunschweig
AmpliTaq FS BigDye Terminator	Perkin Elmer, Weiterstadt

### 2.7 Weitere Materialien

Bakterienpetrischalen (90 mm, 140 mm)	Greiner, Nürtingen
Bio Max <sup>TM</sup> MR Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Bottletop Filter	Millipore, Eschborn
Deckgläser	IDL, Nidderau
Einmal-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Elektroporationsküvette (0,1 cm)	Bio-Rad, München
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filmkassette mit Verstärkerfolie	DuPont, USA

## Material und Methoden

---

Gewebekulturschalen	Nalge Nunc, Naperville IL
Glasperlen ( $\Phi$ 0,45 mm)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)	Blot Clontech, Heidelberg
1,5-ml-Kryoröhrchen	Falcon, Heidelberg
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kühn & Bayer, Nidderau
Objektträger	IDL, Nidderau
Oxalyticase-Stammlösung	Arbeitsgruppe Dr. Binz, MH Hannover
Parafilm	Jürgens-Omnilab, Hannover
Protran BA Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
pVP16-cDNA-Bibliothek	Dr.T.Südhof, University of Texas
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
RNA-Matrix	Dianova
Röntgenfilm X-OMAT™ AR	Kodak, Rochester,USA
Röntgenfilm Bio MAX™ MR	Kodak, Rochester,USA
Sequenzierreaktionsgefäß mit Gummiseptum	Perkin Elmer, Weiterstadt
Skalpell	Jürgens-Omnilab, Hannover
Spritzen, diverse Größen	Braun, Melsungen
Superfect	QIAGEN, Hilden
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Transfermembran (PVDF)	Macherey und Nagel, Düren
Transfermembran (Immobilon-P)	Millipore, Bedford
Whatman 3MM-Papier	Pierce, Rockford, USA

## 2.8 Plasmide

### 2.8.1 Klonierungsvektoren

pBlueScript SK <sup>+</sup>	Stratagene, La Jolla, USA
pGEM-T	Promega, Madison, USA

### 2.8.2 Expressionsvektoren für Bakterien

pGEX-2T	Pharmacia, Freiburg
pGEX5X-1	Pharmacia, Freiburg
pBK-CMV	Stratagene, La Jolla, USA
pQE-30	Qiagen, Hilden

### 2.8.3 Expressionsvektoren für Hefen

pBTM116 und pVp16 sind eine freundliche Gabe von Dr.S.Fields, University of Washington, Seattle, USA.

### 2.8.4 Expressionsvektoren für Säugerzellen

pcDNA3.1Myc-His (A)	Invitrogen,
pSV2neo	(Southern & Berg, 1982)

### 2.8.5 Weitere Plasmide

pAktin: enthält murines Zytoskelett  $\beta$ -Aktin cDNA (Tokunaga et al., 1986); das Insert wird radioaktiv markiert und als Northernblot-Kontrolle für die RNA-Menge eingesetzt.

## 2.9 Biologische Reagenzien

### 2.9.1 Bakterienstämme

*Staphylococcus aureus* Stamm Cowan I

Alle folgenden Bakterienstämme sind *E.coli* K12 Derivate:

## Material und Methoden

---

- HB101: F<sup>-</sup>, hsdS20 (r-B, m-B), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK-2, rpsL20 (str<sub>R</sub>), xyl- 5, mtl-1, supE44 (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969, Bolivar et al., 1977)
- DH5α: F<sup>-</sup>, recA1, endA1, gyrA96 (nal<sup>+</sup>), thi, hsdR17, supE44, relA1 (Gibco-BRL, Eggenstein)
- M15 [pREP4]: Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

### 2.9.2 Hefestämme

*Saccharomyces cerevisiae* L40: Genotyp: MATa, trp1, leu2, his3, LYS2: lexAop-LacZ, lexAop-His3

*Saccharomyces cerevisiae* YRN 974: Genotyp: trp1, leu2, his3, URA3: lexAop-gfp

Dieser Hefestamm wurde von Dr. R. Niedenthal (Medizinische Hochschule Hannover) generiert und zur Verfügung gestellt.

### 2.9.3 Zelllinien

- A-549: humane, epitheliale Lungencarcinom-Zellen, DSM ACC 107
- CaCo2: humane, epithel-ähnliche Colonicarcinom-Zellen, DSM ACC 169
- EFM-19: humane, epitheliale Brustkrebs-Zellen, DSM ACC 231
- EFM-192A: humane, epitheliale Brustkrebs-Zellen, DSM ACC 258
- FDC-P1Mac11: Subklon der murinen multipotenten hämatopoetischen Vorläufer-Zelllinie FDC-P1, der neben Rezeptoren für IL-3 und GM-CSF auch endogene M-CSF-Rezeptoren exprimiert (Gliniak & Rohrschneider, 1990)
- HeLa S3: humane, epitheliale Cervix-Carcinomzellen (Gey et al., 1952)
- HEK 293: humane, embryonale Nieren-Epithelzellen, DSM ACC 305
- MDCK (Madin-Darby canine kidney): Epithel-ähnliche Zellen, die primär Hundenierengewebe entstammen.
- PC12: Pheochromocytom-Zellen aus Ratte, DSM ACC 159
- Raji: humane Burkitt-Lymphom-Zellen, DSM ACC 319
- Wehi-3B: myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie, die durch retrovirale Insertion murines IL-3 konstitutiv synthetisiert (Ymer et al., 1985).

### 2.10 Geräte

ABI PRISM 310 (Sequenziergerät)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Bakterienschüttler	GFL, Burg
Beckmann $\beta$ -Szintillationszähler	Beckmann, München
Brutschränke	Memmert, Schwabach
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirchen
Elektrophoresekammer für Polyacrylamid-Gele	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirchen
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Forschungsmikroskop	Nikon, Düsseldorf
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Mannheim
-80 °C Gefriertruhe	Forma Scientific, Göttingen
Geltrockner	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirchen
Glasküvette	Hellma, Mülheim
Graphit-Blot-Kammer	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirchen
GSA-Rotor	Ivan Sorvall, USA
Hybridisierungsöfen und -röhren	Appligene-Oncor, Heidelberg
Quarzküvette	Hellma, Mülheim
Sonifikator	Branson, USA
Sorvall Zentrifugen-Becher	DuPont, USA
Sorvall-Ultraspeed-Zentrifuge	Ivan Sorvall, USA
Speed-vac	Heraeus Christ, Köln
Spektralphotometer	Heraeus Christ, Köln
SS-34 Rotor	Ivan Sorvall, USA
Stromspannungsquelle	Biometra, Göttingen
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

---

UV-Lampe	Vilber Lourmat, Frankreich
Vibromixer	Eppendorf, Hamburg
Wasserkocher	Köttermann, Hänigsen
Werkbank für die Zellkultur	Heraeus Christ, Köln

### 2.11 Nährmedien

#### 2.11.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

2YT-Medium (1 l):	16 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
LB (Luria-Bertani, 1 l):	10 g Caseinhydrolysat Pepton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
SOC Medium (1l):	20 g Bacto-Trypton
	5 g Hefeextrakt
	100 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	20 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose

Ampicillin-Stammlösung (100 x): 10 mg Ampicillin in 1 ml aqua bidest.

Kanamycin-Stammlösung (500 x): 25 mg Kanamycin in 1ml aqua bidest.

Tetracyclin-Stammlösung (500 x): 25 mg Tetracyclin in 1 ml Ethanol

2YT-Agar-Platten: 15 g Bacto-Agar werden in 1000 ml 2YT-Medium gelöst, die Lösung wird in der Mikrowelle aufgeköcht und auf 50°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 10 ml Ampicillinstammlösung wird die Agarlösung in sterile Bakterien-Petrischalen gefüllt.

5 x M9-Medium: 540 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 110 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 43 mM NaCl, 94 mM NH<sub>4</sub>Cl. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

M9-ΔL-Platten: Die Agar-Stammlösung (700 ml) wird aufgeköcht und auf ca. 50 °C abgekühlt.

## Material und Methoden

---

Nach Zugabe von 200 ml 5 x M9-Medium, 10 ml 40 % (v/v) Glucose, 100 ml  $\Delta$ THULL-Mix (10 x), 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml 100 x Tryptophan-, 10 ml 100 x Prolin-, 10 ml Ampicillin-Stammlösung sowie 1 mM Thiamin wird die Agarlösung mit aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt und in sterile Petrischalen gegossen.

100 x Prolin-Stammlösung: Es werden 400 mg der Aminosäure/ml aqua bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

100 x Tryptophan-Stammlösung: Es werden 200 mg Tryptophan/ml aqua bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

100 x Histidin-Stammlösung: Es werden 200 mg Histidin/ml aqua bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

100 x Uracil-Stammlösung: Es werden 200 mg Uracil/ml aqua bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

100 mM Lysin-Stammlösung: Es werden 300 mg Lysin/ml aqua bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.11.2 Nährmedien für Hefekulturen

YPD-Medium:	20 g/L Difco-Pepton
	10 g/L Hefeextrakt, pH auf 5.8 einstellen
	evtl. Zugabe von 20 g Agar, autoklavieren
	Zugabe von 2 % (w/v) Glucose
	100 µg/ml Ampicillin
	25 µg/ml Tetracyclin
$\Delta$ THULL-Medium (1l):	100 ml 10 x SD-Stammlösung
	100 ml 10 x $\Delta$ THULL Aminosäurenmix
	50 ml 40 % (w/v) Glucose
	20 ml 1M Aminotriazol
	100 µg/ml Ampicillin
	25 µg/ml Tetracyclin
$\Delta$ TL-Medium (1 l):	100 ml 10 x SD-Stammlösung
	100 ml 10 x $\Delta$ TL Aminosäurenmix
	50 ml 40 % (w/v) Glucose
	100 µg/ml Ampicillin
	25 µg/ml Tetracyclin

## Material und Methoden

---

$\Delta$ TL-Medium für YRN 974 (1l): 100 ml 10 x SD-Stammlösung

10 ml L-Histidin-Stammlösung

10 ml Uracil-Stammlösung

50 ml 40 % (w/v) Glucose

100  $\mu$ g/ml Ampicillin

25  $\mu$ g/ml Tetracyclin

$\Delta$ L-Medium (1l):

100 ml 10 x SD-Stammlösung

100 ml 10 x  $\Delta$ L-Aminosäurenmix

50 ml 40 % (w/v) Glucose

100  $\mu$ g/ml Ampicillin

25  $\mu$ g/ml Tetracyclin

$\Delta$ T-Medium (1l):

100 ml 10 x SD-Stammlösung

100 ml 10 x  $\Delta$ T-Aminosäurenmix

50 ml 40 % (w/v) Glucose

100  $\mu$ g/ml Ampicillin

25  $\mu$ g/ml Tetracyclin

SD-Stammlösung (10 x):

67 g Difco SD in 600 ml H<sub>2</sub>O lösen

(„Yeast Nitrogen Base without Aminoacids“)

vorsichtig titrieren mit 0,1-0,2 M NaOH nach pH 5.8

auf 1 l mit aqua bidest. auffüllen

10 x  $\Delta$ THULL /  $\Delta$ TL /  $\Delta$ L /  $\Delta$ T Stammlösung:

	10X $\Delta$ THULL- Mix	10X $\Delta$ TL- Mix	10X $\Delta$ T-Mix	10X $\Delta$ L-Mix
L-Isoleucin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l
L-ArgininHCl	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Histidin		200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Leucin			1000 mg/l	
L-Lysin		300 mg/l	300 mg/l	
L-Methionin	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l
L-Tryptophan				200 mg/l

## Material und Methoden

---

L-Tyrosin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
Uracil		200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
Adenin-hemi-				
Sulfatsalz	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l

### 2.11.3 Nährmedien für die Zellkultur

- DMEM-Kulturmedium: DMEM-Basalmedium mit 10 % (v/v) FKS, 2,25 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin und 0,1 % (v/v) Antibiotika-Stammlösung
- EMEM-Kulturmedium: Minimum Essential Medium nach Eagle mit 10 % (v/v) FKS, 2,25 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin, 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren-Stammlösung und 0,1 % (v/v) Antibiotika-Stammlösung.
- Antibiotika-Stammlösung (1000 x):
  - 60 g/l Penicillin
  - 50 g/l Streptomycin
- Nicht essentielle Aminosäuren-Stammlösung:
  - 890 mg/l L-Alanin
  - 1320 mg/l L-Asparagin
  - 1330 mg/l L-Aspartat
  - 1470 mg/l L-Glutamat
  - 750 mg/l Glycin
  - 1150 mg/l L-Prolin
  - 1050 mg/l L-Serin
- 1 x Trypsin-EDTA-Lösung: die kommerzielle Trypsin-Lösung (Gibco-BRL) wird 1:5 mit 0,025 % (w/v)-iger EDTA-Lösung in PBS verdünnt.

## 3. Methoden

### 3.1 DNA-Arbeiten

#### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

##### 3.1.1.1 Verwendete Lösungen

Lösung 1:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl pH 8.0 2 mg/ml Lysozym
Lösung 2:	0.2 N NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung 3:	3 M Na-Acetat pH 4.8
TE-Puffer:	10 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0
RNase-Stammlösung:	10 mM Tris HCl pH 7.5 15 mM NaCl 10 mg/ml RNase (Lösung für 15 Minuten auf 100°C erhitzen, langsam auf Raumtemperatur abkühlen)
QBT-Puffer:	750 mM NaCl 50 mM MOPS 0.15 % Triton X-100 15 % Ethanol auf pH 7.0 einstellen

## Material und Methoden

---

QC-Puffer:                   1000 mM NaCl  
                                  50 mM MOPS  
                                  15 % Ethanol  
                                  auf pH 7.0 einstellen

QF-Puffer:                   1250 mM NaCl  
                                  50 mM MOPS  
                                  auf pH 8.2 einstellen

### 3.1.1.2 Minipräparation von Plasmid DNA

Bakterielle Plasmide sind selbstreplizierende, zirkuläre, extrachromosomale DNA-Moleküle. Im vorliegenden Fall erfolgt die Isolierung von Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979 und Birnboim, 1983. Bei der Reinigung macht man sich die unterschiedlichen Eigenschaften von genomischer Bakterien-DNA und Plasmid-DNA zunutze. So werden bei der Denaturierungsreaktion unter milden alkalischen Bedingungen zwar die Wasserstoffbrückenbindungen sämtlicher bakterieller DNA-Moleküle aufgebrochen, die komplementären, kovalent geschlossenen, ringförmigen Stränge der Plasmid-DNA können aber nicht voneinander getrennt werden. Diese erhalten bei der anschließenden Renaturierung ihre native Konfiguration zurück, während die linearen Stränge der hochmolekularen chromosomalen DNA im denaturierten Zustand bleiben und somit nicht mehr löslich sind.

Die Isolierung kleinster Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien ist essentiell für die Analyse rekombinanter Klone.

3 ml steriles 2YT-Medium werden nach Zusatz des selektiven Antibiotikums mit einer bakteriellen Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C für 12-16 Stunden unter Schütteln inkubiert. 1,5 ml der hochgewachsenen Zellsuspension werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 5 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 250 µl Lösung 1 und 250 µl Lösung 2 alkalisch aufgeschlossen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 350 µl NE-Puffer hinzugefügt. Die Suspension wird bei 14000 rpm und Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert, um Zellbruchstücke und chromosomale DNA zu entfernen. Die sich im Überstand befindliche Plasmid-DNA wird

auf eine QIAprep spin Säule (QIAGEN) aufgetragen. Die weitere Aufreinigung erfolgt laut Protokoll des Herstellers.

### 3.1.1.3 Midipräparation (Maxipräparation)

Die Isolierung und Aufreinigung großer DNA-Mengen (z.B. für die Transfektion eukaryoter Zellkulturen) erfolgt unter Verwendung von Qiagen-Säulen. Beide Präparationen laufen identisch ab; die in Klammern angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf die Maxipräparation.

Eine Bakterien-Einzelkolonie wird in 30 (500) ml 2YT-Medium, dem zur Selektion entsprechendes Antibiotikum zugegeben wurde, angeimpft und für 12-16 Stunden bei 37°C im Schüttler vermehrt. Die Bakterien werden dann für 30 Minuten bei 3500 rpm und 4°C abzentrifugiert, das Bakterienpellet wird in 4 (10) ml Lösung 1 resuspendiert. Nach sofortiger Zugabe von 4 (10) ml Lösung 2 erfolgt eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 4 (10) ml eiskalter Lösung 3 wird die Suspension vorsichtig gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C für 30 Minuten (Sorvall-Zentrifuge, SS 34 Rotor). Ist der Überstand nach dieser Zentrifugation noch nicht frei von unlöslichem Material, schließt sich eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen an. Während der Zentrifugationszeiten wird die Qiagen-Säule mit 4 (10) ml QBT-Puffer äquilibriert. Der gereinigte Überstand wird dann auf die Säule aufgetragen und die Säule zweimal mit je 10 (30) ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit 5 (15) ml QF-Puffer eluiert und mit 0.7 Volumenteilen Isopropanol für 1 Stunde bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm, 4°C für 30 Minuten (Sorvall-Zentrifuge, SS 34 Rotor) wird das Sediment einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wird dann in 200 µl (1 ml) TE-Puffer, bzw. wenn zur Transfektion bestimmt, in 200 µl (1 ml) sterilem aqua bidest. für die Zellkultur aufgenommen, gefällt und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.1.2 DNA-Präzipitation

Für die längerfristige Aufbewahrung oder im Sinne eines Reinigungsschrittes wird die in der wäßrigen Phase enthaltene DNA mit 0.1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat, pH 5.2 und 2 Volumenteilen absolutem Ethanol bei -20°C für mindestens 2-3 Stunden gefällt. Die präzipitierte DNA wird anschließend bei 14000 rpm und Raumtemperatur für 10 Minuten (Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (unter den oben genannten Bedingungen) und in einem für die weitere Verwendung geeigneten Volumen aqua bidest. oder TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: siehe 3.1.1.1 Verwendete Lösungen

### 3.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Stammlösung wird 1:100 mit aqua bidest. verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die OD-Messung erfolgt bei 260 nm gegen aqua bidest. Die Konzentration berechnet sich dann folgendermaßen:

DNA in mg/ml = gemessene  $OD_{260}$  x Verdünnungsfaktor x 0,05

### 3.1.4 DNA-Transformation in Bakterien, Calciumchlorid-Methode

(Cohen et al., 1972)

Als bakterielle Transformation bezeichnet man die Übertragung von Fremd-DNA (z.B. rekombinante Vektoren) auf Bakterienzellen. Die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen wird durch die Behandlung der Zellen mit Calciumchlorid ermöglicht. Bei der Replikation der Bakterien wird die Fremd-DNA vermehrt und exprimiert. Die Expression der aufgenommenen DNA verleiht den Transformanten neue Eigenschaften, so daß sie z.B. über die neu erworbene Antibiotika-Resistenz selektioniert werden können.

### 3.1.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien/Calciumchlorid-Methode

Eine Einzelkolonie eines geeigneten Bakterienstamms wird in 3 ml 2YT Medium (ohne Antibiotika) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Von dieser Vorkultur werden 2 ml zu 200 ml frischem 2YT-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 hochgezogen. Die Bakterienkultur wird anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt und 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 40 ml eiskalter 100 mM Calciumchloridlösung resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wird 10 Minuten bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet wird in 2 ml eiskalter 100 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Die Suspension wird über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. 2 ml Bakterienlösung wird auf final 15 % Glycerin eingestellt und zu 200 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert. Letztere werden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.1.4.2 DNA-Transformation

Ein Aliquot von 100 µl kompetenten Zellen wird mit 50 ng Plasmid-DNA oder dem gesamten Volumen einer Ligasereaktion versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt der Hitzeschock der Zellen durch zweiminütige Überführung in ein Wasserbad mit 42°C. Anschließend wird der Transformationsansatz wieder für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml 2YT-Medium (ohne Antibiotika) wird die Bakteriensuspension für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend werden verschiedene Volumina des Transformationansatzes auf Antibiotikum-haltigen 2YT-Agar-Platten ausplattiert und für 12-16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar werden.

### 3.1.5 DNA-Transformation durch Elektroporation

#### 3.1.5.1 Herstellung elektrokompeter Zellen

Ein Liter LB-Medium wird mit einer frischen Bakterien-Übernachtskultur in der Verdünnung 1:100 angeimpft. Die Bakterien werden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von genau 0,47-0,53 angezogen; sie wachsen dazu etwa vier Stunden. Die Zellen werden 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend werden sie bei 4°C und 4000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden in einem Liter eiskaltem 10 %-igem Glycerin vorsichtig resuspendiert und danach bei 4°C und 4000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden in einem halben Liter eiskaltem 10 %-igem Glycerin vorsichtig resuspendiert und wiederum wie oben zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 20 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin vorsichtig resuspendiert und bei 4°C, 3000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen werden in 2-3 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die entstandene Bakteriensuspension wird zu je 200 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert.

#### 3.1.5.2 Elektroporation

Einstellungen der Werte am Elektroporationsgerät für die Transformation von Bakterien:

Werte für eine 2 mm Küvette: 200 Ohm

25 µF

2,5 kV

Werte für eine 1mm Küvette: 200 Ohm

25 µF

1,8 kV

Die Küvette, die Küvettenhalterung, die DNA und auch die kompetenten Zellen müssen eine Temperatur von 4°C haben. 1-5µl DNA-Lösung werden mit 50 µl kompetenten Bakterien gemischt und die Mischung wird in die Küvette gegeben. Der Puls wird gesetzt, die Zeitdauer sollte etwa 4,5 msec betragen. Die Zellen werden sofort in 1ml SOC-Medium aufgenommen, anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach auf

geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen. Bei Aminosäure-Prototrophie-Selektion sollten die Bakterien nach der SOC-Inkubation mit PBS gewaschen werden.

### 3.1.6 Angewendete Methoden bei der Klonierung

Alle Klonierungsarbeiten wurden modifiziert nach Protokollen aus „Current Protocols in Molecular Biology“, 1995, bzw. gemäß Angaben des Enzymherstellers durchgeführt.

#### 3.1.6.1 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen sind aus Bakterien isolierte Enzyme, die spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und in der Nähe dieser Erkennungssequenzen schneiden, d.h. Doppelstrangbrüche in die DNA einführen. Dabei entstehen entweder stumpfe ("blunt") oder 5'- bzw. 3'-überhängende ("kohäsive") Enden.

Die Restriktionsenzymspaltungen dieser Arbeit wurden unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei werden 1-5 Einheiten (Units) Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt und der Verdau für 2 Stunden bei der vorgeschriebenen Temperatur durchgeführt. Bei Doppelspaltungen wird zunächst das Enzym verwendet, das die niedrigere Ionenkonzentration benötigt. Nach Einstellen auf die erforderliche höhere Ionenkonzentration wird die Spaltung mit dem zweiten Enzym angeschlossen.

Das Volumen der zugegebenen Restriktionsendonuklease sollte nicht mehr als ein Zehntel des gesamten Restriktionsvolumens betragen, da der Aufbewahrungspuffer der Enzyme Glycerin enthält und dies in zu hoher Konzentration die Reaktion stört.

#### 3.1.6.2. Dephosphorylierung 5'-überstehender Enden der DNA

Um eine Selbstligation von linearisierten Vektoren zu vermeiden, wird der terminale 5'-Phosphatrest mit der aus Kälbern isolierten intestinalen Phosphatase (calf intestine phosphatase; CIP) entfernt. Für seine Aktivität benötigt dieses Enzym katalytische Mengen an Zn-Ionen. Die DNA wird mit Enzympuffer und Enzym 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch Phenol/Chloroform-Extraktion aus

## Material und Methoden

---

der Reaktionsmischung entfernt, dann wird die DNA mit Ethanol gefällt und in Ligasereaktionen eingesetzt.

### 3.1.6.3 Ligation

Reagenzien:

- T4-DNA-Ligase (3U/ $\mu$ l)
- T4-DNA-Ligasepuffer, 10-fach konzentriert: 500 mM Tris-HCl pH 7,4
  - 100 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 100 mM DTT
  - 10 mM BSA
  - 10 mM ATP

Um linearisierte Plasmide wieder zu schließen bzw. um verschiedene DNA-Fragmente in Vektoren einzufügen, wird die Ringschlußreaktion mit Hilfe der T4-DNA-Ligase vollzogen. Sowohl bei der Ligation kohäsiver Enden als auch bei der Ligation glatter Enden wird das Insert in 3-fachem molaren Überschuß zum mit CIP dephosphorylierten Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 14°C über Nacht.

Die T4-DNA-Ligase verknüpft kovalent die 5'-Phosphatgruppen des Inserts mit den 3'-OH-Gruppen des Vektors unter Bildung von Phosphodiesterbindungen. Sie verknüpft ebenfalls Doppelstränge mit glatten Enden (allerdings mit geringerer Ausbeute), wobei beide erforderlichen Phosphodiesterbindungen gebildet werden.

Das erzeugte ringförmige Konstrukt wird anschließend über Transformation in Bakterienzellen eingeführt.

### 3.1.7 Elektrophorese in Agarosegelen

Die Agarosegelelektrophorese dient der Trennung, Aufreinigung und Analyse von DNA-Fragmenten. Linearisierte, doppelsträngige DNA wandert im Gel aufgrund negativer Ladung von der Kathode zur Anode; die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Helling et al., 1974). Durch Zugabe von Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht

## Material und Methoden

---

werden - es entstehen Interkalationsverbindungen, die bei Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenzstrahlung abgeben.

Reagenzien:

- 1 x TAE-Puffer; 50 x TAE-Puffer: 2 M Tris-HCl pH 8,0  
0,1 M EDTA  
0,25 M Natriumacetat
- Agarose-Lösung: 0,8-1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer
- Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml
- 6 x Probenauftragspuffer: 30 % (v/v) Glycerin  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
in aqua bidest.

Durchführung:

Die eingewogene Agarose wird in 1 x TAE-Puffer durch Einkochen gelöst, dann in eine horizontale Gelkammer gegossen, in der sich ein Taschen-formender Kamm befindet. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. DNA-Proben werden mit 1/6 Volumenteil 6 x Probenauftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wird mit einer Spannung von 120-140 V durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (2µg/ml) für 15-30 Minuten äquilibriert und unter UV-Beleuchtung bei 254 nm fotografiert.

### **3.1.8 Präparative DNA-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel**

Ein präparativer Restriktionsansatz wird auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, die entstandenen DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid visualisiert und aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgt mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits (QIAGEN) laut Protokoll des Herstellers.

### 3.1. 9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Reagenzien:

- 10 x Reaktionspuffer:      500 mM Tris-HCl pH 8,3  
   750 mM KCl  
   30 mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP-Stammlösung:      je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Durchführung:

Die PCR stellt eine schnelle Methode für die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente dar (Saiki et al., 1988). Da die Synthese unter denaturierenden Bedingungen verläuft, verwendet man die thermostabile Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase. Sie katalysiert das Wachstum des neuen Stranges in 5'-3'-Richtung. Mittels automatischem Thermocyclers erfolgt zunächst die Denaturierung des template-Stranges, dann das Anheften (annealing) der Primer und letztlich die Synthese der neuen Stränge.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 10 µl PCR-Puffer
- 10 µl 10 µM Primer-Gemisch
- 3 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 µl 10 mM dNTP-Gemisch
- x µl DNA-Template (~20 ng)
- 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Die Reaktionsmischung wird mit sterilem PCR aqua bidest. auf 100 µl aufgefüllt, mit Mineralöl überschichtet und in den PCR-Thermoblock überführt. Die Synthese erfolgt in folgenden Schritten:

Denaturierung: 1 Minute bei 94°C

Annealing :    2 Minuten bei 45-60°C (je nach Primer variabel)

Verlängerung: 3 Minuten bei 72°C

Die Anzahl der zu durchlaufenden Zyklen ist 30.

Bei der Auswahl der Primer sollte man beachten, daß die Anzahl der Nukleotide so gewählt ist, daß die Schmelzpunkte der beiden Primer möglichst identisch sind. Die Annealing-Temperatur in der PCR liegt in der Regel 5 bis 7°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer.

### 3.1.10 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte werden mit Hilfe des QIAquick PCR-Aufreinigungskits (QIAGEN) laut Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Anschließend werden sie mit pGEM-T-Vektor (Promega) ligiert. Dieser Vektor liegt linearisiert vor und hat 3'-überhängende Thymidinbasen. Da die PCR-Produkte der Taq-Polymerase 3'-Adeninüberhänge haben, hat dieses System eine hohe Ligationseffizienz. Das Ligationsprodukt wird in Bakterien transformiert, vermehrt und anschließend sequenziert.

### 3.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA wird mit fluoreszierenden dNTP-Analoga in einer PCR-Reaktion markiert und einer automatischen Sequenzierung unterworfen (ABI Prism 310 System, Perkin Elmer). Das Prinzip basiert auf der Dideoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger, 1981). Die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten 2',3'-Dideoxynukleotide werden in einer PCR-Reaktion in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Das führt zu einem kontrollierten, statistisch verteilten Kettenabbruch am 3'-Ende; die jeweils letzte Base ist spezifisch gefärbt. Die PCR-Produkte werden in einer Kapillare des Sequenziergeräts gelelektrophoretisch aufgetrennt. Am Ende der Kapillare liest ein Lasergerät das Fluoreszenzsignal des ankommenden DNA-Strangs. Anhand der Abfolge der Fluoreszenzfarbstoffe wird die DNA-Sequenz erstellt.

250 ng DNA werden mit 3 pmol Primer und 2 µl Reaktionslösung versetzt. Das Reaktionsvolumen soll 10 µl betragen. Die Proben werden anschließend für die PCR-Reaktion in den Thermocycler gestellt.

PCR-Programm: Denaturierung: 30 s 96°C

    Annealing: 15 s 50°C

    Verlängerung: 4 Min 60°C

    Anzahl der Zyklen: 25

Die PCR-Produkte werden anschließend durch Ethanol-fällung gereinigt. Die DNA wird in 25 µl HPLC-Wasser aufgenommen und für 2 Minuten bei 90°C erhitzt, bevor sie im Sequenziergerät analysiert wird.

### 3.1.12 Southern Blot

Die Southern-Blot-Technik ermöglicht die Übertragung von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran (Gene Screen plus™). DNA-Fragmente werden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, denaturiert und durch Kapillarkräfte auf eine Membran übertragen (Sambrook et al., 1989). Anschließend wird die DNA mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert und mittels Autoradiographie detektiert.

#### 3.1.12.1 Transfer der DNA vom Gel auf die Membran und Hybridisierung mit der DNA-Sonde

Reagenzien:

- Alkalischer Transferpuffer: 0,4 M Na OH  
0,6 M NaCl
- Neutralisationspuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 7,0  
1 M NaCl
- Prähybridisierungslösung: 50 % Formamid  
1 % SDS  
1 M NaCl  
10 % Dextransulfat  
100 µg/ml Heringssperma-DNA
- 10 x SSC-Stammlösung: 1,5 M NaCl  
0,15 M Natriumcitrat

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und 30 Minuten in alkalischem Transferpuffer denaturiert. Die Membran (Gene Screen plus™) wird für 30 Minuten in aqua bidest. äquilibriert. Der Transfer durch Kapillarkräfte vom Agarosegel auf die Membran erfolgt bei Raumtemperatur unter alkalischen Bedingungen. Nach 24 Stunden sollte die DNA in denaturierter Form an die Membran gebunden sein. Die Membran wird für 15 Minuten in Neutralisationspuffer und 2 Stunden bei 80°C (zwecks Fixierung der DNA) inkubiert.

Anschließend wird die Membran für mindestens 4 Stunden bei 42°C in Prähybridisierungslösung (1ml/10 cm<sup>2</sup>) inkubiert. Um spezifische DNA-Sequenzen auf der Membran

## Material und Methoden

---

nachzuweisen, wird diese mit der radioaktiv markierten Sonde inkubiert, die eine komplementäre Sequenz zum nachzuweisenden Fragment besitzt. Nach 5-minütiger Hitzedenaturierung bei 100°C wird die DNA-Sonde zur Prähybridisierungslösung zugegeben ( $1 \times 10^6$  cpm/ml). Die Hybridisierung erfolgt bei 42°C über Nacht.

Unspezifische Bindungen werden durch anschließende Waschschriffe unterbunden:

- 15 Minuten bei 45°C mit 20 ml 2 x SSC-Puffer, 0,1 % SDS;
- 15 Minuten bei 45°C mit 20 ml 1 x SSC-Puffer, 0,1 % SDS;
- 30 Minuten bei 60°C mit 20 ml 0,1 x SSC-Puffer, 0,1 % SDS.

Die Membran wird schließlich auf einem Röntgenfilm (X-OMAT™ AR, Kodak) exponiert.

### 3.1.12.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit anschließender Aufreinigung der Sonden

Ungefähr 25 ng eines linearisierten DNA-Fragments von durchschnittlich 500 bp Länge werden mit Hilfe des „Megaprime DNA labelling“ Kits RPN 1606/7 (Amersham) in Anwesenheit von  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die anschließende Reinigung der DNA-Sonden zum Entfernen nicht eingebauter Nukleotide erfolgt mit Hilfe des Jet Nick „Probe Purification after labeling“ Kits (Genomed) nach dem Protokoll des Herstellers.

## 3.2 RNA-Arbeiten

### 3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Reagenzien:

- DEPC-Wasser: aqua bidest. wird mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann folgt eine Inkubation bei 37°C für mindestens 12 Stunden, anschließend wird die Lösung autoklaviert.
- Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS (1 l):
  - 10 g NaCl
  - 0.25 g KCl
  - 1.41 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - pH 7,2

## Material und Methoden

---

- RNA-Lysispuffer:
  - 4 M Guanidiniumisothiocyanat
  - 50 mM Tris-HCl, pH 7.6
  - 10 mM EDTA
  - 2 % Sarkosyl
  - 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

Durchführung:

Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, werden alle Lösungen mit DEPC-behandeltem aqua bidest. hergestellt.

Adhärenz wachsende Zellen einer konfluent bewachsenen Petrischale werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml RNA-Lysispuffer gelöst. Schwimmzellen von einer Dichte  $1 \times 10^7$  pro Schale werden bei 4°C und 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert; das Zellpellet wird einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Damit Scherkräfte auf die chromosomale DNA einwirken können, wird die Zellsuspension durch eine 21G-Kanüle gedrückt, bis die Viskosität der Lösung abnimmt. Anschließend werden 500  $\mu$ l Phenol und 500  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und die Mischung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei Raumtemperatur wird die wässrige Phase einer Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) unter denselben Bedingungen wie oben unterzogen. Anschließend wird die wässrige Phase mit 50  $\mu$ l RNA-Matrix (Dianova) versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wird mit 14000 rpm bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet zweimal mit jeweils 200  $\mu$ l RNA-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die an die Matrix gebundene DNA in 200  $\mu$ l DEPC aqua bidest. resuspendiert und 5 Minuten bei 55°C inkubiert; dann wird die Matrix durch 5-minütige Zentrifugation mit 12000 rpm entfernt. Die Quantifizierung der RNA erfolgt durch OD<sub>260</sub>-Messung (1 OD<sub>260</sub> entspricht 40  $\mu$ g/ml RNA).

### 3.2.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

#### 3.2.2.1 Vorbereitung des 1 %-igen, formaldehydhaltigen Agarosegels

Reagenzien:

- 10  $\times$  MOPS-Puffer: 0,4 M Morpholinpropansulfonsäure  
100 mM Natriumacetat

## Material und Methoden

---

10 mM EDTA

mit NaOH auf pH 7.0 einstellen

- Deionisiertes Formamid: pro 100 ml Formamid wird 1g Dowex XG8 Mischbettmatrix zugegeben. Nach 1 Stunde Rühren wird die Lösung durch ein Faltenfilter filtriert.

Durchführung:

Das 1 %-ige Agarosegel setzt sich wie folgt zusammen:

0,8 g Agarose

59 ml DEPC aqua bidest.

8 ml 10 x MOPS

13 ml Formaldehyd 37 % (v/v)

Die Agarose, das DEPC aqua bidest. und der 10 x MOPS-Puffer werden in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf 65°C wird das Formaldehyd zugesetzt. Anschließend wird die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Erstarren das Gel mit Laufpuffer (1x MOPS) bedeckt.

### 3.2.2.2 Vorbereitung der RNA-Proben

Reagenzien:

- 10 x Probenpuffer: 0,4 % (w/v) Bromphenolblau

0,4 % (w/v) Xylencyanol

50 % (v/v) Glycerin

1 mM EDTA

Durchführung:

20 µg Gesamt-RNA werden in einer Vakuum-Zentrifuge auf 5,5 µl aufkonzentriert, dann werden 1 µl 10 x MOPS-Puffer, 3,5 µl 37 %-iges (v/v) Formaldehyd und 10 µl Formamid zugegeben. Die Probe wird anschließend für 15 Minuten bei 55°C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 2 µl 10 x Probenpuffer wird die Probe auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 10 V/cm und 1 x MOPS als Laufpuffer durchgeführt. Die Position der 28 S und der 18 S ribosomalen RNA kann auf einer Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm visualisiert werden.

### 3.2.3 Northern Blot

#### 3.2.3.1 Transfer der RNA vom Agarosegel auf die Membran

Reagenzien:

- 10 x SSC-Puffer : s. 3.1.12.1

Durchführung:

Die mit Formaldehyd denaturierte RNA wird durch Kapillarkräfte auf eine Nitrocellulose Membran transferiert (Sambrook et al., 1989). Nach der Durchführung der Elektrophorese werden Gel und Membran für 30 Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Der Transfer durch Kapillarkräfte erfolgt bei Raumtemperatur in 10 x SSC binnen 24 Stunden. Zur Entfernung von Gelresten wird die Membran in 2 x SSC geschwenkt, dann wird die RNA durch 2-stündige Inkubation bei 80°C fixiert.

#### 3.2.3.2 Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Reagenzien:

- Prähybridisierungslösung: s. 3.1.12.1
- 10 x SSC-Stammlösung: s. 3.1.12.1

Durchführung:

Die Nitrocellulose-Membran wird wie unter 3.1.12.1 beschrieben prähybridisiert, hybridisiert und gewaschen. Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde erfolgt wie unter 3.1.12.2 beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein kommerziell erhältlicher Northern Blot (MTN) der Firma Clontech verwendet. Es handelt sich dabei um mRNAs verschiedener humaner Gewebe, die auf Nitrocellulose transferiert wurden.

### 3.3 Protein-Arbeiten

#### 3.3.1 Herstellung von Gesamtzellsaten für Immunblots

Reagenzien:

- Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS (1 l): 10 g NaCl  
0,25 g KCl  
1,41 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,2
- PLC-Lysis-Puffer:  
50 mM HEPES pH 7,0  
150 mM NaCl  
30 mM Natriumpyrophosphat  
100 mM NaF  
10 % (v/v) Glycerin  
1 mM EGTA  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 % (v/v) Triton X  
1 mM PMSF  
0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
5 % (v/v) Trasylol
- 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Stammlösung: der pH-Wert der Lösung wird mit 10 N NaOH auf 10,0 eingestellt. Dabei bekommt die erst farblose Lösung eine gelbe Farbe. Sie wird so lange gekocht, bis sie wieder farblos geworden ist. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert überprüft. Einstellen des pH-Wertes, Kochen der Lösung und Überprüfen des pH-Wertes werden so lange durchgeführt, bis sich dieser bei Raumtemperatur auf 10,0 stabilisiert hat.
- Probenpuffer-Stammlösung, 4-fach: 40 ml 20 % SDS  
40 ml Glycerin  
32 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
- Probenpuffer-Gebrauchslösung, 4-fach: 1 ml Probenpuffer-Stammlösung  
80 µl Bromphenolblaulösung 0,1 %-ig (w/v)  
50 µl β-Mercaptoethanol

Durchführung:

Adhärenz wachsende Zellen einer konfluent bewachsenen Petrischale werden zunächst auf den Schalen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann in 1 ml kaltem PLC-Lysispuffer mit Hilfe eines Gummischabers von den Schalen gekratzt. Schwimmmzellen werden zunächst mit 1000 rpm bei 4°C sedimentiert, einmal mit kaltem PBS gewaschen, dann wird das Zellpellet in 1 ml kaltem PLC-Puffer aufgenommen. Das resuspendierte Zellpellet wird auf Eis 5 Minuten zum Schwellen gebracht. Anschließend wird die Membranfraktion durch 5-minütige Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten für Immunblots wird der Überstand mit ¼ Volumen der 4-fach Probenpuffer-Stammlösung versetzt und für mindestens 5 Minuten gekocht. Anschließend können die Gesamtzelllysate sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder für mehrere Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.3.2 Herstellung von Zellysaten für Immunpräzipitationen und GST-Bindungsstudien**

Gesamtzelllysate werden wie unter 3.3.1 beschrieben hergestellt, aber der Überstand nach der Abtrennung der Zelltrümmer wird nicht mehr mit Probenpuffer versetzt und aufgekocht, sondern für Immunpräzipitationen und GST-Bindungsstudien eingesetzt.

### **3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Unter SDS-PAGE versteht man die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) im Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970). Die gebildeten Protein-SDS-Komplexe wandern nach Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell von der Kathode zur Anode; die Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und wird durch die Konzentration des Polyacrylamids im Gel und die angelegte Spannung bestimmt. Nach anfänglicher Konzentrierung der Proteine im 5 %-igen Sammelgel erfolgt die Auftrennung in 7,5 bis 11 %-igen Trenngelen. Zur

## Material und Methoden

---

Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine läßt man einen SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard mitlaufen.

Reagenzien:

- Acrylamid-Lösung: 30 % Acrylamid  
0,8 % Bisacrylamid
- Trenngel (7.5 %-ig): 1,5 ml Acrylamid-Lösung  
2,25 ml 1M Tris-HCl pH 8.8  
2,25 ml aqua bidest.  
10 µl 20%SDS  
3 µl TEMED  
10 µl 10 %-ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
- Trenngel (11 %-ig): 2,25 ml Acrylamid-Lösung  
2,25 ml 1M Tris-HCl pH 8.8  
1,5 ml aqua bidest.  
10 µl 20 % SDS  
3 µl TEMED  
10 µl 10 %-ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
- Sammelgel (5 %-ig): 334 µl Acrylamid-Lösung  
250 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8  
1,4 ml aqua bidest.  
10 µl 20% SDS  
3 µl TEMED  
10 µl 10 %-ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
- 10-fach Laufpuffer: 30,3 g Tris  
142,2 g Glycerin  
10 g SDS  
auf 1 Liter mit aqua bidest. auffüllen

### 3.3.4 Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen; Coomassieblau-Färbung

Reagenzien:

- Coomassie Brillant Blau: der Farbstoff wird in aqua.bidest und Methanol (s.u.) unter Rühren gelöst. Danach wird die Essigsäure zugegeben und das Gemisch durch Whatman 3MM-Papier filtriert.

Durchführung:

Die Nachweisgrenze für Coomassieblau-gefärbte Gele beträgt 300 bis 1000 ng pro Proteinbande. Nach der Elektrophorese werden die Gele für eine Stunde in eine Färbelösung bestehend aus 450 ml Methanol, 450 ml aqua bidest., 100 ml Essigsäure und 2,5 g Coomassieblau überführt. In dieser Lösung erfolgt die Fixierung und Färbung der Proteinbanden. Zur Entfärbung des unspezifisch blau gefärbten Hintergrunds wird das Gel für 3-4 Stunden in einer Entfärbelösung (besitzt dieselbe Zusammensetzung wie die Färbelösung ohne Coomassieblau) geschwenkt. Anschließend wird das Gel gründlich mit aqua bidest. gewaschen, auf Whatmanpapier übertragen und getrocknet.

### 3.3.5 Western Blot

Mit Hilfe der Western Blot Technik ist es möglich, sehr geringe Mengen eines bestimmten Proteins spezifisch zu erfassen. Dabei werden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine im elektrischen Feld auf eine Transfermembran übertragen (Elektroblotting, Khyse-Anderson, 1984). Die auf die Membran übertragenen Proteine können anschließend mittels immunochemischen Techniken analysiert und charakterisiert werden (Immunblot, Towbin et al., 1979).

Reagenzien:

- Anoden-Puffer I pH 10,4: 300 mM Tris-HCl  
20 % Methanol
- Anoden-Puffer II pH 10,4: 25 mM Tris-HCl  
20 % Methanol
- Kathoden-Puffer pH 9,4: 25 mM Tris-HCl  
20 % Methanol  
40 mM 6-Amino-n-Hexansäure
- Ponceau-S Gebrauchslösung: 0,2 % Ponceau S  
3 % TCA

Durchführung:

Zunächst wird die Graphit-Elektrode der Blotkammer mit Anoden-Puffer I befeuchtet. Darauf werden zwei dem Gel entsprechend zugeschnittene, mit Anoden-Puffer I getränkte Filterpapiere aufgelegt. Nach einem in Anoden-Puffer II getränkten Filterpapier folgt die Transfermembran (PVDF), die zuvor für 30 Sekunden mit Methanol, 2 Minuten mit aqua

bideest. und 10 Minuten mit Anoden-Puffer II vorbehandelt wurde. Auf die Membran wird das zu blottende Gel, das für 15 Minuten mit Kathoden-Puffer vorbehandelt wurde, aufgelegt. Es folgen drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Befeuchten der Kathode mit Kathoden-Puffer wird diese abschließend aufgelegt. Der Transfer erfolgt mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 1,5 Stunden bei 7,5 %-igen Gelen und für 2 Stunden bei 11 %-igen Gelen. Die Vollständigkeit des Transfers kann durch die Ponceau-Rot-Färbung der Membran überprüft werden. Dazu wird die Membran für eine Minute in Ponceau-Rot-Färbelösung inkubiert und mit aqua bideest. entfärbt.

### 3.3.6 Immunblot

Reagenzien:

- Tris-gepufferte Salzlösung (TBS): 20 mM Tris  
137 mM NaCl  
ad 1 l aqua bideest.  
auf pH 7,6 einstellen
- Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST): TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
- Blockpuffer: 3 % (w/v) BSA in TBST

Durchführung:

Nach dem Elektrotransfer wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3 % (w/v)-iger BSA-Lösung in TBST abgesättigt. Damit werden unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers an die geblotteten Proteine unterbunden. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt in der entsprechenden Verdünnung mit 3 ml Blockpuffer über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter ständiger Rotation. Nach 4 Waschvorgängen mit TBST für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgt die Detektion des ersten Antikörpers mit dem zweiten Antikörper ( $10 \mu\text{l}$  [ $^{125}\text{J}$ ]-markierten IgG ( $2 \mu\text{Ci}$ ) in 3 ml Blockpuffer). Nach 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Membran viermal für je 15 Minuten mit TBST gewaschen, anschließend erfolgt die Exposition auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT).

### 3.3.7 Immunpräzipitation

Reagenzien:

- Probenpuffer-Stammlösung, 1-fach: 10 ml 20 % SDS  
10 ml Glycerin  
8 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8  
72 ml aqua bidest.
- Probenpuffer-Gebrauchslösung, 1-fach: 1 ml Probenpuffer-Stammlösung, 1-fach  
80 µl Bromphenolblau-Lösung  
50 µl β-Mercaptoethanol
- Bromphenolblau-Lösung: 0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
0,1 % (w/v) Natriumazid

Durchführung:

Hierbei handelt es sich um eine *in vitro*-Methode, bei der ein Proteinzellysat (Antigen) mit einem Antiserum inkubiert wird, wobei es zur Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe kommt. Durch nachfolgende Inkubation des Antikörper-Antigen-Komplexes mit an Formaldehyd fixierten *Staphylococcus aureus*-Bakterien (Stamm Cowan I) erfolgt eine stabile Bindung der F<sub>C</sub>-Region des Antikörpers an das bakterielle Oberflächenprotein A (Kessler, 1976). Unspezifisch bindende Proteine werden anschließend durch mehrere Waschschrte entfernt. Der Antigen-Antikörper-Protein A-Komplex wird in 30 µl 1-fach Probenpuffer resuspendiert und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Antigen, Antikörper und Bakterien durch Kochen für 5 Minuten aufgelöst. Die Bakterien werden durch eine anschließende zweiminütige Zentrifugation vom Immunkomplex getrennt und die Bestandteile des Immunkomplexes in einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunblot analysiert.

### 3.3.8 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation ist eine Methode, mit deren Hilfe Protein-Protein-Wechselwirkungen qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Durch Inkubation eines Zellysats mit einem entsprechenden Antiserum bilden sich spezifische Komplexe aus Antikörper, Antigen und Bindeproteinen des Antigens. Durch anschließende Zugabe von an Formaldehyd fixierten *Staphylococcus aureus*-Bakterien (Stamm Cowan I) können die

gebildeten Komplexe präzipitiert werden. Die Waschschriffe erfolgen mit Bindungsstabilisierendem Puffer, wie z.B. PLC-Lysispuffer (s. 3.3.1). Die präzipitierten Komplexe werden in 30 µl Probenpuffer aufgenommen und wie unter 3.3.7 beschrieben weiterbehandelt.

### 3.3.9 *In vitro* Kinase-Assay

Reagenzien:

- Kinase-Lysispuffer: 10 mM PO<sub>4</sub>-Stammlösung  
10 mM EDTA  
40 mM NaF  
1 % (v/v) Triton X-100  
5 % (v/v) Trasylol
- PO<sub>4</sub>-Stammlösung: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0
- Kinase-Waschpuffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0  
10 mM EDTA  
40 mM NaF  
1 M NaCl  
0,2 % (v/v) Triton X-100  
5 % (v/v) Trasylol
- Quench-Puffer: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0  
10 mM EDTA  
40 mM NaF  
1 mM ATP
- Probenpuffer-Stammlösung, 1-fach: s. 3.3.7
- Probenpuffer-Gebrauchslösung, 1-fach: s. 3.3.7

Durchführung:

Tyrosinkinasen sind Proteine, die sich selbst (Autophosphorylierung) oder andere Proteine an Tyrosinresten zu phosphorylieren vermögen. Die enzymatische Aktivität von Tyrosinkinasen kann *in vitro* in einer Kinase-Bestimmung nachgewiesen werden. Dazu werden Zellen mit Kinase-Lysispuffer lysiert und einer Immunpräzipitation mit geeigneten Antikörpern unterzogen. Nach zweimaligem Waschen mit Kinase-Waschpuffer und einmaligem Waschen mit aqua bidest. wird das den Antigen-Antikörper-Komplex

## Material und Methoden

---

enthaltende Bakterienpellet in 10  $\mu$ l Kinasepuffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ l des folgenden Gemisches für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

- 4  $\mu$ l 50 mM ATP
- 5  $\mu$ l Kinase-Puffer
- 1  $\mu$ l  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP (2  $\mu$ Ci)

Während der Inkubationszeit läuft die Kinase-Reaktion ab, d.h. die Kinase überträgt in Anwesenheit von zweiwertigen Manganionen als Cofaktoren  $\gamma$ -ständiges, radioaktives Phosphat auf die Tyrosinreste der präzipitierten Proteine. Durch Zugabe von je 1 ml Quench-Puffer, der unmarkiertes ATP im Überschuß enthält, wird die Kinasereaktion beendet. Anschließend werden die Proben für 2 Minuten mit 12000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Präzipitate in 25  $\mu$ l Probenpuffer resuspendiert und so für die anschließende SDS-PAGE vorbereitet.

### 3.3.10 Expression von rekombinanten Fusionsproteinen

#### 3.3.10.1 GST-Fusionsproteine

Reagenzien:

- 2YT-Medium und Antibiotika: s. 2.11.1
- IPTG-Stammlösung: 100 mM
- PBS: s. 3.3.1
- PLC-Lysispuffer: s. 3.3.1

Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine werden von *E.coli*-Bakterien produziert, die ein rekombinantes pGEX-Plasmid (Pharmacia, Freiburg) enthalten. Das zu fusionierende Protein wird am C-Terminus der GST exprimiert, wobei letztere auch das Startcodon für das gesamte Protein liefert. Das 1988 von Smith und Johnson eingeführte System ermöglicht die induzierbare, hocheffiziente, intrazelluläre Expression der Fusionsproteine. Die Proteinexpression steht unter der Kontrolle eines lac-Promoters, der durch das Lactose-Analog Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann. Die Expression fand in dieser Arbeit in dem proteasedefekten Bakterienstamm *E.coli* DH5 $\alpha$  statt, um proteolytischen Abbau des exprimierten Fusionsproteins zu verhindern. Die Bakterien werden durch milden Ultraschall aufgeschlossen und die

## Material und Methoden

---

freigesetzten GST-Fusionsproteine können in einer Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

Von den mit den jeweiligen pGEX-Konstrukten transformierten Bakterien wird eine Übernachtskultur (in Ampicillin-haltigem 2YT-Medium) angelegt; diese wird am folgenden Tag mit frischem 2YT-Medium 1:10 verdünnt und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis die Zellen eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 erreicht haben. Dann erfolgt die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG und weitere Inkubation bei 30°C und 200 rpm für 4 Stunden. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Zellpellets entsprechend 50 ml Kulturvolumen werden jeweils in 4 ml kaltem PLC-Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (30-50 Pulse von 1 Sekunde mit 100 W). Die Zellysate werden durch 5-minütige Zentrifugation mit 14000 rpm von Membranbruchstücken befreit, dann werden 50 µl mit PLC-Puffer äquilibrierte beads zugegeben (1 µl pro ml Bakterienkultur). Nach einstündiger Inkubation bei 4°C unter ständiger Rotation wird das Sepharosekonjugat mit 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und dreimal mit PLC-Puffer gewaschen.

In dieser Arbeit wurden neben GST folgende GST-Fusionsproteine aufgereinigt:

- GST-SHIP-1[SH2]: kodiert für SHIP-1, bp 9-1451, s. 3.5.1
- GST-PI 3'-Kinase[SH2]: kodiert für PI 3'-Kinase, bp 1185-2169, s. 3.5.1
- GST-Grb2[SH2]: kodiert für Grb2, bp 250-552, s. 3.5.1
- GST-Gab1[MBD]: kodiert für Gab1, bp 723-1977, s. 3.5.1

### 3.3.10.2 His6-gekoppelte Proteine

Mit Hilfe des His6-Fusionsproteinsystems werden rekombinante Proteine in Bakterien exprimiert, die anschließend mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

In dieser Arbeit wurden die Proteine mit Hilfe des QIAexpress Systems (QIAGEN) produziert. Das dazugehörige pQE30-Plasmid kodiert für einen N-terminalen His-Anhang bestehend aus 6 Histidinresten und über zwei lac-Operatorsequenzen. Die Expression von rekombinanten Proteinen, die von pQE30-Konstrukten kodiert werden, kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. Das IPTG bindet an das Lac-Repressorprotein und inaktiviert es somit. Außerdem wird die Expression des Fremdproteins durch das pREP4-Plasmid reguliert, das im *E.coli*-Stamm M15 in hoher Kopienzahl enthalten ist. Dieses ermöglicht

## Material und Methoden

---

die Produktion des Lac-Repressorproteins in hohen Mengen, das - wie bereits erwähnt - durch Zugabe von IPTG inaktiviert wird. Sobald der lac-Repressor inaktiviert wird, kann die RNA-Polymerase anfangen, die sich stromaufwärts vom Promotor befindlichen Sequenzen zu transkribieren. Anschließend wird das Transkript in das rekombinante Fusionsprotein translatiert.

Der His6-Affinitätstag erleichtert die Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose; dabei werden 2 Koordinationsstellen des Ni<sup>2+</sup>-Ions von Histidinresten besetzt. Da Imidazol eine höhere Bindungsaffinität an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix besitzt, kann das gebundene Protein mit Imidazol-haltigem Puffer eluiert werden.

Reagenzien:

- 2YT-Medium: s. 2.11.1
  - 100 µg/ml Ampicillin
  - 25 µg/ml Kanamycin
- IPTG-Stammlösung: 100 mM
- Bindungspuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0
  - 300 mM NaCl
  - 0,5 mM PMSF
  - 5 mM Benzamidin
  - 5 % (v/v) Trasylol
- Waschpuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0
  - 300 mM NaCl
  - 10 mM Imidazol
- Elutionspuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0
  - 300 mM NaCl
  - 100 mM Imidazol

Durchführung:

20 ml Ampicillin- und Kanamycin-haltiges 2YT-Medium werden mit einer einzelnen mit pQE30-Konstrukt transformierten M15-Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Vorkultur wird am folgenden Tag mit frischem Medium 1:10 verdünnt und für weitere 3-4 Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 erreicht ist. Anschließend wird die Expression des Fremdproteins durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Die Hauptkultur wird für weitere 4-5 Stunden bei 30°C und 180 rpm inkubiert.

## Material und Methoden

---

Dann werden die Bakterien abzentrifugiert, in 25 ml Bindungspuffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (zweimal für 2 Minuten mit 40 W) aufgeschlossen. Anschließend wird das Zellysatz durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 15000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, SS 34 Rotor) geklärt. Während der Zentrifugation wird die Säule mit 800 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose bepackt und mit einem Säulenvolumen (10 ml) Bindungspuffer äquilibriert; dann wird der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird das Säulenbett mit dreifachem Säulenvolumen an Bindungspuffer gewaschen, um locker assoziierte Proteine abzulösen. Es folgt das Waschen mit einem Säulenvolumen Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen. Die über den His6-Tag gekoppelten Proteine werden mit 3 ml Elutionspuffer von der Matrix abgelöst. Die gewonnene Proteinfraction im Elutionspuffer wird zur Verminderung der Salzkonzentration und zum Entfernen des Imidazols gegen 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 bei 4°C dialysiert.

In dieser Arbeit wurden folgende His6-Proteine generiert:

-His6-SHIP-1[SH2]: enthält das SHIP-1-Fragment bp 9-656, s. 3.5.2

-His6-PI 3'-Kinase[SH2]: enthält das PI 3'-Kinase-Fragment bp 1185-2169, s. 3.5.2

-His6-Grb2[SH2]: enthält das Grb2-Fragment bp 250-552, s. 3.5.2

### 3.3.11 GST-Bindungs-und Kompetitionsstudien

Die GST-Bindungsstudien stellen eine Technik dar, mit deren Hilfe Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden können.

Reagenzien:

-PLC-Lysispuffer: s. 3.3.1

-Probenpuffer-Gebrauchslösung, 1-fach: s. 3.3.7

Durchführung:

Zunächst wird ein *in vitro*-Kinase Assay wie unter 3.3.9 beschrieben durchgeführt. Die autophosphorylierte, an *Staphylococcus aureus* gebundene Proteintyrosinkinase (in diesem Fall c-Met) wird in 17 µl 1 % (w/v) SDS-haltigem 50 mM Tris-Puffer pH 6,8 resuspendiert; durch anschließendes 5-minütiges Kochen werden die Bindungen zwischen Substrat, Antikörper und Bakterien gelöst. Durch Zentrifugation werden die Bakterien abgetrennt. Die sich im Überstand befindende autophosphorylierte Kinase wird in jeweils 1 ml PLC-Puffer mit 20 mg/ml BSA aufgenommen und mit gereinigtem, GT-Sepharose

konjugiertem GST oder GST-Fusionsproteinen über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Pro Ansatz werden 5 µg GST oder GST-Fusionsprotein (gelöst in 1 ml PLC-Puffer) eingesetzt. Die entstandenen Proteinkomplexe werden mittels der Glutathion-sepharose aus dem Puffer präzipitiert, dreimal mit PLC-Puffer gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen, gekocht und durch SDS-PAGE gefolgt von Autoradiographie und Coomassieblau-Färbung analysiert.

Bei den GST-Kompetitionsversuchen wird genauso wie oben beschrieben verfahren, mit dem einzigen Unterschied, daß die autophosphorylierte Kinase mit verschiedenen His6-gekoppelten Proteinen (als potentiellen Kompetitoren) für eine Stunde bei 4°C unter ständiger Rotation vorinkubiert wird. Anschließend werden die GT-Sepharose-konjugierten GST-Fusionsproteine zugesetzt und das Experiment unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

### 3.3.12 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe man Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* in einer eukaryotischen Zelle nachweisen und ganze Genbibliotheken nach interagierenden Proteinen absuchen kann (Fields & Song, 1989). Molekulare Grundlage des Systems ist der Aufbau von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren; diese bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne und einer Aktivierungsdomäne. Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* wurde herangezogen, da die Expression von Plasmid-kodierten Proteinen in Hefen ähnlich einfach wie in Bakterien ist. Außerdem stehen eine große Anzahl an Selektionsmarkern zur Verfügung, da das Hefegenom sehr gut charakterisiert ist. Innerhalb dieses Systems gibt es zwei Plasmid-kodierte Fusionsproteine, die man auch als Hybrid bezeichnet. Eine Hefezelle ist in der Lage, beide Plasmide gleichzeitig aufzunehmen. Das erste Hybrid ist das Ergebnis einer Fusion aus einer DNA-bindenden Domäne und einem Protein von Interesse. Das zweite Hybrid besteht aus einer Aktivierungsdomäne und einem Bindeprotein für das Protein von Interesse. Eins der beiden oder beide Fusionsproteine enthalten zusätzlich ein Kernlokalisierungssignal. Keines der Fusionsproteine verfügt über Transkriptionsfaktor-Aktivität. Beide Fusionsproteine werden über entsprechende Plasmide in einem Hefestamm exprimiert, der ein geeignetes Reportergensystem enthält. Kommt es in der Hefe zu einer Interaktion des zu untersuchenden Proteins mit einem Wechselwirkungsprotein, dann wird

## Material und Methoden

---

die Transkriptionsfunktion wieder hergestellt. Das Reportersystem enthält eine Promotorregion mit einer DNA-Bindungsstelle für das erste Fusionsprodukt; außerdem ist der Promotor durch das zweite Fusionsprodukt aktivierbar. Hinter dem Promotor befindet sich ein Reporterogen, das für ein bestimmtes, leicht detektierbares Protein kodiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System mit der LexA-DNA-Bindungsdomäne für das erste Hybrid verwendet (Bartel & Fields, 1995); an dieses wurden die cytoplasmatischen Domänen verschiedener Tyrosinkinasen (c-Met, c-Fms, c-Kit, TrkA und Insulinrezeptor) fusioniert. Die LexA-Fusionsprodukte dimerisieren über LexA, was zur Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung der cytoplasmatischen Domänen der fusionierten Kinasen führt. Das zweite Hybrid besteht aus einer Fusion aus der Vp16-Transaktivierungsdomäne und beliebig kodierenden Sequenzen einer c-DNA-Bibliothek. Außerdem enthält dieses zweite Hybrid ein Kernlokalisierungssignal (McKnight et al., 1987; Vojtek et al., 1993). Der verwendete *Saccharomyces cerevisiae* L40 Hefestamm verfügt über ein *his3*- und ein *lacZ*-Reporterogen (Vojtek et al., 1993). Dadurch wird im für Histidin-prototrophen Hefestamm L40 ein Screening nach interagierenden Klonen aus einer geeigneten cDNA-Bibliothek möglich. Die Abbildung 3.1 veranschaulicht schematisch das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.

Dieses Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde durch die Generierung eines weiteren Stamms erweitert. Es handelt sich um YRN 974, in dessen Genom ein für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Reporterogen integriert wurde. Dadurch kann die Stärke der Protein-Protein-Interaktion mittels FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung)-Analyse in der lebenden Hefezelle direkt erfaßt werden.

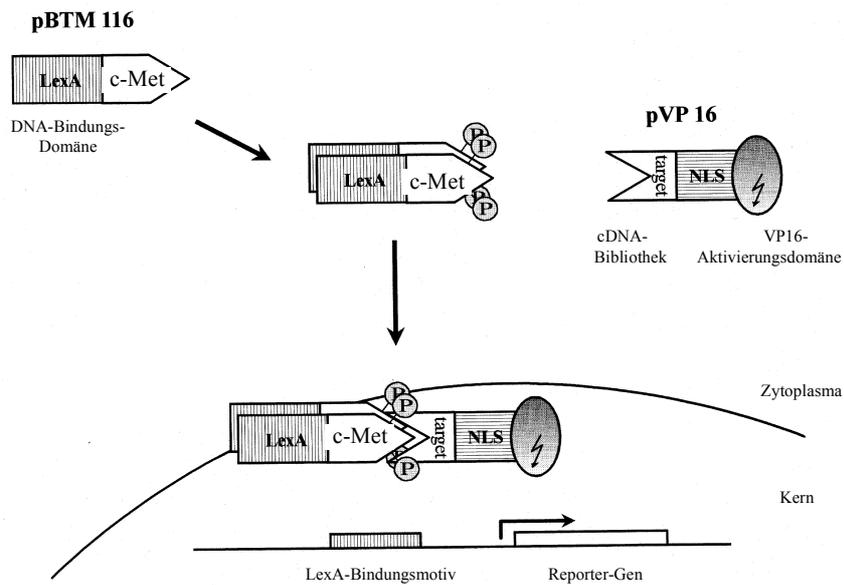


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Die LexA-Domäne induziert die Dimerisierung und Autophosphorylierung der Tyrosinkinase c-Met. Wenn das LexA-c-Met-Fusionsprotein mit einem beliebigen Protein interagiert, das von der cDNA-Bibliothek kodiert wird, dann gelangt der gebildete Proteinkomplex mittels des Kernlokalisierungssignals in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert und die Transkription eines Reportergens aktiviert.

### 3.3.12.1 Hefestämme

- L40: Genotyp: MATa, trp1, leu2, his3, LYS2: lexAop-LacZ, lexAop-His3

Der Hefestamm besitzt folgende Reportergene mit LexA-Bindungsdomänen: das *his3*-Gen sowie das *lacZ*-Gen, die mit entsprechenden Promotoren versehen ins Genom integriert sind.

- YRN 974: Genotyp: trp1, leu2, his3, URA3:: lexAop-gfp

Der Hefestamm besitzt folgendes Reportergen mit LexA-Bindungsdomänen: das *gfp*-Gen, das mit entsprechendem Promotor versehen ins Genom integriert ist.

### 3.3.12.2 Plasmide

- pBTM116 (Bartel & Fields, 1995):

Dieser Vektor mit Inserts, die für zytoplasmatische Domänen von verschiedenen Proteintyrosinkinasen (c-Met, c-Fms, c-Kit, TrkA, Insulin Rezeptor) kodieren, wird im

## Material und Methoden

---

Hefe-Zwei-Hybrid-System-Screen als "bait"-Vektor eingesetzt. Er besitzt Ampicillinresistenz und ist in Hefe auf Tryptophan selektierbar. Er besitzt auch die LexA-DNA-Bindungsdomäne; die Inserts werden "in frame" dazu kloniert.

- pVP16 (Bartel & Fields, 1995):

Dieser Vektor besitzt die Kernlokalisierungssequenz und die VP16-Promotor-Aktivator-Domäne. Dieses Plasmid besitzt Ampicillinresistenz und ist in Hefe auf Leucin selektierbar.

### 3.3.12.3 cDNA-Genbibliothek

Die cDNA-Genbank wurde über „random-primed“ cDNA-Synthese ausgehend von poly A<sup>+</sup>-RNA aus Gehirnen von 8 Tage alten Ratten generiert. Sie enthält  $2 \times 10^7$  unabhängige Klone. Die Inserts wurden in pVp16 über NotI kloniert.

Die cDNA-Genbibliothek wurde uns freundlicherweise von Dr.T.Südhof, University of Texas, USA zur Verfügung gestellt.

### 3.3.12.4 Hefetransformation

Der „bait“-Vektor und die cDNA-Genbibliothek werden in 2 Schritten in den Hefestamm L40 transformiert. Zunächst wird das pBTM116-Konstrukt in den Hefestamm L40 transformiert („small scale“-Transformation) und positive Kolonien über ihre Tryptophan-Autotrophie selektiert. Ein einzelner positiver Klon wird für die Transformation mit der pVp16 cDNA-Genbibliothek verwendet.

#### 3.13.12.4.1 Hefetransformation der LexA-Konstrukte („small scale“-Transformation)

Reagenzien:

-Tris-EDTA(TE)-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

-TE/LiAc/Puffer: 0,5 x TE

100 mM LiAc

## Material und Methoden

---

-TE/LiAc/PEG-Lösung: 1 x TE

100 mM LiAc

40 % (v/v) PEG-3350

Durchführung:

Zunächst werden die Hefezellen kompetent gemacht. Eine L40-Einzelkolonie wird von einer frisch ausgestrichenen YPD-Agar-Platte in 10 ml YPD-Flüssigmedium überführt und für 12-16 Stunden unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Vorkultur wird am nächsten Tag in 50 ml YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt und für weitere 3-4 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und mit 30 ml TE gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter denselben Bedingungen werden die Zellen in 2 ml TE/LiAc aufgenommen und für 10 Minuten bei 30°C inkubiert.

Während der Inkubationszeit werden in ein Eppendorfreaktionsgefäß folgende Komponenten zusammenpipettiert:

1 µg pBTM116-„bait“-Konstrukt DNA

100 µg denaturierte, fragmentierte Herings-Sperma-DNA

50 µl kompetente Hefen

Dann werden 500 µl LiAc/TE/PEG-Lösung zugegeben, der Transformationsansatz gemischt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 55 µl DMSO zur Verbesserung der Transformationseffizienz erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 10 Minuten. Anschließend werden die Zellen zweimal in jeweils 1 ml TE gewaschen, in 100 µl TE resuspendiert und auf eine ΔT SD-Agar-Selektionsplatte ausgestrichen.

### 3.3.12.4.2 Überprüfung der Expression der LexA-Fusionsproteine in transformierten Hefezellen

Eine einzelne Hefekolonie wird von der Platte in 2 ml ΔT SD-Medium überführt und für 12-16 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Vorkultur wird am folgenden Tag mit 20 ml frischem Medium verdünnt und so lange bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis die Zellen eine OD<sub>600</sub> von 0,7 erreicht haben. Anschließend werden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation mit 2500 rpm pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in 40 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Dann werden die Zellen durch Zugabe von 10 µl Oxalyticase-Stammlösung und anschließende 30-minütige Inkubation bei 37°C

## Material und Methoden

---

aufgeschlossen. Schließlich werden 15 µl 4-facher Probenpuffer dem Ansatz zugegeben und die Probe für 15 Minuten gekocht. 20 µl davon werden über SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot/Immunblot analysiert.

Die SDS-PAGE und der immunchemische Nachweis mit LexA-spezifischen Antikörpern erfolgen wie unter 3.3.3, 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben, jedoch wurde hier 5 % (w/v)-ige Trockenmilchpulverlösung in TBST als Blockpuffer verwendet.

### 3.3.12.4.3 Transformation von cDNA-Genbanken in Hefen („Large scale“-Transformation)

5 ml  $\Delta T$  SD-Medium werden mit einer LexA-Protein-transformierten L40-Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wird komplett in 200 ml desselben Mediums überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen. Anschließend werden die Hefen für 10 Minuten mit 2500 rpm zentrifugiert; das Sediment wird zweimal mit 500 ml aqua bidest. gewaschen, in 20 ml TE/LiAc-Puffer aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu werden 400 µg pVp16-cDNA-Bibliothek, 20 mg denaturierte, fragmentierte Heringssperma-DNA und 140 ml TE/LiAc/PEG-Lösung zugegeben. Die Suspension wird vorsichtig gemischt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Vor dem 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C werden 17,6 ml DMSO dem Transformationsansatz zugegeben. Anschließend werden die Zellen auf Raumtemperatur abgekühlt, durch 5-minütige Zentrifugation mit 2500 rpm zentrifugiert und zweimal mit aqua bidest. gewaschen. Danach werden die Zellen in 1 l YPD aufgenommen, eine Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert, durch Zentrifugation sedimentiert, mit 1 l aqua bidest. zweimal gewaschen und schließlich in 1 l  $\Delta TL$ -SD-Selektionsmedium aufgenommen. Zur Kontrolle der primären Transformationseffizienz werden 1/10<sup>4</sup>- und 1/10<sup>5</sup>-Verdünnungen auf  $\Delta TL$ -Agar-Platten ausgestrichen; der Rest wird über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag werden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, zweimal mit aqua bidest. gewaschen, in 10 ml aqua bidest. aufgenommen und auf 20  $\Delta THULL$ -Agar-Platten mit 20 mM 3-Aminotriazol ausgestrichen. Es werden abnehmende Volumina (1 ml, 500 µl, 250 µl, 100 µl, 50 µl, 10 µl; 5 Platten für jedes Volumen) ausplattiert. Um festzustellen, wieviel Klone nach dem Amplifikationsschritt über Nacht doppelt vorliegen, werden 1/10<sup>5</sup>- und 1/10<sup>6</sup>-Verdünnungen auf  $\Delta TL$ -Agar-Platten ausgestrichen.

### 3.3.12.5 Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefen

Um die potentiellen Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins zu identifizieren, müssen die pVp16-Konstrukte aus jedem positiven Klon isoliert, in Bakterien amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Jeder positive Klon wird in 2 ml  $\Delta$ TL-Selektionsmedium überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert, in 300  $\mu$ l Lysis-Puffer resuspendiert, dann werden 150  $\mu$ l Glasperlen (Durchmesser 0,45 mm) und 300  $\mu$ l Phenol/Chloroform zugesetzt. Der Ansatz wird eine Minute kräftig auf dem Vibromischer gemixt. Nach 1-minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm wird die wäßrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA wird zweimal mit Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wird anschließend mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20  $\mu$ l aqua bidest. resuspendiert.

### 3.3.12.6 Selektion von pVp16 aus dem pVp16-pBTM116-Gemisch

Die aus Hefe isolierte DNA stellt ein Gemisch aus zwei verschiedenen, für die beiden Fusionsproteine kodierenden Plasmiden dar. Zur Selektion des pVp16-Plasmids aus dem Gemisch wird die aus Hefe isolierte DNA in einen Leucin-prototrophen *E.coli* HB 101 Stamm transformiert. Auf geeigneten Selektionsplatten können nur HB 101-Bakterien wachsen, die das pVp16-Plasmid aufgenommen haben.

### 3.3.12.7 Elektrotransformation von Bakterien mit Hefe-DNA

Zunächst wurden elektrokompente HB 101-Zellen wie unter 3.1.5.1 beschrieben hergestellt und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Elektroporation werden die Zellen auf Eis aufgetaut, dann werden 40  $\mu$ l kompetente Bakterien mit 2  $\mu$ l Hefe-DNA versetzt, gut gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgt unter folgenden Bedingungen: 1 Puls bei 25  $\mu$ F, 200 Ohm und 1,8 kV. Im Anschluß daran wird 1 ml SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben; die Zellen werden vorsichtig darin resuspendiert, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. 100  $\mu$ l dieser Kultur werden auf M9- $\Delta$ L-Platten ausgestrichen.

Die Bakterien-DNA wird anschließend wie unter 3.3.12.5 beschrieben isoliert und wie unter 3.1.11 beschrieben sequenziert.

Für die Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

VP16 (Vorwärtsprimer, Roth): 5'-GGA ATT GAC GAG TAC GGT GGG-3'

M13 (Rückwärtsprimer, Roth): 5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

### 3.3.12.8 Überprüfung und Quantifizierung der Interaktionen mittels *gfp*-Reporter-gen-Aktivierung

Wie bereits beschrieben, ist das *gfp*-Gen unter der Kontrolle eines LexA-induzierbaren Promotor ins Genom des Hefestamms YRN 974 integriert worden. Dieser Hefestamm wurde von Dr. R. Niedenthal, Medizinische Hochschule Hannover, generiert.

Die Plasmide pVp16 und pBTM116, die für die möglichen Interaktionspartner kodieren, werden wie unter 3.3.12.4.1 beschrieben in YRN 974 transformiert und auf  $\Delta$ TL-Platten ausgestrichen. Als Negativkontrolle werden der leere Vektor pBTM116 und das pVp16-Konstrukt, das für den möglichen Interaktionspartner kodiert, wie oben beschrieben in YRN 974 transformiert. Vier positive Kolonien von jedem Transformationsansatz werden in jeweils 2 ml  $\Delta$ TL-Medium überimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Diese Vorkulturen werden am folgenden Tag 1:10 in 2 ml desselben Mediums verdünnt und für zusätzliche 4 Stunden bei 30°C und 180 rpm inkubiert. 100  $\mu$ l jeder Kultur werden mit 1 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 verdünnt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Intensität der Grünfluoreszenz wird für 10000 Zellen pro Ansatz in einem Becton Dickinson FACScan-Durchflußzytometer gemessen.

## 3.4 Arbeiten mit Zellkulturen

### 3.4.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Epithel- oder Epithel-ähnlichen Zelllinien gearbeitet: MDCK, HeLa S3, Caco2, A-549, HEK 293, EFM-19 und EFM-192A.

-MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zellen sind Epithel-ähnliche Nierenzellen.

## Material und Methoden

---

Sie werden in EMEM (Minimum Essential Medium-Eagle) mit 10 % (v/v)-igem fötalen Kälberserum (FKS) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 7 Tage werden die Zellen im Verhältnis 1:7 mit Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

-HeLa S3 sind humane, epitheliale Cervix-Carcinomzellen. Der Klon S3 stammt von Puck (Puck et al., 1956) und ist extrem widerstandsfähig. Die adhären wachsenden HeLa S3-Zellen werden in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) + 10 % (v/v) FKS im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2 Tage, die Passage der Zellen mit Trypsin-EDTA alle 4-6 Tage.

-Caco2 sind humane, epitheliale Colon-Carcinomzellen. Sie werden in EMEM + 20 % (v/v) FKS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und jede Woche mit Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

-A-549 sind humane epitheliale Lungen-Carcinomzellen. Sie wachsen adhären in DMEM + 10 % (v/v) FKS und werden alle 4-7 Tage mittels Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

- HEK 293 sind humane embryonale Nierenzellen. Sie wachsen semi-adhären in DMEM + 10 % (v/v) FKS und werden alle 2-3 Tage passagiert.

- EFM-19: sind humane Epithelzellen aus Brustcarcinom. Sie wachsen adhären in RPMI + 10 % (v/v) FKS und werden alle 4-7 Tage mittels Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

- EFM-192A: sind humane Epithelzellen aus Brustcarcinom, in denen das *abl*-Gen amplifiziert ist. Sie wachsen adhären in RPMI + 20 % (v/v) FKS und werden alle 7 Tage passagiert.

### 3.4.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Schwimzellen FDC-P1Mac11 gearbeitet. Das sind murine, wachstumsfaktorabhängige (IL-3), hämatopoetische Zellen. Sie werden in DMEM mit 10 % (v/v)-igem FKS und 5 % (v/v)-igem IL-3 bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2-3 Tage werden sie zu einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml Medium ausgesät.

### 3.4.3 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37°C aufgetaut und sofort in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden sie tropfenweise mit 10 ml kaltem Zellkulturmedium versetzt und

## Material und Methoden

---

10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Aufnahme in 10 ml Kulturmedium werden die Zellen auf eine Zellkulturschale ausgesät.

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zellen werden diese mittels Trypsin-EDTA von einer Zellkulturschale ( $\phi$  10 cm) abgelöst und in 1 ml kaltem Zellkulturmedium aufgenommen. Zu der Zellsuspension wird 1 ml Einfriermedium (80 % (v/v) FKS, 20 % (v/v) DMSO) zugegeben. 1,5 ml von dieser Mischung werden in ein Kryoröhrchen überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen in einer Styroporbox über Nacht bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Einfrieren von Suspensionszellen wird eine dichte, mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml bewachsene Gewebekulturschale verwendet. Die Zellen werden gut resuspendiert, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Kulturmedium aufgenommen; ab diesem Zeitpunkt wird wie für adhärente Zellen beschrieben (s.o.) verfahren.

### 3.4.4 Herstellung von IL-3-konditioniertem Medium

Die Kultivierung von FDC-P1Mac11-Zellen benötigt IL-3-konditioniertes Medium. Zu dessen Produktion wird die murine Zelllinie Wehi-3B herangezogen. Die Wehi-3B-Zellen werden in DMEM + 10 % (v/v) FKS kultiviert, bis eine Gewebekulturschale ( $\phi$  20 cm) etwa zu 70-80 % konfluent bewachsen ist. Dann wird das Kulturmedium durch Produktionsmedium ersetzt (DMEM + 5 % FKS) und die Zellen für weitere 3 Tage kultiviert. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation entfernt und der Überstand sterilfiltriert (0,2  $\mu\text{M}$  Filter). Dieser Überstand stellt eine Quelle für IL-3 dar und kann bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Normalerweise werden 5 % Wehi-3B-Überstand zum DMEM-Kulturmedium zugegeben, die optimale Konzentration soll jedoch für jede Charge ermittelt werden.

### 3.4.5 Radioaktive Markierung von Zellen

MDCK-Zellen werden zu einer Dichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/ml auf 96-well Platten (100  $\mu\text{l}$ /well) ausgesät und durch Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  Deoxycytidin und 2 mM Deoxythymidin über die Dauer von 2 Zellzyklen synchronisiert. Nach 48 Stunden werden

## Material und Methoden

---

die Zellen mit Serum-reduziertem Medium (EMEM + 0,2 % FKS) versorgt und für weitere 12 Stunden im Brutschrank kultiviert, bevor die Zugabe von 20 ng/ml HGF erfolgt. Nach weiteren 12 Stunden erfolgt die Zugabe des radioaktiven Isotops in Form von [<sup>3</sup>H]-Thymidin (100 µCi/well). Die Zellen werden zwecks Inkorporierung des Isotops für weitere 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Beendigung der radioaktiven Markierung werden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 100 µl Lysispuffer (s.3.3.9) lysiert. Um den Einbau des Isotops in Zellen zu überprüfen, werden die Zellproteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Das Zellysate wird auf ein Whatman GF/C Glasfaser-Filterblättchen (φ 2,5 cm) pipettiert und angetrocknet. Anschließend wird das Filterblättchen zunächst zweimal mit 10 % (v/v)-iger TCA-Lösung, dann einmal mit absolutem Ethanol beschickt. Jedes getrocknete Filter wird in 4 ml Szintillatorflüssigkeit überführt und im Szintillationszähler gemessen. So sind die cpm-Werte ein Maß für die TCA-gefällten, radioaktiv markierten Zellbestandteile.

### 3.4.6 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann die zelluläre Lokalisation eines bestimmten Antigens detektiert werden. Man behandelt die Zellen mit einem spezifischen Antikörper, der direkt oder indirekt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Ein häufig verwendeter Farbstoff ist Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 450-500 nm zur Emission von Fluoreszenzstrahlung angeregt wird.

Reagenzien:

- Paraformaldehyd-Lösung: 2,5 g Paraformaldehyd

50 ml aqua bidest.

unter Rühren bei 60°C erhitzen,

0,1 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird

50 ml 2 x PBS zugeben

mit 1 N HCl auf pH 7,0 einstellen

- DABCO/Moviol-Lösung: 6 g Glycerin und 2,4 g Moviol werden zusammengegeben und 2 Stunden stehen gelassen. Anschließend werden 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5 hinzugefügt, dann wird die Mischung 10 Minuten bei 50 °C gerührt und zentrifugiert (Raumtemperatur, 20 Minuten, 5000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge). Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

Vor Gebrauch wird DABCO (25 mg/ml) hinzugefügt.

Durchführung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aktinfilamente mit Phalloidin nachgewiesen. Phalloidin ist ein Alkaloid des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das spezifisch an Aktin bindet.

Die MDCK-Zellen werden auf einem 8-Kammer-Objektträger im Vollmedium (EMEM + 10 % FKS) bis zur Subkonfluenz herangezogen, dann wird die FKS-Konzentration im Medium auf 0,02 % herabgesetzt und die Zellen unter diesen Bedingungen für 12 Stunden weiter kultiviert. Anschließend erfolgt die Stimulation mit 20 ng/ml HGF für verschiedene Zeiten.

Dann werden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 2,5 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Da in diesem Fall ein zytoplasmatisches Protein nachgewiesen werden soll, wird die Zellmembran in einem 4-minütigen Waschvorgang mit 0,4 % (v/v) Triton X100 in PBS durchlässig gemacht.

Auf die fixierten und permeabilisierten Zellen werden je 100 µl FITC-konjugiertes Phalloidin (1:20 verdünnt) pro Kammer gegeben. Das Phalloidin wird mit Blocklösung (0,2 % (v/v)-ige FKS-PBS-Lösung) verdünnt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Dann werden die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blocklösung und einmaligem Waschen mit aqua bidest. werden die Kammern kurz angetrocknet und die Präparate in einem Tropfen DABCO/Moviol-Lösung eingebettet.

### 3.4.7 Zellstreuung („Scattering“)

#### 3.4.7.1 Giemsa-Färbung

Um die Morphologie von Zellen zu untersuchen, werden diese mit Giemsa-Reagenz, einem Gemisch aus Eosin und Thiazinfarbstoffen, angefärbt. Dazu werden die Zellen zuerst einmal mit PBS gewaschen und dann mit Methanol fixiert. Nach einer Behandlung mit Giemsa-Lösung für 1-2 Minuten wird die überschüssige Farbe durch zweimaliges Waschen mit aqua bidest. entfernt und das Präparat bei Raumtemperatur getrocknet.

### 3.4.7.2 Zellmigration

Einer der Effekte, den SF/HGF auf Epithelzellen ausübt, ist die Abdissoziation von einzelnen Zellen aus Zellkolonien und deren Wanderung.

MDCK-Zellen werden zu einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml auf 8 well-Platten ausgesät, für 24 Stunden in EMEM mit 10 % FKS inkubiert; dann werden dem Medium HGF in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt. Die Dissoziation von einzelnen Zellen aus Zellkolonien wird 12 Stunden später untersucht. Dafür werden die Zellen mit Giemsa-Reagenz chemisch gefärbt und unter dem Lichtmikroskop (Phasenkontrast) beobachtet.

### 3.4.8 Morphogenese von epithelialen Zellen; Tubulogenese

Die Bildung von verzweigten tubulären Strukturen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix ist ein charakteristischer, spezifischer Effekt, den HGF/SF auf MDCK-Zellen ausübt.

Die Zellen werden auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml im 4-fach konzentrierten EMEM-Medium eingestellt. 200  $\mu$ l von dieser Zellsuspension werden mit 700  $\mu$ l Kollagenlösung (Typ I, 3 mg/ml) und 100  $\mu$ l 0,5 M HEPES pH 7,2 versetzt und für weniger als eine Minute auf Eis inkubiert. Jeweils 400  $\mu$ l von dieser Mischung werden in jedes well einer 12-well Platte pipettiert; anschließend werden die sich in der Kollagenmatrix befindlichen Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis das Kollagen fest geworden ist (etwa 20 Minuten). Die Kollagenmatrix wird dann mit 400  $\mu$ l EMEM + 10 % FKS überschichtet und die Zellen für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis es innerhalb der Kollagenmatrix zur Zystenbildung kommt. Dann werden dem Medium 40 ng/ml HGF/SF hinzugefügt. Der Mediumwechsel und die Zugabe von frischem HGF erfolgt alle 2 Tage.

Die Bildung von tubulären Strukturen wird nach erfolgter HGF-Zugabe jeden Tag unter dem Lichtmikroskop (Hoffmann-Kontrast) untersucht.

### 3.4.9 Einführen von Fremd-DNA in Säugerzellen (Transfektion)

#### 3.4.9.1 Stabile Transfektion mit Superfect-Reagenz

Säugerzellen sind auch in der Lage, exogen zugegebene DNA aufzunehmen; allerdings integrieren sie diese nur mit geringer Effizienz in ihre Chromosomen.

## Material und Methoden

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MDCK-Zellen nach der Superfect-Methode nach den Angaben des Herstellers (QIAGEN) transfiziert.

Der Superfect-Reagenz enthält ein Polykation genau definierter Größe, das in kurzer Zeit negativ geladene Nukleinsäuren komplexiert. Die so gebildete kompakte Struktur besitzt noch viele positiv geladene Gruppen an der Oberfläche und eine positive Gesamtladung. Auf diese Weise kann der Komplex leicht an negativ geladene Bestandteile von Membranen - wie Rezeptoren oder sialysierte Glykoproteine - binden. Von dort aus wird der Komplex meist durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das Endosom fusioniert mit einem Lysosom, dessen niedriger pH-Wert durch das Superfect-Reagenz abgepuffert wird. Deswegen werden die meisten lysosomale Enzyme nicht oder nur schlecht aktiviert. Der Superfect-DNA-Komplex hat dann genügend Zeit, das Lysosom zu verlassen und in den Zellkern zu gelangen.

Durchführung:

24 Stunden vor der Transfektion werden  $5 \times 10^5$ -Zellen auf eine Gewebekulturschale ( $\phi$  6 cm) ausgesät. 5  $\mu$ g DNA aus einer Lösung mit der Konzentration 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l werden mit Zellkulturmedium ohne FKS und Antibiotika auf 150  $\mu$ l eingestellt. Falls der Expressionsvektor keine Selektionsmarker enthält, wird das pSV2neo Plasmid co-transfiziert. Dann werden 20  $\mu$ l Superfect-Reagenz zugegeben, mit der Pipette gut gemischt und der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA-Superfect-Komplex-Bildung zu ermöglichen. Dann wird 1 ml Zellkulturmedium zum Komplex zugegeben. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, dann wird der komplette Transfektionsansatz langsam und gleichmäßig dazupipettiert, so daß alle Empfängerzellen mit der Fremd-DNA in Kontakt kommen. Die so behandelten Zellen werden anschließend für 3 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluß daran wird der Transfektionsansatz entfernt; die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt. Am nächsten Tag werden die Zellen auf 2 neue Gewebekulturschalen ( $\phi$  10 cm) überführt; 24 Stunden später wird das Selektionsmedium (Kulturmedium mit 500  $\mu$ g/ml G418) zugegeben. Die weitere Kultivierung für etwa 2-3 Wochen erfolgt auch in G418-Medium. In dieser Zeit sollen sich Klone von Zellen bilden, die im Selektionsmedium gewachsen sind. Diese Klone können auf folgende Weise isoliert werden: sie werden zunächst mit jeweils einem runden, in Trypsin-EDTA-Lösung getränkten Whatman-3-MM-Papier ( $\phi$  0,5 cm) bedeckt, dann nach einer Einwirkzeit von 1-2 Minuten samt Papier auf jeweils eine neue Gewebekulturschale ( $\phi$  6 cm) überführt. Die

## Material und Methoden

---

einzelnen Klone werden in Erhaltungsmedium (Kulturmedium mit 250 µg/ml G418) zur Konfluenz kultiviert und auf die Expression des exogenen Proteins getestet.

### 3.4.9.2 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Bei der transienten (unbeständigen) Transfektion wird die Fremd-DNA nicht in die chromosomale DNA integriert und unabhängig vom Genom der Zelle exprimiert. Da man die Expression des transfizierten Gens innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Transfektion untersucht, ist ein Einbau in die chromosomale DNA nicht nötig.

Die Aufnahme exogener DNA kann gesteigert werden, wenn diese den Empfängerzellen als DNA-Calciumphosphat-Copräzipitat verabreicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK 293-Zellen mit cDNA kodierend für Myc-gekoppeltes SHIP-1-Protein transfiziert.

Dazu werden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion zu einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml auf Gewebekulturschalen ( $\Phi$  10 cm) ausgesät.

Zur Herstellung des Präzipitats werden folgende Lösungen getrennt angesetzt:

- Lösung 1: 10-25 µg rekombinante Donor-DNA  
62 µl 2 M Calciumchlorid-Lösung (Endkonzentration 125 mM)  
mit sterilem aqua bidest. auf 500 µl auffüllen
- Lösung 2: 500 µl 2 x HBS  
2 x HBS: 280 mM NaCl  
10 mM KCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
12 mM Dextrose  
50 mM Hepes  
mit 0,5 N NaOH den pH.Wert auf 7,05 einstellen  
auf 100 ml auffüllen  
sterilfiltrieren  
Aliquots bei -20°C aufbewahren

Kurz vor der Transfektion werden die Zellen mit Chloroquine (25 µM)-haltigem Medium versorgt.

Die Lösung 1 wird tropfenweise zu Lösung 2 unter deren fortwährendem Schütteln zugegeben, wobei sich ein feinkörniges DNA-Calciumphosphat-Copräzipitat bildet. Dieses

wird für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Gemisch auf die Oberfläche des Nährmediums der Empfängerzellen tropfenweise verteilt und mit diesem gut durchmischt. Dann werden die Empfängerzellen für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit nicht-Chloroquine-haltigem Medium versetzt und für weitere 36 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Für anschließende Stimulationsversuche werden die Zellen für 12 Stunden mit Serum-reduziertem Medium (DMEM mit 0,3 % (v/v) FKS) versorgt und dann mit 40 ng/ml HGF für verschiedene Zeiten stimuliert. Parallel wird ein unstimulierter Kontrollansatz durchgeführt. Sobald die Stimulationszeiten vergangen sind, werden die Zellen (wie unter 3.3.1 beschrieben) mit kaltem PBS gewaschen und mit PLC-Puffer lysiert.

### 3.5 Konstruktion von Fusionsproteinen für die Expression in Bakterien

#### 3.5.1 GST-Fusionsproteine

- GST-SHIP-1[SH2]: enthält die N-terminale SH2-Domäne von SHIP-1 aus Ratte. Das SHIP-1-Fragment (bp 9-1451) wurde aus dem pVp16-Konstrukt durch EcoRI-Schnitt entnommen und in pGEX-2T über die EcoRI-Schnittstelle inkloniert.
- GST-PI 3'-Kinase[SH2]: enthält die N-terminale der 2 SH2-Domänen von PI 3'-Kinase aus Ratte. Das Fragment (bp 1185-2169) wurde über EcoRI-Schnitt aus dem pVp16-Konstrukt entnommen und über die EcoRI-Schnittstelle in pGEX-2T inkloniert.
- GST-Grb2[SH2]: enthält die SH2-Domäne, die im mittleren Teil des murinen Grb2-Proteins liegt. Das Fragment (bp 250-552) wurde aus dem pVp16-Konstrukt über NotI-Schnitt entfernt und in pGEX-5X-1 über die NotI-Schnittstelle inkloniert.
- GST-Gab1[MBD]: enthält die c-Met-Bindungsdomäne (Aminosäuren 450-532) des Adaptor-Proteins Gab1 aus Ratte. Das Fragment (bp 723-1977) wurde über EcoRI-Schnitt aus dem pVp16-Konstrukt entfernt und in pGEX-2T über die EcoRI-Schnittstelle inkloniert.

### 3.5.2 His6-gekoppelte Proteine

- His6-SHIP-1[SH2]: enthält die N-terminale SH2 Domäne des SHIP-1-Proteins aus Ratte. Das Fragment (bp 9-656) wurde über SacI-Restriktionsschnitt aus dem pVp16-Konstrukt entfernt und über die SacI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pQE30 kloniert.
- His6-PI 3'-Kinase[SH2]: enthält die N-terminale der zwei SH2-Domänen von PI 3'-Kinase aus Ratte. Das Fragment (bp 1185-2169) wurde über SacI-Schnitt aus dem pVp16-Konstrukt entnommen und über die SacI-Restriktionsschnittstelle in pQE30 einkloniert.
- His6-Grb2[SH2]: Das Fragment (bp 250-552), das die SH2-Domäne von Grb2 beinhaltet, wurde aus dem pVp16-Konstrukt mit NotI herausgeschnitten und in pQE30 über die NotI-Restriktionsschnittstelle einkloniert.

### 3.6 Herstellung von Konstrukten für Proteinexpression in Hefezellen

- c-Met, c-Kit, TrkA und Insulinrezeptor: die cytoplasmatischen Domänen der aufgezählten Rezeptortyrosinkinasen wurden in den Vektor pBTM116 einkloniert und die so entstandenen Konstrukte freundlicherweise von Dr. K. M. Weidner, Roche Diagnostics, Deutschland, zur Verfügung gestellt.
- c-Fms: die zytoplasmatische Domäne von c-Fms wurde über PCR aus cDNA amplifiziert und in pBTM116 über EcoRI/SalI-Schnittstellen einkloniert. Dieses Konstrukt entstand im Rahmen der Dissertation von Dr. H. Joos.

Vorwärts-Primer:

5'-CAA GCG AAT TCT ACA AGT ACA AGC AGA AGC CGA AG-3'

Rückwärts-Primer:

5'-CAA GCC TCG ACT CAG CAG AAC TGG TAA TTG TTA GG-3'

-c-Met-Mutanten: C-terminale Tyrosinreste wurden innerhalb des zytoplasmatischen Bereichs des murinen c-Met-Proteins zu Phenylalanin mutiert. Die Einzel- oder Doppelmutanten wurden in pBTM116 einkloniert. Außerdem wurde eine Kinase-inaktive Form von c-Met generiert, indem der Lysinrest an Position 1110 zu Alanin mutiert wurde. Folgende c-Met-Mutanten in pBTM116 wurden uns von Dr. K. M. Weidner, Roche Diagnostics, Deutschland, zur Verfügung gestellt: Y971(Y2)F, Y1313(Y13)F, Y1349(Y14)F, Y1356(Y15)F, Y14-15F, Y13-16F und K1110A.

### 3.7 Herstellung von Konstrukten für Proteinexpression in Säugerzellen

- pcDNA3.1(-)Myc-HisA/SHIP-1: das volle Länge murine SHIP-1-Protein (bp 9-3587) wurde uns als pBKCMV-Konstrukt freundlicherweise von Dr. Larry Rohrschneider, Fred Hutchinson Cancer Center, USA, zur Verfügung gestellt. Das SHIP-1-Protein (bp 9-3581) wurde über Sall, PvuII-Restriktionsschnitt aus dem pBKCMV-Konstrukt entfernt und über XhoI, EcoRV-Schnittstellen in den Vektor pcDNA3.1(-)Myc-HisA inkloniert.

Das so hergestellte SHIP-1-Konstrukt verfügt über einen C-terminalen Myc-Anhang, mit dessen Hilfe die Expression des SHIP-1-Proteins in transfizierten Säugerzellen leicht detektiert werden kann.

- pcDNA3.1(-)Myc-HisA/ $\Delta$ SHIP-1: enthält die katalytisch inaktive Form des murinen SHIP-1-Proteins. Dazu wurden die Aminosäuren 666-680 aus dem SHIP-1-Protein deletiert. Verwendete Primer:

Vorwärts-Primer: 5'-ATA TCG ATT GCT GGT GCA TGT GGT CTG TCA-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CCC AAG CTT GGT ACC GAC CTC GGA-3'

Mit diesem Primer-Paar und dem Konstrukt pcDNA3.1(-)Myc-HisA/SHIP-1 als Matrize wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt.

Das SHIP-1-Fragment zwischen den Nukleotiden 2051 und 3581 wurde aus dem Konstrukt pcDNA3.1(-)Myc-HisA/SHIP-1 über ClaI, KpnI-Restriktionsschnitte herausgeschnitten und durch das PCR-Produkt ersetzt. Auf dieser Weise wurde das SHIP-1-Fragment zwischen den Nukleotiden 2051 und 2162 deletiert.

- pcDNA3.1(-)Myc-HisA/SHIP-1[SH2]: enthält die N-terminale SH2-Domäne (bp 9-421) des murinen SHIP-1-Proteins.

Vorwärts-Primer: 5'-AAG AAT TCG GCA CGA GAG AGA GAG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-TGG ATT CGG GCA CGG GGT ACT GCA GGT G-3'

Mit diesem Primer-Paar und dem Konstrukt pBKCMV/SHIP-1 als Matrize wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über EcoRI, BamHI-Schnittstellen in den Vektor pcDNA3.1(-)Myc-HisA inkloniert.

### 4. ERGEBNISSE

Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF ist ein bekanntes Motogen und Morphogen für Epithelzellen. Durch die Aktivierung seines Rezeptors c-Met löst HGF Signale aus, die komplexe zelluläre Vorgänge induzieren. Diese beinhalten Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und anschließende Abdissoziation von Einzelzellen aus Zellverbänden („Scattering“) sowie die Ausbildung von tubulären, verzweigten Strukturen („Branching“) unter speziellen Kulturbedingungen (beispielsweise bei Wachstum in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix).

Während auch andere aktivierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren die Streuung von Zellen bewirken können, ist ausschließlich die Aktivierung von c-Met in der Lage, das komplexe Morphogenese-Programm in Gang zu setzen, das zur Ausbildung von verzweigten Tubuli in dreidimensionalen Kollagengelen führt.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die c-Met-Signaltransduktionskaskaden, die mit der tubulären Morphogenese zusammenhängen, unzureichend charakterisiert. Es kann angenommen werden, daß es c-Met-spezifische Effektoren und c-Met-spezifische Signalwege gibt, die die beschriebenen morphologischen Veränderungen induzieren.

Zur Identifizierung c-Met-bindender Proteine, die in solchen Prozessen eine Rolle spielen könnten, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System herangezogen.

#### **4.1 Identifizierung zweier neuen Bindungspartner von c-Met durch Genbank-Screening im Hefe-Zwei-Hybrid-System**

##### **4.1.1 Klonierung von cDNA's kodierend für zwei neue c-Met-Bindungspartner aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattenhirnen**

Die zytoplasmatische Domäne des murinen c-Met-Proteins wurde als Köder beim Durchsuchen einer cDNA-Bibliothek aus Gehirnen von 8 Tage alten Ratten eingesetzt. Dabei wurde das unter 3.3.12 beschriebene LexA-Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Das LexA-c-Met-Fusionsprotein dimerisiert über den LexA-Bereich in der Hefe; dies führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase und der damit verbundenen Entstehung von phosphorylierten Bindungsstellen für mögliche Interaktionspartner.

## Ergebnisse

---

Es wurden insgesamt  $5,5 \times 10^7$  Klone über die Histidinselektion auf Interaktion getestet. Insgesamt wurden an drei aufeinander folgenden Tagen 300 Klone gefunden, die auf histidinfreien, 20 mM-haltigen 3-Aminotriazol-Platten wuchsen. Um möglichst viele von diesen 300 Klonen zu analysieren, wurde nach folgender Strategie vorgegangen:

Zunächst sollte man einen Überblick über die isolierten potentiellen Wechselwirkungspartner gewinnen. Deswegen wurden zunächst 20 Klone von den am schnellsten wachsenden Transformanten (deuten auf die stärksten Interaktionen hin) gewählt; die pVp16-Plasmide, die die cDNA-Fragmente der Bibliothek als Insert tragen, wurden wie unter 3.3.12.5 beschrieben aus diesen Klonen isoliert, in Bakterien transformiert und anschließend sequenziert.

Zwölf (darunter 3 unabhängige) der zwanzig untersuchten Klone enthielten cDNA kodierend für PI 3'-Kinase, zwei unabhängige Klone vertraten PLC- $\gamma$ , zwei Klone enthielten Gab1-Fragmente, ein weiteres Plasmid kodierte für das Protein SHIP-1 und für weitere 3 Klone wurden keine Homologien zu anderen Proteinen in der Datenbank gefunden. Das Ergebnis der ersten Sequenzierung lieferte den Hinweis, daß PI 3'-Kinase eines der Hauptbindungsproteine von c-Met darstellt. Um weitere PI 3'-Kinase-, PLC- $\gamma$ - und Gab1-beinhaltende Klone zu identifizieren, wurden die pVp16-Konstrukte aus zunächst 160 Transformanten isoliert und mittels der Southern Blot Technik mit verschiedenen Sonden untersucht. 75 der 160 untersuchten Klone entsprachen der p85-Untereinheit der PI 3'-Kinase, 39 Transformanten enthielten cDNA kodierend für Gab1, während 8 Klone PLC- $\gamma$  entsprachen.

Die Abbildung 4.1 zeigt ein Beispiel einer Southern Blot Hybridisierung, bei der ein PI 3'-Kinase-Fragment als Sonde verwendet wurde. Dieses Ergebnis wird stellvertretend für alle durchgeführten Hybridisierungen gezeigt.

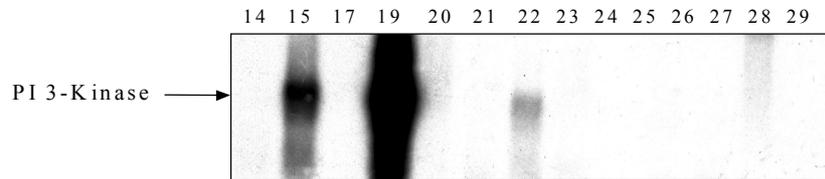


Abbildung 4.1: Southern Blot mit anschließender Hybridisierung mit einer PI 3'-Kinase-Sonde. Die pVp16-DNA wurde zunächst aus Hefe isoliert, in Bakterien transformiert, wiederum aus diesen isoliert, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend auf Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten PI 3'-Kinase-Sonde hybridisiert. Drei der auf diese Membran übertragenen DNA-Proben lieferten eindeutig positive Signale.

Die restlichen, noch nicht identifizierten Klone wurden Sequenzierreaktionen unterzogen. Dabei wurde das Protein SHIP-1 noch weitere 6 Mal gefunden, ansonsten wurden das neuronale c-Src und ein neues Zinkfinger-Motiv enthaltendes Protein detektiert. Für weitere 25 Proteinsequenzen wurden nach der ersten Sequenzierung keine Homologien im Datenbankvergleich gefunden.

Um falsch positive Klone zu eliminieren, wurden die 25 noch nicht identifizierten cDNA's in einem zusätzlichen Interaktionstest überprüft: die entsprechenden Plasmide wurden zusammen mit pBM116/c-Met in den Hefestamm YRN974 transformiert und die Interaktionen wurden mit Hilfe der *gfp*-Reporter-Gen-Aktivierung quantifiziert (Mancini et al., 1997). Als Negativkontrolle wurden das leere Plasmid pBTM116 und das jeweilige pVp16-Konstrukt in YRN974 co-transformiert. Als Positivkontrolle wurden bekannte Interaktionspartner wie PI 3'-Kinase und PLC- $\gamma$  mitgeführt. Vier unabhängige Klone einer jeden Transformation wurden im Durchflußzytometer gemessen; dabei wurde die Grünfluoreszenz des GFP-Reporterproteins (im Falle einer Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine) erfaßt.

## Ergebnisse

Alle 25 Klone, die beim Datenbankvergleich keine Homologien zu bekannten Proteinen zeigten, erwiesen sich als falsch positiv. Im Gegensatz dazu können die c-Met/PI 3'-Kinase und die c-Met/PLC- $\gamma$ -Interaktionen als positiv bezeichnet werden, da sie Werte lieferten, die mindestens das 10-fache der Negativkontrolle erreichten.

Auch die neu identifizierten c-Met-Interaktionspartner (SHIP-1 und das Zinkfinger-Protein) wurden im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet. Beide Protein-Protein-Interaktionen konnten durch die Aktivierung eines zusätzlichen Reportergens bestätigt werden.

Tabelle1: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit c-Met wechselwirkende Proteine

Gefundene Proteine	Anzahl der Klone	Anzahl der unabhängigen Klone	%
PI 3'-Kinase p85	75	5	47 %
Gab1	39	5	24 %
PLC- $\gamma$	8	2	5 %
c-Src	1		1 %
SHIP-1	7	2	4 %
Zinkfinger-Protein	5		3 %
falsch positive Klone	25		16 %
Gesamtzahl analysierte Klone	160 von 300		

Die Ergebnisse des Genbank-Screenings können wie folgt zusammengefaßt werden: neben bekannten Interaktionspartnern wie PI 3'-Kinase, PLC- $\gamma$ , c-Src und Gab1 konnten zwei zusätzliche mit c-Met wechselwirkende Proteine identifiziert werden: die SH2-Domäne enthaltende Inositol-5'-Phosphatase SHIP-1 und ein Zinkfinger-Motiv enthaltendes Protein.

Die verwendete cDNA-Bibliothek besteht aus cDNA-Fragmenten, die durch nicht zielgerichteten Restriktionsverdau der Rattenhirn-cDNA entstanden sind. Deswegen können beim Screening verschiedene (aber in der c-Met-bindenden Domäne überlappende) Sequenzen des gleichen Interaktionspartners erhalten werden. Im Falle des Proteins PI 3'-Kinase wurden unter den sequenzierten Klonen 5 unabhängige Klone identifiziert, die alle die N-terminale SH2-Domäne der p85-Untereinheit beinhalten.

Im Zusammenhang mit Rezeptortyrosinkinasen sind häufig Bindungsdomänen wie SH2- oder PTB-Domänen zu finden; diese Domänen binden nur an phosphorylierte Tyrosinreste

## Ergebnisse

und stellen auf diese Weise eine ideale Bedingung für eine spezifische Regulation der involvierten Signaltransduktionskaskaden dar.

Die neu identifizierten potentiellen Bindungspartner von c-Met (SHIP-1 und das Zinkfinger-Protein) wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Unter den SHIP-1 beinhaltenden Klonen wurden 2 unabhängige identifiziert; beide enthalten die N-terminale SH2-Domäne. Zusätzlich zu der N-terminalen SH2-Domäne weist SHIP-1 eine zentral gelegene katalytische Domäne (Inositol 5'-Phosphatase) auf, eine prolinreiche Region (potentielle Bindungsstellen für SH3-Domänen-enthaltende Proteine) am C-Terminus sowie zwei C-terminale NPXY-Motive, die PTB-Domänen-Bindungsstellen darstellen können.

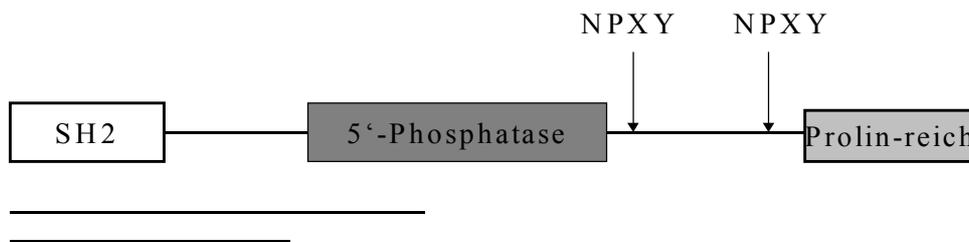


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SHIP-1. Sie zeigt die Src-Homologie 2-Domäne (SH2), die katalytische Domäne und die prolinreiche Region. Die beiden NPXY-Motive werden durch Pfeile markiert. Die verschiedenen Längen der zwei im Hefe-Zwei-Hybrid-System isolierten Klone sind als schwarze Linien dargestellt. Das Ratten-SHIP-1 Protein umfaßt 1191 Aminosäuren und hat ein geschätztes Molekulargewicht von 145 kDa.

Das neu identifizierte c-Met-bindende Protein enthält weder SH2- noch PTB-Domänen; dagegen weist das isolierte Proteinfragment 4 Zinkfinger-Motive auf. Jedes dieser Motive besteht aus zwei Cysteinresten, zwei Histidinresten und einigen konservierten hydrophoben Aminosäuren. Die Konsensussequenz für den C2/H2-Zinkfinger-Typ lautet: C X(2-4) C X(12) H X(3,5) H.

Abbildung 4.3 stellt die Sequenz des isolierten Proteinfragments dar.

AVHSCDSC LQVFESLSDITEHKIHQCQLTPGV  
DVEDDPTCSWPASSPSSKDQTSPSHGEGCDFG  
EEEGGPGLPYPCQFCDKSFSRLSYLKHHEQSH  
SDKLPFKCTYCSRLFKHKRSRDRHIKLTGDK  
KYHCSECDAAFSRSDHLKIHLKTHTSNKPYK  
CAVCRRGFLSSSSLHGHMQVHERSKDGSQSG  
SRMEDWKMKDTQKCSQCEEGFDFPEDLQKHI  
AECHPECSPNEDRAALQCVTATSCLWRRPP

Abbildung 4.3: Aminosäuren-Sequenz des isolierten Proteinfragments des neuen c-Met-interagierenden Zinkfinger-Proteins. Dieses umfaßt 251 Aminosäuren und beinhaltet vier Zinkfinger-Motive des C2/H2-Typs, die in dieser Abbildung unterstrichen wurden. Konservierte hydrophobe Aminosäuren innerhalb dieser Motive werden in kursiver Schrift dargestellt.

Beim Homologievergleich mit anderen Proteinsequenzen in der Datenbank wurde ein Protein identifiziert, das im Rahmen des menschlichen Genom-Projekts vom Kazusa Institute, Japan, kloniert wurde. Es handelt sich um KIAA0760; dieses Protein weist 60 % Homologie zu dem von uns isolierten Zinkfinger-Protein auf. Größere Homologien können im Bereich aller vier Zinkfinger-Motive festgestellt werden, die in beiden Proteinen enthalten sind.

### 4.1.2 Die Interaktion von SHIP-1 mit c-Met ist abhängig von dessen Kinase-Aktivität, während das Zinkfinger-Protein unabhängig vom c-Met-Phosphorylierungszustand an den Rezeptor bindet

Die neu detektierten Interaktionen wurden mit Hilfe des GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems verifiziert, quantifiziert und näher charakterisiert.

Entscheidend für die von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen ausgehende Signalübertragung ist, daß bestimmte Tyrosinreste dieser Rezeptoren phosphoryliert werden und dadurch potentielle Bindungsstellen für SH2-Domänen oder PTB-Domänen enthaltende Proteine darstellen.

Um zu überprüfen, ob die Bindung des SHIP-1- oder des Zinkfinger-Proteins an c-Met vom c-Met-Phosphorylierungszustand abhängt, wurde zusätzlich zum Wildtyp-c-Met dessen Kinase-inaktive Mutante analysiert. Innerhalb dieser Mutante wurde die ATP-Bindungsstelle zerstört, indem der Lysinrest an Position 1110 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Wildtyp-c-Met und die K1110A-Mutante wurden mit SHIP-1 bzw. mit dem Zinkfinger-Protein in den Hefestamm YRN974 co-transformiert. Die Aktivierung des *gfp*-Reportergens konnte durch durchflußzytometrische Analyse erfaßt werden.

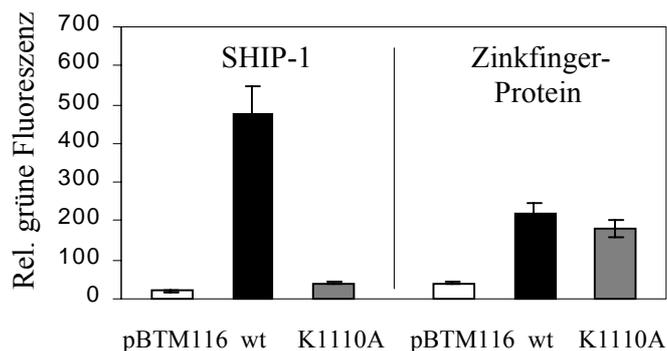


Abbildung 4.4: Die SHIP-1/c-Met-Interaktion ist abhängig vom Phosphorylierungszustand des c-Met-Rezeptors, die Zinkfinger-Protein/c-Met-Interaktion dagegen nicht. pVp16-SHIP-1 bzw. pVp16-Zinkfinger-Protein wurden mit pBTM116 (Negativ-Kontrolle) oder mit pBTM116-Wildtyp-c-Met bzw. pBTM116-c-Met (K1110A) in den Hefestamm YRN974 co-transformiert. Von jedem Ansatz wurden vier Klone im Durchflußzytometer gemessen.

Wie die Abbildung 4.4 zeigt, ist SHIP-1 in der Lage, an Wildtyp-c-Met zu binden, aber nicht an dessen Kinase-inaktive Mutante. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, daß die Bindung von SHIP-1 an c-Met über die SH2-Domäne und phosphorylierte Tyrosinreste erfolgt. Dagegen bindet das Zinkfinger-Protein sowohl an Wildtyp-c-Met als auch an die Kinase-inaktive Mutante K1110A.

### **4.1.3 Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1356 von c-Met stellt die SHIP-1-Bindungsstelle dar**

Um zu untersuchen, ob die SHIP-1/c-Met Interaktion auf die Anwesenheit spezifischer Phosphotyrosinreste von c-Met beruht, wurden eine Reihe von c-Met-Mutanten analysiert, in denen durch Mutationen von Tyrosinresten zu Phenylalanin definierte Bindungsstellen für bekannte c-Met-interagierende Proteine zerstört wurden.

Die zytoplasmatischen Tyrosinreste des c-Met-Proteins wurden - beginnend mit der membrannahen Region - von 1 bis 16 durchnummeriert; folgende Mutanten wurden im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System analysiert: Y971(Y2)F, Y1313(Y13)F, Y1349(Y14)F, Y1356(Y15)F, Y1363(Y16)F, Y14-Y15F, Y13-16F. SHIP-1 besitzt 16 zytoplasmatische Tyrosinreste, von denen 4 erwiesenermaßen phosphoryliert werden. Es handelt sich um die Hauptautophosphorylierungsstelle Y1235, seinen benachbarten Tyrosinrest Y1234 (Naldini et al., 1991) und um die beiden C-terminalen, regulatorischen Tyrosinreste Y1349 und Y1356 (Bardelli et al., 1992), die die Multisubstrat-Bindungsstelle ausmachen.

Wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, reduziert die Mutation Y1356F signifikant die Bindung von SHIP-1 an c-Met, während der Ersatz der beiden Tyrosine Y1349 und Y1356 durch Phenylalanin die Bindung komplett unterbindet.

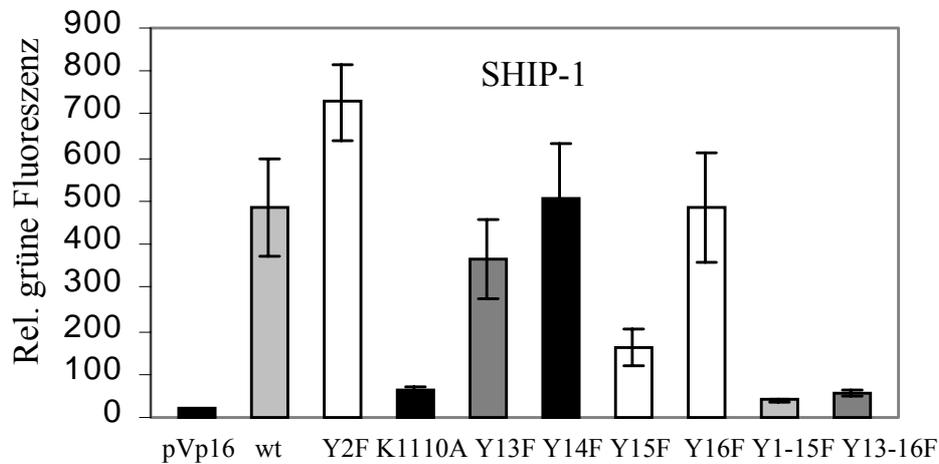


Abbildung 4.5: Die Quantifizierung der Interaktion von SHIP-1 mit Wildtyp-c-Met und verschiedenen c-Met-Mutanten wurde mit Hilfe des GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems durchgeführt. Sowohl die Mutation K1110A als auch die Mutation Y1356F verringern signifikant die Bindungsstärke von SHIP-1 an c-Met.

#### **4.1.4 Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1356 von c-Met stellt die Bindungsstelle für SHIP-1, Grb2 und Grb10 dar, während PI 3'-Kinase, Gab1, PLC- $\gamma$ , c-Src und Shc entweder an pY1349 oder an pY1356 binden**

Um die Korrektheit des oben geschilderten GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zu überprüfen, wurden bekannte Interaktionspartner von c-Met, z.B. PI 3'-Kinase, Gab1, Grb2, Grb10, PLC- $\gamma$ , c-Src oder Shc, zusammen mit Wildtyp-c-Met und den Mutanten K1110A, Y14F, Y15F, Y14-15F auf Wechselwirkung überprüft.

Die Stärke der Interaktion ist bei der Kinase-inaktiven c-Met-Mutante K1110A und bei der Doppelmutante Y14-15F mit allen Bindungspartnern auf den Wert der Negativ-Kontrolle (pVp16, Eigenfluoreszenz der Hefe) reduziert. Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1356(Y15) stellt die singuläre Bindungsstelle für SHIP-1, Grb2 und Grb10 dar.

## Ergebnisse

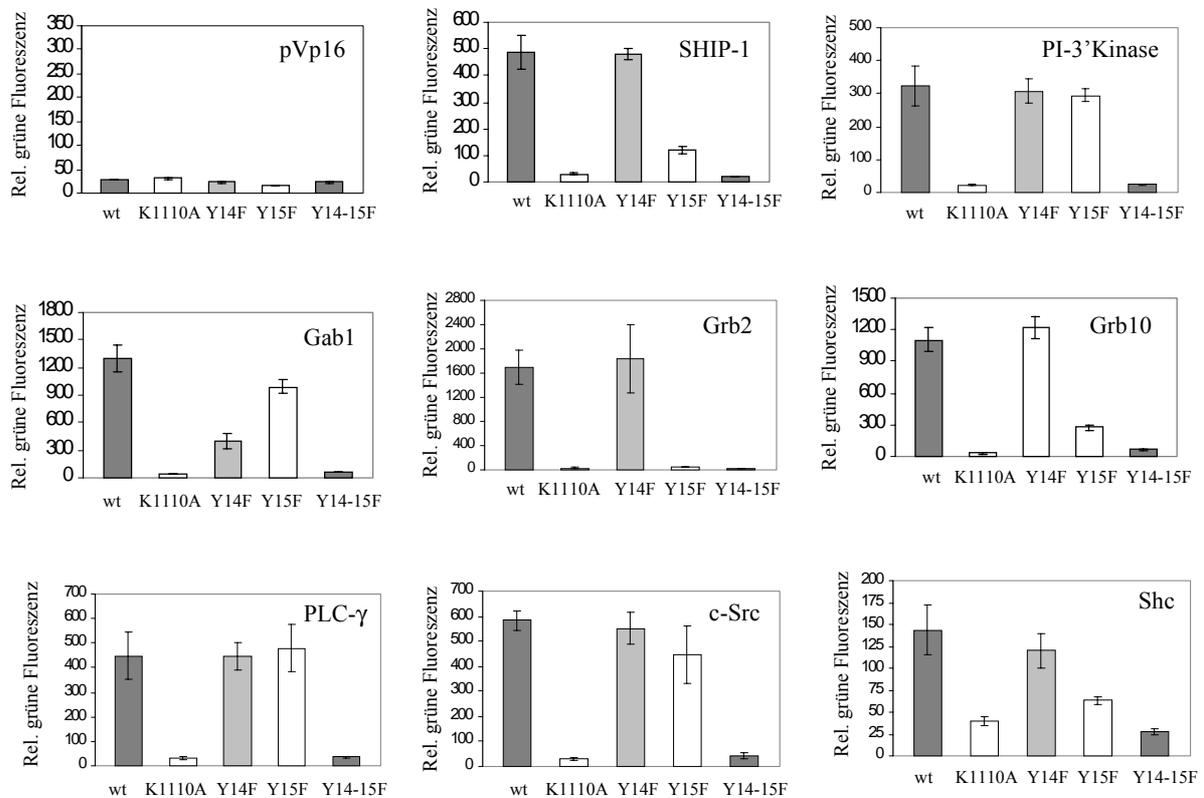


Abbildung 4.6: Sowohl die Mutation K1110A als auch die Mutation Y14-15F verhindern die Bindung von SHIP-1, PI 3'-Kinase, Gab1, Grb2, Grb10, PLC- $\gamma$ , c-Src und Shc an c-Met. Bei einigen Bindungspartnern wie SHIP-1, Grb2 und Grb10 reicht die Mutation eines einzigen Tyrosinrestes (Y1356) aus, um die Bindung an c-Met zu zerstören.

Diese Messungen liefern den Hinweis, daß die Bindung aller neun untersuchten Proteine an c-Met phosphorylierungsabhängig ist. Die Assoziation erfolgt über ihre SH2-Domänen (bzw. die PTB-Domäne im Falle von Shc) und spezifischen phosphorylierten Tyrosinresten von c-Met. Interessanterweise binden alle untersuchten Proteine an dieselbe Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met.

## Ergebnisse

### 4.1.5 Bindungsspezifität von SHIP-1: SHIP-1 bindet an c-Met und c-Fms, aber nicht an c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor

Signalmoleküle wie die PI 3'-Kinase, Shc oder PLC- $\gamma$ , die mit der Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met assoziieren, binden an die meisten Rezeptortyrosinkinasen. Das heißt, die Signalwege, in die diese Proteine involviert sind, sind nicht spezifisch. Um zu untersuchen, ob SHIP-1 Teil einer c-Met-spezifischen Signalkaskade ist, wurde dieses Protein zusammen mit den zytoplasmatischen Domänen von c-Met und vier zusätzlichen aktivierten Tyrosinkinasen in den GFP-Hefestamm YRN974 transformiert und auf Interaktion getestet (Abbildung 4.7).

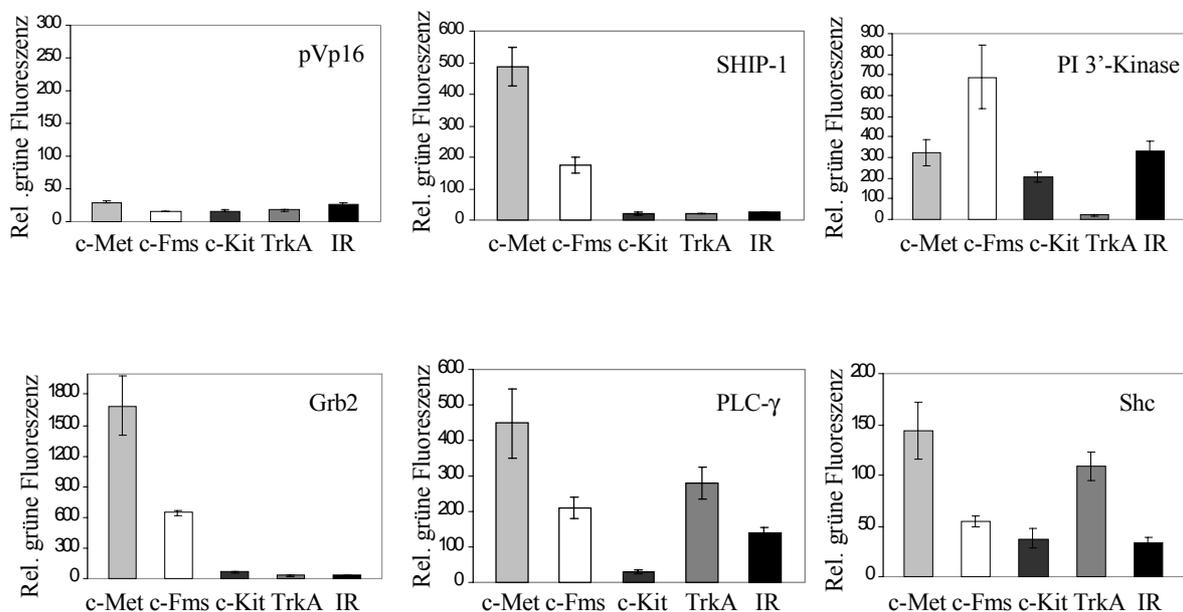


Abbildung 4.7: SHIP-1 bindet an die aktivierten Rezeptortyrosinkinasen c-Met und c-Fms, aber nicht an c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor. pBTM116-Konstrukte mit cDNA's kodierend für die zytoplasmatischen Domänen von c-Met, c-Fms, c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor wurden zusammen mit pVp16-Konstrukten mit cDNA's kodierend für die SH2-Domänen von SHIP-1, PI 3'-Kinase, Grb2, PLC- $\gamma$  oder die PTB-Domäne von Shc in den GFP-Stamm YRN974 co-transformiert und auf ihre Interaktion getestet. Die Fluoreszenzintensität für 10000 Zellen von vier unabhängigen Klonen jeder Transformation wurde im Durchflußzytometer gemessen.

Immunblot-Analysen mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern zeigten, daß all diese Proteine in der Hefe autophosphoryliert vorliegen (Daten nicht gezeigt).

Wie erwartet, war SHIP-1 in der Lage, an c-Fms und c-Met zu binden, aber nicht an andere Rezeptortyrosinkinasen wie c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Reedijk et al., 1992; Herbst et al., 1995; Levy-Toledano et al., 1994) war PI 3'-Kinase in der Lage, an c-Fms, c-Kit und den Insulinrezeptor zu binden. Alle diese Tyrosinkinasen enthalten die Konsensussequenz YXXM für die Bindung der SH2-Domäne der p85-Untereinheit von PI 3'-Kinase.

Wie bereits publiziert (Ponzetto et al., 1994) und auch in der Abbildung 4.6 gezeigt, assoziierte PI 3'-Kinase auch mit den beiden Tyrosinresten Y1349 und Y1356 von c-Met, obwohl die Sequenzen Y1349VHV und Y1356VNV dem Konsensusmotiv YXXM nicht entsprechen.

PLC- $\gamma$  interagierte mit allen untersuchten Rezeptoren außer c-Kit, während Grb2 wiederum nur an c-Met und c-Fms binden konnte. c-Fms beinhaltet zwei Tyrosinreste (Y696KNI und Y921TNL), die beide dem Konsensusmotiv YXNX entsprechen, das für die Bindung der SH2-Domäne von Grb2 erforderlich ist (van de Geer and Hunter, 1993; Mancini et al., 1997). Auch die Grb2-Bindungsstelle innerhalb von c-Met (Y1356VNV) entspricht dem YXNX-Motiv (Salcini et al., 1994).

### **4.2 Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktion zwischen c-Met und den neu identifizierten Bindungspartnern**

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden zwei neue Interaktionspartner (SHIP-1 und ein Zinkfinger-Protein) identifiziert. Für das SHIP-1 konnte im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System zusätzlich die c-Met-Rezeptor-Bindungsstelle charakterisiert werden.

Für die biologische Relevanz der SHIP-1/c-Met-Interaktion ist es entscheidend, ob beide Proteine *in vivo* von gleichen Zellsystemen co-exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde innerhalb dieser Arbeit die Expression beider Proteine in mehreren Zelllinien untersucht.

Um die identifizierten Wechselwirkungen mit Hilfe anderer Systeme sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu verifizieren, wurden GST-Bindungsstudien und Co-Immunpräzipitations-Studien durchgeführt.

Zusätzlich wurde mit Hilfe durchgeführter GST-Kompetitionsstudien die Hierarchie der Bindungsaffinitäten von Grb2, SHIP-1, Gab1 und PI 3'-Kinase an die einzige Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met untersucht.

### 4.2.1 Expression von SHIP-1-RNA in MDCK-, PC12- und Raji-Zellen

Die Rezeptortyrosinkinase c-Met wurde bisher im Zusammenhang mit Epithelzellen beschrieben, während SHIP-1 ursprünglich im hämatopoetischen Zellsystem gefunden wurde (Lioubin et al., 1996; Damen et al., 1996). Es wurde z.B. gezeigt, daß SHIP-1 am M-CSF-1-induzierten Signalweg in FDC-P1Mac11-Zellen beteiligt ist (Damen et al., 1996; Unkeless et al., 1997).

Zur Untersuchung der biologischen Relevanz der SHIP-1/c-Met-Interaktion wurde die Co-Expression der RNA beider Proteine in verschiedenen Zelllinien getestet.

Wie aus Abbildung 4.8 ersichtlich, wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien - darunter den Epithelzellen MDCK, Caco2, den B-Zellen Raji und den Pheochromozytom-Zellen PC12 - isoliert, auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, auf Nitrocellulose-Membran übertragen und mit einer SHIP-1-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Herstellung dieser Sonde wurde das kürzere SHIP-1-Fragment aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit der Restriktionsendonuklease NotI aus dem pVp16-Konstrukt herausgeschnitten und mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markiert.

Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus der hämatopoetischen Vorläufer-Zelllinie FDC-P1Mac11 und aus Mausgehirn-Gewebe untersucht.

Die Aktin-RNA wurde in diesem Northern-Blot-Experiment als Ladekontrolle verwendet. Damit sollte sichergestellt werden, daß in den jeweiligen Spuren des Agarosegels gleich viel RNA aufgetragen wurde.

Auf dem Autoradiogramm (Abbildung 4.8) kann man erkennen, daß SHIP-1-RNA - wie erwartet - in hohen Mengen in den FDC-P1Mac11-Zellen exprimiert wurde. Zusätzlich wurde das SHIP-1-Transkript in PC12-Zellen sowie in kleineren Mengen in der Epithelzelllinie MDCK und in der B-Zelllinie Raji detektiert.

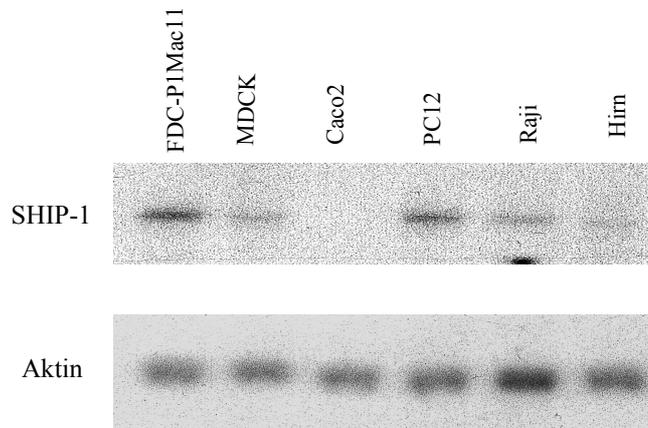


Abbildung 4.8: Northern-Blot von Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien hybridisiert mit einer SHIP-1-spezifischen und einer Aktin-spezifischen Sonde. Gesamt-RNA aus FDC-P1Mac11-, MDCK-, Caco2-, Raji-, PC12- und Gehirn-Zellen wurde auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, auf Nitrocellulose transferiert und nach Hybridisierung mit den spezifischen Sonden mittels Autoradiographie detektiert.

### 4.2.2 Expression des SHIP-1-Proteins in verschiedenen Epithelzelllinien wie MDCK, EFM-19 und EFM-192A

Wie bereits unter 4.2.1 gezeigt, wurde SHIP-1-RNA zusätzlich zum hämatopoetischen Zellsystem in der Epithelzelllinie MDCK detektiert. Zur Bestätigung der Annahme, daß das SHIP-1-Molekül auch im Epithelzellsystem eine relevante Rolle spielt, wurde dessen Expression auf Proteinebene durch Immunblot-Analyse untersucht. Dazu wurden Gesamtzellsate aus verschiedenen Epithelzelllinien wie MDCK, Caco2, EFM-19 und EFM-192A hergestellt. Als Kontrolle wurden Gesamtzellsate aus den hämatopoetischen Zelllinien FDC-P1Mac11 und Raji mitgeführt. Der Immunblot (Abbildung 4.9) mit SHIP-1-spezifischen Antikörpern zeigte gemäß den Erwartungen, daß SHIP-1 in hoher Menge im Zellsat aus FDC-P1Mac11-Zellen vorhanden war. Zusätzlich wurde das SHIP-1-Protein in allen untersuchten Zelllinien - mit Ausnahme der Colonicarcinom-Zellen Caco2 - detektiert.

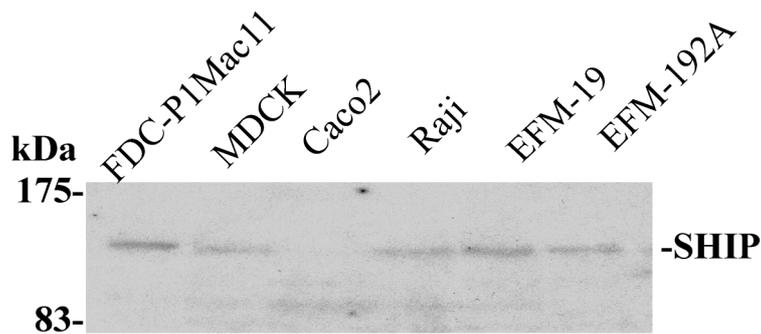


Abbildung 4.9: Expression des SHIP-1-Proteins in verschiedenen Epithelzelllinien. Zellysate aus FDC-P1Mac11-, MDCK-, Caco2-, Raji-, EFM-19- und EFM-192A-Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Spur) wurden durch SDS-PAGE gefolgt vom Immunblot mit anti-SHIP-1-Antikörpern analysiert.

### 4.2.3 Expression der Zinkfinger-Protein-mRNA in verschiedenen murinen Geweben

Wie bereits geschildert, ergab die Datenbank-Suche im Falle des Zinkfinger-Proteins keine größeren Homologien zu anderen Proteinen. Somit konnten keine Aussagen über die Größe, die Expression und die Funktion dieses Proteins gemacht werden.

Mittels des GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde untersucht, ob die Bindung des Zinkfinger-Proteins an c-Met von dessen Phosphorylierung abhängig ist. Die FACS-Messung lieferte den Hinweis, daß die beiden Proteine unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der c-Met-Tyrosinkinase miteinander wechselwirken.

Anschließend wurde ein kommerziell erhältlicher Northern Blot der Firma Clontech (Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTN<sup>TM</sup>)) mit einer Zinkfinger-spezifischen Sonde hybridisiert, um die Expression der Zinkfinger-mRNA in verschiedenen Geweben zu untersuchen und um die Größe des Transkripts bestimmen zu können.

Auf die Nitrocellulose-Membran wurden poly(A)<sup>+</sup>-RNA's (jeweils 2 µg) aus verschiedenen murinen Geweben übertragen und durch UV-Bestrahlung fixiert. Für die Herstellung der Sonde wurde das Zinkfinger-Fragment über NotI-Restriktionsverdau aus dem pVp16-Konstrukt herausgeschnitten und mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markiert.

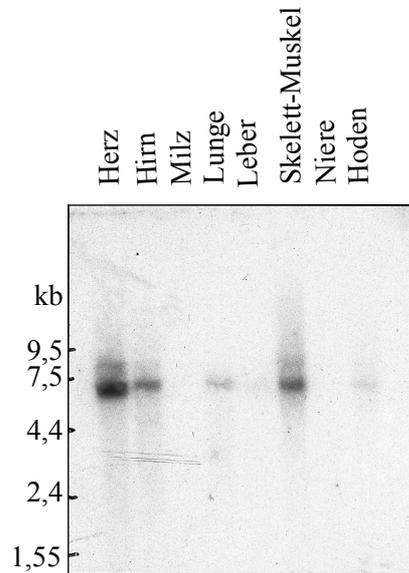


Abbildung 4.10: Autoradiogramm des Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTN<sup>TM</sup>) Blots (Clontech) hybridisiert mit einer Zinkfinger-spezifischen Sonde.

Wie aus Abbildung 4.10 hervorgeht, wurde ein Transkript mit einer Länge von ungefähr 6 kb in den meisten Geweben - mit Ausnahme der Milz und der Niere - detektiert. Starke Hybridisierungssignale sind im Herz, im Hirn und im Skelett-Muskel zu erkennen, während Lunge, Leber und Hoden das Transkript in geringerer Menge exprimieren.

Dieses Expressionsmuster gibt einen Hinweis darauf, daß das Zinkfinger-Protein von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert wird.

### 4.2.4 Überprüfung der c-Met/SHIP-1-Interaktion *in vivo*

Die vom Hefe-Zwei-Hybrid-Screening gelieferten Ergebnisse und die Co-Expression von c-Met und SHIP-1 im Epithelzellsystem deuten an, daß SHIP-1 ein wichtiges Signalmolekül in den c-Met-Signalübertragungskaskaden ist.

#### 4.2.4.1 Co-Immunpräzipitation von SHIP-1 und c-Met in transient transfizierten HEK293-Zellen

Wie die Northern-Blot- (Abbildung 4.8) und die Immunblot-Analyse (Abbildung 4.9) gezeigt haben, ist das SHIP-1-Molekül im Epithelzellsystem relativ schwach exprimiert. Um ideale Voraussetzungen, unter denen beide Proteine in ausreichender Menge vorhanden sind, für eine Co-Immunpräzipitation zu schaffen, wurden HEK293-Zellen mit Myc-gekoppeltem SHIP-1-Protein in voller Länge nach der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Diese Zellen wurden gewählt, weil sie eine gute Quelle für endogenes c-Met darstellen, da sie einen funktionellen c-Met-Rezeptor in ausreichender Menge exprimieren und darüber hinaus leicht zu transfizieren sind.

cDNA kodierend für das Myc-gekoppelte, volle Länge SHIP-1-Protein wurde wie unter 3.4.8.2 beschrieben in die HEK293-Zellen eingebracht; 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Serum-reduziertem Medium (0,3 % FKS) versorgt und für weitere 48 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 40 ng/ml HGF für 5, 10 und 30 Minuten stimuliert. Gesamtzellysate von stimulierten und nicht stimulierten Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Probe) wurden einer Immunpräzipitation mit Myc-spezifischen und c-Met-spezifischen Antikörpern unterzogen. Das präzipitierte Material wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit Myc-, c-Met-, oder Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern analysiert.

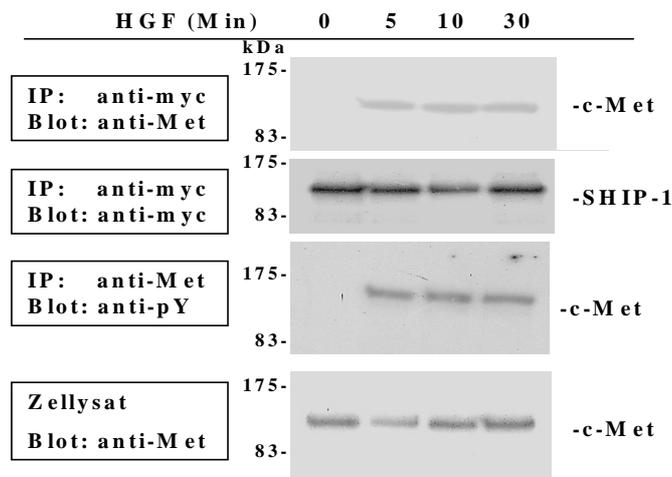


Abbildung 4.11: SHIP-1 co-präzipitiert mit dem aktivierten Rezeptor c-Met in SHIP-1-transfizierten HEK293-Zellen. SHIP-1-exprimierende HEK293-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit HGF stimuliert, anschließend lysiert und mit anti-Myc- oder anti-c-Met-Antikörpern präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit anti-Myc-, anti-c-Met- oder anti-Phosphotyrosin-Antikörpern analysiert.

Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, konnte vor der Stimulation mit HGF kein c-Met-Protein in den Myc-SHIP-1-spezifischen Immunkomplexen detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde während der ganzen Stimulationszeit zwischen 5 und 30 Minuten die Anwesenheit von c-Met in Myc-spezifischen Immunkomplexen gezeigt. Wie der anti-Phosphotyrosin-Immunblot zeigt, wurde c-Met schon nach 5-minütiger HGF-Behandlung phosphoryliert; der Phosphorylierungsstatus änderte sich über die Dauer der Stimulation nicht. Das unterste Autoradiogramm diente als Kontrolle dafür, daß in den jeweiligen Spuren des Polyacrylamidgels gleich viel Protein aufgetragen wurde.

#### 4.2.4.2 SHIP-1 bildet einen spezifischen Immunkomplex mit dem aktivierten c-Met-Rezeptor in MDCK-Zellen

Zur Überprüfung der Assoziation von SHIP-1 mit c-Met unter physiologischen Bedingungen *in vivo* wurden nicht transfizierte MDCK-Zellen gewählt. Sie stellen eine gute Quelle für einen endogenen, funktionellen c-Met-Rezeptor dar und exprimieren auch

## Ergebnisse

das SHIP-1-Protein (s. Abbildung 4.9). Außerdem sind die c-Met-Signaltransduktionswege und die von HGF bewirkten Effekte in diesen Zellen am besten untersucht.

MDCK-Zellen wurden für 8 Stunden mit Serum-reduziertem Medium (0,02 % FKS) versorgt und dann für jeweils 5, 10 und 30 Minuten mit 60 ng/ml HGF stimuliert. Aliquots von  $5 \times 10^6$  Zellen wurden lysiert und einer Immunpräzipitation mit SHIP-1- oder c-Met-spezifischen Antikörpern unterzogen. Die gebildeten Immunkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit SHIP-1-, c-Met-, oder Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern analysiert.

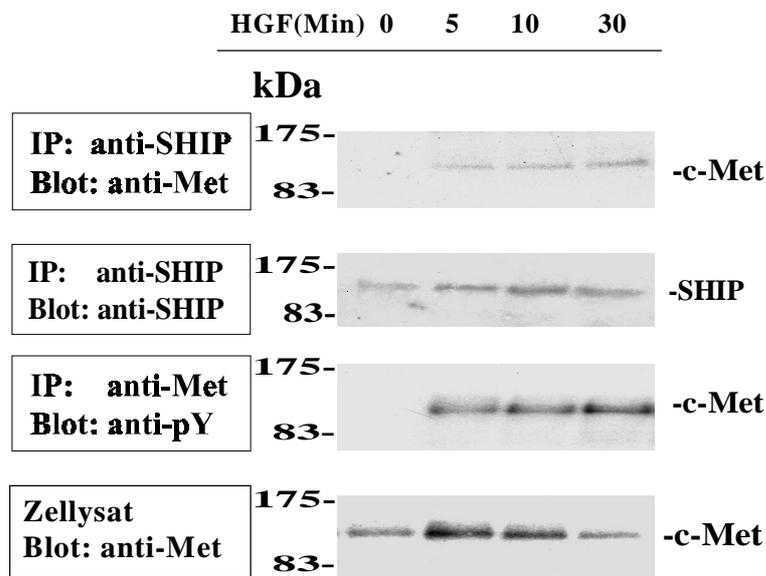


Abbildung 4.12: SHIP-1 assoziiert *in vivo* unter physiologischen Bedingungen mit dem aktivierten c-Met-Rezeptor.

Nach der Stimulation mit HGF konnte die Anwesenheit von c-Met in SHIP-1-spezifischen Immunkomplexen nachgewiesen werden. Der SHIP-1/c-Met-Komplex blieb während der ganzen Stimulationszeit erhalten. Vor der Aktivierung von c-Met konnte keine Assoziation von SHIP-1 mit c-Met detektiert werden.

Wie erwartet, wurde der c-Met-Rezeptor nach der HGF-Behandlung phosphoryliert; der Phosphorylierungsstatus änderte sich über die gesamte Stimulationsdauer nicht.

### 4.2.5 *In vitro* Bindungsstudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* GST-Bindungsstudien durchgeführt, um die im Hefe-Zwei-Hybrid-System detektierten Protein-Protein-Interaktionen zu verifizieren.

Dazu wurden verschiedene GST-Fusionsproteine erstellt: sie umfassen die SH2-Domänen von SHIP-1, PI 3'-Kinase, Grb2, die c-Met-Bindungsdomäne von Gab1 oder die vier Zinkfinger-Motive des Zinkfinger-Proteins.

#### 4.2.5.1 GST-SHIP-1 und das GST-Zinkfinger-Protein binden an phosphoryliertes c-Met *in vitro*

c-Met wurde aus MDCK-Zellen immunpräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP an Tyrosinresten phosphoryliert. Der phosphorylierte Rezeptor wurde dann im SDS-haltigen Puffer vom Antikörper-Komplex freigesetzt und mit an GT-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteinen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde an GT-Sepharose gebundenes GST eingesetzt; damit sollten unspezifische Wechselwirkungen von c-Met mit dem GT-Sepharose-konjugierten GST ausgeschlossen werden.

Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die an GT-Sepharose gebundenen Proteinkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und das phosphorylierte c-Met wurde mittels Autoradiographie detektiert. Die GST-Fusionsproteine ließen sich durch Coomassie-Blau-Färbung visualisieren.

Wie die Abbildung 4.13 deutlich zeigt, war c-Met in der Lage, an das GST-SHIP-1-Fusionsprotein zu binden. Erwartungsgemäß ließ sich das autophosphorylierte c-Met auch mit dem GST-PI-3'-Kinase-Fusionsprotein fällen.

Obwohl das eingesetzte GST-Zinkfinger-Protein über keine SH2-Domänen verfügt, war dieses auch in der Lage, an das Tyrosin-phosphorylierte c-Met zu binden.

Ein Aliquot aus dem Kinase-Assay wurde als Kontrolle für die erfolgte Autophosphorylierung auch auf das Polyacrylamid-Gel (zweite Spur von links, Abbildung 4.13 A) aufgetragen.

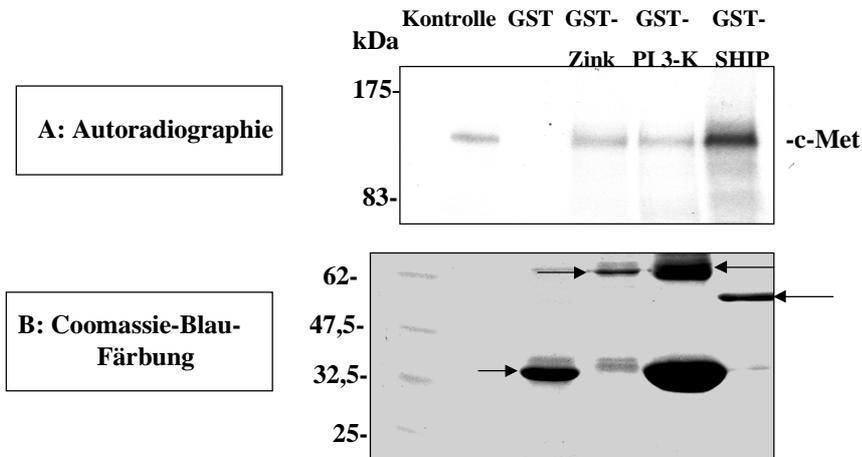


Abbildung 4.13: GST-SHIP-1 und das GST-Zinkfinger-Protein assoziieren *in vitro* mit dem autophosphorylierten c-Met.

A: Autoradiographie der SDS-PAGE

B: Coomassie-Blau-Färbung der GST-Fusionsproteine

Autophosphoryliertes c-Met aus MDCK-Zellen bindet an das GST-Zinkfinger-Protein, an GST-PI 3'-Kinase[SH2] und GST-SHIP-1[SH2], nicht aber an GST allein.

4.2.5.2 *In vitro*-Kompetitionsstudien: Die Bindungsaffinität von PI 3'-Kinase, SHIP-1, Grb2 und Gab1 an c-Met nimmt in der Reihenfolge Grb2 > Gab1 > SHIP-1 > PI 3'-Kinase ab

Wie bereits beschrieben assoziieren viele Signalmoleküle - unter anderem PI 3'-Kinase, Grb2, Gab1 und SHIP-1 - mit einer einzigen Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met, die zwei C-terminale Tyrosinreste beinhaltet.

Wie aus Abbildung 4.6 hervorgeht, binden PI 3'-Kinase und Gab1 an beide Tyrosinreste pY1349 und pY1356, während Grb2 und SHIP-1 selektiv mit pY1356 assoziieren.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob jeweils zwei dieser Signalmoleküle gleichzeitig oder sequentiell an c-Met binden. Um diese Frage beantworten zu können, führten wir *in vitro* GST-Bindungs- und Kompetitions-Studien durch. GST-Fusionsproteine, die die SH2-Domänen von Grb2, SHIP-1, PI 3'-Kinase und die c-Met-Bindungsdomäne von Gab1

## Ergebnisse

enthielten, wurden mit autophosphoryliertem c-Met aus MDCK-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von His6-gekoppelten Proteinen von Grb2[SH2], SHIP-1[SH2] und PI 3'-Kinase[SH2] inkubiert.

Zunächst wurde durch Coomassie-Blau-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele überprüft, ob sich die generierten Fusionsproteine in den *E.coli*-Stämmen DH5 $\alpha$  bzw. M15 exprimieren ließen.

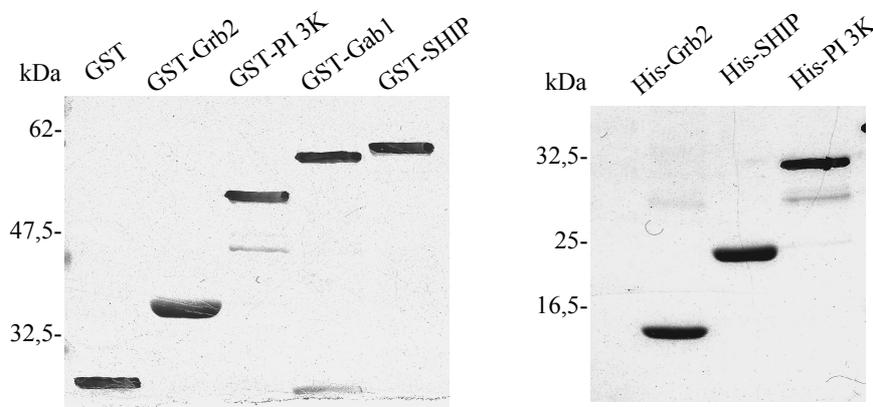


Abbildung 4.14: Coomassie-Blau Färbung der 11 %-igen SDS-Gele, auf die die verschiedenen generierten GST-Fusionsproteine bzw. die His6-gekoppelten Proteine aufgetragen wurden.

Wie die obere Abbildung zeigt, ließen sich alle Proteine in ausreichender Menge und ohne nennenswerte Verunreinigungen exprimieren.

Somit konnten die GST-Bindungs- und Konkurrenzexperimente wie folgt durchgeführt werden: c-Met wurde aus MDCK-Zellen immunpräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay in Anwesenheit von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP an Tyrosinresten phosphoryliert. Das radioaktiv markierte c-Met wurde anschließend mit 2  $\mu$ g GST oder GST-Fusionsprotein in Anwesenheit oder Abwesenheit von potentiellen Konkurrenten - in Form von His6-gekoppelten Proteinen in diversen Mengenverhältnissen - inkubiert. Die an GST-Sepharose gebundenen Protein-Komplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt; der Anteil an c-Met in diesen Komplexen wurde mittels Autoradiographie detektiert.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse aller durchgeführten Wettbewerbsstudien werden in Abbildung 4.15 zusammengefaßt.

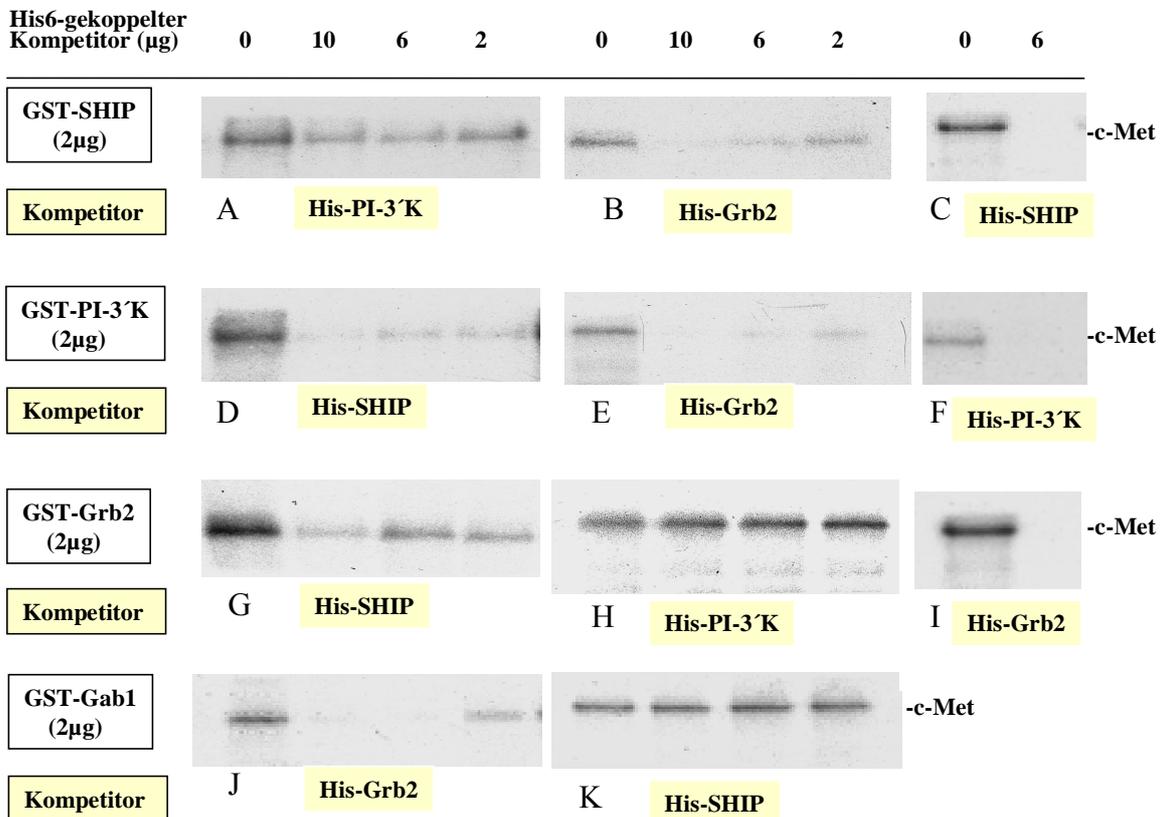


Abbildung 4.15: Hierarchie der Bindungsaffinitäten von Grb2, Gab1, SHIP-1 und PI 3'-Kinase an die Multisubstratbindungsstelle von c-Met *in vitro*.

GST-Fusionsproteine der SH2-Domänen von PI 3'-Kinase, SHIP-1, Grb2 und der c-Met-Bindungsdomäne von Gab1 wurden aus dem *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  isoliert. Dieselben Proteine wurden mit einem N-terminalen His6-Anhang versehen und aus dem *E.coli*-Stamm M15 isoliert. Immunpräzipitiertes, phosphoryliertes c-Met aus MDCK-Zellen wurde mit 2  $\mu\text{g}$  des jeweiligen GST-Fusionsproteins in Anwesenheit oder Abwesenheit der angegebenen Mengen an jeweiligem His6-Protein inkubiert. Die mit GT-Sepharose konjugierten Proteinkomplexe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt; das radioaktiv markierte c-Met im jeweiligen Proteinkomplex wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Die Autoradiogramme auf der rechten Seite zeigen, daß - wie erwartet - jedes Protein in der Lage war, mit sich selbst zu kompetieren; die dreifache Menge an His6-SHIP-1 verdrängte z.B. das GST-SHIP-1 aus dem GT-Sepharose gebundenen c-Met-GST-SHIP-1-Komplex.

## Ergebnisse

---

Beim Vergleich der Bindungsaffinitäten von SHIP-1 und PI 3'-Kinase an c-Met kann man feststellen, daß SHIP-1 in der Lage war, PI 3'-Kinase aus den GT-Sepharose gebundenen GST-PI-3'-Kinase-c-Met-Komplexen zu verdrängen (Abbildung 4.15 D). Im Gegensatz dazu war His6-PI 3'-Kinase nicht in der Lage, mit GST-SHIP-1 um die Bindung an c-Met zu konkurrieren (Abbildung 4.15 A).

Außerdem konnte man feststellen, daß Grb2 die größte *in vitro* Bindungsaffinität an c-Met besaß; das Grb2-Adaptormolekül assoziierte viel stärker als PI 3'-Kinase, SHIP-1 und Gab1 mit c-Met (Abbildung 4.15 E, B, J).

Zusätzlich wurden die Bindungsaffinitäten von Gab1 und SHIP-1 verglichen: das His6-SHIP-1 war nicht in der Lage, das GST-Gab1 aus den GT-Sepharose konjugierten GST-Gab1-c-Met-Komplexen zu verdrängen, selbst wenn dieses in dreifacher Menge als Kompetitor eingesetzt wurde (Abbildung 4.15 K).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente Hinweise auf eine bestehende Hierarchie der Bindungsaffinitäten *in vitro*: die Bindungsstärke an c-Met nimmt in der Reihenfolge Grb2, Gab1, SHIP-1, PI 3'-Kinase ab. Wenn der c-Met-Phosphotyrosinrest pY1356 von SHIP-1 oder von Grb2 besetzt ist, kann das Phosphotyrosin pY1349 nicht die Bindungsstelle für PI 3'-Kinase darstellen, und wenn Grb2 an pY1356 bindet, ist selbst Gab1 nicht in der Lage, mit pY1349 zu assoziieren. Das heißt, daß die Signalmoleküle PI 3'-Kinase, SHIP-1, Gab1 und Grb2 nicht in der Lage sind, gleichzeitig an c-Met zu binden; sie geben das c-Met-Signal sequentiell weiter.

### **4.3 Biologische Funktion von SHIP-1: SHIP-1 beeinflusst die c-Met-vermittelte Morphogenese der MDCK-Zellen**

Wie bereits erwähnt, stellen MDCK-Zellen das am besten untersuchte Zellkultursystem zum Studium biologischer Vorgänge nach HGF-Induktion dar. Es wurde bereits beschrieben, daß HGF eine 3-Phasen-Antwort in solchen Zellen hervorruft (Boccaccio et al., 1998), bestehend aus:

- Zellstreuung („Scattering“): ein Vorgang, für den die Aktivierung von PI 3'-Kinase und Ras notwendig ist (Royal & Park, 1996);
- Mitogenese: die Stimulation des Zellwachstums erfolgt durch die Assoziation von Grb2 mit c-Met, die eine Verbindung zur MAPK-Kaskade herstellt;
- Tubulogenese in dreidimensionaler Kollagenmatrix: ein komplexer Vorgang, für den viele Signalmoleküle wie Grb2 (Royal et al., 1997), Gab1 (Weidner et al., 1996), STAT3 (Boccaccio et al., 1998), PLC- $\gamma$  (Gual et al., 2000), SHP-2 (Schaeper et al., 2000) und andere, noch nicht identifizierte c-Met-spezifische Effektoren essentiell sind.

#### **4.3.1 MDCK-Zellen dissoziieren, wandern und bilden verzweigte tubuläre Strukturen unter dem Einfluß von HGF**

Unter zweidimensionalen Kulturbedingungen (z.B. auf flachen Zellkulturschalen) bilden subkonfluente MDCK-Zellen zusammenhängende Kolonien (sog. Zellinseln) bestehend aus flachen, miteinander in Kontakt stehenden Zellen. HGF ändert die Morphologie solcher Zellkolonien, indem es bewirkt, daß sich die Zellen zunächst verteilen, aus dem Zellverband dissoziieren und anschließend anfangen zu wandern. Außerdem bekommen die mit HGF stimulierten Epithelzellen eine Fibroblasten-ähnliche äußere Erscheinung.

Dieser Effekt, das sog. „Scattering“ (Zellstreuung) wurde nicht nur bei der Aktivierung des c-Met-Rezeptors beobachtet; auch andere aktivierte Rezeptortyrosinkinasen wie Neu, Ros, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor und der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)-Rezeptor bewirken die Streuung von Zellen (Sachs et al., 1996).

Spezifisch und charakteristisch für den c-Met-Rezeptor ist die Bildung von tubulären, verzweigten Strukturen, wenn MDCK-Zellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix in Anwesenheit von HGF kultiviert werden. MDCK-Zellen werden im Kollagengel eingebettet und so lange kultiviert, bis sie runde Zysten bilden. Durch die Zugabe von HGF

## Ergebnisse

dissoziieren einzelne Zellen ab und bilden durchgehende, verzweigte Tubuli. Das durchgehende Lumen dieser Tubuli wird von polarisierten Epithelzellen umgeben; das basale Ende steht in Kontakt mit der Kollagenmatrix, während das apikale, Mikrovilli-reiche Ende das Lumen auskleidet (Montesano et al., 1991).

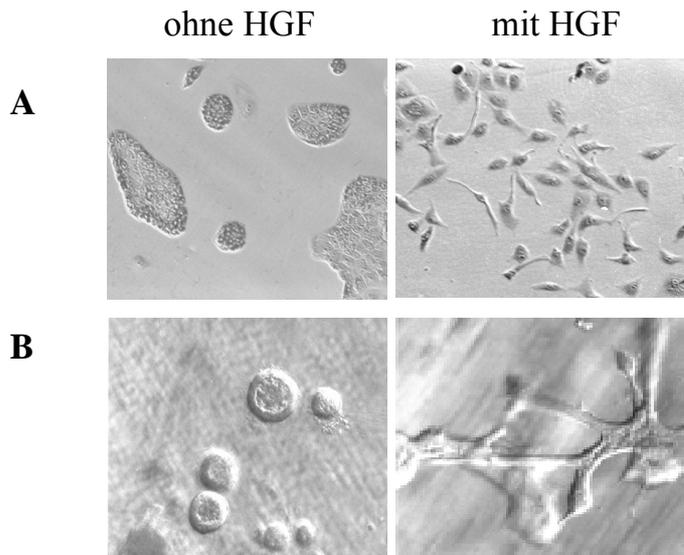


Abbildung 4.16: Morphologische Veränderungen in MDCK-Zellen nach HGF-Stimulation  
A: „Scattering“ - MDCK-Zellen wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml auf 8-Kammer-Gewebekulturplatten ausgesät und für 12-16 Stunden kultiviert, bis sie Kolonien aus miteinander in Kontakt stehenden Zellen bildeten. Dann wurden 20 mg/ml HGF zugegeben und die Zellen für weitere 12 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie fixiert, mit Giemsa-Reagenz angefärbt und unter Verwendung des Phasenkontrast-Verfahrens fotografiert.

B: Tubulogenese - MDCK-Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in Kollagen-Lösung (Typ I, 3 mg/ml) eingebettet und auf 12-Kammer-Gewebekulturplatten ausgesät. Nach dem Erstarren der Kollagen-Lösung wurden die Zellen mit Zellkulturmedium überschichtet und 5 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert, bis Zystenbildung beobachtet wurde. Dann wurden 40 ng/ml HGF zugegeben; der Mediumwechsel und die Zugabe von frischem HGF erfolgten alle 2 Tage. Nach 7 Tagen wurde unter Verwendung des Hoffman'schen Modulations-Kontrastverfahrens die Ausbildung tubulärer, verzweigter Strukturen bei den mit HGF stimulierten Zellen beobachtet und fotografiert.

Wenn SHIP-1 an den c-Met-Signalwegen beteiligt ist, die diesen morphologischen Veränderungen zugrunde liegen, dann sollte die Überexpression oder das Ausschalten von SHIP-1 in MDCK-Zellen die Morphogenese dieser Zellen beeinflussen.

### 4.3.2 Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der biologischen Rolle von SHIP-1 in den c-Met-Signalkaskaden wurden MDCK-Zellen mit dem Myc-gekoppelten, murinen SHIP-1-Protein in voller Länge stabil transfiziert. Mit dem Superfect-Reagens (Qiagen) wurden die besten Transfektionsergebnisse erzielt.

Nach der G418-Selektion wurden insgesamt 19 verschiedene stabile Zellklone isoliert, die unterschiedliche Mengen des exogenen SHIP-1-Proteins konstitutiv exprimierten - wie aus den Immunblots mit Myc-spezifischen Antikörpern (Abbildung 4.17) zu ersehen ist. Erwartungsgemäß konnte kein Myc-gekoppeltes SHIP-1 im Zellysate von Wildtyp-MDCK-Zellen detektiert werden.

Für weitere Untersuchungen wurden zwei Klone (Klon 15 und Klon 21) gewählt, die vergleichbar hohe Mengen von SHIP-1 exprimierten.

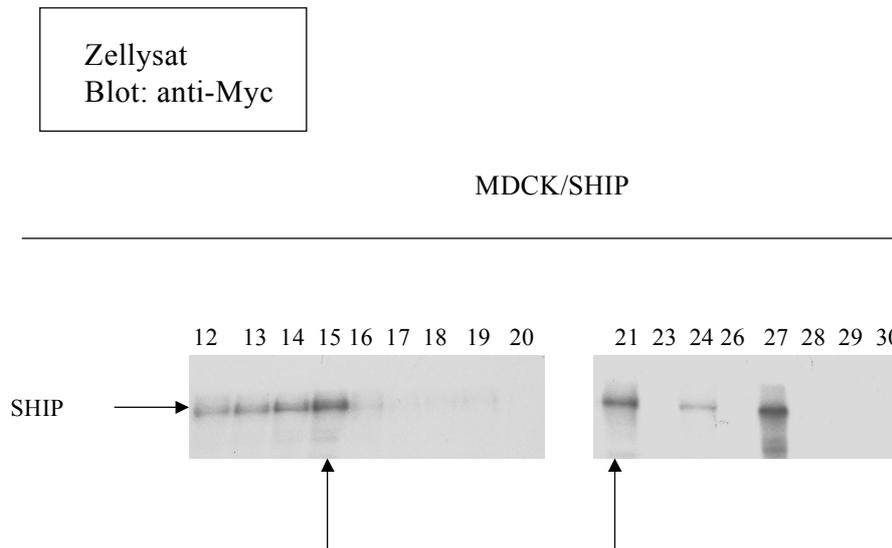


Abbildung 4.17: 19 MDCK-Transfektanten exprimieren das exogene SHIP-1-Protein in unterschiedlichen Mengen. Von jedem Klon wurden Aliquots von  $4 \times 10^5$  Zellen lysiert; Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

### 4.3.2.1 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf die DNA-Syntheserate

Um die Beteiligung von SHIP-1 an der HGF-induzierten mitogenen Signalkaskade in MDCK-Zellen zu untersuchen, wurde die Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Thymidin in Wildtyp-MDCK-Zellen und in die zwei SHIP-1-Transfektanten Klon 15 und Klon 21 gemessen. Die Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die untersuchten Zellen gilt als Maß für deren mitogene Aktivität.

$8 \times 10^3$  Zellen/well wurden auf 96-well-Gewebekulturplatten ausgesät und durch Zugabe von 2 mM Deoxythymidin und 250  $\mu\text{M}$  Deoxycytidin über die Dauer von 2 Zellzyklen synchronisiert. Dann wurden sie für weitere 12 Stunden in serumreduziertem (0,2 % FKS) Medium oder in Vollmedium (10 % FKS) gehalten. Zu den serumreduzierten Zellen

## Ergebnisse

wurden 20 ng/ml HGF hinzugegeben, dann wurden sie für weitere 12 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte eine Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (100  $\mu\text{Ci/well}$ ) für 4 Stunden. Die Einbaurate des Isotops in die während dieser Zeit neu synthetisierte DNA wurde mittels Fällung durch Trichloressigsäure (TCA) und anschließender Messung im Szintillationszähler bestimmt.

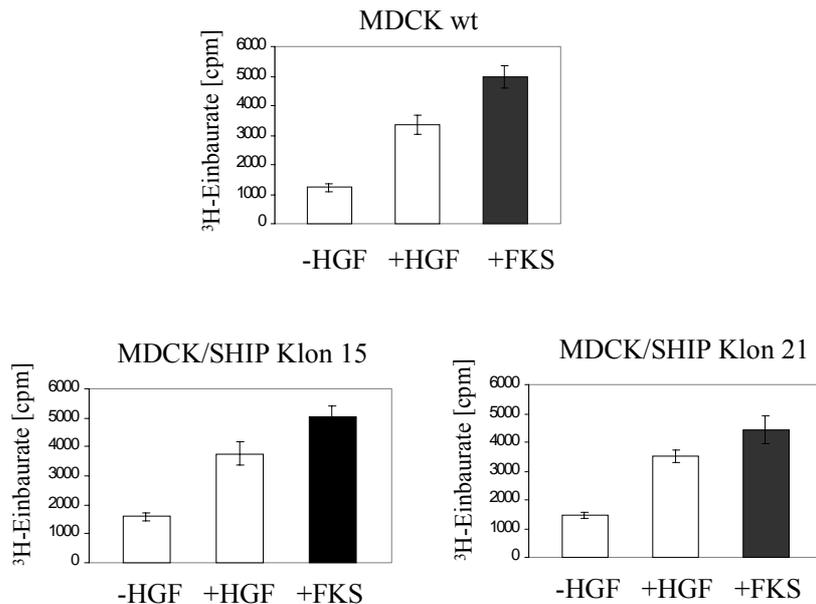


Abbildung 4.18: Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen verändert deren DNA-Syntheserate nicht. Jeweils  $8 \times 10^3$  Zellen wurden für 48 Stunden synchronisiert und in Anwesenheit von Serum oder HGF für weitere 12 Stunden kultiviert, bevor die Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin (100  $\mu\text{Ci/well}$ ) für 4 Stunden erfolgte. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Messung der durch TCA präzipitierten, radioaktiv markierten Zellbestandteile. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Fibroblasten-Zellsystem (Liubin et al., 1996) hatte die Überexpression von SHIP-1 keinen Einfluß auf das Proliferationsverhalten von MDCK-Zellen.

### 4.3.2.2 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf die HGF-induzierte Dissoziation und Wanderung von Zellen

Wie bereits beschrieben (s. 4.3.1), wurden Veränderungen in der Zellmorphologie bei der HGF-Behandlung von MDCK-Zellen beobachtet. Dazu gehört der „Scattering“-Effekt: Zell-Zell-Kontakte gehen innerhalb zusammenhängender Zellkolonien verloren, einzelne Zellen lösen sich aus dem Zellverband, bekommen eine Fibroblasten-ähnliche Erscheinung und wandern (Stoker, 1985; Stoker & Perryman, 1987).

Um zu überprüfen, ob SHIP-1 an den c-Met-Signalkaskaden beteiligt ist, die zum „Scattering“-Effekt führen, wurden Wildtyp-MDCK- und SHIP-1-überexprimierende MDCK-Zellen auf flachen Zellkulturschalen zur Subkonfluenz kultiviert, mit HGF für 12 Stunden stimuliert, anschließend chemisch fixiert und mit Giemsa-Reagenz angefärbt. Die Zellstreuung von Wildtyp-MDCK und SHIP-1-MDCK-Transfektanten wurde unter Verwendung des Phasenkontrast-Verfahrens unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Für diese Experimente wurden wiederum die zwei Klone 15 und 21 gewählt, die vergleichbar hohe Mengen des exogenen SHIP-1 exprimierten (Abbildung 4.19 A).

Wie aus Abbildung 4.19 B ersichtlich ist, zeigten die beiden SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zelllinien 15 und 21 nach HGF-Stimulation das gleiche Streuverhalten wie Wildtyp-MDCK-Zellen.

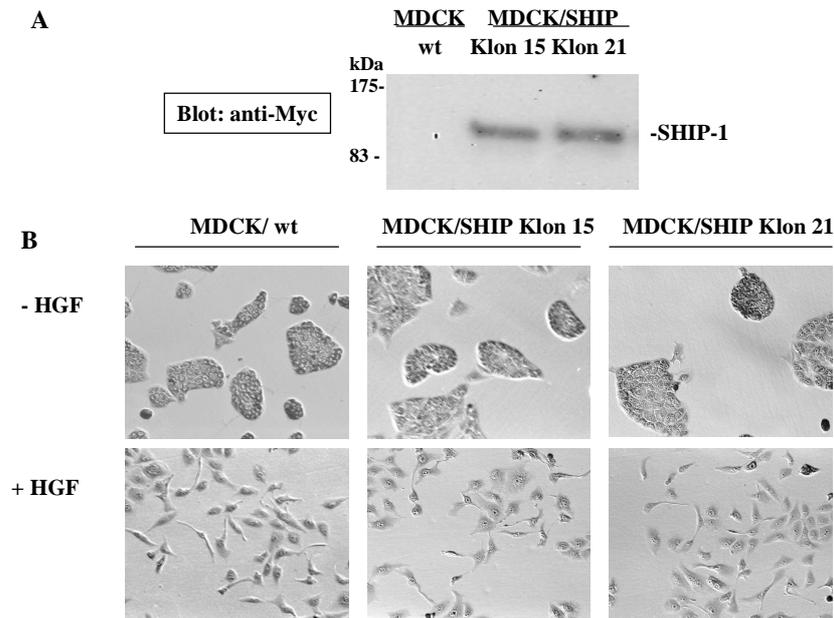


Abbildung 4.19: Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf deren „Scattering“-Verhalten.

A: Immunblot - Gesamtzelllysate aus Wildtyp-MDCK-Zellen und SHIP-1-transfizierten MDCK-Zellen (Klone 15 und 21;  $4 \times 10^5$  Zellen/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

B: Wildtyp-MDCK-Zellen und die beiden SHIP-1-exprimierenden MDCK-Zelllinien 15 und 21 wurden auf Gewebekulturschalen zur Subkonfluenz angezogen, für 12 Stunden mit 20 ng/ml HGF stimuliert und dann mit Giemsa-Reagenz angefärbt. Anschließend wurden die Dissoziation und Migration von Zellen unter Verwendung des Phasenkontrast-Verfahrens beobachtet und fotografiert.

### 4.3.2.3 Darstellung der Aktin-Filamente in Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen

Die Morphologie einer Zelle wird hauptsächlich durch die Ausprägung ihres Zytoskeletts bestimmt. Es ist offensichtlich, daß die Dissoziation und Wanderung von Epithelzellen mit Änderungen der Zytoskelett-Organisation einhergehen.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Methoden ist es möglich, einen Einblick in die Organisation des Zytoskeletts zu gewinnen. Zur Visualisierung von Aktin-Filamenten wird fluoreszierendes Phalloidin verwendet; dieses Alkaloid des Knollenblätterpilzes bildet starke Komplexe mit F-Aktin (Wulf et al., 1979).

## Ergebnisse

Um festzustellen, ob es Unterschiede in der Aktin-Organisation zwischen Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen nach HGF-Stimulation gibt, wurden diese Zellen einer Immunfluoreszenz mit FITC-konjugiertem Phalloidin unterzogen. Die Zellen wurden zu einer Konzentration von  $8 \times 10^3$  Zellen/Kammer auf 8-Kammer-Objektträger ausgesät, in Serum-reduziertem Medium (0,02 % FKS) für 12 Stunden gehalten und dann mit 20 ng/ml HGF für 5, 10, 30 und 60 Minuten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit Triton-haltigem Puffer permeabilisiert, mit Phalloidin angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

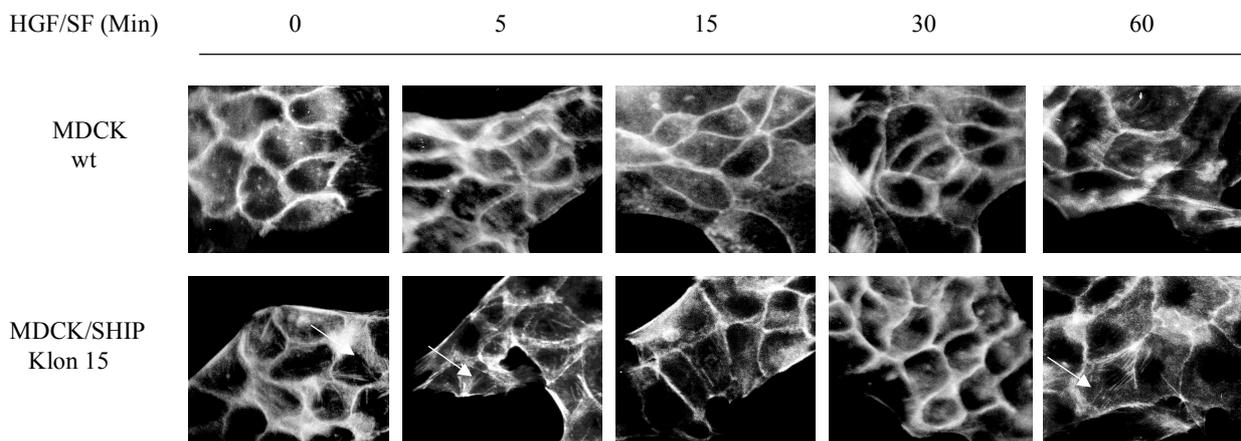


Abbildung 4.20: Aktin-Strukturen in Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen. Wildtyp-MDCK und die SHIP-1-überexprimierende Zelllinie „Klon 15“ wurden auf 8-Kammer-Objektträger ausgesät, zur Subkonfluenz angezogen, dann in Serum-reduziertem Medium für 12 Stunden kultiviert und mit 20 ng/ml HGF für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert, permeabilisiert, mit FITC-konjugiertem Phalloidin angefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und fotografiert.

Wie aus Abbildung 4.20 ersichtlich ist, gab es weder bei Wildtyp- noch bei SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen Unterschiede in der Aktin-Organisation in der frühen

Stimulationsphase mit HGF. Die Aktin-Färbung an Zell-Zell-Kontakten und auch im Zellkörper änderte sich nicht im Laufe der HGF-Behandlung.

In der direkten Gegenüberstellung der intrazellulären Aktin-Verteilung von Wildtyp-MDCK und dem SHIP-1-Transfektant Klon 15 kann man feststellen, daß die SHIP-1-überexprimierenden Zellen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von HGF ein etwas ausgeprägteres Aktinkabel-Netzwerk vorwiesen.

Die Pfeile in der Abbildung 4.20 weisen auf parallel angeordnete Faserbündel (sog. Streßfasern) hin, die die Zelle durchzogen.

#### 4.3.2.4 Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen beschleunigt ihre Tubulogenese-Antwort

Um den Einfluß von SHIP-1 auf die c-Met-spezifische Tubulogenese-Antwort zu untersuchen, wurden die SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zelllinien „Klon 15“ und „Klon 21“ in dreidimensionalem Kollagengel kultiviert, bis Zystenbildung beobachtet wurde; dann wurden die Zellen mit 40 ng/ml HGF stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurden mit HGF-stimulierte, in dreidimensionaler Kollagenmatrix wachsende Wildtyp-MDCK-Zellen eingesetzt.

Bereits innerhalb 24 Stunden nach der HGF-Stimulation begannen beide SHIP-1-Transfektanten tubuläre, verzweigte Strukturen zu bilden. Wie aus Abbildung 4.21 zu ersehen ist, konnten schon 2 Tage nach der HGF-Stimulation lange, verzweigte Tubuli innerhalb der Kollagenmatrix beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde der Tubulogenese-Effekt bei Wildtyp-MDCK-Zellen erst nach 7-tägiger HGF-Behandlung beobachtet.

Wie auch der Abbildung 4.21 zu entnehmen ist, waren weder Wildtyp-MDCK-Zellen noch die beiden SHIP-1-Transfektanten in der Lage, in Abwesenheit von HGF Tubuli zu bilden. Selbst nach 14 Tagen wurden nur runde Zysten und keine Tubuli innerhalb der Kollagenmatrix gesichtet (Daten nicht gezeigt).

Dagegen waren bei den beiden SHIP-1-Transfektanten nach 4-tägiger HGF-Behandlung fast alle Zellen in tubulären, verzweigten Strukturen organisiert.

## Ergebnisse

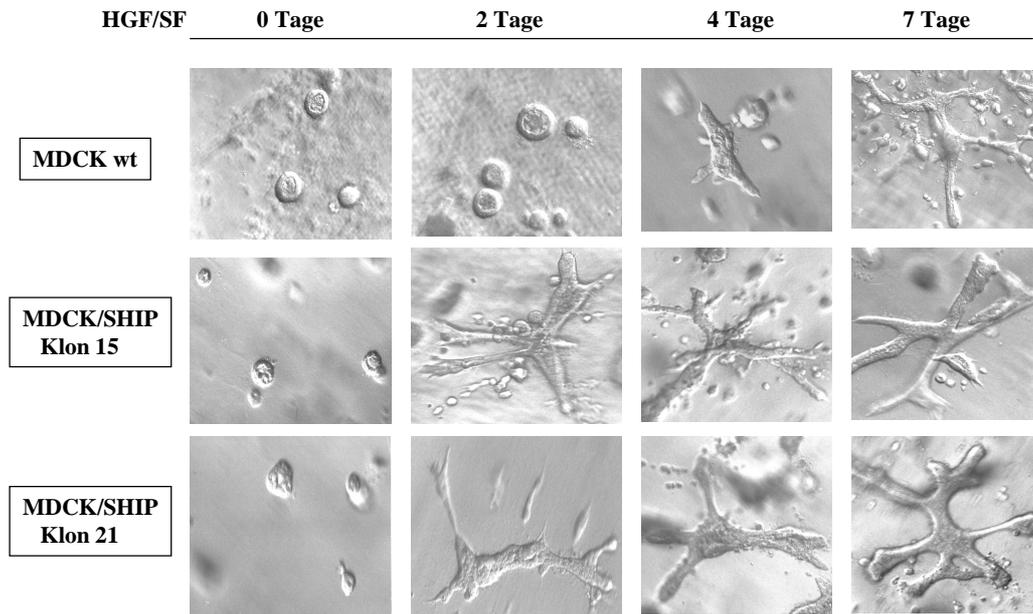


Abbildung 4.21: Die HGF-induzierte Tubulogenese wird durch die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen beschleunigt. Wildtyp-MDCK- und SHIP-1-überexprimierende MDCK-Zelllinien „Klon 15“ und „Klon 21“ wurden für 5 Tage in dreidimensionaler Kollagenmatrix kultiviert; dann wurden dem Zellkulturmedium 40 ng/ml HGF hinzugegeben. Mediumwechsel und Zugabe von frischem HGF erfolgten alle 2 Tage. Nach 2, 4 und 7 Tagen wurde die Tubulogenese-Antwort unter Verwendung des Hoffman'schen Kontrastverfahrens ausgewertet und fotografiert.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Maroun et al., 1999a) wurde festgestellt, daß nur ungefähr 70 % der Wildtyp-MDCK-Zellen in der Lage waren, Tubuli zu bilden.

Diese Daten zeigen deutlich, daß die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen die Tubulogenese-Antwort drastisch potenziert und beschleunigt.

### **4.3.5 Die Überexpression eines mutierten SHIP-1-Proteins ohne katalytische Aktivität in MDCK-Zellen hemmt deren HGF-induzierte Tubulogenese in dreidimensionaler Kollagenmatrix**

Wie bereits gezeigt, beschleunigte die Überexpression von SHIP-1 die Bildung tubulärer, verzweigter Strukturen, wenn MDCK-Zellen in einem dreidimensionalen Kollagengel kultiviert wurden.

Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob dieser Phänotyp auf die erhöhte Phosphoinositol-phosphatase-Aktivität zurückzuführen ist, die die Überexpression des katalytisch intakten SHIP-1-Proteins mit sich bringt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst durch Deletion der Aminosäurenreste 666-680 (Vollenweider et al., 1999) eine SHIP-1-Mutante ohne katalytische Aktivität generiert (SHIP-1  $\Delta$ 666-680). Die Herstellung dieser Mutante und deren Klonierung in das pcDNA3.1MycHis-Vektorsystem wurden unter 3.7 beschrieben. MDCK-Zellen wurden nach der Superfect-Methode (Qiagen) mit dem leeren pcDNA3.1MycHis-Vektor oder mit dem pcDNA3.1MycHis-Konstrukt, das die cDNA für die katalytisch inaktive SHIP-1-Mutante trägt, stabil transfiziert. Nach der G418-Selektion wurden 20 bzw. 12 stabile Klone isoliert, die den leeren Vektor bzw. das SHIP-1-Konstrukt konstitutiv exprimierten. Von den letzteren wurden 2 Klone gewählt (Klon 1 und Klon 4), die gleich hohe Mengen des exogenen, mutierten SHIP-1-Proteins im Immunblot mit Myc-spezifischen Antikörpern aufwiesen (Abbildung 4.22 A).

Alle Transfektanten wurden für 5 Tage in dreidimensionaler Kollagenmatrix kultiviert, bevor die Stimulation mit 40 ng/ml HGF erfolgte. Die mit dem leeren pcDNA3.1MycHis-Vektor transfizierten MDCK-Zellen dienten als Kontrolle.

In Übereinstimmung mit bereits gezeigten Experimenten mit Wildtyp-MDCK-Zellen bildeten die Kontroll-Transfektanten nach 7-tägiger HGF-Behandlung tubuläre, verzweigte Strukturen innerhalb der Kollagenmatrix (Abbildung 4.22 B).

Im Gegensatz dazu zeigten die beiden MDCK-Transfektanten-Zelllinien, die die SHIP-1-Mutante ohne katalytische Aktivität exprimierten, keine Tubulogenese-Antwort nach der HGF-Stimulation. Selbst nach 9-tägiger HGF-Behandlung wurden nur runde Zysten und keine langen, verzweigten, röhrenartigen Strukturen innerhalb des Kollagengels beobachtet (Abbildung 4.22 B).

## Ergebnisse

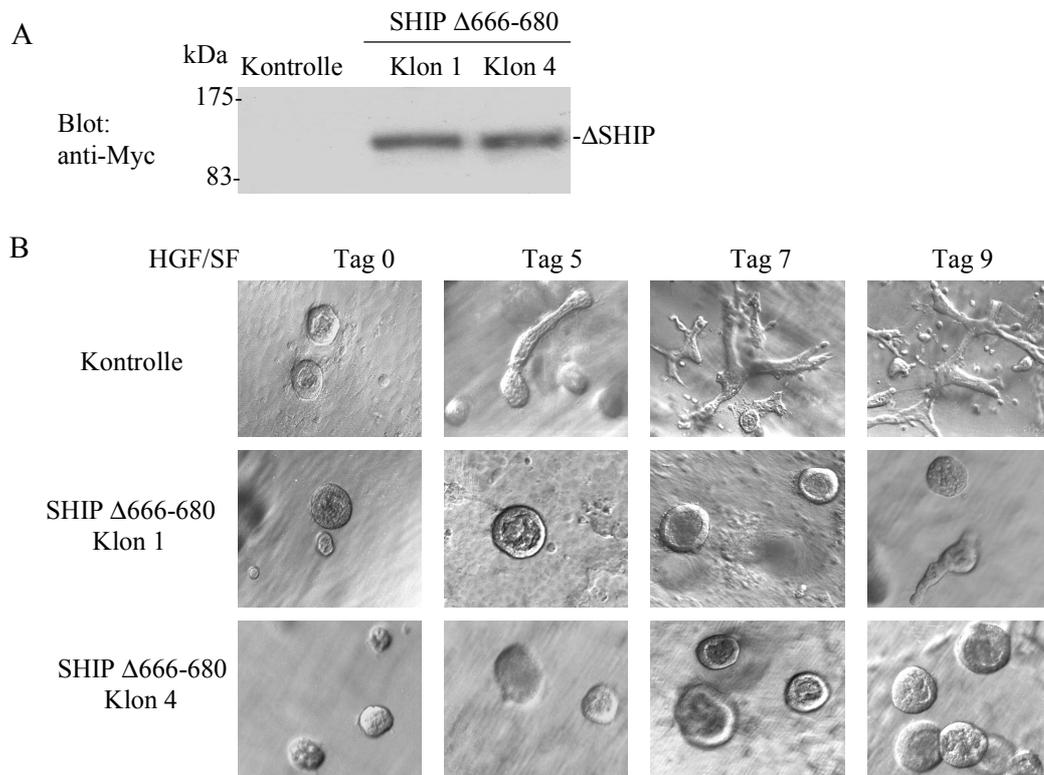


Abbildung 4.22: Expression einer katalytisch inaktiven SHIP-1-Mutante in MDCK-Zellen hemmt deren Tubulogenese-Antwort.

A: Immunblot - Aliquots von  $4 \times 10^5$  MDCK-Zellen, die entweder den leeren pcDNA3.1MycHis-Vektor (Kontrolle) oder die SHIP-1  $\Delta$ 666-680 Mutante (Klon 1 und Klon 4) exprimierten, wurden lysiert; die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

B: Fotoaufnahmen der Tubulogenese-Antwort - MDCK-Transfektanten wurden in dreidimensionaler Kollagenmatrix für 5 Tage kultiviert, dann wurden 40 ng/ml HGF dem Zellkulturmedium hinzugefügt und das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach 5, 7 und 9 Tagen wurde die Tubulogenese-Antwort unter der Verwendung des Hoffman'schen Modulations-Kontrastverfahrens unter dem Mikroskop beobachtet und fotografiert.

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß die Phosphoinositol-5'-phosphatase-Aktivität von SHIP-1 essentiell für die Tubulogenese-Antwort ist.

### 4.3.6 Die Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt, daß SHIP-1 einen Einfluß auf die Signaltransduktion von c-Met hat: die Überexpression dieses Proteins in MDCK-Zellen beschleunigte drastisch die Tubulogenese-Antwort. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß die katalytische Aktivität des SHIP-1-Proteins essentiell für diese Antwort ist.

Eine zusätzliche Erklärung für die gesteigerte Tubulogenese von SHIP-1-überexprimierenden Zellen besteht darin, daß durch die Anwesenheit von großen Mengen SHIP-1 und dessen Bindung an c-Met Bindungsstellen dieses Rezeptors für andere Proteine nicht mehr zugänglich sind.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden MDCK-Zellen mit der SH2-Domäne von SHIP-1 stabil transfiziert.

Die cDNA, die für die SHIP-1-SH2-Domäne kodiert, wurde über PCR amplifiziert und in das Vektorsystem pcDNA3.1MycHis inkloniert (s 3.7). Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe des Superfect-Reagenzes (Qiagen) in MDCK-Zellen stabil eingebracht; ebenso der unveränderte pcDNA3.1MycHis-Vektor als Kontrolle.

Nach der Selektion mit G418-haltigem Medium konnten 7 stabile Klone isoliert werden, die die Myc-gekoppelte SH2-Domäne von SHIP-1 exprimierten (Abbildung 4.23). Ebenso wurden 20 Transfektanten isoliert, die die pcDNA3.1MycHis-Vektor-DNA exprimierten.

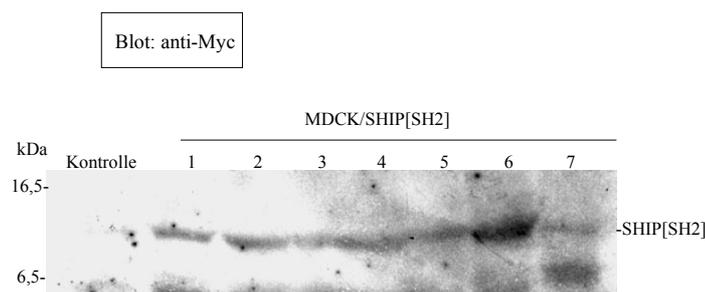


Abbildung 4.23: Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit dem pcDNA3.1MycHis-Konstrukt, das die cDNA für die SH2-Domäne von SHIP-1 beinhaltet, sowie mit dem unveränderten pcDNA3.1MycHis Vektor (als Kontrolle) transfiziert. Nach erfolgter G418-Selektion wurden 7 bzw. 20 stabile Klone isoliert. Jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen von jeder generierten Zelllinie wurden lysiert, die Gesamtzelllysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunfluoreszenz mit Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

Die 7 analysierten SHIP-1-SH2-Transfektanten exprimierten das exogene Protein quantitativ unterschiedlich. Für zellmorphologische Untersuchungen wurden zwei Klone ausgewählt (Klon 1 und Klon 2), die vergleichbar hohe Mengen des exogenen Proteins exprimierten.

### 4.3.6.1 Die Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen führt zur Hemmung der Tubulogenese-Antwort

Die zwei MDCK-Transfektanten „Klon 1“ und „Klon 2“, die die SHIP-1-SH2-Domäne exprimierten, wurden für 5 Tage im dreidimensionalen Kollagengel kultiviert und daraufhin mit 40 ng/ml HGF stimuliert. Die mit dem leeren pcDNA3.1MycHis-Vektor transfizierten MDCK-Zellen dienten als Kontrolle.

Kontroll-Transfektanten zeigten denselben Phänotyp wie Wildtyp-MDCK-Zellen: sie begannen innerhalb von 4 Tagen nach der HGF-Behandlung mit der Ausbildung von Tubuli und bildeten nach 7-tägiger HGF-Stimulation lange, verzweigte Röhren innerhalb der dreidimensionalen Kollagenmatrix.

Dagegen zeigten die beiden SHIP-1-SH2-Domäne exprimierenden Zelllinien „Klon 1“ und „Klon 2“ keine Tubulogenese-Antwort. Aus den anfänglichen runden Zysten bildeten sich selbst nach 9-tägiger HGF-Stimulation keine Tubuli.

Die von den SHIP-1-Mutanten gelieferten Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden: Die Beschleunigung der Tubulogenese-Antwort in SHIP-1-überexprimierenden Zellen ist auf die erhöhte Phosphoinositol-5'-phosphatase-Aktivität zurückzuführen. Dagegen ist die Besetzung der c-Met-Bindungsstelle und die eventuelle Verdrängung anderer c-Met-bindender Moleküle durch das überschüssige SHIP-1 nicht entscheidend für die beobachtete Potenzierung der Tubulogenese-Antwort.

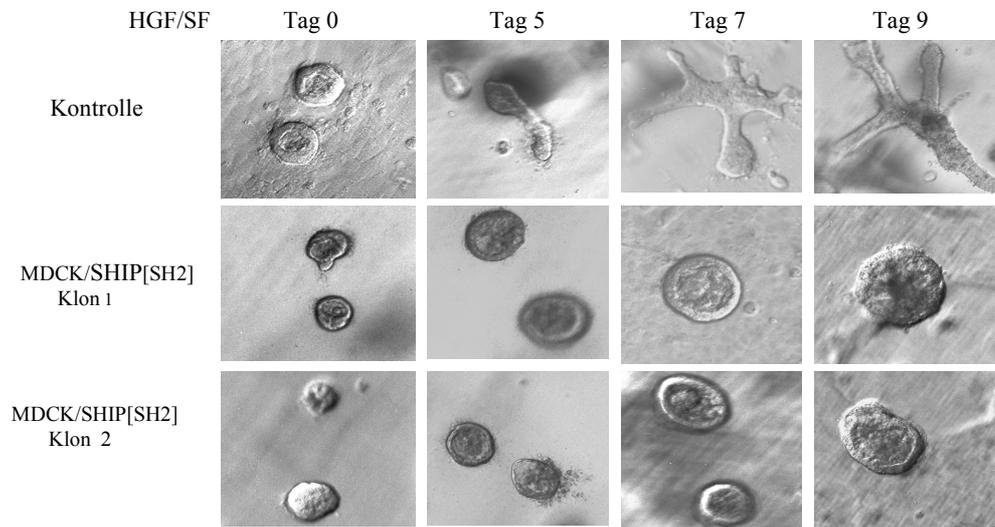


Abbildung 4.24: Hemmung der Tubulogenese-Antwort in SHIP-1-SH2-Domäne-exprimierenden MDCK-Zellen. MDCK-Zellen, die entweder den leeren pcDNA3.1MycHis-Vektor oder cDNA kodierend für die SHIP-1-SH2-Domäne exprimierten, wurden im dreidimensionalen Kollagengel eingebettet und 5 Tage kultiviert, bevor die Stimulation mit 40 ng/ml HGF erfolgte. Nach 5, 7 und 9 Tagen wurde die Tubulogenese-Antwort ausgewertet: die Zellen wurden unter Verwendung des Hoffman'schen Modulations-Kontrastverfahrens beobachtet und fotografiert.

### 5. DISKUSSION

Zellen eines vielzelligen Organismus müssen miteinander kommunizieren, um ihre Entwicklung und Organisation zu Geweben zu regulieren, um ihr Wachstum und ihre Teilung zu kontrollieren und um ihre verschiedenartigen Aktivitäten zu koordinieren.

Die Nachrichtenübertragung zwischen räumlich entfernten Zellen erfolgt über sezernierte Moleküle, die an Rezeptoren der Zielzellen binden. Oft binden die gleichen Signalmoleküle an identische Rezeptorproteine und bewirken dennoch sehr unterschiedliche Antworten in verschiedenen Zielzellen. Das heißt, die zellulären Reaktionen auf Signalmoleküle sind auf zweierlei Art programmiert: durch die Rezeptoren, die die Zielzellen tragen und durch den inneren Mechanismus, an den der Rezeptor gekoppelt ist.

Zelloberflächenrezeptoren binden ein Signalmolekül mit hoher Affinität und wandeln dadurch einen exogenen Stimulus in ein intrazelluläres Signal um. Diese Art der Signalübertragung gilt auch für die zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehörenden Proteine. Durch die Bindung eines spezifischen Liganden wird die katalytische Aktivität einer Rezeptortyrosinkinase stimuliert; daraufhin rekrutiert sie intrazelluläre Signalproteine über spezifische Phosphorylierungsstellen ihrer zytoplasmatischen Domäne. Trotz untereinander bestehender Homologien und vielfach gleicher intrazellulärer Bindeproteine sind Rezeptortyrosinkinasen in der Lage, sehr unterschiedliche zelluläre Antworten hervorzurufen. Diese Tatsache läßt sich dadurch erklären, daß die multiplen aktivierten Signalwege unterschiedlich miteinander vernetzt sind, was einerseits zu der Komplexität und andererseits zu der Spezifität der Signaltransduktion des jeweiligen Rezeptors führt.

In den letzten Jahren wurde viel an der Charakterisierung neuer Signalkaskaden von Rezeptortyrosinkinasen gearbeitet. Der erste Schritt dabei ist die Identifizierung der jeweiligen Autophosphorylierungsstellen; anschließend werden die daran bindenden Proteine und ihre Involvierung in diversen Signalkaskaden ermittelt.

Auch beim im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HGF-Rezeptor c-Met handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, deren Aktivierung für viele Prozesse während der Embryogenese und der Organogenese essentiell ist (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). HGF steuert über seinen Rezeptor c-Met Zellwachstum (Nakamura et al., 1986; Rubin et al., 1991), Zellmigration (Stoker et al., 1987) sowie komplexe morphologische Vorgänge, wie z.B. die durch Faltung von Epithelzellen hervorgerufene Bildung von tubulären und alveolaren Strukturen in diversen Geweben *in*

*vivo* (Matsumoto & Nakamura, 1993). Auch *in vitro* kommt es zur HGF-induzierten Tubulogenese, wenn polarisierte Epithelzellen bestimmter Zelllinien (z.B. MDCK) in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kultiviert werden (Montesano et al., 1991); dieser Effekt ist spezifisch für c-Met (Weidner et al., 1996). Es wurde gezeigt, daß viele Signalmoleküle, darunter Grb2 (Royal & Park, 1997), Gab1 (Weidner et al., 1996), STAT3 (Boccaccio et al., 1998), PLC- $\gamma$  (Gual et al., 2000) und die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 (Schaeper et al., 2000), bei der Übermittlung der HGF-induzierten Tubulogenese-Antwort eine essentielle Rolle spielen. Allerdings werden die meisten von diesen Molekülen auch von anderen aktivierten Rezeptortyrosinkinasen gebunden, was bedeutet, daß die nachfolgenden Signalkaskaden nicht in allen Fällen spezifisch sind. Daher liegt es nahe, daß es zusätzliche, bisher nicht identifizierte c-Met-Effektoren gibt, deren Bindung an den aktivierten Rezeptor sowie die nachfolgende Aktivierung spezifischer Signalkaskaden zu der charakteristischen Tubulogenese-Antwort beitragen.

In dieser Arbeit sollten solche Proteine ermittelt werden; dafür wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System herangezogen. Die Tatsache, daß Zwei-Hybrid-Systeme existieren, mit deren Hilfe man aktivierte Tyrosinkinasen in der Hefe exprimieren kann (Bartel & Fields, 1995), macht es möglich, aus entsprechenden Genbanken direkt bindende Proteine zu ermitteln, die an der Signaltransduktion dieser Tyrosinkinasen beteiligt sind.

### **5.1 SHIP-1 und das Zinkfinger-Protein wurden als neue Interaktionspartner von c-Met identifiziert**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SH2-Domäne-enthaltende Inositol-5'-phosphatase SHIP-1 aus einer Genbank aus Rattenhirnen als neuer Wechselwirkungspartner von c-Met isoliert. Es konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt werden, daß die Interaktion über die SH2-Domäne von SHIP-1 erfolgt und daß sie abhängig vom c-Met-Phosphorylierungsstatus ist.

Diese Arbeit hat ergeben, daß SHIP-1 nicht nur in der Signaltransduktion von hämatopoetischen Zellen, aus denen SHIP-1 ursprünglich isoliert wurde (Lioubin et al., 1996; Damen et al., 1996), sondern auch in der von Epithelzellen, den Hauptzielzellen von HGF, eine wesentliche Rolle spielt. Zunächst wurde die Expression von SHIP-1 - sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene - in diversen Zelltypen detektiert; darunter in den Epithelzelllinien MDCK, EFM-19 und EFM-192A. Somit konnte ein erster Hinweis

## Diskussion

---

gewonnen werden, daß die im Hefe-Zwei-Hybrid-System detektierte c-Met/SHIP-1-Interaktion physiologisch relevant ist. Anschließend wurde durch Co-Immünpräzipitationsstudien eindeutig gezeigt, daß SHIP-1 und c-Met unter physiologischen Bedingungen miteinander assoziieren. Nach Stimulierung von MDCK-Zellen mit HGF konnte die Anwesenheit von c-Met in SHIP-1-spezifischen Immunkomplexen detektiert werden. Die Co-Immünpräzipitationsstudien haben das im Hefe-Zwei-Hybrid-System erzielte Ergebnis bestätigt, nämlich daß die Interaktion von SHIP-1 und c-Met *in vivo* von der Aktivierung des Rezeptors durch HGF-Stimulation abhängig ist.

Zusätzlich konnte in einem *in vitro* GST-Bindungsexperiment die Bindung der SH2-Domäne von SHIP-1 an den tyrosinphosphorylierten c-Met-Rezeptor nachgewiesen werden.

Alle erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, daß die SHIP-1-Bindung an c-Met über die SH2-Domäne und Phosphotyrosinreste erfolgt und daß sie physiologische Relevanz besitzt.

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde die Bindungsdomäne eines neuen c-Met-interagierenden Zinkfinger-Proteins gefunden; die neu identifizierte Protein-Protein-Wechselwirkung wurde anschließend im GST-Bindungsexperiment bestätigt. Die Bindung ist im Hefe-Zwei-Hybrid-System - im Gegensatz zur c-Met/SHIP-1-Interaktion - allerdings nicht vom c-Met-Phosphorylierungsstatus abhängig, d.h. die beiden Proteine assoziieren konstitutiv miteinander.

Die gefundene Bindungsdomäne enthält vier Zinkfinger-Motive der C2/H2-Familie und weist keine hohen Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf. Da keine vollständige Sequenz vorhanden ist, lassen sich über die Funktion dieses Proteins keine näheren Aussagen machen.

Der RNA-Blot ergab, daß die Transkriptlänge der murinen mRNA des Zinkfinger-Proteins etwa 6 kb (s. Abbildung 4.10) beträgt. Zusätzlich zeigte die Northern-Blot-Analyse, daß die Expression des Zinkfinger-Transkripts nicht auf das Gehirn beschränkt ist, woraus das Protein ursprünglich im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen isoliert wurde. Die Anwesenheit des Transkripts in unterschiedlichen murinen Geweben zeigt, daß das Zinkfinger-Protein von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, also auch von c-Met-exprimierenden Epithelzellen.

Wie bereits erwähnt, ergab die Messung im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System, daß das Zinkfinger-Protein sowohl an den phosphorylierten als auch an den nicht phosphorylierten

c-Met-Rezeptor binden kann. Das weist darauf hin, daß die Assoziation *in vivo* nicht von der Stimulation mit HGF abhängt. Inwieweit diese neu detektierte Protein-Protein-Wechselwirkung bei der c-Met-abhängigen Signaltransduktion *in vivo* eine Rolle spielt, bleibt noch zu untersuchen.

Beim Zinkfinger-Protein könnte es sich um einen Inhibitor des c-Met-Rezeptors handeln. Dieser könnte - ähnlich wie die SOCS-Proteine - als Adaptor fungieren und zur Regulation der Kinaseaktivität des c-Met-Rezeptors beitragen (Alexander et al., 1999).

5.2 Die Interaktionen von PI 3'-Kinase, Grb2 und Gab1 mit c-Met wurden durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System und durch GST-Bindungsstudien bestätigt

Zusätzlich zu zwei neuen c-Met-Bindungspartnern (SHIP-1 und ein zuvor nicht bekanntes Zinkfinger-Protein) wurden beim Hefe-Zwei-Hybrid-Screen viele bekannte c-Met-interagierende Proteine, wie z.B. PI 3'-Kinase, Grb2, Gab1, PLC- $\gamma$  und c-Src isoliert. Die c-Met/PI 3'-Kinase-, c-Met/Grb2- und c-Met/Gab1-Wechselwirkungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch durch GST-Bindungsstudien nachgewiesen.

Die N-terminale SH2-Domäne von p85, der regulatorischen Untereinheit von PI 3'-Kinase, assoziierte im Hefe-Zwei-Hybrid-System phosphorylierungsabhängig mit dem c-Met-Rezeptor.

Die nach Aktivierung von c-Met ausgelösten PI 3'-Kinase-Kaskaden sind hauptsächlich für die Motilität der Zellen essentiell. Die Behandlung von MDCK-Zellen mit Wortmannin, einem Inhibitor der PI 3'-Kinase, führte zur Hemmung der HGF-induzierten Zellstreuung (Royal & Park, 1995).

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System und im GST-Bindungsexperiment konnte eine direkte, phosphorylierungsabhängige Interaktion der SH2-Domäne von Grb2 mit c-Met gezeigt werden.

In vielen Fällen spielt Grb2 eine Schlüsselrolle in der durch Wachstumsfaktoren aktivierten mitogenen Signalkaskade, die über Ras/Raf und MAPK zum Zellkern läuft. Es gibt aber auch Grb2-abhängige Signalkaskaden, die eine Verbindung zur Zytoskelettorganisation haben. Die Grb2-Bindung an den c-Met-Rezeptor ist essentiell für die HGF-induzierte Tubulogenese-Antwort. Royal et al. (1997) haben gezeigt, daß c-Met N1358H-Mutanten, bei denen die Grb2-Bindung selektiv unterbunden wurde, nicht mehr in der

## Diskussion

---

Lage waren, die Tubulogenese von im Kollagengel kultivierten MDCK-Zellen zu vermitteln. Im Gegensatz dazu hatte diese Mutation keinen Effekt auf die HGF-induzierte Streuung von MDCK-Zellen (Royal et al., 1997).

Das Multiadaptorprotein Gab1 wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch im GST-Bindungsexperiment als direkter c-Met-Wechselwirkungspartner identifiziert. Die Assoziation war - in Übereinstimmung mit den von Weidner et al. (1996) gezeigten Daten - von der Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors abhängig und erfolgte über die sog. Met-Bindungsdomäne (MBD), eine PTB-ähnliche Domäne zwischen den Aminosäuren 450 und 532.

Gab1 gehört zur Insulinsubstrat-Familie und wird durch die Stimulation mit Insulin (Holgado-Madruga, 1996), verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie EGF, HGF oder NGF (Weidner et al., 1996; Holgado-Madruga, 1996, 1997) oder diversen Zytokinen, wie IL-3, IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Erythropoetin, Thrombopoetin und GM-CSF (Takahashi-Tezuka et al., 1998; Lecoq-Lafon et al., 1999; Nishida et al., 1999) an Tyrosinresten phosphoryliert.

Bei der HGF-induzierten Signaltransduktion in MDCK-Zellen spielt Gab1 eine essentielle Rolle: es stellt das Substrat dar, das am stärksten von der aktivierten c-Met-Kinase phosphoryliert wird (Nguyen et al., 1997). Für die c-Met-spezifische Tubulogenese ist die Bindung von Gab1 an den aktivierten Rezeptor notwendig: in MDCK-Zellen exprimierte c-Met-Mutanten, die bezüglich der Gab1-Assoziation defizient sind, können keine Tubulogenese-Antwort bewirken (Royal et al., 1997). Zusätzlich wurde von Weidner et al. (1996) gezeigt, daß Gab1-überexprimierende MDCK-Zellen konstitutiv (auch in Abwesenheit des Liganden HGF) tubuläre, verzweigte Strukturen im Kollagengel bilden. Die Daten von Maroun et al. (1999a) weisen allerdings darauf hin, daß die Gab1/c-Met-Interaktion notwendig, aber nicht allein ausreichend für die Tubulogenese von MDCK-Zellen ist.

Gual et al. (2000) konnten zusätzliche Faktoren ermitteln, die zur c-Met-Spezifität der Tubulogenese-Antwort beitragen. Sie sind der Frage nachgegangen, warum der HGF-Rezeptor diesen Effekt bewirkt, der EGF-Rezeptor dagegen nicht, obwohl beide Rezeptoren Gab1 zu binden vermögen. Die Antwort besteht darin, daß HGF eine anhaltende, EGF dagegen eine transiente Tyrosinphosphorylierung von Gab1 bewirkt. So kann nur die HGF-Stimulation eine dauerhafte Assoziation zwischen PLC- $\gamma$  und Gab1 bewirken, die essentiell für die Tubulogenese-Antwort ist (Gual et al., 2000).

Es gibt zusätzliche Beispiele dafür, daß die Dauer der Aktivierung einer Signalkaskade entscheidend für die physiologische Antwort ist. So führt die EGF-Stimulation von PC12-Zellen zu einer transienten Aktivierung der MAPK-Kaskade und zum Zellwachstum, während die durch NGF-hervorgerufene, langanhaltende Aktivierung derselben Signalkaskade die Differenzierung der PC12-Zellen bewirkt (Marshall, 1995; Traverse et al., 1993).

Gab1 spielt nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion des c-Met-Rezeptors. Das zeigte der erst vor kurzem ermittelte Phänotyp von Gab1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Gab1-Null-Mutanten sterben während der Embryonalentwicklung; sie unterscheiden sich durch Plazenta-Defekte und eine verringerte Lebergröße von Wildtyp-Mäusen (Sachs et al., 2000). Dieser Phänotyp stimmt mit dem von c-Met<sup>-/-</sup>- bzw. von HGF<sup>-/-</sup>-Mäusen überein. Außerdem wurde in Gab1<sup>-/-</sup>-Mutanten eine reduzierte und verspätete Migration von myogenischen Vorläuferzellen zu ihren Zielorten, z.B. ins Zwerchfell oder in die Extremitäten, festgestellt. Das stellt einen Unterschied zum Phänotyp der c-Met<sup>-/-</sup>- bzw. der HGF<sup>-/-</sup>-Mutanten dar; bei diesen war die Migration von Muskel-Vorläuferzellen ins Zwerchfell und in die Extremitäten komplett blockiert. Es ist offensichtlich, daß c-Met in der Lage ist, selbst in Abwesenheit von Gab1 manche Signale zu übertragen. Sachs et al. (2000) wiesen auf die Existenz zusätzlicher c-Met-Bindungsproteine hin, deren Signale zur Migration von Muskelvorläuferzellen beitragen. Somit stimmen die Daten *in vivo* mit denen *in vitro* überein: Gab1 ist für die c-Met-spezifische Signaltransduktion notwendig, aber nicht ausreichend.

### **5.3 Identifizierung und Charakterisierung der c-Met-Bindungsstellen von SHIP-1, PI 3'-Kinase und Grb2; Vergleich mit den Bindungsstellen dieser Effektoren innerhalb anderer Rezeptortyrosinkinasen**

Wie bereits beschrieben, wurde durch verschiedene Methoden (Hefe-Zwei-Hybrid-System, GST-Bindungsexperimente, Co-Immunpräzipitationsstudien) gezeigt, daß die Bindung von SHIP-1 an c-Met über dessen SH2-Domäne und Phosphotyrosinreste des Rezeptors erfolgt.

Zur Ermittlung der SHIP-1-Bindungsstelle innerhalb von c-Met wurden relevante zytoplasmatische Tyrosinreste des Rezeptors, darunter charakterisierte Bindungsstellen für bekannte c-Met-Effektoren, zu Phenylalanin mutiert. Anschließend wurden die generierten

## Diskussion

Y/F-Mutanten zusammen mit Wildtyp-c-Met im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion mit SHIP-1 getestet. Auf diese Weise wurde gezeigt, daß SHIP-1 vorwiegend mit einem der beiden phosphorylierten Tyrosinreste (pY1356) innerhalb der Multisubstrat-Bindungsstelle assoziiert.

Auf die oben beschriebene Weise wurde zusätzlich die Bindungsstelle der PI 3'-Kinase innerhalb von c-Met ermittelt. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Ponzetto et al., 1994) war die p85-Untereinheit der PI 3'-Kinase in der Lage, mit beiden Phosphotyrosinresten der c-Met-Multisubstratbindungsstelle zu assoziieren.

Für die Bindung der SH2-Domänen von PI 3'-Kinase ist die Konsensussequenz YXXM notwendig (Songyang et al., 1993). Beide Tyrosinreste innerhalb der Multisubstrat-Bindungsstelle (Y1349VHVNATY1356VNV) von c-Met und ihre nachfolgenden Aminosäuren unterscheiden sich von dieser Konsensussequenz. Das kann der Grund für die beobachtete geringe Bindungsaffinität von PI 3'-Kinase an c-Met sein. Sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch in GST-Bindungsstudien war die Bindungsstärke von PI 3'-Kinase an c-Met geringer als die von Gab1, SHIP-1 oder Grb2 an denselben Rezeptor (s. auch Diskussion zu Kompetitionsstudien, Abschnitt 5.4).

Die PI 3'-Kinase ist an der Signaltransduktion vieler aktivierter Rezeptortyrosinkinasen beteiligt; neben c-Met sind z.B. auch c-Fms, c-Kit oder der Insulin-Rezeptor in der Lage, direkt an die p85-Untereinheit zu binden (Reedijk et al., 1992; Herbst et al., 1995; Levy-Toledano et al., 1994). Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, verfügen die PI 3'-Kinase-Bindungsstellen aller drei Rezeptoren über die Konsensussequenz YXXM, die für die Bindung der SH2-Domänen der p85-Untereinheit notwendig ist (Songyang et al., 1993).

Tabelle 2: Vergleich der Konsensussequenzen der Bindungsstellen von PI 3'-Kinase, SHIP-1 und Grb2 innerhalb verschiedener Rezeptortyrosinkinasen; (\*): Literaturhinweis

Rezeptor-tyrosinkinase	PI 3'-Kinase-Bindungsstelle	Grb2-Bindungsstelle	SHIP-1-Bindungsstelle
c-Met	YVHV (127) YVNV (127)	YVNV (127; 161)	YVNV
c-Fms	YVEM (132)	YKNI (176) YTNL (95)	?
c-Kit	YMDM (59)	YKNL (168) YSNL (168)	-
Insulinrezeptor	YHTM (86)	?	-

Bei der Signaltransduktion dieser drei Rezeptoren besteht die Rolle der PI 3'-Kinase-Kaskade hauptsächlich darin, die Zellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu schützen. Die erwähnte PI 3'-Kinase-Kaskade ist gut charakterisiert: das Signal wird über das Protein Akt an das apoptotische Protein BAD weitergeleitet; dieses ist daraufhin nicht mehr in der Lage, an die apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> zu binden. Freivorliegend senden diese Proteine dann Proliferationssignale in den Zellkern (Zha et al., 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zusätzlich erwiesen, daß das Adaptorprotein Grb2 mit dem phosphorylierten c-Met-Rezeptor wechselwirkt.

Über Messungen mit verschiedenen Y/F-Met-Mutanten innerhalb des GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnte die Grb2-Bindungsstelle innerhalb von c-Met auf den phosphorylierten Tyrosinrest pY1356 festgelegt werden. Für eine Grb2-Bindungsstelle muß ein phosphorylierbarer Tyrosinrest in der Konsensussequenz YXNX stehen (Songyang et al., 1994). Aus diesem Grund assoziiert Grb2 selektiv mit nur einem der beiden Tyrosinreste innerhalb der Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met, da dem anderen Tyrosinrest ein korrekt positionierter, für die Bindung essentieller Asparaginrest fehlt.

Das Adaptorprotein Grb2 interagiert direkt oder indirekt mit einer Vielzahl von Rezeptoren, z.B. mit c-Fms (van de Geer & Hunter, 1993; Mancini et al., 1997), c-Kit (Thommes et al., 1999) oder dem PDGF-Rezeptor (Arvidsson et al., 1994). Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, verfügen alle Grb2-Bindungsstellen über die erforderliche Konsensussequenz YXNX.

### **5.3.1 Grb2 und SHIP-1 haben eine identische Bindungsstelle innerhalb des c-Met-Rezeptors. Gilt das auch für andere Signalmoleküle, die beide Proteine zu binden vermögen?**

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die SH2-Domänen von Grb2 und SHIP-1 selektiv an den Phosphotyrosinrest pY1356 von c-Met binden. Das warf die Frage auf, ob auch andere aktivierte Rezeptortyrosinkinasen identische Bindungsstellen für die beiden Signalproteine besitzen.

Der aktivierte M-CSF-Rezeptor c-Fms assoziiert sowohl mit Grb2 als auch mit SHIP-1. Allerdings gibt es innerhalb von c-Fms unterschiedliche Bindungsstellen für die beiden

Proteine. Grb2 bindet an Y696 (Y696KNI) (van der Geer & Hunter, 1993) und an Y921 (Y921TNL) (Mancini et al., 1997). Die Mutation dieser beiden Tyrosinreste zu Phenylalanin hatte im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System keinen Einfluß auf die SHIP-1/c-Fms-Assoziation (Daten nicht gezeigt), d.h. keine der beiden Phosphotyrosine stellt die SHIP-1-Bindungsstelle dar. Das bedeutet, daß auch die zweite Position innerhalb des Konsensusmotivs YXNX entscheidend für die Bindung der SH2-Domänen von SHIP-1 und Grb2 ist.

Interessanterweise gibt es innerhalb des Adaptorproteins Shc eine identische Bindungsstelle für SHIP-1 und Grb2. Es handelt sich um den Phosphotyrosinrest pY317, der in der Konsensussequenz YVNV steht (Wada et al, 1999). Diese ist vollkommen identisch mit der Aminosäurenabfolge der entsprechenden SHIP-1-Bindungsstelle innerhalb von c-Met, was einen Hinweis darauf gibt, daß die für die Bindung der SH2-Domäne von SHIP-1 erforderliche Konsensussequenz „YVNV“ lautet.

### **5.4 Die Signalmoleküle PI 3'-Kinase, SHIP-1, Gab1 und Grb2 binden *in vitro* nicht gleichzeitig, sondern sequentiell an die Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met**

Alle bisher identifizierten c-Met-Wechselwirkungspartner binden an dessen einzige Multisubstrat-Bindungsstelle (Y1349VHVNATY1356VNV), die zwei Phosphotyrosine enthält. Diese stellen die einzigen regulatorischen Autophosphorylierungsstellen innerhalb des c-Met-Rezeptors dar. Die multiple Substratbindungsstelle ist für die Übertragung der c-Met-Signale essentiell; „Knock-In“-Mausmutanten, bei denen die zwei Tyrosinreste durch Phenylalanin ersetzt wurden, zeigten denselben Phänotyp wie c-Met-Null-Mutanten (Maina et al., 1996).

Die meisten anderen Rezeptortyrosinkinase, z.B. c-Fms, c-Kit, TrkA, der EGF- und der PDGF-Rezeptor, besitzen dagegen viele verschiedene Autophosphorylierungsstellen, die mit unterschiedlichen Effektoren assoziieren können. Diese Tatsache legt nahe, daß ein einziges Rezeptormolekül in der Lage ist, gleichzeitig mit vielen verschiedenen Effektormolekülen zu wechselwirken und auf diese Weise mehrere Signalkaskaden gleichzeitig zu aktivieren.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die Multisubstrat-Bindungsstelle von c-Met ebenfalls gleichzeitig mit diversen Signalmolekülen zu assoziieren vermag. Deswegen wurden mit dem *in vitro* phosphorylierten c-Met und den

Effektormolekülen PI 3'-Kinase, SHIP-1, Gab1 und Grb2 verschiedene GST-Bindungs- und Kompetitionsstudien durchgeführt. Die vier c-Met-interagierenden Proteine wurden wechselweise als GST-Substrat oder als His6-gekoppelter Kompetitor eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß c-Met jeweils ein einziges Effektorprotein *in vitro* binden kann. Wenn zwei Effektorproteine gleichzeitig anwesend waren, wurde nur eins, nämlich das mit der größeren Bindungsaffinität, von c-Met gebunden. Die getesteten Proteine zeigten folgende Hierarchie der Bindungsaffinitäten an c-Met *in vitro*: Grb2>Gab1>SHIP-1>PI 3'-Kinase.

Dieses Ergebnis deutet an, daß die Reihenfolge, in der die Effektormoleküle *in vivo* an c-Met binden, eine Schlüsselrolle bei der c-Met-abhängigen Signaltransduktion spielt. Das heißt, daß die c-Met-spezifischen zellulären Antworten, z.B. die Tubulogenese von Epithelzellen, womöglich nicht durch eine koordinierte Aktivierung und die Integration verschiedener Signalwege erfolgen, sondern eher auf die Anwesenheit spezifischer Effektoren zurückzuführen sind.

Auf der anderen Seite muß man bei der Interpretation der *in vitro* Kompetitionsstudien beachten, daß diese nicht mit vollständigen Proteinen, sondern mit Proteinfragmenten durchgeführt wurden. Bei der *in vivo*-Assoziation von Proteinen voller Länge spielen ihre allosterischen Wechselwirkungen zusätzlich eine wichtige Rolle. Diese Wechselwirkungen könnten z.B. zur Entstehung von Multiprotein-Komplexen beitragen, so daß verschiedene Effektormoleküle gleichzeitig an den aktivierten Rezeptor rekrutiert werden könnten.

### **5.5 Die Rolle von SHIP-1 bei der Übermittlung der HGF-induzierten Zellproliferation, Zellstreuung sowie der Tubulogenese von Epithelzellen**

Ursprünglich wurde SHIP-1 als wichtiges Signalmolekül im hämatopoetischen Zellsystem identifiziert (Lioubin et al., 1996; Damen et al., 1996). Es wurde gezeigt, daß SHIP-1 nach der Stimulation hämatopoetischer Zellen mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen an Tyrosinresten phosphoryliert wird und daraufhin mit Shc (Lamkin et al., 1997), mit Grb2 (Jefferson et al., 1997) oder mit SHP-2 (Liu et al., 1997) assoziiert.

Wie aus Abbildung 4.2 ersichtlich, verfügt SHIP-1 über eine N-terminale SH2-Domäne (Schaffhausen, 1995); diese wird durch ungefähr 300 Aminosäuren mit undefinierter Funktion von der zentralen, 400-500 Aminosäuren langen katalytischen Domäne getrennt. Der carboxyterminale Teil umfaßt etwa 350 Aminosäuren und enthält 2 NPXY-Motive, die

potentielle Bindungsstellen für PTB-Domänen enthaltende Proteine darstellen, sowie einige prolinreiche Motive, die als Bindungsstellen für Proteine mit SH3-Domänen dienen können. Durch seine enzymatische Aktivität entfernt SHIP-1 den 5'-Phosphatrest selektiv aus den Phospholipiden PI(3,4,5)P<sub>3</sub> und I(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Damen et al., 1996; Lioubin et al., 1996).

Diese strukturellen und katalytischen Eigenschaften weisen auf ein einzigartiges Protein hin, das seine funktionelle Rolle durch die nachgeschalteten Protein-Protein-Wechselwirkungen und/oder durch seine enzymatische Aktivität ausüben kann. Das heißt, SHIP-1 kann verschiedene Signalwege auf zwei unterschiedliche Weisen regulieren: einerseits durch Interaktion mit zahlreichen nachgeschalteten Bindungsproteinen, andererseits durch direkte Beteiligung am Phosphoinositolphosphat-Metabolismus.

Die Tatsache, daß die 3'-Position im Inositolring der SHIP-1 Substrate phosphoryliert sein muß, deutet an, daß PI 3'-Kinase und SHIP-1 sequentiell im Phosphoinositid-Signalweg agieren. Es wurde gezeigt, daß SHIP-1 zur negativen Regulation der durch PI 3'-Kinase-Aktivierung vermittelten biologischen Effekte in hämatopoetischen Zellen beiträgt. Die Überexpression von SHIP-1 in myeloischen Zellen inhibiert das durch IL-3 und M-CSF induzierte Zellwachstum (Lioubin et al., 1996). Zusätzlich zur Mitogenese werden auch andere von PI 3'-Kinase induzierte zelluläre Effekte durch SHIP-1 herunterreguliert, darunter die Zelltransformation, der Schutz vor Apoptose oder Änderungen der Zytoskelett-Organisation (Chacko et al., 1996; Ono et al., 1996; Kiener et al., 1997; Vollenweider et al., 1999).

Die 5'-Phosphatase-Aktivität von SHIP-1 wird weder durch Tyrosinphosphorylierung noch durch Interaktion mit Adaptorproteinen reguliert. Dagegen ist die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran kritisch für seine katalytische Aktivität. Es wurde gezeigt, daß das zytoplasmatische SHIP-1 im hämatopoetischen Zellsystem in Folge der Stimulation mit Wachstumsfaktoren phosphoryliert und daraufhin zur Plasmamembran transportiert wird, was zur Stimulierung der enzymatischen Aktivität führt (Phee et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, haben die Daten dieser Arbeit eindeutig gezeigt, daß SHIP-1 auch im Epithelzellsystem exprimiert wird und daß SHIP-1 und c-Met in HGF-stimulierten MDCK-Zellen unter physiologischen Bedingungen miteinander wechselwirken. Bei der Fortführung der Arbeit galt es, die generelle Bedeutung des SHIP-1-Moleküls bei der Vermittlung c-Met-abhängiger zellulärer Antworten zu untersuchen. Es wurde überprüft, ob die c-Met/SHIP-1-Wechselwirkung für HGF-induzierte Effekte in Epithelzellen, z.B.

Mitogenese, Migration und tubuläre Morphogenese, von entscheidender Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurde das komplette SHIP-1-Protein in MDCK-Zellen überexprimiert.

### 5.5.1 SHIP-1 hat keinen Einfluß auf die HGF-induzierte Proliferation und Streuung von MDCK-Zellen

Die Überexpression von SHIP-1 hatte keine Auswirkung auf die DNA-Syntheserate in MDCK-Zellen. In Bezug auf den Thymidin-Einbau ließen sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen nachweisen. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß die HGF-induzierte mitogene Grb2-MAPK-Kaskade von SHIP-1 nicht beeinflusst wird. Allerdings sind für genauere Schlußfolgerungen in dieser Richtung weitere Untersuchungen notwendig, die z.B. den Aktivierungsgrad von Ras-, Raf-1- und MAPK-Proteinen in Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen betreffen.

Die Daten in dieser Arbeit stimmen mit denen von Lioubin et al. (1996) überein: die exogene Expression des SHIP-1-Proteins in NIH 3T3-Fibroblasten hatte keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Zellen.

Der HGF-induzierte „Scattering“-Effekt von MDCK-Zellen blieb von der SHIP-1-Überexpression ebenfalls unbeeinflusst.

Auf Plastik-Gewebekulturschalen bilden subkonfluente MDCK-Zellen zusammenhängende Kolonien (sog. Zellinseln) aus relativ flachen, abgerundeten Zellen. Die lateralen Membranen dieser Zellen stehen durch „Tight junctions“, „Zonula adhaerens“ und Desmosomen in direktem Kontakt miteinander. In MDCK-Zellen sind die Proteine von „Tight junctions“ und „Zonula adhaerens“ an Aktinfilamente gekoppelt, während desmosomale Proteine mit Intermediärfilamenten in Verbindung stehen. Es ist offensichtlich, daß die Zellstreuung mit der Destabilisierung dieser Zellkontaktstrukturen (Royal & Park, 1995) und mit der Reorganisation des Zytoskeletts einhergeht.

Die Zugabe von HGF/SF zu MDCK-Zellen bewirkt, daß die Zellen sich aus den Inseln ablösen (innerhalb 2-3 Stunden), dissoziieren (innerhalb 4-6 Stunden), eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie bekommen und anschließend, nach etwa 6-stündiger HGF-Stimulation, anfangen zu wandern (Dowrick et al., 1993).

Es wurde gezeigt, daß PI 3'-Kinase- und Rho-abhängige Signalwege für die Streuung von MDCK-Zellen essentiell sind (Royal & Park, 1995; Takaishi et al., 1994; Ridley et al.,

1995). Die PI 3'-Kinase kann mit dem kleinen G-Protein Rac interagieren und dieses dadurch aktivieren, was zu einer erhöhten Lamellipodien-Ausbildung und damit zur Zellbewegung beiträgt. Rho reguliert den Auf- und Abbau von Streßfasern und Fokalkontakten und ist dadurch entscheidend in der Zellstreuung involviert.

SHIP-1 hat keinen direkten Einfluß auf das Zellstreuverhalten von MDCK-Zellen: SHIP-1-überexprimierende MDCK-Zellen wiesen in Anwesenheit von HGF/SF bezüglich Dissoziation und Wanderung keine Veränderungen gegenüber Wildtyp-MDCK-Zellen auf. In der frühen Stimulationsphase mit HGF/SF zeigten sich in Bezug auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts ebenfalls keine erheblichen Unterschiede zwischen Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen.

Das bedeutet, daß SHIP-1 nicht in die PI 3'-Kinase- und Rho-abhängigen Signalwege in MDCK Zellen eingreift, was im Widerspruch zu den Daten aus dem hämatopoetischen Zellsystem steht. Lioubin et al. (1996), Liu et al. (1997) und Vollenweider et al. (1999) zeigten, daß SHIP-1 die durch PI 3'-Kinase vermittelten Effekte wie z.B. die Mitogenese, den Schutz vor Apoptose und die Reorganisation von Aktinfilamenten negativ reguliert.

### **5.5.2 Die Interaktion von SHIP-1 mit c-Met trägt entscheidend zur Übermittlung der Tubulogenese-Antwort in MDCK-Zellen bei**

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben eindeutig erwiesen, daß die direkte Interaktion der Inositol 5'-Phosphatase SHIP-1 mit dem c-Met-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Übermittlung der HGF-induzierten Tubulogenese-Antwort in MDCK-Zellen spielt. SHIP-1-überexprimierende, im Kollagengel kultivierte MDCK-Zellen, antworteten auf die HGF/SF-Stimulation viel schneller und viel intensiver als Wildtyp-MDCK-Zellen. Während Wildtyp-Zellen erst nach 7-tägiger HGF-Behandlung Tubuli innerhalb der Kollagenmatrix bildeten, wurden bei den SHIP-1-überexprimierenden Zellen bereits 24 Stunden nach der HGF-Stimulation röhrenartige, stark verzweigte Strukturen beobachtet. Wie bereits erwähnt, ist die Tubulogenese eine c-Met-spezifische Antwort. Sie geht mit komplexen morphologischen Veränderungen einher und durchläuft mehrere Phasen. Das von Pollack et al. (1998) entwickelte Modell für die Morphogenese von Tubuli aus polarisierten, in Kollagengelen kultivierten MDCK-Zellen beschreibt folgende Stadien (s. auch Abbildung 5.1):

## Diskussion

- A: Bildung von runden Zysten in Abwesenheit von HGF/SF;
- B: Knospung: einzelne Zellen aus der Zyste durchdringen die Kollagenmatrix;
- C: Ketten-Bildung;
- D: Strang-Bildung;
- E: Bildung von Tubuli mit durchgehendem, flüssigkeitsgefülltem Lumen.

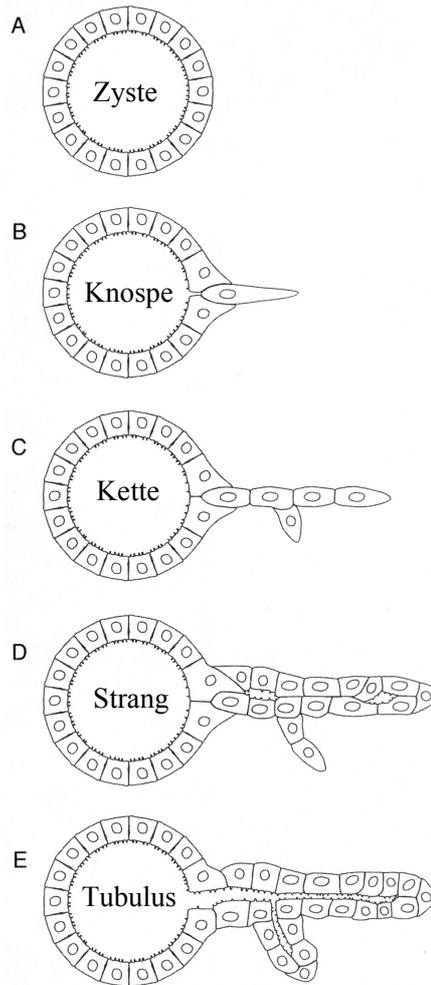


Abbildung 5.1: Modell für die *in vitro* Morphogenese von Tubuli (nach Pollack et al., 1998). Dieser komplexe Prozeß durchläuft mehrere, morphologisch gut voneinander unterscheidbare Stadien. Mikrovilli werden als kleine, ins Lumen ragende Membranausstülpungen dargestellt.

Sowohl die anfänglichen Zysten als auch die End-Tubuli bestehen aus polarisierten Zellen; ihre apikale Oberfläche befindet sich in der Nähe des Lumens, während die basolaterale Oberfläche in Kontakt mit der Kollagenmatrix steht. Während sie die Zwischenstadien durchlaufen, verlieren die Epithelzellen ihre Polarität. Sie bleiben aber die ganze Zeit miteinander in Zell-Zell-Kontakt (Pollack et al., 1998). Diese Beobachtungen

widersprechen einer früheren Hypothese, welche postulierte, daß sich die Zysten-bildenden Zellen voneinander lösen und als Einzelzellen durch die Kollagenmatrix wandern, bevor sie sich zu Tubuli umorganisieren.

Das spricht dafür, daß die Zellstreuung und die Tubulogenese sich in ihrem Ablauf grundsätzlich voneinander unterscheiden. Insofern ist es nicht verwunderlich, daß die SHIP-1-Überexpression selektiv lediglich die Tubulogenese, aber nicht beide Antworten beeinflusst; und das, obwohl beide HGF-Effekte an massive Zytoskelett-Umordnungen gekoppelt sind. Das kann auch durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen erklärt werden. In einer dreidimensionalen Kollagenmatrix ist die Anzahl bzw. die subzelluläre Verteilung wichtiger Signalmoleküle anders als unter zweidimensionalen Kulturbedingungen auf Plastik-Gewebekulturschalen.

Für die Tubulogenese-Antwort sind Wechselwirkungen von Zellen mit der extrazellulären Matrix essentiell. Manche Matrixproteine, z.B. Kollagen I und Laminin, favorisieren die Tubulogenese-Antwort, während andere Komponenten der extrazellulären Matrix, z.B. Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan und Vitronektin, dieselbe Antwort inhibieren (Santos & Nigam, 1993). Das bedeutet, daß die Tubulogenese-Antwort über Änderungen der Matrixzusammensetzung entscheidend reguliert werden kann.

### 5.5.2.1 Der durch SHIP-1-Überexpression modulierte Phosphoinositid-Metabolismus in MDCK-Zellen reguliert ihre HGF-induzierte Tubulogenese-Antwort

Bei der Fortführung dieser Arbeit galt es, den Mechanismus herauszufinden, durch den die SHIP-1-Überexpression die Tubulogenese von Epithelzellen beschleunigt.

Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Tubulogenese-Antwort von SHIP-1-überexprimierenden Zellen besteht darin, daß durch die Anwesenheit großer Mengen von SHIP-1 und der Bindung dessen SH2-Domäne an den aktivierten c-Met-Rezeptor Bindungsstellen für andere, eventuell Tubulogenese-inhibierende Proteine nicht mehr zugänglich sind. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die SH2-Domäne von SHIP-1 in MDCK-Zellen exprimiert; die Transfektanten zeigten keine Tubulogenese-Antwort auf die HGF-Stimulation. Das führte zu der Schlußfolgerung, daß die Besetzung der c-Met-Bindungsstellen durch SHIP-1 und die eventuelle Verdrängung anderer c-Met-bindender Proteine nicht entscheidend für die Potenzierung der Tubulogenese ist.

## Diskussion

---

SHIP-1 könnte seine funktionelle Rolle in der Tubulogenese auch über seine enzymatische Aktivität ausüben. Demnach stellt sich die Frage, ob die beobachtete Beschleunigung der Tubulogenese-Antwort auf die gesteigerte zelluläre Inositol-Phosphatase-Aktivität, die die Überexpression des Proteins mit sich bringt, zurückzuführen ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine katalytisch inaktive Mutante von SHIP-1 in MDCK-Zellen exprimiert und auf ihren Einfluß auf die Tubulogenese-Antwort untersucht. Die Abwesenheit der katalytischen Aktivität führte zur Hemmung der Tubulogenese. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Regulation des Phosphoinositid-Metabolismus durch SHIP-1 entscheidend für die Modulation der Tubulogenese-Antwort ist.

Phosphoinositide spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung zellulärer Funktionen. Weniger als 0,25 % davon sind an Position 3 des Inositolringes phosphoryliert (dagegen 5 % PI(4)P und 5 % PI(4,5)P<sub>2</sub>), was darauf hinweist, daß diese Phospholipide entscheidende regulatorische Funktionen in der Zelle ausüben (Rameh & Cantley, 1999). Studien von Kong et al. (1997), Li et al. (1997) und Steck et al. (1997) haben gezeigt, daß die Amplifikation von PI 3'-Kinase und eine funktionell inaktive Inositol-3'-Phosphatase PTEN in vielen menschlichen Tumoren gefunden werden. Das heißt, daß die Regulation des PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Spiegels für die Kontrolle vieler biologischen Prozesse *in vivo* - einschließlich der Tumorigenese - kritisch ist.

Durch seine durch Plasmamembran-Lokalisation regulierte enzymatische Inositol-5'-phosphatase-Aktivität (Phee et al., 2000) kontrolliert das SHIP-1-Protein den zellulären PI(3,4,5)P<sub>3</sub>/PI(3,4)P<sub>2</sub>-Spiegel, der entscheidend für viele physiologische Antworten ist (Damen et al., 1996; Lioubin et al., 1996). Diese beiden Phosphoinositide fungieren als sekundäre Botenstoffe in der Zelle; das bedeutet, daß ihr Metabolismus durch verschiedene Mechanismen streng reguliert werden muß.

Viele wichtige Signalproteine binden über ihre PH-Domänen bzw. über ihre SH2-Domänen an diese Phospholipide und werden dadurch aktiviert (Review-Artikel, Rameh & Cantley, 1999). Abbildung 5.2 faßt einige bekannte Wechselwirkungen zwischen Phosphoinositiden und ihren Bindungsproteinen zusammen und weist auf die dadurch vermittelten zellulären Antworten hin.

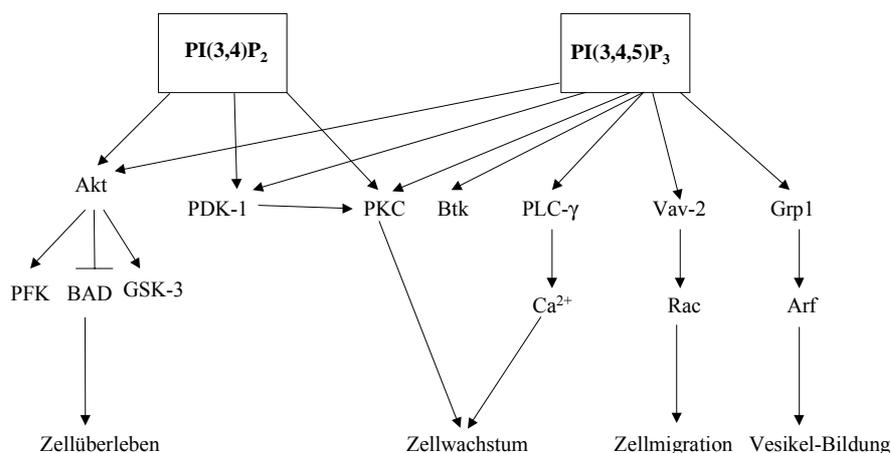


Abbildung 5.2: Signalübertragung über die Phosphoinositide PI(3,4)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> und ihre Bindeproteine (nach Rameh & Cantley, 1999). PFK: Phosphofruktokinase; GSK-3: Glykogensynthasekinase 3; Btk: Bruton's Kinase; Grp1: „General receptor for phosphoinositides“; PKC: Proteinkinase C.

Der durch SHIP-1 regulierte Phosphoinositid-Metabolismus spielt eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung wichtiger zellulärer Antworten in Thrombozyten. In Thrombin-stimulierten Blutplättchen wird SHIP-1 an Tyrosinresten phosphoryliert und durch Translokation an die Plasmamembran katalytisch aktiviert, was mit der Akkumulation von PI(3,4)P<sub>2</sub> korreliert (Giuriato et al., 1997). PI(3,4)P<sub>2</sub> spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts in Thrombozyten: es inhibiert die Trennung und das sog. „Capping“ von Aktinfilamenten (Hartwig et al., 1996). Außerdem trägt PI(3,4)P<sub>2</sub> zur dauerhaften Aktivierung von Integrin in stimulierten Thrombozyten bei (Giuriato et al., 1997). Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen die Aussage zu, daß SHIP-1 eine wichtige Rolle bei der dynamischen Organisation/Reorganisation des Zytoskeletts spielt, die für Morphogenese-Prozesse notwendig ist. Die beobachtete Aktivierung von Integrin-Signalwegen durch PI(3,4)P<sub>2</sub> stellt eine Verbindung zwischen SHIP-1 und der extrazellulären Matrix her; die oben angeführten Punkte sind alle Faktoren, die bei der Übermittlung der Tubulogenese-Antwort eine Rolle spielen.

Integrine vermitteln Wechselwirkungen von Zellen mit der extrazellulären Matrix. Sie stehen in Kontakt mit Proteinen des Zytoskeletts und regulieren dadurch Zellverteilung, Migration, Differenzierung, Zellüberleben und Morphogenese.

## Diskussion

Wie bereits erwähnt, spielt die Zusammensetzung der Matrix eine essentielle Rolle für die Tubulogenese-Antwort *in vitro* (Barros et al., 1995). Es ist durchaus denkbar, daß  $PI(3,4)P_2$  *in vivo* zur differentiellen Expression bestimmter Integrine sowie bestimmter Proteine der extrazellulären Matrix führt und dadurch die Tubulogenese in diversen Geweben reguliert. Da die Tubulogenese ein Durchbrechen der Matrix beinhaltet, könnte auch eine durch  $PI(3,4)P_2$  verursachte gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteasen diese Antwort modulieren.

### 5.6 Modell für die Rolle von SHIP-1 bei der Vermittlung der HGF-induzierten Morphogenese von MDCK-Zellen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen kann mit Hilfe der in dieser Arbeit vorliegenden Daten folgendes Modell für die HGF-induzierte Tubulogenese-Antwort aufgestellt werden:

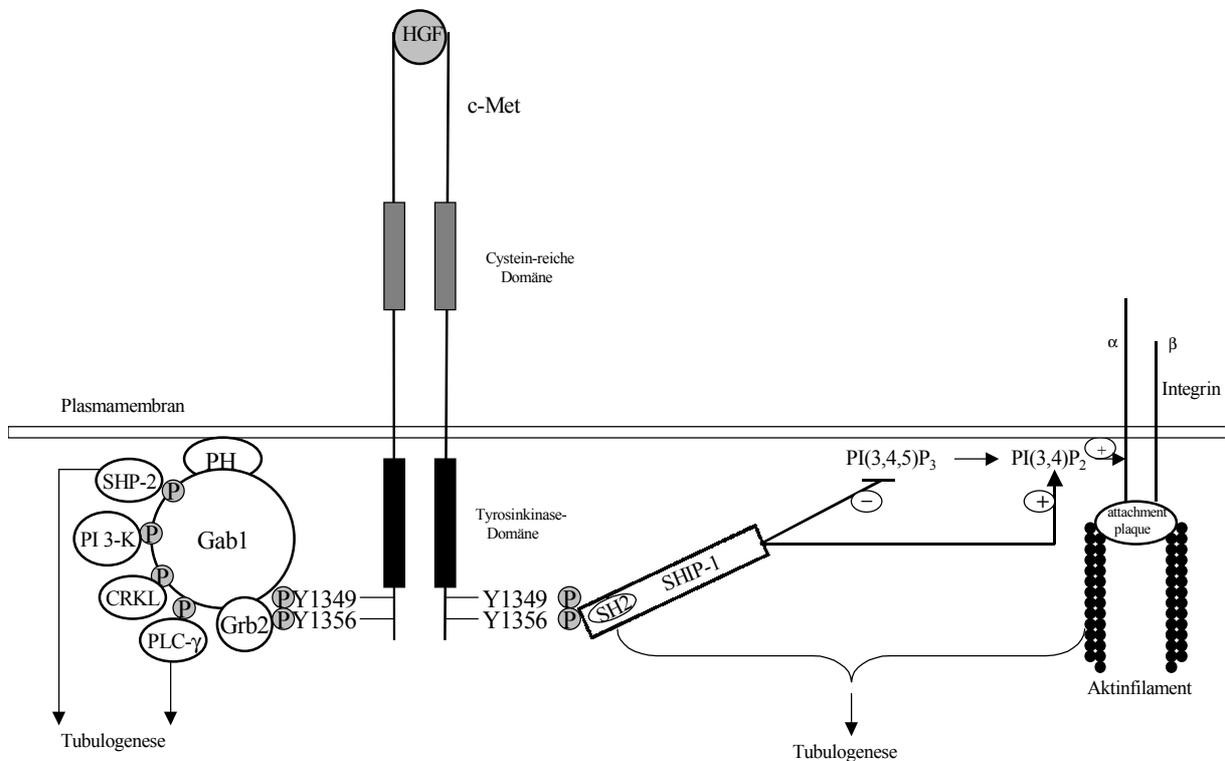


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung wichtiger Signalwege für die HGF-induzierte Tubulogenese von MDCK-Zellen (Erläuterungen im Text)

## Diskussion

---

Zusammenfassend legen die innerhalb dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse nahe, daß die HGF-induzierte Morphogenese von Epithelzellen in Kollagenmatrix zum Teil über eine Signalkaskade verläuft, die vom PI(3,4,5)P<sub>3</sub>/PI(3,4)P<sub>2</sub>-Spiegel in der Zelle reguliert wird. Grundlegend für diese Kaskade ist die HGF-induzierte Bindung der zytoplasmatischen Inositol-5'-Phosphatase SHIP-1 an den Phosphotyrosinrest pY1356 des c-Met-Rezeptors, deren Translokation an die Plasmamembran und die damit gekoppelte Aktivierung der enzymatischen Funktion. Durch die damit verbundene Steigerung des PI(3,4)P<sub>2</sub>-Spiegels in der Zelle kommt es potentiell zu einer Aktivierung des Integrinrezeptors, der eine Verbindung zwischen der Kollagenmatrix und dem Aktinzytoskelett der Zelle herstellt. An den zytoplasmatischen Domänen des Integrinrezeptors bilden sich nach dessen Aktivierung große Proteinkomplexe (sog. „attachment plaques“) aus FAK („focal adhesion kinase“), Vinculin, Talin,  $\alpha$ -Aktinin, Paxillin und VASP. An diesen Komplexen setzen Aktinfilamente an. Deren dynamische Organisation/Reorganisation während der tubulären Morphogenese könnte auf die beschriebene Weise von SHIP-1 gesteuert werden.

Zusätzlich zum neu beschriebenen (hypothetischen) Signalweg gibt es andere Protein-Protein-Wechselwirkungen, die für die Übermittlung der Tubulogenese-Antwort in MDCK-Zellen essentiell sind. Eine zentrale Rolle darin spielt die Interaktion vom aktivierten c-Met mit dem Adaptorprotein Gab1, das das Hauptsubstrat von c-Met in MDCK-Zellen darstellt (Nguyen et al., 1997). Durch Bindung seiner PH-Domäne an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> wird das zytoplasmatische Gab1 an die Plasmamembran transportiert; die subzelluläre Lokalisation von Gab1 ist kritisch für eine effiziente Tubulogenese-Antwort (Maroun et al., 1999a, 1999b).

Nach dessen Phosphorylierung durch den aktivierten c-Met-Rezeptor assoziiert das Multiadaptorprotein Gab1 mit vielen Signalproteinen, z.B. mit PI 3'-Kinase, PLC- $\gamma$ , CRKL und SHP-2 (Holgado-Madruga et al., 1996; Maroun et al., 1999a; Sakkab et al., 2000; Schaeper et al., 2000). *In vitro*-Studien haben gezeigt, daß die Assoziation von Gab1 mit SHP-2 essentiell für die HGF-induzierte Tubulogenese von MDCK-Zellen ist (Schaeper et al., 2000). Dagegen ist die Wechselwirkung von Gab1 mit der PI 3'-Kinase nur für die Streuung von Epithelzellen notwendig (Khwaja et al., 1998). Entscheidend für die Tubulogenese-Antwort von MDCK-Zellen ist auch eine anhaltende Assoziation von PLC- $\gamma$  mit Gab1. Das ist einer der Gründe, warum die HGF-Stimulation von MDCK-Zellen die Bildung von Tubuli hervorruft, die EGF-Stimulation dagegen nicht (Gual et al., 2000).

Maroun et al. (1999a) zeigten, daß die Phosphorylierung von Gab1 durch den aktivierten c-Met-Rezeptor zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Tubulogenese-Antwort ist

## Diskussion

---

und wiesen auf die Existenz zusätzlicher, bisher noch nicht identifizierter, c-Met-spezifischer Substrate hin, die für die Morphogenese von Epithelzellen kritisch sein könnten.

Eins dieser Substrate ist der im Rahmen dieser Arbeit neu ermittelte c-Met-Bindungspartner SHIP-1. SHIP-1 stellt ein vielseitiges Signalmolekül dar, das nicht nur - wie bisher gezeigt - die Apoptose und das Zellwachstum von Zellen reguliert, sondern auch Morphogenese-Prozesse steuert, indem es als Modulator des Zytoskeletts fungiert. Der molekulare Mechanismus, durch den die SHIP-1-Überexpression die Potenzierung der HGF-induzierten Tubulogenese-Antwort von MDCK-Zellen bewirkt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Fest steht aber, daß der durch SHIP-1 regulierte Phosphoinositid-Metabolismus bei der Umordnung/Umorganisation der Epithelzellen und der Bildung durchgehender, Lumen-beinhaltennder Tubuli innerhalb der Kollagenmatrix eine Schlüsselrolle spielt.

### 6. LITERATUR

1. Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. & Cohen, P. (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr. Biol.* 7, 261-269
2. Alexander, W.S., Starr, R., Metcalf, D., Nicholson, S.E., Farley, A., Elefanty, A.G., Brysha, M., Kile, B.T., Richardson, R., Baca, M., Zhang, J.G., Willson, T.A., Viney, E.M., Sprigg, N.S., Rakar, S., Corbin, J., Mifsud, S., DiRago, L., Cary, D., Nicola, N.A. & Hilton, D.J. (1999): Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 66, 588-592
3. Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R. & Hawkins, P.T. (1998): Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* 8, 684-691
4. Arvidsson, A.K., Rupp, E., Nanberg, E., Downward, J., Rönstrand, L., Wennström, S., Schlessinger, J., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. (1994): Tyr-716 in the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase insert is involved in Grb2 binding and Ras activation. *Mol. Cell Biol.*, 6715-6726
5. Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P. & Cantley, L.C. (1989): PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57, 167-175
6. Bar Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V. & Schlessinger, J. (1993): SH3 domain directed cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74, 83-91
7. Bardelli, A., Maina, F., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., Comoglio, P.M. & Ponzetto, C. (1992): Autophosphorylation promotes complex formation of recombinant growth factor receptor with cytoplasmic effectors containing SH2 domains. *Oncogene* 7, 1973-1978
8. Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M.C. & Comoglio, P.M. (1997): Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 15, 3103-3111
9. Barros, E.J.G., Santos, O.F.P., Matsumoto, K., Nakamura, T. & Nigam, S.K. (1995): Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: Implications for epithelial tissue development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4412-4416
10. Bartel, P. & Fields, S. (1995): Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 245, 241-263
11. Birchmeier, C., Meyer, D. & Riethmacher, D. (1995): Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. *Int. Rev. Cytol.* 160, 221-266
12. Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513

13. Birnboim, H.C. (1983): A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255
14. Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. & Birchmeier, C. (1995): Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature (London)* 375, 768-771
15. Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V. & Margolis, B. (1994): A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 32031-32034
16. Blair, D.G., Cooper, C.S., Oskarsson, M.K., Eader, L.A. & Vande Woude, G.F. (1982): New method for detecting cellular transforming genes. *Science* 218, 1122-1125
17. Boccaccio, C., Andò, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C. & Comoglio, P. M. (1998): Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature (London)* 391, 285-288
18. Booker, G.W., Breeze, A.L., Downing, A.K., Panayotou, G. & Gout, I. (1992): Structure of an SH2 Domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 358, 684-687
19. Bossmeyer, D. (1995): Protein kinase-structure and function. *FEBS Letters* 369, 57-61
20. Bottaro, D.O., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F. & Aaronson, S.A. (1991): Identification of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor as the c-met proto-oncogene. *Science* 251, 802-804
21. Brinkmann, V., Foroutan, H., Sachs, M., Weidner, K. M. & Birchmeier, W. (1995): Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 131, 1573-1586
22. Bussolino, F., Di Renzo, M.F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A. & Comoglio, P.M. (1992): Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* 119, 629-641
23. Cai, H., Szeberenyi, J. & Cooper, G.M. (1990): Effect of a dominant inhibitory H-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 10, 5314-5323
24. Chacko, G.W., Tridandapani, S., Damen, J.E., Liu, L., Krystal, G. & Coggeshall, K.M. (1996): Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosine phosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP. *J. Immunol.* 157, 2234-2238
25. Chen, W.S., Lazar, C.S., Poenie, M., Tsien, R.Y., Gill G.N. & Rosenfeld, M.G. (1987): Requirement for intrinsic protein-tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 328, 820-823
26. Cheng, K. & Koland, J.G. (1998): Nucleotide-binding properties of kinase-deficient epidermal-growth-factor-receptor mutants. *Biochem. J.* 330, 353-359

27. Cho, K.O., Hunt, C.A. & Kennedy, M.B. (1992): The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of *Drosophila* disc-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929-942
28. Chou, T.T., Dull, T.J., Russel, D.S., Gherzi, R., Lebowitz, D., Ullrich, A. & Rosen, O.M. (1987): Human insulin receptor mutated at the ATP binding site lacks protein tyrosine kinase activity and fails to mediate postreceptor effect of insulin. *J. Biol. Chem.* 262, 1842-1847
29. Clark, S.G., Stern, M.J. & Horvitz, H.R. (1992): *C. elegans* cell signalling gene sem 5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344
30. Cohen, A.W., Carbajal, J.M. & Schaeffer, R.C. Jr. (1999): VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Physiol.* 277, 2038-2049
31. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114
32. Collett, M.S. & Erikson, R.L. (1978): Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus Src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2021-2024
33. Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M. & Vande Woude, G.F. (1984): Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature (London)* 311, 29-34
34. Crews, C.M. & Erikson, R.L. (1993): Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 74, 215-217
35. Damen, J.E., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R.K., Jefferson, A.B., Majerus, P.W. & Krystal, G. (1996): The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1689-1693
36. De Clue, J.E., Sadowski, I., Martin, G.S. & Pawson, T. (1987): A conserved domain regulates interactions of v-fps protein-tyrosine kinase with the host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9064-9068
37. Dowrick, P., Kenworthy, P., McCann, B. & Warn, B. (1993): Circular ruffle formation and closure lead to micropinocytose in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 44-53
38. Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. & MacKinnon, R. (1996): Crystal structure of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076
39. Eck, M.J., Dhe-Paganon, S., Trub, T., Nolte, R.T. & Shoelson, S.E. (1996): Structure of IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 85, 695-705

40. Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M. & Weinberg, R.A. (1993): Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51
41. Erikson, R.L., Collett, M.S., Erikson, E. & Purchio, A.F. (1979): Evidence that the avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6260-6264
42. Faletto, D.L., Tsafarty, I., Kmiecik, T.E., Gonzatti, M., Suzuki, T. & Vande Woude, G.F. (1992): Evidence for non-covalent clusters of the c-met proto-oncogene product. *Oncogene* 7, 1149-1157
43. Feig, L.A. & Cooper, G.M. (1988): Inhibition of NIH3T3 cell proliferation by mutant Ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell Biol.* 8, 3235-3243
44. Fields, S. & Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246
45. Gey, G.O., Coffmann, W.D. & Kubicek, M.T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-268
46. Gherardi, E., Gray, J., Stoker, M., Perryman, M. & Furlong, R. (1989): Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 5844-5848
47. Gherardi, E (1991): Growth factors and cell movement. *Eur. J. Cancer* 27, 403-405
48. Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M.F., Cooper, C.S. & Comoglio, P.M. (1989): Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met proto-oncogene. *Nature* 339, 155-156
49. Giuriato, S., Payrastra, B., Drayer, L.A., Plantavid, M., Woscholski, R., Parker, P., Erneux, C. & Chap, H. (1997): Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 272, 26857-26863
50. Gliniak, B.C. & Rohrschneider, L.R. (1990): Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of the GM-CSF or multi-CSF. *Cell* 63, 1073-1083
51. Gonzatti-Haces, M., Seth, A., Park, M., Copeland, T., Oroszlan, S. & Vande Woude, G.F. (1988): Characterization of the tpr-met oncogene p65 and the met proto-oncogene cell surface p140 tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 21-25
52. Grant, D.S., Kleinman, H.K., Goldberg, I.D., Bhargava, M.M., Nickloff, B.J., Kinsella, J. L., Polverini, P. & Rosen, E.M. (1993): Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1937-1941
53. Graziani, A., Gramaglia, D., Cantley, L.C. & Comoglio, P.M. (1991): The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with

phosphatidyl-inositol-3 kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 22087-22090

54. Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. & Schreiber, R.D. (1995): Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2, 677-687

55. Gual, P., Giordano, S., Williams, T.A., Rocchi, S., Van Obberghen, E. & Comoglio, P.M. (2000): Sustained recruitment of phospholipase C- $\gamma$  to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* 19, 1509-1518

56. Hartmann, G., Weidner, M., Schwarz, H. & Birchmeier, W. (1994): The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of ras. *J. Biol. Chem.* 269, 21936-21939

57. Hartwig, J.H., Kung, S., Kovacsovics, T., Janmey, P.A., Cantley, L.C., Stossel, T.P. & Toker, A. (1996): D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 271, 32986-32993

58. Helling, R.B., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1974): Analysis of endonuclease R EcoRI-fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14: 1235-1244

59. Herbst, R., Shearman, M.S., Jallal, B., Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1995): Formation of signal transfer complexes between stem cell and platelet-derived growth factor receptors and SH2 domain proteins in vitro. *Biochemistry* 34, 5971-5979

60. Higashio, K., Shima, N., Goto, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H. & Morinaga, T. (1990): Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblasts and hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 397-404

61. Holgado-Madruga, M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K. & Wong, A.J. (1996): A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. *Nature* 379, 560-564

62. Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emlet, D.R., Dieterich, R. & Wong, A.J. (1997): Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12419-12424

63. Honegger, A.M., Dull, T.J., Felder, S., Van Obberghen, E., Bellot, F., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1987): Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. *Cell* 51, 199-209

64. Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L. & Hendrickson, W.A. (1994): Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746-754

65. Hubbard, S.R. (1997): Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16(18), 5572-5581

66. Hunter, T. & Sefton, M. (1980): Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1311-1313
67. Hunter, T. (1991): Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 200, 3-37
68. Hunter, T. (2000): Signaling-2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127
69. Ihle, J.N. (1995): Cytokine receptor signaling. *Nature* 377, 591-594
70. Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T. & Tsukita, S. (1993): The 220 kDa protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 121, 491-502
71. Jefferson, A.B., Auethavekiat, V., Pot, D.A., Williams, L.T. & Majerus, P.W. (1997): Signaling inositol polyphosphate-5-phosphatase. Characterization activity and effect of GRB2 association. *J. Biol. Chem.* 272, 5983-5988
72. Johnson, L.N., Noble, M.E.M. & Owen, D.J. (1996): Active and inactive protein tyrosine kinase: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158
73. Karin, M. & Hunter, T. (1995): Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757
74. Karlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A. & Czech, M.P. (1997): Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930
75. Kavanaugh, W.M. & Williams, L.T. (1994): An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266, 1862-1865
76. Kessler, S.W. (1976): Cell membrane antigen isolation with staphylococcal protein A antibody adsorbent. *J. Immun.* 117, 1482-1490
77. Khwaja, A., Lehmann, K., Marte, B.M. & Downward, J. (1998): Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 18793-18801
78. Khyse-Anderson, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels in a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biophys. Methods* 10, 203-209
79. Kiener, P.A., Lioubin, M.N., Rohrschneider, L.R., Ledbetter, J.A., Nadler, S.G. & Diegel, M.L. (1997): Co-ligation of the antigen and Fc receptors gives rise to the selective modulation of intracellular signaling in B cells. *J. Biol. Chem.* 272, 3838-3844
80. Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. & Pawson, T. (1991): SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668-674

## Literatur

---

81. Kong, D., Suzuki, A., Zou, T.T., Sakurada, A., Kemp, L.W., Wakatsuki, S., Yokoyama, T., Yamakawa, H., Furukawa, T., Sato, M., Ohuchi, N., Sato, S., Yin, J., Wang, S., Abraham, J.M., Souza, R.F., Smolinski, K.N., Meltzer, S.J. & Horii, A. (1997): PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat. Genet.* 17, 143-144
82. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
83. Lamkin, T.D., Walk, S.F., Liu, L., Damen, J.E., Krystal, G. & Ravichandran, K.S. (1997): Shc interaction with Src Homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) *in vivo* requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J. Biol. Chem.* 272, 10396-10401
84. Lecoq-Lafon, C., Verduer, F., Fichelson, S., Chretien, S., Gisselbrecht, S., Lacombe, C. & Mayeux, P. (1999): Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 93, 2578-2585
85. Leever, S.J., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. (1994): Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369, 411-414
86. Levy-Toledano, R., Taouis, M., Blaettler, D.H., Gorden, P. & Taylor, S.I. (1994): Insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells. *J. Biol. Chem.* 269, 31178-31182
87. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947
88. Lioubin, M.N., Algate, P.A., Tsai, S., Carlberg, K., Aebersold, A. & Rohrschneider, L.R. (1996): p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Develop.* 10, 1084-1095
89. Liu, L., Damen, J.E., Ware, M.D. & Krystal, G. (1997): Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *J. Biol. Chem.* 272, 10998-11001
90. Longley, B.J. Jr., Metcalf, D.D., Tharp, M., Wang, X., Tyrell, L., Lu, S.Z., Heitjan, D. & Ma, Y. (1999): Activating and dominant inactivating c-Kit catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1609-1614
91. Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. & Schlessinger, J. (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442
92. Macias, M.J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M. & Oschkinat, H. (1996): Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382, 646-649

93. Maina, F., Casagrande, F., Audero, A., Simeone, A., Comoglio, P.M., Klein, R. & Ponzetto, C. (1996): Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-542
94. Maina, F., Hilton, M.C., Ponzetto, C., Davies, A.M. & Klein, R. (1997): Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Develop.* 11, 3341-3350
95. Mancini, A., Niedenthal, R., Joos, H., Koch, A., Trouliaris, S., Niemann, H. & Tamura, T. (1997): Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. *Oncogene* 15, 1565-1572
96. Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993): The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393
97. Maroun, C.R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M.A., Fournier, T.M., Wong, A.J. & Park, M. (1999a): The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at site of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the Met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* 19, 1784-1799
98. Maroun, C.R., Moscatello, D.K., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J. & Park, M. (1999b): A conserved inositol phospholipid binding site within the pleckstrin homology domain of the Gab1 docking protein is required for epithelial morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 31719-31726
99. Marshall, C.J. (1995): Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185
100. Matsumoto, K., Tekahara, T., Inoue, H., Hagiya, M., Shimizu, S. & Nakamura, T. (1991): Deletion of kringle domains or the N-terminal hairpin structure in hepatocyte growth factor results in marked decrease in related biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 691-699
101. Matsumoto, K., Tajima, H., Hamanoue, M., Kohno, S., Kinoshita, T. & Nakamura, T. (1992): Identification and characterization of „injurin“, an inducer of the gene expression of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89, 3800-3804
102. Matsumoto, K. & Nakamura, T. (1993) in: *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and the Met Receptor*, eds Goldberg, I.D. and Rosen, E.M. (Birkhauser, Basel), Vol. 65, pp. 225-250
103. Mayer, B.J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. (1988): A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332, 272-275
104. McKnight, J., Kristie, T. & Roizman, B. (1987): Binding of the virion protein mediating alpha gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site requires cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7061-7065
105. Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takashi, K., Gohda, E., Daikuhara, Y. &

- Kitamura, N. (1989): Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 967-973
106. Mizuno, K., Higuchi, O., Ihle, J. & Nakamura, T. (1993): Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 178-186
107. Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T. & Orci, L. (1991): Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-908
108. Morrison, D.K. & Cutler, R.E. (1997): The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 174-179
109. Munshi, N., Groopman, J.E., Gil, P.S. & Ganju, R.K. (2000): c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's Sarcoma cells. *J. Immunol.* 164, 1169-1174
110. Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. & Saraste, M. (1993): The PH-domain: A common piece in the structural patchwork of signaling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18, 343-348
111. Nakamura, T., Teramoto, H. & Ichihara, A. (1986): Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6489-6493
112. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi M., Sugimura, A., Tashiro, K. & Shimizu, S. (1989): Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443
113. Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., Birchmeier, W. & Comoglio, P.M. (1991): Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10, 2867-2878
114. Nguyen, L., Holgado-Madruga, M., Maroun, C., Fixman, E.D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M.L., Wong, A.J. & Park, M. (1997): Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J. Biol. Chem.* 272, 20811-20819
115. Nishida, K., Yoshida, Y., Toh, M., Fukada, T., Ohtani, T., Shirogane, T., Atsumi, T., Takahashi, T.M., Ishihara, K., Hibi, M. & Hirano, T. (1999): Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. *Blood* 93, 1809-1816
116. Nusrat, A., Parkos, C.A., Baccara, A.E., Godowski, P.J., Delp-Archer, C., Rosen, E.M. & Madara, J.L. (1994): Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J. Clin. Invest.* 93, 2056-2065

117. Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K. & Kitamura, N. (1992): Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-9561
118. Ono, M., Bolland, S., Tempst, P. & Ravetch, J. (1996): Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc $\gamma$ RIIB. *Nature* 383, 263-266
119. Overduin, M., Rios, C.B., Baltimore, D. & Cowburn, D. (1992): The three-dimensional solution structure of the SH2 domain of c-Abl. *Cell* 70, 697-704
120. Panayotou, G. & Waterfield, M.D. (1993): The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases. *BioEssays* 15, 171-177
121. Park, M., Dean, M., Cooper, C., Schmidt, M., O'Brian, S., Blair, D. & Vande Woude, G.F. (1986): Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 25, 895-904
122. Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M., Gonda, M. & Vande Woude, G.F. (1987): Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6379-6383
123. Pawson, T. (1995): Protein modules and signaling network. *Nature* 373, 573-580
124. Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M.D., Ponzetto, A. & Pelicci, P.G. (1995): The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631-1638
125. Phee, H., Jacob, A. & Coggeshall, K.M. (2000): Enzymatic activity of the SH2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J. Biol. Chem.* 275, 19090-19097
126. Pollack, A.L., Runyan, R.B. & Mostov, K.E. (1998): Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. *Dev. Biol.* 204, 64-79
127. Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. & Comoglio, P.M. (1994): A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the Hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271
128. Porter, A.C. & Vaillancourt, R.R. (1998): Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17, 1343-1352
129. Puck, T.T., Marcus, P.I. & Cieciura, S.J. (1956): Clonal growth of mammalian cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 103, 273-284
130. Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R. & Elliott, B. (1998): c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33714-33721

131. Rameh, L.E. & Cantley, L.C. (1999): The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274, 8347-8350
132. Reedijk, M., Liu, X., van der Geer, P., Letwin, K., Waterfield, M.D., Hunter, T. & Pawson, T. (1992): Tyr721 regulates specific binding of the CSF-1 receptor kinase insert to PI 3'-kinase SH2 domains: a model for SH2-mediated receptor-target interaction. *EMBO J.* 11, 1365-1372
133. Ren, R., Mayer, B.J., Cichetti, P. & Baltimore, D. (1993): Identification of a ten amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161
134. Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C., Diekmann, D. & Hall, A. (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410
135. Ridley, A.J., Comoglio, P.M. & Hall, A. (1995): Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell Biol.* 15, 1110-1122
136. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. & Downward, J. (1994): Phosphatidylinositol 3-kinase activation as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532
137. Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H. & Vande Woude, G.F. (1994): Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4731-4735
138. Rosen, E., Meromsky, L., Setter, E., Vinter, D. & Goldberg, I. (1990): Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 25, 163-175
139. Roussel, M.F., Dull, T.J., Rettenmier, C.W., Ralph, P.R., Ullrich, A. & Sherr, C.J. (1987): Transforming potential of the c-fms proto-oncogene (CSF-1 receptor). *Nature* 325, 549-552
140. Royal, I & Park, M. (1995): Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madine-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 27780-27787.
141. Royal, I., Fournier, T.M. & Park, M. (1997): Differential requirement of Grb2 and PI-3'-kinase in HGF/SF-induced cell motility and tubulogenesis. *J. Cell. Physiol.* 173, 196-201
142. Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. & Bowtell, D. (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85
143. Rubin, J.S., Chan, A.M., Bottaro, D.P., Burgess, W.H., Taylor, W.G., Cech, A.C., Hirschfield, D.W., Wong, J., Miki, T., Finch, P.W. & Aaronson, S.A. (1991): A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 415-419

## Literatur

---

144. Sachs, M., Weidner, K.M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A. & Birchmeier, W. (1996): Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* 133, 1095-1107
145. Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C. & Birchmeier, W. (2000): Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J. Cell Biol.* 150, 1375-1384
146. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
147. Sakkab, D., Lewitzky, M., Posern, G., Schaeper, U., Sachs, M., Birchmeier, W. & Feller, S.M. (2000): Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adaptor protein CRKL. *J. Cell Biol.* 275, 10772-10778
148. Salcini, A.E., McGlade, J., Pelicci, G., Nicoletti, I., Pawson, T. & Pelicci, P.G. (1994): Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene* 9, 2827-2836
149. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual - 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY
150. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
151. Sanger, F. (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214, 1205-1210
152. Santos, O.F.P. & Nigam, S.K. (1993): HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix und TGF- $\beta$ . *Dev. Biol.* 160, 293-302
153. Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B. & Birchmeier, W. (2000): Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.* 149, 1419-1432
154. Schaffhausen, B. (1995): SH2 domain structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1242, 61-75
155. Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9, 383-391
156. Schlessinger, J. (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225
157. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. & Birchmeier, C. (1995): Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature (London)* 373, 699-702

158. Shiota, G., Rhoads, D., Wang, T., Nakamura, T. & Schmidt, E. (1992): Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 373-377
159. Smith, M.R., Degudicibus, S.J. & Stacey, D.W. (1986): Requirement for c-Ras protein during viral oncogene transformation. *Nature* 320, 540-543
160. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnowski, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. & Cantley, L.C. (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778
161. Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R.A. & Cantley, L.C. (1994): Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps, Fes, Grb2, HCP, SHC, Syc and Vav. *Mol. Cell Biol.* 14, 2777-2785
162. Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W. & Knopf, J.L. (1988): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Nature* 332, 269-272
163. Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H. & Tavtigian, S.V. (1997): Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356-362
164. Stoker, M. & Perryman, M. (1985): An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 77, 209-223
165. Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. & Gray, J. (1987): Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial mobility. *Nature (London)* 327, 239-242
166. Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtany, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Hibi, M. & Hirano, T. (1998): Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 18, 4109-4117
167. Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M. & Takai, Y. (1994): Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF induced motility. *Oncogene* 9, 273-279
168. Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M. & Ronnstrand, L. (1999): Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem. J.* 341, 211-216
169. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
170. Traverse, S., Cohen, P., Paterson, H., Marshall, C., Rapp, U. & Grand, R.J. (1993): Specific association of the activated MAP kinase kinase (Raf) with the plasma membranes of ras-transformed retinal cells. *Oncogene* 8, 3175-3181

## Literatur

---

171. Tsarfaty, I., Resau, J.H., Rulong, S., Keydar, I., Faletto, D.L. & Vande Woude, G.F. (1992): The met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 257, 1258-1261
172. Tzivion, G., Luoz, Z. & Avruch, J. (1998): A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for raf kinase activity. *Nature* 394, 88-92
173. Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. & Kitamura, N. (1995): Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature (London)* 373, 702-705
174. Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212
175. Unkeless, J.C. & Jin, J. (1997): Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 338-343
176. van der Geer, P. & Hunter, T. (1993): Mutation of Tyr697, a Grb2-binding site, and Tyr721, a PI 3-kinase binding site, abrogates signal transduction by the murine CSF-1 receptor expressed in Rat-2 fibroblasts. *EMBO J.* 12, 5161-5172
177. van der Geer, P., Lindberg, R.A. & Hunter, T. (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10, 251-257
178. Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. (1993): Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 74, 205-214
179. Vollenweider, P., Clodi, M., Martin, S.S., Imamura, I., Kavanaugh, K.M. & Olefsky, J.M. (1999): An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement. *Mol. Cell Biol.* 19, 1081-1091
180. Wada, T., Sasaoka, T., Ishii, M., Hori, H., Haruta, T., Ishihara, H. & Kobayashi, M. (1999): Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology* 140, 4585-4594
181. Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L. & Kurian, J. (1992): Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-Src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646-653
182. Weidner, K.M., Behrens, J., Vandekerckhove, J. & Birchmeier, W. (1990): Scatter factor, molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 111, 2097-2108
183. Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubushi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. & Birchmeier, W. (1991): Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7001-7005

## Literatur

---

184. Weidner, K.M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J. & Birchmeier, W. (1996): Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature (London)* 384, 173-176
185. Williams, L.T. (1989): Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science* 243, 1564-1570
186. Woods, D.F. & Bryant, P.J. (1991): The disc-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464
187. Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F.A., Faulstich, H. & Wieland, T. (1979): Fluorescent phalloidin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4498-4501
188. Ymer, S., Tucker, W.Q., Sanderson, C.J., Hapel, A.J., Campbell, H.D. & Young, I.G. (1985): Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene. *Nature* 317, 2555-2558
189. Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber, S.L. (1994): Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933-945
190. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S.J. (1996): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X. *Cell* 87, 619-628
191. Zhou, M.M., Margolis, B., Chaudhuri, M., Shoelson, S.E. & Cantley L.C. (1995): The phosphotyrosine interaction domain of Shc recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif. *J. Biol. Chem.* 270, 14863-14866
192. Zhou, M.M., Huang, B., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Shuker, S.B., Miyazaki, M., Trub, T., Shoelson, S.E. & Fesik, S.W. (1996): Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. *Nat. Struct. Biol.* 3, 388-393

## 7. ANHANG

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der vier Hauptklassen von Rezeptortyrosinkinasen (nach Ullrich & Schlessinger, 1990).....	15
Abbildung 1.2: Aktivierungsmechanismus einer Rezeptortyrosinkinase nach Bindung ihres spezifischen Liganden.....	17
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Struktur motive einiger Rezeptortyrosinkinasen-bindender Proteine (nach Pawson, 1995).....	18
Abbildung 1.4: Hauptsignalwege aktivierter Rezeptortyrosinkinasen (nach Porter & Vaillancourt, 1998).....	21
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des c-Met-Rezeptors und seines Liganden HGF/SF (nach Park et al., 1987; Birchmeier et al., 1995).....	26
Abbildung 1.6: Aminosäuresequenz der katalytischen Schleife und der Aktivierungsschleife des murinen c-Met-Rezeptors.....	30
Abbildung 1.7: Wichtigste Strukturelemente und Signalwege des c-Met-Rezeptors.....	32
Abbildung 1.8: HGF-induzierte Tubulogenese von MDCK-Zellen in dreidimensionaler Kollagenmatrix.....	33
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	80
Abbildung 4.1: Southern Blot mit anschließender Hybridisierung mit einer PI 3'-Kinase-Sonde.....	98
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SHIP-1.....	100
Abbildung 4.3: Aminosäuren-Sequenz des isolierten Proteinfragments des neuen c-Met-interagierenden Zinkfinger-Proteins.....	101
Abbildung 4.4: Die SHIP-1/c-Met-Interaktion ist abhängig vom Phosphorylierungszustand des c-Met-Rezeptors, die Zinkfinger-Protein/c-Met-Interaktion dagegen nicht.....	102
Abbildung 4.5: Die Quantifizierung der Interaktion von SHIP-1 mit Wildtyp-c-Met und verschiedenen c-Met-Mutanten wurde mit Hilfe des GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-Systems durchgeführt.....	104
Abbildung 4.6: Sowohl die Mutation K1110A als auch die Mutation Y14-15F verhindern die Bindung von SHIP-1, PI 3'-Kinase, Gab1, Grb2, Grb10, PLC- $\gamma$ , c-Src und Shc an c-Met.....	105
Abbildung 4.7: SHIP-1 bindet an die aktivierten Rezeptortyrosinkinasen c-Met und c-Fms, aber nicht an c-Kit, TrkA oder den Insulinrezeptor.....	106

## Anhang

---

Abbildung 4.8: Northern-Blot von Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien hybridisiert mit einer SHIP-1-spezifischen und einer Aktin-spezifischen Sonde.....	109
Abbildung 4.9: Expression des SHIP-1-Proteins in verschiedenen Epithelzelllinien.....	110
Abbildung 4.10: Autoradiogramm des Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots (Clontech) hybridisiert mit einer Zinkfinger-spezifischen Sonde.....	111
Abbildung 4.11: SHIP-1 co-präzipitiert mit dem aktivierten Rezeptor c-Met in SHIP-1-transfizierten HEK293-Zellen.....	113
Abbildung 4.12: SHIP-1 assoziiert <i>in vivo</i> unter physiologischen Bedingungen mit dem aktivierten c-Met-Rezeptor.....	114
Abbildung 4.13: GST-SHIP-1 und das GST-Zinkfinger-Protein assoziieren <i>in vitro</i> mit dem autophosphorylierten c-Met.....	116
Abbildung 4.14: Coomassie-Blau Färbung der 11 %-igen SDS-Gele, auf die die verschiedenen generierten GST-Fusionsproteine bzw. die His6-gekoppelten Proteine aufgetragen wurden.....	117
Abbildung 4.15: Hierarchie der Bindungsaffinitäten von Grb2, Gab1, SHIP-1 und PI 3'-Kinase an die Multisubstratbindungsstelle von c-Met <i>in vitro</i> .....	118
Abbildung 4.16: Morphologische Veränderungen in MDCK-Zellen nach HGF-Stimulation.....	121
Abbildung 4.17: 19 MDCK-Transfektanten exprimieren das exogene SHIP-1-Protein in unterschiedlichen Mengen.....	123
Abbildung 4.18: Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen verändert deren DNA-Syntheserate nicht.....	124
Abbildung 4.19: Die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen hat keinen Einfluß auf deren „Scattering“-Verhalten.....	126
Abbildung 4.20: Aktin-Strukturen in Wildtyp- und SHIP-1-überexprimierenden MDCK-Zellen.....	127
Abbildung 4.21: Die HGF-induzierte Tubulogenese wird durch die Überexpression von SHIP-1 in MDCK-Zellen beschleunigt.....	129
Abbildung 4.22: Expression einer katalytisch inaktiven SHIP-1-Mutante in MDCK-Zellen hemmt deren Tubulogenese-Antwort.....	131
Abbildung 4.23: Expression der SHIP-1-SH2-Domäne in MDCK-Zellen. ....	132
Abbildung 4.24: Hemmung der Tubulogenese-Antwort in SHIP-1-SH2-Domäne exprimierenden MDCK-Zellen.....	134

## Anhang

---

Abbildung 5.1: Modell für die <i>in vitro</i> Morphogenese von Tubuli (nach Pollack et al., 1998).....	148
Abbildung 5.2: Signalübertragung über die Phosphoinositide PI(3,4)P <sub>2</sub> und PI(3,4,5)P <sub>3</sub> und ihre Bindeproteine (nach Rameh & Cantley, 1999).....	151
Abbildung 5.3: Schematische Darstellung wichtiger Signalwege für die HGF-induzierte Tubulogenese von MDCK-Zellen (Erläuterungen im Text).....	152

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit c-Met wechselwirkende Proteine.....	99
Tabelle 2: Vergleich der Konsensussequenzen der Bindungsstellen von PI 3'-Kinase, SHIP-1 und Grb2 innerhalb verschiedener Rezeptortyrosinkinasen.....	141

### Lebenslauf

Name: Stefan  
Vorname: Monica  
Geburtsdatum: 26.12.1968  
Geburtsort: Bukarest, Rumänien  
Familienstand: ledig  
Eltern: Vater: Georg Stefan, \*06.03.1934  
Mutter: Michaela Stefan, \*25.07.1944

Schulbildung: 15.09.1975-15.06.1983 Besuch der rumänischen Grundschule in Bukarest, Rumänien  
15.09.1983-15.06.1987 Besuch des Gymnasiums für Mathematik und Physik in Bukarest, Rumänien  
Juni 1987 Abitur  
April 1989-November 1989 Besuch des Deutsch-Sprachkurses im Bildungszentrum, Hannover  
Januar 1990-Dezember 1990 Besuch des Sonderlehrgangs für Aussiedler am Göttinger Institut in Göttingen  
Dezember 1990 Abschlußprüfung zur Erlangung der allgemeinen deutschen Hochschulreife

Studium: seit Oktober 1991 Studium der Biochemie an der Universität Hannover  
November 1996-Mai 1997 Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Hannover  
Thema: Untersuchungen zum antagonistischen Regulationsmechanismus der TNF $\alpha$ -Expression durch IFN- $\gamma$  und IL-10  
Mai 1997 Diplom mit der Gesamtnote sehr gut bestanden

Beruflicher Werdegang: Juli 1997-April 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Hannover  
seit Mai 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für physiologische Chemie der MHH in der Arbeitsgruppe von P.D. Dr. T. Tamura-Niemann zum Zweck der Promotion

## Veröffentlichungen

**Direct interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non-receptor tyrosine kinase c-Abl, through the activation loop**

Alexandra Koch, Annalisa Mancini, Monica Stefan, Rainer Niedenthal, Heiner Niemann & Teruko Tamura

FEBS Letters (2000) 469 (1): 72-76

**The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity**

Annalisa Mancini, Alexandra Koch, Monica Stefan, Heiner Niemann & Teruko Tamura

FEBS Letters (2000) 482: 54-58

**Src homology 2-containing inositol 5' phosphatase 1 binds to the multifunctional docking site of c-Met and potentiates hepatocyte growth factor (HGF) induced branching tubulogenesis**

Monica Stefan, Alexandra Koch, Annalisa Mancini, Andrea Mohr, Michael K. Weidner, Heiner Niemann & Teruko Tamura

J. Biol. Chem. 7 (2001) 276 (5): 3017-3023

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit oder Teile der Arbeit wurden bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder als ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, 27.12.2000

Monica Stefan