

Das Interaktom der SH2-Domänen der Proteintyrosinphosphatase SHP2 und ihren krankheitsrelevanten Mutanten

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Jutta Pia Müller
aus Gießen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer.nat. F. Schaper
 Universitätsprofessor Dr.-Ing. W. Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 09. 2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Publikationen

Ein Manuskript zur Veröffentlichung der in dieser Arbeit enthaltenen Daten ist in Vorbereitung.

Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs (Review)

Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, **Müller PJ**, Mütze B, Wolf A, Schaper F
Eur J Cell Biol. 2011 (im Druck)

SHPS-1/SIRP1alpha contributes to interleukin-6 signalling

Sobota RM, **Müller PJ**, Khouri C, Ullrich A, Poli V, Noguchi T, Heinrich PC, Schaper F
Cell Signal. 2008 Jul;20(7):1385

Prostaglandin E1 inhibits IL-6-induced MCP-1 expression by interfering specifically in IL-6-dependent ERK1/2, but not STAT3, activation

Sobota RM, **Müller PJ**, Heinrich PC, Schaper F.
Biochem J. 2008 May 15;412(1):65

Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection

Gavutis M, Lata S, Lamken P, **Müller P**, Piehler J.
Biophys J. 2005 Jun;88(6):4289

Inhalt

I.	Einleitung	1
1.	Hintergrund.....	1
1.1.	SH2-Domänen	3
1.2.	PTP-Domänen	6
2.	SHP2	7
2.1.	Regulation der Aktivität von SHP2.....	9
2.2.	Interaktionen von SHP2	11
2.3.	Krankheiten	14
3.	Zielsetzung	17
3.1.	Strategie	17
II.	Materialien.....	18
1.	Chemikalien und Fertiglösungen.....	18
2.	Enzyme.....	19
3.	Größenstandards	19
4.	Western blot	19
5.	Antikörper	19
6.	Eukaryontische Zellen.....	20
7.	Prokaryontische Zellen.....	20
8.	Plasmide.....	20
9.	Primer	21
10.	Peptide	22
11.	Geräte und Säulen	22
12.	Medien und Lösungen für Kulturen.....	22
13.	Kits.....	23
14.	Stimulation.....	23
15.	Puffer und Lösungen.....	23
16.	EDV	26
III.	Methoden	27
1.	Molekularbiologie	27
1.1.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
1.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
1.3.	Agarose-Gelelektrophorese	28
1.4.	Ligation in den TOPO-Donorvektor	28
1.5.	Gerichtete Mutagenese mittels Quickchange-Kit	29
1.6.	Herstellung der Expressionsvektoren.....	30
1.7.	Herstellung PEG-kompetenter <i>E.coli</i>	30
1.8.	Transformation	30
1.9.	Plasmid-DNS-Präparation.....	31
1.10.	Expression in <i>E. coli</i>	31
1.11.	Präparation der GST-Fusionsproteine.....	31
1.12.	Zellkultur	31
1.13.	Stabile Isotop Markierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC)	32
1.14.	Liposomale transiente Transfektion von HeLa Zellen	32
1.15.	Herstellung von Lysaten aus Säugerzellen	33
2.	Proteinbiochemie.....	34
2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.2.	Western Blot.....	35
2.3.	Immundetektion der Proteine auf der Membran.....	35
2.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
2.5.	Bestimmung der Konzentration der GST-Fusionsproteine.....	36
2.6.	Affinitätschromatographie der GST-Fusionsproteine	36
2.7.	Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie	36
2.8.	Kopplung der GST-Fusionsproteine an magnetische Beads	37
2.9.	Bindung von biotinylierten Peptiden an magnetische Beads	37

2.10. Präzipitation der Interaktionspartner aus Lysaten	38
2.11. Peptidpräzipitation.....	38
3. Biophysikalische Experimente	39
3.1. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	39
4. Massenspektrometrie	41
4.1. Verdau der eluierten Proteine	42
4.2. Fraktionierung der verdauten Proben	42
4.3. Massenspektrometrische Messungen	43
4.4. Datenanalyse	44
IV. Ergebnisse.....	46
1. Expression und Aufreinigung der tandem SH2-Domänen von SHP2	46
2. Die Rolle der SH2-Domänen von SHP2 bei der Bindung an Peptide	49
3. Der Einfluß von krankheitsrelevanten Punktmutationen auf die Bindungseigenschaften der SH2-Domänen	58
3.1. Mutationen R138Q und E139D in der C terminalen SH2-Domäne.....	58
3.2. Die Bindung krankheitsrelevanter Punktmutanten an Peptide	59
4. Neue Interaktionspartner der wildtyp SH2-Domänen von SHP2.....	64
4.1. Abhängigkeit der präzipitierten Proteine vom Stimulus	64
4.2. Abhängigkeit der präzipitierten Proteine von Pervanadat	66
4.3. Spezifität der präzipitierten Proteine	69
4.4. Spezifität der Interaktion- Konkurrenzexperimente	76
4.5. Potentielles Interaktom der SH2-Domänen von SHP2.....	82
5. Interaktom der Mutanten (MS)	90
5.1. Die R138Q Mutante im Kontext des EGF Signalweges	100
5.2. Clusteranalyse der Varianten T42A und E139D.....	101
V. Diskussion und Ausblick.....	108
1. Die Rolle der SH2-Domänen von SHP2 bei bekannten Interaktionen	109
2. Die Bindungspartner der wildtyp SH2-Domänen	115
2.1. Zuordnungen der identifizierten Bindungspartner	120
2.2. Im Interaktom enthaltene Motive	123
2.3. Mögliche Bedeutung für Jak/STAT und Erk Signalwege.....	129
3. Krankheitsrelevante Punktmutanten der SH2-Domänen.....	131
3.1. Auswahl der Punktmutanten	131
3.2. Die Bindungspartner der Punktmutanten.....	133
3.3. Die veränderten Bindungen der R138Q Mutante	135
3.4. Die veränderten Bindungen der E139D Mutante.....	137
3.5. Die veränderten Bindungen der T42A Mutante	139
3.6. T42A und E139D in Relation zueinander	140
VI. Zusammenfassung	142
VII. Anhang	143
1. Abkürzungen	143
2. Literatur	146
3. Daten	156
4. Lebenslauf	168
5. Mein besonderer Dank gilt	169

I. Einleitung

1. Hintergrund

Die Übertragung und Weiterleitung von äußeren Signalen ist essentiell für die Koordination von Zellen innerhalb vielzelliger Organismen. Die Kommunikation kann durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Integrine erfolgen.

Nachdem ein Signal in Form eines Botenstoffs (Hormon oder Zytokin) die Oberfläche einer Zelle erreicht hat, wird es in die Zelle weitergegeben. Die Botenstoffe signalisieren über ihre Bindung an Rezeptoren, die die entsprechenden Informationen über die Zellmembran ins Zellinnere weiterleiten und dort verschiedene Signalkaskaden initiieren, wobei die Signale bis in den Zellkern transportiert werden können. So können die Prozesse wie die Transkription, der Zellzyklus, der zelluläre Stoffwechsel und das Überleben der Zelle gesteuert werden [1].

Die initiierten Signalkaskaden dienen sowohl der Amplifikation als auch der Feinregulation der Signale. Durch verschiedene Stimuli können entweder gleiche oder unterschiedliche Signalmoleküle aktiviert werden. Weiterhin werden durch unterschiedliche Kombinationen der aktivierten Moleküle verschiedene Antworten hervorgerufen. In der Zelle sind die einzelnen Signalwege zu komplexen Netzwerken verknüpft. Die Koordination der Signale erfolgt abhängig von der Lokalisation der Moleküle, von der Zeit nach dem Stimulus und den Molekülen in der Umgebung [1-4].

Die Weiterleitung der Information im Inneren der Zelle kann mittels sekundären Botenstoffen wie zyklischem Adenosinmonophosphat stattfinden, außerdem indem Proteine entweder aktiviert werden oder ihre Aktivität gehemmt wird. Die Änderung der Aktivität wird meist durch posttranslationale Modifikationen (PTM) herbeigeführt. Zu späteren Stadien kann aber auch die Synthese neuer Moleküle z.B. von Ribonukleinsäuren oder Proteinen induziert werden.

Im Allgemeinen können PTM nicht nur die Aktivität, sondern auch die Stabilität und die Lokalisation von Proteinen verändern [3]. Zusätzlich sind PTM in der Lage, die Erkennung durch andere Proteine zu modulieren. Die PTM können reversibel oder irreversibel sein. Sie reichen von der Modifikation durch angehängte Proteine wie Ubiquitin oder SUMO (*small ubiquitin like modifier*) über Glykosylierungen, Methylierungen und Acetylierungen bis zur Phosphorylierung von Threonyl-, Seryl- oder Tyrosylseitenketten [5].

Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine der reversiblen Modifikationen. Sie kann Konformationsänderungen induzieren und sowohl aktivierend als auch inaktivierend auf das Protein wirken. Besonders wichtig sind phosphorylierte Tyrosylreste im Kontext der Signaltransduktion. Das Gleichgewicht der phosphorylierten Tyrosylreste in Zellen wird durch Kinasen und Phosphatasen hergestellt.

In der Beschreibung und Zuordnung von PTM, insbesondere bei der von phosphorylierten Seitenketten in Proteinen, konnten in den letzten Jahren unter anderem durch massenspektrometrische Analysen große Fortschritte erzielt werden [5]. So wurde die Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung während des Zellzyklus oder nach der Stimulation mit EGF relativ zu unbehandelten Zellen quantifiziert [6-8]. Weiterhin wurde beispielsweise das Phosphoproteom von embryonalen Stammzellen beschrieben [9]. Dennoch ist die Charakterisierung von PTMs noch unvollständig.

Serin ist die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure. Das in klassischen Studien erhaltene Verhältnis für die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin liegt bei in Serum wachsenden Zellen bei etwa 2300 Serin: 188 Threonin: 1 Tyrosin (92,5% : 0,45% : 0,05% der phosphorylierten Seitenketten) [10]. Die Bedeutung der phosphorylierten Tyrosylseitenketten innerhalb der Signaltransduktion wird unterstrichen, da für deren Vorkommen in Abhängigkeit von der Stimulierung durch EGF in späteren proteomischen Studien ein höherer Anteil von phosphorylierten Tyrosylresten bestimmt wurde (86,4%: 11,8%: 1,8% der phosphorylierten Seitenketten) [6]. Das große Interesse an Proteinen, die phosphorylierte Tyrosylreste enthalten, spiegelt sich in den Verhältnisse der in der der Phosphosite-Datenbank (Version 2009) [11] beschriebenen phosphorylierten Aminosäuren in humanen Proteinen wider. Die Anzahlen der dort beschriebenen phosphorylierten Aminosäuren weichen beträchtlich von der Häufigkeit ab, in der sie vorkommen. Insgesamt sind in der Datenbank mehr als 100000 Phosphorylierungen beschrieben, wobei 85488 auf Serin, 26913 auf Threonin und 20100 auf Tyrosin entfallen und sich ein Verhältnis von 65%: 20%: 15% ergibt.

Proteine sind oft aus mehreren verschiedene Domänen in unterschiedlichen Kombinationen zusammengesetzt [12]. Obwohl die Interaktionen isoliert betrachtet recht unkomplex sind, erzeugt das Zusammenspiel der Domänen ein sehr vielschichtiges zelluläres System. Zur Erklärung differentieller Signale ist dies mittlerweile ein etabliertes Konzept [3]. Die jeweiligen Domänen übernehmen genau definierte Aufgaben. Eine Phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domäne, sowie eine

Src-homologe Region 2 (SH2) bindet an Proteine mit phosphorylierten Tyrosylseitenketten. Ihre Einteilung erfolgte aufgrund ihrer räumlichen Strukturen (detailliertere Informationen zur SH2-Domäne in Kapitel I.1.1, Vergleich beider Domänen: [13, 14]). Auch eine Proteintyrosinphosphatase (PTP)-Domäne erkennt Motive mit phosphorylierten Tyrosylresten und führt zu deren Dephosphorylierung (siehe Kapitel I.1.2, [15]). Es gibt aber auch andere Domänen, deren Wechselwirkungen mit anderen Molekülen unabhängig von Tyrosinphosphorylierungen sind. SH3-Domänen erkennen und interagieren mit prolinreichen Sequenzen [16]. Pleckstrinhomologe (PH)-Domänen wechselwirken mit Phospholipiden in den Zellmembranen [17]. Aber auch Proteine wie beispielsweise die Untereinheiten von trimeren G-Proteinen können von einer PH-Domäne gebunden werden, die so zur Membran rekrutiert werden kann [18, 19].

1.1. SH2-Domänen

Wie bereits erwähnt, ist die Phosphorylierung von Tyrosylresten in der Signaltransduktion sehr wichtig. Daher kommt auch den Domänen, die abhängig von der Phosphorylierung anderer Proteine an diese binden können, eine wesentliche Funktion zu. Dieses Modul wurde zuerst in der Tyrosinkinase Src beschrieben und daher als Src-homologe Region 2 (SH2) benannt [20]. Bei dem Erkennungsprozess von Sequenzen mit phosphorylierten Tyrosylseitenketten nehmen die SH2-Domänen Schlüsselrolle ein. Sie bestehen aus ungefähr 100 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von etwa 13 kDa. Die erste aufgeklärte Kristallstruktur einer SH2-Domäne war die von Src (Abbildung 1). Die Kristallisation wurde mit gebundenen Peptiden durchgeführt, die aus dem PDGF-Rezeptor β bzw. dem EGF-Rezeptor stammten [21]. Das Zentrum einer SH2-Domäne wird aus einem antiparallelen β -Faltblatt (β A-D, grün) gebildet, das von zwei α -Helices (α A und B, blau) umrandet wird. Die α B-Helix ist ein essentielles Element des hydrophoben Kerns der Domäne und wird durch das zweite antiparallele β -Faltblatt (β D'-F) abgeschirmt.

Nach der Bindung eines Peptids werden die Sauerstoffatome des phosphorylierten Tyrosylrestes des Peptids von den Argininen in den Positionen α A2 und β B5 der SH2-Domäne koordiniert (rechts), wobei das Arginin β B5 die einzige invariante Aminosäure in allen SH2-Domänen und somit besonders wichtig ist.

Die Abhängigkeit der Bindung der SH2-Domänen an verschiedene, spezifische Sequenzen resultiert aus vielen schwachen Interaktionen der C-terminal zum Tyrosylrest liegenden Aminosäuren des Liganden und den Aminosäuren in den

verbindenden Regionen von βG nach αB und βE nach βF der SH2-Domänen [21]. Die Bindungsstelle zeigt keine Wechselwirkungen mit phosphorylierten Threonyl- oder Serylresten, da diese Seitenketten zu klein sind um mit den zentralen Argininen der SH2-Domäne zu interagieren.

Die Bindungsstelle einer SH2-Domäne befindet sich auf der anderen Seite als ihre Termini, was die modulare Anordnung in Proteinen vereinfacht [16].

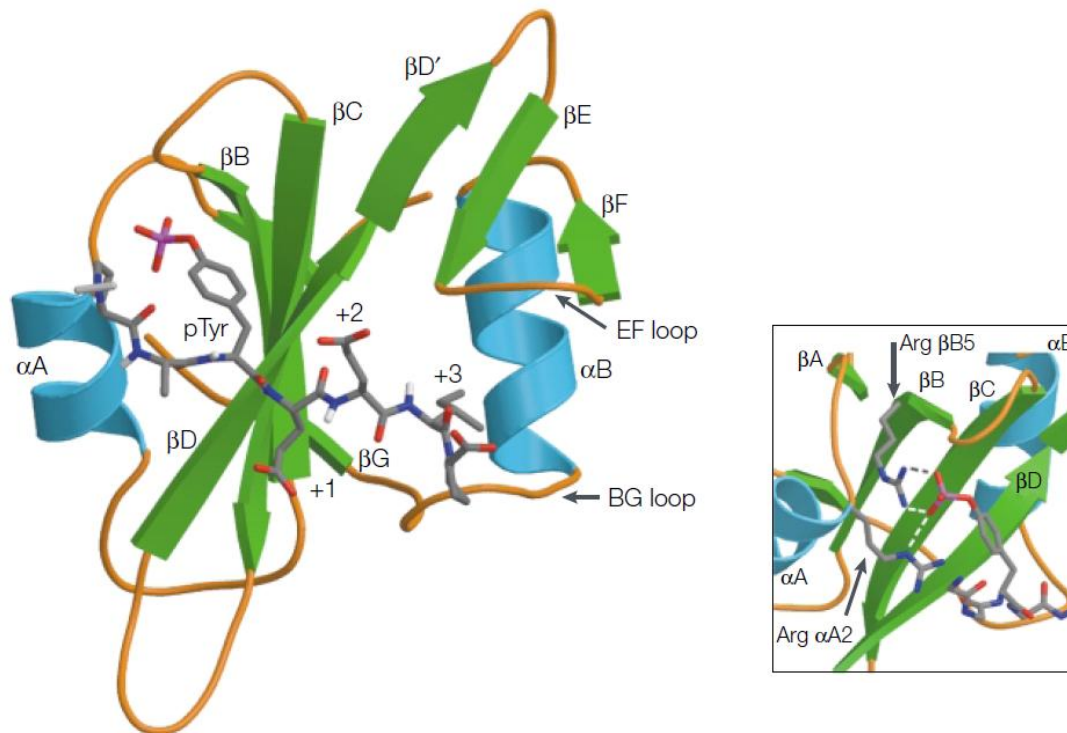


Abbildung 1 Struktur der SH2-Domäne von Src mit gebundenem Liganden
Die α -Helices sind blau, die β -Faltblätter grün und die verbindenden Regionen orange dargestellt. Der Ligand ist ein Peptid mit einem phosphorylierten Tyrosylrest und wie die Arginine der SH2-Domäne im rechten Bild als Stäbchenmodell gezeigt. Darin sind Kohlenstoffatome grau, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Phosphoratome rosa gefärbt (aus [13]).

Im humanen Genom sind 120 SH2-Domänen codiert. Insgesamt sind diese in 110 verschiedenen Proteinen zu finden [22]. Diese Proteine haben unterschiedliche Funktionen (Abbildung 2) und enthalten meist auch verschiedene andere Domänen. Unter den Proteinen mit SH2-Domänen befinden sich Kinasen und Phosphatasen, aber auch andere Enzyme, Gerüstproteine, Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren.

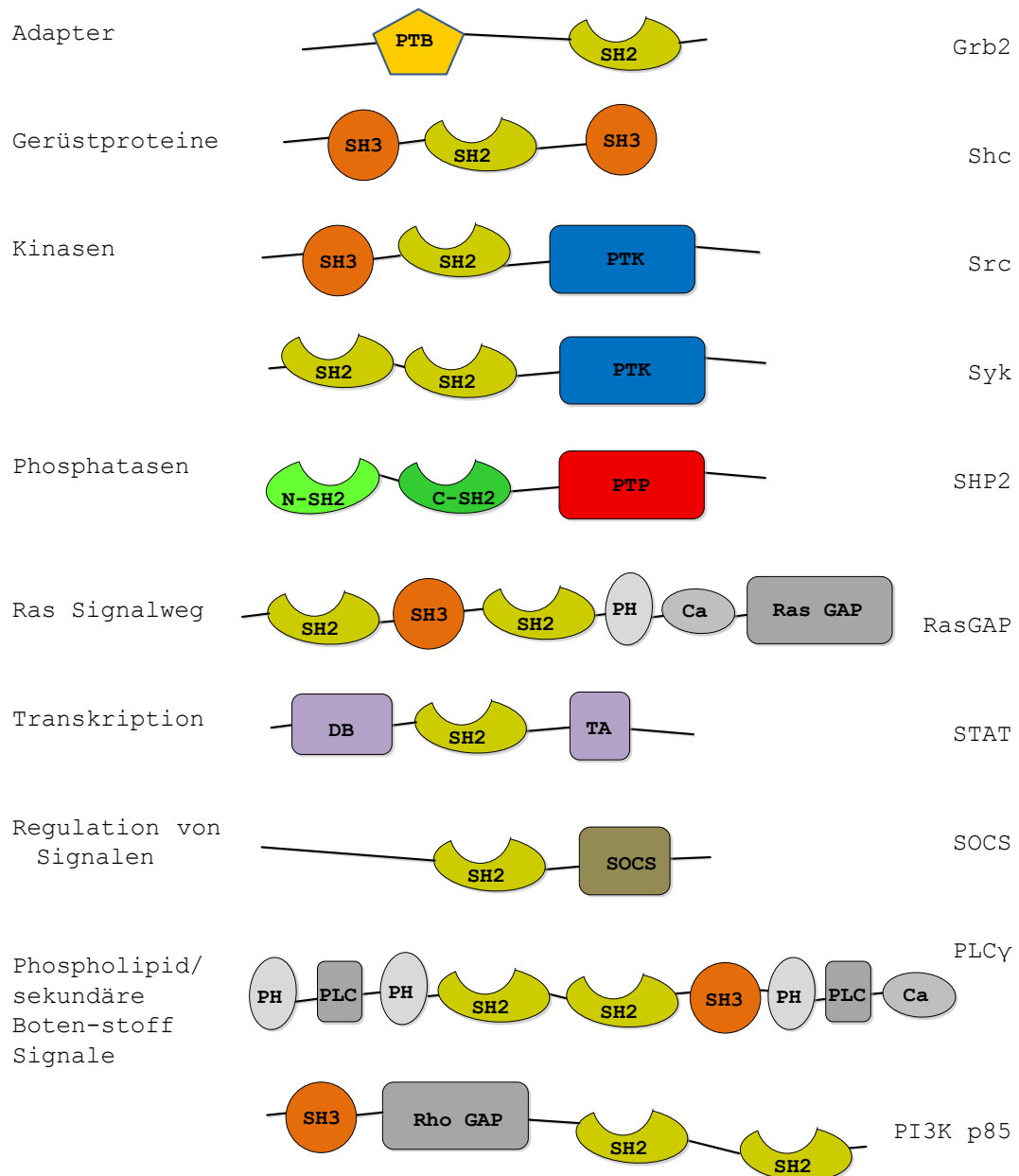


Abbildung 2 Modularer Aufbau von SH2-Domänen enthaltenden Proteinen
 SH2-Domänen sind in vielen Proteinen zu finden und können mit verschiedenen anderen Domänen kombiniert sein (modifiziert nach [14, 22]).
 Für die Domänen verwendete Abkürzungen: DB DNA-bindende Domäne; PH Pleckstrinhomologe Domäne; PLC Teil der katalytischen Domäne der PLCγ; PTB Phosphotyrosinbindende Domäne; PTK Proteintyrosinkinase Domäne; PTP Proteintyrosinphosphatase Domäne; Ca Proteinkinase C konservierte Region 2 für kalziumabhängige Phospholipidbindungen; GAP katalytische Domäne von GTPase aktivierenden Proteinen; SH2 Src-homologe Region 2, SH3 Src-homologe Region 3; SOCS SOCS Box

In einigen Proteinen sind die SH2-Domänen als Tandem-Konstrukt arrangiert. Da sich die phosphorylierten Tyrosylreste für eine hochaffine Bindung an die SH2-Domänen dann in einer bestimmten räumlichen Orientierung zueinander befinden

müssen, wird die Spezifität der Bindung erhöht [23]. Beispiele von Proteinen mit einer solchen Anordnung sind die *spleen tyrosine kinase* (Syk), die regulatorische Untereinheit der Phosphatidyl-inositol-3 Kinase (PI3K) p85, die Phospholipase C γ (PLC γ) und die Proteintyrosinphosphatase SHP2 (Abbildung 2).

1.2. PTP-Domänen

Eine weitere Domäne, die abhängig von phosphorylierten Tyrosylresten bindet, ist die Proteintyrosinphosphatase (PTP)-Domäne. Sie besteht aus etwa 280 Aminosäuren. Nach ihrer Bindung an Sequenzabschnitte anderer Proteine mit phosphorylierten Tyrosylseitenketten werden diese dephosphoryliert. Für die enzymatische Aktivität der PTP-Domäne ist ein Cystein in der katalytisch aktiven Spalte wesentlich. Zur Charakterisierung der Substrate wurden von vielen Gruppen Punktmutanten generiert, in denen dieses Cystein, und optional andere Aminosäuren, ausgetauscht sind [24-27]. Bei der Bindung von Substraten kann dann keine Umsetzung mehr stattfinden und das Substrat bleibt an die PTP-Domäne gebunden (*substrate-trapping*).

Zur Klärung der Substratspezifität von Phosphatasen wurden vor allem mit Peptiden zahlreiche Studien durchgeführt ([28, 29], einen Überblick gibt [30]). Wurden die *substrate-trapping* Mutanten in Verbindung mit Zelllysaten eingesetzt, wurden zur Identifizierung oft Antikörper verwendet. Da sie meist voreingenommen ausgewählt wurden, konnten oft nur einzelne Substrate identifiziert werden [30].

Besonders in den letzten Jahren wurden viele Experimente mit hohem Durchsatz durchgeführt, um die Substratspezifität der Proteintyrosinphosphatasen besser zu verstehen [31-35]. Hierzu wurden beispielsweise Mikroarrays eingesetzt, in denen die Proteintyrosinphosphatasen jeweils zu spezifischen Mustern der dephosphorylierten Proteine führten, die ähnlich wie ein Fingerabdruck Auskunft über die Identität der PTP geben konnten [31].

In einer anderen Studie wurden die Strukturen von 22 PTPs aufgeklärt und in Kombination mit den bereits bekannten Strukturen analysiert [36]. Anhand der unterschiedlichen Oberflächenladungen konnte eine sekundäre Bindungsfläche beschrieben werden, die für die Spezifitäten mitverantwortlich ist.

Basierend auf den momentan verfügbaren Daten werden die Aktivität und Spezifität der Proteintyrosinphosphatasen von mehreren Faktoren bestimmt [37]:

- Phosphorylierung
- Proteolyse
- Bindung an andere Proteine
- die intrinsische Spezifität der PTP-Domäne
- die subzelluläre Lokalisierung der PTPs und ihrer Substrate.

2. SHP2

Die humane SH2-enhaltende Proteintyrosinphosphatase (SHP) 2 besteht aus 593 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 68 kDa [38, 39]. Sie ist aus zwei aufeinanderfolgenden (Tandem) SH2-Domänen aufgebaut, an die sich eine klassische PTP-Domäne anschließt (Abbildung 3). In ihrer C-terminalen Region befinden sich zwei Tyrosylreste, die nach ihrer Phosphorylierung als Bindungsstelle für Proteine mit SH2-Domänen dienen können. Weiterhin sind in der C-terminalen Region eine prolinreiche Region und auch optional phosphorylierte Seitenketten von Serinen enthalten, deren Funktion bisher nicht genau aufgeklärt ist und die Bindungsstellen für andere Domänen sein könnten [40].

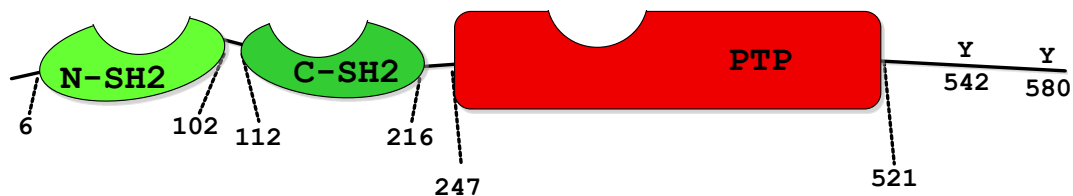


Abbildung 3 SHP2 ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut

Im N-terminalen Teil sind zwei SH2-Domänen als Tandem nacheinander geschaltet. Nach einer flexiblen Verbindung folgt die PTP-Domäne. An diese schließt die C-terminalen Region an, in der sich u.a. zwei phosphorylierbare Tyrosylreste (Y) befinden.

Die Phosphatase SHP2 kann ihre Funktion durch verschiedene Mechanismen ausüben. Einerseits kann sie durch die Aktivität ihrer PTP-Domäne und die resultierende Dephosphorylierung von Zielproteinen agieren. Andererseits fungiert sie auch mittels der beiden SH2-Domänen und der beiden phosphorylierbaren Tyrosylseitenketten im C-terminalen Teil als Adapter und kann Proteine durch die Bindung in räumliche Nähe zueinander bringen [15].

SHP2 ist ein in Zellen von Säugetieren ubiquitär exprimiertes, zytosolisches Protein. Alternative Bezeichnungen sind beispielsweise *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11* (PTPN11), Syp, PTP2C oder PTP-1D. Diese Phosphatase hat

diverse Funktionen in der Regulation von Entwicklung, Differenzierung, Migration und dem Überleben von Zellen [15]. Das SHP2 codierende Gen ist *PTPN11* und auf dem langen Arm von Chromosom 12 an Position 24 lokalisiert. Sind *PTPN11* oder wesentliche Teile davon (Exon 3) deletiert, sterben die Embryos von *knock-out* Mäusen noch vor der Geburt [41, 42], was die Bedeutung von SHP2 während der Entwicklung unterstreicht.

Die Modulation von Signalen durch SHP2 wurde auch beispielsweise während der Apoptose [43], in embryonalen Stammzellen [44] und innerhalb der Immunantwort [45] gezeigt. Nach der Stimulation von Zellen durch Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Zell-Zellkontakte modifiziert SHP2 die Propagation der Signale [15, 46-48]. Das Ausmaß der Einflussnahme von SHP2 auf die Signalwege ist abhängig vom Zelltyp und außerdem vom Ursprung des Signals. In hämatopoetischen Zellen beispielsweise führt der *knock-down* von SHP2 zu verminderten Wachstumsfaktor-induzierten MAPK, Jak/STAT und PI3K Signalwegen. Insbesondere ist die Phosphorylierung der *extracellular regulated kinase* (Erk) und der Proteinkinase B (PKB) reduziert und die von STAT3 und STAT5 erhöht [49]. In Neuronen ist SHP2 für die vollständige Aktivierung der Ras/Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalkaskade nach der Stimulation durch den Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* BDNF notwendig [50].

Auch in anderen Zelltypen kann SHP2 den Jak/STAT Signalweg negativ regulieren. Die Ras/MAPK Signalkaskade, und damit die Erk Aktivität, wird nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine durch SHP2 positiv moduliert [15, 51-54].

Die jeweiligen molekularen Mechanismen der Wirkung von SHP2 sind bisher nicht vollständig aufgeklärt, für die Ras-vermittelte Erk-Aktivierung nach der Stimulation durch Wachstumsfaktoren werden gegenwärtig drei Modelle diskutiert ([15, 55], Abbildung 4):

1. SHP2 inhibiert durch die Dephosphorylierung der Bindungsstellen von Rezeptoren, oder vom Adapterprotein Gab, die Rekrutierung von RasGAP. RasGAP kann dann die intrinsische GTPase Aktivität von Ras nicht mehr aktivieren, welches dadurch aktiv bleibt.
2. Proteine der Src-Familie Kinasen (SFK) regulieren Ras auf bisher unbekannte Weise. SHP2 dephosphoryliert die Bindungsstellen von Rezeptoren und Adapterproteinen für Kinasen wie Csk, welche die inhibitorischen Tyrosylseitenketten von SFK phosphorylieren können.

3. Sprouty Proteine inhibieren abhängig von ihrer Phosphorylierung die Aktivierung von Ras, indem sie an den GrbSOS-Komplex binden und damit dessen Interaktion mit Ras verhindern.

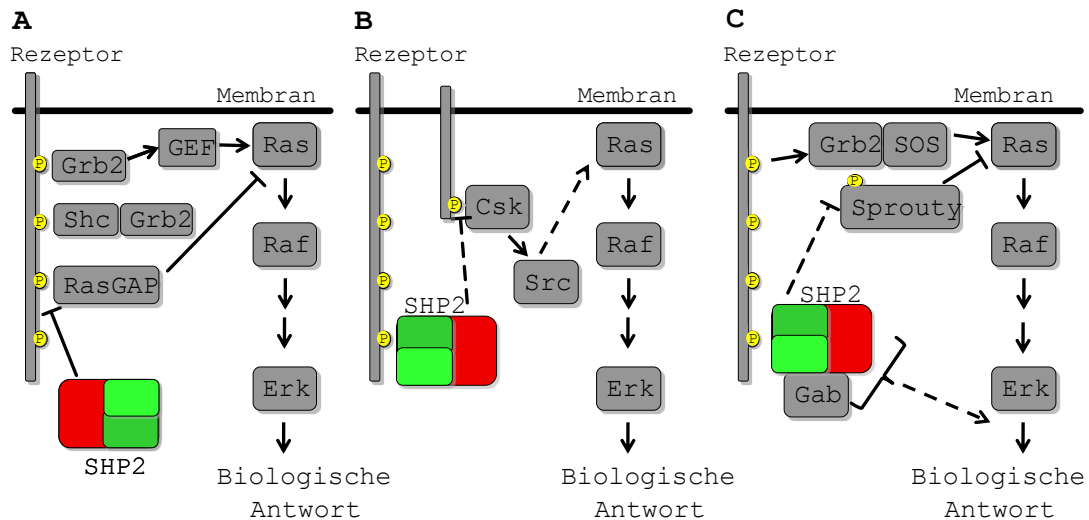


Abbildung 4 Modelle der positiven Regulation durch SHP2

Mögliche molekulare Mechanismen über die SHP2 die Ras-vermittelte Erk-Aktivierung nach der Stimulation durch Wachstumsfaktoren positiv beeinflussen kann. Details siehe Text (modifiziert nach [15, 55]).

2.1. Regulation der Aktivität von SHP2

Die Kristallstruktur von SHP2 zeigt die Phosphatase in einer auto-inhibierten Form [56]. Hauptsächlich auf Basis dessen in Kombination mit den in 1998 publizierten Daten wurde ein Modell der Aktivierung beschrieben [57]: Ohne Stimulation durch die Bindung von Peptiden mit phosphorylierten Tyrosylresten liegt SHP2 inaktiv vor. Die N-terminale SH2-Domäne interagiert mit der PTP-Domäne. Dadurch ist die Bindungsstelle der N-terminalen SH2-Domäne in ihrer Erreichbarkeit für potentiell interagierende Proteine beeinträchtigt, aber vor allem ist die katalytische Spalte der PTP-Domäne für Substrate nicht zugänglich.

Schon die Bindung von einem monophosphorylierten Peptid erhöht die Aktivität der Phosphatase etwa dreifach, während die Bindung der SH2-Domänen an ein Peptid mit zwei phosphorylierten Tyrosylresten die Aktivität etwa 100fach erhöht [58, 59].

Kürzlich wurden Molekulardynamiksimulationen des Öffnungsmechanismus von SHP2 veröffentlicht [60]. Die Bindung der SH2-Domänen an ein Peptid scheint die für die Aktivität notwendigen Konformationsänderungen der Phosphatase zu

induzieren. Außerdem lassen die Simulationen eine wesentliche Beteiligung der C-terminalen SH2-Domäne bei der Konformationsänderung vermuten. Weiterhin wurde auch die Kristallstruktur der geöffneten SHP1 publiziert [61], die das Modell des Öffnungsmechanismus stützen. Die Struktur zeigt deutliche Konformationsänderungen der geschlossenen gegenüber der aktiven Form von SHP1. Die offene Form der Phosphatase, in der Substrate Zugang zur katalytischen Spalte haben, wird durch Wechselwirkungen der beiden SH2-Domänen miteinander stabilisiert. Aufgrund der hohen Homologie der beiden SHP stützt dies die durch die Simulationen gewonnenen Erkenntnisse für SHP2.

Allerdings sind die Proteine, die eine Konformationsänderung von SHP2 auslösen können, noch nicht vollständig beschrieben.

Zusätzlich kann SHP2 durch intramolekulare Interaktionen in ihre aktivierte Form übergehen. Dabei binden die SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosylreste 542 und 580 im C-terminalen Teil [62]. Die Möglichkeiten der Aktivierung sind zur Übersicht in Abbildung 5 dargestellt.

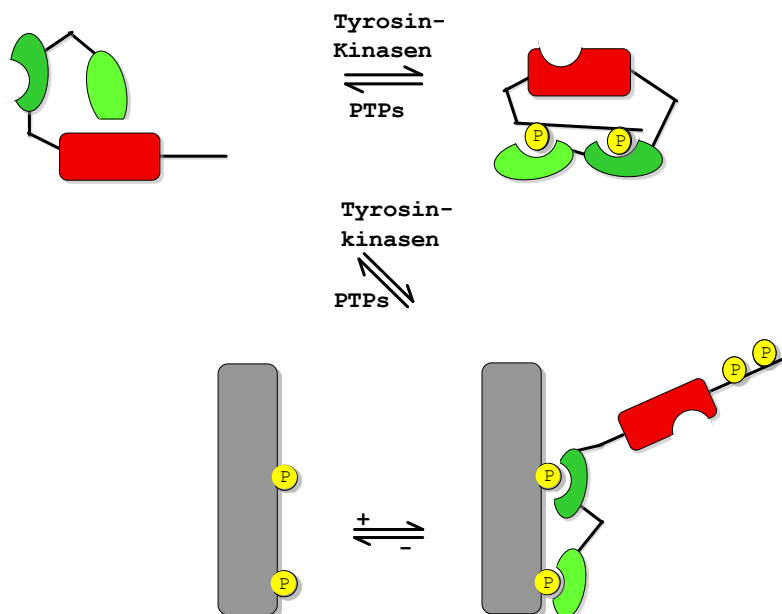


Abbildung 5 Aktivierungsmechanismus von SHP2

links auto-inhibierte Form von SHP2 mit nicht zugänglicher PTP-Domäne (rot), rechts aktivierte Form, oben: in der die SH2-Domänen (grün) an die phosphorylierten Tyrosine im C-terminalen Teil der Phosphatase binden, unten: in der die SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine eines Interaktionspartners (grau) binden (modifiziert nach [15]).

Auch die Substratspezifität von SHP2 ist nicht stringent. Daher sind neben der Autoinhibition noch andere regulatorische Mechanismen nötig [63]. Die Regulation

der subzellulären Lokalisierung kann durch die Bindung der SH2-Domänen an andere Proteine erfolgen. SHP2 kann beispielsweise durch Rezeptoren oder das Signal-regulatorische Protein α (SIRP) zur Zellmembran rekrutiert werden [15, 48, 55, 64]. Natürlich sind auch die Affinitäten von SHP2 zu interagierenden Proteinen und deren lokale Verfügbarkeit für die Funktion von SHP2 entscheidend.

2.2. Interaktionen von SHP2

SHP2 besteht aus drei Domänen, die abhängig von phosphorylierten Tyrosylresten mit anderen Proteinen interagieren können (Abbildung 3). Hierbei ist die Interaktion der PTP-Domäne nur sehr transient, die Interaktionen der SH2-Domänen hingegen relativ stabil. Im Allgemeinen sind für die Bindung der Tandem SH2-Domänen von SHP2 jeweils die Aminosäurereste -2 bis +5 um einen phosphorylierten Tyrosylrest wichtig [56, 65]. Für die Interaktion der N-terminalen SH2-Domäne an pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β liegen sowohl eine Kristallstruktur als auch Molekulardynamiksimulationen vor [65, 66]. Die Interaktionen der einzelnen SH2-Domänen mit diesem Motiv zeigen, dass ihre Spezifitäten auch überlappen können [59, 67, 68]. Mit der optimierten *substrate-trapping* Mutante D425A/C459S konnten beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und das Adapterprotein *Grb2-associated binder* (Gab1) als Substrate identifiziert werden [69]. Unter Verwendung von *substrate-trapping* Mutanten haben alle drei Domänen die Möglichkeit, stabile Interaktionen mit bestimmten Motiven auszubilden, die phosphorylierte Tyrosylseitenketten enthalten. Schon aufgrund der überlappenden Spezifitäten der SH2-Domänen sind die Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen sehr vielfältig und komplex, woraus sich eine große Herausforderung in der Beschreibung der Interaktionen ergibt.

Die bekannten Interaktionspartner können oft frühen Zeitpunkten nach der Stimulation durch Wachstumsfaktoren zugeordnet werden. Es sind Membranproteine wie die Rezeptoren selbst und SIRP α , Adapterproteine wie die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und Gab-Proteine und auch Transkriptionsfaktoren wie STAT (Abbildung 6). Außerdem sind auch die GAP von Ras und Rho bekannte Substrate [70].

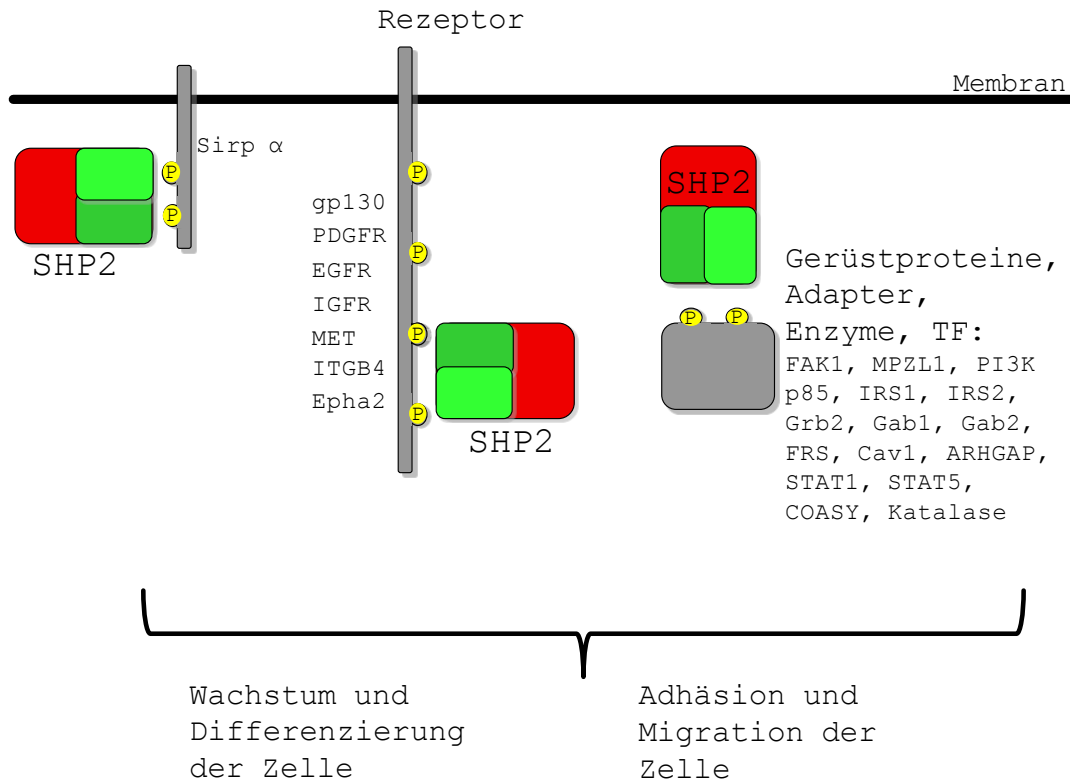


Abbildung 6 **Einige bekannte Interaktionspartner von SHP2** (modifiziert nach [55]).

Die SH2-Domänen wurden oft als einzelne Domänen unabhängig voneinander untersucht. Jedoch unterscheiden sich die Bindungseigenschaften der Tandem SH2-Domänen von denen der einzelnen Domänen [23, 58, 59]. Die Tandem SH2-Domänen verhalten sich sogar anders als die komplette SHP2 [71], was wahrscheinlich durch die Autoinhibition erklärbar ist.

Die Aktivierung von SHP2 durch die Bindung an ein phosphoryliertes Protein ist in Abbildung 5 sehr stark vereinfacht dargestellt. In Abbildung 7 ist die kombinatorische Vielfalt der Interaktionsmöglichkeiten detaillierter am Beispiel der Bindung der multivalenten SHP2 an nur einen Rezeptor dargestellt [72]. Zur weiteren Vereinfachung des komplexen Zusammenspiels wird eine membranennahe Phosphorylierungsstelle als Substrat für die PTP-Domäne angenommen und nur die weiter von der Membran entfernte Phosphorylierungsstelle als Bindungspartner der SH2-Domänen betrachtet. Die Rekrutierung von SHP2 aus dem Zytosol (Abbildung 7 A) kann durch eine von der Konformation unabhängige Bindung der C-terminalen SH2-Domäne an den Rezeptor erfolgen. Für die Bindung der N-terminalen SH2- oder der PTP-Domäne an den Rezeptor dagegen die offene Form von SHP2 notwendig.

Abbildung 7 zeigt die hypothetischen Komplexe, die bei der Beteiligung von zwei (B) und drei (C) der Domänen an der Interaktion mit dem Rezeptor gebildet werden können [72].

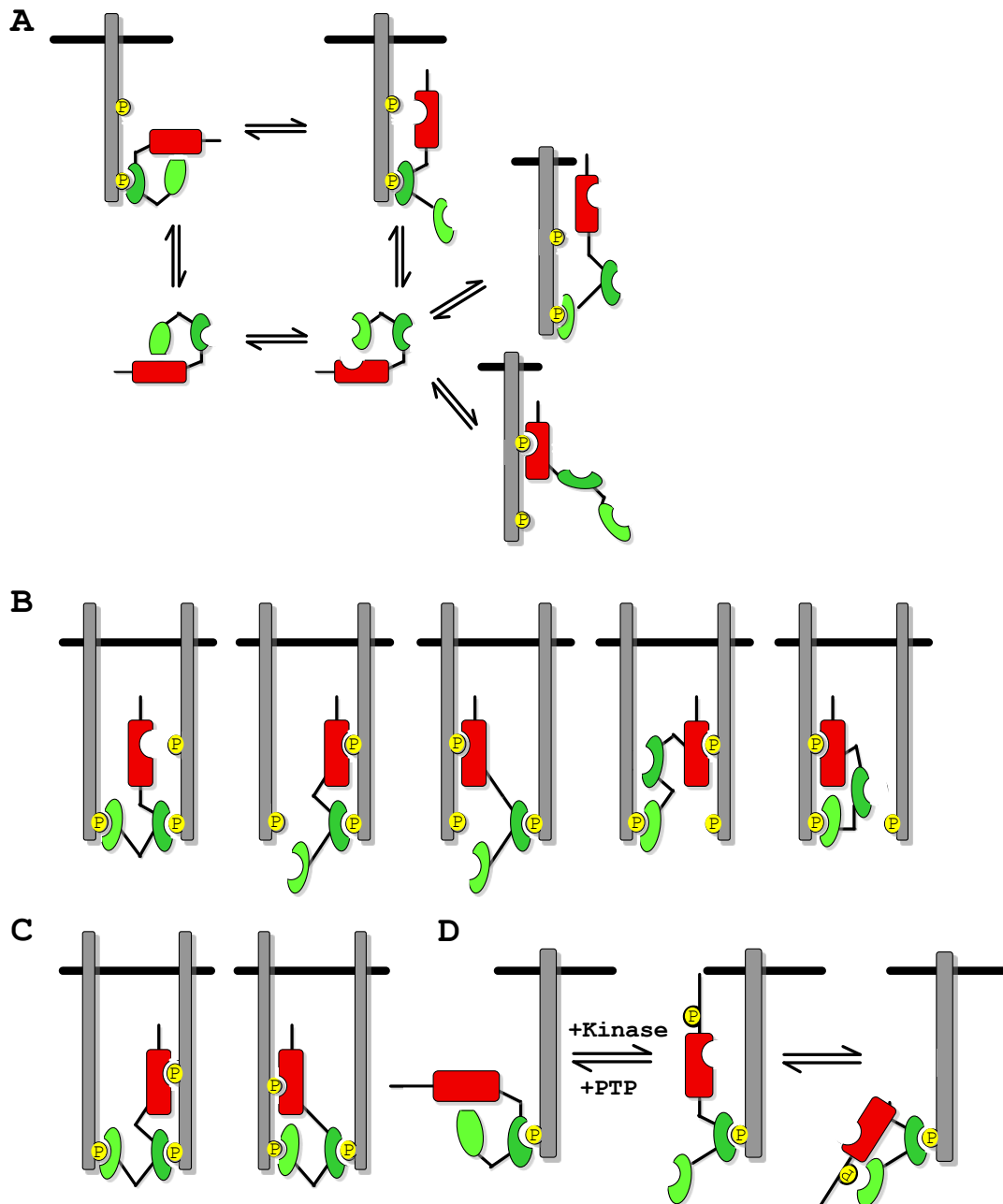


Abbildung 7 Kombinatorische Komplexität der Interaktion von SHP2 mit einem Rezeptor

A Rekrutierung von SHP2 aus dem Zytosol, PTP-Domäne und N-terminale SH2-Domäne können nur in der offenen Form an den Rezeptor binden. B Mögliche Komplexe, in denen beide SH2-Domänen an den Rezeptor binden. C Mögliche Komplexe, in denen alle 3 Domänen mit dem Rezeptor interagieren. D Die Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung von SHP2 könnte die offene Form von SHP2 durch die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne begünstigen (modifiziert nach [72]). Rezeptor grau, SH2-Domänen grün, PTP-Domäne rot

Wird durch den Rezeptor die Phosphorylierung der gebundenen SHP2 vermittelt, könnte möglicherweise durch eine intramolekulare Interaktion der N-terminalen SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosin 542 die offene, aktive Form begünstigt werden (D).

Die Bindung von SHP2 an nur einen Rezeptor bietet schon viele verschiedene Interaktionsmöglichkeiten. Die Komplexität wird noch weiter erhöht, da SHP2 mit verschiedenen Rezeptoren und auch zytosolischen Proteinen, die bisher relativ unvollständig beschrieben sind, interagieren kann. Außerdem wird oft nicht zwischen Bindungspartner und Substrat differenziert. Die Bindungspartner müssen aber nicht immer auch Substrat und die Substrate nicht zwangsläufig Bindungspartner sein. Eine der Funktionen von SHP2 in der Signaltransduktion ist es, über die SH2-Domänen Komplexe zusammenzustellen. Daher ist die Kenntnis der Bindungspartner essentiell für ein besseres Verständnis.

2.3. Krankheiten

Jeweils einzelne Punktmutationen im SHP2 codierenden Gen *PTPN11* wurden bei etwa der Hälfte der Patienten mit Noonan Syndrom gefunden. Das Noonan Syndrom ist eine Krankheit, die sich durch Entwicklungsstörungen auszeichnet und 1968 zuerst beschrieben wurde [73]. Relativ oft auftretende Folgen der Entwicklungsstörungen sind innere und äußere Fehlbildungen, wie die des Herzens, Wachstumsstörungen und Minderwuchs (zusammenfassend beschrieben in [74-76]). Das Noonan Syndrom tritt mit einer Rate von 1:500 bis 1:2500 bei Geburten vergleichsweise häufig auf und ist außerdem der zweithäufigste Grund für angeborene Herzfehler.

Die meisten aufgrund der Mutationen ausgetauschten Aminosäuren befinden sich in der Interaktionsfläche der PTP mit der N-terminalen SH2-Domäne [77, 78]. Zur Übersicht der in den Mutanten geänderten Aminosäuren wurden diese in Abbildung 8 zusammengestellt.

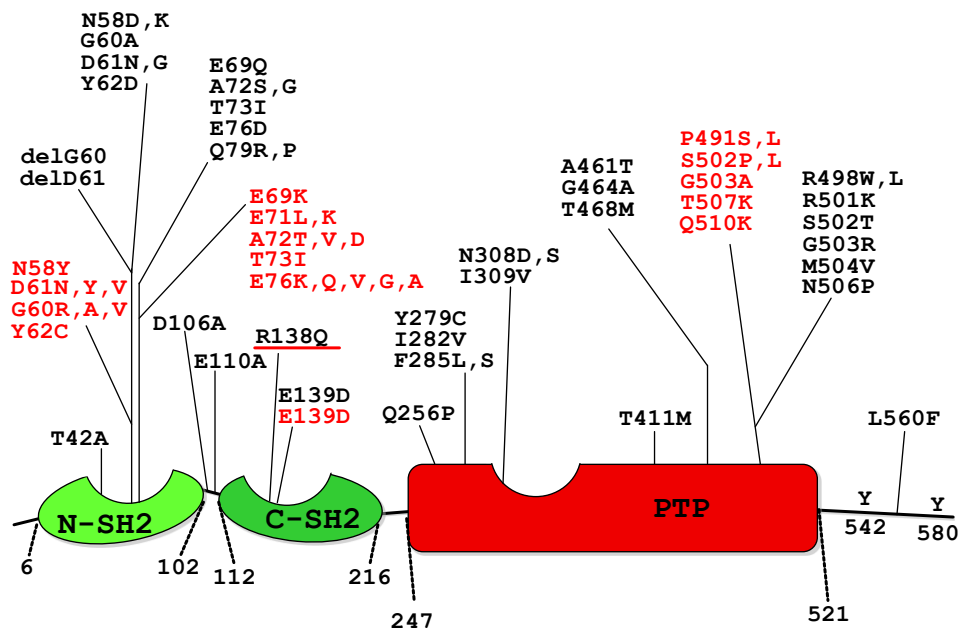


Abbildung 8 In Krankheiten ausgetauschte Aminosäuren von SHP2
Schematische Darstellung der Lage von ausgetauschten Aminosäuren bei Patienten mit Noonan Syndrom (schwarz) und Leukämien (rote Schrift).

Im Allgemeinen wird durch die Position der, nur einzeln vorkommenden Mutationen in der Interaktionsfläche der N-terminalen SH2-Domäne mit der PTP-Domäne eine gestörte Autoinhibition der Mutanten von SHP2 angenommen. Die geänderte Auto-Inhibition zieht eine Änderung der enzymatischen Aktivität nach sich und wird daher als Ursache der Krankheitssymptome bei dem Noonan Syndrom vermutet [77, 79]. Dies konnte für einige der krankheitsrelevanten Mutanten bereits bestätigt werden [80-82].

Einige der SHP2-Mutanten zeigen *in vitro* eine konstitutive Aktivität, deren Einfluss beispielsweise in einer verlängerten Erk2 Aktivierung nach EGF-Stimulation deutlich wird [71, 83, 84]. In Kardiomyozyten verstärken konstitutiv aktive Mutanten von SHP2 die Kalziumoszillation nach der Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen [85]. Ein Mausmodell des Noonan Syndroms, in dem die D61G Variante von SHP2 exprimiert wird, zeigte zelltypspezifische Effekte auf den MAPK Signalweg, die zusätzlich von der Stimulation abhängig sind [86]. Auch die Expression der Q79R Variante von SHP2 in Kardiomyozyten während der Gestation führt zu einer Hyperphosphorylierung von Erk [87].

Eine seltene Krankheit, bei der bei mehr als 80% der Patienten ebenfalls Mutationen in *PTPN11* vorkommen, ist das dem Noonan Syndrom ähnelnde LEOPARD Syndrom. Sein Name leitet sich aus den häufigsten Symptomen her

(Lentiginose, **E**KG-Veränderungen, **O**kularer Hypertelorismus, **P**ulmonalstenose, **A**nomalien der Geschlechtsorgane, **R**etardiertes Wachstum und Taubheit (*deafness*)). Die Lage der Mutationen ist vorrangig in der PTP-Domäne codierenden Region in der Nähe des Cysteins 459 (Y279C, S; A461T; G464A; T468M; R498L, W; Q506P; Q510E, P, R) [88-90]. Die negative Beeinflussung der katalytischen Eigenschaften durch diese Mutationen in SHP2 wurde nachgewiesen. Die Mutationen wirken sich dominant negativ auf den von Wachstumsfaktoren induzierten Erk Signalweg aus. Dieses unterscheidet sie von einigen konstitutiv aktiven Mutanten, die bei Patienten mit Noonan Syndrom gefunden wurden [91].

PTPN11 ist weiterhin das erste beschriebene, eine Phosphatase codierende Proto-Onkogen [82, 92, 93]. Mutationen in *PTPN11* spielen eine Rolle bei Leukämien im Kindesalter, wie der juvenilen myelomonozytischen Leukämie (JMML) [82]. Auch die hier vorkommenden Austausche von Aminosäuren sind in Abbildung 8 zusammengestellt. Für Patienten mit Noonan Syndrom wird eine Prävalenz für JMML vermutet [55]. Weiterhin wurde eine Mutation in *PTPN11* (R138Q) in Melanomen beschrieben [94]. Nicht nur Mutanten von SHP2 können zur Entstehung von Krebs beitragen, sondern auch das wildtyp Protein ist nach einer Infektion mit *Helicobacter pylori* mit der Entwicklung von Magenkarzinomen assoziiert [95].

Die in den verschiedenen Krankheiten gefundenen Mutationen wirken sich teilweise sogar gegensätzlich auf die Aktivität von SHP2 aus, resultieren dennoch oft in einer verstärkten Aktivierung von Erk und letztendlich in ähnlichen Phänotypen [96]. Ein detaillierteres Verständnis der molekularen Funktionen von SHP2 ist notwendig, um die Ursachen der durch die Mutationen veränderten Eigenschaften erkennen zu können. Hierzu wären Kenntnisse der Interaktionspartner von SHP2 von Vorteil.

3. Zielsetzung

Die Proteintyrosinphosphatase SHP2 kann das Überleben von Zellen, deren Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Hierbei reguliert sie durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Integrine induzierte Signalwege. Punktmutationen in *PTPN11* können Krankheiten wie Noonan Syndrom, Leukämien oder Melanome hervorrufen. In der Literatur wurden im Allgemeinen eine gestörte Autoinhibition der Mutanten von SHP2 und die dadurch geänderte enzymatische Aktivität als Ursache der Krankheitssymptome angenommen [77, 79]. Für einige der krankheitsrelevanten Mutanten wurde dies auch bereits gezeigt [80-82]. Jedoch können so nicht die Effekte aller Punktmutanten erklärt werden. Es ist daher zu vermuten, dass nicht nur die intramolekularen, sondern auch die intermolekularen Wechselwirkungen verändert werden. Für die Bindung an IRS1 konnte dies für einzelne Punktmutanten gezeigt werden [71]. Um die differentiellen Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion von SHP2 detaillierter beschreiben zu können, ist ein tieferes Verständnis der Interaktionen dieser Phosphatase mit anderen Proteinen notwendig.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur vereinzelte Substrate und Bindungspartner von SHP2 bekannt. Deshalb war vor allem die systematische, unvoreingenommene Untersuchung der Interaktionspartner von großem Interesse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen der Tandem SH2-Domänen, die zur Rekrutierung der PTP-Domäne zu ihren Zielmolekülen dienen, mit anderen Proteinen analysiert. Neben der Identifizierung neuer Interaktionspartner stand hierbei die Analyse der Bindungseigenschaften von krankheitsrelevanten Punktmutanten in den SH2-Domänen im Vergleich zu den wildtyp Domänen im Vordergrund.

3.1. Strategie

Um die in Kapitel I.3 genannten Ziele zu verwirklichen wurde die folgende Vorgehensweise gewählt:

- Klonierung des N-terminalen Teils von SHP2 (die beiden SH2-Domänen)
- Ortsspezifische Mutagenese der für die SH2-Domänen codierenden Sequenz
- Expression und Reinigung der SH2-Domänen und resultierenden Punktmutanten
- Interaktionsstudien der SH2-Domänen mit Peptiden auf Oberflächen
- Interaktionsstudien mit Proteinen aus Lysaten von Zellen
- Analyse des Interaktoms mit einer LTQ-Orbitrap (online HPLC-ESI-MS/MS)

II. Materialien

1. Chemikalien und Fertiglösungen

Die Chemikalien und Fertiglösungen wurden in p.a. Qualität verwendet und wenn nicht anders erwähnt von einer der folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH, Biozym Scientific GmbH, Biomol GmbH, BioRAD Laboratories GmbH, Fluka Chemie GmbH, GE Co., Invitrogen GmbH, Merck KGaA, Millipore GmbH, Perkin Elmer GmbH, Qiagen GmbH, Promega GmbH, Riedel-de-Haën GmbH, Roche Deutschland Holding GmbH, Carl Roth GmbH, Serva GmbH, Sigma-Aldrich Co.

Name	Hersteller / Bezugsquelle
Acrylamid 30%	AppliChem GmbH
Agar	Invitrogen GmbH
Agarose	Sigma-Aldrich Co.
Ampicillin	Sigma-Aldrich Co.
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Co.
Bromphenolblau	Merck KGaA
Bradford Reagenz	BioRAD Laboratories GmbH
BSA	Serva GmbH
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich Co.
DMSO	Fluka Chemie GmbH
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH
DTT	Sigma Chemicals Co.
EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH
Ethanol absolute	Riedel de Haen GmbH
Ethidiumbromid	Merck KGaA
FCS	Biochrom KG
Gentamycin	Sigma-Aldrich Co.
Glutathion-Agarose 4B	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG
Glutathion-Sepharose 4B	GE Co.
Harnstoff	ICN Biomedicals
Immobiline DryStrip Cover Fluid	GE Co.
IPG Puffer, pH 3-10	GE Co.
IPTG	ICN Biomedicals GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
LB-Medium	Carl Roth GmbH
Lysozym	Sigma Chemicals Co.
L-Arginin	Carl Roth GmbH
L-Arg-13C6 HCl 98%	Sigma-Aldrich Co.
L-Arg-13C6,15N4 HCl 98%	Sigma-Aldrich Co.
L-Lysin	Carl Roth GmbH
L-Lys-4,4,5,5-d4 HCl 98% D	Sigma-Aldrich Co.
L-Lys-13C6,15N2 HCl 98%	Sigma-Aldrich Co.
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Natriumthiosulfatpentahydrat	Carl Roth GmbH
Pen/Strep	PAA Laboratories GmbH
Polyethylenglycol	Sigma Chemicals GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
Trypan-Blau	Sigma Chemicals GmbH

2. Enzyme

Name	Hersteller / Bezugsquelle
Gateway BP-Klonase	Invitrogen GmbH
Gateway LR Klonase® II	Invitrogen GmbH
TrypsinGold	Promega Co.
Lys-C	Wako Chemicals GmbH
DNA-Restriktionsenzyme	MBI Fermentas oder NEB GmbH
DNA-Polymerasen	New England Biolabs GmbH
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs GmbH
Für alle enzymatischen Reaktionen wurden, wenn nicht gesondert beschrieben, jeweils die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und empfohlenen Bedingungen verwendet.	

3. Größenstandards

Name	Hersteller/Bezugsquelle
1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs GmbH
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs GmbH
Protein-Prestained-Marker	BioRAD Technologies GmbH

4. Western blot

Name	Hersteller / Bezugsquelle
PVDF-Membran	Pall Co.
Filterpapiere	Whatman GmbH
Immobilion Western Chemiluminescent	Millipore Co.
HRP Substrat	

5. Antikörper

Name	Beschreibung/Hersteller
m α -pY 99	polyklonaler Antikörper aus der Maus gegen Phosphotyrosin-Motive, Santa Cruz Biotechnology Inc.
m α -Phospho - Tyrosin 4G10	polyklonaler Antikörper aus der Maus gegen phosphorylierte Tyrosinmotive, Millipore GmbH
rb α -STAT3 C20	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen STAT3 Santa Cruz Biotechnology Inc.
m α -V5	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den V5-Tag, Invitrogen GmbH
g α -Maus	polyklonales Ziegen-Antiserum gegen konstante Anteile von Kaninchen-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase, DAKO Deutschland GmbH
g α -Kaninchen	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase DAKO Deutschland GmbH

6. Eukaryontische Zellen

Name	Beschreibung
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten, adhären in Einzelschichten wachsend, von der Hautklinik Aachen zur Benutzung überlassen
HeLa	humane epithelial-artige Zellen, isoliert aus einem Cervixkarzinom, adhären wachsend (DSMZ GmbH)

7. Prokaryontische Zellen

Die verwendeten *Escherichia coli* Stämme wurden von Invitrogen GmbH bezogen.

Name	Verwendungszweck
BL21	Expression der pGEX-Vektoren
DB3.1	Amplifikation der Gateway Zielvektoren mittels Negativselektion
DH5 α	Amplifikation der Vektoren
Top10	Amplifikation der TOPO-Vektoren

8. Plasmide

Name	Beschreibung/Bezugsquelle
pCR8/GW/TOPO	Der Vektor ermöglicht den rekombinations-basierten Transfer eines durch <i>Taq</i> -Polymerase amplifizierten PCR-Produkts, in dem dieses von <i>attL</i> Sequenzen flankiert wird, in einen beliebigen Gateway(GW) Zielvektor mit <i>attR</i> Rekombinationssequenzen. Die Selektion wird durch Spektinomycin-Resistenz ermöglicht. Invitrogen GmbH.
pCBC-Syp-myc wt	Dieser Vektor diene als Template zur Amplifikation des für den N-Terminale die Tandem SH2-Domänen codierenden Bereiches von SHP2 (AS 2-220). U. Lehmann
pCBC-Syp-myc R32A	Dieser Vektor diene als Template zur Amplifikation des für Aminosäuren 2-220 codierenden Bereiches der Punktmutante R32A von SHP2. U. Lehmann
pCBC-Syp-myc R138A	Dieser Vektor diene als Template zur Amplifikation des für Aminosäuren 2-220 codierenden Bereiches der Punktmutante R138A von SHP2. U. Lehmann
pCBC-Syp-myc R32A, R138A	Dieser Vektor wurde als Template zur Amplifikation des für die Tandem SH2-Domänen codierenden Bereiches der Punktmutante R32A und R138A von SHP2 (AS 2-220) verwendet. U. Lehmann
pGEX-GW	Dieser Vektor ist ein GW-Zielvektor. Er basiert auf pGEX-4T2 (GE Co.), in dessen MCS eine GW-Kassette mit <i>attR</i> Rekombinationssequenzen im Leseraster A (RfA) inseriert wurde. Nach dessen Insertion erlaubt er die durch IPTG induzierbare Expression eines N-terminal GST markierten Proteins unter Kontrolle eines <i>tac</i> Promotors und dem <i>lac</i> Operator. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin Resistenz. R. Lilischkis

Name	Beschreibung/Bezugsquelle
pGEX-GW tSH2 wt	pGEX-GW, in den der für die SHP2 Tandem SH2-Domänen codierende Bereich über LR GW rekombiniert wurde
pGEX-GW tSH2 R32A	R32A Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt,
pGEX-GW tSH2 T42A	T42A Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 D61V	D61V Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 D61Y	D61Y Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 E76K	E76K Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 D106A	D106A Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 R138A	R138A Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 R138Q	R138Q Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 E139D	E139D Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pGEX-GW tSH2 RARA	R32A/R138A Punktmutante von pGEX-GW tSH2 wt
pcDNA3.1-tSH2 V5-His	Dieser Vektor erlaubt die Expression des C-terminal V5-His6 markierten, für die Tandem SH2-Domänen codierenden Bereiches von SHP2 (AS 2-220) in eukaryotischen Zellen. J. Günther.
pcDNA3.1-tSH2 R32A V5-His	R32A Punktmutante von pcDNA3.1-tSH2 V5-His. J. Günther.
pcDNA3.1-tSH2 R138A V5-His	R138A Punktmutante von pcDNA3.1-tSH2 V5-His, J. Günther
pcDNA3.1-tSH2 R32A, R138A V5-His	R32A/R138A Punktmutante von pcDNA3.1-tSH2 V5-His. J. Günther.

9. Primer

Nachfolgend sind die verwendeten Primer und deren Sequenzen aufgelistet. Alle Primer wurden von MWG Biotech bezogen. Die eingefügten Nukleotide bzw. die für die mutierten Aminosäuren codierenden Nukleotide sind rot dargestellt.

Primer	Sequenz (5' → 3')
Klonierung	
SHP2NtermFu f (ohne Startcodon)	ATGACAATCATGACATCGCGGAGATGGTTTCACCC
SHP2SH2Cterm-STOP r (Einführung STOPcodon)	TCAACGAGTCGTGTTAAGGGGCTGCTTGAGTTG
Mutagenese	
T42A f	GTAACCCTGGAGACTTCGCACTTTCCGTTAGAAGAAATGG
T42A r	CCATTTCTTCTAACGGAAGTGCGAAGTCTCCAGGGTTAC
D61V f	CAAGATTCAGAACACTGGTGTCTACTATGACCTGTATGGA
D61V r	TCCATACAGGTCATAGTAGACACCAGTGTTCTGAATCTTG
D61Y f	CAAGATTCAGAACACTGGTTATTACTATGACCTGTATGGA
D61Y r	TCCATACAGGTCATAGTAATAACCAGTGTTCTGAATCTTG
E76K f	TTTGCCACTTTGGCTAAGTTGGTCCAGTATTAC
E76K r	GTAATACTGGACCAACCTTAGCCAAAGTGGCAAA
D106A f	ATATCCTCTGAACTGTGCAGCTCCTACCTCTGAAAGGTGG
D106A r	TTCAGAGGTAGGAGCTGCACAGTTCAGAGGATATTTAAGC
R138Q f	GGTAGTTTTCTTGTAACAAGAGAGCCAGAGCCAC
R138Q r	GTGGCTCTGGCTCTCTTTGTACAAGAAACTACC
Sequenzierung	
GW1 f	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC

10. Peptide

Alle Peptide sind am N-Terminus biotinyliert und wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Schneider-Mergener (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Name	Sequenz
PDGF-Rezeptor β pY751	β -A-KDESVDpYVPMLDMK
PDGF-Rezeptor β pY763	β -A MKGDVKpYADISSN
PDGF-Rezeptor β pY1009	β -A DTSSVLpYTAVQPNE
gp130 pY759	β -A TSFTVQpYSTVVHSGYRHQVPSV
gp130 Y759	β -A TSFTVQYSTVVHSGYRHQVPSV

11. Geräte und Säulen

Gerät/Säule	Hersteller
Sonifier	Branson Ultraschall GmbH
Aekta Explorer	GE Co.
Säulen: GStrap™ 1 ml	GE Co.
Agilent 1200 nanoflow HPLC System	Agilent
LTQ-Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific GmbH
Säulenmaterial: Reverse Phase ReproSil-Pur C18-AQ 3 μ m	Dr. Maisch GmbH
Imagequant LAS 4000	GE Co.
J-600 Spektropolarimeter (CD)	Jasco Co.
CASY	Roche Innovatis AG
ProteOn und NLC Sensor Chip	BioRAD Technologies GmbH
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific GmbH
Agilent 3100 OFFGEL Fractionator	Agilent
IPG Dry Streifen (13 cm, pH3-10)	GE Co.
Sepak C18 Säulen	Waters Co.

12. Medien und Lösungen für Kulturen

Medium	Zusammensetzung
Kompetenzmedium für Bakterien	10% Polyethylenglycol 3350 5% DMSO 100 mM MgCl ₂ in LB-Medium (gefiltert: 0,22 μ m, 4°C)
Selektions-Agar-Platten	15 g Agar 1 Liter LB-Medium Selektionsantibiotikum Ampicillin (100 μ g/ml) oder Spectinomycin (50 μ g/ml)
Trypsin/EDTA	Lonza Verviers Sprl
FCS (fötales Kälber Serum)	Cytogen GmbH
FCS, dialysiert	Gibco GmbH
Dulbecco's modified Eagle Medium (D-MEM): 4,5 g/L Glukose, Glutamax, Na-Pyruvat	Invitrogen GmbH
D-MEM für SILAC	D-MEM ohne Arginin und Lysin, Invitrogen GmbH

Medium	Zusammensetzung
Medium für nhDF/HeLa-Zellen	60 mg/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 10% (w/v) FCS in DMEM
SILAC-Medium	30 mg/L N-,M- oder H L-Arg 45 mg/L N-,M- oder H Lys 200 mg/L Prolin 60 mg/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 10% dialysiertes FCS in DMEM für SILAC
Opti-MEM I	Invitrogen GmbH

13. Kits

Name	Hersteller/Bezugsquelle
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH
QIAEX II Gel-Extraction-Kit	Qiagen GmbH
Quickchange site-directed mutagenesis	Stratagene Co.
pCR8/GW/TOPO-Klonierungsskit	Invitrogen GmbH
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH

14. Stimulation

Name	Konzentration
IL-6 und gp80	200 U/ml und 500ng/ml DMEM
OSM	5 ng/ml DMEM
PDGF	5 ng/ml DMEM
EGF	5 ng/ml DMEM
Pervanadat	1 mM/ml DMEM einer frisch angesetzten Lösung: 100 mM Na-Vanadat 0,01% H ₂ O ₂ in PBS

15. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
ABC	50 mM Ammoniumbicarbonat (NH ₄ HCO ₃)
AC-Elutionspuffer	10 mM Glutathion (reduziert) 5 mM DTT 150 mM NaCl (optional) 20 mM HEPES pH 8
AC-Waschpuffer	150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7,5
Ampholytlösung	5% Glyzerin IPG Puffer (1:50)

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	20% MeOH 0,3 M Tris pH 10,4
Anodenpuffer II	20% MeOH 25 mM Tris pH 10,4
Blockierungspuffer	10% BSA in TBS-N
Blot-Regenerationslösung	62,5 M Tris-HCl pH 7,6 2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung	0,006% Coomassie-Brilliant Blue G250 in Entfärbelösung
Dialysepuffer	150 mM NaCl 20 mM DTT 20 mM HEPES pH 7,5
DNA-Ladepuffer (6 x)	2 mM EDTA 2,5 mg/ml Bromphenolblau 80% Saccharose 20 mM Tris-HCl pH 8,0
Elutionspuffer:	4% SDS 100 mM DTT 20 mM Tris pH 7,5
Entfärbelösung	15% Essigsäure 25% Isopropanol in MilliQ-Wasser
Fixierlösung	10% Essigsäure 25% Isopropanol in MilliQ-Wasser
Harnstoff-Lysepuffer	8 M Harnstoff 0,1 M DTT 50 mM Tris oder HEPES pH 7,5
Harnstoffpuffer	8 M Harnstoff 20 mM Tris pH 7,5
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure 20% MeOH
Lysepuffer – Bakterien	100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 50 mM Tris-HCl pH 8,0

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer (modifizierter RIPA Puffer mit Protease- und Phosphatase- Inhibitoren)	150 mM NaCl 0,5% Nonidet 0,8 µM Pefabloc 10 µM Aprotinin 10 µM Leupeptin 10 µM Pepstatin 1 mM NaF 1 mM Na-Vanadat 50 mM Tris-HCl pH 7,5
PBS	200 mM NaCl 2,5 mM KCl 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Puffer A	0,5% Essigsäure
Puffer B	0.5% Essigsäure 80% Acetonitril
SDS-Ladepuffer (4 x)	8% SDS 0,2% Bromphenolblau 40% Glyzerin 20% β-Mercaptoethanol 250 mM Tris-HCl pH 6,5
SDS-PAGE-Laufpuffer	192 mM Glycin 0,1% SDS 25 mM Tris-HCl pH 8,8
SPR-Laufpuffer	150 mM NaCl 0,01% Triton-X 20 mM HEPES pH 7,5
SPR-Regenerationspuffer	50 mM HCl
TAE-Puffer	1 mM EDTA 20 mM Tris-Acetat pH 8,0
TBS-N	140 mM NaCl 0,1% Nonidet P40 20 mM Tris pH 7,6
TBSN-Waschpuffer (TBS-N):	140 mM NaCl 0,1% Nonidet P40 20 mM Tris pH 7,6
TBSNE-Waschpuffer	150 mM NaCl 0,5 mM Nonidet P40 1 mM EDTA 50 mM Tris pH 7,5

16. EDV

Programm oder Datenbank	Hersteller oder Webseite
MS Word 2007	Microsoft
MS Excel 2007	Microsoft
Proteon Manager 1.0	Biorad
Xcalibur 2.1.0	Thermo *
Maxquant Version 10.3.13	http://www.biochem.mpg.de/en/rd/maxquant/Downloads
Gprox	[97]
VektorNTI 10	Invitrogen
MultiGauge/LAS Image	Fuji Co.
Unicorn	GE Healthcare
EXPASY Proteomics Server	http://expasy.org/
Motif x	http://motif-x.med.harvard.edu
SMALIsite prediction	http://lilab.uwo.ca/cgi-bin/SMALI_peptide_search.pl
ProteinCenter	Proxeon *
Endnote X1	Thomson Reuters
Origin Pro 7.5	OriginLab Co.
IPI Human/Decoy Datenbank (V 3.69)	http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html
Mascot 2.2	Matrix Science *
Human Protein Reference Database	http://www.hprd.org
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	http://www.genome.jp/kegg
Gene Ontology Datenbank	http://www.geneontology.org
Elektronische Zeitschriftenbibliothek	http://ezb.uni-regensburg.de
VMD viewer	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd
PovChem	http://www.chemicalgraphics.com
IPA	http://www.ingenuity.com

*=Zugang im Rahmen der Kooperation mit dem Center of experimental bioinformatics, University of Southern Denmark, Odense, Dänemark

III. Methoden

1. Molekularbiologie

1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNS wurde spektrometrisch entweder mit dem Nanodrop oder einer Quarzküvette in einem gängigen UV-Vis Spektrometer bestimmt. Hierzu wird die Absorption A bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und anschließend die Konzentration der DNS [DNS] in $\mu\text{g/ml}$ berechnet:

$$[DNS] = A(260\text{nm}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Qualitätsbeurteilung wurde die Reinheit der Probe durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm kontrolliert. Sind in der Probe Verunreinigungen in Form von Proteinen enthalten, absorbieren diese Licht bei 280 nm. Der Reinheitsgrad kann durch die Bildung des Quotienten aus $A_{260\text{nm}}$ und $A_{280\text{nm}}$ bestimmt werden und sollte für eine proteinfreie DNS-Lösung einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

1.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde durchgeführt, um die für die Tandem SH2-Domänen von SHP2 codierenden DNA-Abschnitte als *Inserts* für die Klonierung in den Vektor pCR8/GW/TOPO zu amplifizieren. Als *Template* diente der Vektor pCBC-Syp-myc. Die verwendeten *Primer* SHP2NtermFu f und SHP2SH2CtermSTOP r führen dazu, dass nur der erste Teil des Gens, der die SH2-Domänen kodiert (AS 2-220), amplifiziert wird. Die Verwendung der *Taq*-Polymerase ermöglicht später die direkte Ligation in den TOPO-Transfervektor.

Die Elongationszeit von einer Minute wurde aufgrund der Größe des zu amplifizierenden Genteils (660 bp) festgelegt. Der verwendete PCR-Ansatz ist in Tabelle 1, das entsprechende PCR-Programm in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: PCR-Ansatz

Volumen	Reagenz
1 μl	<i>Template</i> (15 ng)
0,5 μl	je <i>Primer</i> (100 pmol)
5 μl	10 x PCR-Puffer (ohne MgSO_4)
5 μl	dNTPs (2 mM)
8 μl	MgSO_4
2 μl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/ μl)
ad 50 μl	MilliQ-Wasser

Tabelle 2: PCR-Programm

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Initiationsschritt	95°C	3 min
35 Zyklen:		
1. Denaturierung	95°C	1 min
2. Annealing	57°C	1 min
3. Elongation	72°C	1 min
Finale Elongation	72°C	7 min
Abkühlung	4°C	∞

Das PCR-Produkt wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese und -extraktion aufgereinigt.

1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zu analytischen und präparativen Zwecken durchgeführt. Die DNS wird hierbei aufgrund ihrer negativen Ladung durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid können die DNS-Banden anschließend durch UV-Licht visualisiert werden.

Es wird folgendermaßen vorgegangen:

Die Agarose wird in TAE-Puffer durch Aufkochen (Mikrowelle, 800 Watt) vollständig gelöst.

Die Endkonzentration der Agarose beträgt 0,5% für große (>15 kb) und 1,5% für kleine DNS-Moleküle (100 - 200 bp).

Nach dem Abkühlen der Lösung (auf ca. 60°C) wird 0,01% Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt.

Die DNS wird vor dem Beladen mit Ladepuffer versetzt (1:6).

Die Auftrennung der DNS erfolgt in TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 mV.

Die Dauer der Auftrennung richtet sich nach Größe der DNS-Moleküle.

Die Banden werden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Wird die Gelelektrophorese präparativ durchgeführt, werden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNS via Gel-Extraktions-Kit isoliert.

1.4. Ligation in den TOPO-Donorvektor

Die Ligation diente dazu, die PCR-Produkte in den TOPO-Donorvektor einzufügen. Hierzu wurde das TOPO-Klonierungsskit verwendet. Es enthält den späteren Donorvektor pCR8/GW/TOPO, an den Topoisomerasen kovalent gekoppelt sind. Dieser Vektor enthält zudem -att Sequenzen, die eine schnelle Rekombination in ebenfalls -att flankierte Akzeptorvektoren erlaubt. Die Selektion mit dem PCR-Produkt ligierten Plasmide wird durch ein Spectinomycin Resistenzgen ermöglicht. Gemäß der Anleitung wurden 20 ng des PCR-Produktes eingesetzt. Der Ansatz ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Ligationsansatz

Volumen	Reagenz
0,5 µl	TOPO-Vektor mit gekoppelter Ligase
x µl	Insert (20 ng/µl)
1 µl	10 x Salzpuffer
ad 10 µl	MilliQ-Wasser

Nach 10 minütiger Inkubation wurden die Ansätze in *E.coli* des Stammes Top10 transformiert.

1.5. Gerichtete Mutagenese mittels Quickchange-Kit

Die gerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um verschiedene Punktmutationen mit Hilfe von Primern in die SH2-Domänen einzufügen. Sie wurde mit dem Stratagene *Quick change site-directed Mutagenesis*-Kit durchgeführt. Hierbei wurde der in Tabelle 4 aufgelistete Ansatz und das in Tabelle 5 aufgeführte Zeitprogramm verwendet.

Tabelle 4: Mutagenese-Ansatz

Volumen	Reagenz
50 ng	Matritzen-DNS
2,5 µl	dNTP (2 mM)
2,0 µl	je Primer (phosphoryliert)
1,0 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (1 U)
2,5 µl	10 x Polymerase-Puffer
4,0 µl	Magnesiumsulfat (25 mM)
ad 25 µl	MilliQ-Wasser

Tabelle 5: PCR-Programm

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Initiationsschritt	95°C	3 min
30 Zyklen		
1. Denaturierung	95°C	1 min
2. Annealing	55°C	1 min
3. Elongation	72°C	3,5 min
Finale Elongation	72°C	7 min
Abkühlung	2°C	max. 8 h

Die PCR-Produkte wurden via *PCR-Purification-Kit* gereinigt, die DNS mit 30 µl MilliQ-Wasser eluiert. Da sich in der Produktlösung noch das nicht mutierte, methylierte *Template* befindet, wurde dieses durch *DpnI* für 2 h bei 37°C abgebaut (Ansatz siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: DpnI-Restriktionsansatz

Volumen	Reagenz
3 µl	<i>DpnI</i> -Puffer
1 µl	<i>DpnI</i>
30 µl	Mutagenese-Produkt (gereinigt)

Die Inaktivierung von *DpnI* erfolgte für 20 min bei 80°C.

Der Ansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert.

1.6. Herstellung der Expressionsvektoren

Die Vektoren zur Expression der SH2-Domänen mit einem N-terminalen *GST-tag* in *BL21* wurden mit Hilfe des Gateway Clonase II Enzym Mix hergestellt. Basierend auf dem System des Lambda-Phagen werden der Donorvektor, der eine *attL*-Sequenz enthält, und der Akzeptorvektor, mit einer *attR*-Sequenz, rekombiniert. Mit Hilfe der Rekombinase werden die zwischen den Erkennungssequenzen liegenden DNS-Sequenzen zwischen den Vektoren ausgetauscht. Als Akzeptorvektor wird ein mit *att*-Sequenzen modifizierter pGEX-Vektor (pGEX-GW) verwendet.

Im Anschluss an die Rekombination wird die Rekombinase durch Zusatz der Proteinase K abgebaut und der Ansatz in kompetente DH5 α transformiert.

1.7. Herstellung PEG-kompetenter *E.coli*

Durch die Methode nach Chung [98] erwerben die Bakterien die Fähigkeit DNS aus dem Medium aufzunehmen. Die kompetenten Bakterien wurden dazu benutzt, Plasmide zu amplifizieren (DH5 α , *Top10*) oder deren Gene zu exprimieren (*BL21*).

100 µl Bakterien (*E. coli*) werden in 500 ml LB-Medium im Schüttler bei 37°C inkubiert.

Die Zellen werden nach Erreichen einer OD_{550nm} von 0,6 - 0,8 abzentrifugiert (15 min, 4°C, ~7600 x g).

Das Pellet wird in 50 ml Kompetenzmedium resuspendiert.

Kompetente Zellen werden zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1.8. Transformation

Die Transformation dient dazu, Plasmid-DNS in die Bakterien einzubringen. Dies wurde zur Amplifikation klonierter DNS oder zum Einbringen von Expressionsvektoren genutzt.

Etwa 100 ng DNS bzw. der Ligationsansatz werden zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben.

Der Transformationsansatz wird 30 min auf Eis inkubiert.

Wird eine Ampicillin-Selektion benutzt, kann der Ansatz direkt auf Agar-Platten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert werden.

Bei anderen Selektionen werden ein 30s langer 42°C-Hitzeschock durchgeführt, 150 µl LB-Medium zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert bevor der Ansatz ausplattiert wird.

Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

1.9. Plasmid-DNS-Präparation

Von den zu präparierenden Klonen werden je nach benötigter Plasmid-DNS Menge 3 ml- bzw. 200 ml- Kulturen angesetzt und diese über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die anschließende Plasmid-DNS-Präparation wurde mittels Miniprep bzw. Maxiprep Kit gemäß der Anleitung durchgeführt und die erhaltene DNS mit 50 µl bzw. 800 µl MilliQ-Wasser eluiert. Die Konzentration der DNS wurde spektrometrisch bestimmt, die Qualität durch ein analytisches Agarosegel und Sequenzierung beurteilt.

1.10. Expression in *E. coli*

Die Expression in *E. coli* Bakterien wurde verwendet, um die GST fusionierten Tandem SH2-Domänen von SHP2 und die Punktmutanten herzustellen. Da der Vektor über ein *lacIq* Gen verfügt, kann jeder beliebige *E.coli* Stamm zur Expression verwendet werden. Die Expression wird durch Zugabe von IPTG verstärkt. Hier wurden BL21 verwendet, da dieser Stamm OmpT und Lon Proteasen defizient ist.

Die Vorgehensweise bei der Expression ist nachfolgend beschrieben:

Es wird eine Kolonie frisch transformierter Zellen zu 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben (Startkultur) und ü.N. bei 37°C inkubiert.

500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) werden mit der Startkultur im Verhältnis 1:50 angeimpft.

Der Expressionsansatz wird bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Bei einer OD_{550nm} von 0,6 - 0,8 wird IPTG zugegeben (Endkonzentration 300 µM) und die Temperatur auf 25°C reduziert.

Nach 5 h Expression bei 25°C im Schüttler werden die Bakterien abzentrifugiert (20 min, ~ 7000 x g).

1.11. Präparation der GST-Fusionsproteine

Durch das N-terminal angehängte GST kann das Fusionsprotein aus dem Zytosol der Bakterien aufgereinigt werden. Der Zellaufschluss wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Das Pellet eines 500 ml Expressionsansatzes wird in 25 ml Lysepuffer resuspendiert.

Es wird eine Spatelspitze Lysozym zugegeben.

Der Ansatz wird auf Eis inkubiert, bis die Viskosität stark angestiegen ist.

Es wird eine Ultraschallbehandlung durchgeführt (auf Eis, 30% Power, Stufe 5), bis die Lösung klar ist.

Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation pelletiert (4°C, 25000 x g, 20 min).

Das Pellet wird verworfen.

Der Überstand wird filtriert (0,22 µm-Sterilfilter).

1.12. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Säugetier-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank durchgeführt.

Die Zellen wurden bei 37°C (5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) bis zu 100% Konfluenz (Einzelschichten) kultiviert. Die Stammkultur wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Zellen werden mit PBS gewaschen.

Die adhärennten Zellen werden durch Inkubation mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschale gelöst.

Die abgelösten Zellen werden in frischem Medium (DMEM) resuspendiert
 Die Zelldichte wird mit dem Casy bestimmt.
 In einer frischen Kulturschale wird Medium vorgelegt (10 cm-9 ml, 15 cm-17 ml).
 Die Zellen werden in die frische Schale überführt ($4\text{-}6 \times 10^6$ Zellen/10 cm Schale).
 Innerhalb von 2 - 3 Tagen bilden die Zellen wieder eine Einzelschicht.
 Die Zellen der Stammkultur sollen nicht zweilagig werden.

1.13. Stabile Isotop Markierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC)

Die Einführung der stabilen Aminosäuren erfolgte nach dem Protokoll von Ong und Mann [99]. Die Stammkultur wird mit SILAC-Medium durchgeführt, das die entsprechenden stabilen Isotope von Arginin und Lysin enthält [100, 101].

Die HeLa Zellen müssen für mindestens 5 Zellteilungen in SILAC-Medium gehalten werden, um die Markierung gewährleisten zu können. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden sie mindestens 14 Tage lang in SILAC-Medium kultiviert. Hier wurden jeweils Doppelmarkierungen (Lysin und Arginin) durchgeführt. In Tabelle 7 sind die benutzten Kombinationen von Arginin und Lysin zusammengestellt:

Tabelle 7: Verwendete SILAC Aminosäurenkombinationen

Zustand	Aminosäuren		Massendifferenz zu N in Da
N (normal) / L (leicht) 	Arginin	L-Arg	0
	Lysin	L-Lys	0
M (medium) 	Arginin	L-Arg-13C6 HCl	6
	Lysin	L-Lys-4,4,5,5-d4 HCl	4
H (heavy, schwer) 	Arginin	L-Arg-13C6,15N4 HCl	10
	Lysin	L-Lys-13C6,15N2 HCl	8

1.14. Liposomale transiente Transfektion von HeLa Zellen

Die liposomale Transfektion wurde verwendet, um die für wt und RA-Mutanten codierenden pcDNA3.1-tSH2 V5-His Plasmide in HeLa Zellen einzubringen.

Die Liposomen (Lipofectamine 2000) bilden mit den Phosphatgruppen der DNS Komplexe, die von Zellen aufgenommen werden. Die Transfektionen wurden gemäß der modifizierten Anleitung des Herstellers folgendermaßen durchgeführt:

Vor der Transfektion werden je 1×10^6 Zellen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät.

Am folgenden Tag wird das Medium durch Opti-MEM ausgetauscht.

Je 1 µg DNS werden in 50 µl Opti-MEM resuspendiert.

Pro µg der eingesetzten DNS werden 2 µl Lipofectamine in 200 µl Opti-MEM gegeben.

Beide Ansätze werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Ansätze werden gemischt und nach 20 Minuten auf die Zellen pipettiert.

Nach 5 Stunden Inkubation im Brutschrank wird das Transfektionsmedium durch normales Medium ersetzt.

Die Zellen werden frühestens nach einem weiteren Tag für Experimente verwendet.

1.15. Herstellung von Lysaten aus Säugerzellen

Die Experimente wurden bei einer Zelldichte von 80-100% Konfluenz durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und vor der Stimulation über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit einem Zytokin, Wachstumsfaktor oder mit Pervanadat stimuliert (Konzentrationen für den jeweiligen Stimulus sind in Kapitel II.14 aufgeführt). Die mit Pervanadat durchgeführten Stimulationen erfordern keine Inkubation in serumfreiem Medium. Die Zellen wurden durch die Zugabe einer frisch angesetzten Pervanadat-Lösung in das Stammkulturmedium für 15 Minuten stimuliert.

Nach der gewünschten Stimulationszeit werden die Zellen in kaltem PBS mit einem Schaber von der Kulturschale gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (800 g, 5 min) pelletiert. Das Zellpellet wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Lyse der Zellen nach dem Auftauen abhängig vom weiteren Verwendungszweck durchgeführt.

Um denaturierte Proteine zu erhalten, wird Harnstoff-Lysepuffer eingesetzt. Andernfalls wird Lysepuffer verwendet. Optional (abhängig von der Menge/Viskosität des Lysates) wird die DNS durch Ultraschall geschert, um die Viskosität zu verringern. Anschließend werden die Lysate durch Zentrifugation (10000 g, 4°C, 10 min) geklärt.

Für Experimente mit dephosphorylierten Lysaten wurden diese mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierzu wurden für die klassische Immundetektion unstimulierte Lysate dephosphoryliert. Für die im Massenspektrometer durchgeführten Detektionen wurden Lysate von zuvor mit Pervanadat stimulierten Zellen dephosphoryliert.

Tabelle 8: Dephosphorylierungsansatz

Volumen	Reagenz
10 µl	10 x Reaktionspuffer
1 µl	Alkalische Phosphatase (1 u/µl)
89 µl	Lysat (~2 mg/ml)

Die Reaktion erfolgte für 1-12 h bei 37°C.

2. Proteinbiochemie

2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli [102] trennt Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht auf, da die Ladung von angelagertem SDS die Eigenladung des Proteins überdeckt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine wird ein Größenstandard aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-PAGE dazu verwendet, die Reinheit und Mengen der GST-Fusionsproteine zu kontrollieren oder um Proben für die Immundetektion vorzubereiten.

Tabelle 9: Gelzusammensetzung (13 Minigele, 10 x 10 cm)

	Trenngel		Sammelgel
	8%	10%	3%
Aqua bidest	48,3 ml	41,3 ml	28 ml
1,5 M Tris pH 8,8	26,6 ml	26,6 ml	--
2 M Tris pH 6,8	--	--	2,19 ml
20% SDS-Lösung	525 µl	525 µl	175 µl
Acrylamid/ Bisacrylamid 29/1	26,88 ml	34,3 ml	4,45 ml
TEMED	105 µl	105 µl	35 µl
APS 10%	525 µl	525 µl	280 µl

Die Bestandteile des Trenngels (ohne APS und TEMED) werden vereint.

Als Radikalstarter werden TEMED und Ammoniumperoxosulfat (APS) zügig nacheinander hinzugegeben.

Die Lösung wird in die entsprechende Apparatur gegossen, bis diese zu $\frac{3}{4}$ gefüllt ist.

Das Gel wird mit Isopropanol überschichtet.

Nachdem die Lösung polymerisiert ist, wird das Isopropanol vollständig mit Filterpapier entfernt.

Die Sammelgellösung wird vorsichtig über das Trenngel gegossen und der entsprechende Kamm eingesetzt.

Die Proben werden vor dem Auftragen mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

Das Gel wird in die Laufapparatur eingespannt und mit SDS-PAGE-Laufpuffer überschichtet.

Die Proben werden aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgt durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel (je nach Acrylamidgehalt des Gels 45-100 min).

Anschließend werden die Proteinbanden entweder direkt angefärbt oder über eine Immundetektion visualisiert

Coomassie-Blau-Färbung

Der optimale Detektionsbereich dieser Färbemethode liegt bei 50 - 400 ng Protein.

Anleitung:

Zur Fixierung der Proteine und zur Entfernung des SDS wird das Gel 15 min in Entfärberlösung inkubiert.

Das Gel wird mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert.

Das Gel wird in Entfärberlösung unter Schütteln entfärbt, der an Proteine angelagerte Farbstoff bleibt gebunden.

Bis zur völligen Entfärbung des Hintergrunds wird die Entfärberlösung mehrfach gewechselt.

2.2. Western Blot

Für die Immundetektion durch entsprechende Antikörper ist es notwendig, die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Hierfür wurde das *Western-Blot-semidry*-Verfahren angewendet:

Inkubationsverlauf zur Aktivierung und Äquilibration der PVDF-Membran:

15 s in 100% MeOH

15 s in MilliQ-Wasser

5 min in Anoden-Puffer II

Aufbau für den Transfer (luftblasenfreie Schichtung):

Anode

Filterpapier (befeuchtet mit Anoden-Puffer I)

Filterpapier (befeuchtet mit Anoden-Puffer II)

Äquilierte PVDF-Membran

Gel

Filterpapier (befeuchtet mit Kathoden-Puffer)

Kathode

Der Aufbau wird mit einem Gewicht (1 kg) beschwert. Der Transfer erfolgt für 1 h bei einem konstanten Stromfluß von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran.

2.3. Immundetektion der Proteine auf der Membran

Die Immundetektion ermöglicht die spezifische Visualisierung bestimmter Proteine. Zuerst müssen jedoch die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer abgesättigt werden. Da alle verwendeten Substanzen im Überschuss verwendet werden, muss die Membran zwischen den Inkubationen immer sorgfältig gewaschen werden. Anschließend wird der primäre Antikörper eingesetzt, der das gewünschte Protein (bzw. eine bestimmte Modifikation des Proteins, optional an einer bestimmten Stelle) erkennt. An den sekundären Antikörper, der an die speziesspezifischen Abschnitte des primären Antikörpers bindet, ist eine Peroxidase gekoppelt, die eine Chemilumineszenzreaktion mit dem entsprechenden Substrat katalysiert. Die entstehenden Signale werden mit Röntgenfilmen oder dem LAS 4000 dokumentiert.

Inkubationsfolge der Membran bei RT:

20 min Blockierungspuffer

5 min TBSN-Waschpuffer

1 h oder ü.N. bei 4°C Primär-Antikörper (1:2000 in TBS-N)

3 mal 5 min TBSN-Waschpuffer

30 min Sekundär-Antikörper (1:15000 bis 1:20000 in TBS-N)

3 mal 5 min TBSN-Waschpuffer

5 min Peroxidase-Substrat

Nach dem Abgießen des überschüssigen Substrates können die Signale direkt detektiert werden. Vor einer weiteren Detektion werden die Antikörper mit Blot-Regenerationslösung (15 min, 70°C) wieder abgelöst und der beschriebene Inkubationsablauf wiederholt.

2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Zell-Lysaten (Proteinlösungen) wurde nach Bradford im Photometer bei $\lambda=595$ nm durchgeführt. Die Zunahme der Absorption der sauren Coomassie-Lösung bei Zugabe einer proteinhaltigen Lösung basiert auf der Wechselwirkung des Farbstoffes mit den basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine in den Lysaten. Diese Interaktion verschiebt das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm auf 595 nm und erlaubt damit eine relative Bestimmung der Proteinkonzentration der Lösung. Es wurden jeweils 3 μ l der Probe mit 997 μ l Bradford-Reagenz versetzt und 5 min lang bei RT inkubiert. Die Absorption der Probe gegen die Referenz (1 ml Bradford-Reagenz) wird in einer 1 cm Einmalküvette gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

2.5. Bestimmung der Konzentration der GST-Fusionsproteine

Zum Ausschluss von Verunreinigungen durch DNS oder RNS wurde zunächst ein Absorptionsspektrum ($\lambda=240-320$ nm) der Proteinlösung aufgenommen. Ist DNS enthalten, zeigt sich Zunahme der Absorption in der Region von 260 nm.

Die Proteinkonzentration [Prot] wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt:

$$A(280) = \epsilon \times d \times [\text{Prot}]$$

(wobei A die Absorption bei 280 nm, d die Küvettenlänge [cm] und ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] darstellt).

Der theoretische molare Extinktionskoeffizient der in der Arbeit verwendeten GST-Fusionsproteine ($67645 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) wurde auf Basis der Proteinsequenz mit Hilfe des ProtParam Protokolls (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>) ermittelt.

2.6. Affinitätschromatographie der GST-Fusionsproteine

Da die Proteine in den Bakterien-Lysaten nicht in Einschlusskörperchen vorlagen, konnte das Lysat nachdem es filtriert wurde direkt auf eine GSTrap-Säule aufgetragen werden. Dies wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe durchgeführt (Flußrate ca. 0,2 ml pro Minute). Anschließend wurde die Säule in den Äkta-Explorer eingebaut, mit ca. 20 Säulenvolumen gewaschen und die GST-Fusionsproteine mit Elutionspuffer abgelöst. Das Eluat wurde in 0,2-1 ml Fraktionen gesammelt. Alternativ können die Proteine mit Glutathion-Agarose oder -Sephrose unter Verwendung der gleichen Puffer mit einer Tropfsäule aufgereinigt werden.

2.7. Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Fern-UV-CD-Spektren wurden vom wildtyp GST-Fusionsprotein und den Punktmutanten aufgenommen, um die Auswirkungen des Austausches der einzelnen Aminosäuren auf die Sekundärstruktur zu untersuchen.

Die Mutanten wurden in 0,1 mm-Quarzküvetten im Spektrometer im Wellenlängenbereich von 195 bis 250 nm gemessen. Die Daten wurden mit einer spektralen Bandbreite von 1 nm und 8,0 s Integrationszeit in 0,1 nm Intervallen bei

25°C aufgenommen. Die Proteinlösungen wurden vor der Messung mit PBS verdünnt.

Für Proteine wird die molare Elliptizität angegeben, indem die in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessene Elliptizität Θ_{obs} auf die mittlere Anzahl der Peptidbindungen (entspricht der Anzahl n der AS) bezogen wird und ergibt so die *mean residue ellipticity* (Θ_{MRE}) in [deg /dmol cm]:

$$\Theta_{\text{MRE}} = \frac{\Theta_{\text{obs}} [\text{mdeg}]}{n_{\text{AS}} \times [\text{Prot}] \times d \times 10}$$

(wobei [Prot] die Proteinkonzentration in M und d die Küvettenlänge in cm darstellt)

Die Konzentrationen der Proteine lagen bei etwa 1,3 μM (wt 1,280 μM , TA 1,378 μM , RQ 1,278 μM und ED 1,281 μM) und das Fusionsprotein enthält 452 AS.

2.8. Kopplung der GST-Fusionsproteine an magnetische Beads

Die bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine wurden kovalent an tosylaktivierte magnetische Beads (Dynabeads Myone oder M280), die mit primären Aminen oder Sulfhydrylgruppen reagieren, gekoppelt. Die Kopplungsprozedur wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt und demnach 1 mg der Beads pro 40 μg Fusionsprotein eingesetzt.

100 μg der aufgereinigten Proteine werden in 0,1 M Borat pH 9,5 überführt.

Die Beads werden in 0,1 M Borat Puffer pH 9,5 äquilibriert.

Der Kopplungsreaktionsansatz ist folgendermaßen zusammengesetzt:

1 M Ammoniumsulfat

0,1 M Natriumborat pH 9.5

40 mg Beads/ml

1,6 mg Protein/40 mg Beads

Der Ansatz wird für 24 h rotierend bei 37°C inkubiert.

Anschließend werden die Beads mehrmals mit PBS gewaschen.

Die noch freien Bindungsstellen werden durch Inkubation mit 200 mM Tris pH 8,5 bei 37°C unter Rotation für 24 h blockiert

Die Beads können in 10 μM Protein und 20 mM HEPES pH 7,5 bei 4°C bis zu einem Monat gelagert werden.

2.9. Bindung von biotinylierten Peptiden an magnetische Beads

Zur Präzipitation der Domänen (optional aus HeLa Lysaten) wurden die biotinylierten Y759 und pY759 Peptide an magnetische Streptavidinbeads (Dynabeads MyOne) mit Hilfe des folgenden Protokolls gebunden:

Je 100 μl der Beads (entspricht 1 mg Beads) werden mit TBSNE gewaschen.

Die Beads werden mit 5 nmol des biotinylierten Peptids für 2 h rotierend inkubiert.

Nicht gebundene Peptide werden durch mehrfaches Waschen mit TBSNE entfernt.

Die beladenen Beads können direkt für Präzipitationen eingesetzt oder bei 4°C bis zu einem Monat gelagert werden.

2.10. Präzipitation der Interaktionspartner aus Lysaten

Die an die Beads gekoppelten GST-SHP2-SH2 tandem Domänen werden verwendet, um die Interaktionspartner aus dem Zell-Lysat zu präzipitieren. Bevor die denaturierten Lysate für Präzipitationen verwendet werden konnten, musste der Harnstoff aus diesen entfernt werden, da dieser die SH2-Domänen denaturieren würde. Dies ist durch Dialyse möglich. Hierfür wurden die Lysate in Dialysekassetten gegen Dialysepuffer (mindestens 3 mal 1:1000 ü.N.) dialysiert.

Die Präzipitationen werden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Es werden 20-100 µl der Beads (entspricht ungefähr 30 bis 150 µg Protein) mit 0,3 bis 1,5 mg Proteinen der Zell-Lysate für 3 h bei 4°C inkubiert.

Für die Konkurrenzexperimente wurden die Domänen für 30 bis 60 min mit Peptiden präinkubiert (1 µl 0,5 mg/ml Peptid pro 5 µl Beads) und die Lysate anschließend zugegeben.

Die Beads werden 5 mal mit mindestens 1,5 ml Lysepuffer/mg Protein gewaschen.

Die Proteine werden abhängig von der weiteren Verwendung eluiert:

Für eine nachfolgende Analyse durch Immundetektion werden sie durch Erhitzen (95°C, 5 min) in SDS-Ladepuffer eluiert.

Folgt eine Analyse der Proben durch proteomische Techniken, wird die Elution mit Harnstofflysepuffer durchgeführt.

2.11. Peptidpräzipitation

Die Peptidpräzipitationen wurden durchgeführt, um die Bindung der Domänen an magnetische Beads gebundene Peptide (Y759 und pY759) zu untersuchen. Sie wurden von einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomandin (Janka Günther) durchgeführt. Es wurden wildtyp Domänen und die RA-Mutanten (R32A; R138A; R32A-R138A) verwendet, die entweder als GST Fusionsprotein in Bakterien oder in HeLa Zellen mit einem V5-His6-tag exprimiert wurden.

Die bakteriell exprimierten Proteine wurden vor dem Experiment wie im Absatz 2.6 beschrieben aufgereinigt und deren Konzentration bestimmt (siehe Absatz 2.5).

Je 62,5 nmol der Fusionsproteine wurden mit 15 µl Peptid-Streptavidinbeads (aus Abschnitt 2.9) rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Beads wurden mehrfach mit TBSNE gewaschen.

Die gebunden Proteine wurden durch Erhitzen in 2 x SDS-Ladepuffer auf 95°C eluiert.

Die Proteine wurden durch Immunodetektion analysiert.

Die in HeLa Zellen exprimierten Domänen wurden direkt aus dem Zell-Lysat präzipitiert.

Die 750 µg Protein entsprechende Menge der Zell-Lysate wurden mit 15 µl Peptid-Streptavidinbeads (aus Abschnitt 2.9) rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Beads wurden mehrfach mit TBSNE gewaschen.

Die gebunden Proteine wurden durch Erhitzen in 2 x SDS-Ladepuffer auf 95°C eluiert.

Die Proteine wurden durch Immunodetektion analysiert.

3. Biophysikalische Experimente

3.1. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Mithilfe von Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz wurde die Bindungskinetik der GST fusionierten tandem SH2-Domänen aus SHP2 und ihren Punktmutanten an verschiedenen Phosphotyrosinmotiven untersucht.

In der Messapparatur bildet sich ein Oberflächenplasmon aus, wenn das sich an der Grenzfläche zwischen Gold und Puffer befindende delokalisierte Elektronengas durch Licht angeregt wird. Die Resonanzfrequenz dieses Plasmons für die Absorption von Licht ändert sich in Abhängigkeit vom Brechungsindex in der Nähe der Oberfläche. Deshalb kann die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche sensitiv detektiert werden. Proteine haben mit ungefähr 1,4 einen höheren Brechungsindex als wässrige Lösungen (~1,33). Daher verändert sich der Brechungsindex an der Oberfläche bei der Bindung von Proteinen proportional zur Masse der gebundenen Proteine. Die Bindung von Proteinen an eine Oberfläche lässt sich somit sowohl orts- als auch zeitaufgelöst detektieren.

Hierzu wurde das BioRad ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System verwendet. Es ermöglicht die simultane Detektion von bis zu 36 Interaktionen (6 Peptide mit 6 Proteinlösungen) und die Referenzierung sowohl auf eine der immobilisierten Proben als auch auf unmodifizierte Oberflächenbereiche. Diese liegen zwischen den Bereichen, in denen die zu untersuchenden Moleküle immobilisiert und ihre Interaktionen gemessen werden.

Die zu untersuchenden Peptide wurden auf einem NLC Sensor Chip, an dessen Polymerschicht Neutravidin kovalent gekoppelt ist, immobilisiert. Durch ihre hochaffine Bindung an Neutravidin können die biotinylierten Peptide auf der Oberfläche spezifisch, orientiert und effizient immobilisiert werden (siehe Abbildung 9, linke Seite). Anschließend werden die Domänen in der Flußzelle über die immobilisierten Peptide geleitet (siehe Abbildung 9, rechte Seite). Die Änderung der an die Oberfläche gebundenen Masse wird in Echtzeit verfolgt.

Durchführung der Bindungsassays:

Alle verwendeten Puffer werden gefiltert (0,22 µm) und entgast.

Der NLC Chip wird in das Gerät eingebaut und mit SPR-Laufpuffer bei 25°C äquilibriert.

Die zu immobilisierenden, biotinylierten Peptide werden gelöst und anschließend mit Laufpuffer verdünnt.

Die Proteine werden aufgetaut und zentrifugiert (10000 g, 4°C, 10 min) um eventuelle Präzipitate zu entfernen. Die Konzentration wird spektrometrisch bestimmt und in einem SDS-Gel kontrolliert. Anschließend werden die verschiedenen Verdünnungen hergestellt.

Der Injektionsverlauf während der Messung erfolgt gemäß Tabelle 10:

Eine Injektion der Domänen wird durchgeführt, um unspezifische Wechselwirkungen der Domänen mit der Oberfläche auszuschließen.

Die biotinylierten phosphorylierten Peptide werden auf der Neutravidin Oberfläche immobilisiert.

Die GST-fusionierten tandem SH2-Domänen werden in verschiedenen Konzentrationen injiziert.

Es folgt ein Waschschriff, um auch die Dissoziation beobachten zu können.

Die nach dem Waschen verbliebenen, noch an die Peptide gebundenen Domänen werden mit SPR-Regenerationspuffer entfernt.

Die auf der Oberfläche immobilisierten Peptide werden mit SPR-Laufpuffer äquilibriert, um gegebenenfalls eine weitere Probeninjektion vornehmen zu können.

Die Konzentrationen der injizierten Proteine und die Anzahl der aufeinander folgenden Injektionen der SHP2-Punktmutanten wurden dem jeweiligen Experiment angepasst.

Tabelle 10: Injektionsablauf

Flußrate(µl/min]	Dauer [s]	Probe
30	180	SPR-Laufpuffer
30	180	GST-tandem SH2-Domänen wt [800 µM]
100	240	SPR-Laufpuffer
30	180	Biotinylierte pY-Peptide [0,5 mM]
100	240	SPR-Laufpuffer
Probeninjektionen		
100	240	GST-SHP2 SH2-Domänen
100	1000	SPR-Laufpuffer
100	30	SPR-Regenerationspuffer
100	100	SPR-Laufpuffer
weitere GST-SHP2 Proben wie in Probeninjektionen beschrieben		

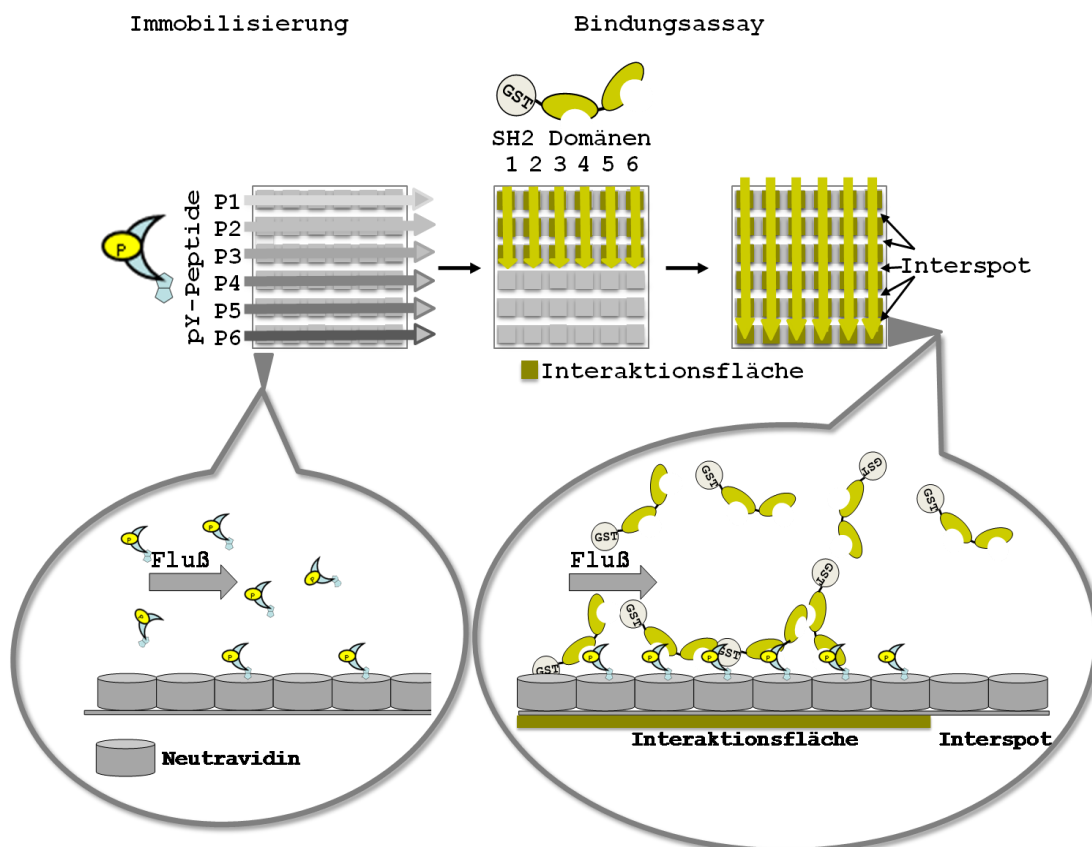


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Bindungsassays

A Immobilisierung der biotinylierten Peptide,

B Interaktion der Domänen mit den immobilisierten Peptiden.

Oben: Flußzelle in Aufsicht, unten: Ansicht einer Interaktionsfläche von der Seite.

Im rechten Teil ist das Muster der entstandenen Interaktionsflächen gezeigt.

4. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde zur unvoreingenommenen Identifizierung von Interaktionspartnern der SH2-Domänen und zur Analyse des Bindungsverhaltens der Punktmutanten verwendet.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die Zellen während ihrer Kultivierung mit stabilen Isotopen der Aminosäuren Arginin und Lysin markiert (SILAC), um die verschiedenen Proben simultan quantitativ untersuchen zu können (einen Überblick der massenspektrometrischen Anwendungen in der Zellbiologie geben [5, 103]). Hierzu wurden mittels an Beads gekoppelten Domänen Bindungspartner wie in Abschnitt 2.8 beschrieben aus denaturierten Lysaten präzipitiert. Je 3 Ansätze aus wt Domänen oder optional Punktmutanten an den Beads präzipitierten Interaktionspartner aus unterschiedlich markierten Lysaten. Die Beads mit den präzipitierten Domänen wurden direkt beim ersten Waschschrift gemischt.

Die Probenvorbereitung für die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Experimente gliedert sich in die Pervanadatstimulation der SILAC markierten Zellen, Herstellung der Lysate (siehe Abschnitt 1.15), deren Denaturierung, die Präzipitation der denaturierten Interaktionspartner durch die Domänen (siehe Abschnitt 2.10), das Mischen der Ansätze, den Verdau der eluierten Proteine und die Fraktionierung der resultierenden Peptide.

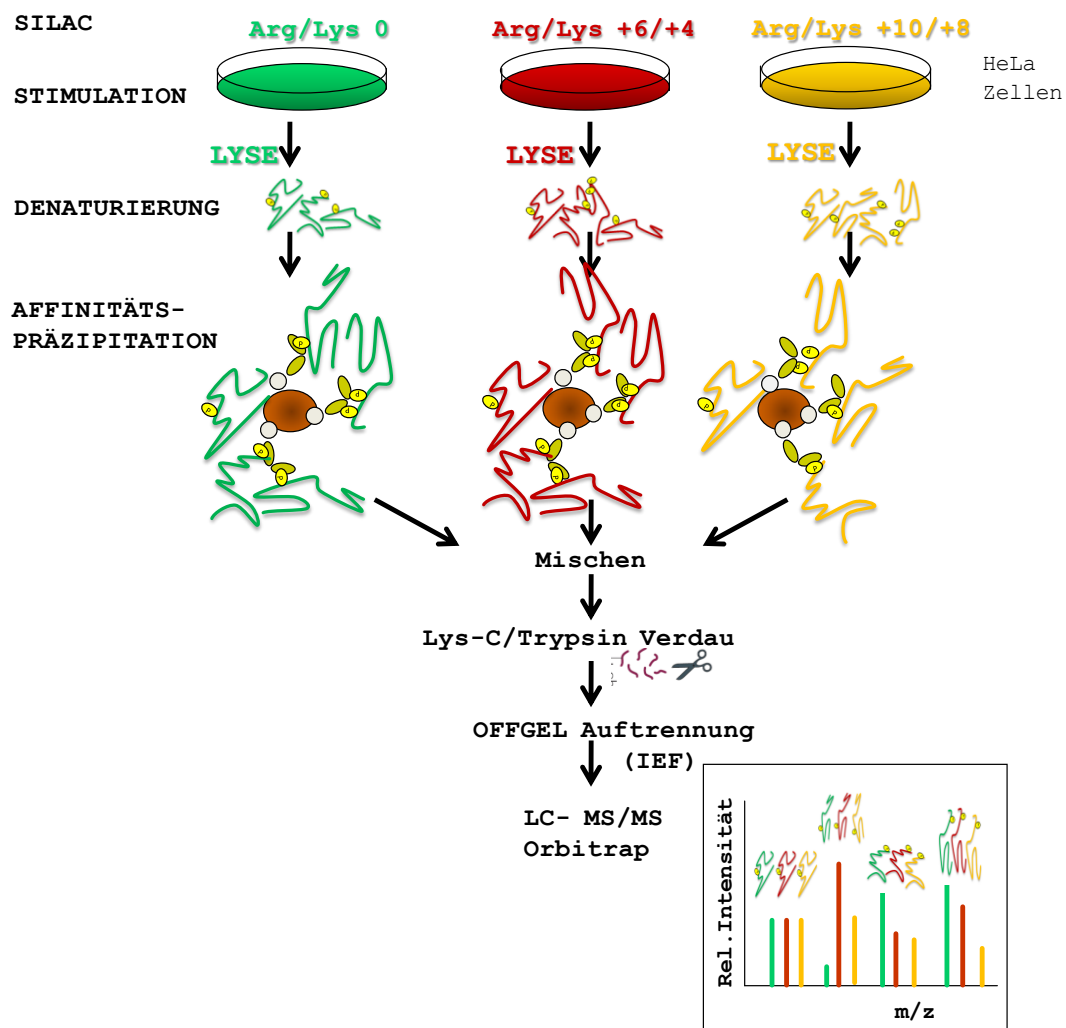


Abbildung 10 Design der Experimente, in denen SILAC mit LC-MS kombiniert ist.

4.1. Verdau der eluierten Proteine

Für den Verdau auf einem Filter wurden die an die SH2-Domänen gebundenen Proteine mit Elutions- oder Harnstoffpuffer gelöst und auf einem Dialysefilter (Centricon, CO=10-30 kDa) überführt. Gegebenenfalls musste der Puffer gegen Harnstoffpuffer ausgetauscht werden, um das SDS aus der Probe zu entfernen und damit bessere Bedingungen für den Verdau herzustellen.

Vorgehensweise:

- Die Probe wird in ein Centricon überführt.
- 300 µl Harnstoffpuffer werden zugegeben.
- Der Ansatz wird zentrifugiert, bis die Filtermembran fast trocken ist (max. 4000 g, 22°C).
- Es werden 2 mal je 400 µl Harnstoffpuffer zugegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt.
- Die Peptide werden auf der Membran in 100 µl Harnstofflysepuffer resuspendiert.
- Die Proteine werden durch Zugabe von 20 µl 55 mM Chloroacetamidlösung alkyliert.
- Der Ansatz wird nach 10 min Inkubation erneut zentrifugiert.
- Es werden 2 mal je 300 µl Harnstoffpuffer zugegeben und zentrifugiert.
- Es werden 2 mal je 300 µl ABC zugeben und der Ansatz zentrifugiert.
- Es werden 20 µg Trypsin/Probe in 200 µl ABC zugegeben.
- Die Proteine werden für 16 h bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre verdaut.
- Anschließend werden die Peptide durch den Filter in ein frisches Reaktionsgefäß zentrifugiert.

Für den Verdau in Lösung wurden die gebundenen Proteine direkt mit Harnstoffpuffer von den Domänen eluiert. Es wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Die Proteine werden mit 100 µl Harnstoffpuffer eluiert.
- Es werden 10 µl 100 mM DTT pro Mischung zugegeben und diese 20 min lang geschüttelt.
- Es werden 100 µl 50 mM ABC zugegeben und 20 µl 55 mM Chloroacetamidlösung zugegeben und der Ansatz weitere 20 min geschüttelt.
- Die Proteine werden durch Zusatz von 20 µl Lys-C (entspricht 1/50 Lys-C/Protein, ~10 µg/Probe) für 4 h bei RT verdaut.
- Anschließend wird die Lösung mit 400 µl 50 mM ABC verdünnt, so dass die Harnstoffkonzentration unter 1 M liegt.
- Es werden 15 µg Trypsin/Probe (entspricht ~1/50 Trypsin/Protein) zugegeben und die Lösung 16 h lang bei 37°C inkubiert.

4.2. Fraktionierung der verdauten Proben

Nach dem Verdau mussten die Proben zunächst entsalzt werden, um mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) fraktioniert werden zu können. Es wurde folgendes Protokoll angewendet:

- Die Sepak C18 Säule wurde mit 500 µl Puffer B äquilibriert.
- Es folgt ein Waschschrift mit 1 ml Puffer A.
- Der Probe wird mit 10% TFA auf 1% TFA angesäuert und auf die Säule geladen.
- Die beladene Säule wird 2 x mit 1 ml Puffer A gewaschen.
- Die Peptide werden mit 1 ml 100% Acetonitril eluiert.
- Ungefähr 1/3 (50 µg) des Ansatzes wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rest für eventuelle technische Wiederholungen aufbewahrt.

Die Fraktionierung selbst wurde unter Verwendung eines Agilent 3100 OFFGEL Fractionator, IPG Dry Streifen und des von Hubner et al veröffentlichten Protokolls [104] vorgenommen:

Die Streifen wurden für 20 min mit 20 µl/Tasche Ampholytlösung rehydriert.

Das aus Peptiden bestehende Pellet wird in 2 ml Ampholytlösung resuspendiert.

Die Peptide werden in 2 ml Ampholytlösung resuspendiert.

Etwa 150 µl der in Ampholytlösung resuspendierten Peptide werden in jede Tasche pipettiert.

Die Elektrodenpads werden in Ampholytlösung getränkt und an den Enden der Streifen platziert.

Nach dem Anbringen der Abdeckungsichtung wird Immobiline Cover Fluid aufgetragen (400 µl und 1 ml)

Die Elektroden werden aufgesteckt.

Die Fraktionierung wird bei 20 kVh mit einem maximalen Strom von 50 µA und einer Leistung von 200 mW durchgeführt (Dauer ~40 h).

Nach 24 h werden die oberen Elektrodenpads durch frische, in Wasser getränkte Pads ersetzt.

Nach der Fokussierung wurden die Peptide in der Lösung über dem Gel in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und angesäuert (1/10 mit 10% TFA, 5% Essigsäure, 30% Acetonitril).

Nach der Fokussierung mussten die Proben entsalzt und von Detergenzien und starken Säuren oder Lösungsmitteln befreit werden. Hier wurde das so genannte *stage tipping* [105] benutzt.

Die Stagetips wurden folgendermaßen hergestellt und angewendet:

2 Schichten von C18 Empore Disks werden in 200 µl Pipettenspitzen gesteckt.

Die Aktivierung erfolgt mit 10 µl Puffer B.

Die C18-Scheibchen werden mit 50 µl Puffer A gewaschen.

Die Peptide werden aufgetragen.

Es werden 2 Waschschrte mit je 50 µl 2% Puffer B durchgeführt.

Die Elution erfolgt mit 20 µl Puffer B.

Das Lösungsmittel wird entfernt (Vakuumbzentrifuge).

Die Proben werden in Puffer A resuspendiert.

Die resuspendierten Peptide werden in die mit der LTQ-Orbitrap gekoppelte LC-Anlage gestellt und dort gemessen.

4.3. Massenspektrometrische Messungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mit einer LTQ-Orbitrap (Ionenfallenmassenspektrometer) durchgeführt. Diese ermöglicht eine genaue Massenbestimmung von Molekülionen und deren Fragmenten und besitzt eine hohe Massenauflösung. Vor dieses Massenspektrometer ist über nano Elektrospray eine HPLC-(high performance liquid chromatography)-Säule geschaltet (online HPLC-ESI-MS/MS). Diese Apparatur erlaubt die Analyse komplexer Peptidmischungen. Die verwendeten Säulen sind 15-20 cm lang und haben einen Durchmesser von 50 µm.

Die Proben wurden in 140 min langen Läufen aufgetrennt. Die ersten 22 min dienten dem Probenauftrag auf die Säule und in den folgenden 118 min wurden die Peptide mit einem Gradienten (2% bis 80% Puffer B) eluiert (siehe Abbildung 11). Während der Beladung lag der Fluß der Kapillare bei 0,5 µl/min, während er bei der Elution auf 0,25 µl/min reduziert wurde.

Die sechs intensivsten Ionen (Top 6) jedes in der Orbitrap aufgenommenen Übersichtsscans, mit einer Auflösung von 60.000 im m/z-Bereich von 350 bis 1800, wurden für die Fragmentierung durch CID (*collision induced dissociation*) in der LTQ (MSMS) ausgewählt. Die Kollisionsenergie lag bei 30% und die Ausschlußzeit zwischen 120 und 180 s.

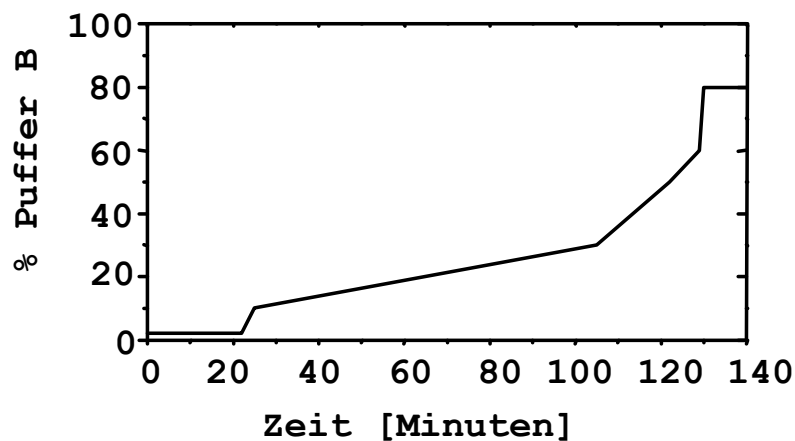


Abbildung 11 LC Gradient zur Elution der Peptide

4.4. Datenanalyse

Die Datenanalyse gliedert sich in die Prozessierung der Daten und das spätere Filtern der spezifischen Interaktionen.

Prozessierung der Daten:

Die MSMS-Spektren der Rohdaten wurden mit der MaxQuant Software (Version 10.3.13) [106] prozessiert. Die Peaklisten wurden mit dem Mascot 2.2 Sever (Matrix-Science) mit der IPI Human/Decoy Datenbank Version 3.69 mit Kontaminanten mit folgenden Parametern verglichen:

Feste Modifikation: Carbamidomethyl Cystein.

Variable Modifikationen: Oxidation von Methionin, Acetylierung der N-Termini, phospho STY, SILAC Aminosäuren (Arg +6 Da und 10 Da, Lys +4 Da und +8 Da), 2 verpasste Spaltungen, MS accuracy 7 ppm, MS/MS Accuracy 0.5 Da und eine False Discovery Rate 1% [107].

Filterkriterien auf Proteinebene:

Bevor die Ergebnisse der Experimente mit den Mutanten analysiert werden konnten, wurde ein Referenzdatensatz der wt Domänen erstellt:

Die Proteingruppen des Dephosphorylierungsexperimentes und des Konkurrenzexperimentes wurden so gefiltert, dass die durch mehr als 1 Peptid identifizierten erhalten blieben. Im Folgenden wurde das jeweils erste Protein innerhalb der identifizierten Proteingruppe berücksichtigt. Die in der Datenbank als Kontaminanten definierten und die mit der reversen Datenbank identischen Proteine wurden manuell entfernt. Weiterhin mussten die Proteine in mehr als der Hälfte der Experimente gefunden worden sein.

Die Interaktionen während der Dephosphorylierungsexperimente wurden als spezifisch betrachtet, wenn das Verhältnis zwischen aus phosphorylierten und dephosphorylierten Lysaten gezogenen Proteinen mindestens 2 war:

$$\frac{\text{Präzipitation mit wt aus phosphorylierten Lysaten}}{\text{Präzipitation mit wt aus dephosphorylierten Lysaten}} > 2$$

Die Konkurrenzexperimente wurden ähnlich ausgewertet. Das Verhältnis von Präzipitation mit phosphorylierten Y759 Peptid aus gp130 zu ohne Präinkubation der Domänen musste mindestens doppelt so groß sein wie das Verhältnis der Präzipitation mit Präinkubation mit dem unphosphorylierten Y759 Peptid von gp130 zu ohne Präinkubation.

$$\text{Präzipitation wt} \left(\frac{\text{mit Präinkubation pY759}}{\text{ohne Präinkubation}} \right) > 2 \times \text{wt} \left(\frac{\text{mit Präinkubation Y759}}{\text{ohne Präinkubation}} \right)$$

Es wurde eine Liste der wt Interaktionen erstellt, indem nur die Proteine weiterhin betrachtet wurden, deren Proteingruppen mindestens in einem der beiden Kontrollexperimente gefunden wurden und die oben genannten entsprechenden Kriterien erfüllen.

Diese Referenzliste der wt Interaktionen wurde für die Analyse der Interaktionen der Mutanten verwendet: Die gefundenen Proteingruppen der Mutanten-experimente wurden gefiltert, so dass nur zuvor in den wt Experimenten als spezifisch befundene Interaktionspartner betrachtet wurden.

IV. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die Wechselwirkungen der tandem SH2-Domänen von SHP2 mit anderen Proteinen zu identifizieren und das Interaktom von krankheitsrelevanten Punktmutanten näher zu charakterisieren. Der Ergebnisteil gliedert sich in 5 Kapitel, in denen zunächst die Expression und Aufreinigung der SH2-Domänen als GST-Fusionsproteine dargestellt ist. Im Weiteren wird deren Bindung an Peptide und an Proteine aus Lysaten von Zellen untersucht.

1. Expression und Aufreinigung der tandem SH2-Domänen von SHP2

Für alle Experimente wurden größere Mengen der tandem SH2-Domänen benötigt. Hierzu wurden die SH2-Domänen heterolog in *E.coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert und anschließend aufgereinigt. In Tabelle 11 sind die exprimierten Proteine zusammengestellt. In den Arginin zu Alanin Punktmutanten ist jeweils das zentrale Arginin der einen oder von beiden SH2-Domänen mutiert. Die anderen Varianten wurden in Patienten mit Krankheiten nachgewiesen.

Tabelle 11 Übersicht der exprimierten Proteine

Name des Proteins	Beschreibung	Krankheit
GST SH2 wildtyp	mit GST fusionierte tandem SH2-Domänen von SHP2	
GST SH2 R32A	R32A Variante von wildtyp	
GST SH2 T42A	T42A Variante von wildtyp	Noonan Syndrom
GST SH2 D61V	D61V Variante von wildtyp	Leukämie
GST SH2 D61Y	D61Y Variante von wildtyp	Leukämie
GST SH2 E76K	E76K Variante von wildtyp	Leukämie
GST SH2 D106A	D106A Variante von wildtyp	Noonan Syndrom
GST SH2 R138A	R138A Variante von wildtyp	
GST SH2 R138Q	R138Q Variante von wildtyp	Melanom
GST SH2 E139D	E139D Variante von wildtyp	Noonan Syndrom und Leukämie
GST SH2 RARA	R32A/R138A Variante von wildtyp	

Die für die SH2-Domänen codierende Sequenz wurde mit dem Gateway System in den pGEX-GW Vektor kloniert und in kompetente *BL21* transformiert. Nach der Induktion mit IPTG konnten die SH2-Domänen als GST-Fusionsprotein exprimiert werden.

Die Punktmutationen wurden mithilfe der QuikChange Mutagenese im Donorvektor eingefügt. Dieser wurde anschließend analog zu den wildtyp Domänen mit dem pGEX-GW Vektor rekombiniert, in *BL21* transformiert und exprimiert. In Abbildung 12 ist eine exemplarische SDS-PAGE Analyse der Bakterienlysate vor und nach der IPTG-Induktion gezeigt. Die Banden der GST-Fusionsproteine sind bei etwa 50 kDa zu erwarten und nach der IPTG Zugabe stärker und deutlich zu sehen.

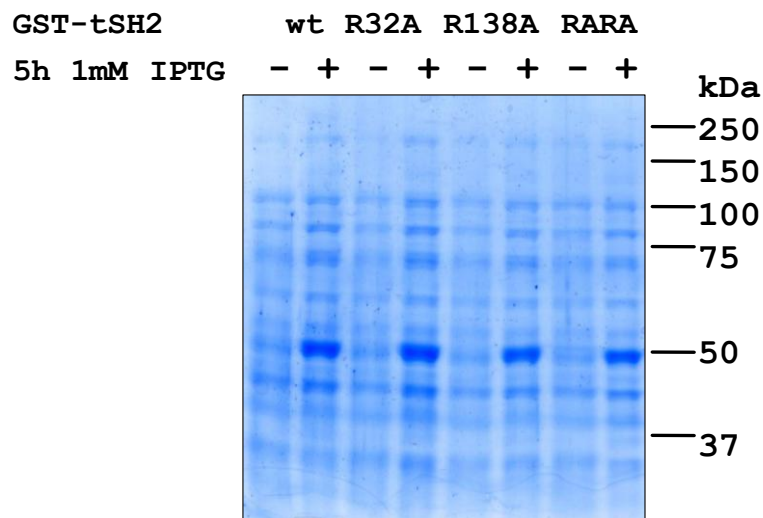


Abbildung 12 Expression von GST-fusionierten tandem SH2-Domänen von SHP2 in *E.coli*.

Die SDS-PAGE Analyse der Bakterienlysate (5 μ l des Expressionsansatzes) vor (-) und nach (+) Induktion der Expression der GST-fusionierten SH2 Domänen zeigt die induzierten Proteine (wt und Punktmutanten R32A, R138A und R32A R138A) bei etwa 50 kDa.

Aus den Bakterienlysaten wurden die gewünschten Proteine mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die durchschnittliche Ausbeute lag im Bereich von 10 mg pro Liter Expressionsansatz. Abbildung 13 zeigt exemplarisch einen Chromatogrammausschnitt der Elution und die SDS-PAGE Analyse der gesammelten Fraktionen der wildtyp SH2-Domänen. Die Proteine eluieren in hohen Konzentrationen sobald der Elutionspuffer die Säule durchläuft.

Auch die anderen Punktmutanten (Tabelle 11) ließen sich mit vergleichbaren Ausbeuten exprimieren und reinigen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die

mit GST fusionierten tandem SH2-Domänen so in einem Schritt in ausreichender Reinheit und Menge eluiert werden konnten.

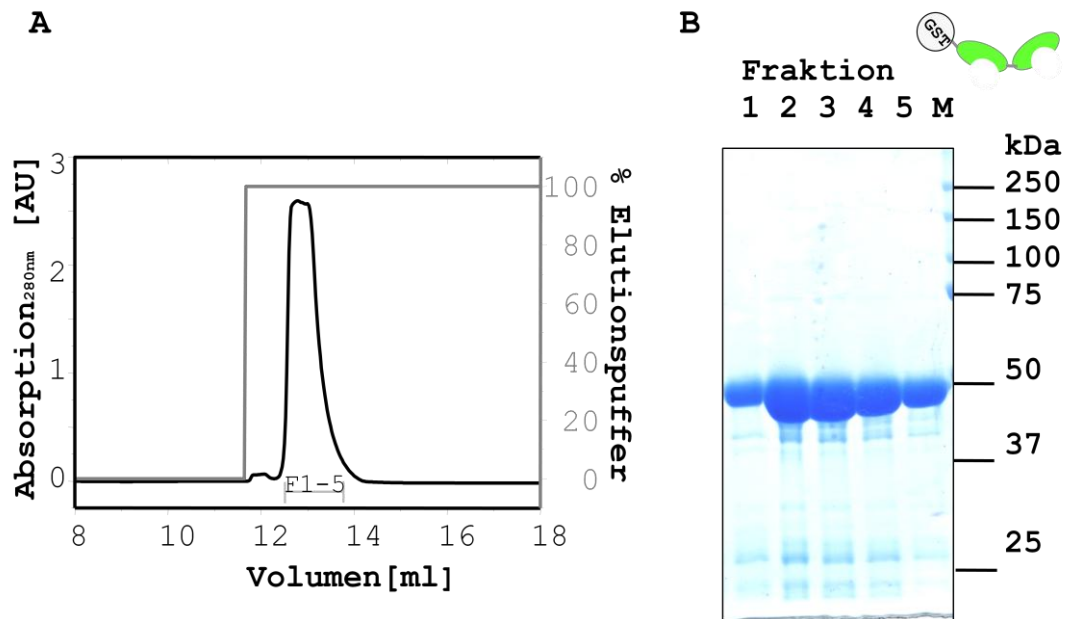


Abbildung 13 Affinitätsreinigung der GST-fusionierten wildtyp tandem SH2-Domänen aus Bakterienlysaten.

A Chromatogramm (F1-5: Fraktion 1-5)

B SDS-PAGE Analyse einer Elution (3 μ l des Eluats) der GST-Fusionsproteine.

2. Die Rolle der SH2-Domänen von SHP2 bei der Bindung an Peptide

Zur Untersuchung der Bedeutung der beiden SH2-Domänen in SHP2 für die Bindung an verschiedene Phosphotyrosinmotive wurden die RA Mutanten verwendet. Da jeweils das zentrale Arginin der einen oder von beiden SH2-Domänen mutiert sind und dadurch ihre Affinitäten zu Interaktionspartnern reduziert sind [62, 108], konnte so der Einfluß der Domänen auf die Bindung untersucht werden.

Die Bindungseigenschaften der Domänen wurden in Echtzeit mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) untersucht. Hierbei wurden biotinylierte, phosphorylierte Peptide, deren Sequenz aus den mit SH2-Domänen von SHP2 interagierenden Proteinen gp130 (pY759) [109-111] und dem PDGF-Rezeptor β (pY1009) [68, 112, 113] stammt, sowie ein nicht mit den SH2-Domänen interagierendes Phosphotyrosinmotiv aus dem PDGF-Rezeptor (pY751) über Neutravidin auf einem Chip immobilisiert. Vor den Messungen wurde eine Größenausschlußchromatographie der GST-SH2-Domänen durchgeführt, um mögliche Dimere oder Multimere abzutrennen (nicht gezeigt).

Das detektierte Signal ist direkt proportional zur Oberflächenbeladung. Daher wird die Menge des gebunden Proteins in Abhängigkeit der Injektionszeit im Sensogramm aufgezeichnet (Abbildung 14). Die Domänen wurden in verschiedenen Konzentrationen über die Oberfläche geleitet. Hier ist das Bindungsverhalten der Wildtyp SH2-Domänen an verschiedene pY Peptide gezeigt.

Im Falle des Phosphotyrosinmotivs pY751 aus dem PDGF-Rezeptor β (Abbildung 14 A) ist keine Bindung der Domänen sichtbar. Daher können durch den Phosphotyrosinrest oder durch das mit den Domänen fusionierte GST hervorgerufene, unspezifische Effekte auf die Bindung ausgeschlossen werden. Mit Beginn der Injektion der Domänen (Zeitpunkt 0) ist bei den Peptiden pY759 aus gp130 (Abbildung 14 B) und pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β (Abbildung 14 C) die Assoziation der Domänen zu erkennen. Nach 200 Sekunden wurde Waschlösung durch die Flußzelle gespült. Dabei war die Dissoziation der Domänen zu beobachten, die auch nach mehr als 10 Minuten nicht vollständig war. Die verbliebenen gebundenen Proteine auf der Oberfläche konnten nur mit denaturierendem Regenerationspuffer entfernt werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung wird ebenfalls deutlich; je höher die Konzentration der Domänen in der injizierten Lösung war, desto größer war das Signal der immobilisierten Domänen auf der Oberfläche und desto schneller deren Assoziation.

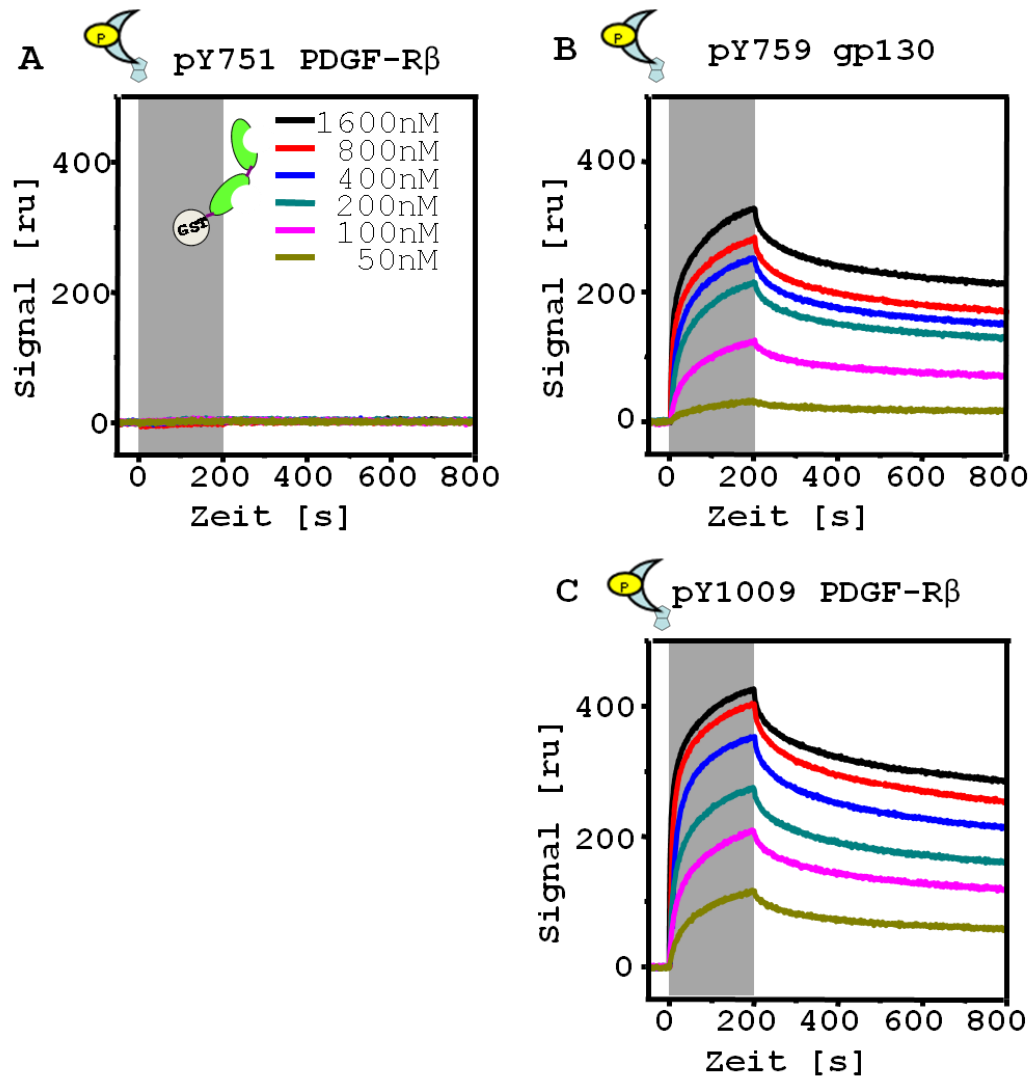


Abbildung 14 Interaktionen der wt tandem SH2-Domänen mit pY-Motiven.

Sensogramme der SPR Analyse

A Negativkontrolle: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung an das pY751 Motiv von PDGF-Rezeptor β

B Konzentrationsabhängigkeit der Bindung an das pY759 Motiv von gp130.

C Konzentrationsabhängigkeit der Bindung an das pY1009 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

1 ru entspricht 1 pg/mm² immobilisiertem Protein auf der Oberfläche, die Dauer der Injektion der SH2-Domänen ist grau unterlegt.

Die Bindungskurven zeigen, dass die GST-fusionierten SH2-Domänen nach der Reinigung ihrer Funktion nachkommen und Phosphotyrosinmotive spezifisch binden. Der biphasische Kurvenverlauf weist bereits daraufhin, dass eine Kooperativität der beiden Domänen vorliegt.

Mit dieser Methode konnte nun die Rolle der beiden SH2-Domänen für die Interaktionen mittels RA-Mutanten untersucht werden. In Abbildung 15 sind die Interaktionen der wildtyp SH2-Domänen und RA-Punktmutanten mit verschiedenen

Phosphotyrosinmotiven aus gp130 und PDGF-Rezeptor β durch Sensogramme dargestellt. Diese Motive umfassen neben den bereits erwähnten pY759, pY1009 und pY751 auch zusätzlich pY763 aus dem PDGF-Rezeptor β , welches ebenfalls als mit SHP2 interagierendes Motiv bekannt ist [114]. Die Bindungen der wildtyp GST-SH2-Domänen und der RA Punktmutanten an Peptide bei Injektion einer 400 nM Lösung wurden untersucht. Wieder ist keine Bindung der Domänen an das nicht interagierende Phosphotyrosinmotiv 751 aus dem PDGF-Rezeptor β sichtbar (Abbildung 15 A).

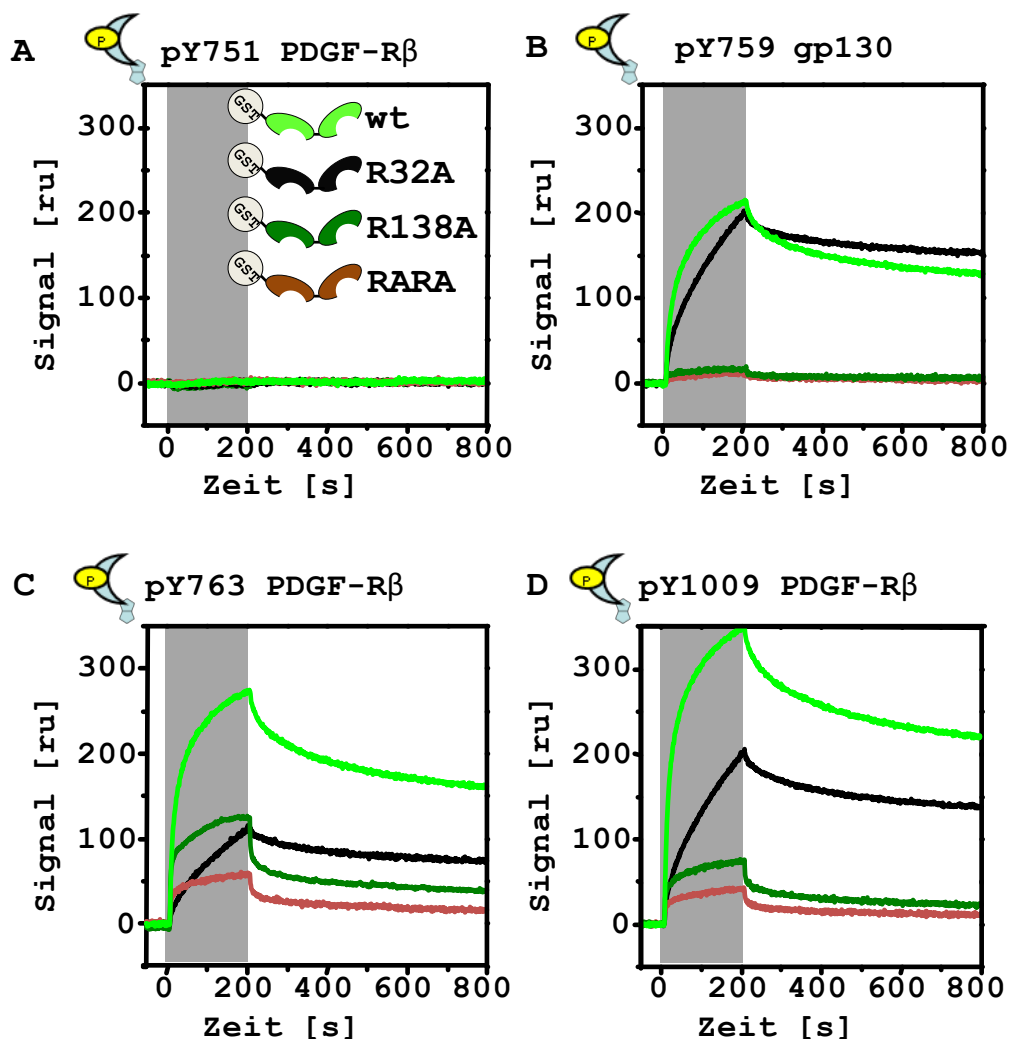


Abbildung 15 Interaktion der RA Punktmutanten und wt SH2-Domänen mit pY Motiven.

Sensogramme der SPR Analyse

A Negativkontrolle: Bindung an das pY751 Motiv von PDGF-Rezeptor β

B Bindung an das pY759 Motiv von gp130.

C Bindung an das pY763 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

D Bindung an das pY1009 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

Es wurde jeweils die Injektion mit einer 400 nM Lösung durchgeführt. 1 ru entspricht 1 pg/mm² immobilisiertem Protein auf der Oberfläche, die Dauer der Injektion der SH2-Domänen ist grau unterlegt.

Da in der verwendeten Meßapparatur dieselben Lösungen der SH2-Domänen über verschiedene Peptide geleitet werden, kann es nicht wie bei einzelnen, aufeinanderfolgenden Messungen zu Konzentrationsunterschieden kommen. Da anzunehmen ist, dass vergleichbare Mengen der Peptide immobilisiert wurden, sind die Bindungen der Domänen an die Peptide direkt vergleichbar. Die Affinität der wildtyp Domänen zu dem Phosphotyrosinmotiv 759 aus gp130 (pY759, siehe Abbildung 15 B) ist geringer als die zu den Phosphotyrosinmotiven 763 und 1009 aus PDGF-Rezeptor β (pY763 und pY1009; siehe Abbildung 15 C und D).

Im Vergleich der Bindungskurven der wildtyp Domänen (hellgrün) und der R32A Mutante (schwarz) an pY759 (Abbildung 15 B) ist neben einer nur leicht veränderten Kinetik eine mit den wildtyp Domänen vergleichbare Bindung zu beobachten, während die R138A (dunkelgrün) und die R32A/R138A Mutanten (braun) nahezu keine Assoziation zeigen.

Die wildtyp SH2-Domänen haben eine höhere Affinität zu pY763 als die Mutanten (siehe Abbildung 15 C). Die Assoziation und die Dissoziation der beiden Einzelmutanten verlaufen jeweils anders als die der wildtyp Domänen: Während die R32A Mutante gegenüber den wildtyp Domänen deutlich verlangsamt assoziiert und leicht verlangsamt dissoziiert, ist die Dissoziation der R138A Mutante deutlich schneller. Die Maxima der Bindungskurven der R32A und der R138A Mutanten sind vergleichbar groß, wobei aufgrund der langsameren Assoziation der R32A Mutante bei einer längeren Injektion eine höhere Amplitude zu erwarten wäre. Die Dissoziation der Doppelmutante ist schneller als die der wildtyp Domänen.

Bei der Bindung an pY1009 (Abbildung 15 D) zeigen die wildtyp Domänen eine schnelle Assoziation und eine damit verglichen langsame Dissoziation. Im Vergleich mit den Mutanten ist die Affinität der wildtyp Domänen die höchste. Die Assoziation der R32A Mutante an dieses Motiv ist gegenüber den wildtyp Domänen verlangsamt, die Dissoziation ebenfalls. Die Bindungskurve der R138A Mutante zeigt eine deutlich geringere Amplitude am Ende der Injektion und eine schnellere Dissoziation als die wildtyp Domänen. Das Maximum der Bindungskurve der Doppelmutante ist geringer als die der anderen.

Die wildtyp Domänen haben eine höhere Affinität zu pY763 und pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β als die RA-Punktmutanten. Es zeigt sich sowohl für pY759 aus gp130 (Abbildung 15 B) als auch für pY763 und pY1009 aus PDGF-Rezeptor β

(Abbildung 15 C und D) ein durch die beiden vorhandenen Bindungsstellen und deren möglichen Kooperativität erklärbares, komplexes Bindungsverhalten, das nicht einer Interaktion mit einer 1:1 Stöchiometrie entspricht. Die Kurven der RA-Doppelmutante verdeutlichen, dass die Punktmutationen die Affinität reduzieren. Die Doppelmutante bindet dennoch an die Peptide aus dem PDGF-Rezeptor β , der Einfluß der Domänen auf die Bindung wird durch die Mutationen nicht völlig eliminiert. Allgemein scheint die C-terminale SH2-Domäne für die Bindung wichtiger als die N-terminale, die R32A Mutante scheint eine höhere Affinität zu haben als die R138A Mutante. Diese Tendenz ist besonders bei der Interaktion mit pY759 aus gp130 zu sehen, die Bindung der R32A Mutante am Ende der Injektion ist vergleichbar mit der von den wildtyp Domänen. Die Affinitäten der R138A Mutante und der RA Doppelmutante sind dagegen vernachlässigbar gering. Bei der Interaktion der Domänen mit pY763 und pY1009 ist ein höherer Einfluß der N-terminalen Domäne als bei der Interaktion mit pY759 sichtbar, aber auch hier kommt der C-terminalen SH2-Domäne eine größere Bedeutung zu.

Bezüglich der Bindung an das Phosphotyrosinmotiv 759 aus gp130 kann demnach festgehalten werden, dass im Vergleich der Bindungskurven von wildtyp Domänen und R32A Mutante ein vergleichbares Maximum sichtbar ist, das größer als das der beiden anderen Mutanten ist. Da in dem R138A Konstrukt das Arginin der N-terminalen SH2-Domäne nicht mutiert ist, aber die Bindungskurven dieser Mutante und der Doppelmutante gleich sind, scheint die N-terminale SH2-Domäne im Gegensatz zur C-terminalen keine wichtige Rolle bei der Bindung an pY759 zu spielen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Rolle der beiden SH2-Domänen für die Interaktion der Domänen mit gp130 im Gleichgewicht in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit untersucht [115]. Dazu wurden die Peptide nicht an Chip-Oberflächen, sondern an mit Streptavidin beschichteten magnetischen Beads immobilisiert und anschließend über Nacht mit den Domänen inkubiert. Nach entsprechenden Waschschritten wurden die gebundenen Domänen durch Erhitzen von den Peptiden eluiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und durch Immundetektion mit Antikörpern gegen GST sichtbar gemacht (Abbildung 16).

In der Konzentrationskontrolle (Abbildung 16 B) sind die Mengen der eingesetzten Domänen zu sehen. Das Signal der Bande der R32A Mutante erscheint ein wenig stärker als das der anderen Domänen. Die wildtyp Domänen wurden von pY759 gut detektierbar präzipitiert (Abbildung 16 A, Spur 4). Von dem unphosphorylierten

Peptid (Y759) konnten die wildtyp Domänen deutlich schlechter gebunden werden (Spur 3). Die bei der Bindungsanalyse in Echtzeit beobachtete Tendenz, dass die C-terminale Domäne eine wichtigere Rolle bezüglich der Bindung an das phosphorylierte Tyrosinmotiv pY759 aus gp130 spielt, zeigte sich auch hier: Die R32A Mutante wurde trotz Berücksichtigung der Beladungsunterschiede (Abbildung 16 B) von pY759 in mit den wildtyp SH2-Domänen vergleichbaren Mengen gebunden. Die Mengen der präzipitierten R138A Mutante und der Doppelmutante R32A/R138A waren vernachlässigbar gering. Sie liegen in der gleichen Größenordnung wie die von den Beads ohne und mit dem unphosphorylierten Peptid immobilisierten wildtyp Domänen und werden damit nicht der Interaktion mit dem phosphorylierten Tyrosin zugeschrieben.

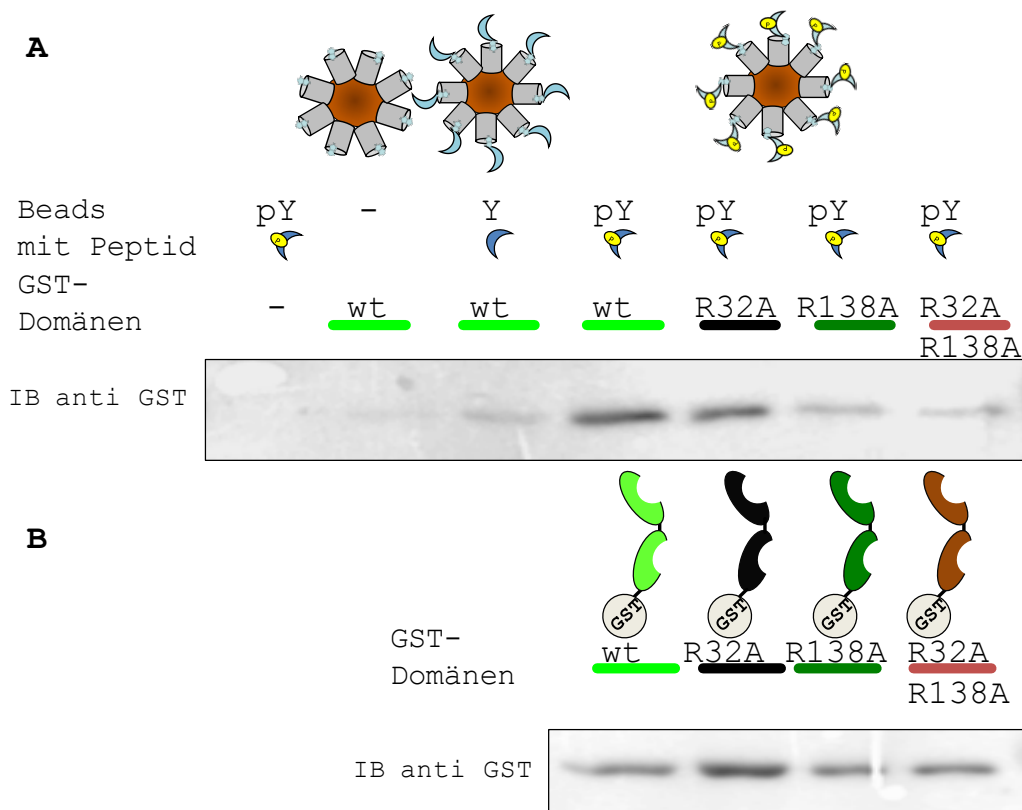


Abbildung 16 Die Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an pY759 aus gp130 im Gleichgewicht.

A Peptidpräzipitation: Aufgereinigte, bakteriell exprimierte GST-fusionierte SH2-Domänen von SHP2 und RA-Punktmutanten wurden mit über Biotin an Streptavidin-Beads gebundenen Peptiden (Y759 und pY759 aus gp130) inkubiert. Nach der Elution und einer SDS-PAGE wurden die Domänen auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen GST immunodektiert.

B Konzentrationskontrolle der eingesetzten Domänen (Blots sind [115] entnommen)

In den Versuchen konnte bestätigt werden, dass die C-terminale SH2-Domäne von SHP2 eine dominierende Rolle bei der Bindung an pY759 von gp130 spielt. Im

Vergleich dazu zeigte die N-terminale SH2-Domäne keine relevante Funktion bei der Bindung an dieses Motiv.

Die bisher gezeigten Experimente wurden mit bakteriell exprimierten, aufgereinigten Domänen durchgeführt, die N-terminal mit GST fusioniert waren. Um die Domänen im zellulären Kontext zu untersuchen wurden Konstrukte kloniert, die die Expression der SH2-Domänen mit einem C-terminalen V5-Tag in HeLa Zellen erlauben ([115]). Werden die so exprimierten Domänen aus den Lysaten präzipitiert, müssen sie mit der endogenen SHP2 und anderen Interaktionspartnern um die Bindung an das Phosphotyrosinmotiv konkurrieren.

In Abbildung 17 A ist die Immundetektion der Domänen und der endogenen SHP2 einer Peptidpräzipitation aus Lysaten transient transfizierter Zellen gezeigt. Die Domänen wurden in den Lysaten in gleichen Mengen exprimiert (Abbildung 17 B). Die Kontrolle der Präzipitation mit dem Y759 Peptid zeigt weder ein Signal für die endogene SHP2 noch für die Domänen (Abbildung 17 A Spuren 1 und 2). Dagegen zeigt die Präzipitation mit dem pY759 aus Lysaten von untransfizierten Zellen ein starkes Signal der SHP2 (Spur 3). Dieses wird in Lysaten aus transfizierten Zellen durch die Bindung der wildtyp Domänen reduziert (Spur 4). Sind die Affinitäten der SH2-Domänen durch die Mutation der Arginine reduziert, ist auch die detektierte Menge der präzipitierten Domänen verringert (Spuren 5 bis 7). Nur durch die Bindung der wildtyp SH2-Domänen kann die Menge der präzipitierten endogenen Phosphatase SHP2 sichtbar verringern (Abbildung 17 A, unten).

Die Präzipitation der R32A Mutante der SH2-Domänen führt zu einer sichtbaren Bande (Spur 5), welche jedoch viel schwächer als die der wildtyp Domänen (Spur 4) ist. Allerdings nimmt die R32A Mutante keinen detektierbaren Einfluß auf die Menge der präzipitierten endogenen SHP2, was auf die Komplexität der Bindung hinweist. Die Menge der präzipitierten R138A Mutante ist vergleichsweise gering. Da in dieser Mutante die N-terminale SH2-Domäne nicht mutiert und somit dem wildtyp Konstrukt entsprechend bindungsfähig ist, hat sie für die Bindung an pY759 folglich nur einen geringen Einfluß und die dominante Rolle der C-terminalen SH2-Domäne bei der Bindung wurde bestätigt. Die RA Doppelmutante zeigt kein detektierbares Signal, beide SH2-Domänen haben eine durch die Punktmutationen verringerte Affinität. Da die R138A Mutante und die RA Doppelmutante kaum bzw. nicht an das Motiv binden, haben sie in diesen Experimenten auch keinen Einfluß auf die Menge der präzipitierten Phosphatase. Interessanterweise ist das Signal der präzipitierten wildtyp Domänen stärker als das der R32A Mutante. Folglich reicht eine dem wildtyp entsprechende C-terminale SH2-Domäne allein nicht für eine mit

den wildtyp tandem Domänen vergleichbare Bindung aus. So zeigt sich auch hier die Komplexität der Interaktionen dieser SH2-Domänen mit Phosphotyrosinmotiven.

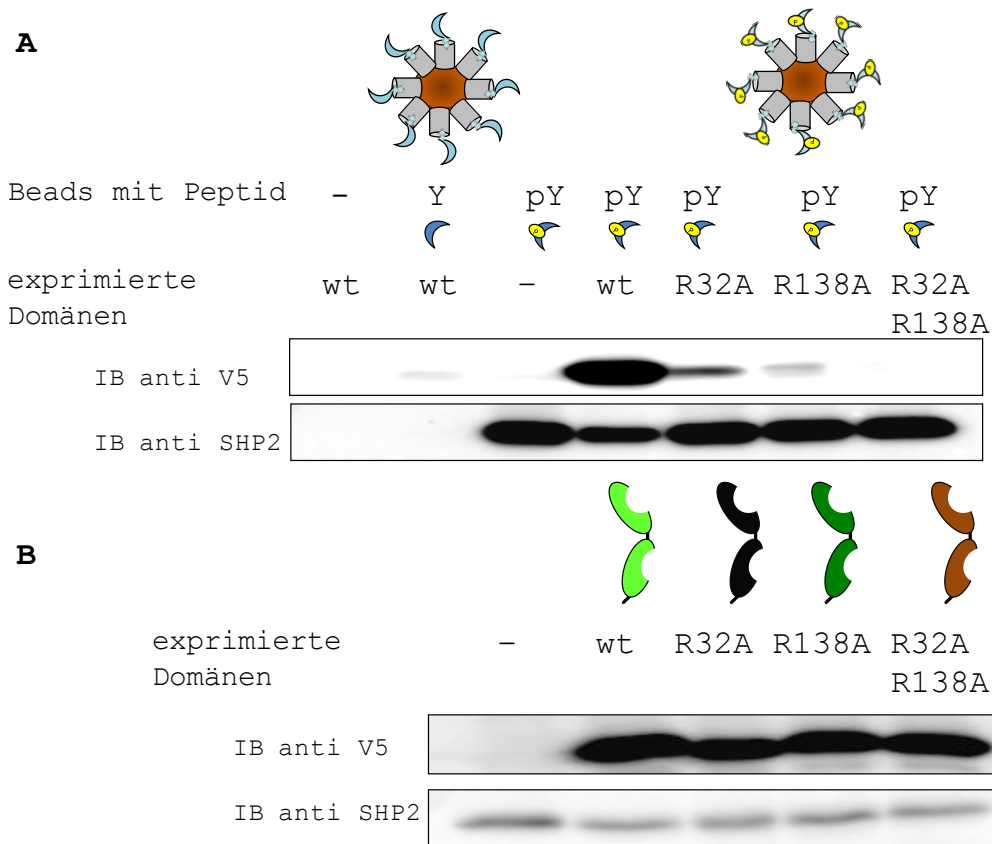


Abbildung 17 Die Bindung der SH2-Domänen und RA-Punktmutanten von SHP2 an pY759 aus gp130 in Konkurrenz mit der endogenen SHP2.

A: Peptidpräzipitation: Lysate, die aus Zellen hergestellt wurden, die SH2-Domänen für 48h transient in HeLa Zellen exprimiert hatten, wurden mit über Biotin an Streptavidin-Beads gebundenen Peptiden (Y759 und pY759 aus gp130) inkubiert. Nach der Elution und einer SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die Mengen der und präzipitierten Domänen und endogenen SHP2 mit Antikörpern gegen GST immunodektiert.

B: Lysat: Expressionskontrolle der Domänen und der endogenen SHP2 (Blots sind [115] entnommen)

Die Ergebnisse dieser Experimente mit zellulärem Kontext bestätigen die erhaltenen Resultate der SPR-Messungen: Die C-terminalen Domäne spielt eine dominante Rolle für die Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an pY759 aus gp130.

In diesem Kapitel wurde die Integrität der aufgereinigten GST-fusionierten Domänen demonstriert. Die bakteriell exprimierten GST-fusionierten SH2-Domänen können für weitere Untersuchungen verwendet werden. Weiterhin wurde die Bedeutung der SH2-Domänen für die Bindung an Phosphotyrosinmotive mit

verschiedenen Methoden und Ansätzen untersucht, deren Resultate miteinander im Einklang stehen. Für die Bindung an pY759 nimmt die C-terminale SH2-Domäne eine dominierende Rolle ein.

3. Der Einfluß von krankheitsrelevanten Punktmutationen auf die Bindungseigenschaften der SH2-Domänen

Bei Patienten wurden u.a. auch Punktmutationen in der C-terminalen SH2-Domäne von SHP2 gefunden. Sowohl die Kristallstruktur [56] als auch MD Simulationen von SHP2 [71] weisen darauf hin, dass eine gestörte Autoinhibition von SHP2 nicht die Effekte aller Punktmutanten erklären kann. Die mutierten Reste befinden sich nicht ausschließlich in der Interaktionsfläche der N-terminalen Domäne mit der PTP - Domäne, sondern auch in der Nähe oder sogar in der pY Bindungstasche der SH2-Domänen.

Zur Einordnung der ausgewählten Mutanten wurden Immundetektionen von Präzipitaten aus Zelllysaten und Bindungsstudien auf Oberflächen durchgeführt. Anschließend wurden massenspektrometrische Analysen (siehe Kapitel IV.5) zur Erforschung des Interaktoms vorgenommen.

3.1. Mutationen R138Q und E139D in der C terminalen SH2-Domäne

Im vorhergehenden Abschnitt zeichnete sich bei der Untersuchung der Domänen ab, dass die C-terminale SH2-Domäne bei der Bindung an gp130 eine dominierende Rolle spielt. Daher wurden für eine erste Überprüfung der veränderten Bindungseigenschaften die krankheitsrelevanten Mutationen in der C-terminalen Domäne betrachtet (vergl. Tabelle 11). Die eingesetzten Punktmutationen führen zum Austausch der Aminosäuren Arginin 138 nach Glutamin (R138Q) und Glutaminsäure 139 nach Asparaginsäure (E139D) in der Bindungspalte der C-terminalen SH2-Domäne.

Die tandem Domänen wurden kovalent an magnetische Beads gekoppelt, welche dann zur Präzipitation von interagierenden Proteinen aus Zell-Lysaten verwendet wurden. Die präzipitierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immundetektion phosphorylierter Tyrosylreste visualisiert (Abbildung 18). Die Zellen wurden vor der Präzipitation mit dem Wachstumsfaktor EGF für die angegebenen Zeitspannen stimuliert. Die Lysate wurden jeweils aufgeteilt, um für gleiche Bedingungen während der Präzipitation zu sorgen. Die Menge der eingesetzten Domänen wurde durch Coomassie-Färbung gezeigt. Aus unstimulierten Lysaten werden von keinem der analysierten Proteine detektierbaren Mengen phosphorylierter Proteine präzipitiert (Spuren 1, 6 und 11). Die wildtyp Domänen präzipitieren mehrere verschiedene phosphorylierte Proteine aus den Lysaten (Spuren 2 bis 5). Im Vergleich der von den wildtyp SH2-Domänen präzipitierten Proteine mit denen der von Punktmutanten (Spuren 6 bis 10 und

11 bis 15) ist offensichtlich, dass sich mindestens die Mengen der gebundenen Proteine deutlich unterscheiden. Zusätzlich demonstriert die R138Q Mutante eine stark reduzierte Affinität zu den Bindungspartnern (Spuren 11 bis 15). Die Bindung von Proteinen aus dem Zelllysate an die R138Q Mutante ist nicht mehr detektierbar, was vermutlich durch die Präsenz der endogenen SHP2 erklärbar ist. Insgesamt wird deutlich, dass sich die aus den Zelllysaten präzipitierten phosphorylierten Proteine unterscheiden, wenn sie von den wildtyp SH2-Domänen oder deren in der C-terminalen SH2-Domäne modifizierten Punktmutanten gebunden werden.

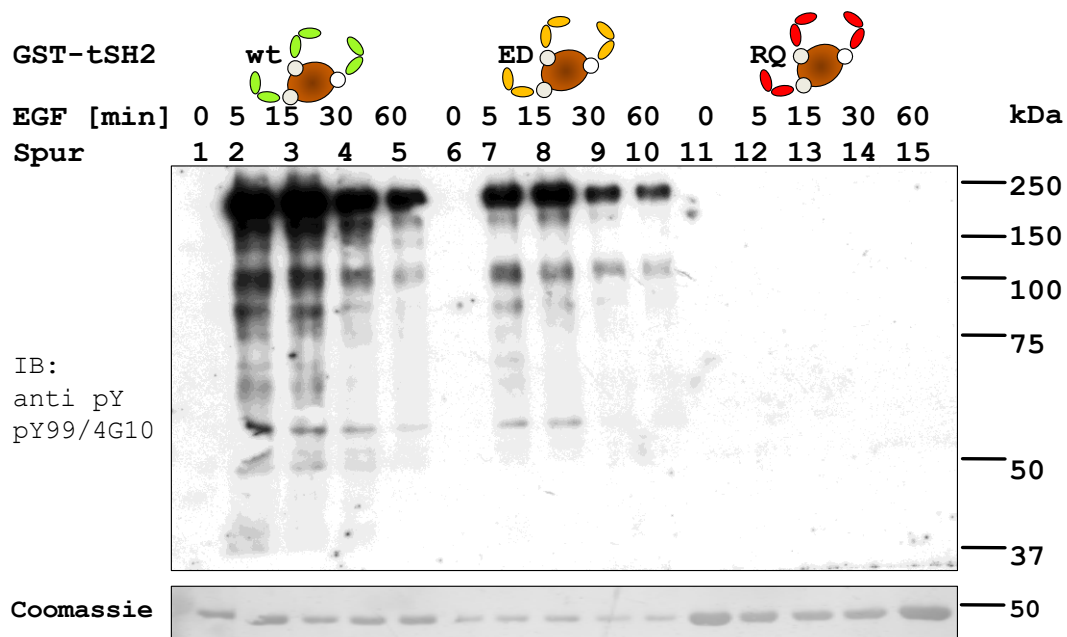


Abbildung 18 Nach EGF-Stimulationen durch die GST-tandem SH2-Domänen von SHP2 und die Varianten R138Q und E139D aus Lysaten präzipitierte, an Tyrosinen phosphorylierte Proteine.

Primäre humane Fibroblasten wurden mit 100 ng EGF für die angegebenen Zeiträume stimuliert und lysiert. Die Interaktionspartner wurden aus 350 µg Zelllysate präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine durchgeführt. Die Menge der eingesetzten Domänen wurde durch Coomassie Färbung der Membran dargestellt.

3.2. Die Bindung krankheitsrelevanter Punktmutanten an Peptide

Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von ausgewählten, in Krankheiten vorkommenden Punktmutanten von SHP2 wurden weiterhin durch Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. Um das Spektrum der untersuchten Mutationen zu erweitern wurden jetzt auch Mutanten in der N-terminalen SH2-Domäne analysiert (Übersicht der Auswahl siehe Tabelle 11).

Die bereits bei der Analyse der RA Mutanten benutzten phosphorylierten Peptide, aus gp130 und dem PDGF-Rezeptor β wurden auf einem Chip immobilisiert. Neben den mit GST-fusionierten wildtyp SH2-Domänen wurde die Auswahl der Punktmutanten in verschiedenen Konzentrationen injiziert. In Abbildung 19 sind exemplarisch die aus einer Injektion von 1,6 μM Lösungen resultierende Signale in Abhängigkeit der Zeit gezeigt.

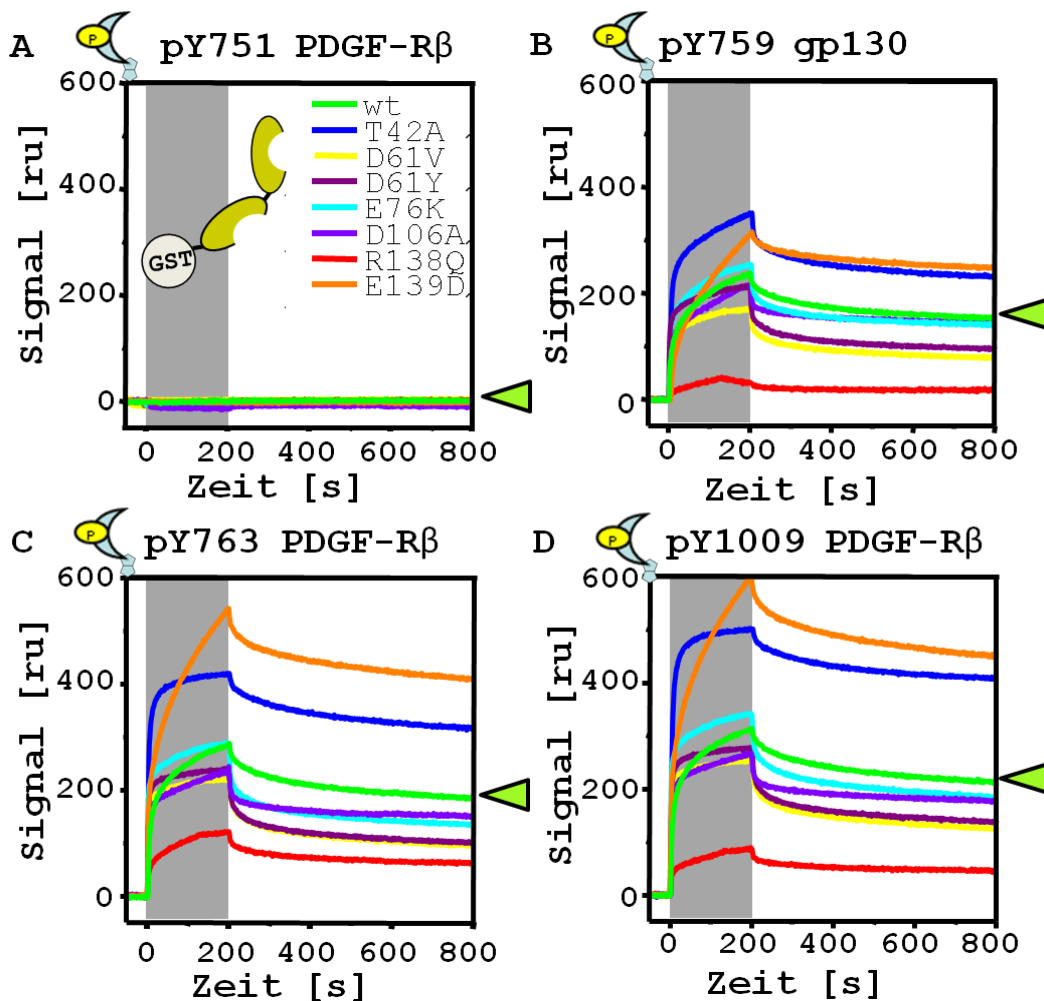


Abbildung 19 Interaktion der mit GST fusionierten wildtyp SH2-Domänen und der krankheitsrelevanten Punktmutanten mit verschiedenen Phosphotyrosinmotiven.

Sensogramme der SPR Analyse

A Negativkontrolle: Bindung an das pY751 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

B Bindung an das pY759 Motiv von gp130.

C Bindung an das pY763 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

D Bindung an das pY1009 Motiv von PDGF-Rezeptor β .

Die Injektionen von 1,6 μM Lösung sind gezeigt. 1 ru entspricht 1 pg/mm² immobilisiertem Protein auf der Oberfläche, die Dauer der Injektion der SH2-Domänen ist grau unterlegt, das grüne Dreieck markiert das Signal der wildtyp Domänen.

Die Domänen zeigen keine Bindung an das phosphorylierte Motiv pY751 aus dem PDGF-Rezeptor β (Negativkontrolle, Abbildung 19 A) und verdeutlichen damit, dass die gemessenen Signale nicht auf einer Wechselwirkung beruhen, die ausschließlich auf ein phosphoryliertes Tyrosin zurückzuführen ist, sondern dass die Bindung auch abhängig von der Sequenz eines Motivs ist. Im Fall der anderen Peptide (Abbildung 19 B und C) ist in den ersten 200 Sekunden während der Injektion der Domänen die Assoziation an die Peptide und anschließend die unvollständige Dissoziation erkennbar.

Die Kurven der Bindung der wildtyp Domänen an die phosphorylierten Peptide zeigen auch bei dieser Konzentration einen komplexen Verlauf. Während der Assoziation und Dissoziation sind zunächst eine schnelle und dann eine langsamere Phase erkennbar. Sowohl die Intensitäten als auch der Kurvenverlauf von den wildtyp Domänen und der T42A (blau), R138Q (rot) und der E139D (orange) Mutanten unterscheiden sich.

Bei der Interaktion mit dem pY759 Motiv (Abb. B) zeigen die Mutanten T42A (blau) und E139D (orange) eine leicht höhere Affinität als die wildtyp Domänen. Hierbei zeigt die T42A Mutante eine schnellere Assoziation und Dissoziation. Die E139D Mutante assoziiert anfangs zwar langsamer, erreicht jedoch am Ende der Injektion eine höhere Amplitude als der wildtyp. Im Verlauf der Assoziation ist eine Ähnlichkeit mit dem Verhalten der R32A Mutante (Abbildung 17) zu sehen. Die Bindungskurve der R138Q Mutante (rot) deutet auf eine deutlich niedrigere Affinität hin, hat jedoch auch einen Verlauf, der nicht durch eine 1:1 Reaktion erklärbar ist. Vergleicht man die Interaktionen der wildtyp Domänen mit denen der Punktmutanten D61V (gelb), D61Y (violett), E76K (hellblau) und D106A (dunkelblau), sind zwar leichte Abweichungen in der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit aber keine dramatischen Effekte für erkennbar.

Für die Bindung an die Motive pY763 und pY1009 (Abbildung 19 C und D) sind die Unterschiede zwischen den Punktmutanten T42A, E139D und R138Q und den wildtyp SH2-Domänen noch deutlicher erkennbar. Die T42A Mutante assoziiert deutlich schneller, wogegen die Dissoziation kaum beeinträchtigt ist. Diese Mutante hat eine höhere Affinität zu den Peptiden als die wt Konstrukte. Auch die Affinität der E139D Mutante ist höher, hier ist die Assoziation wieder zuerst langsamer und die gebundene Menge am Ende der Injektion größer. Die R138Q bindet zwar an die Motive, aber mit deutlich geringerer Affinität. Wie bereits für die Bindung an pY759 beobachtet, haben die Mutationen D61V (gelb), D61Y (violett), E76K (hellblau) und

D106A (dunkelblau) bis auf kleine Abweichungen in der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit keine dramatischen Effekte auf die Bindungen.

Diese Experimente zeigten, dass die Mutanten unterschiedliche Bindungseigenschaften haben, die sich je nach Bindungspartner unterscheiden können. Die Mutanten, deren Mutationen in der N-terminalen Domäne außerhalb der Bindungstasche lokalisiert sind (D61V, D61Y, E76K) und die Punktmutation in der Verbindungssequenz der beiden Domänen (D106A) haben keine relevanten Auswirkungen auf die Bindung an die untersuchten Motive. Die Punktmutanten T42A, R138Q und E139D zeigen die größten Effekte. Damit sind sie am interessantesten für weitere Analysen. Die in der C-terminalen Domäne mutierten Proteine R138Q und E139D haben entgegengesetzte Auswirkungen, die R138Q hat eine reduzierte und die E139D eine höhere Affinität als die wildtyp SH2-Domänen. Die T42A Mutante verdeutlicht außerdem, dass die N-terminale SH2-Domäne vor allem bei der Bindung an pY763 und pY1009 eine Bedeutung hat.

Um auszuschließen, dass Änderungen der Bindungseigenschaften durch eine von der Punktmutation bedingten, alternativen Sekundärstruktur hervorgerufen werden, wurden vom wildtyp GST-Fusionsprotein und von den Punktmutanten T42A, R138Q und E139D Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 20). Die Konzentrationen wurden spektrometrisch bestimmt und mit einer SDS PAGE Analyse überprüft. Der Austausch der einzelnen Aminosäuren hat keine Auswirkungen auf die Sekundärstruktur, die Spektren unterscheiden sich nicht voneinander. Die Sekundärstrukturen dieser Punktmutanten sind unverändert.

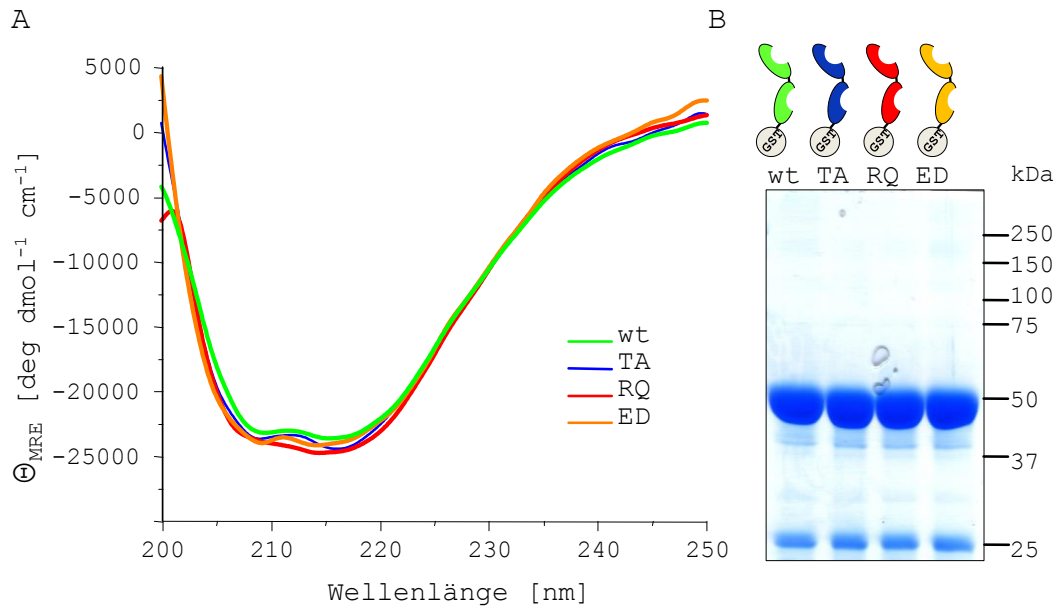


Abbildung 20 Relative Analyse der Sekundärstruktur der Punktmutanten
A CD-Spektren
B Konzentrationskontrolle der eingesetzten Domänen vor der Verdünnung mittels SDS-PAGE Analyse (5 μ l)

4. Neue Interaktionspartner der wildtyp SH2-Domänen von SHP2

Bisher wurde untersucht, wie die GST-fusionierten SH2-Domänen von SHP2 an Peptide binden. Vor allem interessant ist, an welche Proteine sie binden können. Die von den in der C-terminalen Domäne mutierten und den wildtyp Konstrukten präzipitierten, an Tyrosylresten phosphorylierten Proteine wurden bereits dargestellt (Abbildung 18). Um die potentiellen Interaktionspartner auch benennen zu können, wurden diese wieder aus lysierten Zellen präzipitiert und zunächst im Immunoblot betrachtet. Anschließende Experimente wurden nach der Markierung von Zellen mit stabilen Isotopen von Aminosäuren in der Zellkultur (SILAC) durchgeführt. Dies ermöglichte eine nachfolgende Analyse mittels einer an eine RPHPLC Säule gekoppelten Orbitrap. So konnten die Interaktionspartner sowohl identifiziert als auch relativ quantifiziert werden. Die gefundenen, spezifisch mit den wt SH2-Domänen interagierenden Proteine wurden weiterhin als Filter für die Interaktionen mit den Mutanten verwendet. Durch die Experimente sollten einerseits Informationen über Bindungseigenschaften der wildtyp SH2-Domänen erhalten werden und andererseits auch das Interaktom der Mutanten beschrieben werden.

4.1. Abhängigkeit der präzipitierten Proteine vom Stimulus

Die Phosphorylierung von Tyrosylresten in Proteinen ist eine Möglichkeit, Signale innerhalb und zwischen Zellen zu propagieren. Je nach Zellart und Stimulus sind dies unterschiedliche oder teilweise auch die gleichen phosphorylierten Proteine. Daher stellte sich die Frage, ob die Interaktionspartner nach verschiedenen Stimulationen unterschiedlich sind, unter welchen Bedingungen und mit welchem Stimulus die meisten Interaktionspartner gefunden werden können.

Die Präzipitate aus Zellen, die für verschiedene Zeiträume mit EGF stimuliert waren wurden bereits gezeigt (Abbildung 18). Abbildung 21 zeigt das experimentelle Design und die Immundetektion von durch die wildtyp SH2-Domänen präzipitierten, an Tyrosylresten phosphorylierten Proteinen. Sie wurden aus Lysaten unterschiedlich stimulierter Zellen gebunden. Schon die Verteilung der phosphorylierten Proteine in den Lysaten unterscheidet sich deutlich. Je nach Stimulation werden unterschiedliche an Tyrosylresten phosphorylierte Proteine durch die Bindung an die Domänen angereichert.

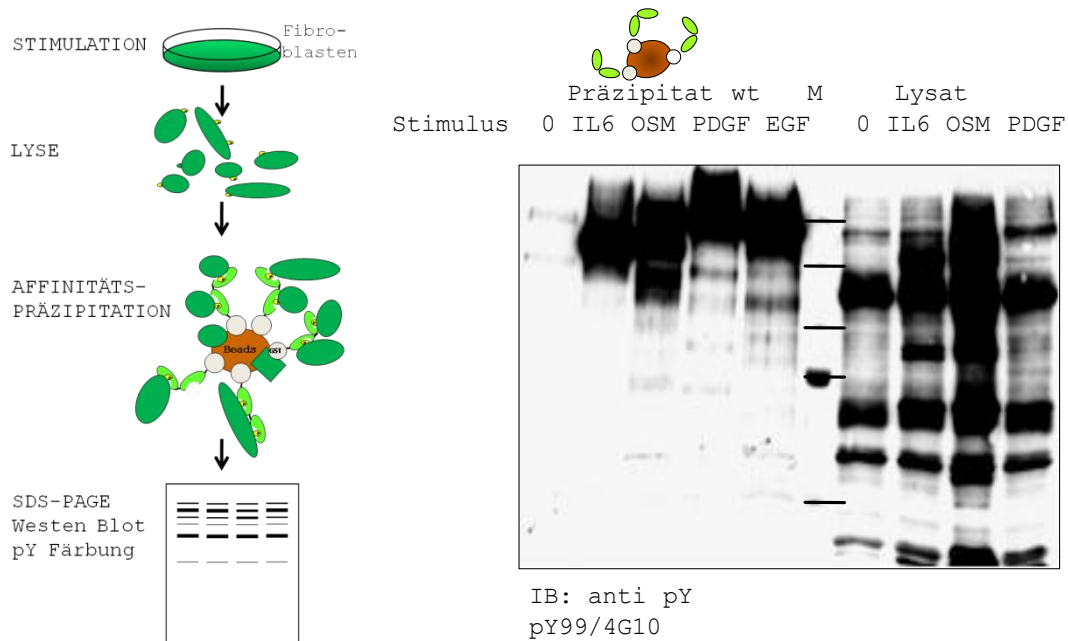


Abbildung 21 Nach verschiedenen Stimulationen durch die GST-tandem SH2-Domänen von SHP2 aus Lysaten präzipitierte, an Tyrosinen phosphorylierte Proteine.

Primäre humane Fibroblasten wurden für 8 Minuten mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren (IL6 [200 U/ml]/gp80 [500 ng/ml], OSM [5 ng/ml], PDGF [20 ng/ml] oder EGF [20 ng/ml]) stimuliert und danach lysiert. Die Interaktionspartner wurden aus 320 µg Zelllysate präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine durchgeführt. M – Größenstandard, von oben nach unten 250, 150, 100, 75 und 50 kDa

Nach der Stimulation werden verschiedene Signalwege aktiviert, die teilweise dieselben Moleküle gemeinsam nutzen. Eines davon ist die regulatorische Untereinheit der Phosphatidyl-inositol-3 Kinase (PI3K) p85 β . Die Assoziation von p85 mit SHP2 wurde für hämatopoetische Zellen von Zhang und Broxmeyer [116] bereits 1999 beschrieben. Um herauszufinden, ob verschiedene Stimulationen immer zur Präzipitation bestimmter Proteine durch die SH2-Domänen von SHP2 führen, wurde exemplarisch die Interaktion der Domänen mit p85 untersucht. Eine Immundetektion nach der Präzipitation durch die SH2-Domänen von SHP2 ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Untereinheit der Kinase ist in allen Lysaten nach den verschiedenen Stimuli detektierbar. Allerdings wird p85 von den SH2-Domänen nur aus den Lysaten gebunden, die Extrakte von mit PDGF stimulierten Zellen waren. Möglicherweise sind die für die Bindung notwendigen phosphorylierten Tyrosine in den anderen Lysaten zu den gemessenen Zeitpunkten unphosphoryliert oder durch die Bindung anderer Proteine mit einer höheren Affinität blockiert.

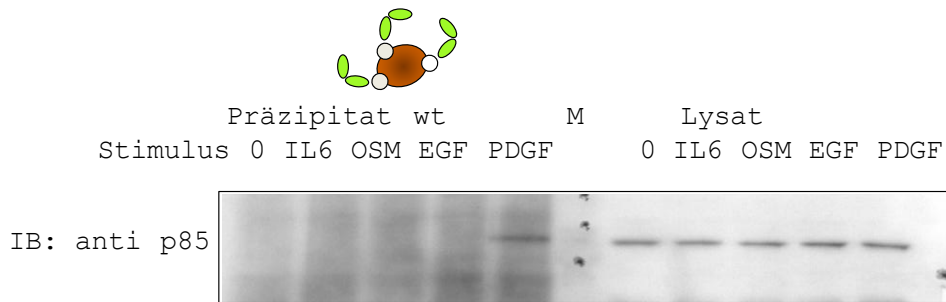


Abbildung 22 Auswirkungen von verschiedenen Stimulationen auf die Präzipitation von PI3K p85 durch die GST fusionierten SH2 Domänen. Primäre humane Fibroblasten wurden mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (IL6 [200 U/ml], OSM [5 ng/ml], PDGF [100 ng/ml] oder EGF [100 ng/ml]) für 8 Minuten stimuliert und lysiert. Die Interaktionspartner wurden aus 350 µg Zelllysate präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen p85 durchgeführt.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass nicht nach jeder Stimulation die gleichen Moleküle miteinander interagieren. Abhängig vom Stimulus werden unterschiedliche Proteine präzipitiert.

4.2. Abhängigkeit der präzipitierten Proteine von Pervanadat

Anhand der in Abbildung 22 gezeigten präzipitierten Untereinheit der PI3-Kinase läßt sich erahnen, dass physiologische Stimuli wahrscheinlich nicht zur Phosphorylierung aller potentiellen Bindungspartner führen oder die phosphorylierten Proteine nicht immer für die Bindung zugänglich sind. Zur Verfolgung des Ziels, möglichst viele direkt mit den SH2-Domänen von SHP2 interagierende Proteine identifizieren zu können, ist eine maximale Phosphorylierung der Proteine in den Zelllysaten wünschenswert. Zusätzlich wurde im Gegensatz zu Verwendung von artifiziellen Peptidbibliotheken angestrebt, nur die in der Zelle für Kinasen zugänglichen Tyrosine im phosphorylierten Zustand zu analysieren. Daher wurden die Zellen für die nachfolgenden Experimente mit Pervanadat inkubiert. Da Pervanadat spezifisch Proteintyrosinphosphatasen inhibiert, wird das Gleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen in der Zelle verschoben und der Phosphorylierungsgrad der Tyrosine steigt an [117, 118], Blots der Lysate nicht gezeigt). In allen folgenden Experimenten wurde Pervanadat an Stelle eines Stimulus verwendet.

Bereits im Experiment mit den in Zellen exprimierten SH2-Domänen (Abbildung 17) wurde deutlich, dass nur die wt Domänen in der Lage sind, die endogene SHP2 zu verdrängen. Für die Analyse des Interaktoms von Mutanten mit einer niedrigeren

Affinität als die wildtyp SH2-Domänen von SHP2 ist es jedoch suboptimal, wenn die SH2-Domänen direkt in den Zellen exprimiert werden. Die Präzipitationen durch die R138Q Mutante (Abbildung 18) zeigen, dass auch bei Verwendung eines großen Überschusses der GST-fusionierten SH2-Domänen keine phosphorylierten Proteine präzipitiert werden. Das Interaktom der Punktmutanten mit niedriger Affinität kann analysiert werden, wenn die Bindung nicht durch die endogene SHP2 verhindert wird. Durch eine Denaturierung der Proteine in den Zellextrakten kann einerseits die endogene SHP2 nicht mehr binden, weiterhin werden aber auch andere an die pY Motive bindende Proteine entfernt, die in den Zellen mit den SH2-Domänen um die Bindung konkurrieren würden. Daher wurden die Proteine in den Lysaten der nachfolgend gezeigten Experimente denaturiert. Es ist möglich denaturierte Lysate zu verwenden, da es sich bei den mit den SH2-Domänen interagierenden Motiven um lineare Sequenzen handelt. Außerdem könnten bei dem in Abbildung 21 gezeigten Experiment auch indirekt bindende Proteine fälschlicherweise als Interaktionspartner identifiziert werden. Unter den Bedingungen können Multiproteinkomplexen beispielsweise über Adapterproteine indirekt an die SH2-Domänen binden. Durch die Denaturierung der Proteine des Lysats werden zusätzlich präzipitierte, indirekt bindende Proteine vermieden. Sowohl die Zugänglichkeit als auch die direkte Bindung an die Domänen sind durch die Denaturierung gewährleistet. Folglich können so potentielle, direkte Interaktionspartner identifiziert werden.

Eine Immundetektion der in einem solchen Experiment präzipitierten Proteine ist in Abbildung 23 B dargestellt. Wie in Abbildung 23 A schematisch dargestellt, wurden an Beads kovalent gekoppelte Konstrukte eingesetzt. Sie umfassen die GST-fusionierte wildtyp SH2-Domänen von SHP2 und die aufgrund der SPR-Analyse ausgewählten krankheitsrelevanten Punktmutanten T42A in der N-terminalen Domäne und zwei Punktmutanten R138Q und E139D in der C-terminalen SH2-Domäne. Zur Beurteilung der geänderten Versuchsbedingungen fällt schon bei der Betrachtung der Spur der von den wildtyp Domänen präzipitierten Proteine trotz des intensiven Signals auf, dass viele phosphorylierte Proteine nach einer Inkubation der Zellen mit Pervanadat gebunden werden. Bei dem Vergleich der von den wildtyp Domänen gebundenen Proteine mit denen der von den Mutanten ist zu berücksichtigen, dass an die Beads gleich viele GST-Fusionsproteine gekoppelt wurden. Es wurden lediglich unterschiedliche Mengen der Beads eingesetzt: Aufgrund der erwarteten niedrigen Affinität der R138Q Mutante (Abbildung 18, Abbildung 19) wurde die dreifache Menge Beads mit der R138Q Mutante verwendet. Die T42A Mutante präzipitiert mehr Proteine als die wildtyp Domänen,

während diese wiederum mehr Proteine präzipitieren als die in der C-terminalen Domäne mutierten Konstrukte R138Q und E139D. Es zeigten sich für die Punktmutanten T42A und R138Q die schon bei den SPR Messungen beobachteten Tendenzen; wobei in den SPR Messungen die Interaktionen mit Peptid untersucht wurden. Die T42A Mutante ist höher affin und die R138Q niedriger affin zu den interagierenden Proteinen als die wildtyp Domänen. Unter diesen Bedingungen konnten auch Proteine von der R138Q Mutante präzipitiert werden.

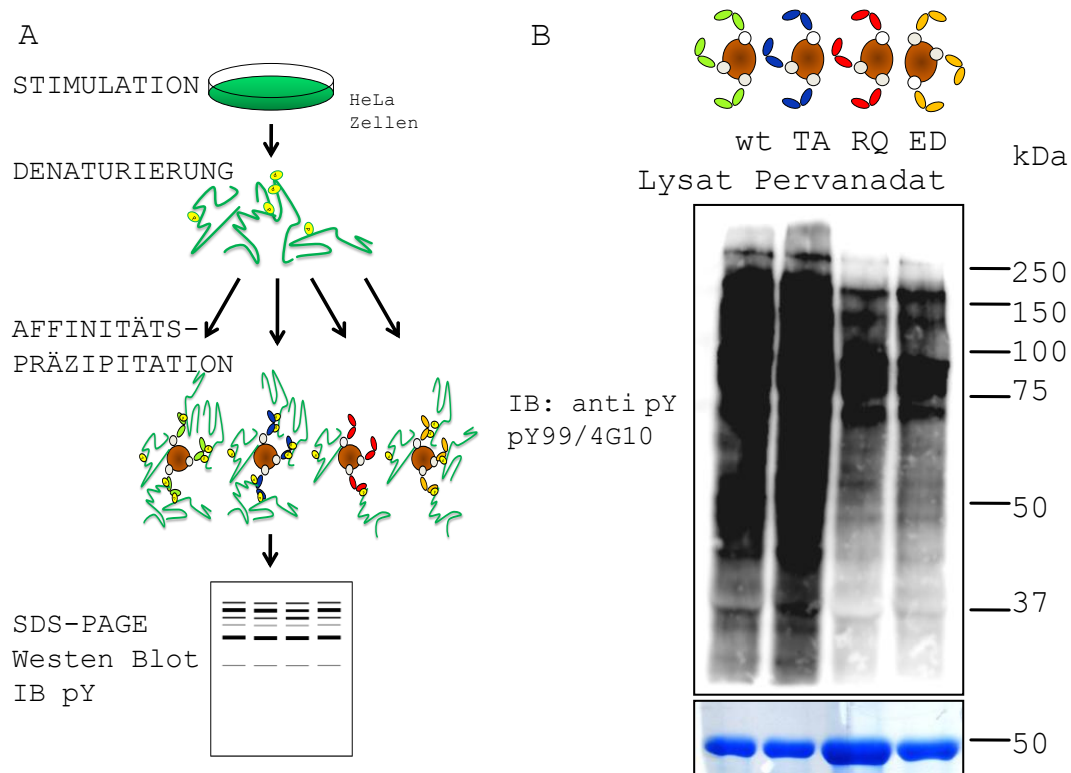


Abbildung 23 Nach Pervanadat-Inkubation durch die GST-tandem SH2-Domänen von SHP2 und die Punktmutanten T42A, R138Q und E139D aus Lysaten präzipitierte, an Tyrosylseitenketten phosphorylierte Proteine.

A Experimentelles Design

B HeLa Zellen wurden mit Pervanadat (1 mM für 15 min) stimuliert und in denaturierendem Puffer lysiert und dialysiert. Die Interaktionspartner wurden aus 900µg Zelllysate präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine durchgeführt. Konzentrationskontrolle: Die dreifachen Mengen der für die Präzipitation eingesetzten GST fusionierten Domänen wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die nach der Coomassiefärbung sichtbaren Banden dargestellt.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Kombination aus Inkubation der Zellen mit Pervanadat und Denaturierung der Proteine der Lysate zur Präzipitation von

vielen direkt mit den SH2-Domänen interagierenden, phosphorylierten Proteinen führt.

Die durch Pervanadat hervorgerufene Inhibition der Tyrosinphosphatasen resultiert in einem hohen Phosphorylierungsgrad der Proteine im Lysat. Durch die Denaturierung werden einerseits indirekte Bindungen und zusätzlich mit den SH2-Domänen um die Bindung konkurrierende Proteine (endogenen SHP2 sowie andere Proteine) vermieden. Mit diesen Bedingungen erschien die Identifizierung aller im Lysat vorhandenen potentiellen Interaktionspartner vielversprechend.

4.3. Spezifität der präzipitierten Proteine

Bei Betrachtung der vielen präzipitierten Proteine stellte sich die Frage, welche Proteine abhängig von einem Motiv mit phosphoryliertem Tyrosylrest spezifisch mit den Domänen assoziieren. Eine Möglichkeit dies herauszufinden ist die Verwendung von Lysaten, in denen nur unphosphorylierte Proteine enthalten sind.

Lysate von unstimulierten Zellen enthalten weniger phosphorylierte Proteine und können zusätzlich mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert werden. Diese dephosphorylierten Proteine wurden im Vergleich zu den extrem phosphorylierten Proteinen aus den mit Pervanadat inkubierten Zellen als Negativkontrolle eingesetzt.

Für die in Abbildung 24 dargestellten Präzipitationen wurden maximal phosphorylierte Zellextrakte eingesetzt und als Kontrolle maximal dephosphorylierte Proteine verwendet. Bei der Immundetektion dieses Vorexperimentes für die späteren massenspektrometrischen Analysen sind nur Präzipitate sichtbar, wenn die Zellen zuvor mit Pervanadat inkubiert waren. Die Empfindlichkeiten einer Coomassie oder Ponceau S Färbung waren zu niedrig, um die sich tatsächlich auf der Membran befindenden Proteine zu dokumentieren.

Aufgrund der niedrigeren erwarteten Affinität der R138Q Mutante wurden im Experiment wieder mehr Beads mit dieser Mutante eingesetzt. Weder von den GST-fusionierten wildtyp SH2-Domänen von SHP2 noch von den Punktmutanten wurden detektierbare Mengen phosphorylierter Proteine unspezifisch gebunden. Die Punktmutanten präzipitierten wieder viele phosphorylierte Proteine. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente sind zunächst nur die Präzipitationen der wildtyp Domänen wichtig.

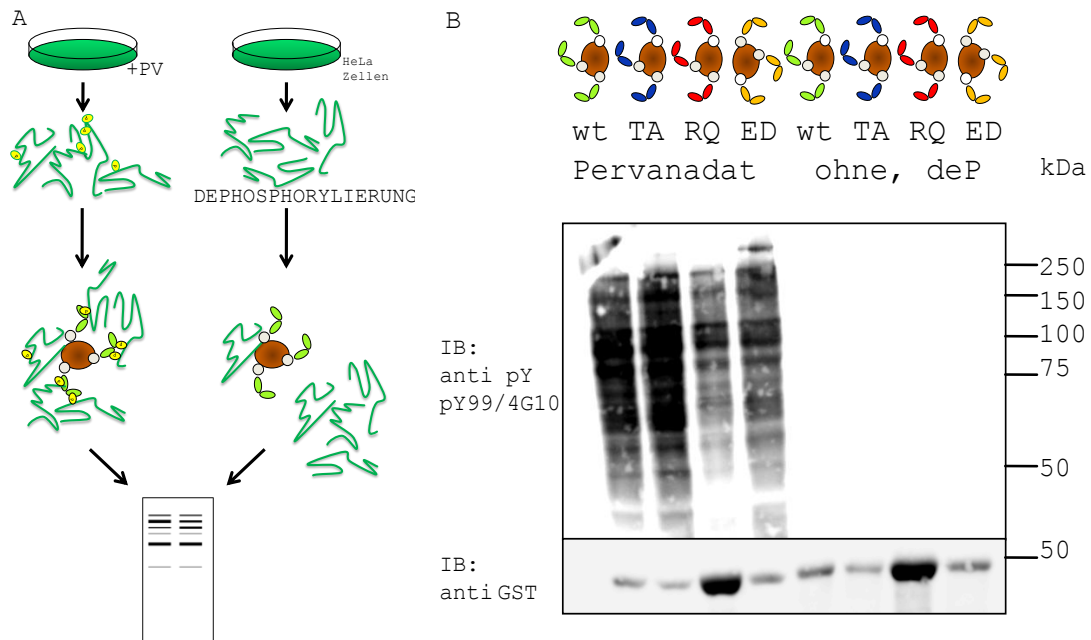


Abbildung 24 Durch die GST-tandem SH2-Domänen von SHP2 und die Punktmutanten T42A, R138Q und E139D aus Lysaten präzipitierte, an Tyrosylresten phosphorylierte Proteine.

A Experimentelles Design

B HeLa Zellen wurden optional für 15 Minuten mit Pervanadat (1 mM) inkubiert, in denaturierendem Puffer lysiert und dialysiert. Die Lysate von unstimulierten Zellen wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die Interaktionspartner wurden aus 900 µg Zelllysat präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine durchgeführt. Die Menge der für die Präzipitation verwendeten GST fusionierten Domänen wurde durch Immundetektion dargestellt (primärer Antikörper gegen GST). wt-wildtyp, TA-T42A, RQ-R138Q, ED-E139D, deP-dephosphoryliert. PV-Pervanadat

Aus diesen qualitativen Betrachtungen ist nicht ersichtlich, welche spezifisch gebundenen Proteine von den pY Antikörpern angefärbt werden. Daher wurde das zuvor beschriebene **Experiment** mit **dephosphorylierten** Lysaten (Depex) unter Verwendung der wildtyp Konstrukte leicht modifiziert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Dies erlaubt es herauszufinden, welche Proteine spezifisch an die SH2-Domänen binden. Die Quantifizierung der geplanten massenspektrometrischen Messungen ist relativ, deshalb wurde im Unterschied zu den in Abbildung 24 gezeigten Proben in diesen Experimenten keine totale Dephosphorylierung angestrebt. Die Identifizierung und Quantifizierung durch Maxquant würde deutlich verkompliziert und weniger zuverlässig, deshalb wurden die Lysate aus mit Pervanadat inkubierten Zellen nicht vollständig dephosphoryliert. Gleichzeitig konnte so eine Veränderung des Proteoms der Zellen gegenüber der

Kontrolle ausgeschlossen werden, die theoretisch in dem in Abbildung 24 gezeigten Experiment möglich wäre.

Die metabolische Markierung primärer Zellen mit stabilen Isotopen von Arginin und Lysin (SILAC) zu einem hohen Markierungsgrad (>97%) ist nicht immer möglich (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Jens Anderson). Dies kann unter anderem daran liegen, dass Arginin für normale humane Zellen nicht essentiell ist. Normale Fibroblasten ließen sich auch nach mehr als 20 Passagen und durch Erhöhung der Konzentration der Aminosäuren nur bis zu einem Markierungsgrad von etwa 90% markieren. Die vollständige Markierung von HeLa Zellen kann nach 6 Zellteilungen erreicht werden [99-101]. Deshalb wurden für alle ab Abschnitt (IV.4.2) gezeigten Experimente Lysate aus HeLa Zellen verwendet.

In Abbildung 25 A ist das Design der massenspektrometrischen Depex schematisch dargestellt. Nach der metabolischen Markierung der Proteine in den HeLa Zellen mit stabilen Isotopen von Arginin und Lysin (mittelschwer Arg6 und Lys4, schwer Arg10 und Lys8, zur Übersicht siehe auch Tabelle 7: Verwendete SILAC Aminosäurenkombinationen) wurden die Zellen mit Pervanadat inkubiert, lysiert und die Proteine denaturiert. Die mit schweren Isotopen markierten Proteine wurden zusätzlich durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurden die Lysate jeweils für 3 Stunden mit den wt SH2-Domänen inkubiert. Nach dem ersten Waschschrift wurden Proben zur Betrachtung mittels Immundetektion entnommen und die Ansätze für die massenspektrometrische Messung gemischt. Nach weiteren Waschschriften wurden die Proteine mit Lys-C und Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mit der OFFGEL-Apparatur fraktioniert und für die Messung entsalzt (Details siehe III.4). Danach wurden die Proben in Mikrotiterplatten gegeben und auf die RP-HPLC Säule aufgetragen und die eluierenden Peptide online mit der LTQ-Orbitrap gemessen. Bei einer biologischen Wiederholung wurden die Markierungen der Proben getauscht, so dass die Lysate mit hohem Phosphorylierungsgrad mit den normalen leichten Isotopen (Arg0 und Lys0) und die dephosphorylierten Proteine mit mittelschweren Aminosäuren (Arg6 und Lys4) markiert waren.

Je ein Beispiel der im Immunblot detektierten Lysate und präzipitierten Proteine ist in Abbildung 25 B und C dargestellt. In den Lysaten aus mit Pervanadat inkubierten Zellen können sehr viele an Tyrosylresten phosphorylierte Proteine detektiert werden, und die Domänen binden an viele dieser Proteine. Nach der Dephosphorylierung der Proteine ist die Menge der phosphorylierten Proteine

deutlich reduziert, dem entsprechend präzipitieren die SH2-Domänen aus den Zellextrakten deutlich weniger Proteine.

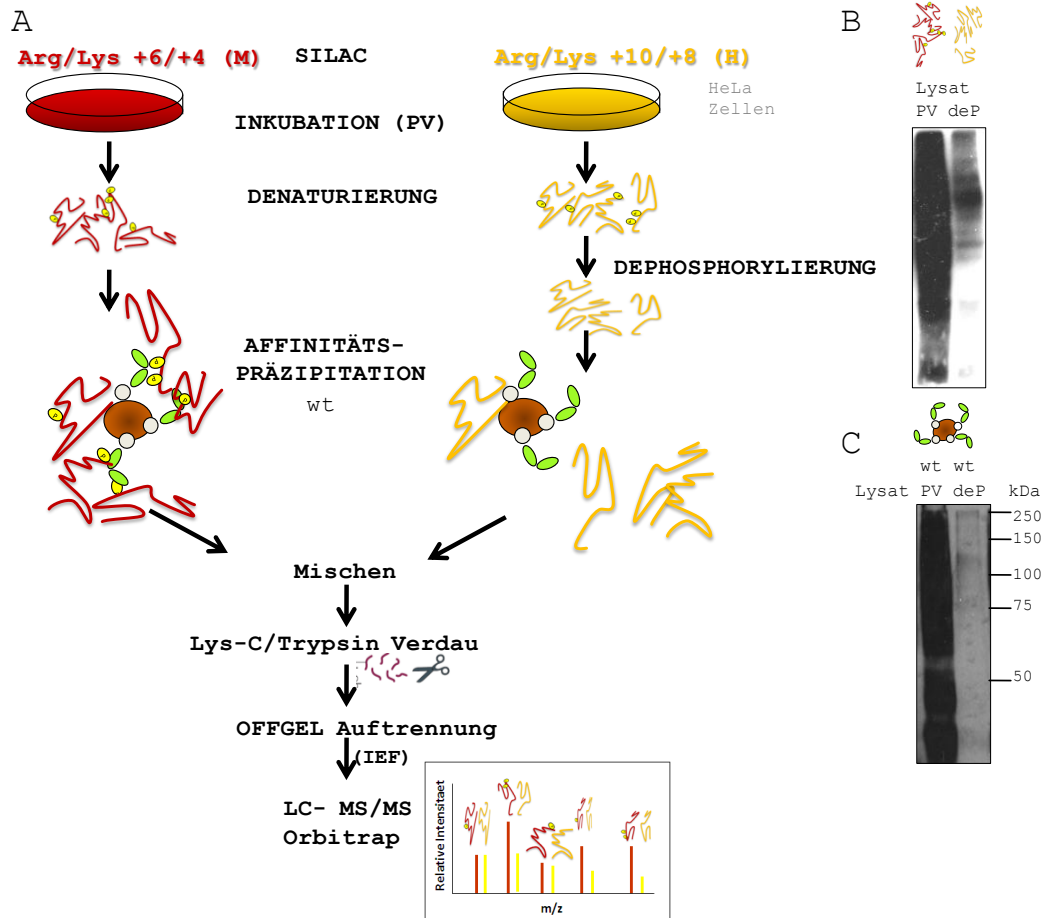


Abbildung 25 A: **Design der Depex.**

Details siehe Text. (Zur Präzipitation wurden die wildtyp SH2-Domänen von SHP2 für 3 h mit den Proteinen inkubiert)

B und C: Probenvorbereitung: Immundetektion der denaturierten Lysate und der Präzipitate mit Hilfe von Antikörpern gegen pY.

M-mittelschwere, H-schwere (heavy) Isotope der Aminosäuren, PV-Pervanadat, deP- dephosphoryliert

Nach den Präzipitationen wurden die Proteine proteolytisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe der OFFGEL-Apparatur fraktioniert. Um die Effizienz der Fraktionierung der verdauten Proteine zu kontrollieren, wurde nach der Messung der Proben untersucht, in wievielen Fraktionen ein bestimmtes Peptid gefunden wurde. Abbildung 26 zeigt, dass 81% der Peptide nur in einer Fraktion und 12,5% in nur 2 Fraktionen detektiert wurden. Folglich fanden sich weniger als 6,5% der Peptide in mehr als 2 Fraktionen. Die Effizienz der Fraktionierung lag damit im von Hubner et al. als optimal publizierten Bereich [104].

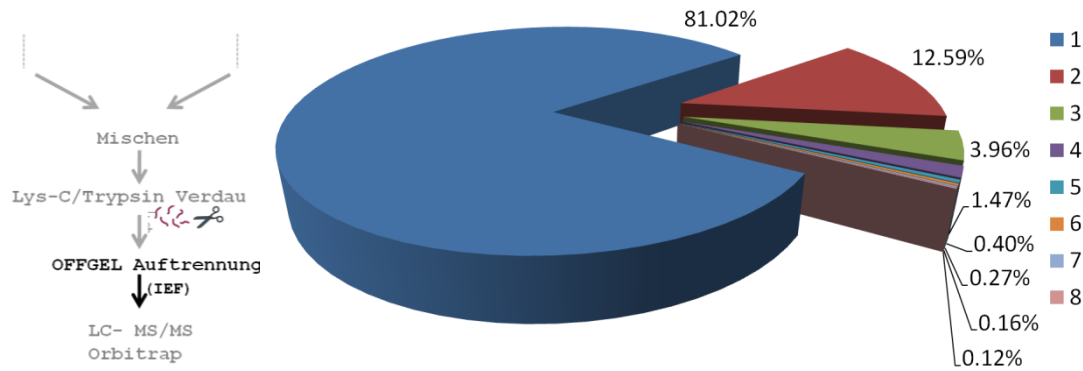


Abbildung 26 Effizienz der OFFGEL Fraktionierung

Im Diagramm ist dargestellt, in wie vielen Fraktionen die jeweiligen Peptide gefunden wurden.

Die Peptide in den erhaltenen Fraktionen wurden nach der Entsalzung (siehe Kapitel 4.3) in Mikrotiterplatten gegeben. Aus diesen wurden die Peptide direkt auf die mit der LTQ-Orbitrap gekoppelte LC-Säule aufgetragen und über Elektrospray Ionisierung (ESI) ins Massenspektrometer überführt und gemessen.

In Abbildung 27 ist zur Veranschaulichung der Elution von der LC-Säule ein Chromatogramm eines Laufs einer Fraktion der Peptide nach der OFFGEL-Fraktionierung gezeigt. In den ersten 22 Minuten wurde die Probe aufgetragen. Nach 30 Minuten (entspricht etwa 10% Puffer B) beginnt die Elution. Verschiedene Peptide eluieren mit unterschiedlichen Intensitäten über den gesamten Gradienten.

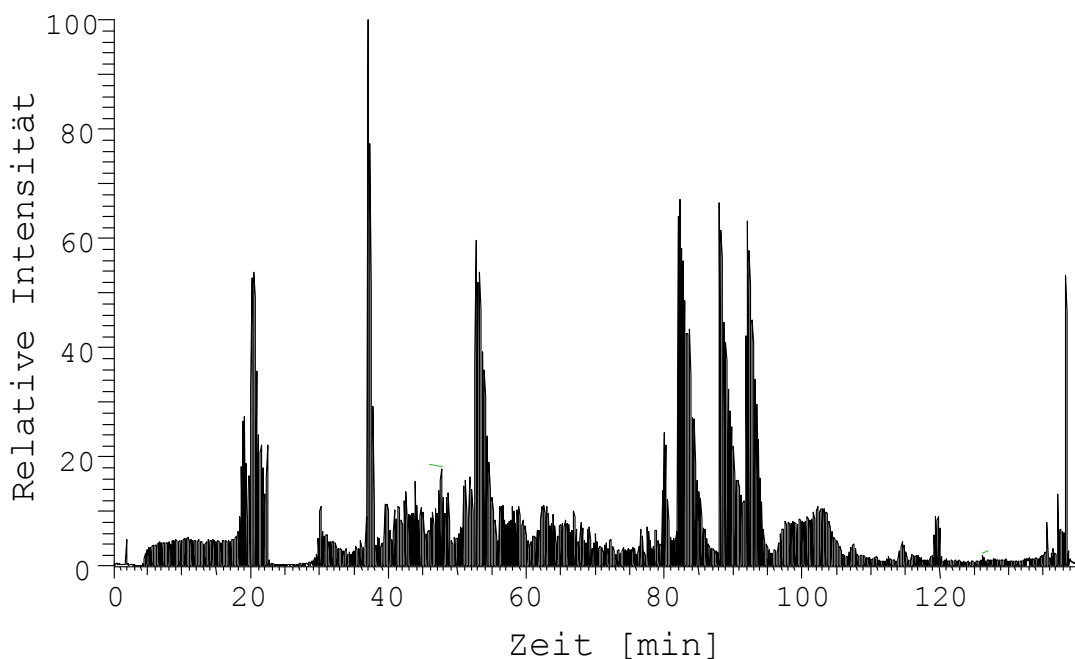


Abbildung 27 Chromatogramm eines LC-MS Laufs einer Peptid Fraktion

Nach der Messung wurden die MSMS Spektren der Rohdaten mit der MaxQuant Software (Version 10.3.13) [106] zur Identifizierung prozessiert. Die resultierenden Peaklisten wurden mit dem Mascot 2.2 Sever (Matrix-Science) mit der IPI Human/Decoy Datenbank mit den in Kapitel III.4.4 dokumentierten Parametern verglichen. Die relative Quantifizierung der Proteine erfolgte durch MaxQuant auf Basis der Intensitäten der Peaks der verschiedenen Isotope der Peptide in den MS Spektren. Die in Maxquant benutzten Algorithmen berücksichtigen auch eventuelle leicht verschobene Elutionen der Peptide, die beispielsweise aufgrund der mit Deuterium markierten Aminosäuren auftreten können. Außerdem werden benachbarte Fraktionen der OFFGEL-Fraktionierung berücksichtigt. Die Quantifizierung ist eine dreidimensionale Analyse der Peaks, sie basiert nicht nur auf einem Zeitpunkt.

Die resultierenden Proteinlisten wurden wie in III.4.4 beschrieben prozessiert. Die Proteine mußten in allen drei Experimenten quantifizierbar (d.h. mit Verhältnissen) gefunden worden sein.

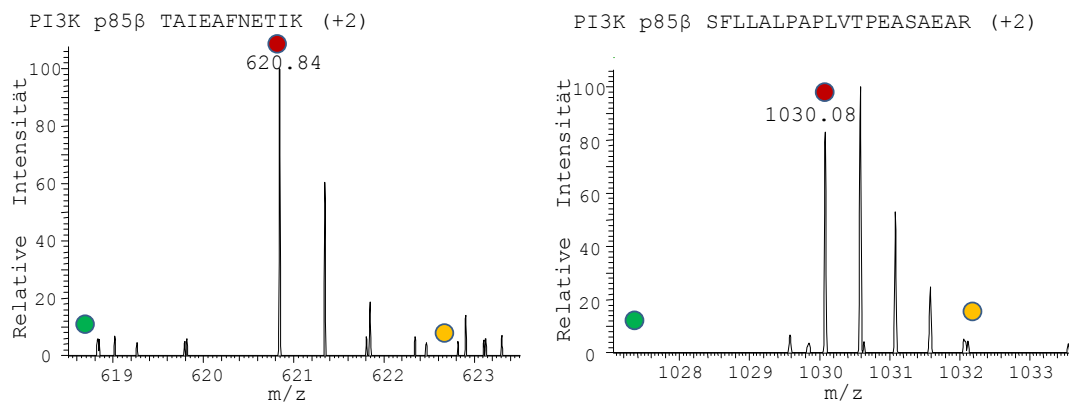
In diesen Experimenten konnten 1443 spezifisch in Abhängigkeit von phosphorylierten Tyrosylresten interagierende Proteine identifiziert werden. Von diesen Proteinen wurden aus den phosphorylierten Lysaten mindestens doppelt so viele wie aus den dephosphorylierten Lysaten präzipitiert.

Für die weiteren Analysen der einzelnen spezifisch gebundenen Proteine wurde der Mittelwert der Verhältnisse aus phosphorylierten Lysaten präzipitierten zu aus dephosphorylierten Lysaten präzipitierten Proteinen (P/deP) aus drei Experimenten verwendet. Er war bei 1308 Proteinen größer als 5. Der Mittelwert der Verhältnisse für alle spezifisch gebundenen Proteine lag bei 7,5.

In Abbildung 28 sind die Massenspektren verschiedener Peptide jeweils bei einem bestimmten Elutionszeitpunkt des in Abbildung 27 gezeigten LC-MS Laufs dargestellt. Die Auswahl der Spektren erfolgte aus denen von bekannten Interaktionspartnern (siehe Kapitel I.2). Es sind zwei der Spektren von Peptiden aus der regulatorischen p85 β Untereinheit der PI3K p85 [119] dargestellt. Eines stammt von einem mit Lysin und das andere von einem mit Arginin markierten Peptid. Die gleichzeitige Verwendung von Arginin und Lysin verbessert sowohl die Identifizierung als auch die Quantifizierung, weil mehr Peptide zugordnet werden können. Weiterhin sind zwei Arginin enthaltende Peptide aus IRS2, das ebenfalls mit SHP2 interagieren kann [120] abgebildet. Es ist jeweils der Bereich des Spektrums dargestellt, der die Masse zu Ladung Verhältnisse (m/z) der unterschiedlichen Isotope des jeweiligen Peptids zeigt. Da in dem Experiment nur

mittelschwer (rot) und schwer (gelb) markierte Proben verwendet wurden, ist an der dem normalen Isotop entsprechenden Position (grün markiert) kein Signal zu sehen. Für die medium markierten Peptide ist jeweils ein deutliches Signal zu sehen. Die aus den dephosphorylierten Lysaten präzipitierten Proteine führen zu schwer markierten Peptiden, die in den gezeigten Spektren nicht detektierbar sind (m/z gelb markiert). Das Verhältnis von Masse zu Ladung der Isotope ist gegenüber dem normalen Signal (grün) verschoben: Aufgrund der zweifach positiven Ladung aller gezeigten Peptide ergibt sich eine Verschiebung gegenüber dem normalen Isotop entsprechend der veränderten Masse und der Ladung 2. Für die mit medium Isotopen von Arginin markierten Peptide ergibt sich eine Verschiebung um 3 (+6/2; rot), mit schweren Isotopen von Arginin markierten um 5 (+10/2; gelb), mit medium Isotopen von Lysin markierten Peptide um 2 (+4/2) und mit schweren Isotopen von Lysin markierten um 4 (+8/2) zu den normalen Isotopen.

A



B

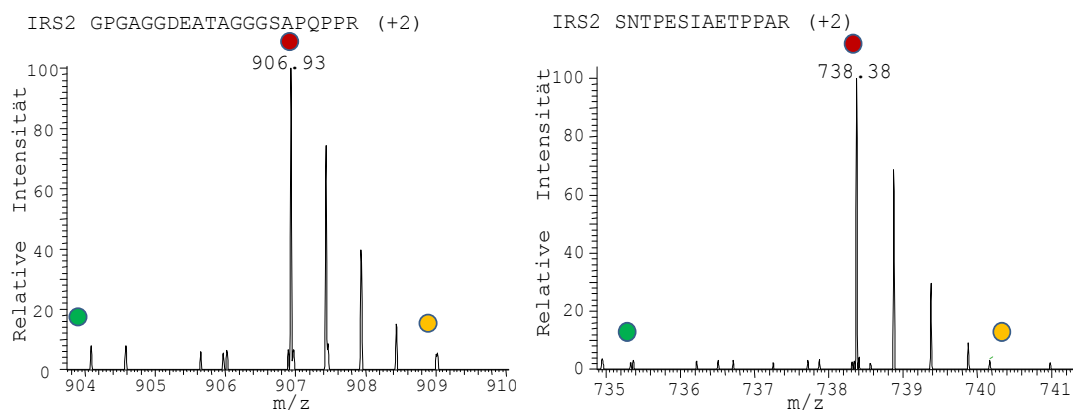


Abbildung 28 Massenspektren von Peptiden aus p85 (A) und IRS2 (B)
 Die Elutionszeiten lagen bei 65,76; 118,29; 35,90 bzw. 42,38 Minuten. Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) für das normale Isotop ist jeweils grün markiert; das m/z von mittelschwer markierten Peptiden ist rot markiert; das m/z der schweren Isotope ist gelb markiert.

Mit diesen Experimenten konnten mehr als 1400 spezifisch interagierende Proteine identifiziert werden, die abhängig von phosphorylierte Tyrosylreste enthaltenden Motiven an die SH2-Domänen binden. Unter diesen spezifisch interagierenden Proteinen befinden sich die bereits beschriebenen, wie der EGF-Rezeptor und IRS2 und außerdem auch andere bekannte Interaktionspartner wie Integrin β 4, STAT1, Grb2 und die Katalase. In Kapitel IV.4.2 konnte bereits anhand der Immundetektionen beobachtet werden, dass die Verwendung von Pervanadat zu einem hohen Phosphorylierungsgrad der Tyrosylreste der Proteine führt und damit viele Interaktionspartner gebunden werden konnten. Die Denaturierung der Proteine in den Lysaten stellte sicher, dass die Bindung direkt ist.

Die zusätzliche Kontrollpräzipitation, in dem die Proteine in den Lysaten vor der Präzipitation durch die SH2-Domänen mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert wurden, zeigt eine geringere Mengen präzipitierter Proteine und verdeutlicht damit die Abhängigkeit der Bindung von phosphorylierten Tyrosinen.

Unter den identifizierten Proteinen finden sich bereits bekannte interagierende Proteine und Substrate von SHP2, wie beispielsweise EGFR. Zusätzlich viele bisher nicht als an die SH2-Domänen bindend bekannte Proteine wie Grb2. In IV.4.5ff werden die Eigenschaften der erhaltenen Proteine weiter analysiert. Die massenspektrometrische Identifizierung erfolgte vorurteilslos. Im Gegensatz hierzu müssten für Identifizierungen durch Immundetektion jeweils spezifische Antikörper gegen bestimmte Proteine eingesetzt werden.

4.4. Spezifität der Interaktion- Konkurrenzexperimente

Um sicherzustellen, dass die analysierten Bindungen auch über die SH2-Bindungstaschen stattfinden, wurde eine komplementäre Variante zur Untersuchung der Spezifität der Bindung durchgeführt. In dieser wurden die Bindungstaschen mit einem Überschuss eines interagierenden Peptids (pY759) blockiert. So können die Peptide die Bindung von anderen Proteinen über die Bindungstasche verhindern. In Abbildung 29 ist ein solches Konkurrenzexperiment dargestellt. In jeweils einem Ansatz wurden die Bindungstaschen der Domänen durch die Präinkubation mit einer Mischung von bekannterweise interagierenden Peptiden (pY763 und pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β) gesättigt, die einen phosphorylierten Tyrosylrest enthalten. In jeweils einem weiteren Ansatz wurden die Domänen mit Puffer präinkubiert. Anschließend wurden die Domänen für 3 h mit Lysaten aus zuvor mit Pervanadat behandelten Zellen inkubiert, gewaschen und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran

wurden die phosphotyrosylenthaltenden Proteine sichtbar gemacht. Es wird deutlich, dass kompetierende Peptide im Ansatz die Menge der an die Domänen gebundenen phosphorylierten Proteine stark reduzierten. Auch für die Interaktion mit den mutierten SH2-Domänen zeigte die Blockierung der Bindungstaschen den gleichen Effekt. Die Verminderung der gebundenen Proteine durch die Peptide demonstriert die Beteiligung der bekannten SH2-Bindungstasche an den Interaktionen.

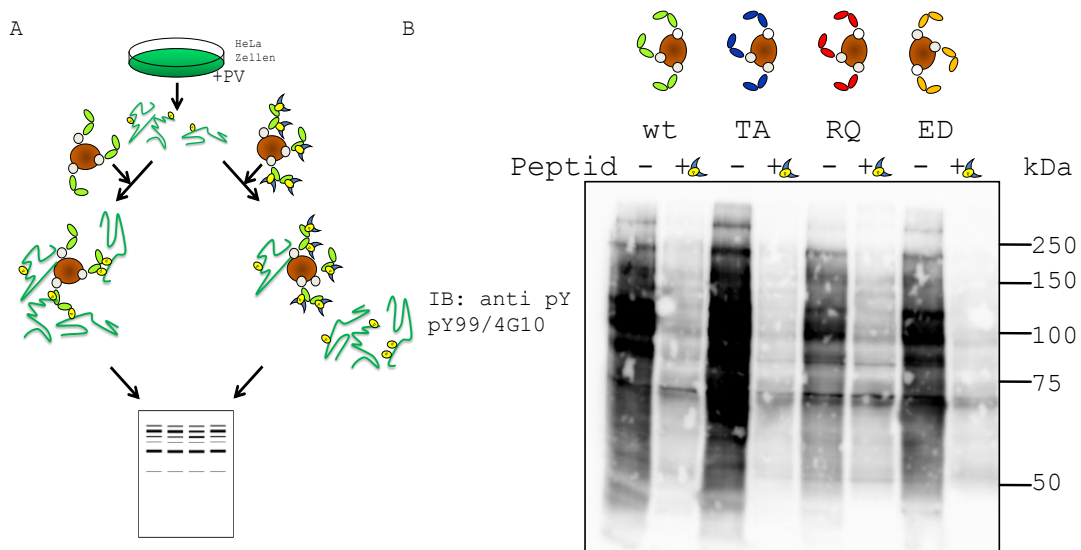


Abbildung 29 Blockierung der Interaktionen durch Konkurrenz mit pY-Peptiden.

A: Design des Konkurrenzexperiments

B: HeLa Zellen wurden für 15 Minuten mit Pervanadat (1 mM) inkubiert, in denaturierendem Puffer lysiert und dialysiert. Für die Präzipitationen wurden GST-tandem SH2-Domänen von SHP2 und die Punktmutanten (T42A, R138Q und E139D) verwendet. Die Interaktionspartner wurden optional nach Präinkubation mit und in Gegenwart von Peptiden (pY-Motive pY763 und pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β) aus 700 μ g Zelllysate präzipitiert und nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosylseitenketten durchgeführt. pY-phosphorylierter Tyrosylrest, wt-wildtyp, TA-T42A, RQ-R138Q, ED-E139D. PV-Pervanadat, deP-dephosphoryliert

Auf Basis dieser Experimente wurden die massenspektrometrischen Experimente mit **Kompetition** durch Peptide (Kompex) entworfen. Das experimentelle Design ist in Abbildung 30 dargestellt. Wie zuvor war in einem Ansatz kein zusätzliches Peptid enthalten (grün dargestellter Ansatz). Als kompetierendes Peptid wurde das bekannterweise interagierende pY759 Motiv aus gp130 verwendet (gelb markierter Ansatz). Außerdem wurde ein zusätzlicher Ansatz verwendet, in dem das entsprechende nicht phosphorylierte Peptid (Y759) enthalten war (rot dargestellter Ansatz). Diese Modifikation vorgenommen, um innerhalb der

Experimente sicher sein zu können, dass die Veränderung nicht durch die Peptidkonzentration selbst hervorgerufen wird. Weiterhin konnte dadurch differenziert werden, wie stark die Einwirkung der den phosphorylierten Tyrosylrest umgebenden Sequenz ist.

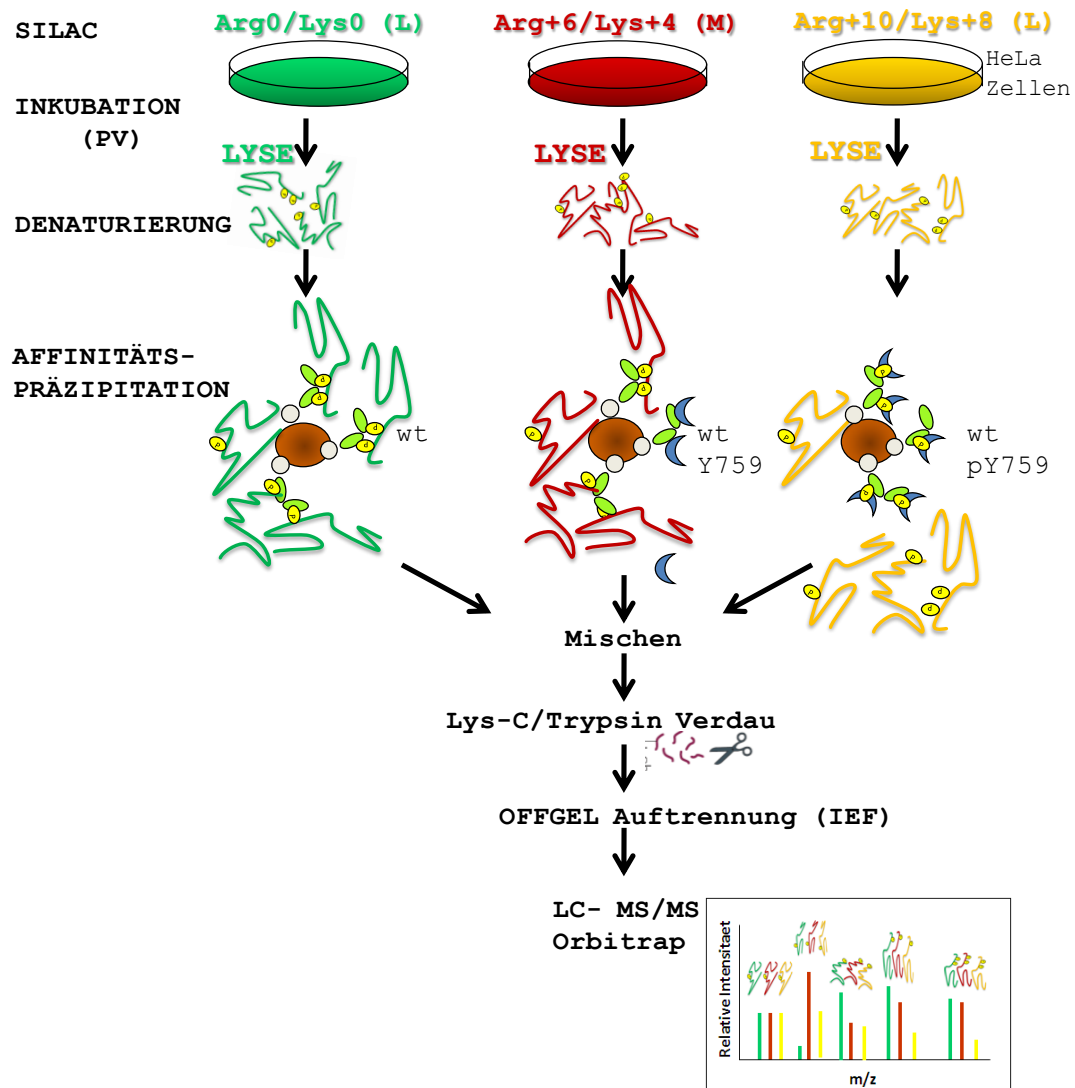


Abbildung 30 Design der Komplex

Details siehe Text. PV-Pervanadat, wt wildtyp, pY759- am Tyrosylrest phosphoryliertes Peptid mit der Sequenz der Motifs um Tyrosin 759 von gp130, Y759-Peptid mit derselben Sequenz wie pY759 ohne Phosphorylierung

Es wurden drei verschiedene stabile Isotope von Arginin und Lysin verwendet, um die Ansätze in einem Experiment unterscheiden zu können.

Eine Immundetektion der Probenvorbereitung ist in Abbildung 31 dargestellt. Sie zeigt die an Tyrosinen phosphorylierten Proteine. In den Lysaten sind vergleichbar viele phosphorylierte Proteine enthalten. Die von den SH2-Domänen in Abwesenheit von zusätzlichen Peptiden präzipitierten Proteine haben starke

Signale. Auch die Anwesenheit des nicht phosphorylierten Peptids Y759 führt zu vergleichbare Mengen gebundener Proteine (Abbildung 31 B Spur M). Ist das am Tyrosylrest phosphorylierte Peptid (pY759) im Ansatz enthalten, konnten auch nach langen Expositionszeiten nur wenige Proteine detektiert werden (Abbildung 31 B Spur H). Es wird deutlich, dass die Konkurrenz mit dem phosphorylierten Peptid zu einer reduzierten Menge interagierender Proteine führt. Nur die phosphorylierten Peptide können die Zugänglichkeit der Bindungstaschen effizient vermindern. Der Einfluss des unphosphorylierten Peptids, der auf die den Tyrosylrest umgebende Sequenz zurückzuführen wäre, ist im Einklang mit den in Abbildung 16 und Abbildung 17 gezeigten Experimenten und im Vergleich zum phosphorylierten Peptid vernachlässigbar gering.

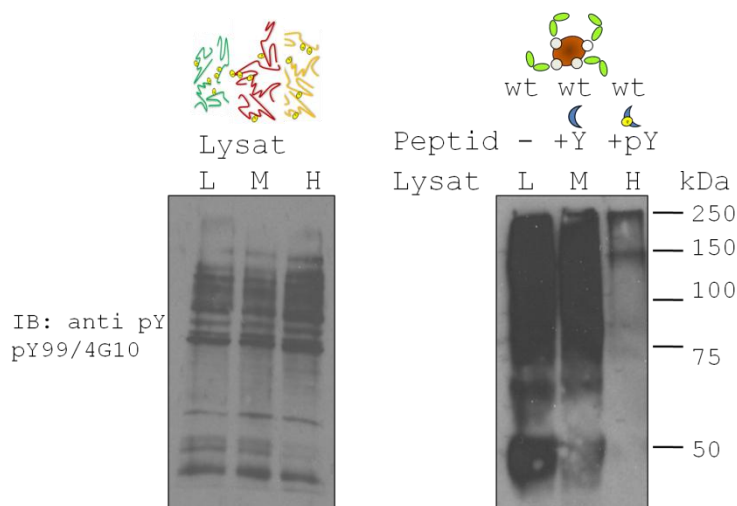


Abbildung 31 Probenvorbereitung der Komplex mit den Peptiden Y759 und pY759

Immundeckungen der Lysate (links) und Präzipitationen (rechts) mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosylreste. Details siehe Text. L leichte Isotope, M mittelschwere Isotope, H schwere Isotope von Arginin und Lysin. Y Peptid-Y759 Motiv von gp130, pY Peptid – pY759

Wie anhand des experimentellen Designs ersichtlich und im Methodenteil detaillierter beschrieben, wurden die Ansätze gemischt, gewaschen und proteolytisch verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mit der OFFGEL-Apparatur fraktioniert und entsalzt. Die Proben wurden in Mikrotiterplatten gegeben aus diesen direkt auf die mit der LTQ-Orbitrap gekoppelte LC-Säule aufgetragen und gemessen. Die Prozessierung der Daten und Datenbanksuche wurde analog zu den Dephosphorylierungsexperimenten und wie in Kapitel III.4.4 beschrieben vorgenommen. Nicht sicher identifizierte und in allen Proben gleich bindende Proteine wurden manuell entfernt.

So konnten in den Konkurrenzexperimenten 1505 spezifische Interaktionen identifiziert werden. Diese Proteine binden in Abhängigkeit der pY spezifischen Bindungsstellen an die SH2-Domänen und wurden in allen drei Experimenten gefunden.

Unter den identifizierten spezifischen Interaktionspartnern befinden sich auch verschiedene Rezeptoren wie der EGF-Rezeptor (EGFR), der Hepatozyten Wachstumsfaktorrezeptor cMET und der Ephrin Typ α 2 Rezeptor. Für sie wurde die Interaktion mit SHP2 bereits beschrieben (EGFR [121], [122], [123], [124], MET [125] und EPHA2 [126]).

Es wurden mit dem EGFR, IRS2 und ITGB4 auch bekannte Interaktionspartner gefunden, die bereits in den Depex identifiziert werden konnten (siehe Kapitel IV.4.3). In Abbildung 32 (A und B) sind die Bereiche der Massenspektren von zwei der dem EGF-Rezeptor zugeordneten Peptide jeweils bei einem bestimmten Elutionszeitpunkt dargestellt. Da die Spektren nicht denselben LC-Läufen entnommen wurden, wurde hier auf die Angabe der Retentionszeiten verzichtet. Die Spektren zeigen die m/z der unterschiedlichen Isotope des jeweiligen Peptids. Eines der Peptide wurde durch Lysin und das andere durch Arginin markiert. Das Verhältnis von Masse zu Ladung der Isotope ist wieder gegenüber dem normalen Signal (grün) verschoben: Zur Vereinfachung wurden wieder nur Peptide mit einer zweifach positiven Ladung gezeigt. Es ergibt sich eine Verschiebung zu dem normalen Isotop entsprechend der veränderten Masse und der Ladung 2. Für die mit mittelschweren Isotopen von Arginin markierten Peptide ergibt sich eine Verschiebung um 3 (rot), mit schweren Isotopen von Arginin markierten um 5 (gelb), mit mittelschweren Isotopen von Lysin markierten Peptide um 2 (rot) und mit schweren Isotopen von Lysin markierten um 4 (gelb) zu den normalen Isotopen. Die relativen Intensitäten der Peptide mit normalen Isotopen (grün) und der mit mittelschweren (rot) Isotopen sind vergleichbar. In diesem Fall übt das unphosphorylierte Peptid somit keinen Einfluss auf die Menge des gebundenen EGF-Rezeptors aus. Dagegen sind die Intensitäten der schwer markierten Peptide (gelb) deutlich schwächer, das phosphorylierte Tyrosinmotiv von gp130 kann folglich die Menge des präzipitierten EGF Rezeptors deutlich reduzieren. Für cMET und EphA2 (Abbildung 32 B und C) sind vergleichbare Tendenzen zu sehen. Hier reduziert auch das unphosphorylierte Peptid das Signal der mittelschweren Isotope. Die durch das pY Peptid bedingte Reduktion des Signals (gelb) ist aber deutlich stärker.

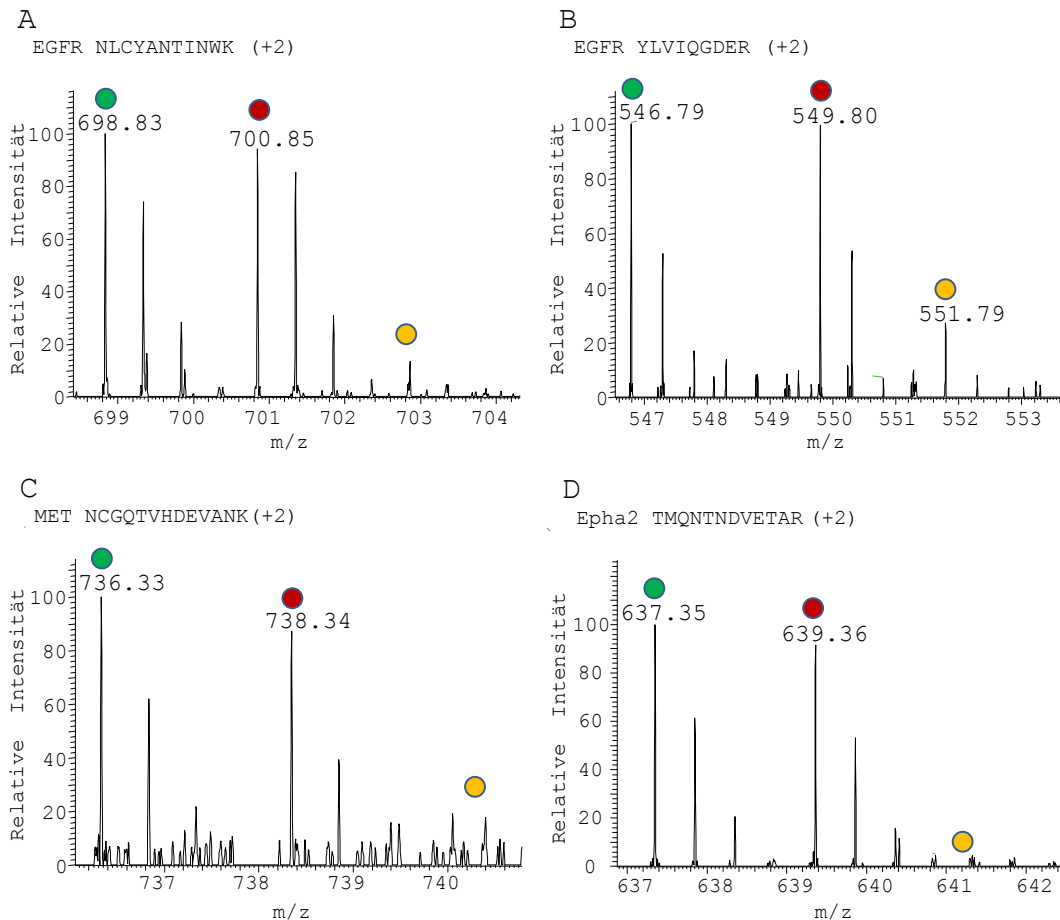


Abbildung 32 Massenspektren von Peptiden aus EGFR, cMET und Epha2
Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) für das normale Isotop ist jeweils grün markiert; das m/z von medium Isotopen ist rot markiert; das m/z der schweren Isotope ist gelb markiert. EGFR epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, cMET Hepatozyten Wachstumsfaktor, Epha2-Ephrin Typ α Rezeptor.
Das m/z für normale Isotope ist grün, das der mittelschwer markierten Peptide rot und das der schweren Isotope gelb gekennzeichnet.

Aus den Intensitäten der Peaks der Peptide wurden mit Hilfe von Maxquant wieder die relativen Verhältnisse der Proteine gebildet. In Abbildung 33 sind die relativen Verhältnisse von 5 Proteinen gezeigt. Bis auf Erk2 sind diese Interaktionen mit SHP2 in der Literatur beschrieben (ITGB4 [127]). Im Diagramm ist dargestellt, wie viel mehr ihrer Interaktionspartner die wildtyp SH2-Domänen präzipitieren konnten, wenn kein kompetierendes Peptid im Ansatz enthalten war. Die Verhältnisse der gezeigten Präzipitationen der Interaktionspartner von den wt Domänen ohne Peptid zu wt mit pY759 sind 10- bis 15-mal größer als die Verhältnisse von wt zu Y759.

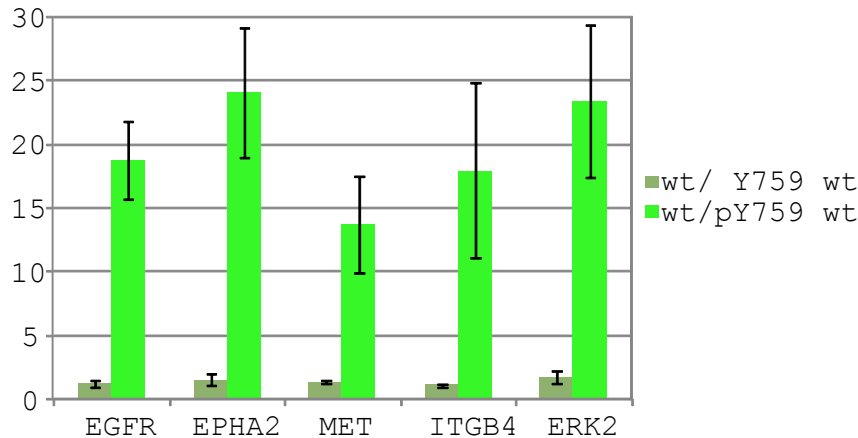


Abbildung 33 Auswahl von in den Komplex gefundenen Interaktionspartnern
 Die für EGFR, Epha2, cMET, ITGB4 und Erk2 gefundenen Verhältnisse der Präzipitationen der wt SH2-Domänen an Ab- und Anwesenheit von Peptiden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Experimenten

Zusätzlich wurde noch ein weiteres Wettbewerbsexperiment mit pY Peptiden aus dem PDGF-Rezeptor β durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In diesem wurden Peptide verwendet, die einen phosphorylierten Tyrosylrest enthielten. Wenn sich pY751, das bekannterweise (vergl. Abbildung 14) nicht an die SH2-Domänen bindet, Präzipitationsansatz befindet, ist nur eine sehr geringe oder keine Änderung gegenüber dem Ansatz ohne Peptid sichtbar. Im Gegensatz dazu führt die Präsenz eines an die Domänen bindenden Peptids (pY1009), das die Bindungstasche besetzt, zu einer reduzierten Menge präzipitierter Proteine. Es wurde nur allerdings nur ein massenspektrometrisches Experiment durchgeführt. In diesem konnten 1273 der 1505 in den anderen Wettbewerbsexperimenten gefundenen Proteine nochmals bestätigt werden.

4.5. Potentielles Interaktom der SH2-Domänen von SHP2

Die bisher bekannten Bindungspartner von SHP2 sind häufig Proteine, die eine große Rolle in der Signaltransduktion spielen. SHP2 ist oft an Prozessen beteiligt, die in der Nähe der Plasmamembran stattfinden. Die Anzahl der in der Zelle exprimierten Moleküle kann besonders im Fall von Rezeptoren vergleichsweise gering sein. Daher wurden manche bekannten Interaktionspartner nicht in allen zuvor beschriebenen Experimenten gefunden. Exklusiv in den Depex wurden u. a. PI3K p85, Grb2, und STAT5 gefunden. Mit den Komplex konnten zusätzlich Proteine wie gp130, cMET und Epha2 beschrieben werden. Die Interaktionen der SH2-Domänen mit dem EGFR, IRS2 und ITGB4 konnten sowohl in den Depex als auch den Komplex bestätigt werden. In Bezug auf die bekannten Interaktionspartner der SH2-Domänen ergänzen sich die Depex und Komplex. Daher wurde auch

angenommen, dass die Experimente auch für andere Proteine komplementär sind. Die experimentelle Herkunft einer Auswahl von Interaktionspartnern ist in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12 Experimentelle Herkunft einer Auswahl von Interaktionspartnern

Nur Depex	Nur Komplex	Beide Arten
ARHGAP*	Epha2*	EGFR*
FAK1*	gp130*	IRS2*
Grb2 *	MET*	ITGB4*
Katalase*	Cav1*	ERK2
MPZL1*	IQGAP2	STAT1*
PI3K p85*	MAPK2K	STAT3
STAT5*	ROCK2	CTNND1
COASY*	ERBB2IP	ITGA2

bereits beschriebene Interaktionspartner sind mit * markiert.

Die aus den Depex und Komplex resultierenden Proteinlisten wurden zur Bildung einer Referenzliste mit den spezifischen Interaktionen kombiniert. Die experimentelle Herkunft der Proteine der Proteinliste ist in Abbildung 34 zur Übersicht dargestellt. Die wt Tandem SH2-Domänen von SHP2 interagieren demnach potentiell und spezifisch mit 1925 der in HeLa Zellen vorkommenden Proteine. In den Depex wurden 1443 Proteine identifiziert (Abbildung 34, blau und grün, detaillierte Auflistung der Proteine Kapitel VII.3). Die Komplex führten zu 1505 spezifisch interagierenden Proteinen (Abbildung 34 gelbe und grüne Markierung).

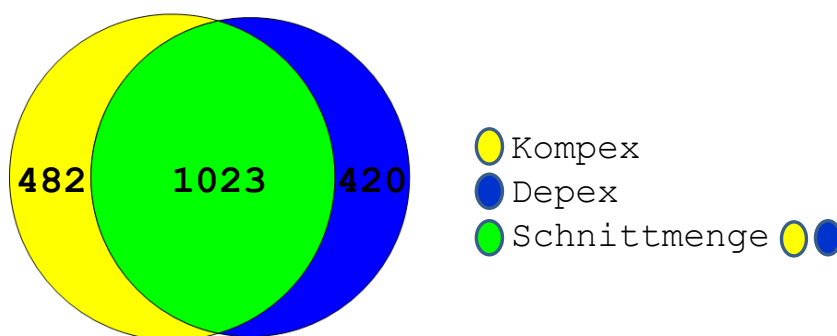


Abbildung 34 Experimentelle Herkunft der Proteine der Referenzliste.
 Im Venn Diagramm die Anzahl der Proteine sichtbar, die mit den 3 Depex(blau), mit den 3 Komplex (gelb) oder in allen 6 Experimenten (grün) gefunden wurden. Alle dieser in den Komplex oder den Depex gefundenen 1925 Proteine wurden später als Referenzliste für die Mutanten verwendet.

Die in blau und gelb dargestellten Mengen (Abbildung 34) wurden jeweils in den Depex- oder Komplex gefunden. Mehr als 1000 der Proteine wurden in allen der verschiedenen Experimente gefunden (siehe Abbildung 34 grüne Schnittmenge). Die Liste bildet zusätzlich eine Referenzliste für die nachfolgenden Experimente mit den Punktmutanten.

Um einen Überblick über die Eigenschaften der 1925 mit den SH2-Domänen von SHP2 interagierenden Proteine gewinnen zu können, wurden die gefundenen Proteine anhand der ihnen nach der Gene Ontology Datenbank (<http://www.geneontology.org>, [128]) zugeordneten Eigenschaften mit Hilfe von ProteinCenter™ klassifiziert. Die Klassifizierung der interagierenden Proteine nach ihrer möglichen Lokalisation in der Zelle ist in Abbildung 35 gezeigt.

Es ist jeweils der Anteil der gefundenen Proteine dargestellt, dem die genannte Lokalisation zugeordnet ist. Hierbei ist zu beachten, dass in der Datenbank mehrfache Zuordnungen eines Proteins zu verschiedenen Lokalisationen möglich sind. Den meisten Proteinen ist das Zytoplasma zugeordnet (83%). Die Membran ist 62% der Proteine als möglicher Aufenthaltsort zugewiesen. Im Nukleus kann sich etwa die Hälfte dieser Proteine (51%) befinden. Darüberhinaus kann das Mitochondrium der Aufenthaltsort von 22% der gefundenen Proteine sein. Insgesamt sind alle möglichen Lokalisationen in der Zelle als Lokalisation der interagierenden Proteine vertreten.

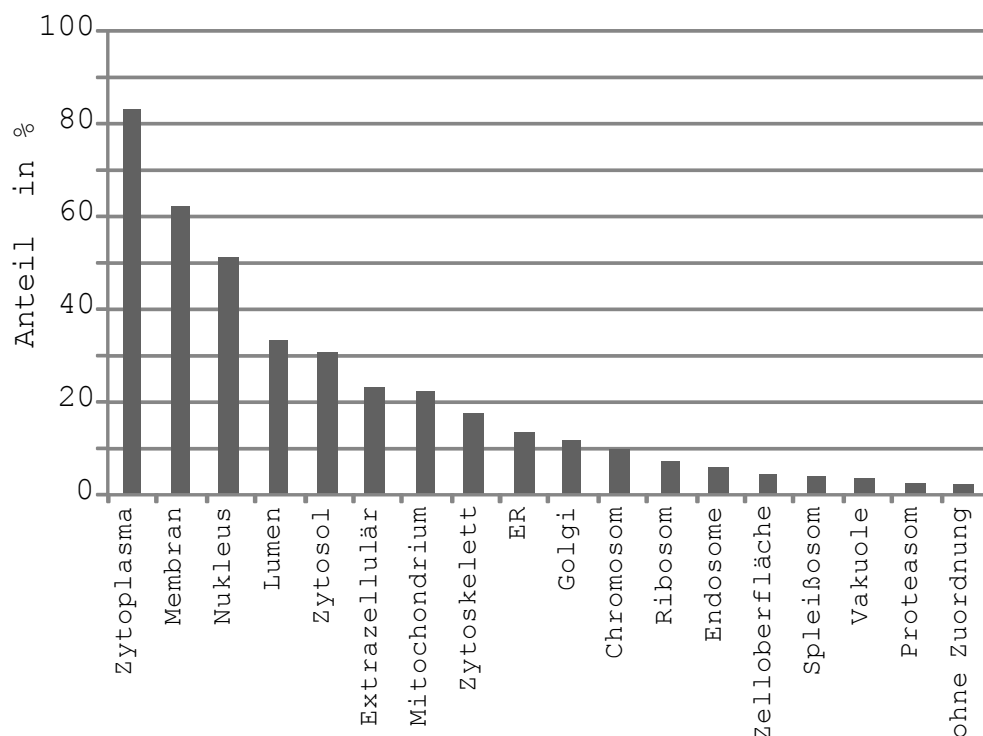


Abbildung 35 Klassifizierung der Proteine des Interaktoms der SH2-Domänen von SHP2 nach ihrer zellulären Lokalisation.

Das Diagramm zeigt jeweils den Anteil der 1925 identifizierten Proteine an der ihnen mittels der GO zugeordneten Lokalisation in der Zelle (GOCC). Einem Protein können mehrere Lokalisationen zugeordnet sein. GO-Gene ontology

Außerdem können die 1925 interagierenden Proteine nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen klassifiziert werden (Abbildung 36). Auch hier können einem Protein mehrere biologische Prozesse zugeordnet sein. Es ist auffällig, dass fast 85% der interagierenden Proteine an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Die Hälfte der gefundenen Proteine ist an der Regulation von biologischen Prozessen beteiligt. Etwa 40% der Proteine sind der Reaktion auf Stimulation zugeordnet. Etwa ein Drittel (33,8%) der interagierenden Proteine sind an der Zellkommunikation beteiligt. Auch Entwicklung (27%) und Differenzierung (30,4%) gehören zu den Funktionen, die den Interaktionspartnern von SHP2 zugeordnet sind. An der Zellorganisation und Biogenese können über 50% der Proteine beteiligt sein. Etwa 17% des Interaktoms kommt eine Funktion während des Zelltods zu. Insgesamt wird ein breites Funktionsspektrum der biologischen Prozesse von den mit SHP2 interagierenden Proteinen abgedeckt.

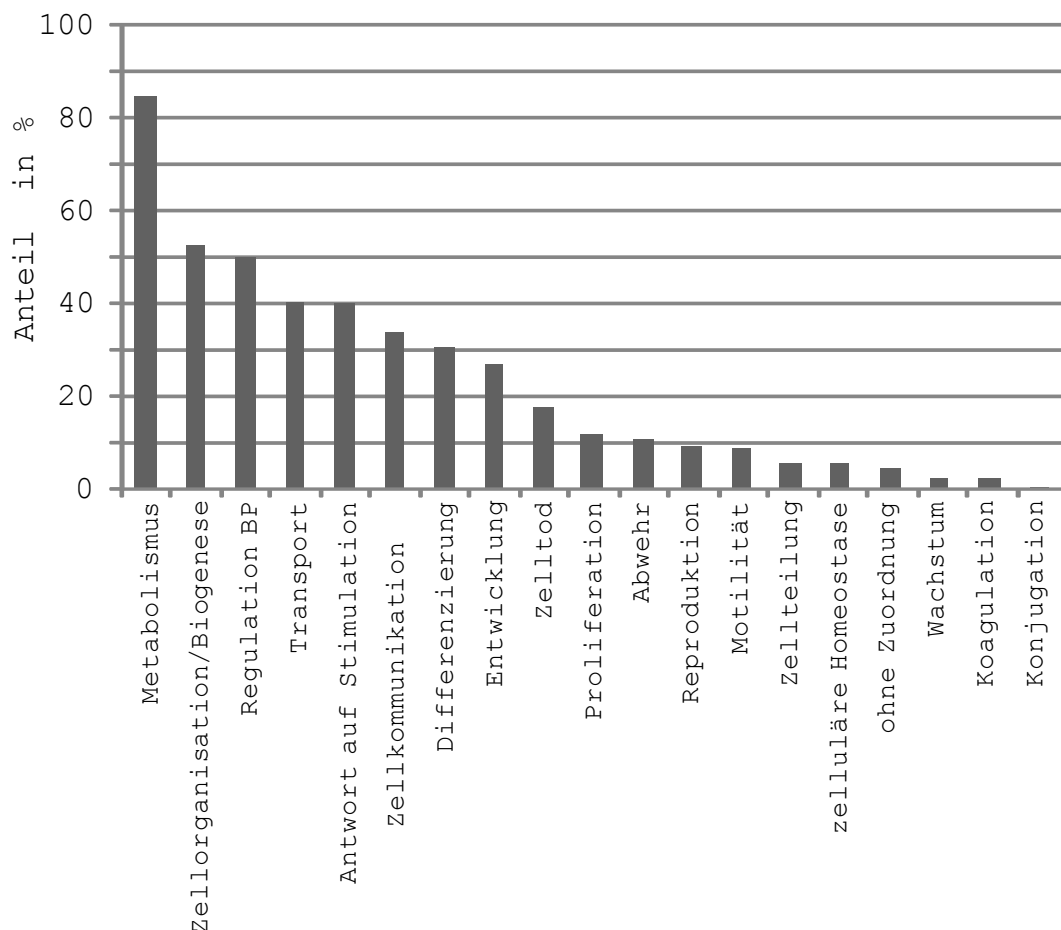


Abbildung 36 Klassifizierung der Proteine des Interaktoms der SH2-Domänen von SHP2 nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen. Das Diagramm zeigt jeweils den Anteil der 1925 identifizierten Proteine an den ihnen mittels der GO zugeordneten biologischen Prozessen (GOBP). Einem Protein können mehrere biologische Prozesse zugeordnet sein. GO=Gene ontology

Weiterhin wurden die interagierenden Proteine nach ihrer molekularen Funktion klassifiziert. Diese Klassifizierung erlaubt die Zuordnung mehrerer molekularer Funktionen zu einem Protein und ist für das Interaktom in Abbildung 37 dargestellt. Die Funktion Proteinbindung ist in dieser Datenbank als selektiv und nicht kovalent mit einem Protein interagierend definiert. Proteinbindung wird 80% der gefundenen Proteine zugeordnet. Etwa 71% der identifizierten Proteine sind Enzyme (Katalysatoren). Fast 10% sind Rezeptoren. Der Regulation von Transkription sind etwa doppelt so viele Proteine zugeordnet (14%) wie der Regulation der Translation (6%). Etwa 170 Proteinen (15%) der mit den SH2-Domänen von SHP2 interagierenden Proteine werden Funktionen in der Signaltransduktion zugeordnet. Signalwege werden später im Kontext der Punktmutanten analysiert (siehe Kapitel IV.5). Auch hinsichtlich der molekularen Funktionen wird ein großes Spektrum durch die mit den SH2-Domänen interagierenden Proteine abgedeckt.

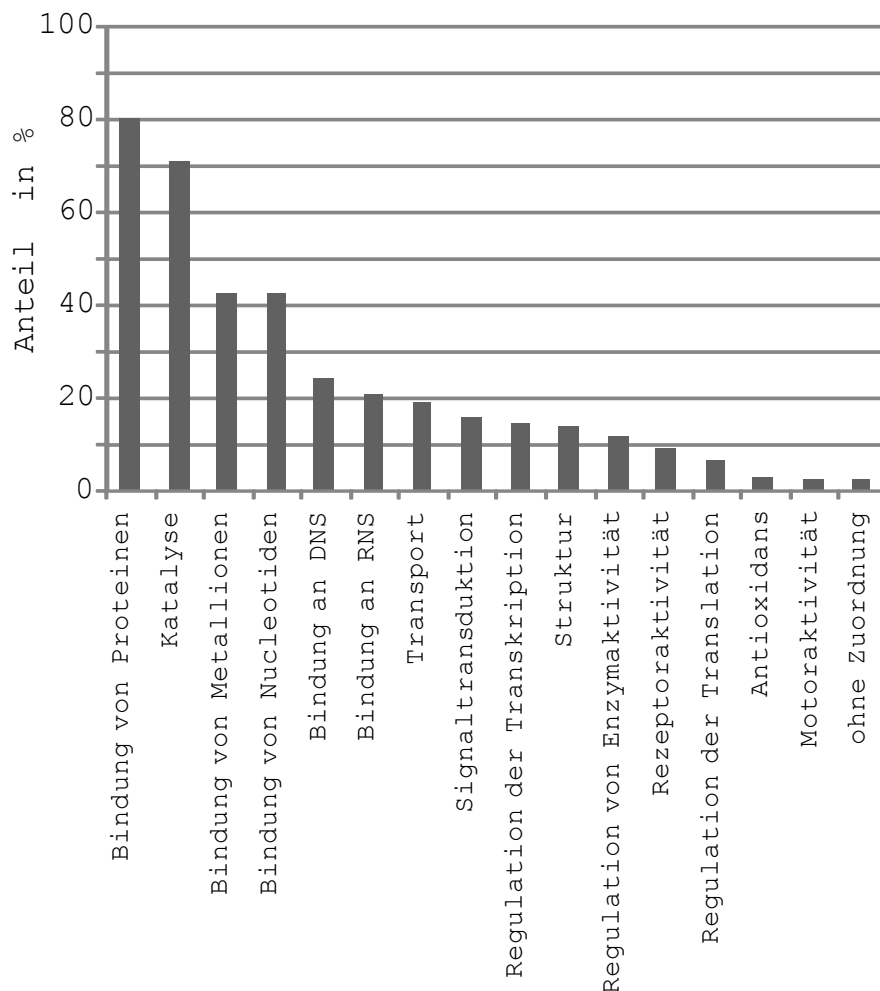


Abbildung 37 Klassifizierung der Proteine des Interaktoms der SH2-Domänen von SHP2 nach ihrer molekularen Funktion.

Das Diagramm zeigt jeweils den Anteil der 1925 identifizierten Proteine an der ihnen mittels der GO zugeordneten molekularen Funktion (GOMF). Einem Protein können mehrere MF zugeordnet sein. GO-Gene ontology.

Die Klassifizierungen der identifizierten Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation, ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen und ihrer molekularen Funktion zeigen keine klare Fokussierung auf einen bestimmten Bereich, es wird immer ein breites Spektrum vertreten.

Eine weitere Möglichkeit das Interaktom der SH2-Domänen von SHP2 zu analysieren basiert auf den Aminosäuresequenzen der Proteine. Die Motive, die für Bindung an SH2-Domänen verantwortlich gemacht werden, enthalten immer ein phosphoryliertes Tyrosin. Dennoch wird die Bindung auch durch die umgebende Sequenz bestimmt [129, 130]. Daher war es naheliegend zu untersuchen, ob bestimmte Motive in den Proteinen durch die Experimente angereichert wurden und extrahiert werden können. Diese Analyse wurde mit der Software Motiv-x [131] durchgeführt und Tyrosin (Y) als zentrale Aminosäure (AS) gewählt. Da eine der bisherigen Publikationen auf eine Bedeutung der sechsten Seitenkette nach dem Y hinweist [132], wurden jeweils die 6 AS vor und nach dem Y betrachtet. Die in den Proteinen enthaltenen angereicherten Motive wurden als Sequenzlogos [133] dargestellt (Abbildung 38).

Es wird deutlich, dass die in den interagierenden Proteinen enthaltenen Motive sehr heterogen sind. In keinem der angereicherten Motive sind neben dem zentralen Y mehr als zwei konservierte AS zu finden. Lysin, das positive Ladungen enthält, ist an verschiedenen Positionen (-5, -1, +2, +4 bzw. +5) konserviert. Weiterhin sind die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat in mehreren Motiven als konservierte AS vertreten.

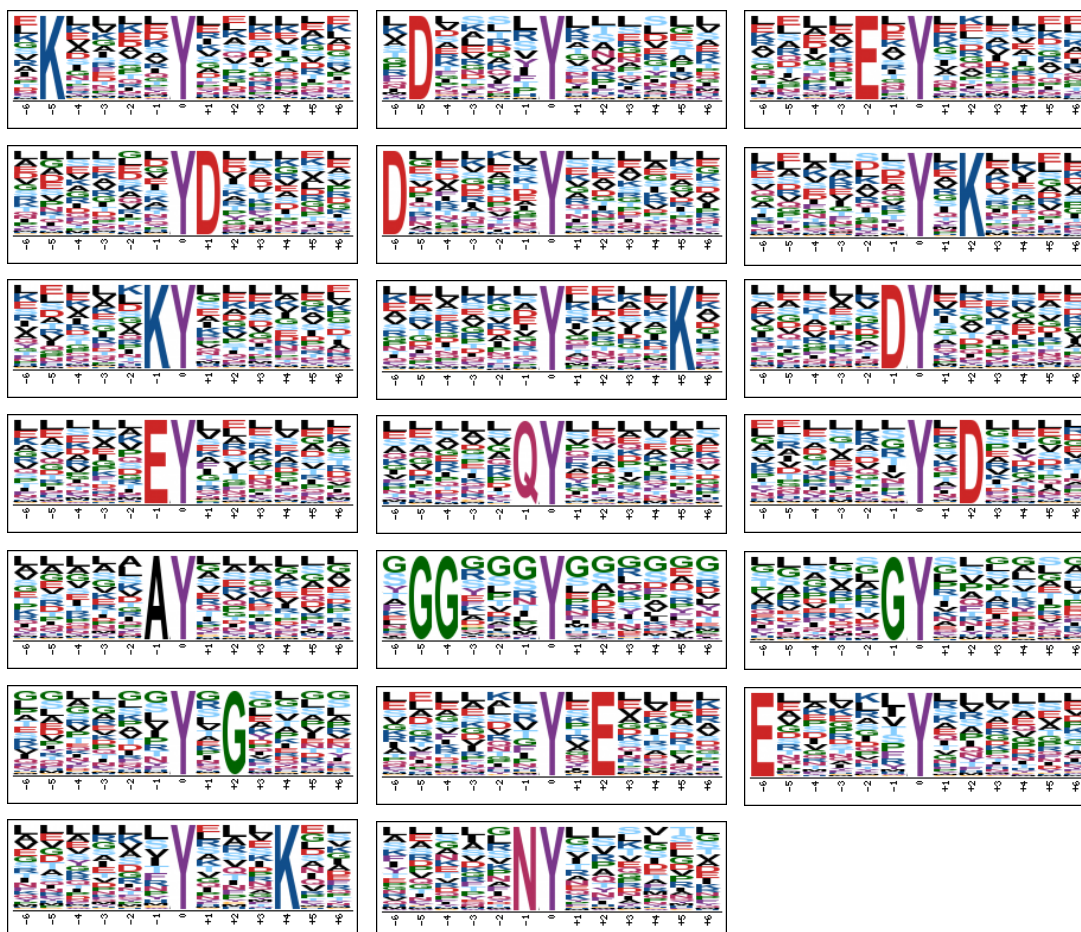


Abbildung 38 Weblogos der im Interaktom angereicherten Motive

In den von den SH2-Domänen präzipitierten Proteinen enthaltene Motive. Die Motive wurden mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> mit folgenden Parametern erstellt: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mindestens 20-mal vorkommend, Hintergrund: IPI human, zentrale AS des Hintergrunds Y, Signifikanz für 0,00000

Zum Vergleich wurden auf Literatur basierende Vorhersagen von Proteinen, die mit den SH2-Domänen von SHP2 interagieren könnten, mit SMALIsite [134, 135] durchgeführt. Die resultierenden Motive wurden mit motif-x analysiert. Fanden sich die prognostizierten interagierenden Motive mindestens 20 Mal sind die Weblogos dargestellt (Abbildung 39).

Für Interaktionspartner der N-terminalen Domäne scheint der N-terminale Teil des Motivs wenig Bedeutung zu haben, die Verteilung der AS ist heterogen. Die AS direkt nach dem Tyrosin (Y+1) wirkt wichtig, da hauptsächlich Val, Ser, Thr, Ile und Glu dort zu finden sind. In Positionen Y+3 ist in 2 Motiven Pro und einem anderen Leu stark angereichert. Auch für die Bindung an die C-terminale SH2-Domäne wirkt die N-terminal zum Tyrosin liegende Sequenz aufgrund ihrer Heterogenität nicht entscheidend. Es konnte jeweils aber keine an einer bestimmten Position in allen Motiven festgelegte AS gefunden werden. Insgesamt sind auch die Motive der vorhergesagten Interaktionspartner für beide SH2-Domänen heterogen.

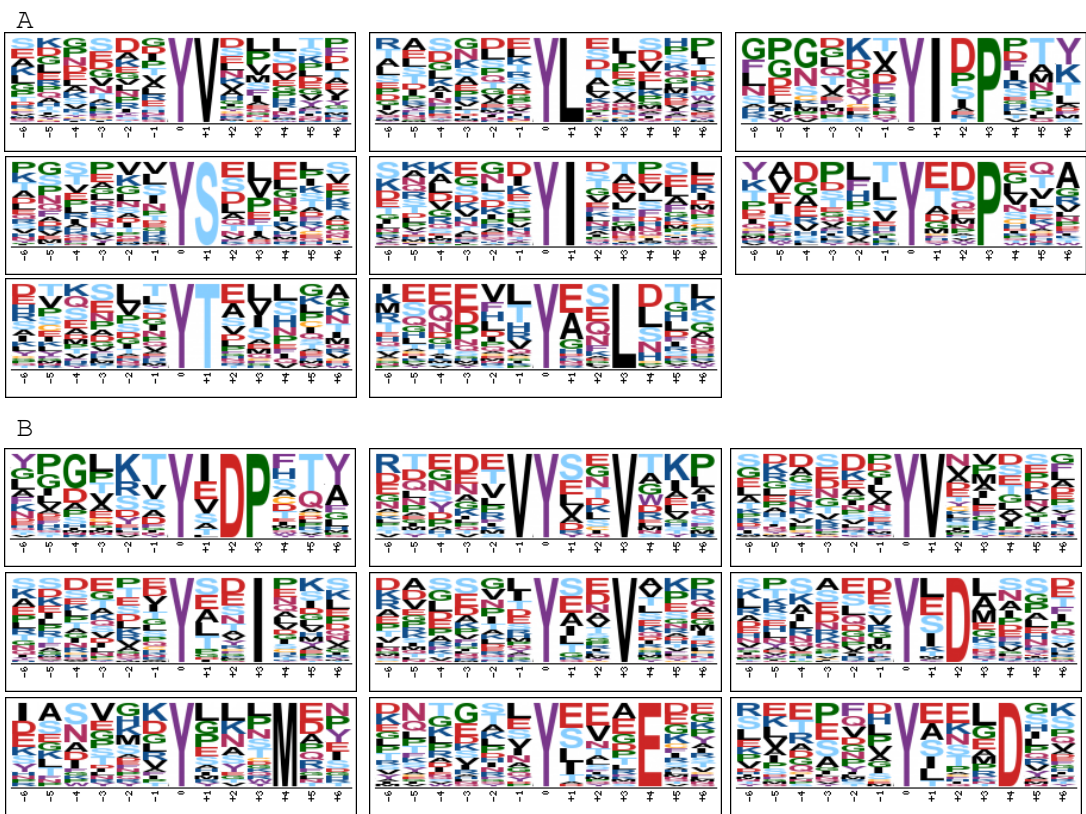


Abbildung 39 Weblogos der Motive in vorhergesagten Interaktionspartnern
A der N-terminalen SH2-Domäne, B der C-terminalen SH2-Domäne. Für die Vorhersage der Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP2 mit SMALLsite wurde die SWISS-PROT Datenbank verwendet, Einschränkungen erfolgten, in dem nur Proteine aus dem Zytosol, mit Bezug zu Signaltransduktion und mit Phosphorylierungspotential betrachtet wurden. Aus den Motiven von 500 vorhergesagten Interaktionspartnern wurden Weblogos mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> mit folgenden Parametern erstellt: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mindestens 20-mal vorkommend, Hintergrund: IPI human, zentrale AS des Hintergrunds Y, Signifikanz 0,000001

5. Interaktom der Mutanten (MS)

Aufgrund von SPR Messungen (siehe Kapitel IV.3.2) wurden die in Krankheiten vorkommenden Punktmutanten T42A, R138Q und E139D für weitere Analysen ausgewählt. In den mit Immundetektion durchgeführten Analysen (Abbildung 23) sind die Präzipitate der Punktmutanten T42A, R138Q, E139D und der wt SH2-Domänen von SHP2 gezeigt. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den Mengen der präzipitierten Proteine zu erkennen. Die Präzipitate der Punktmutanten wurden auch in der Immundetektion des Depex eingesetzt (siehe Abbildung 24). Diese Experimente demonstrierten die Abhängigkeit der Bindung von phosphorylierten Tyrosylresten. Auch die Blockierung der Bindungstaschen reduziert die Menge der von den Punktmutanten präzipitierten Proteine (Kompex, Abbildung 29).

Mit Hilfe der Immundetektionen der phosphorylierten Tyrosylreste können jedoch keine Aussagen darüber gemacht werden, welche Proteine unterschiedlich binden. Daher wurden auch massenspektrometrische Analysen der Präzipitationen der Punktmutanten vorgenommen. Das Design derartiger Versuche ist in Abbildung 40 dargestellt.

Analog zu den vorhergehenden Experimenten wurde eine Doppelmarkierung der Zellen mit stabilen Isotopen der Aminosäuren Arginin und Lysin verwendet. Durch die Benutzung von jeweils 3 verschiedenen Isotopen (N/L, M und H) konnten drei Ansätze in einer Messung analysiert werden. Nach der Inkubation mit Pervanadat wurden die Zellen lysiert und die enthaltenen Proteine denaturiert. Die Präzipitation mit den wt SH2-Domänen von SHP2 und den Punktmutanten wurde jeweils aus unterschiedlich markierten Lysaten durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Ansätze in den **Ex**perimenten mit den **Mut**anten (Mutex) gemessen. In Ansatz 1 wurden die Präzipitationen von wt, T42A und R138Q, in Ansatz 2 die Präzipitationen von wt, T42A und E139D eingesetzt. In allen Messungen wurde eine Präzipitation durch die wt Domänen eingeschlossen. Die Mutanten konnten dann immer in Relation zum wildtyp Konstrukt gesetzt werden. So war ein Vergleich zu den wt Domänen und zwischen den beiden verschiedenen Ansätzen möglich. Außerdem wurde auch die T42A Mutante in beiden Ansätzen verwendet. Vorhergegangene Experimente (wie auch die in Abbildung 18 und Abbildung 24 zeigten) ließen eine höhere Affinität der T42A Mutante als die der wt SH2-Domänen zu Interaktionspartnern erwarten. Diese könnte sich in stärkeren Signalen der späteren gemessenen Peptide der Interaktionspartner auswirken und würde dann die zuverlässige Identifizierung erleichtern.

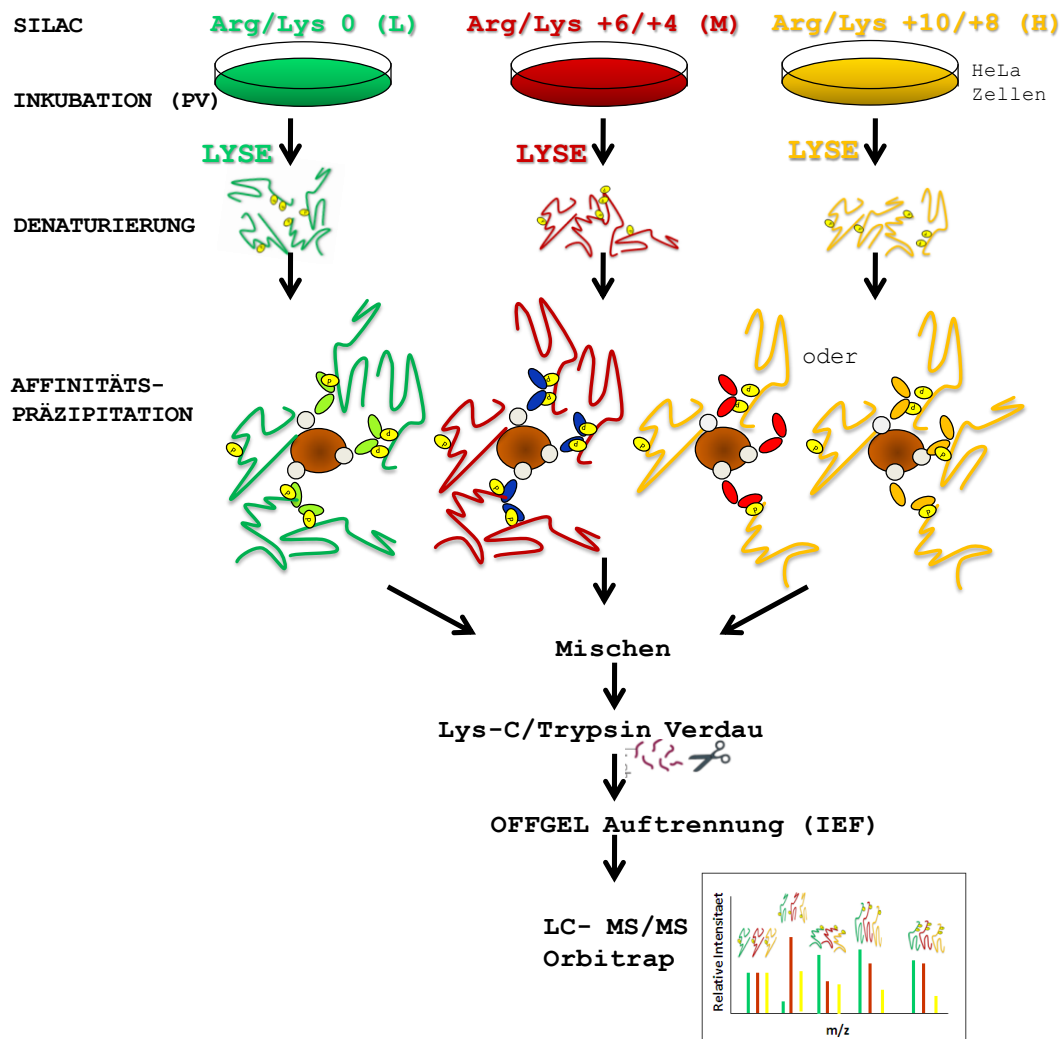


Abbildung 40 **Design der Mutex**

Es wurden je zweimal Ansatz 1 (wt TA RQ) und Ansatz 2 (wt TA ED) analysiert, alle Mutanten wurden auf wt bezogen, weitere Details siehe Text. L leichte Isotope (dunkelgrün), Präzipitate von wt (grüne Domänen); M mittelschwere Isotope (rot), Präzipitate von T42A (blaue Domänen), H schwere Isotope (gelb), Präzipitate von R138Q (rote Domänen) oder E139D (gelbe Domänen)

Wie in den zuvor beschriebenen massenspektrometrischen Experimenten wurde die nachfolgende Probenvorbereitung durchgeführt. Ihre Überprüfung durch Immundetektionen ist in Abbildung 41 dargestellt. Die Lysate wurden nach der Denaturierung spektrometrisch auf gleiche Mengen untersucht und die Konzentrationen gegebenenfalls angepasst. Anschließend wurde die Phosphorylierung der Proteine durch eine Immundetektion mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine kontrolliert (Abbildung 41 A). Die Menge der gekoppelten Domänen wurde durch Immundetektion mit Antikörpern gegen GST und

Coomassiefärbung eines Gels dargestellt (Abbildung 41 B). Die Coomassie Färbung zeigt, dass jeweils gleich viele Proteine an die Beads gekoppelt waren.

Wie es aufgrund der in Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 29 gezeigten Experimente zu erwarten war, unterscheidet sich die Menge der von den wt Domänen oder von den Punktmutanten gebundenen Proteine.

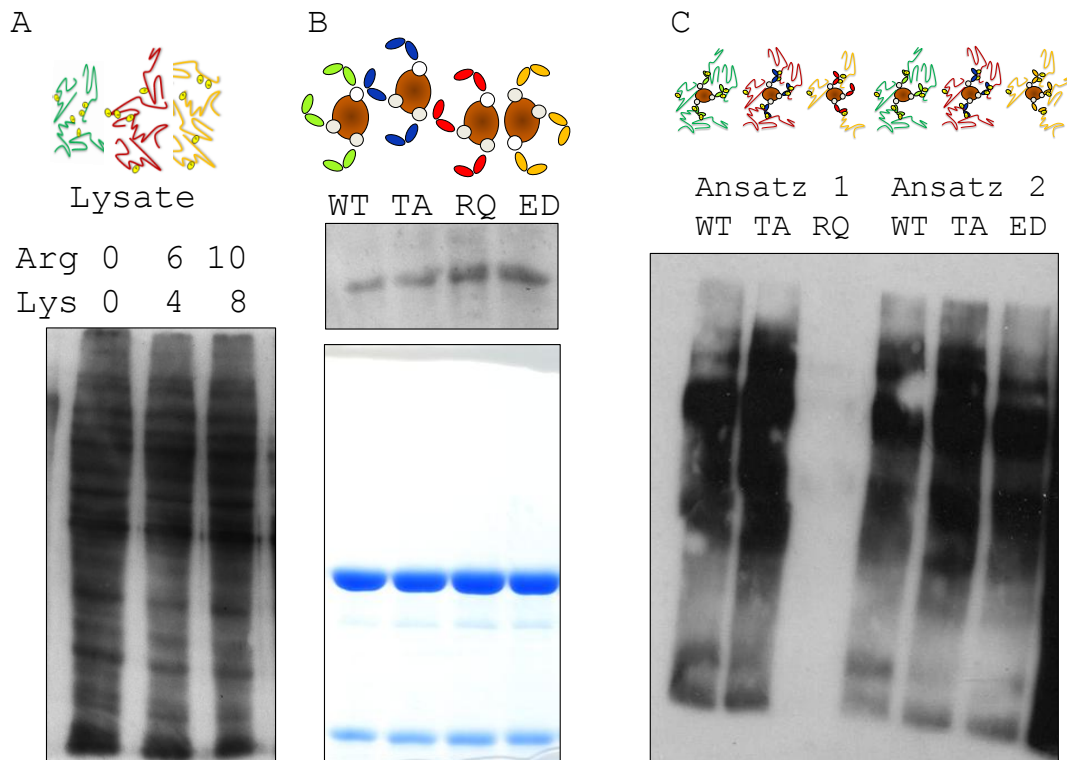


Abbildung 41 Probenvorbereitung der Mutex

A HeLa Zellen wurden mit Pervanadat (1 mM) inkubiert und in denaturierendem Puffer lysiert und dialysiert. Die Phosphorylierung der Proteine in den verschiedenen markierten (Arg/Lys 0, L; 6/4, M; 10/8, H), denaturierten Lysaten wurde nach der SDS-PAGE und dem Transfer auf die Membran durch Immundetektion mit Antikörpern gegen pY visualisiert.

B Kopplung der Domänen: Die Menge und Reinheit der an die Beads gekoppelten GST-fusionierten SH2-Domänen von SHP2 wt, T42A, R138Q oder E139D wurde nach einer SDS-PAGE durch Coomassie Färbung und im Immunoblot durch Detektion mit einem Antikörper gegen GST kontrolliert.

C Von den Konstrukten (B) präzipitierte Proteine

Die Interaktionspartner wurden aus 1,5 mg Zelllysate (A) präzipitiert. Die Proben wurden vor dem Mischen dieser Ansätze entnommen. Nach einer SDS-PAGE wurden sie auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine durchgeführt.

Nach der Messung wurden die Daten (MS und MSMS Spektren) wie bereits in den Kapiteln III.4.4, IV.4.3 und IV.4.4 beschrieben zur Identifizierung prozessiert und analysiert.

Die relative Quantifizierung der Proteine wurde mit Hilfe der Intensitäten der Peptide in den MS Spektren vorgenommen. Auch hier wurden wie in den vorhergegangenen Experimenten wieder bekannte Interaktionspartner gefunden. Unter ihnen auch p85 und der EGFR. Außerdem wurde in diesen Experimenten wieder der Transkriptionsfaktor STAT3 identifiziert.

In Abbildung 42 sind die Spektren verschiedener Peptide zu jeweils einem bestimmten Zeitpunkt während der Elution gezeigt. Da die Spektren in diesem Fall nicht denselben Läufen entnommen wurden, wurde hier auf die Angabe der Retentionszeiten verzichtet. Weiterhin wurden wieder nur die Spektren von zweifach positiv geladenen Peptiden gezeigt, daher ist die durch die verschiedenen Isotope hervorgerufene m/z-Verschiebung wie in den zuvor beschriebenen Spektren. Außerdem wurde jeweils ein Spektrum aus einem der Ansätze der Mutex gezeigt. In Ansatz 1 (Abbildung 42 A, C) waren die von den Varianten wildtyp, T42A und R138Q präzipitierten Proteine enthalten, während die Präzipitationen in Ansatz 2 (Abbildung 42 B, D) mit den Varianten wildtyp, T42A und E139D durchgeführt wurden. Die Spektren zeigen jeweils Signale für alle drei verwendeten Isotope. Das zu dem Peptid verdaute Protein wurde von allen Varianten während der Präzipitation gebunden. Die Intensitäten der Signale sind proportional zur Menge des Peptids. Zu dem Elutionszeitpunkt, an das in Abbildung 42 A gezeigte Spektrum entstand, war die Intensität des Signals des leichten Isotops (grün) kleiner als die des mittelschweren (rot) und größer als die des schweren (gelb). Das Spektrum lässt darauf schließen, dass das wildtyp Konstrukt weniger der Untereinheit p85 der PI3K als das T42A und mehr als das R138Q Konstrukt bindet. Allerdings wird die Quantifizierung jedes Peptids nicht nur an einem Elutionszeitpunkt vorgenommen, sondern über den gesamten Elutionszeitraum. Dadurch ist sie genauer als die Quantifizierung zu nur einem Zeitpunkt. In Ansatz 2 ist die Intensität des aus dem leichten Isotop resultierenden Peptids am höchsten, das mittelschwere Isotop führt zu einer leicht geringeren und das schwere zu einer geringeren Intensität. Folglich erscheint es, als ob die wildtyp Variante mehr p85 als die T42A und die E139D Variante präzipitiert. Die Intensität des Signals eines dem Transkriptionsfaktor STAT3 zugeordneten Peptids ist bei dem Verhältnis Masse zu Ladung des leichten Isotops (grün) niedriger als bei dem des mittelschweren Isotops (rot) und höher als bei dem des schweren Isotops (gelb). Zeigen alle Peptide von STAT3 diese Tendenz, wurde von den wildtyp Domänen weniger STAT3 gebunden als von der T42A Mutante und mehr als von der R138Q Mutante. Das Spektrum eines dem EGFR zugeordneten Peptids (Abbildung 42 D) zeigt ebenfalls Unterschiede in den Intensitäten der verschiedenen Isotope. Die Intensität

des Signals des leichten Isotops ist geringer als die des mittelschweren und höher als die des schweren.

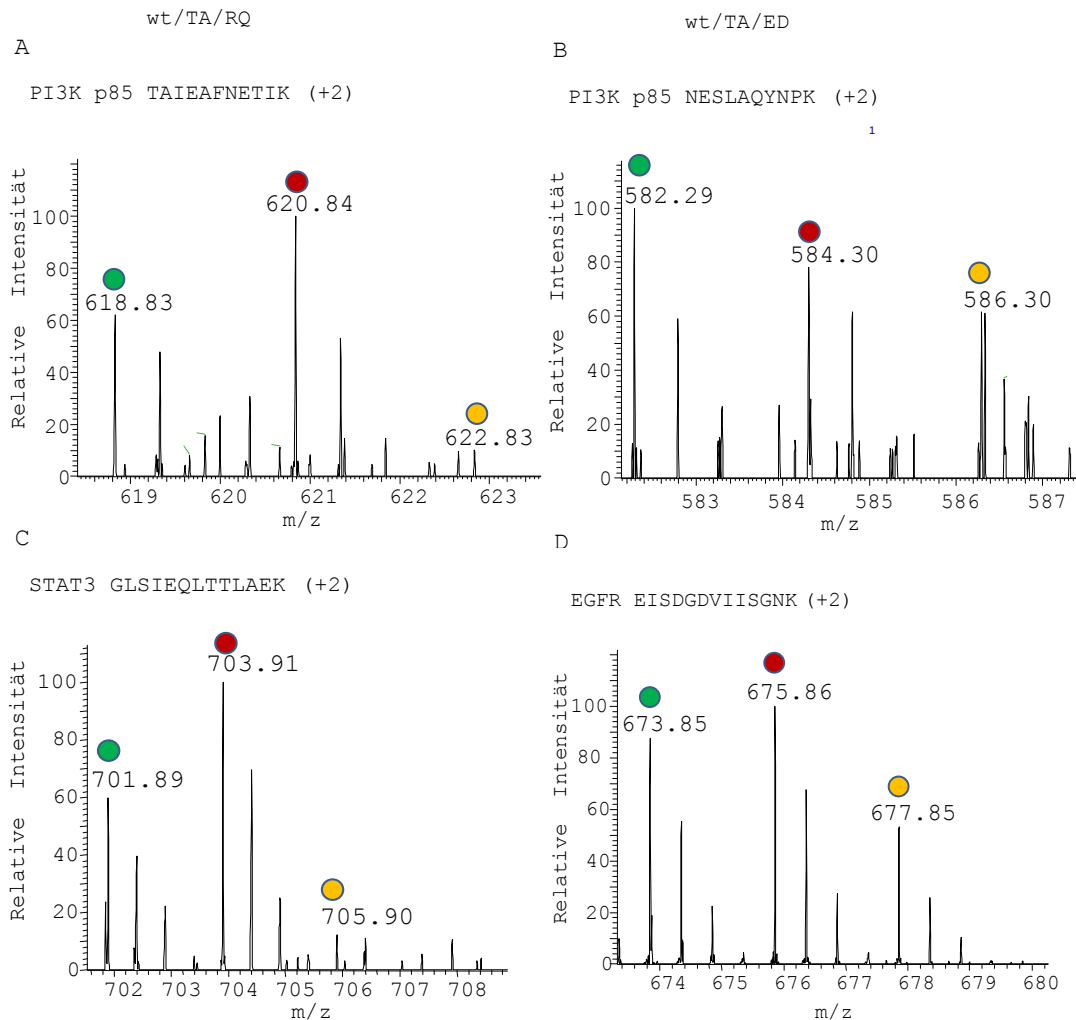


Abbildung 42 Massenspektren von Peptiden aus den Mutex

Die Spektren auf der linken Seite sind einem Präzipitationsansatz 1 mit wt, T42A und R138Q, die Spektren auf der rechten Seite einem Ansatz 2 mit wt, T42A und E139D entnommen.

A und B Peptide von PI3K p85

C Peptide von STAT3

D Peptide des EGFR

Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) für das normale Isotop ist jeweils grün markiert (wt); das m/z von mittelschwer markierten Peptiden ist rot markiert (T42A); das m/z der schweren Isotope ist gelb markiert (linke Spektren R138Q und rechte Spektren E139D)

Wie bereits erwähnt, werden die Intensitäten der Signale aller einem Protein zugeordneter Peptide von MaxQuant dazu verwendet, das relative Verhältnis des Proteins über die verschiedenen Isotope zu ermitteln. Die Verhältnisse der

mittelschweren und schweren Versionen zu den leichten in den Mutex geben Auskunft über die von den Mutanten im Vergleich zu wildtyp präzipitierten Mengen der Proteine. Diese Menge wird als Maß der Bindungskapazität der Mutanten im Vergleich zu den wildtyp Domänen verwendet.

In Abbildung 43 ist die Analyse einer Auswahl von bekannten Interaktionspartnern auf Proteinebene dargestellt. Gezeigt sind jeweils die von den Punktmutanten im Vergleich zu den wt Domänen präzipitierten Mengen der Proteine. Das Verhältnis aus der mittelschweren zu der leichten Version entspricht dem Verhältnis der an die T42A Mutante zu der an die wildtyp SH2-Domänen gebundene Menge. Analog entsprechen die Verhältnisse der schweren zu leichten Varianten der Bindung von R138Q oder E139D bezogen auf die wildtyp Domänen. Es wurde der Logarithmus zur Basis 2 ($\log_2$) für die Darstellung gewählt, so dass $\log_2$ Verhältnisse von Null einer den wt SH2-Domänen gegenüber unveränderten Bindung der Mutanten an das jeweilige Protein entsprechen. Als verändert von den Mutanten gebunden wurden Proteine betrachtet, deren $\log_2$ Verhältnis (Mutante/wt) kleiner als -0,58 oder größer als 0,58 ist. Diese Grenzen sind so gewählt, damit nur deutlich ausgeprägte Veränderungen betrachtet werden. Die T42A Mutante bindet dann in den meisten Fällen vergleichbar wie die wt SH2-Domänen. Von der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und dem IRS2 werden jedoch von der TA Mutante größere Mengen präzipitiert als von den wt Domänen. Die E139D Mutante bindet tendenziell vergleichbar bis weniger der Proteine als die wt SH2-Domänen. Von der E139D Punktmutante wird im Vergleich zur Bindung an wt Domänen weniger von der FAK, Grb2 und der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K (PIK3R2) gebunden. Wie auch schon bei den SPR-Experimenten (Abbildung 19) ist das Verhalten der R138Q Mutante bei dieser Auswahl präzipitierter Proteine sehr auffällig. Sie präzipitiert in allen gezeigten Fällen mindestens viermal weniger der Proteine als die wt Domänen.

Alle Mutanten präzipitieren weniger Katalase (CAT) als die wt SH2-Domänen.

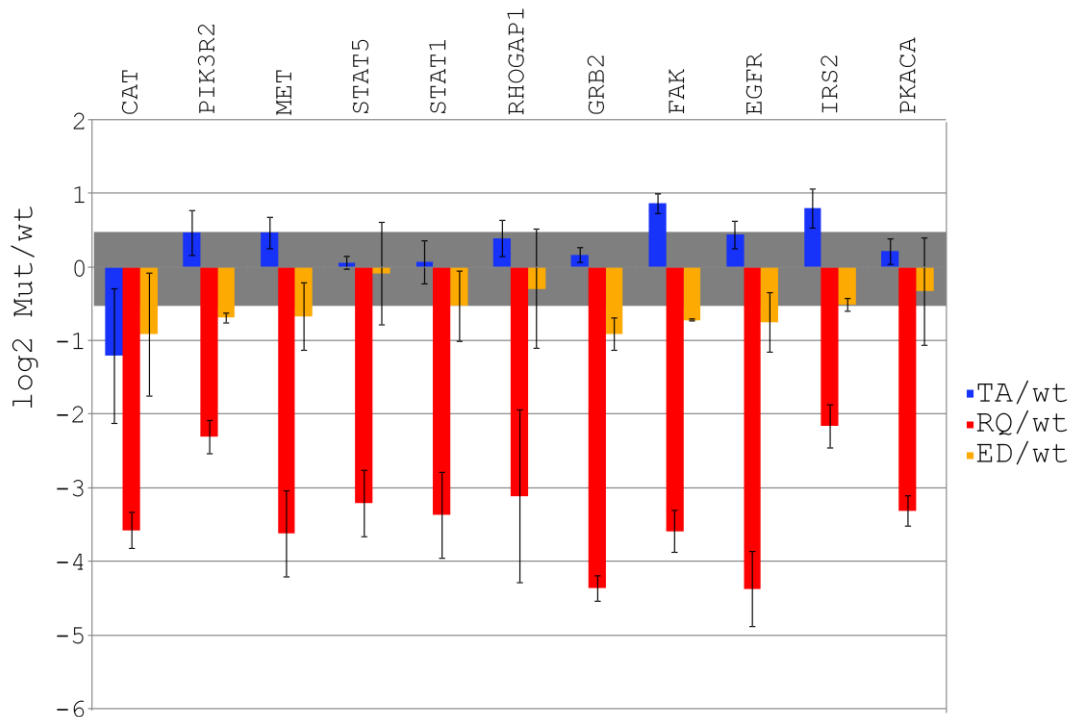


Abbildung 43 Die Bindung der Punktmutanten T42A, R138Q und E139D an eine Auswahl von bona fide Interaktionspartner

Die Verhältnisse der von den Mutanten präzipitierten Proteine im Vergleich zu wt sind als Logarithmus zur Basis 2 dargestellt. Der grau unterlegte Bereich zeigt wenn die Bindung der Mutanten als gleichwertig mit der Bindung von den wt Domänen definiert ist. Die Mittelwerte für TA/wt wurden aus 4, die für RQ und ED aus 2 Experimenten berechnet.

Weiterhin befand sich auch der Transkriptionsfaktor STAT3 unter den gefunden Proteinen. In Abbildung 44 A sind die in den massenspektrometrischen Experimenten bestimmten Verhältnisse der von den Mutanten präzipitierten Mengen zu den von den wt SH2-Domänen von SHP2 dargestellt. Die T42A Mutante bindet ein wenig mehr des Transkriptionsfaktors als die wt Domänen. Sie hat eine leicht höhere Affinität zu STAT3 als die wt Domänen. Die wt Domänen binden deutlich mehr STAT3 als die R138Q Mutante. Die Affinität der RQ Mutante zu STAT3 ist im Vergleich zu den wt Domänen stark verringert. Die Bindung der E139D Mutante führt zu genauso viel bis leicht weniger gebundenem STAT3 als von den wt Domänen. Sie ist leicht schwächer bis ähnlich affin wie die wt Domänen. Die Validierung von STAT3 und den Tendenzen der Bindungen der Mutanten werden im Immunoblot des präzipitierten STAT3 (Abbildung 44 B) deutlich. Die Mengen der eingesetzten Domänen sind durch die Detektion mit Hilfe von Antikörpern gegen GST gezeigt. Von keinem der Konstrukte werden detektierbare Mengen von STAT3 präzipitiert, wenn die Proteine der eingesetzten Lysate dephosphoryliert sind.

Im Vergleich der Mengen von aus den Lysaten mit maximal phosphorylierten Proteinen präzipitiertem STAT3 zeigen sich dieselben Tendenzen wie in Abbildung 44 A. Die von den wt SH2-Domänen präzipitierten Mengen von STAT3 führen zu einer sichtbaren Bande. Die Intensität der Bande nach der Präzipitation durch die T42A Mutante ist höher. Obwohl von der R138Q Mutante größere Mengen eingesetzt wurden, wurden keine detektierbaren Mengen von STAT3 präzipitiert. Die E139D Mutante dagegen präzipitiert wieder ähnlich viel STAT3 wie die wt Domänen.

Die in den massenspektrometrisch bestimmten Tendenzen der Affinitäten der Mutanten zu STAT3 konnten im Immunoblot bestätigt werden.

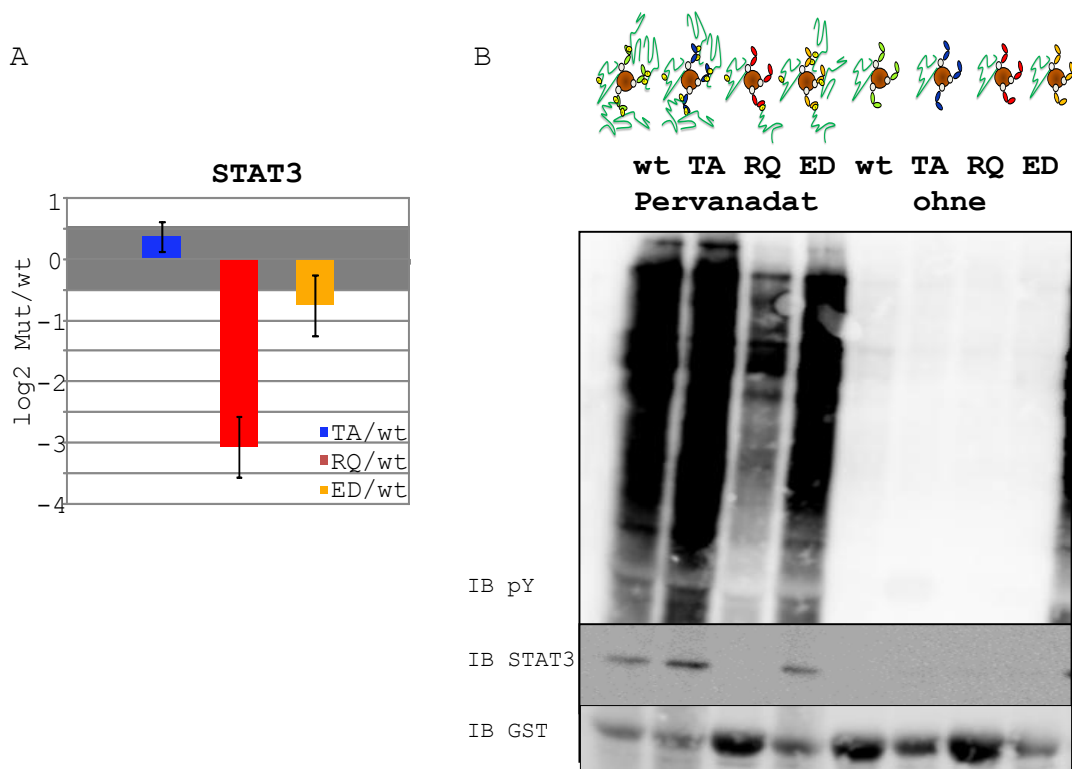


Abbildung 44 Von den Mutanten in Relation zu wt präzipitierter STAT3

A Es wurden die massenspektrometrisch gefundenen Verhältnisse der Mutanten/wt dargestellt. Die Mittelwerte für TA/wt wurden aus 4, die für RQ und ED aus 2 Experimenten berechnet

B HeLa Zellen wurden nicht oder für 15 Minuten mit Pervanadat (1mM) stimuliert, in denaturierendem Puffer lysiert und dialysiert. Die Interaktionspartner wurden von den wt Konstrukten und den Punktmutanten T42A, R138Q und E139D aus jeweils 0,75 mg Zelllysat präzipitiert. Nach einer SDS-PAGE wurden sie auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immundetektionen wurde mit Antikörpern gegen pY und STAT3 durchgeführt. Die Menge der eingesetzten SH2-Domänen wurde im Immunoblot durch Detektion mit einem Antikörper gegen GST kontrolliert.

Insgesamt wurden in diesen Experimenten mit der T42A Mutante 2412 Proteine, mit der R138Q Mutante 2344 und der E139D 2386 identifiziert. Hiervon wurden 2318 Proteine von allen Mutanten präzipitiert. Die Mutanten wurden jeweils in Relation zu den wt Domänen gemessen. Dadurch konnten sie untereinander auch dann verglichen werden, wenn sie sich nicht im selben Ansatz befanden. Die von den Punktmutanten präzipitierten Proteine wurden anschließend mit der Referenzliste gefiltert. Diese enthielt die Interaktionspartner, die bereits in den Experimenten mit den wt SH2-Domänen von SHP2 (Depex oder Kompex) als spezifisch gebunden definiert wurden (vergl. Kapitel IV.4.5). In Abbildung 45 sind Venn Diagramme zur Übersicht der experimentellen Herkunft der gefundenen Proteine zu sehen. So ergaben sich nach dem Filtern die Schnittmengen in denen für die T42A Mutante 1640, für die R138Q Mutante 1615 und die E139D Mutante 1631 interagierende Proteine enthalten waren. Es wurden im Folgenden nur die 1606 Proteine betrachtet, die in der Referenzliste enthalten waren und von allen Mutanten gebunden wurden (Abbildung 45 D, grauer Bereich).

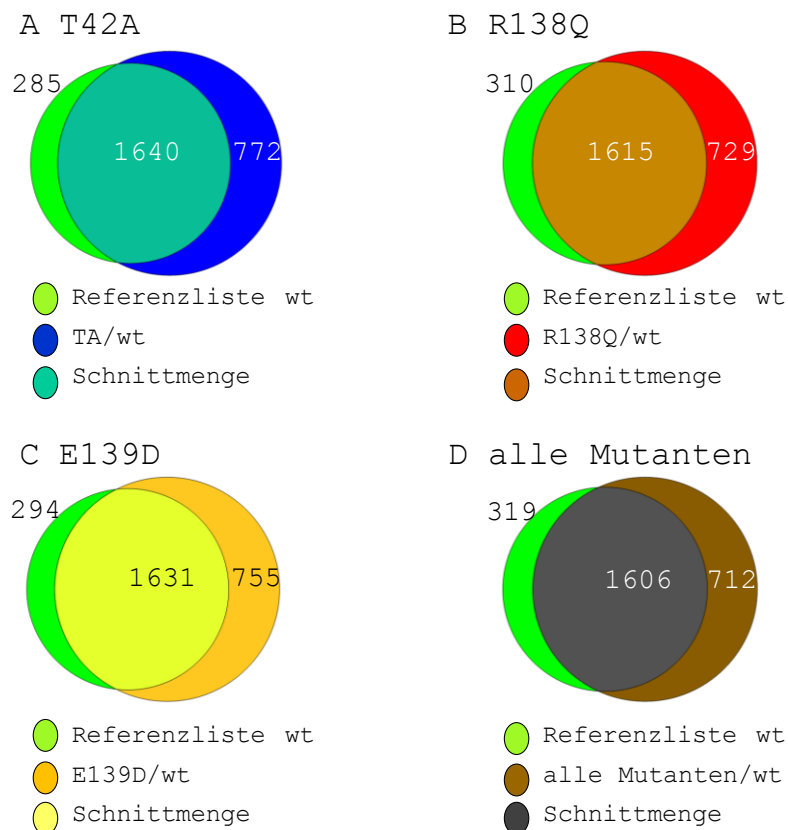


Abbildung 45 Experimentelle Herkunft der identifizierten Proteine

In den Venn Diagrammen ist die Anzahl der Proteine sichtbar, die mit den Mutex in Relation zur Referenzliste gefunden wurden. Die identifizierten Proteine wurden mit den 1925 Proteinen der Referenzliste gefiltert, so dass nur über Experimente mit den wt Domänen als spezifisch definierte Proteine weiterhin betrachtet wurden (Schnittmengen).

Unter den identifizierten allerdings nicht in den wt Experimenten gefundenen Proteinen befanden sich auch bekannte Interaktionspartner wie die Januskinase Jak1, das Adapterprotein GAB1 und SIRP α . Sie sind unter den 712 Proteinen (Abbildung 45 D, braun), die keine Schnittmenge bilden und wurden daher nicht weiter betrachtet.

Abbildung 46 zeigt ein Histogramm der jeweils bei den Präzipitationen von allen Mutanten im Vergleich zu wt (mut/wt) gefundenen, mit der Referenzliste gefilterten 1606 Verhältnisse der interagierenden Proteine. Werden diese von den Mutanten vergleichbar mit den wt Domänen gebunden, sind die Signale in Abbildung 46 grau unterlegt. Aufgrund der im Histogramm verwendeten Klassen wurden hier Proteine als verändert bindend betrachtet, wenn die Logarithmen der Verhältnisse Mut/wt zu Basis 2 kleiner als -0,5 oder größer als 0,5 waren.

So werden 1604 der Proteine von der RQ Mutante weniger gut gebunden als von den wt Domänen. Mit der ED Mutante interagieren etwa 200 schwächer, ungefähr 70 Proteine stärker als und 1200 vergleichbar mit den wt Domänen. Obwohl das Maximum der Verteilung der Verhältnisse von der TA Mutante größer als Null ist, zeigt die Mutante bei dieser Betrachtung die geringsten Abweichungen von den wt Domänen. Mit ihr wechselwirken etwa 1300 Proteine vergleichbar wie mit den wt Domänen, 65 schwächer und 210 stärker.

Da die T42A Mutante in den meisten Fällen ein wenig mehr präzipitiert als die wt SH2-Domänen, ist eine leicht erhöhte Affinität anzunehmen. Die E139D Variante hat sowohl höhere, niedrigere oder auch gleiche Affinitäten wie die wt Konstrukte. Die Affinitäten der RQ Mutante zu den Interaktionspartnern sind gegenüber den wt SH2-Domänen deutlich verringert.

Die erhaltenen Verhältnisse der von den Mutanten präzipitierten Proteine zu denen der wt Domänen entsprechen makroskopisch den auf Immundetektionen von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosylresten basierenden Erwartungen (siehe beispielsweise Abbildung 23).

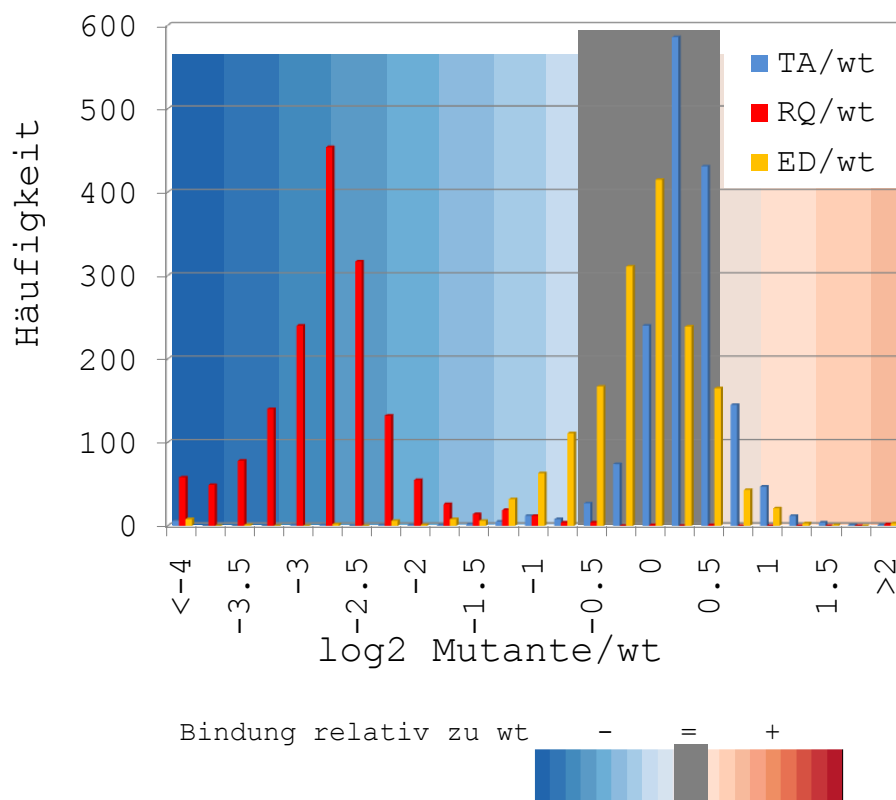


Abbildung 46 Verteilung der log2 Verhältnisse der Proteine, die durch die Mutanten in Relation zum wildtyp präzipitiert wurden.

Die Mittelwerte der Verhältnisse wurden verwendet, für TA/wt wurden sie aus 4, für RQ und ED aus 2 Experimenten berechnet.

5.1. Die R138Q Mutante im Kontext des EGF Signalweges

Von den unterschiedlichen Bindungseigenschaften sind verschiedene Signalwege potentiell betroffen. Am deutlichsten ist der Einfluss der Punktmutation für das R138Q Konstrukt. Um einen Eindruck im Kontext eines Signalweges gewinnen zu können, sind die veränderten Bindungseigenschaften bezüglich der nach der KEGG Datenbank [136-139] am EGF Signalweg beteiligten durch die R138Q Mutante präzipitierten Proteine dargestellt (Abbildung 47). Die Darstellung ist allerdings so vereinfacht, dass beispielsweise im MAPK-Signalweg unter MEK und Erk verschiedene Kinasen zusammengefasst sind und SHP2 gar nicht enthalten ist. Neben den bereits bekannten Interaktionspartnern wie dem EGFR und der FAK wurden auch Proteine wie Grb2 und Erk2 gefunden, deren Wechselwirkung mit den SH2-Domänen von SHP2 nicht bekannt war. Die R138Q Mutante bindet etwa 20-mal weniger EGFR und Grb2 als die wt Domänen. Diese binden auch etwa die 8-fache Menge des Transkriptionsfaktors STAT5. Die regulatorische Untereinheit p85

der PI3K wird von den wt Domänen 5-mal besser als von der RQ Variante gebunden.

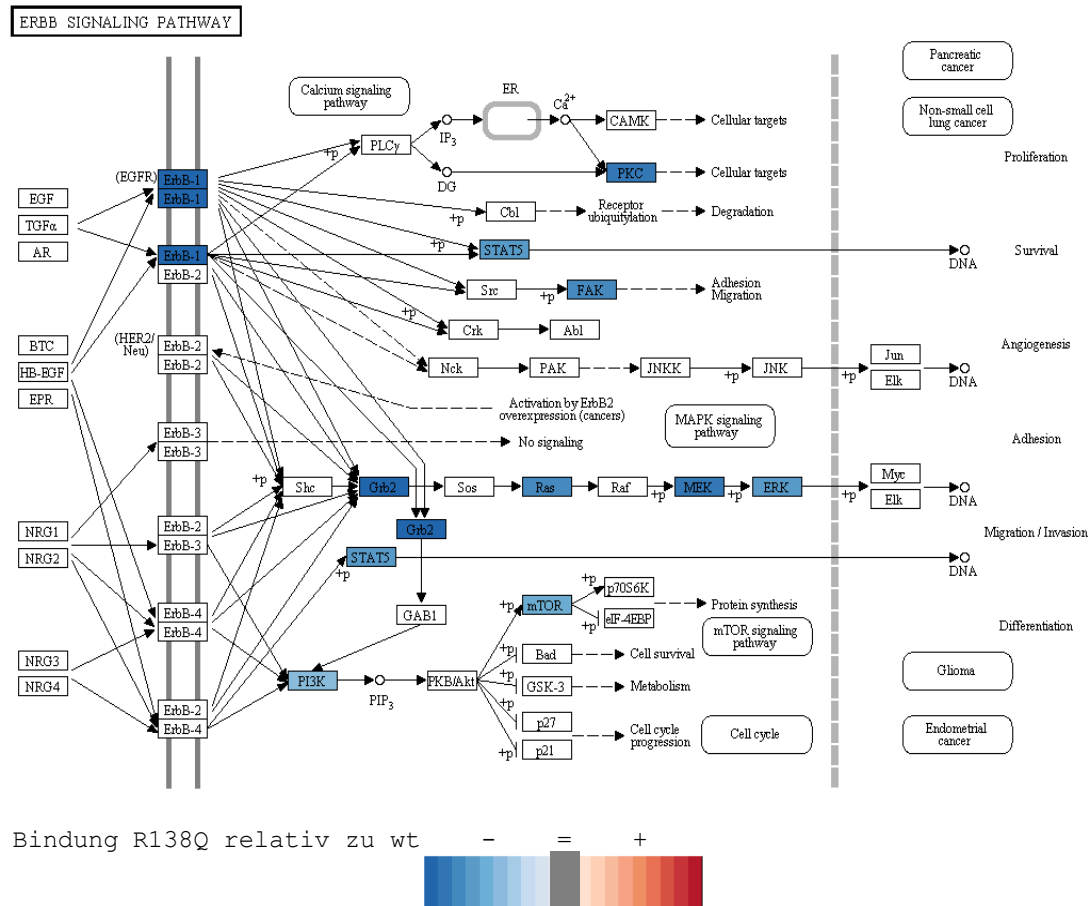


Abbildung 47 Bindung der R138Q Mutante/wt an Proteine im EGF Signalweg
 Nach KEGG sind dem EGF Signalweg die dargestellten Proteine zugeordnet.
 Die in den Experimenten mit der R138Q Mutante gefundenen Verhältnisse für
 die Bindung der Proteine sind als log2 RQ/wt farbig dargestellt, dunkelblau
 entspricht einem log2<-4. Die Mittelwerte wurden aus 2 Experimenten berechnet,
 KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

5.2. Clusteranalyse der Varianten T42A und E139D

Die Clusteranalyse erlaubt die Betrachtung der veränderten Bindung der Proteine an die Mutanten T42A und E139D gegenüber dem wt Konstrukt in Relation zueinander. Die Bindung der Proteine an R138Q wurde hier nicht einbezogen. Von dieser Mutante wurden immer viel geringere Mengen der Proteine präzipitiert als von den wt SH2-Domänen (Abbildung 46).

Die Cluster dienen dazu, die Interaktionspartner nach ihrer Bindung an die Punktmutanten im Vergleich zu der Bindung an die wildtyp Domänen zu gruppieren.

Hierfür wurde zunächst definiert, dass nur die Interaktionen mit einer veränderten Bindung der Mutanten gegenüber den wildtyp Domänen analysiert werden. Als von den Mutanten verändert gebunden wurden die Proteine angesehen, deren Signale entweder weniger als 0,665-mal oder mindestens 1,5-mal so intensiv wie die durch die wt Domänen erzeugten Signale waren. Die Signale dieser Proteine wurden mit Gprox [97] und R Software in *fuzzy means* Clustern [140] analysiert. Die Proteine können hierbei mehreren Clustern zugeordnet sein. Als Referenzpunkt wurde für die wt Domänen ein theoretisches Verhältnis von 1 (damit $\log_2=0$) gesetzt. Anschließend wurden die auf wt normalisierten, durch $\log_2$ transformierten Werte mit der z-Transformation standardisiert. Die Standardisierung ermöglicht es die Tendenzen der Veränderungen zu vergleichen. Die Cluster wurden anhand der standardisierten Werte gebildet. Die 3 Punkte einer Line zeigen die standardisierten, transformierten Werte eines gebundenen Proteins. Die Farbe der Line, die die Punkte verbindet, beschreibt die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit des Proteins zum Cluster. Ein Protein kann auch mehreren Clustern zugeordnet werden.

In Abbildung 46 wurde bereits deutlich, dass ungefähr 1080 der 1606 Proteine nach diesen Kriterien nicht verändert (unreguliert) gebunden werden (Abbildung 46, grauer Bereich). Diese wurden Cluster 0 zugeordnet. Die verbleibenden Proteine wurden 5 Clustern zugeordnet (Abbildung 48), wobei die Anzahl der Cluster willkürlich gewählt wurde. Die Proteine in Cluster 1 werden von der T42A Mutante vergleichbar und der E139D Mutante deutlich schlechter als der wt gebunden. Proteine in Cluster 2 binden deutlich besser an die T42A Variante als an wt und E139D. In Cluster 3 präzipitieren die E139D Konstrukte am meisten des jeweiligen Proteins, hinsichtlich der Bindungseigenschaften der T42A Mutante ist dieses Cluster heterogen. Die Affinität der TA Mutante zu dem jeweiligen Protein in Cluster 4 ist höher als die der wt Domänen, deren wiederum höher als die der E139D Mutante ist. In Cluster 5 wechselwirken die wt Domänen im Vergleich zu beiden anderen Punktmutanten am stärksten mit dem Bindungspartner.

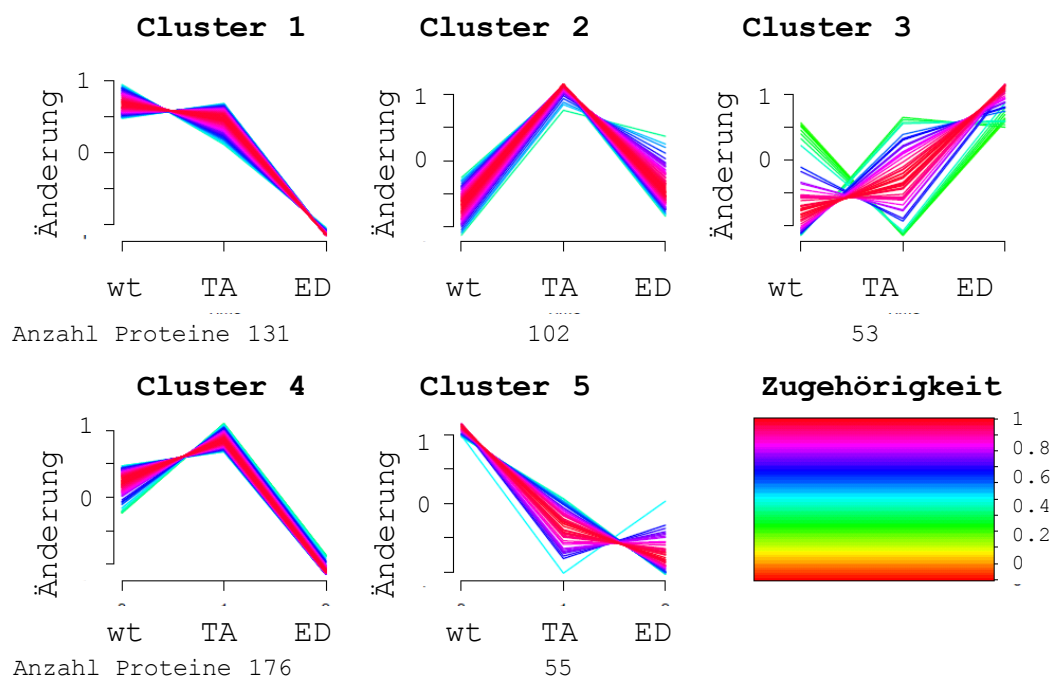


Abbildung 48 Clusteranalyse wt-TA-ED

Vom den wt SH2-Domänen und den Punktmutanten unterschiedlich präzipitierte Proteine wurden mit Gprox und R analysiert. Die Kurven zeigen die standardisierte Veränderung der Bindung der Domänen an ein Protein. Die Werte die eine Kurve bilden stammen von unterschiedlichen Konstrukten und stehen nicht in einer direkten Abhängigkeit zueinander.

Die Farbskala gibt die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu dem entsprechenden Cluster an. Verwendete Parameter für Gprox/R: Regulation außerhalb der Grenzwerte -0,5 und 0,5 (log2 Skala der Verhältnisse), fuzzification 2, 100 Iterationen und eine minimale Zugehörigkeit von 0,2.

Außerdem wurden die Proteine in den Clustern auf statistische Überrepräsentation von nach der KEGG Datenbank [136-139] zugeordneten Eigenschaften gegenüber den unverändert bindenden Proteinen (in Cluster 0) untersucht (Abbildung 49). Hierzu wurde der Fisher-Yates-Test (exakter Chiquadrattest) verwendet. Die Korrektur für multiples Testen der p-Werte zur Reduktion falsch positiver Ergebnisse wurde nach Benjamini und Hochberg durchgeführt [141, 142]. In jedem Cluster finden sich signifikant angereicherte Proteine mit den benannten KEGG Zuordnungen (gelb). In Cluster 3 sind Proteine angereichert, denen ein Einfluss auf Krankheiten wie Alzheimer und Huntington zugeschrieben wird. Proteine, die den Jak/STAT und ErbB Signalwegen zugewiesen sind, sind in Cluster 4 angereichert. Cluster 5 zeigt die Anreicherung von Proteinen, denen eine Funktion im Zusammenhang mit fokalen Adhäsionen und Zelladhäsionsmolekülen zugeordnet wird. An verschiedenen Arten von Krebs beteiligte Proteine finden sich in Cluster 4 und 5.

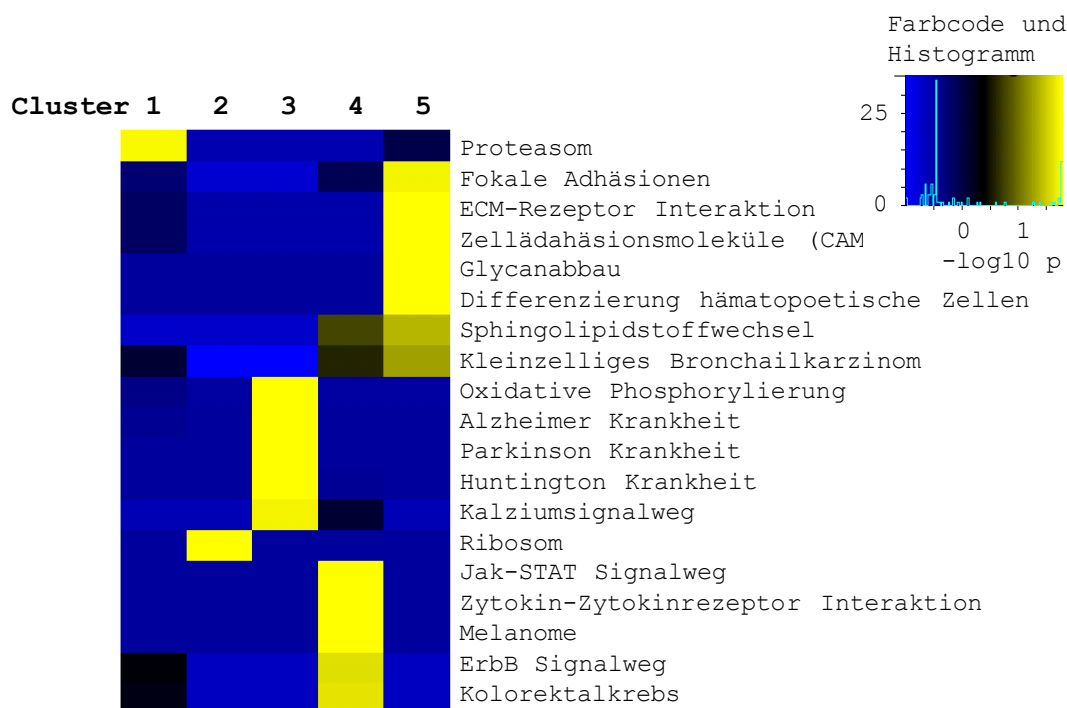


Abbildung 49 Anreicherungsanalyse der Proteine in den Clustern nach ihren KEGG Zuordnungen

Die Proteine in den Clustern wurden mit den unverändert bindenden Proteinen aus Cluster 0 verglichen. Für Gprox/R verwendete Parameter waren: Fisher-Yates-Test, *p*-Wertkorrektur nach Benjamini-Hochberg, Grenzwert für *p*-Werte 0.05, minimales Auftreten 2 und nur die deskriptivsten Beschreibungen.

Die Farben zeigen die innerhalb der Reihen standardisierten negativen dekadischen Logarithmus der *p*-Werte.

Anschließend wurde untersucht, ob in den Proteinen innerhalb der Cluster bestimmte Motive gegenüber dem humanen Proteom angereichert waren. Die Anreicherung definierter Motive könnte für die veränderte Bindung verantwortliche Motive zeigen. Die unverändert bindenden Proteine aus Cluster 0 enthalten Motive, die anteilig etwa 1,2-mal häufiger als im humanen Proteom vertretene sind (Abbildung 50). Die negativ geladenen AS Aspartat und Glutamat sind an verschiedenen Positionen häufig zu finden. Asparaginsäure in einer bestimmten Position findet sich in vier Motiven, Glutaminsäure in 5 Motiven. In zwei Motiven ist Lysin in der N-terminalen Region (Position -6 und -5) zu finden. Insgesamt ist neben dem Tyrosin innerhalb der Motive maximal eine weitere Aminosäure festgelegt. Die weiteren Positionen sind heterogen.

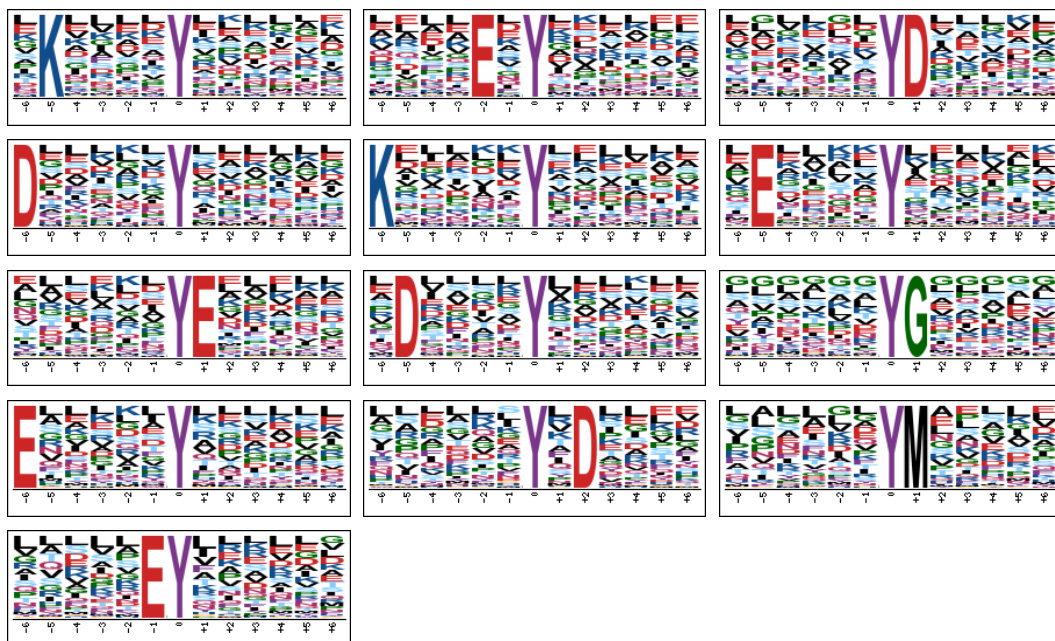


Abbildung 50 In Cluster 0 angereicherte Motive

Die Motive wurden mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> mit folgenden Parametern erstellt: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mind. 10-mal vorkommend, Hintergrund: IPI human, zentrale AS Y, Signifikanz 0,000001

Die Proteine in Cluster 1 und 2 enthielten keine signifikant gegenüber dem humanen Proteom (IPI.human) angereicherten Motive. Dagegen konnten in den anderen Clustern, wie auch für die wt Domänen beobachtet (IV.4.5), mehrere in Relation zur IPI.human Datenbank angereicherte Motive gefunden werden (Abbildung 51). In Cluster 3 ist auffällig, dass in jedem der Motive mindestens ein zusätzliches Tyrosin an einer der Positionen vorkommt. Weiterhin sind die Motive homogener als die in Cluster 0.



Abbildung 51 In Cluster 3 angereicherte Motive

Die Motive wurden mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> mit folgenden Parametern erstellt: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mind. 10-mal vorkommend, Hintergrund: IPI human, zentrale AS Y, Signifikanz 0,000001

In den Cluster 4 zugeordneten Proteinen sind im Vergleich zum humanen Proteom ebenfalls Motive angereichert (Abbildung 52). Wie schon für Cluster 3 ermittelten Motive enthalten auch diese Motive alle neben dem zentralen Tyrosin mindestens ein weiteres.



Abbildung 52 In Cluster 4 angereicherte Motive

Die Motive wurden mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> mit folgenden Parametern erstellt: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mind. 10-mal vorkommend, Hintergrund: IPI human, zentrale AS Y, Signifikanz 0,000001

In den Proteinen, die Cluster 5 zugeordnet waren, konnten gegenüber dem humanen Proteom angereicherte Motive identifiziert werden (Abbildung 53 A). Neben dem zentralen Tyrosin ist auch hier in allen Motiven ein weiteres Tyrosin an einer bestimmten Position enthalten. In einem der Motive sind zusätzlich an zwei Positionen konservierte AS enthalten, Glycin und Valin.

In Cluster 5 ist im Gegensatz zu allen anderen sogar ein Motiv gegenüber Cluster 0 angereichert (Abbildung 53 B), das in 55 Proteinen des Clusters 22-mal enthalten ist. Es enthält zwei konservierte AS, Glycin an der Position -2 und Cystein an der Position +2.



Abbildung 53 In Cluster 5 angereicherte Motive

A: gegenüber dem humanen Proteom

B: gegenüber Cluster 0.

Die Motive wurden mit <http://motif-x.med.harvard.edu/motif-x.html> erstellt.

Parameter: zentrale AS Tyrosin, Motivlänge 13 AS, mind. 10-mal vorkommend,

Hintergrund: A: IPI human; B: Cluster 0, zentrale AS Y, Signifikanz 0,000001.

In diesem Kapitel wurde das Interaktom der Punktmutanten T42A, R138Q und E139D der Tandem SH2-Domänen von SHP2 im Vergleich zu den wildtyp SH2-Domänen untersucht. Mit Hilfe der massenspektrometrisch analysierten Experimente konnte gezeigt werden, dass krankheitsrelevante Punktmutanten der SH2 Domänen sich auf die Interaktionen mit deren Bindungspartnern auswirken können. Besonders deutlich werden die durch eine Punktmutation hervorgerufenen potentiellen Effekte auf die Bindung von anderen Proteinen im Fall des in der C-terminalen SH2-Domäne mutierten R138Q Konstrukts: Es hat zu allen Interaktionspartnern eine leicht bis extrem erniedrigte Affinität. Aber auch die in der C-terminalen SH2-Domäne modifizierte Punktmutante E139D und die Substitution des Thr42 in der N-terminalen Domäne durch Ala wirken sich in veränderten Bindungseigenschaften aus.

V. Diskussion und Ausblick

Die Proteintyrosinphosphatase SHP2 spielt eine regulatorische Rolle bei der Entwicklung höherer Organismen, der Differenzierung und Proliferation von Zellen. Weiterhin wurde im Kontext von Zell-Zellkontakten oder der Migration von Zellen eine Beteiligung von SHP2 gefunden. Nach externen Stimulationen, die durch Wachstumsfaktoren und Zytokine erfolgen können, übt SHP2 einen modulatorischen Einfluss auf die Signaltransduktion aus. Dabei kann SHP2 durch die Aktivität der PTP-Domäne und als Adapter Signalwegen positiv und negativ regulieren. In dieser Arbeit wurden das Interaktom der beiden SH2-Domänen von SHP2 und ausgewählter Punktmutanten charakterisiert.

Die Tandem SH2-Domänen wurden in früheren Studien oft als dominant-negative Version von SHP2 verwendet [143-148]. Wurden sie in Zellen exprimiert, reduzieren sie die Bindung der endogenen Phosphatase an ihre Zielmoleküle und beeinträchtigen damit die Dephosphorylierung von Substraten. Diese Studien implizieren eine wesentliche Bedeutung der SH2-Domänen bei der Rekrutierung der PTP-Domäne zu ihren Substraten. Bei Patienten mit Noonan Syndrom oder JMML wurden diverse Punktmutationen von PTPN11 detektiert [77, 78]), von denen sich die meisten in der Interaktionsfläche der N-terminalen SH2-Domäne mit der PTP-Domäne befinden und daher die Autoinhibition beeinflussen. Allerdings gibt es auch Punktmutationen in der Nähe der SH2-Bindungstaschen. Ausgehend davon wurde folgende Arbeitshypothese entwickelt: Punktmutationen in den SH2-Domänen können die Rekrutierung zu Zielproteinen und somit die Funktion von auch qualitativ SHP2 beeinflussen.

Daher wurde die Rekrutierungsfunktion der wildtyp SH2-Domänen und von krankheitsrelevanten Punktmutanten genauer untersucht. Insbesondere war es hierbei interessant, das Interaktom zu bestimmen, um zum größten Teil noch unbekannte Interaktionspartner zu analysieren.

Die Untersuchung der Bindung von SHP2 an andere Proteine ist aufgrund der enzymatischen Aktivität der PTP-Domäne komplex, da sowohl die SH2-Domänen als auch die katalytisch aktive PTP-Domäne an phosphorylierte Tyrosylreste binden können. Die Bindung der PTP-Domäne ist jedoch sehr transient, da das Substrat nach der Dephosphorylierung nicht mehr bindet. Um dennoch Substrate der PTP zu finden, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *substrate-trapping* Mutanten entwickelt, in denen das Cystein im aktiven Zentrum der PTP gegen ein Serin ausgetauscht wurde [24]. So kann die Dephosphorylierung des Substrats nicht

mehr stattfinden und das phosphorylierte Protein bleibt an die PTP-Domäne gebunden. Diese Konstrukte besitzen demnach allerdings drei verschiedene Bindungsstellen für Moleküle, die phosphorylierte Tyrosine beinhalten. Die zusätzliche Bindungsstelle der PTP-Domäne führt zu einer kombinatorischen Explosion der Anzahl der möglichen Bindungspartner, die keine Fokussierung auf die SH2-Domänen erlauben würde und daher bei der Betrachtung der Interaktionspartner im Kontext dieser Arbeit nicht zielführend wäre. Deshalb wurden die isolierten Tandem SH2-Domänen für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Analysen verwendet. Zusätzlich wurden innerhalb der SH2-Domänen liegende Punktmutationen ausgewählt und analysiert. Die Domänen wurden als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert, so dass sie in großem Überschuss eingesetzt werden konnten. Das bietet weiterhin den Vorteil, dass die Fusionsproteine schnell und einfach aufgereinigt werden können. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten SPR-Messungen erhöht die GST aufgrund ihrer Masse die Signale und verbessert die Unterscheidung zwischen Signalen und Rauschen. Bei der kovalenten Kopplung an Beads für die Präzipitationen der Interaktionspartner kann GST als Verbindung zwischen den Beads und den Domänen fungieren, die SH2-Domänen sind dann exponierter. Diese Herangehensweise wird auch von anderen Arbeitsgruppen für die Untersuchung der Einzeldomänen, der Tandem SH2-Domänen und auch der kompletten SHP2 verwendet [38, 71, 149-152]. Zur Untersuchung von anderen an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen mit SH2-Domänen wurden ebenfalls GST-Fusionsproteine verwendet (beispielsweise GST-Grb2-SH2 [153] und GST-EGFR-SH2 [154, 155]).

1. Die Rolle der SH2-Domänen von SHP2 bei bekannten Interaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Untersuchungen zur Rolle der beiden SH2-Domänen für die Bindung an bekannte Bindungspartner durchgeführt, um zu zeigen, welche der beiden Domänen eine dominantere Rolle bei der Bindung einnimmt.

Hierzu wurde die Bindung von Arginin zu Alanin Mutanten in den SH2-Domänen von SHP2 an immobilisierte Peptide bekannter Interaktionspartner mit SPR-Messungen untersucht (Abbildung 15). In diesen Mutanten war jeweils das zentrale Arginin in der Bindungstasche durch ein Alanin ersetzt. Die positive Ladung des Arginins ist zur Koordination der Sauerstoffatome des Phosphatrests am Tyrosin im bindenden Motiv notwendig. Durch den Austausch des Arginins durch Alanin kann

die Koordination des phosphorylierten Tyrosins nicht mehr korrekt erfolgen und die Bindungsaffinität zu den phosphorylierten Motiven ist gegenüber den nicht mutierten Domänen reduziert. In der N-terminalen SH2-Domäne wurde das Arginin an Position 32 und in der C-terminalen SH2-Domäne Arginin 138 gegen Alanin ausgetauscht. Außerdem wurde eine Doppelmutante verwendet, in der beide Arginine mutiert vorlagen.

Durch die Mutation einer der beiden Domänen wurde die Bindungsstelle für das Peptid entfernt, daher konnte der Einfluss dieser Domäne auf die Interaktionen untersucht werden. Allerdings ist für die Wechselwirkung der einzelnen RA Mutanten von SHP2 mit einem Peptid, das nur einen phosphorylierten Tyrosylrest enthält, aufgrund der Kooperativität der SH2-Domänen keine Reduktion der Komplexität der Interaktionen zu erwarten [59]. Es könnte alternativ zwar vermutet werden, dass der Austausch von Arginin nach Alanin die Bindungsfähigkeit der jeweiligen Domäne nicht drastisch genug reduziert und daher ein direkter Einfluss der mutierten Domäne auf die Bindung sichtbar bleibt. Das ausgetauschte Arginin ist jedoch die einzige invariante AS in allen SH2-Domänen, die für die Bindung und Identifizierung des phosphorylierten Tyrosylrests verantwortlich ist [156]. Alanin dagegen ist nicht positiv geladen und kann somit keine starke Wechselwirkung mit negativ geladenen phosphorylierten Seitenketten haben. Daher ist anzunehmen, dass die Affinität der RA Mutanten zu den phosphorylierten Motiven stark erniedrigt ist und bestenfalls der niedrigen Affinität der zweiten, nicht mutierten wildtyp Domänen zu den unphosphorylierten Motiven entspricht.

Andere Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass die Bindung der Tandem Domänen im Vergleich zu den Einzeldomänen nicht additiv, sondern synergistisch ist [23, 58, 59]. Auch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen auf überlappende Spezifitäten der Domänen schließen und eine Kooperativität zwischen den Domänen vermuten, da das durch die SPR-Messungen dargestellte Bindungsverhalten der RA Mutanten nicht additiv, sondern synergistisch war (Abbildung 15). Den SH2-Domänen kann folglich, je nach Peptid mit dem sie interagieren, eine unterschiedliche Bedeutung zukommen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den SPR-Messungen keine Bindung der SH2-Domänen an pY751 aus dem PDGF-Rezeptor β detektiert werden (Abbildung 15 A), daher diente es als Negativkontrolle. Von einer anderen Gruppe wurde für pY751 gezeigt, dass es Substrat der PTP-Domäne von SHP2 ist [157]

Bei der Bindung von SHP2 an pY759 aus gp130 zeigte sich eine klare Dominanz der C-terminalen Domäne. Dies war sowohl in Experimenten mit den GST-fusionierten SH2-Domänen (Abbildung 15 B, Abbildung 16) als auch bei den Peptidpräzipitationen von in Säugerzellen exprimierten Konstrukten erkennbar (Abbildung 17). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Experimenten, die mit der vollständigen, in Säugerzellen exprimierten SHP2 durchgeführt wurden [158] und resultieren in einem genaueren Modell für die Bindung an gp130: SHP2 bindet mit der C-terminalen SH2-Domäne an pY759. Diese Bindung kann in sowohl in auto-inhibierter als auch in aktivierter Form der SHP2 stattfinden, da die Autoinhibition (Abbildung 54). Die Bedeutung der Bindung von SHP2 an gp130 wurde im Kontext des IL6 Signalwegs bereits demonstriert. Hier wirkt SHP2 erst, nachdem es an pY759 aus gp130 bindet [110]. Die Assoziation mit STAT5 nach der Stimulation Prolaktin ist ein weiteres Beispiel, in dem die C-terminale SH2-Domäne für die Interaktion wichtig und notwendig ist [159].

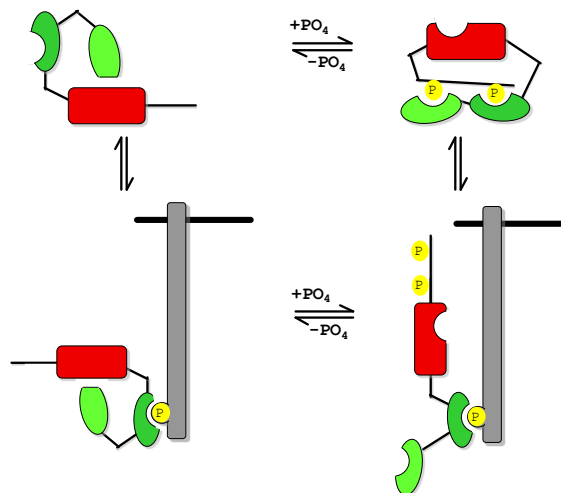


Abbildung 54 Modell für die Bindung von SHP2 an gp130

SHP2 kann unabhängig von ihrer Aktivierung zu gp130 rekrutiert werden. Das gp130 ist in grau, die SH2-Domänen von SHP2 in grün und die PTP-Domäne von SHP2 in rot dargestellt..

Für die Bindung von pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β zeigt sich ein ähnliches Bild, allerdings sind auch entscheidende Unterschiede erkennbar. So spielt die C-terminale Domäne bei der Bindung an pY1009 eine leicht dominantere Rolle als die N-terminale SH2-Domäne. Diese kann aber in diesem Fall auch binden. Typische Affinitätskonstanten von einzelnen SH2-Domänen zu Peptiden liegen im mikromolaren Bereich. Die Affinitäten von Tandem SH2-Domänen zu Motiven mit zwei phosphorylierten Tyrosylresten hingegen können eine Größenordnung

niedriger liegen [23]. In der Literatur wurde jedoch beschrieben, dass die N-terminale SH2-Domäne eine Affinität zu pY1009 im mikromolaren Bereich hat, während keine Bindung der C-terminalen SH2-Domäne detektiert werden konnte [160]. Im Gegensatz dazu haben andere Arbeitsgruppen die Bindung der C-terminalen SH2-Domäne an pY1009 aber beobachtet [150]. Weiterführend wurde für beide einzelnen Domänen eine für die Bindung an pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β ausreichende Affinität im mikromolaren Bereich ermittelt; sie können demnach unabhängig voneinander binden [59]. Für die Bindung der N-terminalen Domäne an pY1009 aus dem PDGF-Rezeptor β liegen zusätzlich sowohl eine Kristallstruktur als auch Molekulardynamiksimulationen vor [65, 66]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte schon bei den Interaktionen mit monophosphorylierten Peptiden das komplexe Zusammenspiel der beiden SH2-Domänen aufgezeigt werden (Abbildung 15). Hierfür sind vermutlich die teilweise überlappenden Spezifitäten der beiden SH2-Domänen mitverantwortlich, da beide Domänen mit pY1009 interagieren können [67]. In Zellen ist die Bindung an das Motiv pY1009 notwendig und ausreichend für die Assoziation von SHP2 an den Rezeptor [68]. Die Verwendung eines Peptides in dem das pY1009 Motiv zweimal vorhanden und durch eine Verknüpfung von 11 Aminosäuren verbunden ist, erhöht die Affinität allerdings nur um Faktor 2, obwohl man aufgrund der Kooperativität eine Erhöhung um eine Größenordnung erwarten würde [23]. Dies impliziert bereits, dass die Verbindung zwischen den Bindemotiven von SHP2 länger sein kann als bei den Motiven der meisten Tandem SH2-Domänen, wie denen der Tyrosinkinase Syk, für die der Abstand zwischen den phosphorylierten Tyrosylresten der Bindungspartner bei ungefähr 10 Aminosäuren liegt. Der Abstand der beiden Bindungstaschen von SHP2 liegt bei über 5 nm, was ungefähr 10 Windungen in einer α -Helix entspricht. Somit wird ein großer Abstand der phosphorylierten Tyrosylreste erforderlich. Durch den großen Abstand der phosphorylierten Tyrosylreste kommt somit neben den Spezifitäten der SH2-Domänen selbst als weiteres Bindungskriterium der Abstand der Phosphotyrosinmotive hinzu. [23, 59]. Damit wird die Spezifität der Tandem SH2-Domänen von SHP2 zu ihren Bindungspartnern weit erhöht und die Dissoziationskonstante kann bei ungefähr 1 nM liegen [56]. Die Motive, an die die SH2-Domänen von SHP2 binden können, müssen zusätzlich auch nicht unbedingt innerhalb einer Peptidkette liegen. So könnten im Fall eines PDGF-Rezeptorhomodimers, das dann zwei pY1009 enthält, auch beide SH2-Domänen jeweils ein pY1009 binden [59].

Andererseits wird die Bindung von SHP2 an den PDGF-Rezeptor β durch das Vorliegen des phosphorylierten Tyrosylrests 763 verstärkt, was diesen Rest als

zweite Bindungsstelle für SHP2 nahelegt [114]. Die Ergebnisse dieser Arbeit, in der die Bindung der wildtyp Domänen und RA Mutanten an dieses Motiv bestätigt wurde, stützen diese Vermutung. Die Bindungen der RA-Mutanten an pY763 scheinen für eine alleinige Rekrutierung der SHP2 nicht stark genug. Daher ist zu vermuten, dass letztendlich beide SH2-Domänen für die Bindung an den PDGF-Rezeptor β notwendig sind. Für eine solche Bindung wäre die aktive (offene) Form von SHP2 mit einer zugänglichen N-terminalen und C-terminalen SH2-Domäne Voraussetzung. Allerdings bieten sich damit viele Kombinationsmöglichkeiten für die Bindung der SH2-Domänen an die beiden Motive pY762 und pY1009 im Homodimer des PDGF-Rezeptor β (Abbildung 55).

Die teilweise widersprüchliche Literatur und die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen neben der Komplexität der Interaktionen auch die Bedeutung des experimentellen Aufbaus.

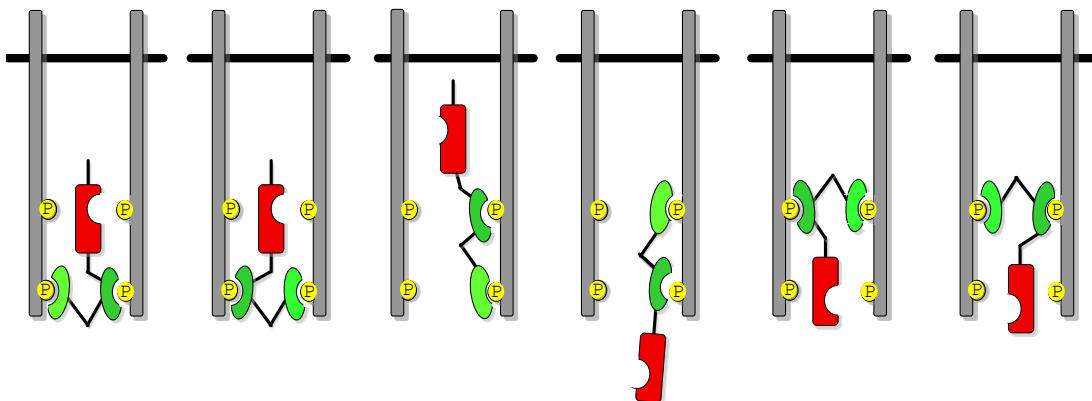


Abbildung 55 Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an PDGF-Rezeptor β

Es gibt viele Möglichkeiten, wie die SH2-Domänen mit den Motiven pY763 und pY1009 im PDGF-Rezeptor β interagieren können.

PDGF-Rezeptor β ist in grau, die SH2-Domänen von SHP2 in grün und die PTP-Domäne von SHP2 in rot dargestellt.

Die bis hierhin diskutierten bekannten Phosphotyrosinmotive wurden zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von SHP2 ausgewählt um festzustellen, ob die Komplexität der Interaktionen erfasst werden kann und die Methode zur Auswahl der krankheitsrelevanten Punktmutanten herangezogen werden kann. Es wird deutlich, dass die Verwendung von monophosphorylierten Peptiden in Kombination mit den Tandem SH2-Domänen Rückschlüsse auf das Verhalten der Domänen in Bezug auf einzelne Motive erlaubt. Mit einzelnen Domänen wäre dies durch das synergistische Verhalten der Domänen nicht möglich gewesen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die C-terminale Domäne eine deutlich größere Rolle spielt, als bisher in der Literatur angenommen wurde. Während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift wurde die Kristallstruktur der nicht auto-inhibierten SHP1 veröffentlicht [61]. Es zeigte sich, dass die C-terminale SH2-Domäne bei der Konformationsänderung von der inhibierten in die aktive Form von SHP1 eine wesentliche Rolle für die Positionierung der N-terminalen SH2-Domäne spielt. Da SHP1 eine hohe Homologie zu SHP2 aufweist, kann für SHP2 ein analoger Mechanismus angenommen werden, was die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiter unterstützt.

Für einige bekannte Interaktionspartner wie gp130 und STAT5 ist die Rekrutierung der Phosphatase-Domäne durch die C-terminale SH2-Domäne an ihre Wirkungsstätte der erste Schritt zur Einflussnahme auf die Signaltransduktion (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, und Abbildung 54). Für die Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor β dagegen sind weiterhin verschiedene Interaktionsmöglichkeiten vorhanden (Abbildung 15, Abbildung 55). Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes könnten zukünftig verschiedene experimentelle Ansätze dienen. Einerseits könnten FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) Experimente *in vitro*, in Lösung oder auf Oberflächen und in Zellen durchgeführt werden. Hierbei könnten für die *in vitro* Untersuchungen niedermolare Fluorophore wie Oregon Green oder Texas Red verwendet werden. Diese könnten über Kopplungschemie (an Cysteinen oder Lysinen) oder kleine Tags, wie Histidintag und ybbRtag, an den beiden interagierenden Proteinen oder Peptiden angebracht werden und die Interaktion sichtbar machen. Für die Untersuchung in Zellen könnten auch fluoreszente Proteine an die SH2-Domänen SHP2 und den PDGF-Rezeptor β fusioniert werden. Die fluorescent markierten Proteine könnten auch für Messungen auf Oberflächen mit totalinterner Reflexionsspektroskopie eingesetzt werden. Hierbei könnten sowohl Proteine in aufgereinigter Form oder auch direkt Zelllysate verwendet werden [162]. Im Weiteren könnten diverse Tyrosin nach Phenylalanin Mutanten Aufschlüsse über den genauen Mechanismus der Interaktion liefern. Zu markierungsfreien Untersuchungen könnte isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) mit verschiedenen Peptiden aus dem zytosolischen Teil des PDGF-Rezeptors β durchgeführt werden.

Häufig wurden in der Literatur auch Komplexe beschrieben, bei denen die Interaktion mit SHP2 durch die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne bestimmt wird. Dies ist jedoch in der inaktiven, auto-inhibierten Form von SHP2 nicht möglich.

Beispielsweise ist die Interaktion der N-terminalen SH2-Domäne bei der Bindung von SHP2 an den Fc γ Rezeptor IIb vergleichbar mit der Bindung von den Tandem Domänen und somit viel stärker als die der C-terminalen [161]. Dies steht nicht im Widerspruch mit den in dieser Arbeit erlangten Daten, sondern zeigt lediglich eine zusätzliche Möglichkeit der Interaktionen mit anderen Proteinen auf.

Zusätzlich müssen die Motive, an die die beiden SH2-Domänen binden, nicht unbedingt in demselben Protein liegen. Da viele der Interaktionspartner noch nicht bekannt waren, war die Untersuchung der Wechselwirkungen der Tandem SH2-Domänen mit allen in einer Zelle vorliegenden Proteinen zur Charakterisierung des Interaktoms naheliegend. Ihre Beschreibung ist ein weiterer Schritt im Verständnis der Funktionsweise von SHP2 und ihrer SH2-Domänen.

2. Die Bindungspartner der wildtyp SH2-Domänen

Zu Beginn dieser Arbeit waren einige Interaktionspartner und Substrate von SHP2 bekannt. Die bis dahin veröffentlichten systematischen Untersuchungen der Interaktionen beruhten jedoch auf artifiziellen Peptidbibliotheken [163-166]. Aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten der beteiligten Aminosäuren bilden diese oft nur Teilbereiche des in Zellen exprimierten Proteoms ab. Oft haben sie das Ziel, optimale Bindungsmotive zu beschreiben und untersuchen die Auswirkungen von Aminosäureaustauschen an einer bestimmten Position. Die so identifizierten Motive sind aber nicht zwangsläufig auch im Proteom zu finden. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit kam sogar zu dem Ergebnis, dass SH2-Domänen häufig nicht als Bindungspartner der beschriebenen optimalen Sequenzen im Proteom detektiert werden können [167]. In Zellen durchgeführte Analysen spezifisch interagierender Proteine wurden in der Vergangenheit oft in unkomplexeren Systemen wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Hierfür wurde oft die *yeast two-hybrid* Methode (allg. [168], optimiert für pY abhängige Interaktionen [169]) angewandt (SHP2 z. B. [170, 171]). Andere Studien lieferten meist voreingenommen nur einzelne stabil bindende Proteine, die anschließend mit Immundetektionen analysiert wurden [172-174]. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden zahlreiche auf ausgewählten Peptiden beruhende Interaktionsstudien veröffentlicht [132, 134, 167, 175-179]. Davon wurde eine Studie mit diversen SH2-Domänen aus verschiedenen Proteinen durchgeführt, in denen eine systematische Untersuchung hinsichtlich des Vorkommens der Motive in Zellen vorausging [175]. Anschließend wurden Peptide verwendet, die aus den

bioinformatischen Analysen von in Zellen existierenden Motiven mit phosphorylierten Tyrosylresten resultierten. Erstaunlicherweise konnte SHP2 nicht als Bindungspartner von allen vorhergesagten Peptiden detektiert werden. Allerdings wurden die Peptidpräzipitationen mit Lysaten aus unstimulierten Zellen durchgeführt, in denen SHP2 vermutlich zum größten Teil in der inaktiven Form mit einer nicht zugänglichen N-terminalen SH2-Domäne vorliegt. Zur Analyse spezifischer, von phosphorylierten Tyrosylresten der EGF-Rezeptorfamilie abhängigen, Interaktionen mit nahezu allen bekannten SH2- und PTB-Domänen wurden Microarrays mit kurzen Peptiden durchgeführt [180]. Es bleibt jedoch fraglich, inwiefern hierdurch tatsächlich Rückschlüsse auf die Interaktionen mit nativen Proteinen möglich sind. So wurde kürzlich für die Wechselwirkung der N-terminalen der Tandem SH2-Domänen von PLC γ mit FGFR1 gezeigt, dass für deren Selektivität neben der klassischen Bindungsstelle eine zweite phosphorylierungsunabhängige Interaktion notwendig ist. Diese konnte nur in Experimenten mit Proteinen, nicht in denen mit Peptiden erfasst werden [181]. Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel zu erforschen, mit welchen Proteinen die SH2-Domänen von SHP2 wechselwirken können. Sie berücksichtigt im Gegensatz zu den zuvor genannten Publikationen das gesamte Proteom der HeLa Zellen als potentielle Bindungspartner. Da nur die SH2-Domänen untersucht werden, entfällt die Autoinhibition und stört damit auch nicht.

Die experimentellen Bedingungen für massenspektrometrische Experimente wurden in dieser Arbeit mittels der Immundetektion von phosphorylierten Proteinen etabliert und optimiert. Die Immobilisierung der GST-Fusionsproteine an magnetische Beads erlaubte die Präzipitation von Interaktionspartnern aus Zelllysaten. Immundetektionen der präzipitierten Proteine mit Antikörpern, die gegen Phosphotyrosin gerichtet sind, gaben Auskunft das ungefähre Molekulargewicht der präzipitierten Proteine (Abbildung 23, Abbildung 25 C und Abbildung 29). Außerdem konnte bestätigt werden, dass die Bindung an die SH2-Domänen in Abhängigkeit von phosphorylierten Tyrosylseitenketten erfolgte (Abbildung 24). Offen blieb aber die Frage, welche Proteine präzipitiert wurden. Daher wurden Zellen metabolisch mit stabilen Isotopen der Aminosäuren Arginin und Lysin markiert und massenspektrometrische Analysen der von den SH2-Domänen präzipitierten Proteine durchgeführt. Diese Experimente gaben Auskunft über die Identitäten der Proteine, die im Immunblot nachweisbar waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1925 Proteine identifiziert, die direkt mit den SH2-Domänen von SHP2 interagieren können. Sie setzen sich aus 1443 in den

Depex und 1505 in den Komplex nachgewiesenen Proteinen zusammen. Mehr als 1000 dieser Proteine wurden mit beiden experimentellen Ansätzen gefunden.

Die Anzahl dieser Proteine erscheint zunächst extrem hoch, ist aber auf die experimentellen Bedingungen zurückzuführen. Sie wurden zur Verfolgung des Ziels, einer möglichst vollständigen Beschreibung der Interaktionspartner, optimiert. Zuerst werden nun die technischen Aspekte besprochen:

Der Verdau mit Trypsin und Lys-C führt zu einem vollständigeren Verdau der Proteine als der jeweilige Einzelverdau. Nach dem vollständigem Verdau liegt die durchschnittliche Peptidlänge bei etwa 8 Aminosäuren, wodurch die Peptide aufgrund ihrer Größe besser detektiert werden können. Lys-C spaltet Proteine C-terminal zu Lysin. Bei dem Verdau mit Trypsin entstehen Peptide, an deren C-terminalen Ende sich entweder Arginin oder Lysin befindet [183]. Die metabolische Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen dieser beiden Aminosäuren ermöglicht somit sowohl eine höhere Identifizierungsrate als auch eine zuverlässigere Quantifizierung der Proteine. Außer an den ursprünglichen C-Termini der Proteine sollte sich am C-terminalen Ende jedes Peptids eine markierte Aminosäure befinden. Obwohl Arginin eigentlich nicht essentiell für humane Zellen ist, kann es in der Zellkultur für die Markierung humaner Zelllinien verwendet werden [184-186]. Im Verlauf der weiteren Probenvorbereitung wurden die resultierenden Peptide mit der OFFGEL-Apparatur durch isoelektrische Fokussierung fraktioniert [104]. Dies ist eine alternative Methode zur Fraktionierung der Proteine in einem eindimensionalen Gel und dem anschließenden Verdau im SDS-Gel. Hubner et al. haben gezeigt, dass nach dem Verdau der Proteine in Lösung und der anschließenden Auftrennung durch IEF bei gleicher Probenmenge etwa ein Drittel mehr Proteine identifiziert werden kann als nach dem Verdau der Proteine im SDS-Gel. In dieser Arbeit wurde eine genauso gute Fraktionierung erreicht.

Eine weitere Voraussetzung für eine hohe Identifizierungsrate ist ein Massenspektrometer mit hoher Sensitivität und hoher Auflösung. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde eine LTQ-Orbitrap verwendet, die im Vergleich zu älteren Modellen zuverlässige Identifizierungen aus komplexen Mischungen ermöglicht, indem eine lineare in Kombination mit einer elektrostatischen Ionenfalle als Massenanalysator verwendet wird. Aufgrund dessen können innerhalb eines hohen dynamischen Bereiches schnell sehr präzise Daten gewonnen werden [187-191]. Seit ihrer kommerziellen Einführung in 2005 haben sich die LTQ-Orbitraps daher für proteomische Analysen etabliert [5, 103].

Neben den technischen Details ist natürlich auch das biochemische Design der Experimente ausschlaggebend für die Menge der erwarteten Interaktionen. Im Zuge dieser Arbeit wurden Zellen mit verschiedenen Stimuli inkubiert, um anschließend Bindungspartner identifizieren zu können. Physiologische Stimuli lösen nur die Phosphorylierung einer begrenzten Menge von Proteinen aus (Abbildung 21). So wurde beispielsweise die Untereinheit p85 der PI3K nicht nach allen Stimuli als Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP2 gefunden. Um einen möglichst vollständigen Überblick über die Interaktionen der SH2-Domänen zu bekommen, wurden die Zellen daher mit Pervanadat behandelt. Dies führt zur Inhibition aller Proteintyrosinphosphatasen, was je nach Konzentration und Inkubationszeit des Pervanadats zu einem drastischen Anstieg der Phosphorylierung von Tyrosylseitenketten vieler Proteine führt, die in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielen [192-195]. Die Inkubation von Zellen mit Pervanadat hat gegenüber Peptidbibliotheken und in vitro Phosphorylierungen von Peptiden durch Kinasen den Vorteil, dass nur in der Zelle für Kinasen zugängliche Tyrosylreste phosphoryliert werden, da das Gleichgewicht der Reaktionen von Kinasen und Phosphatasen in Zellen durch die Inhibition der Tyrosinphosphatasen verschoben wird. In den Lysaten sind folglich nach der Inkubation mit Pervanadat extrem viele phosphorylierte Proteine vorhanden, die dann auch detektiert werden.

Nach der Lyse der Zellen wurde das gesamte Proteom ohne Fraktionierung für die Präzipitationen verwendet. Die Regulation der Bindung könnte in Zellen im Gegensatz zu den durchgeführten Experimenten auch über die zelluläre Lokalisation erfolgen [4]. In dieser Arbeit lag der Fokus jedoch darauf herauszufinden, an welchen Prozessen SHP2 mitwirken kann. In zukünftigen Analysen könnten nach Organellen fraktionierte Proben detailliertere Informationen liefern.

Da die Wechselwirkung der Domänen mit anderen Proteinen auf einer linearen Sequenz beruht, konnte durch die Denaturierung der Proteine in den Lysaten die Konkurrenz mit anderen Proteinen und der endogenen SHP2 verhindert werden. Zusätzlich führt die Denaturierung zu einer höheren Zuverlässigkeit der direkten Assoziation der gefundenen Proteine mit den Domänen, da indirekte Interaktionen vermieden werden. Die Expression der Domänen in Zellen (Abbildung 17) würde aus mehreren Gründen keine Denaturierung erlauben, einerseits würden auch die Domänen denaturiert. Weiterhin verändert die Expression der Domänen in Zellen aufgrund ihrer dominant negativen Wirkung die Effekte der Inkubation mit Pervanadat und resultiert in einer global schwächeren Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist es für die später durchgeführten Experimente wichtig,

dass Mutanten mit einer geringeren Affinität als das wildtyp Protein in der Lage sind, die endogene SHP2 zu verdrängen. Ansonsten müsste die endogene SHP2 durch Verwendung von Zellen mit konditionellem *knock-out* oder mit siRNA eliminiert werden. *Knock-out* Mäuse sehen nicht zur Verfügung, da diese bereits im Uterus aufgrund von Entwicklungsstörungen sterben [41].

Bei der Betrachtung der hohen Anzahl der Interaktionspartner ist weiterhin zu beachten, dass wegen der Denaturierung in den hier gezeigten Experimenten aber auch Bindungen möglich werden, die in der Zelle üblicherweise durch die Bindung anderer Proteine unterbunden werden würden. In Zellen konkurriert SHP2 bei der Bindung an pY759 aus gp130 beispielsweise mit SOCS3 [196].

In dieser Arbeit wurde zuerst die Spezifität der Interaktionen der wt SH2-Domänen untersucht. Die Abhängigkeit der Interaktionen von phosphorylierten Tyrosylresten wurde zunächst in den Depex sichergestellt (vergl. Kapitel 4.3). Die Dephosphorylierung der Proteine vor der Präzipitation reduzierte die Menge der, an die SH2-Domänen gebundenen Proteine, deutlich. Allgemein wird für Interaktionen von SH2-Domänen eine Abhängigkeit von Motiven mit phosphorylierten Tyrosylresten angenommen. Da dies in den Depex bestätigt wurde, wird das Vertrauen in die erhaltenen Ergebnisse erhöht. Die Komplex zeigen die Spezifität der Bindung durch Konkurrenz mit einem bekannterweise interagierenden Peptid (siehe Kapitel 4.4). Die Reduktion der Bindung in Anwesenheit eines relevanten Peptids demonstriert hierbei, dass die Bindung über die SH2-Bindungstaschen stattfindet.

Die Kombination der Ergebnisse aus den Depex und Komplex zu einer Referenzliste mit 1925 potentiellen Interaktionspartnern ist darin begründet, dass manche Proteine in der einem der experimentellen Ansätze nicht detektiert wurden. Dies bedeutet aber nicht, dass die Interaktion nicht spezifisch ist. Die Analyse der bekannten Interaktionspartner in beiden Ansätzen zeigt, dass diese sich ergänzen (Tabelle 12). Daher wurde nicht ausschließlich die Schnittmenge berücksichtigt.

Während der Anfertigung dieser Dissertation wurde eine Interaktionsstudie veröffentlicht, bei der ähnlich den hier vorliegenden Experimenten mit an Beads immobilisierten Antikörpern Interaktionspartner aus mit stabilen Isotopen von Aminosäuren markierten Lysaten präzipitiert wurden [182]. Darin wurden in messzeitintensiven Versuchsreihen sogar apparente Bindungskonstanten der Wechselwirkung zwischen dem Antikörpern und seinen Interaktionspartner

bestimmt. Analog wäre es spannend in zukünftigen Experimenten die apparenten Konstanten des Interaktoms der SH2-Domänen zu bestimmen.

2.1. Zuordnungen der identifizierten Bindungspartner

In der der GO Datenbank werden Proteinen Lokalisationen, molekulare Funktionen und Beteiligungen an biologischen Prozessen zugeordnet.

Zunächst wurden die zugeordneten **zellulären Lokalisationen** der 1925 identifizierten Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP2 analysiert. Wie bereits erwähnt, sind aufgrund der Lyse und Denaturierung in den Proben keine intakten Organellen mehr enthalten. Alle Proteine in der Zelle sind dadurch für die SH2-Domänen erreichbar, es liegt keine räumliche Trennung mehr vor.

Aber selbst wenn intakte Organellen enthalten sind, muss sich das Protein von Interesse nicht in allen Lokalisationen befinden können in denen die Interaktionspartner sich aufhalten können. Daher ist bei der Analyse der Lokalisation (Abbildung 35) der von den SH2-Domänen präzipitierten Proteine zu beachten, dass die endogene SHP2 sich nicht zwangsläufig ebenfalls in allen diesen Lokalisationen befinden können muss. Beispielsweise wäre es zusätzlich denkbar, dass die Dephosphorylierung durch SHP2 auch zu einer Änderung der Lokalisation der Bindungspartner führen oder die Bindungspartner durch andere Interaktionen in ein anderes Kompartiment überführt werden könnten.

Die Analyse der Interaktionspartner auf ihre in der GO Datenbank zugeordneten Lokalisationen demonstrierte, dass sich über 80% der Proteine im Zytoplasma befinden können. Auch SHP2 selbst ist diese Lokalisation in der Datenbank zugeordnet. Viele der von SHP2 beeinflussten Prozesse, finden in der Nähe von Membranen statt. So können beispielsweise SIRP α und PZR SHP2 zur Membran rekrutieren [48, 64], wo die Aktivierung von SHP2 stattfinden kann. Aufgrund dessen wird erwartet, dass sich viele der Bindungspartner auch dort aufhalten können.

Außerdem sind über die Hälfte der interagierenden Proteine auch im Nukleus zu finden, Interaktionen von SHP2 mit Transkriptionsfaktoren wie STAT1 [197] sind bekannt. Aber sogar SHP2 selbst kann sich im Nukleus befinden [159, 198]. Die Translokation von SHP2 in den Nukleus erfolgt nach der Stimulation mit Prolaktin abhängig von der Assoziation mit STAT5 im Zytoplasma [159]. Allerdings wurde SHP2 in diesen Studien nach transients Transfektion überexprimiert. Eine vergleichbare Situation ist auch in Zellen von Patienten mit Leukämien zu finden, da eine höhere Expressionsrate von SHP2 vorliegen kann [199]. Daher wäre es

interessant zu klären, wann und ob die Translokation dieser Phosphatase in den Nukleus auch in Patientenzellen oder ohne Überexpression stattfindet.

Über 20% der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP2 sind dem Mitochondrium zugeordnet. Es wurde bereits beobachtet, dass sich SHP2 in Mitochondrien befinden kann [200]. Die Expression von konstitutiv aktiver SHP2 führt in Epithelzellen zu einer erhöhten Cytochrom C Oxidase Aktivität [201], was die Autoren auf die Dephosphorylierung der Cytochrom C Oxidase durch SHP2 im Intermembranraum der Mitochondrien schließen ließ. Eine weitere Studie zeigte die Abhängigkeit dieser Beobachtung von der Art des Gewebes. SHP2 konnte in Mitochondrien aus Gehirnen, aber nicht in Mitochondrien aus Muskeln, Leber oder Niere nachgewiesen werden [202]. Dies deutet an, dass die Regulation von SHP2 abhängig vom Zelltyp auch durch die Lokalisation stattfinden kann.

Die **molekularen Funktionen** der Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP2 decken ein breites Spektrum ab (Abbildung 37), was hinsichtlich der Funktionen selbst im Einklang mit der Literatur steht. Verwunderlich sind dennoch einige der Häufigkeiten der zugeordneten Funktionen. Die Bindung von Proteinen setzt laut der GO-Definition eine selektive, nicht kovalente Interaktion voraus. Entsprechend sollten alle Proteine, die als Bindungspartner der SH2-Domänen gefunden wurden der Zuordnung „Proteinbindung“ zuzuordnen sein. Tatsächlich liegt sie aber bei nur 80%. Auch die Zuordnung Signaltransduktion war nur bei 15% der Proteine vorhanden, was durch unvollständige Zuordnungen erklärbar sein kann, aber auch einen Hinweis auf die Beteiligung von SHP2 an anderen Prozessen liefert. Die Anzahl der Enzyme hingegen liegt mit etwa 70% aufgrund der bekannten Interaktionen im Rahmen der Erwartung. In Kombination mit der Lokalisation in der Nähe von Membranen wird die bekannte Beteiligung von SHP2 an frühen Prozessen der Signaltransduktion reflektiert, da knapp 10% der Interaktionspartner Rezeptoren sind.

Im Überblick zeigt die Klassifizierung der Proteine des Interaktoms der SH2-Domänen nach ihrer **Beteiligung an biologischen Prozessen** wieder ein breites Spektrum (Abbildung 36). In diesem befinden sich im Zusammenhang mit SHP2 lange etablierte Prozesse, wie die Antwort auf Stimulation, Zellkommunikation, Differenzierung und Entwicklung. Allerdings werden diese Prozesse jeweils weniger als der Hälfte der interagierenden Proteine zugeschrieben. Dies könnte auf weitere unerforschte Beteiligungen in biologischen Prozessen hinweisen. Zunächst

überraschenderweise wurde den meisten der identifizierten Proteine (über 80%) die Beteiligung an metabolischen Prozessen zugeordnet. Die Funktion von SHP2 in der Stoffwechselregulation ist bisher kaum untersucht. Einer der identifizierten Bindungspartner der SH2-Domänen ist die CoA Synthase (CoASy), ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese des im Energiestoffwechsel wichtigen Cofaktors Acetyl-CoA. Eine Studie zeigte den positiven Einfluss der Dephosphorylierung der CoASy durch SHP2 auf die Aktivität dieser Synthase [203]. In dieser Arbeit konnten weiterhin auch Enzyme der Glykolyse als Bindungspartner der SH2-Domänen identifiziert werden. Unter ihnen befinden sich die Pyruvatkinase und eine Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase (PDE E2 Komplex). Die Wechselwirkung von PDE E2 mit dem Transkriptionsfaktor Stat5 im Mitochondrium [204] wurde in leukämischen T-Zellen und nach Zytokinstimulation gezeigt. Auch im Nukleus wurden Komplexe aus beiden Proteinen gefunden [205]. Wie bereits erwähnt, kann SHP2 mit STAT5 assoziieren und in den Nukleus translozieren [159]. Hier sollte zukünftig untersucht werden, ob ein Komplex aus allen drei Proteinen vorliegt und dieser als Transkriptionsfaktor agiert. Die Kategorie der metabolischen Prozesse in der Datenbank beinhaltet allerdings neben Anabolismus und Katabolismus alle Reaktionen, in denen chemische Substanzen transformiert werden. Daher sind auch die Einführung und Entfernung posttranslationaler Modifikationen in dieser Gruppe eingeschlossen, welche aber auch in der Kategorie Regulation beinhaltet sind. Diese ist nur etwa 50% der interagierenden Proteine zugeordnet, obwohl sie die bisher von vielen Arbeitsgruppen untersuchte Funktion von SHP2 ist. Dies könnte in dem Fehlen der PTP-Domäne in den Experimenten begründet sein. Das würde das Modell stützen, in dem die SH2-Domänen nicht notwendigerweise an die Substrate binden, sondern auch als Adapter fungieren können, um andere Proteine in räumliche Nähe zueinander zu bringen. So dass zusätzlich auch andere in den Komplexen, aber nicht von den SH2-Domänen direkt, gebundene Proteine als Substrate der PTP-Domäne dienen können. Diese wichtige Funktion als Adapter wurde bisher wenig untersucht. Die Expression der SH2-Domänen in Zellen [115] veränderte die durch SHP2 beeinflussten Signalwege nach Stimulation mit IL6 erheblich. Die Einwirkung der Domänen basiert auf der partiellen Verdrängung der endogenen SHP2 und sollte in zukünftigen Studien auch im Kontext anderer Stimuli und Zellarten detaillierter untersucht werden.

Zusammenfassend sind die Zuordnungen der Interaktionspartner im Einklang mit der Literatur und liefern neue Ansatzpunkte für weitere Studien. Eine genauere Untersuchung der in dieser Arbeit identifizierten Wechselwirkungen von SHP2

könnte beispielsweise im Kontext der Glykolyse, des MAPK Signalweges oder von Zell-Zell-Kommunikation erfolgen.

2.2. Im Interaktom enthaltene Motive

SH2-Domänen wechselwirken mit linearen Motiven, die einen phosphorylierten Tyrosylrest enthalten [20]. Um diese Motive zu bestimmen wurden schon zahlreiche Studien durchgeführt. Im Allgemeinen sind für die Bindung der Tandem SH2-Domänen von SHP2 jeweils die Aminosäurereste -2 bis +5 um einen phosphorylierten Tyrosylrest wichtig [56, 65], aber auch die Seitenkette der AS in der Position +6 ist für die Spezifität mitverantwortlich [132]. Wie auch im Fall des Adapterproteins SH2D1A [206] können die N-terminal der Tyrosylseitenkette gelegenen Aminosäuren die Kontaktfläche des Liganden mit der SH2-Domäne vergrößern [56]. Die Relevanz der dem phosphorylierten Tyrosylrest N-terminal liegenden Positionen für die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne von SHP2 wurde ebenfalls untersucht [134, 161, 207]. Von einer Arbeitsgruppe wurde eine besondere Bedeutung der Aminosäure in der Position -2 gezeigt, indem keine Bindung von SHP2 an Proteine (FcγIIb und p58) mehr detektierbar war, wenn deren Sequenz durch Mutation von Isoleucin oder Valin in der Position -2 zu Alanin verändert wurde [208]. Die N-terminale SH2-Domäne von SHP-2 bindet mit hoher Affinität an mehrere Peptide mit verschiedenen Konsensussequenzen [177], für die Bindung der C-terminalen SH2-Domäne von SHP-2 haben in der gleichen Arbeit nur Peptide mit einer Konsensussequenz gebunden [177]. In einer anderen Analyse wurde keine hochaffine Bindung der C-terminalen SH2-Domäne in Abhängigkeit der Aminosäurereste -5 bis -1 gefunden. In [165] konnten ebenfalls keine Bindungen der C-terminalen SH2-Domäne detektiert werden. Es wurden in den Peptiden der letztgenannten Studie allerdings nur die Aminosäuren nach dem Tyrosin variiert und ausschließlich Peptide verwendet, die N-terminal des Tyrosylrests die Sequenz GEGpY enthielten. Daher weisen diese Ergebnisse indirekt auf eine Bedeutung der Aminosäuren in den Positionen -3 bis -1 hin. In einigen Arbeiten wurden Konsensussequenzen der an die SH2-Domänen von SHP2 bindenden Motive ermittelt, eine Übersicht der resultierenden Motive für die beiden Domänen ist in Tabelle 13 zusammengestellt. Die erhaltenen Sequenzen variieren je nach Aufbau der verwendeten Peptidbibliothek.

Tabelle 13 In der Literatur beschriebene Motive

-5	-4	-3	-2	-1	pY	+1	+2	+3	+4	+5	+6	Ref
HF	x	V	x	TSA		IV	x	VILP				[165]
						STAVI	x	VIL	x	WF		[209]
												[207]
									WYMI	FHWY	PGRHAins	[132]
						TVA	x	IVLf				[163, 177]
						ILVAt	NAdi	LPVITA				[67]
						yr	IL	X				[177]
						LMT	Y	APTSg				[177]
						FM	x	P				[177]
						VLI	x	LM	LM			[134]
						AYST		IVI	IL	Wfi		[209]
						Astv	x	Ivl				[163]
						TV	IL	ILVP				[164]
									WRHY	HRwfym	RHYg	[132]
						VALi	N	LVi				[163]
						Astv	x	Ivl				[67]
						VITLSE	DM	IMVA	M			[134]

Die Aminosäuren an den Positionen relativ zum phosphorylierten Tyrosylrest pY sind mit dem Einbuchstabencode dargestellt. Sind die Aminosäuren in kleinen Buchstaben geschrieben, ist die Präferenz geringer als für die in großen Buchstaben dargestellten Aminosäuren. Wenn keine Präferenz gefunden wurde, ist die Position mit x gekennzeichnet. Die oberen Konsensusmotive beschreiben die Wechselwirkung mit der N-terminalen SH2-Domäne, die unteren die mit der C-terminalen SH2-Domäne von SHP2.

Insgesamt haben die SH2-Domänen von SHP2 teilweise überlappende Spezifitäten mit den SH2-Domänen in anderen Proteinen, beispielsweise mit SHP1 [177] oder SOCS3 [196]. Die SH2-Domänen von SHP1 und 2 bevorzugen in Bestätigung von [208] einen hydrophoben Aminosäurerest in der Position-2 (L, I, V T) [177]. Sie zeigen aber manchmal auch entscheidende Unterschiede an bestimmten Positionen, SHP2 bevorzugt I in der +3 Position während SHP1 eine Präferenz für L zeigt [163].

In dieser Arbeit wurden die beiden SH2-Domänen zusammen und nicht isoliert betrachtet. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen, in den identifizierten Proteinen enthaltenen Motive (Abbildung 38) sind im Vergleich zu anderen veröffentlichten (Tabelle 13) sehr heterogen. So könnte die Bindung der einen Domäne durch die räumliche Nähe, die Bindung der anderen Domäne auch an Motive mit niedrigerer Affinität erlauben. Andererseits kann die Heterogenität auch darin begründet sein, dass natürlich in den Sequenzen der Interaktionspartner viele Tyrosylreste enthalten sind. Da leider noch keine vollständige Charakterisierung der in Zellen vorliegenden phosphorylierten Tyrosylseitenketten vorliegt, wurden in die Analyse

alle in den Sequenzen der Interaktionspartner enthaltenen Tyrosylreste einbezogen. Diese müssen nicht an der zugänglichen Oberfläche der Proteine liegen und werden möglicherweise gar nicht phosphoryliert. Außerdem befinden sich oft mehrere phosphorylierbare Tyrosylreste in einem Protein, beispielsweise 14 im EGF-Rezeptor β und 6 in p85 β der PI3K [210].

Die mit SMALIsite [134, 135] vorhergesagten Motive (Abbildung 39) beruhen auf den Daten in [134] und wurden aus Sequenzen der Aminosäurereste -6 bis +6 um den potentiell phosphorylierten Tyrosylrest erstellt. Daher sind die Motive insgesamt weniger heterogen und haben ein größeres Verhältnis von Signalen zum Hintergrund als die in Abbildung 38 gezeigten Motive. Im Vergleich der Konsensussequenzen in Tabelle 13 mit Abbildung 39 sind ähnliche Motive zu erkennen.

Die isolierten N-terminale SH2-Domäne konnte in einer Studie an beinahe alle getesteten Motive binden [134], daher die Spezifität der Interaktionen dieser SH2-Domäne relativ zu sehen [134, 167]. Die Bewertung der Qualität der angereicherten Motive ist sowohl bei der Verwendung von Peptidbibliotheken als auch dem Proteom immer noch eine Herausforderung. In zukünftigen Experimenten sollte folglich die Frage, an welche im Proteom vorhandenen Motive die SH2-Domänen von SHP2 binden, adressiert werden. Basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenen Proteinen können Experimente geplant werden, in denen die Proteine vor der Präzipitation verdaut werden, so dass die Motive aus kleineren Sequenzbereichen direkt bestimmt werden könnten. In diesem Fall wäre kein vollständiger Verdau anstrebenswert, damit die resultierenden Peptide lang genug für die Interaktion mit den SH2-Domänen sind. Da die anschließende Identifizierung dann ausschließlich auf den an Tyrosylresten phosphorylierten Peptiden beruhen würde, müssten jedoch deutlich höhere Mengen der Domänen und der verdauten Lysate eingesetzt werden. Nachfolgende Analysen könnten weitere Kombinationen von experimentellen Ansätzen mit bioinformatischen Strategien beinhalten. Sie könnten beispielsweise zur Beantwortung der Frage dienen, welche Tyrosine in den Proteinen tatsächlich phosphoryliert vorliegen und damit für weitere Bindungsstudien interessant sind. Auch die Bestimmung der Motive nach verschiedenen Stimulationen der Zellen sollte in zukünftigen Studien durchgeführt werden.

Ein anderer Ansatz wurde von Miller et al. durchgeführt [175]. Dort wurde zuerst mit bioinformatischen Analysen und Datenbanksuchen eingegrenzt, in welchen laut GO Zuordnungen gebildeten Gruppen von Proteinen das im Fall von SHP2 anhand von Peptidbibliotheken in [165] erstellte Motiv enthalten ist. Es wurde eine Sequenz gewählt, die repräsentativ die Bindung an Proteine der jeweiligen GO Gruppe bestätigen sollte. Anschließend wurden aus Lysaten Peptidpräzipitationen mit den ausgewählten Peptiden durchgeführt. Diese bieten den Nachteil, dass wieder nur eine eingeschränkte Auswahl von gewählten Peptiden verwendet wurde. Ein Vorteil ist die Verwendung physiologisch relevanter Peptide. Konnte ein Protein aus den Lysaten präzipitiert werden, wurde geschlossen, dass dieses präzipitierte Protein an alle Proteine der GO Gruppe binden kann. Allerdings lag der Anteil der zu diesen Motiven passenden Sequenzen maximal bei der Hälfte der in der Gruppe enthaltenen Proteine. Diese Einschränkung sollte auch bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden. In diesen Experimenten waren weiterhin konkurrierende endogene Proteine enthalten, was potentiell falsch positive Ergebnisse einschränkt. So kam diese Studie zu dem Ergebnis, dass SHP2 an Proteine der Immunantwort, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und an Proteine mit der Funktion Insulinrezeptorbindung bindet. Proteine dieser Gruppen sind auch in der vorliegenden Arbeit enthalten.

Insgesamt liefern die beschriebenen, verschiedenen Ansätze aufgrund ihres Designs unterschiedliche Ergebnisse, die sich zumindest teilweise ergänzen.

Die am häufigsten von SH2-Domänen aus den Peptidbibliotheken selektierten Peptidgruppen sind nicht unbedingt diejenigen mit den höchsten Affinitäten [176, 177]. Zusätzlich zur Möglichkeit einer SH2-Domäne an verschiedene Motive zu binden, können natürlich die Motive auch von verschiedenen SH2-Domänen gebunden werden. Werden Bindungsassays mit anderen um die Bindung konkurrierenden SH2-Domänen durchgeführt, kann die Bindung der SH2-Domänen von Interesse reduziert werden [167]. So sind möglicherweise bessere Vorhersagen für Interaktionen in Zellen erzielbar. Bei einem Vergleich der Bindung der SH2-Domänen von SOCS3 und SHP2 wurde die Überlappung der Spezifitäten mithilfe von pY759 aus gp130 gezeigt. Hier verläuft die Regulation der Bindung einerseits über die Affinitäten, die SH2-Domäne von SOCS3 hat eine höhere Affinität als die der C-terminalen SH2-Domäne von SHP2, die eine höhere Affinität als die N-terminale SH2-Domäne von SHP2 hat [209]. Andererseits wird SHP2 in Zellen konstitutiv exprimiert, während SOCS3 beispielsweise erst nach Stimulation mit IL6

exprimiert wird und dann aufgrund der höheren Affinität zu pY759 in gp130 SHP2 verdrängen kann.

Durch Experimente mit fusionierten Domänen aus verschiedenen Proteinen wurde gezeigt, dass die Kombination von Tandem SH2-Domänen und PTP-Domäne letztendlich die Spezifität von SHP2 bestimmt [211]. Ergänzend erschien kürzlich eine Veröffentlichung, in der die Substratspezifität von SHP2 in einem von der PTP-Domäne bevorzugten Motiv resultierte [34]. Allerdings wurden hier wie in vorherigen Studien zur Substratspezifität [29] ausschließlich Peptidbibliotheken verwendet. Da die SH2-Domänen der Rekrutierung von SHP2 dienen [212], könnten die Sequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner auf das Vorkommen dieses von der PTP-Domäne bevorzugten Motivs untersucht werden. Anschließend könnten proteomische Experimente, deren Design analog zu dem in dieser Arbeit gezeigten ist, mit der vollständigen SHP2 in aktivierter oder auto-inhibierter Form und mit den DACS *substrate-trapping* Mutanten durchgeführt werden, um das Bild der Interaktionen von SHP2 zu vervollständigen. Weiterhin wäre die auch die globale proteomische Analyse der Interaktionen in Abhängigkeit des Zelltyps oder der Stimulation interessant.

Zusammenfassend zeigt dieser Teil der Arbeit, dass durch die vielen Interaktionspartner aufgrund der Komplexität spannende Fragen hinsichtlich der Mechanismen der Interaktionen aufgeworfen werden. Unabhängig davon ist das Verständnis der SH2-Domänen von SHP2 detaillierter geworden: An der Stelle, wo zuvor viele Fragezeichen neben den sogenannten bindenden Proteinen standen, können jetzt Namen von Proteinen gesetzt werden. Weiterhin können die Namen der Proteine basierend auf ihren Zuordnungen zu Prozessen, wie der zellulären Entwicklung, eingesetzt werden (Abbildung 56).

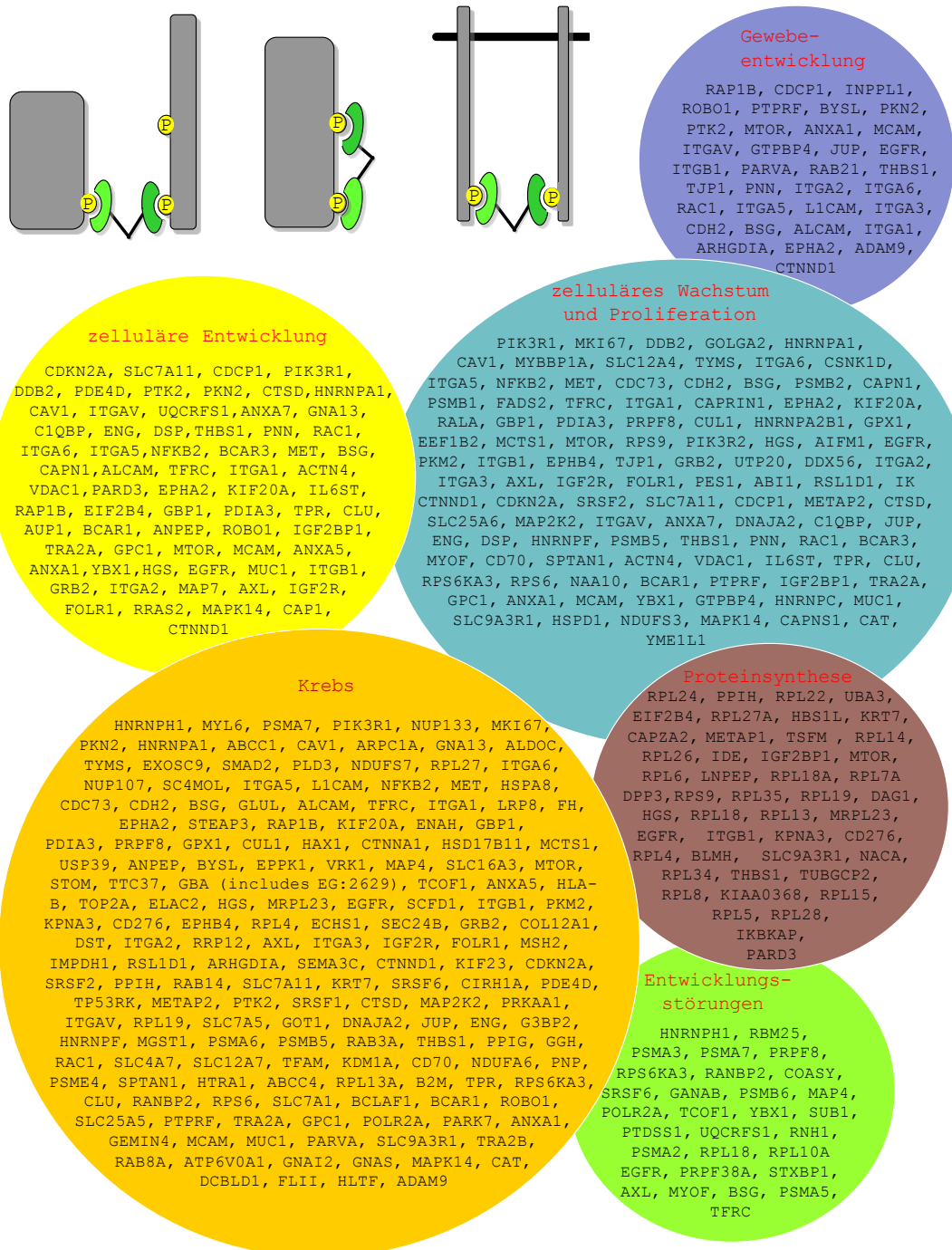


Abbildung 56 Auswahl der an die SH2-Domänen bindenden Proteine
 Die grau dargestellten interagierenden Proteine der SH2-Domänen von SHP2 können aufgrund der dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse benannt werden. In den Kreisen sind die Bezeichnungen der die Proteine codierenden Gene dargestellt, denen eine Beteiligung an den jeweils in rot benannten Prozessen zugeordnet ist. Die Proteinzuzuordnung wurde mit der IPASoftware von ingenuity systems erstellt.

2.3. Mögliche Bedeutung für Jak/STAT und Erk Signalwege

Der potentielle Einfluss von SHP2 auf Vorgänge in der Zelle scheint viel größer als angenommen. Auch wenn der Gesamtanteil der interagierenden Proteine mit Zuordnung zur Signaltransduktion mit etwa 15% eher niedrig ist, sind besonders hier viele interessante potentielle Zielproteine enthalten. Der Jak/STAT Signalweg [109] und die MAPK Kaskade [26, 54, 213] sind bekannte, von SHP2 beeinflusste Signalwege, die hier stellvertretend für andere Signalwege diskutiert werden. Die genauen Ansatzpunkte von SHP2 sind in beiden Fällen immer noch nicht vollständig verstanden.

Einer dieser Ansatzpunkte im Jak/STAT Signalweg ist STAT3. Die direkte Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an STAT3 wurde in den Depex und auch in den Komplex nachgewiesen. Die Validierung erfolgte mittels Immundetektion (Abbildung 44). Vorhersagen der für die Bindung verantwortlichen Motive mit SMALsite geben für die N-terminale SH2-Domäne die Region um Tyrosin 705 und für die C-terminale SH2-Domäne die Region um Tyrosin 674 an. Während die Phosphorylierung von Y705 und ihre diversen Funktionen, wie die Regulation der Transkription [214-219] und der Zelladhäsion [220] in zahlreichen Publikationen beschrieben wurde, konnte pY674 bisher nur in Experimenten von Cell Signalling Technology (www.phosphosite.org) identifiziert werden. Daher wäre es im Weiteren interessant zu untersuchen, ob dies eine neue Rekrutierungsstelle in STAT3 für SHP2 und andere Proteine ist und welche funktionellen Konsequenzen daraus resultieren.

Der knock-out von SHP2 führt sowohl zu einer verstärkten als auch verlängerten Aktivierung von STAT3 [221]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SHP2 an Tyrosin 705 phosphorylierten STAT3 dephosphorylieren kann [222], was auf eine negative Regulation von STAT3 durch SHP2 hinweist.

Bei Überexpression in Zellen wirken die wt SH2-Domänen dominant-negativ auf SHP2 und verhindern dadurch die Dephosphorylierung von STAT3 [115]. Die Präzipitation von STAT3 mit SHP2 nach Thrombin und IL6 Stimulation wurde bereits gezeigt [223]. Nach UVB-Bestrahlung können die Phosphatasen TC PTP, SHP1 und SHP2 je nach Lokalisation STAT3 dephosphorylieren [224]. Das ließ die Autoren schließen, dass neben der Balance der Aktivitäten von Phosphotyrosinkinasen und PTPs auch die Feinregulation und Lokalisierung der PTPs für die Reaktion von Zellen auf äußere Stimulation sehr wichtig ist. Die Bedeutung der Feinregulation der Aktivität von SHP2 und seine ambivalente Funktion werden durch die duale Rolle von SHP2 deutlich: Einerseits ist *PTPN11* das erste identifizierte Proto-Onkogen, das eine Tyrosinphosphatase codiert [93,

225, 226] und andererseits kann SHP2 durch die negative Regulation der Phosphorylierung und damit der Aktivität von STAT3 auch als Tumorsuppressor fungieren [227]. Daher wäre es interessant in zukünftigen Studien herauszufinden, wann genau die Interaktion von SHP2 mit STAT3 stattfindet und welche zelltypabhängigen Konsequenzen sie hat.

In einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit wurde gezeigt, dass die Expression der wt SH2-Domänen in Zellen neben der erhöhten Phosphorylierung von STAT3 auch zu einer Reduktion der Phosphorylierung von Erk führt [115]. Der dominant negative Einfluss durch Expression der SH2-Domänen auf die Funktion SHP2 in der IL6 Signaltransduktion ist abhängig von pY759 aus gp130. Die RA Mutanten der SH2-Domänen und Y759F Mutanten von gp130 wurden als Kontrolle verwendet, damit der Effekt zweifelsfrei der Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an den Rezeptor zugeordnet werden konnte. So lässt sich anhand der Peptidpräzipitationen (Abbildung 17) und weiteren Experimente erahnen, wie wichtig das Positionierung der PTP-Domäne durch die SH2-Domänen auch im Kontext des IL6 Signalweges ist, da sonst die Propagation der Signale verändert ist. Außerdem wurde die ambivalente Funktion von SHP2 im Kontext der IL6 Signalweges damit nochmals bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Interaktion der SH2-Domänen von SHP2 mit Erk2 gezeigt. Die Nachweise der Interaktion von SHP2 mit STAT3 und Erk2 geben somit weitere Hinweise für die noch immer nicht vollständig aufgeklärte Rolle von SHP2 in der IL6 Signaltransduktion. Das Adapterprotein Grb2 bindet laut Literatur an den C-Terminus von SHP2 [143, 173, 228]. In dieser Arbeit konnte überraschenderweise auch die Bindung der SH2-Domänen von SHP2 an Grb2 detektiert werden. Dies könnte auf die eine noch unbekannte Phosphorylierung von Grb2 hinweisen, oder aber eine weitere Interaktionsmöglichkeit unter bestimmten Voraussetzungen darstellen. Da in den Komplex und Depex die Konkurrenz um die Bindung mit anderen Proteinen ausgeschlossen wurde, wäre es weiterführend interessant zu klären, wann die direkte Bindung der SH2-Domänen an Grb2 im zellulären Kontext eine Rolle spielt. Analog zeigen andere gefundene Interaktionspartner Implikationen für andere Signalwege wie beispielsweise den EGF Signalweg, die Regulation des Aktinzytoskeletts oder von Zell-Zellkontakten, deren genauere Untersuchung zu einem besseren Verständnis von SHP2 beitragen könnte.

3. Krankheitsrelevante Punktmutanten der SH2-Domänen

In Patienten mit Noonan Syndrom, JMML und selten auch in Melanomen wurden Mutationen in PTPN11 gefunden. Ein Großteil dieser Mutationen führt zum Austausch von AS, die sich in der für die Autoinhibition wichtigen Interaktionsfläche der N-terminalen SH2-Domäne mit der PTP-Domäne befinden und so die basale Inhibition beeinflussen. Daher konzentrierten sich bisherige Untersuchungen meist auf die gestörte Autoinhibition, die Phosphatase-Aktivitäten *in vitro* und für einige der Punktmutationen wurde die konstitutive Aktivität der Phosphatase gezeigt [71, 77-79, 82, 84, 225, 229, 230]. In Untersuchungen von Mutanten in Zellkultur oder Mausmodellen wurden die Folgen einer konstitutiven Aktivierung von SHP2 gezeigt [85, 86, 94]. Hierzu gehören beispielsweise die zelltypabhängigen erhöhten Aktivierungen von Erk oder AKT [80, 82, 83, 231-234].

3.1. Auswahl der Punktmutanten

Die Effekte der krankheitsrelevanten Punktmutanten wurden in der Literatur zu Beginn dieser Arbeit im Allgemeinen mit einer gestörten Autoinhibition erklärt [71, 77-79, 82, 84, 225, 229]. Sowohl die Struktur von SHP2 [56] als auch die biochemische Untersuchung der Aktivitäten einiger Mutanten lieferten jedoch erste Hinweise, dass eine gestörte Autoinhibition nicht für alle Auswirkungen verantwortlich sein kann [71].

Daher wurden auf Basis der Struktur von SHP2 in Krankheiten vorkommende Punktmutationen ausgewählt, die zum Austausch von AS in den SH2-Domänen führen. Es wurden Mutanten gewählt, die sich in der Interaktionsfläche der N-terminalen SH2-Domäne mit der PTP (D61V, D61Y und E76K) oder in der Nähe der Bindungstasche einer der SH2-Domänen befinden (T42A, R138Q und E139D). Aufgrund der Analysen mit den RA Mutanten (Kapitel IV.2) erschienen hierbei besonders die Mutationen in der C-terminalen SH2-Domäne interessant. Bei allen diesen Mutanten sind keine dramatischen Änderungen der Raumstruktur der Proteine durch die Mutationen zu erwarten, da sie an der Oberfläche liegen. Diese Annahme wurde mit Hilfe von CD-Spektren der Punktmutanten in der Nähe der Bindungstaschen verifiziert (Abbildung 20). Die Positionen der veränderten Aminosäurereste sind in Abbildung 57 dargestellt und werden im Folgenden kurz beschrieben.

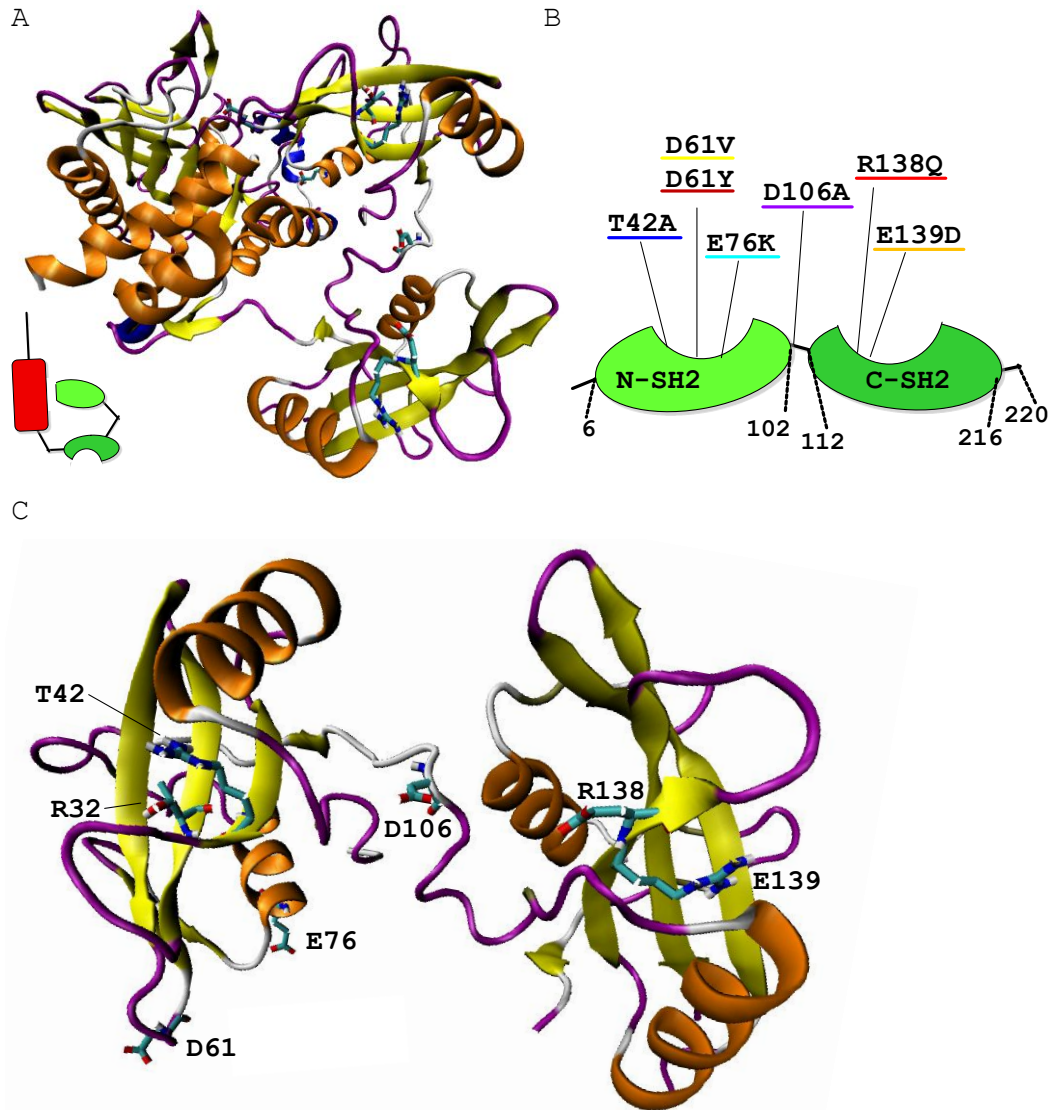


Abbildung 57 Lokalisation der substituierten Aminosäuren in der Struktur

A: Kristallstruktur von SHP2 in der auto-inhibierten Form

B: Schematische Darstellung der Lage der ausgewählten, in Krankheiten mutierten Aminosäuren in den SH2-Domänen von SHP2

C: Darstellung der Lage der ausgewählten, in Krankheiten mutierten Aminosäuren in der Struktur der SH2-Domänen von SHP2, zusätzlich ist das Arginin R32 in der Bindungstasche der N-terminalen SH2-Domäne herausgestellt.

Die Strukturen wurden mit PovChem und VMD nach der Struktur von Hof et al. [56] erstellt (Referenzcode 2SHP).

In der N-terminalen SH2-Domäne bildet Threonin 42 im wt Protein eine Wasserstoffbrücke zu dem phosphorylierten Peptid pY1127 aus dem Bindungspartner IRS1 [58]. Die T42A Mutante ist dazu nicht in der Lage.

Die Varianten D61V, D61Y und E76K liegen in der für die Autoinhibition wichtigen Region der N-terminalen Domäne und nicht sehr nahe an der Bindungstasche.

Daher ist keine dramatische Änderung der Bindungseigenschaften der SH2-Domänen zu erwarten.

In der C-terminalen SH2-Domäne trägt die positive Ladung von Arginin 138 bei der Bindung eines Proteins wesentlich zur Koordination der Sauerstoffe des phosphorylierten Tyrosins bei. In Melanomen wurde die R138Q Mutante gefunden, in der das Glutamin im Gegensatz zu Arginin nicht positiv geladen ist und außerdem eine kürzere Seitenkette hat. Daher ist zu vermuten, dass die Affinität dieser Variante zu Sequenzen mit phosphorylierten Tyrosylseitenketten dramatisch verringert ist.

Glutaminsäure 139 ragt nicht in die Bindungstasche, die Seitenkette ist von ihr abgewendet. Obwohl durch den Austausch von Asparaginsäure zu Glutaminsäure (E139D) keine funktionellen Gruppen der Seitenkette verändert werden, ist die Seitenkette des Glutaminsäurerests ein Kohlenstoffatom länger als die des Asparaginsäurerests.

3.2. Die Bindungspartner der Punktmutanten

Zu Beginn dieser Arbeit war bis auf die Bindungen der T42A und E139D Mutante an pY1127 aus IRS1 nicht untersucht, ob diese Mutanten auch verändert an andere Proteine binden. Es gab nur eine Studie zur Aktivität verschiedener krankheitsrelevanter Mutanten, deren Resultate nicht durch veränderte Autoinhibition erklärt werden konnten [71].

Die Untersuchungen der Interaktionen der Mutanten mit Peptiden auf Oberflächen (Abbildung 19) konnten zur weiteren Auswahl der im Laufe dieser Arbeit genauer untersuchten, krankheitsrelevanten Mutanten verwendet werden. Sie zeigten erwartungsgemäß und im Einklang mit der Literatur, dass die Punktmutationen D61V und Y und E76K keine Effekte auf die Bindung an pY Peptide haben. Die ausgetauschten Aminosäuren liegen der Bindungstasche nicht nahe genug (Abbildung 19, Abbildung 57). Die Punktmutanten T42A, R138Q und E139D zeigten jedoch eine veränderte Bindung an phosphorylierte Peptide aus dem PDGF-Rezeptor β und auch gp130 (Abbildung 19).

Diese veränderten Bindungseigenschaften der Varianten T42A, R138Q und E139D in den SPR-Analysen machten sie für weiterführende massenspektrometrische Analysen des Interaktoms attraktiv (Abbildung 19). Daher wurden die Bindungen dieser Varianten an Proteine in Lysaten aus mit Pervanadat inkubierten Zellen charakterisiert. Wie in den vorangegangenen Experimenten mit den wt Domänen

wurde das gesamte Proteom von HeLa Zellen einbezogen. Da zuvor keine Untersuchungen vorlagen, in denen Punktmutanten hinsichtlich ihrer Bindung an Proteine aus Lysaten untersucht wurden, wurden entsprechende Experimente entworfen (Abbildung 40).

Die Bindung der Interaktionspartner an die Mutanten wurde immer in Bezug zu der Bindung an die wildtyp Domänen gesetzt, daher konnte die Referenzliste der wildtyp SH2-Domänen (IV.4.5, VII.3) zur Selektion des analysierten Interaktoms der Mutanten (VII.3) verwendet werden. Dies bietet den Vorteil, dass nur bereits im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene spezifische Interaktionen untersucht wurden.

Schon die Immundetektionen von an Tyrosinen phosphorylierten Proteinen (Abbildung 18, Abbildung 23 und Abbildung 24) zeigen die bereits für die Bindung an Peptide (Abbildung 19) beobachteten Tendenzen. Die T42A Mutante bindet oft mehr als die wt Domänen, die wiederum ähnlich der E139D Mutante binden. Die R138Q Punktmutante bindet deutlich weniger von allen Interaktionspartnern. Das Histogramm der in den massenspektrometrischen Experimenten gewonnenen Verhältnisse der von den Mutanten im Vergleich zu den wildtyp Domänen präzipitierten Proteine zeigt mit den Immundetektionen übereinstimmende Bereiche für die Bindung der Punktmutanten an andere Proteine (Abbildung 46). Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Experimente erweitern auch hier die Informationen entscheidend. Neben der Identifizierung der Interaktionspartner konnten diese auch in Relation zu denen der wt SH2-Domänen quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte nun die Hypothese bestätigt werden, dass die Punktmutationen T42A, R138Q und E139D die Bindungseigenschaften verändern können.

Allerdings konnten auf diese Art keine Interaktionspartner identifiziert werden, die an die Punktmutanten aber nicht an die wildtyp Domänen binden, da diese nicht in der Referenzliste enthalten sind. In zukünftigen Untersuchungen wäre es daher von Interesse, auch diese Interaktionen zu beschreiben. Dies wäre möglich, indem für die einzelnen Punktmutanten Depex und Komplex analog zu den Experimenten mit den wildtyp Domänen durchgeführt werden würden. Immundetektionen von derartigen Komplex zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse (Abbildung 29). Dies betrifft die Punktmutationen T42A und E139D, im Fall der R138Q Mutante wären hier aufgrund der niedrigen Affinitäten keine zusätzlichen Bindungspartner, sondern durch die niedrigeren Intensitäten deutlich weniger identifizierte Interaktionspartner zu erwarten.

Die möglichen Konsequenzen der Bindung von STAT3 an die SH2-Domänen wurden bereits im Kontext der wildtyp Domänen besprochen. In den Mutex wurde eine veränderte Bindung der Punktmutanten an STAT3 beobachtet, die durch Immundetektionen bestätigt wurde (Abbildung 44). Die Änderung ist im Fall der R138Q Mutante drastisch, die T42A Mutante bindet STAT3 leicht besser und die E139D Mutante leicht schlechter. Obwohl die Unterschiede nicht besonders groß erscheinen, ist das Vorhandensein der PTP-Domäne im Kontext von Patientenzellen zu berücksichtigen. Eine leicht veränderte Bindung kann auch eine große Änderung der Phosphorylierungsrate von STAT3 nach sich ziehen. In der Zwischenzeit hat auch eine andere Gruppe beschrieben, dass konstitutiv aktive Punktmutanten von SHP2 dazu führen, dass weniger des phosphorylierten Transkriptionsfaktors STAT3 vorliegt [222].

3.3. Die veränderten Bindungen der R138Q Mutante

Die R138Q Punktmutante: wurde bisher von anderen Arbeitsgruppen nicht untersucht und nur als somatische Mutation gefunden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die R138Q Variante fatale Auswirkungen bezüglich der Bindung der SH2-Domänen an andere Proteine hat (Abbildung 18, Abbildung 46). Die ausgetauschten Aminosäuren R138Q und E139D in der C-terminalen SH2-Domäne haben gegensätzliche Auswirkungen auf die Interaktion mit den untersuchten Peptiden. Die R138Q Variante zeigt eine reduzierte Affinität. Die schwächere Wechselwirkung der R138Q kann durch die veränderte Ladung der Seitenkette erklärt werden. Die für die hochaffine Bindung eines Motives mit negativ geladenem, phosphoryliertem Tyrosylrest an die Domänen notwendige positive Ladung fehlt. Daher kann angenommen werden, dass die Bindung nicht stark sondern eher entsprechend eines unphosphorylierten Peptids ist.

Da diese Mutation in Melanomen gefunden wurde, ist besonders die Betrachtung von potentiellen Effekten auf die Signalwege von Wachstumsfaktoren von Interesse. Am Beispiel der Bindung der R138Q Mutante an beteiligte Proteine im Kontext des EGF Signalwegs (Abbildung 47) wird deutlich, dass von der R138Q Mutante immer viel weniger der Proteine als von den wildtyp Domänen präzipitiert wird. Außerdem zeigt diese Abbildung zusätzlich zu den Informationen über das Bindungsverhalten der R138Q Mutante, wie komplex die Einflussnahme von SHP2 sein kann (Abbildung 47). Es zeigen sich viel mehr Ansatzpunkte als ursprünglich vermutet, beispielsweise ist die Bindung an STAT5 beeinträchtigt. Eine Beteiligung von SHP2 bei diesen Prozessen, besonders an der MAP Kinasen Signalkaskade,

ist schon lange bekannt, aber die genauen Ansatzpunkte sind nicht geklärt [26, 54, 213]. Es gibt widersprüchliche Literatur darüber, ob SHP2 ober- und oder unterhalb von Ras angreift. Das momentan im Allgemeinen favorisierte Modell beinhaltet die von SHP2 hervorgerufene Modulation der Aktivität des GTPase-aktivierenden Proteins Ras-GAP als den hauptsächlichen Angriffspunkt von SHP2 für die Beeinflussung der Aktivität von Ras [55, 92]. Aber auch hier gibt es vermutlich zelltypspezifische Unterschiede. Ohne Konkurrenz mit anderen Proteinen um die Bindung könnte SHP2 laut der in dieser Arbeit gewonnenen Daten sowohl oberhalb von Ras über die Bindung an Grb2 als auch unterhalb durch die Bindung an MEK und Erk2 agieren. Weiterhin können die SH2-Domänen auch direkt an Ras binden. Betrachtet man allerdings die Bindung der SH2-Domänen der R138Q Mutante in nicht denaturierten Lysaten wird deutlich, dass die Konkurrenz mit endogenen Proteinen überhaupt keine detektierbare Bindung der R138Q Variante zulässt (Abbildung 18), womit positive und negative Einflüsse von SHP2 nicht mehr zum Tragen kommen können. Daher wäre im Kontext von Signalwegen zu erwarten, dass diese sich bei Vorliegen der R138Q Mutante so verhalten, als wäre SHP2 nicht vorhanden.

Im Kontext der wt Domänen war es überraschend, wie viele Proteine gebunden wurden. Allerdings wurde von der R138Q Mutante immer deutlich weniger präzipitiert als von den wt Domänen. Im zellulären Kontext sind diese Bindungen vermutlich so schwach, dass sie praktisch nicht stattfinden. Dies könnte bedeuten, dass die PTP-Domäne von SHP2 ihre Substrate nicht mehr finden kann oder Proteine eines Proteinkomplexes nicht mehr in die Nähe zueinander gebracht werden können. Diese Vermutung wird gestützt, da die Dephosphorylierung von Erk2 durch SHP2 nicht stattfindet, wenn deren SH2-Domänen blockiert sind und die PTP-Domäne dadurch nicht mehr zu ihrem Wirkungsort rekrutiert wird [235]. Es ist anzunehmen, dass die fehlende Rekrutierung aufgrund der mutierten SH2-Domäne gleiche Auswirkungen wie die Blockierung der SH2-Domänen hat.

Da diese Punktmutation aus Melanomen isoliert wurde, ist neben der Betrachtung der durch Wachstumsfaktoren stimulierten Signalwege auch die Zell-Zellkommunikation beispielsweise über fokale Adhäsionen interessant. Die R138Q Mutante bindet auch alle in solche Vorgänge verwickelten Moleküle wie Integrin β , RhoA, die FAK und Caveolin deutlich schlechter als die wildtyp Domänen. Dadurch könnten Informationen von benachbarten Zellen modifiziert werden oder gar verlorengehen, was letztendlich die Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflussen könnte.

Zurückkommend auf die Frage, welche der SH2-Domänen wichtig für die Bindung und Funktion von SHP2 ist, zeigt die R138Q Mutante, dass die C-terminale SH2-Domäne bisher völlig unterschätzt wurde. Von SHP2 beeinflusste Prozesse wie die Initiation, Propagation und auch die negative Regulation von Signalwegen durch SHP2 funktionieren vermutlich bei Vorliegen der R138Q Mutante nicht mehr. Dies könnte einer der möglichen Gründe dafür sein, dass diese Mutation in keinem der Patienten mit Keimbahnmutationen gefunden wurde. Vermutlich hätte sie ähnlich drastische Auswirkungen wie die Deletionen eines Teils der N-terminalen Domäne oder der kompletten SHP2, die zum Absterben der Embryonen vor der Geburt führen. Das Verhalten dieser Mutante bestätigt weiterhin die ursprünglich aufgrund der Experimente mit den RA Mutanten aufgestellte Hypothese: Die C-terminale SH2-Domäne ist folglich nicht nur für die Bindung an gp130 wichtig.

3.4. Die veränderten Bindungen der E139D Mutante

Im Gegensatz zur R138Q Mutante werden die Ladungsverhältnisse in der E139D Punktmutante nicht verändert, aber die Seitenkette des Aspartats ist verkürzt. In der N-terminalen Domäne ist in der Position vor Arginin 32 die kleine AS Alanin, statt dem in vielen SH2-Domänen konservierten Valin. Dies führt zu einer Änderung der Größe der Bindungstasche und damit der Spezifität [192]. Der Austausch von E139 zu D, das sich direkt nach dem für die Bindung kritischen Arginin 138 befindet und dessen Seitenkette aufgrund des Faltblatts auch von der Bindungstasche abgewendet ist, könnte einen ähnlichen Effekt auf die C-terminale SH2-Domäne hervorrufen und so deren Spezifität verändern.

Nicht nur mittels der SPR-Messungen (Abbildung 19), sondern auch mit den Immundetektionen (Abbildung 18, Abbildung 24) und massenspektrometrischen Experimenten konnte die veränderte Bindung der E139D Mutante im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 46). Während die Affinitäten der R138Q Mutante zu den Interaktionspartnern stark reduziert sind, zeigt das E139D Konstrukt zum Teil auch höhere Affinitäten als die wildtyp Domänen. Bei den Mutex wurden mit $\log_2 \pm 0,58$ stringente Kriterien ab wann eine Bindung gegenüber den wt Domänen als verändert betrachtet wurde festgelegt. Für die mutierte endogene SHP2 bei Patienten ist hierbei zu bedenken, dass die PTP-Domäne auch vorhanden ist und enzymatische Aktivität besitzt. Eine längere oder kürzere Verweildauer von SHP2 in einer bestimmten Umgebung kann daher größere Auswirkungen haben, als direkt von einer nur leicht veränderten Bindung absehbar sind.

Während der Anfertigung dieser Arbeit erschien zuerst eine Veröffentlichung, in der eine veränderte Bindung der E139D Mutante vermutet wurde [236] und darauf folgend erfolgte eine Veröffentlichung, in der mithilfe einer Peptidbibliothek die Änderung der Spezifität der C-terminalen in Richtung der N-terminalen Domäne gezeigt wurde [67]. In der letztgenannten Arbeit konnte sogar ein gegenüber der C-terminalen wt Domäne verändertes, von der E139D Mutante bevorzugtes Motiv ermittelt werden. Beispielsweise bindet die E139D Mutante auch Peptide mit Prolin an der Position +3, was von C-terminalen wildtyp Domäne nicht aber von der N-terminalen SH2-Domäne gebunden wurde. Dieses Motiv wurde aus Peptiden erstellt, die sowohl an die C- als auch die N-terminale wt Domänen binden. Die Konsensussequenz ähnelt der für die Bindung an die N-terminale SH2-Domäne ein bisschen mehr als die für die C-terminale Domäne bestimmte. Dies ist vermutlich in der verkürzten Seitenkette des Aspartats begründet. Die Ergebnisse der Studie ergänzen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten, in der die Bindung der E139D Mutante im Vergleich zu den wildtyp Domänen in einzelnen Fällen verstärkt war. Ein Beispiel eines Proteins, das durch das E139D Konstrukt etwa vierfach mehr als die wt Domänen präzipitiert wurde, ist Cadherin 2, dessen Aktivierung zu einer erhöhten Phosphorylierung von Erk2 führt und die Migration von Zellen reguliert [237]. Tendenziell würde eine stärkere Bindung bedeuten, dass sich die veränderte Spezifität fördernd für die Interaktion auswirkt. Eine schwächere Bindung der Mutante zeigt, dass die ursprünglichen Affinitäten und Spezifitäten der wt Domänen für die Bindung optimaler sind. Auch hier könnte sich die veränderte Bindung in Form einer funktionellen Dysregulation auf die Intensität der Signale auswirken. Von anderen Proteinen präzipitierte die E139D Variante gleich viel oder weniger als die wt Domänen. Im Kontext des EGF Signalwegs werden weniger EGFR, Grb2 und MEK von der E139D Mutante gebunden, während die Bindung an STAT5, Ras und ERK2 unverändert ist. Zwischenzeitlich wurde auch gezeigt, dass die basale Aktivität der E139D Mutante vergleichbar mit der wt SHP2 ist, nach Stimulation zeigt die E139D Mutante jedoch eine deutlich höhere Phosphataseaktivität als wt SHP2 [67]. Eine Untersuchung solcher Effekte wäre entweder mit Patientenproben am interessantesten, allerdings wäre sie dann auf leicht entnehmbare Proben wie Blut beschränkt. Da diese Mutation auch in Patienten mit Leukämien gefunden wurde, wären derartige Ansätze vielversprechend. Besonders in JMML spielen durch veränderte SHP2 Aktivität dysregulierte Ras vermittelte Signale eine wichtige Rolle (zusammengefasst in [231]). Alternativ könnten Zellen mit einem konditionellen knock out von SHP2 mit der Mutante rekonstituiert und anschließend hinsichtlich veränderter Signalwege analysiert werden.

Wie schon bei den wildtyp Domänen angesprochen, befinden sich unter den Interaktionspartnern auch Proteine der Glykolyse. Die E139D Mutante bindet verändert an zwei der Schlüsselenzyme der Glykolyse, wobei weniger Pyruvatkinase und mehr PDE E2 als von den wt SH2-Domänen präzipitiert wurde. Sollte sich in zukünftigen Experimenten zeigen, dass SHP2 die Aktivität dieser Enzyme durch deren Dephosphorylierung beeinflussen kann, wäre eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Glykolyse und Glukoneogenese eine naheliegende Konsequenz.

Die in der C-terminalen SH2-Domäne veränderte Variante E139D von SHP2 zeigt Veränderungen bei der Bindung von Interaktionspartnern [67]. Aufgrund der beiden Bindungsstellen der SH2-Domänen, von denen die C-terminale eine leicht veränderte Spezifität besitzt, werden die Interaktionspartner auch leicht verändert gebunden.

3.5. Die veränderten Bindungen der T42A Mutante

Obwohl die T42A Variante im Vergleich zum Wildtyp bei der Bindung eines Peptids eine Wasserstoffbrücke weniger ausgebildet werden kann, dennoch hat sie erstaunlicherweise eine höhere Affinität zu den untersuchten Peptiden. Sie hat auch eine höhere Affinität als die wt Domäne zu pY1127 aus IRS1 [71]. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden MD Simulationen der T42A Mutante veröffentlicht, die eine Stabilisierung der N-terminal benachbarten Struktur (AS 9-22 und 34-40) zeigten, wenn diese mit der N-terminalen Region des Peptids pY1009 aus PDGF-Rezeptor β interagiert [67]. Diese Stabilisierung des Komplexes kann die fehlende Wasserstoffbrücke kompensieren und erklärt damit auch die in dieser Arbeit erhaltenen Daten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mittels SPR-Analysen (Abbildung 19), Immundetektionen (Abbildung 18, Abbildung 24) und massenspektrometrischen Experimenten (Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 46) auch die gegenüber den wt Domänen global veränderten Bindungen der T42A Mutante gezeigt werden. Von mehr als 100 Proteinen wurde von der TA Mutante mindestens 1,5fach so viel wie von den wt Domänen präzipitiert. Wieder würde eine stärkere Bindung bedeuten, dass sich die veränderte Spezifität fördernd für die Interaktion auswirkt und eine schwächere Bindung der Mutante zeigen, dass die ursprünglichen Affinitäten und Spezifitäten der wt Domänen für die Bindung optimaler sind. Tendenziell ist das Maximum der Verhältnisse im Histogramm leicht in Richtung einer verstärkten Bindung der T42A Mutante verschoben (Abbildung 46).

Bei *in vitro* Experimenten ist die basale Aktivität der T42A Mutante vergleichbar mit der wildtyp SHP2, nach Stimulation der Phosphatase durch die Bindung von phosphorylierten Peptiden aus IRS ist deren Aktivität deutlich höher als die des wildtyp Proteins [71]. Dies ist vermutlich auf die auch in der vorliegenden Arbeit gezeigte, veränderte Bindung der SH2 Domänen zurückzuführen. Während der Anfertigung dieser Arbeit könnte eine erhöhte Aktivität der T42A Mutante auch nach der Aktivierung durch Peptide aus SIRP α gezeigt werden. Diese Veränderung erfolgt ausschließlich bei der Mutation von Threonin 42 zu Alanin. Der Austausch dieses Threonins zu anderen Aminosäuren verringerte die Affinität zu Peptiden [67]. In zuletzt genannter Studie bindet die T42A Mutante in vielen Fällen die gleichen Peptide wie die N-terminale SH2-Domäne. Zusätzlich wurden insgesamt etwa doppelt so viele Motive der Peptidbibliothek gebunden. Diese Tendenz wird in den hier durchgeführten Experimenten reflektiert, das Vorhandensein der T42A Mutante in den Mutex führt zur Identifizierung von deutlich mehr Proteinen als die Experimente mit den wildtyp Domänen (Abbildung 46). Wie bereits zuvor angesprochen, konnten aufgrund der Referenzierung über die Interaktionen der wildtyp Domänen in dieser Arbeit derartige, zusätzliche Bindungspartner nicht weiter analysiert werden. Analog zu dem für die wildtyp Domänen verwendeten experimentellen Design der Komplex können zukünftige Experimente mit der T42A Mutante direkt durchgeführt werden.

Insgesamt zeigen die in den Experimenten gefundenen Verhältnisse der Bindung der T42A Mutante im Vergleich zu den wildtyp Domänen wieder eine durch die veränderte Bindung der Mutante hervorgerufene potentielle Beeinflussung vieler Signalwege.

3.6. T42A und E139D in Relation zueinander

In der Clusteranalyse wurden gegenüber den wildtyp SH2-Domänen verändert bindende Interaktionspartner der T42A und der E139D Punktmutanten analysiert. (Abbildung 48). Hierbei wurden diese in Clustern zusammengefasst. Die Proteine in den resultierenden Clustern wurden weiterhin mittels ihrer Zuordnung nach der KEGG Datenbank auf ihre Anreicherung gegenüber dem humanen Proteom untersucht (Abbildung 49), um einen Eindruck über reguliert bindende Proteine im Kontext von Signalwegen zu gewinnen.

Die Anreicherung, der durch KEGG zugeordneten Eigenschaften in den Clustern, zeigt, dass viele Signalwege durch die veränderten Bindungseigenschaften betroffen sein können. In Cluster 3 bis 5 finden sich viele angereicherte Proteine aus Signalwegen, in denen eine Beteiligung von SHP2 bereits bekannt war. Im für

die Bindung an die T42A Mutante relativ heterogenen Cluster 3, das gleichzeitig auch eine stärkere Wechselwirkung der E139D Mutante zeigt, sind Proteine des Kalziumsignalwegs angereichert. Die Beteiligung von SHP2 an diesem Signalweg wurde bereits mehrfach untersucht [238-241]. Weiterhin wurde eine Beeinflussung dieses Signalweges durch konstitutiv aktive SHP2 Mutanten beschrieben [85]. Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten ist zu vermuten, dass auch die veränderte Bindung der SH2-Domänen an beteiligte Proteine Auswirkungen auf diesen Signalweg zeigt. Ähnlich verhält es sich bei den in Cluster 4 angereicherten Proteinen aus den Jak/STAT und EGF Signalwegen, hier ist die Bindung der T42A Mutante verstärkt und die der E139D Mutante reduziert. Daher wäre es spannend zu untersuchen, welche Veränderung der Signalwege dies nach sich zieht. Insbesondere ist zu klären, ob beide Mutationen ähnliche oder entgegengesetzte Effekte auslösen. Bei den in Cluster 5 angereicherten Proteinen aus Signalwegen, wie denen der fokalen Adhäsionen und für die Differenzierung verantwortlichen, ist anzunehmen, dass die verringerte Bindung der beiden Mutanten zu einem Verlust des Einflusses von SHP2 führen könnte. Die veränderte Rekrutierung der PTP-Domäne im Kontext der Mutanten sollte in Zellen von Patienten unbedingt im Zusammenhang mit den genannten Signalwegen genauer untersucht werden. Vor allem, da die Analyse der Effekte von überwiegend inaktiven Mutanten in Patienten mit LEOPARD Syndrom und die von konstitutiv aktiven Mutanten in Patienten mit Noonan Syndrom oder Leukämien in überlappenden Phänotypen resultiert (zusammengefasst in [96]).

Wie schon die Motive der mit den wildtyp Domänen interagierenden Proteine (Abbildung 38), sind die in den Proteinen der Cluster angereicherten Motive (Abbildung 50 bis Abbildung 53) für die gegenüber den wildtyp Domänen veränderten Bindungen von T42A und E139D sehr heterogen. Besonders an dieser Stelle wären weitere Präzipitationen verdauter Proteine hochinteressant, um die Motive direkt bestimmen zu können.

VI. Zusammenfassung

Die Proteintyrosinphosphatase (PTP) SHP2 ist ein bekannter Regulator von Wachstumsfaktor- und Zytokin-induzierten Signalwegen. Sie ist aus zwei SH2-Domänen, einer katalytisch aktiven PTP-Domäne und einem C-terminalen Bereich mit phosphorylierbaren Tyrosylseitenketten aufgebaut. SHP2 kann als Adapter und als Phosphatase Einfluss auf Signalwege nehmen. Durch den modularen Aufbau sind die Reaktions- und Regulationsmechanismen komplex und beinhalten unter anderem einen Autoinhibitionsmechanismus, bei dem die N-terminale SH2-Domäne die Bindungsstelle der PTP-Domäne intramolekular blockiert.

Die SH2-Domänen können abhängig von phosphorylierten Tyrosylresten in anderen Proteinen mit diesen interagieren. Zu Beginn der Arbeit waren nur wenige Bindungspartner von SHP2 bekannt. Deshalb wurden hier massenspektrometrische Experimente zur Identifizierung der Interaktionspartner der beiden SH2-Domänen etabliert. Hierfür wurden die beiden SH2-Domänen heterolog in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert, aufgereinigt und nach der Kopplung an magnetische Beads zur Präzipitation der interagierenden Proteine aus Lysaten von metabolisch, mit stabilen Isotopen von Aminosäuren markierten Zellen verwendet. Das so gewonnene Interaktom der SH2-Domänen umfasst mehr als 1000 Proteine aus unterschiedlichen Signalwegen.

Keimbahn- und somatische Mutationen im SHP2 codierenden Gen *PTPN11* wurden in Patienten mit Noonan Syndrom, Leukämien und Melanomen identifiziert. Im Allgemeinen wurde als Ursache der Krankheiten eine gestörte Autoinhibition von SHP2 durch die Punktmutationen angenommen. Da so aber nicht alle molekularen Effekte erklärt werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch mutierte SH2-Domänen untersucht. Es wurden Mutationen gewählt, die nicht nur in der Interaktionsfläche der N-terminalen SH2- und der PTP-Domäne liegen, sondern auch innerhalb oder in der Nähe der Bindungstaschen der SH2-Domänen. Zunächst wurde die Bindung der Mutanten an Peptide bekannter Interaktionspartner mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) analysiert und veränderte Bindungseigenschaften der Mutanten gezeigt. Im Anschluss daran wurde das Interaktom der mutierten SH2-Domänen massenspektrometrisch analysiert und auch global veränderte Bindungseigenschaften der ausgewählten Punktmutanten gezeigt. Diese Bindungseigenschaften könnten sich neben der veränderten Funktion als Adapter bei Rekrutierung von Proteinen auch direkt auf die Aktivität der Phosphatase gegenüber Zielproteinen auswirken und somit eine weitere Erklärung für die Krankheiten liefern.

VII. Anhang

1. Abkürzungen

Tabelle 14 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	mikro
ABC	Aminiumbicarbonatpuffer
APS	Ammoniumpersulfat
ARHGAP	Rho GAP
AS	Aminosäure/n
AU	<i>absorption unit</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>circular dichroism</i>
CO	<i>cutoff</i>
COASY	<i>coenzyme A synthase</i>
C-terminal	Carboxyterminal
CTNND	Catenin δ
d	Schichtdicke
Da	Dalton
Depex	Experimente mit dephosphorylierten Lysaten
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
g	Gramm, im Zusammenhang mit Zentrifugen Erdbeschleunigung
Gab	<i>Grb2-associated binder</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein</i>
GST	Glutathion-S Transferase
GTPase	<i>guanosine triphosphate hydrolysing enzyme</i>
H	<i>heavy (isotope)</i>
h	Stunden
HeLa	Henrietta Lacks
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL6	Interleukin 6
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IQGAP2	<i>IQ motif containing GTPase activating protein</i>
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITGA	Integrin α
ITGB	Integrin β

Abkürzung	Bedeutung
Jak	Januskinase
JMML	juvenile myelomonozytische Leukämie
k	Kilo-
kb	Kilobasen
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
Komplex	Experimente mit Konkurrenz
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	<i>liquid chromatography</i>
LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
M	Molar
m	milli
M	<i>medium (isotope)</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPK2K	MAPKkinasekinase
MeOH	Methanol
MilliQ	doppelt destilliertes, steril gefiltertes Wasser
min	Minuten
MPZL	<i>myelin protein zero related</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
Mutex	Experimente mit den Mutanten
n	nano
N/L	<i>normal/light (isotope)</i>
N-terminal	Aminoterminal
OSM	Onkostatin M
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI3K p85	regulatorische Untereinheit der Phosphatidyl-inositol-3 Kinase
PLCγ	Phospholipase C γ
Prot	Protein
PTB	Phosphotyrosin bindend
PDE	Pyruvat Dehydrogenase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
PTPN	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type</i>
PV	Pervanadat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pY	Phosphotyrosin
pY(Zahlen)	bestimmte phosphorylierte Peptide (siehe II Kapitel 10)
PZR	<i>protein zero related</i>
Ras	<i>retrovirus associated sequence</i>
RasGAP	Ras GTPase aktivierendes Protein
Rho	<i>Ras-homologous GTPase</i>
RNS	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RT	Raumtemperatur
ru	<i>response unit</i>
s	Sekunden
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	Src-homologe
SHP	SH2 enthaltende Phosphatase
SILAC	<i>stable isotope labeling with aminoacids in cell culture</i>

Abkürzung	Bedeutung
SIRP α	<i>signal regulatory protein α</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Src	<i>Rous sarcoma virus homolog protein</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TBS-N	<i>tris bufferd saline nonidet</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	<i>Trifluoro acetic acid</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ü.N.	über Nacht
UVB	ultraviolette Strahlung (315–280 nm)
wt	wildtyp
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Tabelle 15 Aminosäuren

Drei- /Einbuchstabencode	Aminosäure
Ala/A	Alanin
Arg/R	Arginin
Asn/N	Asparagin
Asp/D	Asparaginsäure
Cys/C	Cystein
Gln/Q	Glutamin
Glu/E	Glutaminsäure
Gly/G	Glycin
His/H	Histidin
Ile/I	Isoleucin
Leu/L	Leucin
Lys/K	Lysin
Met/M	Methionin
Phe/F	Phenylalanin
Pro/P	Prolin
Ser/S	Serin
Thr/T	Threonin
Trp/W	Tryptophan
Tyr/Y	Tyrosin
Val/V	Valin

2. Literatur

1. Schlessinger, J., *Signal transduction. Autoinhibition control*. Science, 2003. **300**(5620): p. 750-2.
2. Jordan, J.D., E.M. Landau, and R. Iyengar, *Signaling networks: the origins of cellular multitasking*. Cell, 2000. **103**(2): p. 193-200.
3. Scott, J.D. and T. Pawson, *Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1220-4.
4. Smith, F.D. and J.D. Scott, *Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway*. Curr Biol, 2002. **12**(1): p. R32-40.
5. Choudhary, C. and M. Mann, *Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(6): p. 427-39.
6. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
7. Olsen, J.V., et al., *Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis*. Sci Signal, 2010. **3**(104): p. ra3.
8. Steen, H., et al., *Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1031-9.
9. Rigbolt, K.T., et al., *System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation*. Sci Signal, 2011. **4**(164): p. rs3.
10. Hunter, T. and B.M. Sefton, *Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1311-5.
11. Hornbeck, P.V., et al., *PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation*. Proteomics, 2004. **4**(6): p. 1551-61.
12. Pawson, T., *Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems*. Cell, 2004. **116**(2): p. 191-203.
13. Yaffe, M.B., *Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 177-86.
14. Schlessinger, J. and M.A. Lemmon, *SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling*. Sci STKE, 2003. **2003**(191): p. RE12.
15. Neel, B.G., H. Gu, and L. Pao, *The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 284-93.
16. Schlessinger, J., *SH2/SH3 signaling proteins*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 25-30.
17. Ferguson, K.M., et al., *Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain*. Cell, 1995. **83**(6): p. 1037-46.
18. Philip, F., Y. Guo, and S. Scarlata, *Multiple roles of pleckstrin homology domains in phospholipase Cbeta function*. FEBS Lett, 2002. **531**(1): p. 28-32.
19. Wang, D.S., et al., *Binding of PH domains of beta-adrenergic receptor kinase and beta-spectrin to WD40/beta-transducin repeat containing regions of the beta-subunit of trimeric G-proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(1): p. 29-35.
20. Sadowski, I., J.C. Stone, and T. Pawson, *A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(12): p. 4396-408.
21. Waksman, G., et al., *Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides*. Nature, 1992. **358**(6388): p. 646-53.
22. Liu, B.A., et al., *The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 851-68.
23. Ottinger, E.A., M.C. Botfield, and S.E. Shoelson, *Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 729-35.
24. Flint, A.J., et al., *Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1680-5.
25. Zhao, R. and Z.J. Zhao, *Tyrosine phosphatase SHP-2 dephosphorylates the platelet-derived growth factor receptor but enhances its downstream signalling*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 1): p. 35-9.

26. Bennett, A.M., et al., *Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1189-202.
27. Xie, L., Y.L. Zhang, and Z.Y. Zhang, *Design and characterization of an improved protein tyrosine phosphatase substrate-trapping mutant*. Biochemistry, 2002. **41**(12): p. 4032-9.
28. Espanel, X., M. Huguenin-Reggiani, and R. Hooft van Huijsduijnen, *The SPOT technique as a tool for studying protein tyrosine phosphatase substrate specificities*. Protein Sci, 2002. **11**(10): p. 2326-34.
29. Walchli, S., et al., *Probing protein-tyrosine phosphatase substrate specificity using a phosphotyrosine-containing phage library*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 311-8.
30. Tiganis, T. and A.M. Bennett, *Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective*. Biochem J, 2007. **402**(1): p. 1-15.
31. Gao, L., H. Sun, and S.Q. Yao, *Activity-based high-throughput determination of PTPs substrate specificity using a phosphopeptide microarray*. Biopolymers, 2010. **94**(6): p. 810-9.
32. Kumar, S., et al., *Global analysis of protein tyrosine phosphatase activity with ultra-sensitive fluorescent probes*. J Proteome Res, 2006. **5**(8): p. 1898-905.
33. Liang, F., S. Kumar, and Z.Y. Zhang, *Proteomic approaches to studying protein tyrosine phosphatases*. Mol Biosyst, 2007. **3**(5): p. 308-16.
34. Ren, L., et al., *Substrate Specificity of Protein Tyrosine Phosphatases 1B, RPTPalph, SHP-1, and SHP-2*. Biochemistry, 2011. **50**(12): p. 2339-56.
35. Mertins, P., et al., *Investigation of protein-tyrosine phosphatase 1B function by quantitative proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(9): p. 1763-77.
36. Barr, A.J., et al., *Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome*. Cell, 2009. **136**(2): p. 352-63.
37. Soulsby, M. and A.M. Bennett, *Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 281-9.
38. Sugimoto, S., et al., *Expression, purification, and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22771-6.
39. Plutzky, J., B.G. Neel, and R.D. Rosenberg, *Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(3): p. 1123-7.
40. Poole, A.W. and M.L. Jones, *A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail*. Cell Signal, 2005. **17**(11): p. 1323-32.
41. Arrandale, J.M., et al., *Insulin signaling in mice expressing reduced levels of Syp*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21353-8.
42. Saxton, T.M., et al., *Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2*. EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2352-64.
43. Yuan, L., et al., *SHP-2 phosphatase regulates DNA damage-induced apoptosis and G2/M arrest in catalytically dependent and independent manners, respectively*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42701-6.
44. Feng, G.S., *Shp2-mediated molecular signaling in control of embryonic stem cell self-renewal and differentiation*. Cell Res, 2007. **17**(1): p. 37-41.
45. Pao, L.I., et al., *Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 473-523.
46. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
47. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
48. Takada, T., et al., *Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9234-42.
49. Li, L., et al., *A critical role for SHP2 in STAT5 activation and growth factor mediated proliferation, survival and differentiation of human CD34+ cells*. Blood.
50. Easton, J.B., A.R. Royer, and D.S. Middlemas, *The protein tyrosine phosphatase, Shp2, is required for the complete activation of the RAS/MAPK pathway by brain-derived neurotrophic factor*. J Neurochem, 2006. **97**(3): p. 834-45.
51. Shi, Z.Q., et al., *Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1526-36.
52. Cunnick, J.M., et al., *Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9498-504.

53. Hadari, Y.R., et al., *Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3966-73.
54. Noguchi, T., et al., *Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6674-82.
55. Matozaki, T., et al., *Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation*. Cancer Sci, 2009. **100**(10): p. 1786-93.
56. Hof, P., et al., *Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2*. Cell, 1998. **92**(4): p. 441-50.
57. Barford, D. and B.G. Neel, *Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2*. Structure, 1998. **6**(3): p. 249-54.
58. Pluskey, S., et al., *Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 2897-900.
59. Eck, M.J., et al., *Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2*. Nature, 1996. **379**(6562): p. 277-80.
60. Darian, E., et al., *Structural mechanism associated with domain opening in gain-of-function mutations in SHP2 phosphatase*. Proteins, 2011. **79**(5): p. 1573-88.
61. Wang, W., et al., *Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation*. J Cell Biochem, 2011.
62. Lu, W., et al., *Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 759-69.
63. Ren, L., et al., *Substrate Specificity of Protein Tyrosine Phosphatases 1B, RPTPalpha, SHP-1, and SHP-2*. Biochemistry. **50**(12): p. 2339-56.
64. Tsuda, M., et al., *Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13223-9.
65. Lee, C.H., et al., *Crystal structures of peptide complexes of the amino-terminal SH2 domain of the Syp tyrosine phosphatase*. Structure, 1994. **2**(5): p. 423-38.
66. Wieligmann, K., L.F. Pineda De Castro, and M. Zacharias, *Molecular dynamics simulations on the free and complexed N-terminal SH2 domain of SHP-2*. In Silico Biol, 2002. **2**(3): p. 305-11.
67. Martinelli, S., et al., *Diverse driving forces underlie the invariant occurrence of the T42A, E139D, I282V and T468M SHP2 amino acid substitutions causing Noonan and LEOPARD syndromes*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(13): p. 2018-29.
68. Valius, M., C. Bazenet, and A. Kazlauskas, *Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64-kilodalton protein, respectively*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 133-43.
69. Agazie, Y.M. and M.J. Hayman, *Development of an efficient "substrate-trapping" mutant of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 and identification of the epidermal growth factor receptor, Gab1, and three other proteins as target substrates*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13952-8.
70. Bregeon, J., et al., *Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(5): p. C1062-70.
71. Keilhack, H., et al., *Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30984-93.
72. Barua, D., J.R. Faeder, and J.M. Haugh, *Structure-based kinetic models of modular signaling protein function: focus on Shp2*. Biophys J, 2007. **92**(7): p. 2290-300.
73. Noonan, J.A., *Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease*. Am J Dis Child, 1968. **116**(4): p. 373-80.
74. Noonan, J.A., *Noonan syndrome revisited*. J Pediatr, 1999. **135**(6): p. 667-8.
75. Noonan, J.A., *Noonan syndrome and related disorders: alterations in growth and puberty*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(4): p. 251-5.
76. Tartaglia, M., G. Zampino, and B.D. Gelb, *Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis*. Mol Syndromol, 2010. **1**(1): p. 2-26.
77. Tartaglia, M., et al., *Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 465-8.

78. Zenker, M., et al., *Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome*. J Pediatr, 2004. **144**(3): p. 368-74.
79. Tartaglia, M., et al., *PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(6): p. 1555-63.
80. Mohi, M.G., et al., *Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 179-91.
81. Schubbert, S., et al., *Functional analysis of leukemia-associated PTPN11 mutations in primary hematopoietic cells*. Blood, 2005. **106**(1): p. 311-7.
82. Tartaglia, M., et al., *Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 148-50.
83. Fragale, A., et al., *Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation*. Hum Mutat, 2004. **23**(3): p. 267-77.
84. O'Reilly, A.M., et al., *Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 299-311.
85. Uhlen, P., et al., *Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2160-5.
86. Araki, T., et al., *Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 849-57.
87. Nakamura, T., et al., *Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2123-32.
88. Digilio, M.C., et al., *Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(2): p. 389-94.
89. Kalidas, K., et al., *Genetic heterogeneity in LEOPARD syndrome: two families with no mutations in PTPN11*. J Hum Genet, 2005. **50**(1): p. 21-5.
90. Yoshida, R., et al., *Two novel and one recurrent PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome*. Am J Med Genet A, 2004. **130A**(4): p. 432-4.
91. Kontaridis, M.I., et al., *PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6785-92.
92. Chan, R.J. and G.S. Feng, *PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase*. Blood, 2007. **109**(3): p. 862-7.
93. Loh, M.L., et al., *Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2325-31.
94. Bentires-Alj, M., et al., *Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8816-20.
95. Higashi, H., et al., *Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17205-16.
96. Edouard, T., et al., *How do Shp2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms?* Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(13): p. 1585-90.
97. Rigbolt, K.T., J.T. Vanselow, and B. Blagoev, *GProX, a User-Friendly Platform for Bioinformatics Analysis and Visualization of Quantitative Proteomics Data*. Mol Cell Proteomics, 2011.
98. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
99. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
100. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
101. Ong, S.E., I. Kratchmarova, and M. Mann, *Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. J Proteome Res, 2003. **2**(2): p. 173-81.
102. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

103. Walther, T.C. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics in cell biology*. J Cell Biol, 2010. **190**(4): p. 491-500.
104. Hubner, N.C., S. Ren, and M. Mann, *Peptide separation with immobilized pl strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis*. Proteomics, 2008. **8**(23-24): p. 4862-72.
105. Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann, *Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics*. Anal Chem, 2003. **75**(3): p. 663-70.
106. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
107. Cox, J., et al., *A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 698-705.
108. Sugimoto, S., et al., *Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13614-22.
109. Anhuf, D., et al., *Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2535-43.
110. Lehmann, U., et al., *SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 661-71.
111. Stahl, N., et al., *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1349-53.
112. Kazlauskas, A., et al., *The 64-kDa protein that associates with the platelet-derived growth factor receptor beta subunit via Tyr-1009 is the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 6939-43.
113. Lechleider, R.J., et al., *Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21478-81.
114. Ronnstrand, L., et al., *SHP-2 binds to Tyr763 and Tyr1009 in the PDGF beta-receptor and mediates PDGF-induced activation of the Ras/MAP kinase pathway and chemotaxis*. Oncogene, 1999. **18**(25): p. 3696-702.
115. Günther, J., *Funktionelle Analyse der SH2-Domänen der Proteinphosphatase SHP2 im Kontext der IL-6 Signaltransduktion*, in Institut für Biochemie und Molekularbiologie. 2010, RWTH Aachen University: Aachen.
116. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(2): p. 440-5.
117. Boeri Erba, E., et al., *Systematic analysis of the epidermal growth factor receptor by mass spectrometry reveals stimulation-dependent multisite phosphorylation*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(8): p. 1107-21.
118. Huyer, G., et al., *Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 843-51.
119. Kwon, M., et al., *Recruitment of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain tyrosine phosphatase-2 to the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase is required for insulin-like growth factor-I-dependent PI-3 kinase activation in smooth muscle cells*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1458-65.
120. Argetsinger, L.S., et al., *Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29415-21.
121. Tomic, S., et al., *Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21277-84.
122. Feng, G.S. and T. Pawson, *Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction*. Trends Genet, 1994. **10**(2): p. 54-8.
123. Agazie, Y.M. and M.J. Hayman, *Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7875-86.
124. Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann, *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0008.

125. Fixman, E.D., et al., *Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13116-22.
126. Miao, H., et al., *Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 62-9.
127. Bertotti, A., P.M. Comoglio, and L. Trusolino, *Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 993-1003.
128. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology*. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
129. Pawson, T., G.D. Gish, and P. Nash, *SH2 domains, interaction modules and cellular wiring*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 504-11.
130. Russell, R.B., J. Breed, and G.J. Barton, *Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains*. FEBS Lett, 1992. **304**(1): p. 15-20.
131. Schwartz, D. and S.P. Gygi, *An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1391-8.
132. Imhof, D., et al., *Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 position*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20271-82.
133. Schneider, T.D. and R.M. Stephens, *Sequence logos: a new way to display consensus sequences*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(20): p. 6097-100.
134. Huang, H., et al., *Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(4): p. 768-84.
135. Li, L., et al., *Prediction of phosphotyrosine signaling networks using a scoring matrix-assisted ligand identification approach*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(10): p. 3263-73.
136. Arakawa, K., et al., *KEGG-based pathway visualization tool for complex omics data*. In Silico Biol, 2005. **5**(4): p. 419-23.
137. Kanehisa, M., *The KEGG database*. Novartis Found Symp, 2002. **247**: p. 91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52.
138. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 27-30.
139. Kanehisa, M., et al., *The KEGG resource for deciphering the genome*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D277-80.
140. Futschik, M.E. and B. Carlisle, *Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data*. J Bioinform Comput Biol, 2005. **3**(4): p. 965-88.
141. Fisher, E.A., *The New Garbage Reduction Works at Rochester*, N. Y. Am J Public Health (N Y), 1922. **12**(3): p. 222-5.
142. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society, 1995. **57**: p. 289-300.
143. Bennett, A.M., et al., *Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7335-9.
144. Berchtold, S., et al., *Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(4): p. 556-67.
145. Maegawa, H., et al., *Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30236-43.
146. Reeves, S.A., et al., *An alternative role for the src-homology-domain-containing phosphotyrosine phosphatase (SH-PTP2) in regulating epidermal-growth-factor-dependent cell growth*. Eur J Biochem, 1995. **233**(1): p. 55-61.
147. Symes, A., et al., *The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression*. Curr Biol, 1997. **7**(9): p. 697-700.
148. Hausdorff, S.F., et al., *Different signaling roles of SHPTP2 in insulin-induced GLUT1 expression and GLUT4 translocation*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12965-8.
149. Carpenter, L.R., et al., *Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6061-6.
150. Lechleider, R.J., R.M. Freeman, Jr., and B.G. Neel, *Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of the human corkscrew homologue, SH-PTP2*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13434-8.

151. Tauchi, T., et al., *Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4495-501.
152. Zhang-Sun, G., et al., *A 60-kilodalton protein in rat hepatoma cells overexpressing insulin receptor was tyrosine phosphorylated and associated with Syp, phosphatidylinositol 3-kinase, and Grb2 in an insulin-dependent manner*. Endocrinology, 1996. **137**(7): p. 2649-58.
153. Blagoev, B., et al., *A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 315-8.
154. Rotin, D., et al., *SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor: identification of Tyr992 as the high-affinity binding site for SH2 domains of phospholipase C gamma*. EMBO J, 1992. **11**(2): p. 559-67.
155. Pandey, A., et al., *Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 179-84.
156. Kuriyan, J. and D. Cowburn, *Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997. **26**: p. 259-88.
157. Lin, H.Y., L.M. Ballou, and R.Z. Lin, *Stimulation of the alpha1A adrenergic receptor inhibits PDGF-induced PDGF beta receptor Tyr751 phosphorylation and PI 3-kinase activation*. FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 106-10.
158. Clahsen, T., et al., *The tyrosine 974 within the LIF-R-chain of the gp130/LIF-R heteromeric receptor complex mediates negative regulation of LIF signalling*. Cell Signal, 2005. **17**(5): p. 559-69.
159. Chughtai, N., et al., *Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31107-14.
160. Case, R.D., et al., *SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10467-74.
161. Famiglietti, S.J., K. Nakamura, and J.C. Cambier, *Unique features of SHIP, SHP-1 and SHP-2 binding to FcgammaRIIb revealed by surface plasmon resonance analysis*. Immunol Lett, 1999. **68**(1): p. 35-40.
162. Jain, A., et al., *Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 484-8.
163. Sweeney, M.C., et al., *Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains*. Biochemistry, 2005. **44**(45): p. 14932-47.
164. Rodriguez, M., et al., *An oriented peptide array library (OPAL) strategy to study protein-protein interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8802-7.
165. Songyang, Z., et al., *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, 1993. **72**(5): p. 767-78.
166. Cochrane, D., et al., *Identification of natural ligands for SH2 domains from a phage display cDNA library*. J Mol Biol, 2000. **297**(1): p. 89-97.
167. Machida, K., et al., *High-throughput phosphotyrosine profiling using SH2 domains*. Mol Cell, 2007. **26**(6): p. 899-915.
168. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
169. Park, D. and Y. Yun, *Tyrosine phosphorylation-dependent yeast two-hybrid system for the identification of the SH2 domain-binding proteins*. Mol Cells, 2001. **12**(2): p. 244-9.
170. Rocchi, S., et al., *Interaction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor: studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system*. Endocrinology, 1996. **137**(11): p. 4944-52.
171. Lamothe, B., et al., *Reexamining interaction of the SH2 domains of SYP and GAP with insulin and IGF-1 receptors in the two-hybrid system*. Gene, 1996. **182**(1-2): p. 77-80.
172. Gu, H., J.D. Griffin, and B.G. Neel, *Characterization of two SHP-2-associated binding proteins and potential substrates in hematopoietic cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16421-30.
173. Minoo, P., et al., *The adaptor function of SHP-2 downstream of the prolactin receptor is required for the recruitment of p29, a substrate of SHP-2*. Cell Signal, 2003. **15**(3): p. 319-26.

174. Tauchi, T., et al., *The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 25206-11.
175. Miller, M.L., et al., *Motif decomposition of the phosphotyrosine proteome reveals a new N-terminal binding motif for SHIP2*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(1): p. 181-92.
176. Pei, D. and A.S. Wavreille, *Reverse interactomics: decoding protein-protein interactions with combinatorial peptide libraries*. Mol Biosyst, 2007. **3**(8): p. 536-41.
177. Wavreille, A.S., et al., *Defining SH2 domain and PTP specificity by screening combinatorial peptide libraries*. Methods, 2007. **42**(3): p. 207-19.
178. Yaoi, T., et al., *Src homology 2 domain-based high throughput assays for profiling downstream molecules in receptor tyrosine kinase pathways*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(5): p. 959-68.
179. Yaoi, T., X. Jiang, and X. Li, *Development of a fluorescent microsphere-based multiplexed high-throughput assay system for profiling of transcription factor activation*. Assay Drug Dev Technol, 2006. **4**(3): p. 285-92.
180. Jones, R.B., et al., *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.
181. Bae, J.H., et al., *The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site*. Cell, 2009. **138**(3): p. 514-24.
182. Sharma, K., et al., *Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts*. Nat Methods, 2009. **6**(10): p. 741-4.
183. Olsen, J.V., S.E. Ong, and M. Mann, *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-14.
184. Lamb, J. and D.N. Wheatley, *Single amino acid (arginine) deprivation induces G1 arrest associated with inhibition of cdk4 expression in cultured human diploid fibroblasts*. Exp Cell Res, 2000. **255**(2): p. 238-49.
185. Scott, L., et al., *Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells*. Br J Cancer, 2000. **83**(6): p. 800-10.
186. Wheatley, D.N., et al., *Single amino acid (arginine) restriction: growth and death of cultured HeLa and human diploid fibroblasts*. Cell Physiol Biochem, 2000. **10**(1-2): p. 37-55.
187. Makarov, A., et al., *Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom, 2006. **17**(7): p. 977-82.
188. Olsen, J.V., et al., *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(12): p. 2010-21.
189. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
190. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
191. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1156-62.
192. Huyer, G. and C. Ramachandran, *The specificity of the N-terminal SH2 domain of SHP-2 is modified by a single point mutation*. Biochemistry, 1998. **37**(9): p. 2741-7.
193. Krady, M.M., A.N. Malviya, and J.L. Dupont, *Pervanadate-triggered MAP kinase activation and cell proliferation are not sensitive to PD 98059. Evidence for stimulus-dependent differential PD 98059 inhibition mechanism*. FEBS Lett, 1998. **434**(3): p. 241-4.
194. Shisheva, A. and Y. Shechter, *Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin-activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect*. Endocrinology, 1993. **133**(4): p. 1562-8.
195. Tsiani, E., N. Abdullah, and I.G. Fantus, *Insulin-mimetic agents vanadate and pervanadate stimulate glucose but inhibit amino acid uptake*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C156-62.
196. Schmitz, J., et al., *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
197. Wu, T.R., et al., *SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47572-80.
198. Jakob, S., et al., *Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33155-61.

199. Xu, R., et al., *Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3142-9.
200. Salvi, M., et al., *Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(18): p. 2393-404.
201. Lee, I., et al., *A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(2): p. 275-83.
202. Arachiche, A., et al., *Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24406-11.
203. Breus, O., et al., *CoA Synthase is phosphorylated on tyrosines in mammalian cells, interacts with and is dephosphorylated by Shp2PTP*. Mol Cell Biochem, 2009. **335**(1-2): p. 195-202.
204. Chueh, F.Y., K.F. Leong, and C.L. Yu, *Mitochondrial translocation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in leukemic T cells and cytokine-stimulated cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **402**(4): p. 778-83.
205. Chueh, F.Y., et al., *Nuclear localization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), a mitochondrial enzyme, and its role in signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)-dependent gene transcription*. Cell Signal, 2011. **23**(7): p. 1170-8.
206. Hwang, P.M., et al., *A "three-pronged" binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome*. EMBO J, 2002. **21**(3): p. 314-23.
207. Qin, C., A.S. Wavreille, and D. Pei, *Alternative mode of binding to phosphotyrosyl peptides by Src homology-2 domains*. Biochemistry, 2005. **44**(36): p. 12196-202.
208. Vely, F., et al., *Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1994-2000.
209. De Souza, D., et al., *SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities*. Biochemistry, 2002. **41**(29): p. 9229-36.
210. Keshava Prasad, T.S., et al., *Human Protein Reference Database--2009 update*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D767-72.
211. O'Reilly, A.M. and B.G. Neel, *Structural determinants of SHP-2 function and specificity in Xenopus mesoderm induction*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 161-77.
212. Jackson, D.E., K.R. Kupcho, and P.J. Newman, *Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, SHP-2*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24868-75.
213. Milarski, K.L. and A.R. Saltiel, *Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21239-43.
214. Chu, W.K., et al., *Transcriptional activity of the DeltaNp63 promoter is regulated by STAT3*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7328-37.
215. Dudka, A.A., S.M. Sweet, and J.K. Heath, *Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3391-401.
216. Duechting, A., et al., *Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7942-52.
217. Kim, Y.R., et al., *Modulatory role of phospholipase D in the activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 by thyroid oncogenic kinase RET/PTC*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 144.
218. Nadiminty, N., et al., *LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(2): p. 379-84.
219. Zoubaidi, A., et al., *The Fer tyrosine kinase cooperates with interleukin-6 to activate signal transducer and activator of transcription 3 and promote human prostate cancer cell growth*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(1): p. 142-55.
220. Rivat, C., et al., *Disruption of STAT3 signaling leads to tumor cell invasion through alterations of homotypic cell-cell adhesion complexes*. Oncogene, 2004. **23**(19): p. 3317-27.
221. Ohtani, T., et al., *Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 95-105.

222. Zhang, W., et al., *Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22353-63.
223. Gunaje, J.J. and G.J. Bhat, *Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(1): p. 252-7.
224. Kim, D.J., M.L. Tremblay, and J. Digiovanni, *Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10290.
225. Tartaglia, M., et al., *Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia*. Blood, 2004. **104**(2): p. 307-13.
226. Tartaglia, M., et al., *SHP-2 and myeloid malignancies*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(1): p. 44-50.
227. Bard-Chapeau, E.A., et al., *Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis*. Cancer Cell, 2011. **19**(5): p. 629-39.
228. Wong, L. and G.R. Johnson, *Epidermal growth factor induces coupling of protein-tyrosine phosphatase 1D to GRB2 via the COOH-terminal SH3 domain of GRB2*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 20981-4.
229. Tartaglia, M. and B.D. Gelb, *Germ-line and somatic PTPN11 mutations in human disease*. Eur J Med Genet, 2005. **48**(2): p. 81-96.
230. Niihori, T., et al., *Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia*. J Hum Genet, 2005. **50**(4): p. 192-202.
231. Chan, R.J., et al., *Human somatic PTPN11 mutations induce hematopoietic-cell hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3737-42.
232. Krenz, M., K.E. Yutzey, and J. Robbins, *Noonan syndrome mutation Q79R in Shp2 increases proliferation of valve primordia mesenchymal cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. 813-20.
233. Yu, W.M., et al., *Effects of a leukemia-associated gain-of-function mutation of SHP-2 phosphatase on interleukin-3 signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5426-34.
234. Eminaga, S. and A.M. Bennett, *Noonan syndrome-associated SHP-2/Ptpn11 mutants enhance SIRPalpha and PZR tyrosyl phosphorylation and promote adhesion-mediated ERK activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15328-38.
235. Zhao, R., et al., *Blocking the function of tyrosine phosphatase SHP-2 by targeting its Src homology 2 domains*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42893-8.
236. Tartaglia, M., et al., *Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease*. Am J Hum Genet, 2006. **78**(2): p. 279-90.
237. Schrick, C., et al., *N-cadherin regulates cytoskeletally associated IQGAP1/ERK signaling and memory formation*. Neuron, 2007. **55**(5): p. 786-98.
238. Barrow, A.D., et al., *Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5838-42.
239. Hagiwara, Y., et al., *SHP2-mediated signaling cascade through gp130 is essential for LIF-dependent I CaL, [Ca2+]i transient, and APD increase in cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(6): p. 710-6.
240. Wang, Q., et al., *SHP-2 modulates interleukin-1-induced Ca2+ flux and ERK activation via phosphorylation of phospholipase Cgamma1*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8397-406.
241. Wang, Q., et al., *Phosphorylation of SHP-2 regulates interactions between the endoplasmic reticulum and focal adhesions to restrict interleukin-1-induced Ca2+ signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 31093-105.

In den massenspektrometrischen Experimenten identifizierte Proteine (dargestellt mittels Gennamen).

156

Anhang

BPNT1		X	X	CD59	X	X	CPSF7		X	X
BPTF	X			CD63	X	X	CPT1A	X	X	X
BRE	X			CD70	X	X	CPT2		X	X
BRI3BP	X		X	CD81	X		CRYZ	X	X	X
BRIX1	X	X		CDC16	X	X	CS	X	X	X
BSG	X		X	CDC27	X	X	CSDE1		X	
BST2	X	X	X	CDC42	X	X	CSE1L	X	X	X
BUB3	X	X	X	CDC73	X	X	CSNK1A1	X		X
BYSL	X	X	X	CDCP1	X	X	CSNK1D	X		X
BZW1	X	X	X	CDH2	X	X	CSNK2A1	X	X	X
BZW2		X	X	CDK1	X	X	CSNK2A2	X	X	X
C12orf10		X	X	CDK9	X	X	CSNK2B	X		X
C14orf166		X	X	CDKN2A		X	CSTF1	X	X	
C14orf21	X			CDYL	X	X	CSTF3	X	X	X
C15orf57		X		CEBPZ	X	X	CTBP1		X	X
C16orf80		X	X	CECR5		X	CTNNA1	X	X	X
C18orf55	X	X	X	CFL1	X	X	CTNNB1	X	X	X
C19orf21	X		X	CFL2		X	CTNND1	X	X	X
C1orf57	X	X	X	CHCHD3	X	X	CTPS	X	X	X
C1orf58		X		CHD4	X	X	CTR9	X		X
C1QBP	X	X	X	CHERP		X	CTSA	X		
C20orf3	X	X		CHORDC1	X	X	CTSD	X	X	X
C22orf28	X	X	X	CHP	X		CTSZ		X	
C3orf26		X	X	CIRH1A	X	X	CUL1	X		X
C5orf33		X		CISD1	X	X	CUL3	X	X	X
C8orf55		X	X	CKAP4	X	X	CUL4A	X	X	X
C9orf114	X		X	CKAP5	X	X	CUL4B	X	X	X
C9orf64		X		CKB		X	CXADR	X		
CA12	X			CLASP1	X	X	CYB5B	X	X	X
CAB39		X	X	CLIC1	X	X	CYB5R3	X	X	X
CACYBP	X	X	X	CLIC4	X	X	CYC1	X	X	X
CAD	X	X	X	CLPB		X	CYFIP1	X		X
CALR	X			CLPP	X	X	CYP51A1	X		X
CAND1	X	X	X	CLPTM1	X	X	DAD1	X	X	X
CANX	X	X	X	CLPTM1L	X	X	DAG1	X		X
CAP1	X		X	CLPX	X	X	DAGLB		X	X
CAP1	X	X	X	CLTC	X	X	DAK		X	
CAPN1	X	X	X	CLU	X	X	DAP3	X	X	X
CAPN2	X	X	X	CMBL		X	DARS	X	X	X
CAPNS1		X	X	CMPK1		X	DARS2	X		X
CAPRIN1		X	X	CNDP2	X	X	DCAF13	X	X	
CAPZA1	X	X	X	CNIH4	X		DCAKD	X		
CAPZA2	X		X	CNOT1	X	X	DCBLD1	X		X
CAPZB	X	X	X	CNP	X	X	DCTN1	X	X	X
CARM1	X	X	X	CNPY2	X	X	DCTN4	X		X
CARS	X	X		CNTNAP1	X	X	DCUN1D1		X	
CASK		X	X	COASY		X	DDB2	X		X
CASP8		X		COL12A1		X	DDOST	X	X	X
CAT		X	X	COMT	X	X	DDX1	X	X	X
CAV1	X		X	COPA	X	X	DDX17	X	X	X
CBS		X		COPB1	X	X	DDX18	X	X	X
CBX5	X	X	X	COPB2	X	X	DDX19A	X	X	X
CCDC109A		X		COPG	X	X	DDX21	X	X	X
CCDC127		X	X	COPS2	X	X	DDX23	X	X	X
CCDC47	X	X	X	COPS5	X	X	DDX24	X		X
CCDC51	X	X	X	COPS6		X	DDX27	X	X	X
CCDC59	X		X	COPS8		X	DDX31	X		X
CCNB1	X	X	X	COPZ1	X	X	DDX39	X	X	X
CCT2	X	X	X	CORO1C	X	X	DDX3X	X	X	X
CCT3	X	X	X	COTL1		X	DDX42		X	X
CCT4	X	X	X	COX2	X	X	DDX46	X	X	X
CCT5	X	X	X	COX4I1	X	X	DDX47	X		X
CCT6A	X	X	X	COX7A2	X	X	DDX49	X		X
CCT7	X	X	X	CPM		X	DDX5	X	X	X
CCT8	X	X	X	CPNE1	X	X	DDX52	X		
CD276	X		X	CPNE3	X	X	DDX54	X		X
CD44	X	X	X	CPS1	X	X	DDX56	X	X	X
CD46	X			CPSF1	X		DDX6	X	X	X
CD55	X	X		CPSF6		X	DECR2	X		

Anhang

DEK		X	X	EGFR	X	X	X	FAF2	X	X	X
DGAT1	X			EHD1		X	X	FAM120A	X	X	X
DHCR24	X		X	EHD2	X		X	FAM129B	X	X	
DHRS7	X			EHD4	X	X	X	FAM49B	X	X	X
DHRS7B		X	X	EIF1		X	X	FAM50A		X	
DHX15	X	X	X	EIF2A	X	X	X	FAM82A2		X	X
DHX16	X		X	EIF2AK2	X	X	X	FAM98A	X	X	X
DHX29	X	X	X	EIF2B1		X	X	FAM98B	X		X
DHX30	X	X	X	EIF2B4	X		X	FANCD2	X		
DHX36	X	X	X	EIF2B5	X	X		FANCI	X	X	X
DHX9	X	X	X	EIF2S1	X	X	X	FARP1	X	X	X
DIAPH1	X	X	X	EIF2S2	X			FARSA	X	X	X
DIMT1L	X	X	X	EIF2S3	X	X	X	FARSB	X	X	X
DIS3	X	X	X	EIF3A	X	X	X	FASN	X	X	X
DKC1	X	X	X	EIF3B	X	X	X	FBL	X	X	X
DLAT	X		X	EIF3CL	X	X	X	FDPS	X	X	X
DLD	X	X	X	EIF3D	X	X	X	FECH	X		X
DLST		X	X	EIF3E		X	X	FEN1	X	X	X
DNAJA1	X	X	X	EIF3F	X	X		FERMT2	X	X	X
DNAJA2		X	X	EIF3H	X	X		FH	X	X	X
DNAJA3	X	X	X	EIF3I	X	X	X	FHOD1	X		X
DNAJB11		X	X	EIF3J		X	X	FIS1		X	
DNAJC10	X	X	X	EIF3K	X	X	X	FKBP2	X	X	
DNAJC11	X		X	EIF3L	X	X		FKBP3		X	X
DNAJC13		X		EIF3M		X	X	FKBP4	X	X	X
DNAJC2	X	X	X	EIF4A1	X	X	X	FKBP8	X		
DNAJC3		X		EIF4A3	X	X	X	FLII	X	X	X
DNAJC5	X		X	EIF4G1	X	X	X	FLJ16223		X	
DNAJC7	X	X	X	EIF4G2	X	X	X	FLNA	X	X	X
DNAJC9	X			EIF5A	X		X	FLNB	X	X	X
DNM1L	X	X	X	EIF5B	X	X	X	FLOT1	X	X	X
DNM2	X	X	X	EIF6	X	X	X	FLOT2	X	X	X
DNMBP	X			ELAC2	X		X	FMNL1	X		X
DNMT1	X		X	ELAVL1		X	X	FOLR1	X		X
DNPEP	X	X	X	ELOVL5	X			FRG1	X		X
DNTTIP2	X		X	ELP3	X			FSCN1	X	X	X
DOCK5	X		X	EMD	X	X	X	FTH1		X	X
DPM1	X	X	X	ENAH		X	X	FTSJ3	X	X	X
DPP3	X	X	X	ENG	X		X	FUBP3		X	X
DPP9		X		ENO1	X	X	X	FUS		X	X
DPYSL2	X	X	X	EPB41L1		X	X	FXR1		X	X
DPYSL2	X	X	X	EPHA2	X		X	G3BP1		X	X
DPYSL3	X	X		EPHB4	X		X	G3BP2		X	X
DRG1	X	X	X	EPHX1	X	X	X	G6PC3	X		
DRG2	X	X	X	EPPK1	X	X	X	G6PD	X	X	X
DSG1	X		X	EPRS	X	X	X	GALK1		X	
DSG2	X	X	X	ERBB2IP	X		X	GALNT1	X	X	X
DSP	X	X	X	ERGIC1	X	X	X	GALNT2	X	X	X
DST	X		X	ERGIC3	X		X	GALNT7	X	X	X
DTYMK		X	X	ERH	X		X	GANAB	X	X	
DYNC1H1	X	X	X	ERLIN1	X	X	X	GANAB		X	
DYNC1LI1	X	X	X	ERLIN2	X	X	X	GAPDH	X		
DYNC1LI2		X	X	ERMP1	X	X	X	GAPDH	X	X	
DYNLL1	X	X	X	ERO1L		X	X	GAPVD1	X	X	X
EBNA1BP2	X	X	X	ERP44		X	X	GAR1	X	X	X
EBP	X			ESYT1	X	X		GARS	X	X	X
ECE1	X	X	X	ESYT2	X	X		GART	X	X	X
ECH1	X	X	X	ETF1	X	X	X	GBA	X	X	X
ECHDC1		X		ETFA	X	X	X	GBAS		X	X
ECHS1	X	X	X	ETFB	X	X	X	GBE1	X	X	X
EDIL3	X	X	X	EXOC4	X		X	GBF1	X	X	
EEF1A1	X	X	X	EXOSC10	X	X	X	GBP1		X	X
EEF1A2	X		X	EXOSC2		X	X	GCDH	X		
EEF1B2	X	X	X	EXOSC4		X	X	GCLM	X		X
EEF1D	X	X	X	EXOSC6	X	X		GCN1L1	X	X	X
EEF1E1	X	X	X	EXOSC9	X	X	X	GDI1	X	X	X
EEF1G	X	X	X	EZR	X	X	X	GDI2	X	X	X
EEF2	X	X	X	FADS1	X	X	X	GEMIN4	X	X	X
EFTUD2	X	X	X	FADS2	X	X	X	GEMIN5	X	X	X

Anhang

GFM1	X	X	X	HEATR2	X	HUWE1	X	X
GFPT1	X	X	X	HELLS	X	HYOU1	X	X X
GFPT2		X	X	HEXA	X	IARS	X	X X
GGH		X	X	HEXB	X	IARS2	X	X X
GLB1		X	X	HGS	X X	IDE		X X
GLG1	X		X	HIBADH	X X	IDH1	X	X X
GLRX3		X	X	HIBCH	X X	IDH3A	X	X X
GLS	X	X	X	HINT1	X X	IDH3B	X	X X
GLT25D1	X	X	X	HIST1H1B	X X X	IDH3G	X	X
GLUD1	X	X	X	HIST1H1E	X X X	IFI16	X	X
GLUL		X	X	HIST1H2BO	X X X	IGF2BP1	X	X X
GLYR1	X			HIST2H2AA4	X X	IGF2BP3	X	X X
GMDS	X	X	X	HIST2H2BF	X X	IGF2R	X	X X
GMPS	X	X	X	HIST2H3D	X X	IK		X X
GNA13	X	X	X	HIST2H3PS2	X X X	IKBIP	X	X
GNAI1	X		X	HIST2H4B	X X	IKBIP	X	
GNAI2	X	X	X	HK1	X X X	IKBKAP	X	X X
GNAI3	X	X	X	HK2	X X X	IL6ST	X	X
GNAS	X	X	X	HLA-A	X X X	ILF2	X	X X
GNB1	X	X	X	HLA-B	X X X	ILF3	X	X X
GNB2	X		X	HLTF	X X	IMMT	X	X X
GNB2L1	X	X	X	HM13	X X X	IMP3	X	X
GNE		X	X	HMGB1	X X	IMPA1		X X
GNG12		X	X	HMGB2	X X X	IMPA2		X X
GNL2		X	X	HMGCL	X	IMPAD1		X
GNL3	X	X	X	HMGCS1	X X	IMPDH1	X	X X
GNL3L	X			HMOX1	X X X	IMPDH2	X	X X
GNPDA1	X	X	X	HNRNPA0	X X X	INCENP	X	
GOLGA2		X	X	HNRNPA1	X X X	INF2	X	X
GOLGA7	X	X		HNRNPA2B1	X X X	INPPL1	X	X X
GOLGB1		X	X	HNRNPA3	X X X	INTS1	X	
GOLIM4		X	X	HNRNPAB	X X	INTS3	X	
GOT1	X	X	X	HNRNPC	X X X	INTS4	X	
GPAA1	X		X	HNRNPD	X X	IPO4	X	X
GPC1	X		X	HNRNPF	X X X	IPO5	X	X X
GPD2	X	X	X	HNRNPH1	X X X	IPO7	X	X X
GPI	X	X	X	HNRNPH2	X X X	IPO8	X	X X
GPS1	X	X	X	HNRNPK	X X X	IPO9	X	X X
GPX1	X	X	X	HNRNPL	X X X	IQGAP1	X	X X
GPX8	X			HNRNPM	X X X	IQGAP2	X	X
GRB2		X	X	HNRNPR	X X X	IRS2	X	X X
GRHPR	X	X	X	HNRNPU	X X X	ISG15		X X
GRPEL1		X		HNRNPUL1	X X X	ISOC1		X
GRWD1	X		X	HNRNPUL2	X X X	ITGA1	X	X
GSPT1	X	X	X	HNRPDL	X X	ITGA11	X	
GSR		X		HP1BP3	X X X	ITGA2	X	X X
GSTK1	X	X	X	HPRT1	X X X	ITGA3	X	X X
GSTM1	X	X	X	HRNR	X X	ITGA5		X X
GSTM3	X	X	X	HSD17B10	X X X	ITGA6	X	X X
GSTO1	X	X	X	HSD17B11	X X	ITGAV	X	X X
GSTP1	X	X	X	HSD17B12	X X	ITGB1	X	X X
GTF2I	X	X	X	HSD17B4	X X X	ITGB4	X	X X
GTF3C2	X			HSDL2	X X X	ITGB5	X	
GTF3C4	X		X	HSP90AA1	X X X	ITPR1	X	X X
GTF3C5	X		X	HSP90AB1	X X X	ITPR3	X	X X
GTPBP4	X		X	HSP90B1	X X X	ITPRIP	X	
H1FX	X	X	X	HSPA1A	X X	IVD	X	X
H2AFY	X	X	X	HSPA1A	X	JUP	X	X X
HADH	X	X	X	HSPA4	X X X	KARS	X	X X
HADHA	X	X	X	HSPA4L	X X X	KCTD12		X X
HADHB	X	X	X	HSPA5	X X X	KDELC1	X	
HARS	X	X	X	HSPA8	X X X	KDM1A	X	
HAT1	X	X	X	HSPA9	X X X	KDM2A	X	X
HAX1		X	X	HSPB1	X X X	KHDRBS1		X X
HBS1L	X	X	X	HSPD1	X X X	KIAA0020	X	X X
HCCS	X		X	HSPH1	X X X	KIAA0090	X	X X
HDAC2	X	X	X	HTATIP2	X X X	KIAA0368	X	X
HDLBP		X	X	HTRA1	X X	KIAA0664	X	X X
HEATR1	X	X	X	HTT	X	KIAA0776	X	

Anhang

KIAA1797		X	X	LPL		X	X	MMGT1		X		
KIAA1967	X	X	X	LRBA		X	X	MMS19			X	X
KIF20A	X		X	LRP1	X		X	MOBKL1A			X	
KIF23	X		X	LRP8	X		X	MOSPD2	X			X
KIF2A		X	X	LRPPRC	X	X	X	MPDU1			X	
KIF2C	X			LRRC40		X	X	MPST			X	
KIF4A	X			LRRC47	X	X	X	MPZL1			X	X
KIF5B	X	X	X	LRRC57	X	X	X	MRC2	X			X
KIFC1	X			LRRC59	X	X	X	MRE11A			X	X
KIRREL	X	X	X	LRRC8A	X		X	MRP63	X			X
KLC1	X	X	X	LRRC8D	X	X	X	MRPL1			X	X
KPNA1	X			LRRCC1		X	X	MRPL14	X			X
KPNA2	X	X	X	LSM2		X	X	MRPL15			X	X
KPNA3	X	X	X	LSM4	X		X	MRPL19			X	X
KPNA4	X	X		LSS	X		X	MRPL22	X			X
KPNA6	X	X	X	LTA4H	X	X	X	MRPL23	X			X
KPNB1	X	X	X	LUC7L2		X	X	MRPL37	X	X	X	
KRAS		X	X	LUC7L2		X	X	MRPL38	X	X	X	
KRR1		X	X	LUC7L3		X		MRPL43	X	X	X	
KRT1		X	X	LUZP1	X	X	X	MRPL45	X			X
KRT17	X	X		LYRM7		X		MRPL46			X	X
KRT18	X	X	X	MACF1		X	X	MRPL9			X	X
KRT19	X			MAGED2		X	X	MRPS34	X			X
KRT7	X	X	X	MAGOHB	X	X	X	MRPS7	X	X	X	
KTN1	X	X	X	MAGT1		X	X	MRPS9	X			X
KYNU	X	X	X	MAK16		X	X	MRT04	X	X	X	
L1CAM	X	X	X	MAN2A1		X	X	MSH2	X	X	X	
LAMA5	X	X	X	MANF	X			MSH6	X	X	X	
LAMC1		X	X	MAP1B	X	X	X	MSI2	X			
LAMP1		X	X	MAP1S	X			MSN	X	X	X	
LAMP2		X	X	MAP2K2	X		X	MST4			X	X
LANCL1		X	X	MAP4		X	X	MTA2	X	X	X	
LAP3	X	X	X	MAP7		X	X	MTAP	X	X	X	
LARP1		X	X	MAPK1	X	X	X	MTCH1	X			X
LARS	X	X	X	MAPK14		X	X	MTCH2	X	X	X	
LAS1L	X		X	MAPKAPK2		X		MTDH	X	X	X	
LASS2		X	X	MARS	X	X	X	MTHFD1	X	X	X	
LBR	X	X	X	MAT2A	X	X	X	MTHFD1L	X	X	X	
LCLAT1	X	X	X	MAT2B		X	X	MTOR	X	X		
LDHA	X	X	X	MATR3	X	X	X	MUC1	X			X
LDHB	X	X	X	MBOAT7	X			MVP			X	X
LDLR	X	X	X	MCAM	X	X	X	MYADM	X			X
LEMD2	X			MCCC2	X	X	X	MYBBP1A	X	X	X	
LEPRE1		X	X	MCM2	X	X	X	MYH10	X			X
LETM1	X	X	X	MCM3	X	X	X	MYH9	X	X	X	
LGALS1		X	X	MCM4	X	X	X	MYL12A	X	X		
LIG3	X		X	MCM5	X	X	X	MYL6B	X	X		
LIMCH1		X	X	MCM6	X	X	X	MYO18A	X			X
LLPH		X		MCM7	X	X	X	MYO1B	X	X	X	
LMAN1	X	X	X	MCTS1	X	X	X	MYO1C	X	X	X	
LMAN2	X	X	X	MDC1	X		X	MYO1E	X	X	X	
LMNA	X	X	X	MDH1	X	X	X	MYOF	X	X	X	
LMNB1	X	X	X	MDH2	X	X	X	NAA10	X	X		
LMNB2	X	X	X	MDN1	X		X	NAA15	X	X		
LMO7	X	X	X	ME2		X	X	NAA25			X	
LNPEP	X	X	X	MEPCE	X		X	NAA50			X	
LOC100131294	X			MET	X		X	NACA			X	X
LOC100290337	X	X		METAP1	X		X	NAE1			X	
LOC150786	X			METAP2	X		X	NAMPT	X	X	X	
LOC642393		X		MFF	X	X	X	NANS			X	X
LOC643576	X	X		MFN2		X	X	NAP1L1	X	X	X	
LOC645139	X	X		MGAT2		X	X	NAP1L4			X	
LOC646821	X			MGST1	X		X	NAPA			X	X
LOC650517	X	X		MGST2		X		NARS	X	X	X	
LOC653877	X			MGST3	X			NASP			X	X
LOC730732	X	X		MIER1	X		X	NAT10	X	X	X	
LONP1	X	X	X	MKI67	X		X	NBN	X			
LPCAT1	X	X	X	MKI67IP	X	X	X	NCAPD2	X	X	X	
LPCAT3	X	X	X	MLEC	X		X	NCAPG	X			X

Anhang

NCBP1	X	X	X	NUP188	X		PDIA4	X	X	X
NCEH1	X			NUP205	X	X	PDIA6	X	X	X
NCKAP1	X	X	X	NUP210	X	X	PDLIM5	X	X	X
NCLN	X	X	X	NUP214	X	X	PDLIM7		X	X
NCOA5		X	X	NUP35		X	PDS5A	X	X	X
NDUFA10	X		X	NUP43		X	PDS5B	X		X
NDUFA13	X		X	NUP62		X	PDXDC1	X	X	X
NDUFA4	X		X	NUP85	X	X	PECI	X	X	X
NDUFA6	X	X	X	NUP88		X	PES1	X	X	X
NDUFA9	X		X	NUP93	X	X	PFAS	X	X	X
NDUFB10	X		X	NUP98	X	X	PFKL	X		X
NDUFB9	X			NXF1	X	X	PFKM	X	X	X
NDUFS1	X	X	X	OAS3		X	PFKP	X	X	X
NDUFS2		X	X	OGDH	X	X	PFN1	X	X	X
NDUFS3	X	X	X	OGFR	X		PGAM5	X	X	X
NDUFS7	X		X	OGT	X	X	PGD	X	X	X
NFIB		X		OLA1	X	X	PGK1	X	X	X
NFKB2		X	X	OPA1		X	PGM1	X	X	X
NFS1		X		ORC3L	X	X	PGP		X	
NGDN		X	X	ORC4L		X	PGRMC1		X	X
NHLRC2		X	X	OSBP		X	PGRMC2	X	X	X
NHP2L1		X	X	OSBPL8	X	X	PHB	X	X	X
NIP7	X		X	OSBPL9	X	X	PHB2	X	X	X
NIPBL	X		X	OSGEP	X		PHGDH	X	X	X
NIT2	X			OSTC	X		PHIP	X		
NKRF	X		X	OTUB1	X	X	PIGK		X	X
NLE1		X		OXA1L	X	X	PIGT	X		X
NLN		X		OXCT1	X	X	PIK3R1	X		X
NMD3	X			P4HA1		X	PIK3R2		X	X
NME1		X	X	P4HB		X	PITPNB	X		X
NME1-NME2	X	X	X	PA2G4	X	X	PITRM1	X	X	X
NME3		X	X	PABPC1	X	X	PKM2	X	X	
NMT1	X	X	X	PABPC4		X	PKM2		X	
NNT	X	X	X	PACSIN2		X	PKN2	X	X	X
NOC3L	X		X	PACSIN3		X	PKP4	X	X	X
NOC4L	X	X	X	PAFAH1B1	X	X	PLA2G4A	X	X	X
NOL10	X	X	X	PAFAH1B3		X	PLAA	X	X	
NOL11	X	X		PAICS	X	X	PLAUR	X		
NOL6	X		X	PAK1IP1	X		PLD3		X	X
NOL9	X	X	X	PAPSS1		X	PLEC	X	X	
NOLC1	X	X	X	PAPSS2		X	PLEC		X	
NOMO2	X	X	X	PARD3		X	PLEKHA2	X		
NONO	X	X	X	PARK7		X	PLOD1	X	X	X
NOP14	X		X	PARN	X	X	PLOD2	X		X
NOP2	X	X	X	PARP1	X	X	PLOD3	X	X	X
NOP56	X	X	X	PARVA	X	X	PLRG1		X	X
NOP58	X	X	X	PBRM1	X		PLS3	X	X	X
NPC2	X			PBX1	X		PLXNB2	X	X	X
NPEPPS	X	X	X	PBXIP1		X	PMM2		X	X
NPM1	X	X	X	PC	X	X	PMPCA	X	X	X
NPTN		X	X	PCBP1	X	X	PMPCB	X	X	X
NQO1	X	X	X	PCBP2	X	X	PNN		X	X
NR3C1	X			PCDH7	X	X	PNP	X	X	
NRD1		X	X	PCID2	X	X	PNPT1	X	X	X
NRM	X			PCK2	X	X	POFUT1	X	X	X
NSDHL	X	X	X	PCMT1	X	X	POLA1	X		
NSF	X	X	X	PCNA	X	X	POLD1	X	X	X
NSUN2	X	X	X	PCYOX1	X	X	POLDIP2		X	X
NSUN4	X			PDCD10		X	POLR1A	X		
NT5DC2	X			PDCD11	X	X	POLR1B	X		X
NUDC		X	X	PDCD6	X	X	POLR1C	X	X	
NUDCD1		X		PDCD6IP	X	X	POLR2A	X	X	X
NUDT21	X		X	PDE12		X	POLR2B	X		X
NUDT5		X	X	PDE3A	X	X	POLR2H		X	X
NUMA1	X	X	X	PDE4D	X	X	POLRMT	X		
NUP107	X	X	X	PDHA1	X	X	POMT1	X		
NUP133	X	X	X	PDHB	X	X	PON2	X	X	X
NUP155	X	X	X	PDHX		X	POP1	X	X	X
NUP160	X	X	X	PDIA3		X	POR	X		X

Anhang

PPA1		X	X	PSMC5		X	X	X	RAC1		X	X	X
PPA2		X	X	PSMC6		X	X	X	RACGAP1		X		X
PPAT		X	X	PSMD1		X	X	X	RAD21			X	
PPFIBP1		X	X	PSMD11		X	X	X	RAD50		X	X	X
PPIA	X	X	X	PSMD12		X	X	X	RAE1		X	X	X
PPIB	X	X	X	PSMD13		X	X	X	RALA			X	X
PPID		X	X	PSMD13		X		X	RALY		X	X	X
PPIG		X	X	PSMD14		X	X	X	RAN		X	X	X
PPIH		X	X	PSMD2		X	X	X	RANBP2		X	X	X
PPME1	X	X	X	PSMD3		X	X	X	RANBP6		X		X
PPP1CA	X	X	X	PSMD5		X	X	X	RANGAP1		X	X	X
PPP1CB	X	X	X	PSMD6		X	X	X	RAP1B		X	X	X
PPP1CC		X	X	PSMD7			X	X	RAP1GDS1		X		X
PPP1R7		X	X	PSMD8			X	X	RARS		X	X	X
PPP2CA	X	X	X	PSME1			X	X	RAVER1		X		
PPP2R1A	X	X	X	PSME2			X	X	RBBP4		X	X	X
PPP2R2A	X	X	X	PSME3		X	X	X	RBBP7		X		X
PPP2R4	X	X	X	PSME4		X	X	X	RBM12B			X	X
PPP2R5C	X			PSMG1		X		X	RBM14		X	X	X
PPP2R5D	X	X	X	PSPC1			X		RBM25			X	X
PPP4C	X			PTBP1		X		X	RBM39		X	X	X
PPT1	X	X		PTCD1		X		X	RBM4			X	X
PRDX1	X	X	X	PTCD3		X			RBM8A			X	X
PRDX2	X	X	X	PTDSS1		X		X	RBMX		X	X	X
PRDX3	X	X	X	PTGES		X	X	X	RCC1		X	X	X
PRDX4	X	X	X	PTGES2			X	X	RCC2		X	X	X
PRDX6	X	X	X	PTGES3			X	X	RCL1			X	X
PREP	X			PTGFRN		X	X	X	RCN1			X	X
PRIM2	X	X	X	PTGR1		X	X	X	RCN2		X		X
PRKAA1	X		X	PTK2			X		RDH11		X		X
PRKACA	X		X	PTK7		X	X	X	RECQL		X	X	X
PRKAG1	X		X	PTP4A1		X	X	X	RELA			X	X
PRKAR2A		X	X	PTPLAD1		X	X	X	RFC1		X		
PRKCA	X	X	X	PTPN1		X	X	X	RFC2		X		
PRKDC	X	X	X	PTPRF		X		X	RFC3		X	X	X
PRMT1	X	X	X	PTPRJ		X	X	X	RFC4		X	X	X
PRMT5	X	X	X	PTPRK		X		X	RFC5		X		X
PRNP		X		PTRF		X	X	X	RG9MTD1		X	X	X
PRPF19	X	X	X	PTRH2			X	X	RHEB			X	X
PRPF3	X		X	PUF60		X	X	X	RHOA		X	X	X
PRPF31		X	X	PUM1		X		X	RHOG		X		X
PRPF38A		X	X	PUS7		X	X	X	RHOT1		X		
PRPF4	X	X	X	PWP2		X	X	X	RIF1		X		
PRPF40A		X	X	PWP2			X	X	RNASEH2A			X	
PRPF4B	X		X	PXDN		X		X	RNF213		X	X	X
PRPF6	X	X	X	PYCR1		X	X	X	RNH1		X		X
PRPF8	X	X	X	PYGB		X	X	X	RNMT		X		
PRPS1	X	X	X	PYGL		X	X	X	RNMTL1		X		X
PRPS2	X	X	X	QARS		X	X	X	RNPEP		X	X	X
PRSS21		X	X	RAB10		X	X	X	RNPS1			X	X
PRSS3		X		RAB11B		X	X	X	ROBO1		X	X	X
PSAT1	X	X	X	RAB11FIP5			X	X	ROCK2		X		X
PSIP1	X	X	X	RAB14		X	X	X	ROD1		X		
PSMA2	X		X	RAB18		X	X	X	RP2		X		X
PSMA3		X	X	RAB1A		X			RPA1		X	X	X
PSMA4	X	X	X	RAB1B		X	X	X	RPF1		X		
PSMA5	X	X	X	RAB21		X	X	X	RPF2		X	X	
PSMA6	X	X	X	RAB27A		X		X	RPL10		X	X	X
PSMA7	X	X	X	RAB2A		X	X	X	RPL10A		X	X	X
PSMB1	X	X	X	RAB31		X	X	X	RPL11		X	X	X
PSMB2	X		X	RAB32		X	X	X	RPL12		X	X	X
PSMB3	X	X	X	RAB34		X		X	RPL13		X	X	X
PSMB5	X	X	X	RAB3A		X		X	RPL13A		X	X	X
PSMB6		X	X	RAB5A		X	X	X	RPL14		X	X	X
PSMB7		X	X	RAB5B			X	X	RPL15		X	X	X
PSMC1	X	X	X	RAB5C		X	X	X	RPL17		X	X	X
PSMC2	X	X	X	RAB6A		X	X	X	RPL18		X	X	X
PSMC3	X	X	X	RAB7A		X	X	X	RPL18A		X		X
PSMC4		X	X	RAB8A		X	X	X	RPL19		X	X	X

Anhang

RPL21	X	X	X	RRP12	X	X	X	SFRS11		X
RPL22	X	X	X	RRP1B	X		X	SFRS13A		X
RPL23	X	X	X	RSL1D1	X		X	SFRS2		X
RPL23A	X	X	X	RSU1	X	X	X	SFRS3	X	X
RPL24	X	X	X	RTN4	X	X	X	SFRS6		X
RPL26	X	X	X	RTN4IP1	X			SFRS7	X	X
RPL27	X	X	X	RUFY1		X		SFXN1	X	X
RPL27A	X	X	X	RUVBL1	X	X	X	SFXN3	X	X
RPL28	X		X	RUVBL2	X	X	X	SGPL1	X	X
RPL3	X	X	X	S100A16		X	X	SH2D4A		X
RPL30	X	X	X	S100A4		X	X	SHMT1		X
RPL31	X	X	X	S100A6		X	X	SHMT2	X	X
RPL32	X		X	SACM1L	X		X	SIN3A	X	X
RPL34	X	X	X	SAE1		X		SKIV2L2	X	X
RPL35		X	X	SAMM50	X	X	X	SLC12A4	X	X
RPL36	X	X	X	SAPS3		X	X	SLC12A7	X	X
RPL36AL	X		X	SAR1A	X	X	X	SLC16A1	X	X
RPL38	X	X	X	SARS	X	X	X	SLC16A3	X	X
RPL4	X	X	X	SART3	X			SLC1A5	X	X
RPL5	X	X	X	SBDS	X	X	X	SLC25A1	X	X
RPL6	X	X	X	SC4MOL	X		X	SLC25A10	X	
RPL7	X	X	X	SCAMP3	X	X		SLC25A11	X	X
RPL7A	X	X	X	SCARB1	X	X	X	SLC25A12		X
RPL7L1	X		X	SCCPDH		X	X	SLC25A13	X	X
RPL8	X	X	X	SCD	X		X	SLC25A22	X	X
RPL9	X	X	X	SCFD1	X	X	X	SLC25A24		X
RPLP0	X	X	X	SCO1	X			SLC25A3	X	X
RPLP1		X	X	SCRIB		X	X	SLC25A4	X	X
RPLP2	X	X	X	SDAD1		X		SLC25A5	X	X
RPN1	X	X	X	SDCCAG1		X	X	SLC25A6	X	X
RPN2	X	X	X	SDHA	X		X	SLC27A2	X	X
RPP30	X			SDHA	X	X	X	SLC27A4	X	X
RPP40	X			SDHB	X	X	X	SLC2A1	X	X
RPRD1B		X		SEC11A	X	X	X	SLC30A1	X	X
RPS10	X	X	X	SEC16A		X	X	SLC38A1		X
RPS11	X	X	X	SEC22B	X	X	X	SLC38A2	X	
RPS13	X	X	X	SEC23A	X	X	X	SLC38A5		X
RPS14	X		X	SEC24B		X	X	SLC39A14	X	X
RPS15	X	X	X	SEC24C	X	X	X	SLC3A2	X	X
RPS15A	X	X	X	SEC24D	X	X		SLC4A7	X	X
RPS16	X	X	X	SEC31A	X	X	X	SLC7A1	X	X
RPS18	X	X	X	SEC61A1	X	X	X	SLC7A11	X	X
RPS19	X	X	X	SEC61B		X	X	SLC7A5	X	X
RPS20	X	X	X	SEC63	X	X	X	SLC9A3R1	X	X
RPS23	X		X	SEH1L	X	X	X	SLFN5	X	X
RPS24	X	X	X	SEL1L	X			SLITRK5	X	X
RPS25	X	X	X	SEMA3C	X		X	SLK		X
RPS26P25		X		SENP3	X			SMAD2	X	X
RPS27A	X	X	X	SEP2	X	X	X	SMARCA1	X	
RPS27L	X	X	X	SEPT10	X		X	SMARCA4	X	X
RPS2P5	X	X		SEPT11		X	X	SMARCA5	X	X
RPS3	X	X	X	SEPT7	X	X	X	SMARCB1	X	X
RPS3A	X	X	X	SEPT9	X	X		SMARCC1	X	X
RPS4X	X	X	X	SERBP1		X	X	SMC1A	X	X
RPS5	X	X	X	SERPINB1		X	X	SMC2	X	X
RPS6	X	X	X	SERPINB5	X	X	X	SMC3	X	X
RPS6KA1	X	X	X	SERPINB6	X	X		SMC4	X	X
RPS6KA3	X		X	SERPINH1	X	X	X	SMCHD1	X	X
RPS7	X	X	X	SETD4	X	X		SMPD4	X	X
RPS8	X	X	X	SF3A1		X	X	SMS	X	X
RPS9	X	X	X	SF3A2		X		SMU1	X	X
RPSA	X	X	X	SF3A3		X		SND1	X	X
RPSA	X		X	SF3B1	X	X	X	SNRNP200	X	X
RPUSD2	X			SF3B14	X	X	X	SNRNP40	X	X
RRAS2	X	X	X	SF3B2		X	X	SNRNP70		X
RRBP1	X	X	X	SF3B3	X	X	X	SNRPA1		X
RRM1	X		X	SF3B4		X		SNRPB		X
RRM2		X	X	SFPQ	X	X	X	SNRPB2	X	
RRP1	X	X	X	SFRS1	X	X	X	SNRPD1	X	X

Anhang

SNRPD2	X	X	X	SVIL	X			TMX2	X		X
SNRPD3	X	X	X	SWAP70		X	X	TMX3		X	X
SNRPF	X		X	SYCP1	X		X	TNFAIP2	X		X
SNTB2	X		X	SYNCRIP		X	X	TNPO1	X	X	X
SNX2	X	X	X	SYNE2	X	X	X	TNPO3	X		X
SNX6		X	X	TAGLN2		X	X	TNS3	X		
SOAT1	X			TALDO1	X	X	X	TOMM34		X	X
SON		X		TAOK1	X		X	TOMM40		X	X
SORD	X	X	X	TAOK2	X		X	TOMM70A	X	X	X
SPCS2	X	X	X	TARDBP		X	X	TOP1	X	X	X
SPCS3	X	X	X	TARS	X	X	X	TOP2A	X	X	X
SPG21	X		X	TARS2	X		X	TOP2B	X	X	
SPIN1		X		TATDN1		X		TOR1AIP1	X		X
SPR		X	X	TBC1D10B	X		X	TP53RK	X	X	X
SPRR2E	X			TBL2	X	X	X	TPP2	X		X
SPTAN1	X	X	X	TBL3	X		X	TPR	X	X	X
SPTBN1	X	X	X	TCEB1	X	X	X	TRA2A	X		X
SPTBN2		X	X	TCERG1		X	X	TRA2B	X	X	X
SPTLC1	X		X	TCIRG1		X		TRAM1	X		X
SQRDL		X	X	TCOF1		X	X	TRAP1	X	X	X
SQSTM1	X	X	X	TCP1	X	X		TRIM25	X	X	X
SR140	X		X	TECR	X	X		TRIM28	X	X	X
SRM	X	X	X	TELO2		X		TRIO	X		X
SRP14	X	X	X	TEX10	X		X	TRIP10	X		X
SRP54	X		X	TFAM	X		X	TRIP12	X		
SRP68	X	X	X	TFRC	X	X	X	TRIP13	X	X	X
SRP72	X	X	X	TGFB1	X			TRMT112		X	
SRP9L1		X		TGM2	X	X	X	TRNT1		X	X
SRPK1	X	X	X	THBS1	X		X	TROVE2		X	X
SRPR	X	X	X	THOC1	X		X	TSFM	X		X
SRPRB	X	X	X	THOC2	X	X	X	TSN	X	X	X
SRRM1		X	X	THOC3	X			TSR1	X	X	X
SRRM2	X	X	X	THOC5	X			TTC35	X	X	X
SRRT		X	X	THOC6	X		X	TTC37		X	X
SSB	X	X	X	THOP1		X	X	TTLL12	X	X	X
SSFA2		X	X	THRAP3	X	X	X	TTLL3	X	X	
SSR1		X	X	THUMPD3	X	X	X	TUBA1A	X		X
SSR4	X	X	X	TIMM13	X	X	X	TUBA1C	X	X	X
SSRP1	X	X	X	TIMM44	X	X	X	TUBA4A	X	X	X
ST13		X	X	TJP1		X		TUBAL3	X	X	X
STAG2	X		X	TKT	X	X	X	TUBB	X	X	X
STAM		X	X	TLE3	X			TUBB2C	X	X	X
STAT1	X	X	X	TLN1	X	X	X	TUBB3	X		X
STAT3	X	X	X	TM9SF1		X	X	TUBB6	X	X	X
STAT5B		X	X	TM9SF2	X	X	X	TUBG1	X	X	X
STC2	X			TM9SF3	X	X	X	TUBGCP2	X		X
STEAP3	X		X	TM9SF4		X	X	TUFM	X	X	X
STIP1		X	X	TMCO1	X		X	TXLNA		X	X
STOM	X	X	X	TMED10	X	X	X	TXLNG		X	X
STOML2	X	X	X	TMED2	X		X	TXNDC5		X	X
STRAP	X	X	X	TMED4	X	X	X	TXNRD1	X	X	X
STT3A	X	X	X	TMED5	X	X	X	TYMS	X		X
STT3B	X	X	X	TMED7-		X		U2AF1		X	X
STUB1		X	X	TICAM2				U2AF2		X	X
STX4		X	X	TMED9	X	X	X	UBA1	X	X	X
STX5	X		X	TMEM165	X			UBA2	X	X	X
STX7		X	X	TMEM201	X			UBA3		X	X
STXBP1	X	X	X	TMEM209	X			UBA6	X		
STXBP3	X	X	X	TMEM214	X		X	UBAC2	X		X
SUB1		X	X	TMEM33		X	X	UBAP2L		X	
SUCLG1	X			TMEM43	X	X	X	UBE2D3	X		X
SUCLG2	X	X	X	TMEM48	X		X	UBE2I		X	X
SUMF2	X			TMEM49	X	X		UBE2K		X	
SUN1	X			TMEM70	X		X	UBE2M	X	X	X
SUN2	X			TMEM97		X		UBE2N		X	X
SUPT16H	X	X	X	TMPO	X	X	X	UBE2V2		X	X
SUPT6H		X	X	TMPO	X	X	X	UBE3C	X		X
SUPV3L1	X		X	TMTC3	X	X	X	UBIAD1		X	
SURF4	X	X	X	TMX1	X	X	X	UBLCP1		X	X

Anhang

UBR4	X		X	VAT1	X	X	X	XPO7	X		X
UBTF	X	X	X	VCL	X	X	X	XPOT	X	X	X
UCHL5	X	X	X	VCP	X	X	X	XRCC5	X	X	X
UCK2				VDAC1	X	X	X	XRCC6	X	X	X
UGDH	X	X	X	VDAC2	X	X	X	XRN2	X		X
UGGT1			X	VDAC3	X	X	X	YARS	X	X	X
UGP2			X	VIM	X	X	X	YBX1	X		X
UGT8	X		X	VPS13A	X		X	YIF1B	X		
UMPS	X	X	X	VPS26A	X	X	X	YKT6		X	X
UNC45A			X	VPS29			X	YME1L1	X		X
UPF1	X	X	X	VPS33A			X	YTHDF2	X	X	X
UQCR10	X	X		VPS35	X	X	X	YTHDF3	X		X
UQCRC1	X	X	X	VPS53			X	YWHAB	X	X	X
UQCRC2	X	X	X	VRK1	X		X	YWHAE	X	X	X
UQCRFS1	X	X	X	WARS	X	X	X	YWHAG	X	X	X
URB1	X			WBSCR16	X		X	YWHAH	X	X	X
URB2	X			WDHD1	X			YWHAQ	X	X	X
UROD	X			WDR1	X		X	YWHAZ	X	X	X
USO1		X	X	WDR12	X		X	ZADH2	X		
USP14		X	X	WDR18	X			ZC3H18		X	
USP39	X		X	WDR3	X	X	X	ZC3HAV1	X	X	X
USP9X	X	X	X	WDR36	X	X	X	ZDHHC5	X		X
UTP11L	X		X	WDR43	X			ZMPSTE24	X	X	X
UTP14A	X		X	WDR46	X		X	ZNF512	X		
UTP15	X			WDR61			X	ZNF598		X	X
UTP6	X	X	X	WDR75	X		X	ZNF638	X		X
VAMP7		X	X	WDR77	X	X	X	ZNF644	X		
VAPA	X	X	X	WDR82		X	X	49kDaProt	X		
VAPB	X	X	X	XPO1	X	X	X				
VARS	X	X	X	XPO5	X						

Identifikationsnummern der Proteine in den Clustern 1-5 (laut internationalem Protein Index), unregulierte Proteine (Cluster 0) sind nicht aufgeführt.

CLUSTER 1	IPI00328737	IPI00921422	IPI00554742	IPI00020898
IPI00009305	IPI00926491	IPI00024662	IPI00157790	IPI00003783
IPI00396279	IPI00011998	IPI00328243	IPI00328154	IPI00004655
IPI00011229	IPI00023635	IPI00003856	IPI00216159	IPI00874277
IPI00008248	IPI00294955	IPI00031485	IPI00845373	IPI00154915
IPI00028564	IPI00479306	IPI00299155	IPI00554711	IPI00005260
IPI00002460	IPI00219729	IPI00746351	IPI00005707	IPI00016610
IPI00220373	IPI00028481	IPI00029697	IPI00396627	IPI00018768
IPI00329801	IPI00017567	IPI00374747	IPI00219622	IPI00290039
IPI00871903	IPI00062120	IPI00291922	IPI00027728	IPI00914016
IPI00025019	IPI00011285	IPI00019472	IPI00418262	IPI00942869
IPI00029623	IPI00028004	IPI00027505	IPI00030770	IPI00300659
IPI00402231	IPI00871279	IPI00010697	IPI00031713	IPI00170596
IPI00853384	IPI00396131	IPI00058192	IPI00018963	IPI00013466
IPI00334400	IPI00748303	IPI00855940	IPI00021518	IPI00008557
IPI00023234	IPI00470596	IPI00031410	IPI00289819	IPI00171611
IPI00015856	IPI00329512	IPI00470883	IPI00552073	IPI00337612
IPI00893197	IPI00419844	IPI00218163	IPI00006079	IPI00016513
IPI00291802	IPI00024175	IPI00024157	IPI00328318	IPI00937278
IPI00028006	IPI00219675	IPI00002478	IPI00013909	IPI00029422
IPI00185146	IPI00010474	IPI00014310	IPI00247871	IPI00004233

IPI00217519	IPI00479191	IPI00019488	IPI00414717	IPI00297124
IPI00306046	IPI00101186	IPI00025329	IPI00867509	IPI00084828
IPI00016679	IPI00183786	IPI00165486	IPI00216260	IPI00011592
IPI00021924	IPI00791325	IPI00642816	IPI00007346	IPI00154451
IPI00007682	IPI00329573	IPI00796366	IPI00307749	IPI00005861
IPI00002857	IPI00003768	IPI00470528	IPI00306959	IPI00150269
IPI00031570	IPI00914529	IPI00006980	IPI00003968	IPI00290305
IPI00017303	IPI00412607	IPI00003918	IPI00045946	IPI00002324
IPI00220609	IPI00007928	IPI00930068	IPI00012912	IPI00328987
IPI00302850	IPI00221089	IPI00217686	IPI00446875	IPI00006675
IPI00418797	IPI00218606	IPI00295772	IPI00783271	IPI00007755
IPI00007401	IPI00021840	IPI00219153	IPI00165506	IPI00012490
IPI00152695	IPI00329598	IPI00215719	IPI00641973	IPI00220232
IPI00410287	IPI00554723	IPI00793696	IPI00021338	IPI00293260
IPI00418121	IPI00154590	IPI00299573	IPI00305992	IPI00941899
IPI00291200	IPI00301323	IPI00219155	IPI00411426	IPI00060715
IPI00375527	IPI00607584	IPI00221088	IPI00021805	IPI00008616
IPI00009057	IPI00009071	IPI00927606	IPI00025796	IPI00333068
IPI00031023	IPI00742682	IPI00455457	IPI00604664	IPI00024403
IPI00007694	IPI00216587	IPI00016932	IPI00794956	IPI00329650
IPI00001568	IPI00181728	IPI00179053	IPI00853201	IPI00021327
IPI00026182	IPI00032826	IPI00005978	IPI00784154	IPI00027831
IPI00012645	IPI00215948	IPI00023504	IPI00007765	IPI00939159
IPI00005675	IPI00550021	IPI00178440	IPI00555597	IPI00100313
IPI00107113	IPI00915363	IPI00396378	IPI00889534	IPI00412147
IPI00020672	IPI00012772	IPI00219160	IPI00014230	IPI00014985
IPI00256861	IPI00400826	IPI00555744	IPI00019899	IPI00306290
CLUSTER 2	IPI00290204	IPI00025252	IPI00024993	IPI00163230
IPI00900325	IPI00003881	IPI00003176	IPI00007188	IPI00059279
IPI00032313	IPI00642238	IPI00217468	IPI00291467	IPI00027808
IPI00216237	IPI00027270	IPI00001560	IPI00001891	IPI00477468
IPI00000494	IPI00790342	IPI00215884	IPI00010951	IPI00013721
IPI00871780	IPI00293331	IPI00795990	IPI00305166	IPI00299095
IPI00396171	IPI00413895	IPI00646917	IPI00034277	IPI00102685
IPI00026202	IPI00856045	IPI00003527	IPI00420108	IPI00465160
IPI00783872	IPI00453473	IPI00006176	IPI00290085	IPI00003217
IPI00456758	IPI00332499	CLUSTER3	IPI00020928	IPI00012512
IPI00247583	IPI00180454	IPI00296388	IPI00945153	IPI00033600
IPI00296053	IPI00385042	IPI00026964	IPI00003004	IPI00909064
IPI00879004	IPI00871827	IPI00009368	IPI00332106	IPI00032406
IPI00003865	IPI00215965	IPI00216308	IPI00043598	IPI00095891
IPI00216592	IPI00304612	IPI00796843	IPI00555647	IPI00871870
IPI00412579	IPI00008708	IPI00240503	IPI00641384	IPI00220007
IPI00844215	IPI00927658	IPI00221224	CLUSTER 4	IPI00028005
IPI00302281	IPI00443909	IPI00329600	IPI00026111	IPI00297626
IPI00413324	IPI00465361	IPI00000690	IPI00923468	IPI00216057
IPI00015954	IPI00012345	IPI00465290	IPI00014236	IPI00844014

IPI00026627	IPI00022033	IPI00645446	IPI00644231
IPI00549205	IPI00239815	IPI00550766	IPI00294455
IPI00289876	IPI00031627	IPI00306642	IPI00023126
IPI00021057	IPI00021129	IPI00456940	IPI00013891
IPI00021058	IPI00306723	IPI00043990	IPI00152510
IPI00748145	IPI00939523	IPI00719680	IPI00464978
IPI00337386	IPI00044761	IPI00168849	IPI00008868
IPI00220578	IPI00009471	IPI00303568	IPI00413961
IPI00011102	IPI00293884	IPI00396329	IPI00107831
IPI00022239	IPI00328293	IPI00021812	IPI00020178
IPI00293735	IPI00298547	IPI00219682	IPI00030654
IPI00549664	IPI00789740	IPI00797126	IPI00217467
IPI00430472	IPI00059292	IPI00013808	IPI00334907
IPI00794402	IPI00009747	IPI00291928	IPI00480028
IPI00005634	IPI00218449	IPI00789041	IPI00033036
IPI00004273	IPI00339381	IPI00065500	CLUSTER5
IPI00099463	IPI00807573	IPI00015148	IPI00216137
IPI00013184	IPI00000030	IPI00176903	IPI00807727
IPI00383581	IPI00021267	IPI00217563	IPI00220327
IPI00016621	IPI00009070	IPI00021807	IPI00894288
IPI00892784	IPI00005774	IPI00171390	IPI00239406
IPI00396234	IPI00440932	IPI00022048	IPI00025753
IPI00019209	IPI00030851	IPI00020436	IPI00873376
IPI00550069	IPI00296992	IPI00015688	IPI00013933
IPI00221108	IPI00292000	IPI00218918	IPI00218019
IPI00019640	IPI00915356	IPI00022558	IPI00015102
IPI00032355	IPI00031661	IPI00472882	IPI00013744
IPI00307017	IPI00018274	IPI00419249	IPI00290043
IPI00014808	IPI00022462	IPI00025084	IPI00023728
IPI00328272	IPI00221222	IPI00008986	IPI00016334
IPI00946792	IPI00002804	IPI00872664	IPI00219575
IPI00006298	IPI00878181	IPI00604710	IPI00028911
IPI00015195	IPI00029273	IPI00306419	IPI00640525
IPI00019548	IPI00646954	IPI00006666	IPI00871467
IPI00221325	IPI00015808	IPI00219029	IPI00010130
IPI00873459	IPI00004970	IPI00296830	IPI00024095
IPI00828125	IPI00031812	IPI00009236	IPI00216172
IPI00001589	IPI00289342	IPI00000811	IPI00296099
IPI00010746	IPI00645369	IPI00291006	IPI00021405
IPI00922855	IPI00411628	IPI00026270	IPI00306604
IPI00217540	IPI00011736	IPI00796919	IPI00465436
IPI00295485	IPI00002449	IPI00883647	
IPI00000070	IPI00289870	IPI00017672	
IPI00299033	IPI00102815	IPI00743104	
IPI00290928	IPI00441498	IPI00004657	
IPI00021048	IPI00185919	IPI00793688	
IPI00815713	IPI00009505	IPI00022613	

4. Lebenslauf

Jutta Pia Müller
geboren am 31. Mai 1979
in Gießen
deutsche Staatsangehörigkeit

Ausbildung

-
- | | |
|-------------------|--|
| 11. 2005-07.2011 | RWTH Aachen University, Universitätsklinikum, Institut für Biochemie und Molekularbiologie AG Prof. F. Schaper
Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin
Projekt: Identifizierung von Bindungspartnern der Tyrosinphosphatase SHP2 |
| 12. 2003 | J.-W. Goethe Universität Frankfurt, Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
Diplom in Biochemie (Note: sehr gut)
Diplomarbeit im Institut für Biochemie, AG Dr. J. Piehler mit dem Thema Mechanistische Untersuchung der Assemblierung des Typ I Interferonrezeptors |
| 10. 1998-12. 2003 | J.-W.-Goethe-Universität, Biozentrum, Frankfurt am Main
Studium Biochemie
Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie
Nebenfach: Zellbiologie |
| 08. 1989-06. 1998 | Ricarda Huch Schule, Gießen
Allgemeine Hochschulreife
Note: 1,4 |

Berufserfahrung

-
- | | |
|-------------------------------------|--|
| 11. 2005-01.2011 | RWTH Aachen University, Universitätsklinikum, Institut für Biochemie und Molekularbiologie AG Prof. F. Schaper
Wissenschaftliche Mitarbeiterin |
| 05.-09. 2005
und
01.-04. 2004 | J.-W.-Goethe-Universität, Biozentrum, Frankfurt am Main
Institut für Biochemie, AG Dr. J. Piehler
Wissenschaftliche Mitarbeiterin |
| 07.-11. 2002 | Aventis, Frankfurt Abteilung Metabolic Diseases, Labor Dr. W. Müller
Werkstudentin |

Auslandserfahrung

-
- | | |
|--|---|
| 02.-03. 2009
07. 2009
und 03. 2010 | Süddänische Universität Odense, Zentrum für experimentelle Bioinformatik (CEBI), AG Prof. J. Andersen
Gastwissenschaftlerin |
| 05. 2004-04. 2005 | Individual-Weltumrundung |

Aachen, Juli 2011

5. Mein besonderer Dank gilt

...allen, die mich in diesem Lebensabschnitt begleitet und unterstützt haben.

...Prof. Fred Schaper vor allem für sein Vertrauen, die wissenschaftliche Freiheit zum selbständigen Arbeiten und konstruktive Diskussionen.

...Prof. Jens Andersen for the chance to do the MS measurements in CEBI.

...Prof. Werner Baumgartner für die Übernahme des Zweitgutachtens.

...Prof Peter C. Heinrich für das Beleben der Institutsseminare.

...den Kollegen aus dem ehemaligen Labor 15, dem A-team und Flur 42 für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit.

...Anna Dittrich für Deinen Einsatz, die unglaubliche Geduld und den Gedankenaustausch beim Korrekturlesen.

...den Labormitgliedern im CEBI und im Labor Prof. Jacob Piehler für gute Atmosphäre, konstruktive Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

...meinen Eltern dafür, dass Ihr immer unermüdlich an mich geglaubt habt und für mich da seid.

...meiner Schwester und Freundin Sue, Du hast mich in allen Lebenslagen fabelhaft unterstützt.

...Radoslaw Sobota for your infectious passion and curiosity for science, for making everything more exciting, your support, suggestions, criticism, patience and friendship.

...Erika Andreetto for being as you are! I am so glad to be your friend.

...Stefanie Speckgens für die schöne Zeit in und nach dem grünen Haus, die Inspiration ;) nicht nur für die Abbildungen und Deine Freundschaft.

...Alena und Achim für die Beherbergung und Motivation während der Schreibphase als nichts mehr ging.

...meiner Oma, Peter Haas, Adam und Lydia Schmidt.

...meinen Freunden.