



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7129

**Ein neuer, regulierter Komplex
des *NF2* Tumorsuppressor
Genproduktes Merlin mit
p190RhoGAP und p120RasGAP**

T. Sperka

Institut für Toxikologie und Genetik

Juli 2005

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7129

**Ein neuer, regulierter Komplex des *NF2*
Tumorsuppressor Genproduktes Merlin
mit p190RhoGAP und p120RasGAP**

Tobias Sperka

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2005

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071295

**Ein neuer, regulierter Komplex des *NF2*
Tumorsuppressor Genproduktes Merlin
mit p190RhoGAP und p120RasGAP**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Tobias Sperka

aus Braunschweig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes

Referent: Prof. Dr. Peter Herrlich

Korreferent: PD Dr. Jonathan Sleeman

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2005

Zusammenfassung

Das *NF-2* Gen (Neurofibromatose-Typ 2) kodiert für das Protein Merlin, das mit den ERM Proteinen (für Ezrin, Radixin, Moesin) verwandt ist. Merlin Defizienz führt zu unkontrolliertem Wachstum und einem anomalen Aktin-Zytoskelett. Merlin wirkt als Tumorsuppressor, indem es die Kontaktinhibition des Wachstums aktiviert und mit Ras Signaltransduktion interferiert. Die Tumorsuppressorfunktion von Merlin wird durch hohe Zelldichte und die Zellmatrixkomponente Hyaluronsäure stimuliert und hängt von Dephosphorylierung von Merlin an Serin-518 ab. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Dephosphorylierung an Serin-518 nicht die einzige für die Tumorsuppression essentielle Modifikation ist. Zusätzlich inhibiert Dephosphorylierung an Threonin-272 und Phosphorylierung an Threonin-576 in Merlin die Transformation. Die Aktivierung von Merlin durch Hyaluronsäure bewirkt innerhalb von fünf Minuten eine Dephosphorylierung an Serin-518 und insgesamt einen Anstieg der Phosphorylierung an Threonin. Gleichzeitig werden Veränderungen im Aktin-Zytoskelett sichtbar, die mit einer Merlin-vermittelten Inhibition des kleinen G-Proteins Rho einhergehen. Die Dynamik dieser Inhibition läßt auf die Beteiligung einer RhoGAP schließen. Merlin immunopräzipitiert und kolokalisiert tatsächlich mit p190RhoGAP. Diese Interaktion ist überdies spezifisch für die aktiven Merlin Mutanten S518A (nicht phosphorylierbar) und T576D (pseudophosphoryliert). p120RasGAP ist ein bekannter Bindungspartner von p190RhoGAP und bindet auch an Merlin. Dies legt nahe, daß das p120RasGAP Substrat Ras ebenso Merlin-vermittelt nach Inkubation mit Hyaluronsäure inhibiert werden kann. Dies ist in der Tat der Fall. Der Verlust von Merlin durch RNAi bewirkt umgekehrt eine Aktivierung von Ras. Die durch differentielle Phosphorylierung regulierte Interaktion von Merlin mit p190RhoGAP und p120RasGAP könnte die Ursache für die Inhibition der G Proteine Ras und Rho sein und korreliert mit Merlins Tumorsuppressoraktivität. Weiterhin ist über diese neuen Bindungspartner eine Einflußnahme von Merlin auf Proliferation, Zelladhäsion und Zytoskelett Organisation möglich.

A novel regulated complex of the NF2 tumour suppressor gene product merlin with p190RhoGAP and p120RasGAP

Abstract

The NF-2 gene (neurofibromatosis type 2) encodes for the tumour suppressor protein merlin, which is related to ERM proteins (ezrin, radixin, moesin). Merlin deficiency leads to uncontrolled growth and an aberrant actin cytoskeleton. Merlin acts as a tumour suppressor by activating the contact inhibition of growth and interfering with Ras signal transduction. This tumour suppressor function is activated through high cell density or the cell-matrix component hyaluronic acid and depends on merlin dephosphorylation on serine-518. In this thesis it was possible to show that dephosphorylation on serine-518 is not the only essential modification for tumour suppression. Additionally dephosphorylation on threonine-272 and phosphorylation on threonine-576 inhibits transformation. Short-term activation of merlin via hyaluronic acid is accompanied by changes in the actin cytoskeleton and a merlin-mediated inhibition of the small G-protein Rho. The dynamics of this inhibition points towards an involvement of a RhoGAP. Merlin indeed immunoprecipitates and colocalizes with p190RhoGAP. Moreover this interaction is specific for the active merlin mutants S518A (mimics dephosphorylation) and T576D (pseudo-phosphorylated). p120RasGAP a known binding partner of p190RhoGAP binds as well to merlin. This suggested that the p120RasGAP substrate Ras could be a target for merlin-mediated inhibition after hyaluronic acid incubation. This is in fact the case. Conversely loss of merlin by the use of RNAi results in activation of Ras. This interaction of merlin with p190RhoGAP and p120RasGAP regulated via differential phosphorylation could be the reason for the inhibition of the small G-proteins Rho and Ras and correlates with the tumour suppressor activity. Furthermore these new binding partners of merlin could allow an influence on proliferation, cell adhesion and organization of the cytoskeleton.

Inhalt

Einleitung	9
Tumore und Krebs	9
Epigenetische und genetische Veränderungen der DNA im Entartungsprozeß	10
Epigenetische Mechanismen	10
Genetische Mechanismen	10
Onkogene	10
Tumorsuppressorgene	11
Neurofibromatose 2	13
Krankheit	13
Klonierung von NF2	13
Inaktivierung von NF2	14
NF2 Tumorsuppressorgen und Genprodukt	14
Genregulation	14
Expression	16
Subzelluläre Verteilung	16
Protein-Domänen	16
Protein-Konformation	16
Merlin Interaktionspartner	18
Zytoskelett	18
Transmembranproteine	18
Vesikeltransport	19
Funktion von Merlin	19
Zielsetzung	25
Ergebnisse	27
Einleitung	27
Merlin fungiert als Tumorsuppressor bei hoher Zelldichte	28
Die Tumorsuppressorfunktion wird durch Hyaluronsäure aktiviert und beeinflusst die Signaltransduktion	31
Hyaluronsäure induziert Veränderungen im F-Aktin Zytoskelett	33
Dephosphorylierung an Serin-518 ist notwendig für die Aktivität von Merlin und wird durch Hyaluronsäure induziert	35
Dephosphorylierung an Serin-518 ist notwendig aber nicht hinreichend für die Tumorsuppressoraktivität	37
Phosphorylierung von Merlin an Threonin T272 und T576	40
Dephosphorylierung von Merlin Threonin-272 ist notwendig für die Tumorsuppressor-aktivität	47
Phosphorylierung von Merlin Threonin-576 ist notwendig für die Tumorsuppressoraktivität	49
Merlin inhibiert das G-Protein Rho und liegt im Komplex mit p190RhoGAP vor	51
Merlin assoziiert auch p120RasGAP und inhibiert das G-Protein Ras ..	54

Aktives Merlin bindet an RhoGAP	55
Diskussion	59
Material und Methoden	67
Gerätschaften	67
Verbrauchsmaterialien	67
Reagenzien, Medien und Zusätze	68
Wachstumsfaktoren und Spezialreagenzien	69
Antikörper und Konjugate	69
Plasmide und Plasmidkonstrukte	70
Primer	71
Standardmethoden	71
Bakterienstämme	71
Chemisch kompetente Bakterien	72
Transformation von Bakterien	72
DNA-Plasmidpräparation	72
Restriktionsenzymatische DNA Spaltung	73
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) Fällung und DNA Präzipitation	73
Agarose Gelelektrophorese	74
Sequenzspezifische DNA Mutagenese	74
DNA Sequenzierung	74
Zelllinien	75
Zellkultivierung	75
Kryokonservierung	75
Aktivierung von Natriumorthovanadat (PTP Inhibitor)	75
Proteinextraktion & Zellyse	76
Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	78
Western Blotting und Immunodetektion	78
Transfektion eukaryontischer Zellen	79
Stabile Transfektion / Selektion von Zellklonen	79
Doxycyclin-induzierbare Genexpression in eukaryontischen Zellen	80
RNA Interferenz	80
Immunopräzipitation von Proteinen und Proteinkomplexen	81
GTPasen-Aktivierungsgrad	82
Proliferationsanalyse mittels BrdU-Inkorporation	84
In vitro Transformationsanalyse (Wachstum in Weichagar)	84
In vitro Transformationsanalyse (Fokusbildung)	84
Immunzytochemie	85
Analysesoftware und Onlinetools	86
Literatur	87
Abkürzungen	113
Danksagung	115
Lebenslauf	117

Einleitung

Tumore und Krebs

Der Begriff Tumor bezeichnet die örtliche Zunahme des Gewebevorkommens. Im engeren Sinne handelt es sich dabei um eine Neubildung in Form eines enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe. Gutartige (benigne) Tumoren verbleiben an ihrem Entstehungsort und sind häufig durch eine Bindegewebsschicht eingeschlossen. Sie können zu einem ernsthaften Problem werden, wenn ihre Ausdehnung in einem geschlossenen Raum wie dem Gehirn erfolgt oder ihr Volumen die Funktion anderer Organe beeinträchtigt. Bösartige (maligne) Tumoren bezeichnet man auch als Krebs und sind örtlich nicht begrenzt. Sie haben die Eigenschaft erworben, in andere Gewebe hineinzuwachsen und ihre Zellen über Lymph- und Blutgefäße zu verteilen und so Metastasen zu bilden (Burridge and Wennerberg, 2004; Fidler, 2003).

Entartete Tumorzellen unterscheiden sich auch *in vitro* von normalen Zellen. Ein Merkmal stellt die Kontaktinhibition des Wachstums dar, welche ein Überbleibsel des Verhaltens im Gewebeverband ist. Nach Ausbildung einer geschlossenen Einzellschicht in der Petrischale stellen nicht transformierte Zellen die Proliferation ein, wogegen Tumorzellen nicht inhibiert sind und übereinander wachsen (Abercrombie and Heaysman, 1954; Holley, 1975; Holley and Kiernan, 1968). Transformierte Zellen benötigen im Gegensatz zu normalen adhärenenten Zellen kein Substrat zur Verankerung, um zu proliferieren (Clark and Brugge, 1995). Dies führt dazu, daß Krebszellen nach Suspension in Agar, welcher sich nicht zur Verankerung eignet, Kolonien bilden können (Kinzler and Vogelstein, 1996; Weiss, 1970).

Man nimmt heute an, daß sich der maligne Transformationsprozeß aus mehreren Schritten zusammensetzt und durch sechs zellphysiologische Veränderungen charakterisiert ist: Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, Entzug vom programmierten Zelltod, unbegrenzte Fähigkeit zur Replikation, Stimulierung der Angiogenese, sowie Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Grundlage der Entartung ist eine durch Mutation, Umlagerung oder Verpackung veränderte DNA. Diese DNA Modifikationen werden in epigenetische und genetische Mechanismen unterteilt und tragen gemeinsam zur Tumorentwicklung bei.

Epigenetische und genetische Veränderungen der DNA im Entartungsprozeß

Epigenetische Mechanismen

Epigenetische Steuerung der Genexpression bezeichnet die Verpackung der DNA im Chromatin in transkriptionell aktive und inaktive Abschnitte. Dies wird durch posttranslationale Modifikation der DNA und der diese verpackende Histone erreicht (Grewal and Moazed, 2003; Khosravi-Far et al., 1995; Narlikar et al., 2002; Nobes and Hall, 1995). DNA Methylierung kooperiert direkt mit Histondeacetylierung, bewirkt damit die Bildung inaktiven Heterochromatins und inhibiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Nobes and Hall, 1995; Robertson et al., 2000). Die verstärkt auftretende Hypomethylierung der DNA in menschlichem Tumormaterial (Goelz et al., 1985; Nobes and Hall, 1995) wird daher für die unregulierte Expression von transformierenden Faktoren verantwortlich gemacht. Auch Histonacetylierung, die zur Bildung aktiven Euchromatins führt, kann die Entartung vorantreiben, transformierende Faktoren transkriptionell zugänglich gemacht werden (Archer and Hodin, 1999; Davis and Brackmann, 2003; Hake et al., 2004).

Genetische Mechanismen

Onkogene

Genetische Mechanismen der Krebsentstehung beinhalten direkte Veränderungen der DNA in Form von Mutationen oder Umlagerungen kompletter Chromosomenabschnitte. Das sogenannte 'Philadelphia' Chromosom in chronisch-myeloischer Leukämie entsteht durch Fusion von Teilen der Chromosomen 9 und 22. Diese Umlagerung verknüpft Teile der Gene *bcr* und *c-abl* und führt zur Expression eines Fusionsproteins mit transformierenden Eigenschaften (Heisterkamp et al., 1983).

Umgestaltung der DNA durch Mutation einzelner Basen kann die Nicht-Expression oder ein in seinen Eigenschaften verändertes Genprodukt zur Folge haben. Die Familien der Proto-Onkogene und der Tumorsuppressorgene spielen eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung. Proto-Onkogene kodieren für positive Wachstumsregulatoren wie Rezeptortyrosinkinasen (Doolittle et al., 1983; Kang and Massague, 2004), Transkriptionsfaktoren (Bohmann et al., 1987) oder GTPasen (Barbacid, 1987), die nach aktivierender Mutation zum Onkogen nicht mehr der zellulären Kontrolle gehorchen. Onkogene verhalten sich nach diesem Funktionsgewinn dominant aktiv, so daß nur Mutation eines Allels zur Bildung eines Phänotyps

notwendig ist (Bocchetta and Carbone, 2004; Hunter, 1997).

Tumorsuppressorgene

Das Tumorsuppressorgen dagegen muß infolge seiner Natur als Zellteilungsbremse homozygot mutiert sein, um zu einem entarteten Phänotyp zu führen. Bei Mutation eines Allels kann das verbliebene Allel die Funktion kompensieren (Knudson, 1971; Sherr, 2004). Von diesem Funktionsverlust sind Transkriptionsfaktoren (Finlay et al., 1989), CDK Inhibitoren (Serrano (Gu et al., 1993; Serrano et al., 1993; Xiong et al., 1993) oder DNA-Reparatur Proteine (Bakkenist and Kastan, 2003) betroffen. Verlust der Tumorsuppressorfunktion und Zugewinn eines Onkogens stattet die betroffene Zelle also mit einem oder mehreren der oben eingeführten Transformationskriterien aus.

Auf Grund des rezessiven Charakters von Tumorsuppressorgen können diese unbemerkt vererbt werden, und prädisponieren ihren Träger durch weitere Mutationen in anderen Genen einen Tumor zu entwickeln. Die Untersuchung klassifizierbarer Krebs syndrome hat zur Entdeckung einzelner Tumorsuppressoren geführt. Adenomatosis coli Patienten bilden eine Vielzahl von Darm polypen, welche sich in maligne Karzinome weiterentwickeln können (Kinzler and Vogelstein, 1996). Den genetischen Auslöser der Krankheit bilden Mutationen im *APC* Gen (Grodin et al., 1991; Joslyn et al., 1991), dessen Genprodukt Apoptose (Morin96PNAS93-7950) und Zelladhäsion stimulieren kann (Perez-Moreno et al., 2003; Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993). Die Grundlage von Neurofibromatose 1 sind Mutationen im *NF1* Gen (Cawthon et al., 1990; Viskochil et al., 1990; Wallace et al., 1990), das für Neurofibromin, eine RasGAP kodiert (Martin et al., 1990; Xu et al., 1990a; Xu et al., 1990b). Funktionsverlust von Neurofibromin in Schwann Zellen ruft anomal aktiviertes Ras hervor (Basu et al., 1992), da nach Stimulation von Ras die inhibitorische Wirkung der RasGAP fehlt (siehe unten: Box ‚Ras und Rho GTPasen‘). Dies führt u.a. zur Entwicklung von benignen und malignen Neurofibromen, Gliomen und Neurofibrosarkomen (Cichowski and Jacks, 2001; Colman and Wallace, 1994). Symptomatisch ist NF1 mit NF2 verwandt, so daß Kliniker bis in die späten 1970er Jahre den Begriff ‚von Recklinghausen‘ Erkrankung für beide Syndrome verwandt haben (Ruggieri and Huson, 1999).

Ras und Rho GTPasen

GTPasen der Ras und Rho Familie fungieren als molekulare Schalter und kontrollieren u.a. das Zytoskelett, Zelladhäsion und Proliferation in eukaryontischen Zellen. Wie alle GTPasen existieren sie in einer inaktiven (GDP Beladung) und einer aktiven (GTP Beladung) Konformation. Guanosinnukleotid Austauschfaktoren (GEF, z.B. Sos, Tiam) katalysieren die Freisetzung von GDP und damit die Beladung mit GTP. Im Aktiven Zustand binden die GTPasen an Zielproteine, durch die verschiedene zelluläre Antworten ausgelöst werden. Die intrinsische GTPase Aktivität wird schließlich durch ein GTPase aktivierendes Protein (GAP, z.B. p120RasGAP, NF1, p190RhoGAP) erhöht, so daß die GTPase wieder in den inaktiven, GDP beladenen Zustand zurückgekehrt ist. Durch einen GDP Dissoziationsinhibitor (GDI, z.B. RhoGDI) kann die GTPase danach im inaktiven Zustand gehalten werden (Bar-Sagi and Hall, 2000; Burridge and Wennerberg, 2004).

Ras aktiviert z.B. die MAP Kinase ERK über den Raf/MEK/ERK Signalweg, der die Proliferation nach Mitogenstimulation steuert (Seger and Krebs, 1995). Die GTP Beladung von Ras wird hier durch den Komplex aus Grb2 Adapter und Sos GEF katalysiert. Onkogene Mutationen von Ras haben die intrinsische und durch GAP stimulierbare Hydrolyseaktivität verloren und liegen daher ständig im aktiven Zustand vor (Scheffzek et al., 1997). In den am besten untersuchten humanen Neoplasien (Kolonkarzinome) wurde in etwa 50% onkogenes Ras identifiziert (Kinzler and Vogelstein, 1996; Nagy et al., 2004). Die Rho GTPasen (Cdc42, Rac, Rho) lösen mittels verschiedener Effektoren Umstrukturierungen im Aktin-Zytoskelett aus (siehe Box). Neben einer direkten Stimulation der Aktinpolymerisation werden auch Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion durch Rho GTPasen gesteuert (Kaibuchi et al., 1999).

Eine ursprünglich angenommene Aufgabenteilung der Ras (Stimulation der Proliferation) und Rho GTPasen (Zytoskelett und Adhäsion) weicht mittlerweile einem Bild, in dem diese Abläufe durch vernetzte Einflüsse aller GTPasen reguliert werden. Der maligne Transformationsprozeß ist von der Aktivität von Rho und Rac abhängig (Khosravi-Far et al., 1995; Nobes and Hall, 1995; Qiu et al., 1995a; Qiu et al., 1995b). Dominant negatives Rac oder Rho inhibieren die Transformation. Dies wird zum Teil dem synergistischen Effekt von Ras und Rac auf Raf und MEK zugeschrieben (Frost et al., 1997; Nobes and Hall, 1995). Zusätzlich kann Rho den Fortschritt im Zellzyklus durch Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI) vorantreiben (Olson et al., 1998). Eine weitere Quervernetzung besteht zum Abbau von Zell-Zell Kontakten. Epitheliale Zellen nehmen durch aktives Ras einen mesenchymalen Phänotyp an, der mit dem Verlust von Zell-Zell Kontakten und Rho Aktivierung einhergeht. Dominant negatives Rho stellt den epithelialen Phänotyp teilweise wieder her (Sander et al., 1999; Sander et al., 1998). Der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp ist ein wichtiges Geschehnis in der Entwicklung eines Organismus, ist aber ebenso im Verlauf der Transformation vom benignen zum malignen Tumor notwendig (Kang and Massague, 2004; Lozano et al., 2003).

Neurofibromatose 2

Krankheit

Auch Neurofibromatose 2 (NF2) ist ein vererbbares Tumorsyndrom, welches mit einer Häufigkeit von etwa 1/33000 auftritt (Ruggieri and Huson, 1999). Die Krankheit zeichnet sich durch die Bildung unterschiedlicher, meist benigner Tumoren des Nervensystems aus (Schwannome, Neurofibrome, Gliome, Meningeome; (Evans et al., 2000; Roos and Dunn, 1992)). Trotz der Gutartigkeit der NF2 Tumoren sind diese schwierig zu behandeln, da sie auf Grund ihrer Lage operativ oft nicht entfernbar sind. Die Kompression der benachbarten Nerven führt zu einer Fülle von Neuropathien, die sich im Fall der charakteristischen Schwannome des Gehörnervs in Form von Gleichgewichtsstörungen und Hörverlust äußern. Konsequenterweise resultiert die Erkrankung in einer signifikant verkürzten Lebenserwartung von 15 Jahren nach Diagnose (Gusella et al., 1996; Ruggieri and Huson, 1999).

Die hauptsächlich mit der Krankheit assoziierten Schwannome gehören infolge der Expression bestimmter Markerproteine (z.B. S100 und NGFR) zu den Schwann Zellen (Mirsky and Jessen, 1999). Sie weisen im Vergleich zu normalen humanen Schwann Zellen eine erhöhte Proliferation und den Verlust der Kontaktinhibition auf, so daß sie *in vitro* in dritter Dimension wachsen (Rosenbaum et al., 1998). Darüber hinaus ist *in vitro* ein morphologischer Wandel mit langen Zellausläufern (Filopodien) und Lamellipodien (siehe unten: Box „Aktin-Zytoskelett“), sowie ein verstärktes Ausbreiten auf verschiedenen Matrixkomponenten (Laminin, Kollagen, Fibronectin) sichtbar (Pelton et al., 1998).

Klonierung von NF2

Durch Stammbaumanalysen konnte das verantwortliche Gen auf Chromosom 22 lokalisiert werden (Dumanski et al., 1987; Seizinger et al., 1987; Seizinger et al., 1986). Dieses verhält sich nach den von Knudson aufgestellten Regeln (Knudson, 1993; Knudson, 1971) als Tumorsuppressor. In betroffenen Familien wird ein mutiertes Allel bereits über die Keimbahn vererbt und es kommt nach somatischer Mutation des zweiten Allels zum Ausbruch der Krankheit (Rouleau et al., 1987). Weitere Eingrenzung des Genlokus auf Chromosom 22 hat schließlich zur Klonierung des *NF2* Tumorsuppressorgens und dessen Lokalisierung auf Chromosom 22q12 geführt (Rouleau et al., 1987; Trofatter et al., 1993).

Inaktivierung von NF2

Mit Kenntnis der *NF2* Sequenz konnte bestimmt werden, daß Inaktivierung des *NF2* Gens auch für einen Großteil aller sporadisch auftretenden Schwannome und Meningeome verantwortlich ist (Bianchi et al., 1994; Lekanne Deprez et al., 1994; Rutledge et al., 1994). Zudem werden Mutationen von *NF2* in anderen, nicht mit der Krankheit NF2 assoziierten malignen Tumoren wie Melanomen, Karzinomen (Arakawa et al., 1994; Bianchi et al., 1994), Mesotheliomen (Bianchi et al., 1995; Cheng et al., 1999; Deguen et al., 1998; Sekido et al., 1995; Ueki et al., 1999) und Gastrointestinal Stroma Tumoren identifiziert (Fukasawa et al., 2000).

Die inaktivierenden Mutationen führen zu ‚Splicing‘-Fehlern, vorzeitiger Termination, Aminosäureaustausch oder ‚Frameshift‘ und sind über das gesamte Gen verteilt (Lutchman and Rouleau, 1996). Inwieweit allerdings die Schwere der NF2 Erkrankung und die Form der Mutation miteinander korrelieren, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. So haben einige Untersuchungen einen ernsteren Verlauf für ‚nonsense‘ Mutationen bestimmt (Evans et al., 2000; Parry et al., 1996; Rutledge et al., 1996), dagegen zeigt eine andere Studie keine Beziehung dieser Parameter (Bruder et al., 2001). Es sind daher keine direkten Rückschlüsse auf funktionell wichtige Sequenzabschnitte möglich.

NF2 Tumorsuppressorgen und Genprodukt

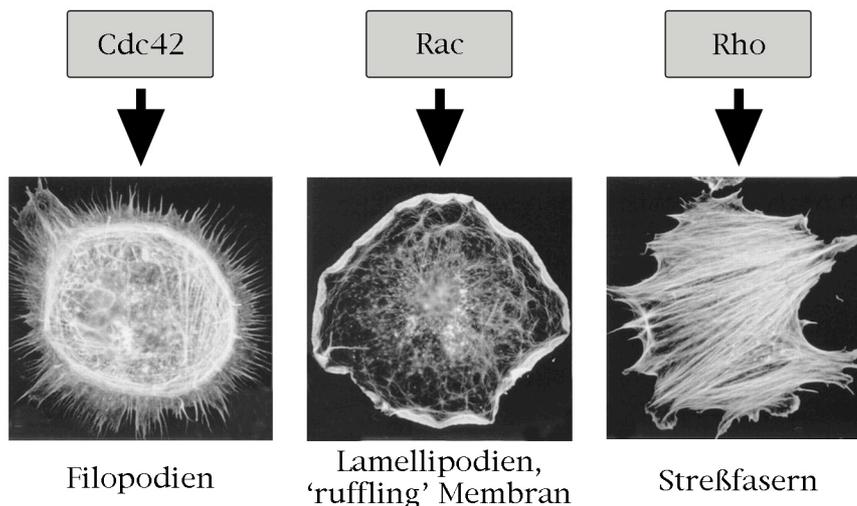
Genregulation

Das menschliche *NF2* Gen ist über einen Bereich von 90kb verteilt und besteht aus 17 Exonen (Zucman-Rossi et al., 1998). Bisher sind drei mRNA Spezies von etwa 7kb, 4,4kb und 2,6kb bekannt (Bianchi et al., 1994; Trofatter et al., 1993), von denen durch alternatives ‚Splicen‘ und unterschiedliche Polyadenylierung, sowie mehrere Transkriptions-Startstellen (Welling et al., 2000) verschiedene Transkripte gebildet werden (Hara et al., 1994; Hitotsumatsu et al., 1994; Huynh et al., 1994; Schmucker et al., 1999). Die cDNA der Isoform I (Bianchi et al., 1994), welche Thema der vorliegenden Arbeit ist, setzt sich aus den Exonen 1-15 plus Exon 17 zusammen und besteht aus 1788bp. Sie kodiert für ein Protein von 595 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 70kDa, dessen Verwandtschaft zu den ERM Proteinen im Namen Merlin ausgedrückt wird (Moesin-Ezrin-Radixin like protein (Trofatter et al., 1993); Merlin wird auf Grund der Isolation aus Schwannomen von wenigen Gruppen auch Schwannomin genannt (Rouleau et al., 1993).

Aktin-Zytoskelett

Aktinfilamente formen ein komplexes, dynamisches Netzwerk, welches an einer Reihe zellulärer Abläufe wie Motilität, Vesikeltransport, Adhäsion, Formgebung, Transkription und Signaltransduktion beteiligt ist (Pantaloni et al., 2001; Rafelski and Theriot, 2004). Der Grundbaustein globuläres G-Aktin befindet sich in einem Fließgleichgewicht mit filamentösem F-Aktin, das *in vitro* unter physiologischen Bedingungen fast vollständig auf Seite des F-Aktins liegt (Korn et al., 1987). In der Zelle erfolgt eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des G-Aktins, so daß mit den verfügbaren Untereinheiten schnell auf äußere Einwirkungen reagiert werden kann. Die Verschiebung der Balance wird durch verschiedene G-Aktin bindende Proteine wie Profilin erreicht (Witke, 2004), wodurch Aktin dem Gleichgewicht entzogen wird. Um die Polymerisation zu F-Aktin örtlich und zeitlich zu begrenzen steht der Zelle eine Serie von Mechanismen zur Verfügung, die zur Ausbildung spezialisierter Strukturen wie Filopodien, Streßfasern oder Lamellipodien genutzt werden.

Die lokal induzierte Nukleation neuer Aktinfilamente erfolgt durch den Arp2/3 Komplex (Welch et al., 1997) und Proteine der Formin Familie (Pruyne et al., 2002). Beide Nukleatoren müssen selbst noch aktiviert werden und reagieren auf Signale von kleinen GTPasen der Rho Familie (Hall, 1998). Formine binden direkt an die GTPase und werden aktiviert (Wallar and Alberts, 2003), wogegen der Arp2/3 Komplex von WASp/WAVE Proteinen aktiviert wird, deren Autoinhibition durch die GTPase aufgehoben wird (Stradal et al., 2004). Die Bildung fingerförmiger Filopodien wird durch aktives Cdc42 induziert (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995), aktives Rac stimuliert Lamellipodien und Membran ‚Ruffles‘, Ausfaltungen der apikalen Plasmamembran (Nobes and Hall, 1995; Ridley et al., 1992). Die Aktivität von Rho führt schließlich zur Bildung von Streßfasern und deren Verankerungen in der basalen Plasmamembran, den fokalen Adhäsionspunkten (Ridley and Hall, 1992).



Expression

Das Expressionsspektrum von Merlin im adulten Menschen ist sehr breit gefächert und steht damit im Gegensatz zum beschränkten Auftreten der Krankheit NF2. Merlin kann in Epithelien von Niere, Bauchspeicheldrüse, Schilddrüse, Lunge, Haut, Dickdarm und Dünndarm, im Mesothel des Bauchfells, im Endothel von Blutgefäßen und in Neuronen und Schwann Zellen nachgewiesen werden (den Bakker et al., 1999). Obendrein ist die *NF2* Expression in Brust, Eierstock, Plazenta, Gebärmuttermuskulatur, glatter und gestreifter Muskulatur, Speiseröhre und Nebenniere bestimmbar (Bianchi et al., 1994; den Bakker et al., 1995a; den Bakker et al., 1995b; Rouleau et al., 1993; Stemmer-Rachamimov et al., 1997).

Subzelluläre Verteilung

Eine weitere Eigenheit von Merlin stellt die für einen Tumorsuppressor ungewöhnliche subzelluläre Verteilung dar. In Zellkultur liegt Merlin in dynamischen Membranregionen (Lamellipodien, Filopodien und ‚ruffling‘-Membran), wo es mit filamentösem Aktin kolokalisiert, und im perinuklearen Raum vor (Gonzalez-Agosti et al., 1996; Sainio et al., 1997; Schmucker et al., 1997). In isolierten Nervenfasern konzentriert es neben den Ranvier Schnürringen im paranodalen Bereich der Schwann Zellen (Scherer and Gutmann, 1996). Zusätzlich ist Merlin auch abhängig vom Zellzyklus im Zellkern, der Mitosespindel und dem kontraktilen Ring zu finden (Muranen et al., 2005).

Protein-Domänen

Merlin gliedert sich in drei Domänen und zeigt eine große Ähnlichkeit mit den ERM Proteinen, einer Gruppe, die als Zytoskelett-Plasmamembran Koppelungsproteine klassifiziert werden (Bretscher et al., 2002): eine aminoternale, globuläre FERM Domäne (erythrocyte band four-point one, ezrin, radixin, moesin) von circa 300 Aminosäuren, die eine evolutionär konservierte Domäne ist, welche Protein-Protein Interaktionen vermittelt (Chishti et al., 1998), eine zentrale α -helikale Domäne von circa 200 Aminosäuren und eine carboxyterminale Domäne von etwa 100 Aminosäuren. Die FERM Domäne humanen Merlins zeigt 61% Homologie zu Ezrin. α -helikale und carboxyterminale Domäne von Merlin und Ezrin stimmen zu 30% beziehungsweise 22% überein, so daß sich insgesamt ein Homologiegrad von 45% ergibt (Turunen et al., 1998).

Protein-Konformation

Die Funktion der ERM Proteine wird u.a. über die Konformation gesteuert. Diese verbinden in geöffneter Form Transmembranrezeptoren der Plasmamembran mit dem Aktin-

Zytoskelett und sind in geschlossener Form inaktiv. ERM Proteine interagieren intramolekular über die C-ERMAD und N-ERMAD ('carboxy-' und 'aminoterminal ERM association domain'). Die N-ERMAD entspricht der FERM Domäne, die C-ERMAD den letzten 100 Aminosäuren (Gary and Bretscher, 1995). Die intramolekulare Interaktion in ERM Proteinen wird sequentiell durch Phospholipid-Bindung (N-ERMAD) und Threonin-Phosphorylierung (C-ERMAD) durch die Kinasen PKC und ROCK/Rho Kinase unterbunden, so daß das Protein in einer geöffneten Konformation vorliegt (Fievet et al., 2004; Hirao et al., 1996; Matsui et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Ng et al., 2001; Pietromonaco et al., 1998). Die Kristallstruktur von Moesin N- und C-ERMAD bestätigt sterische und elektrostatische Veränderungen, die mit einer Phosphorylierung von Threonin-558 in Moesin (Threonin-567 in Ezrin, und Threonin-564 in Radixin) einhergehen und so die N-C-Bindung stören (Pearson et al., 2000). Das geöffnete Protein ist dann in der Lage, andere Proteine und das F-Aktin-Zytoskelett zu binden (Nakamura et al., 1999; Reczek and Bretscher, 1998; Simons et al., 1998).

Für Merlin wird ein ähnlicher, die Konformation regulierender Mechanismus angenommen. Auch der N- und der C-Terminus von Merlin wechselwirken miteinander (Gronholm et al., 1999; Meng et al., 2000). Die Assoziierung wird durch Phosphorylierung von Serin-518 (nicht homolog zu Threonin-558 in Moesin) beeinflusst, welche durch den cAMP/PKA Signalweg (Alfthan et al., 2004) und die Rac/PAK Kaskade reguliert wird (Kissil et al., 2002; Shaw et al., 2001; Xiao et al., 2002). Der N-Terminus bindet an den C-Terminus, wenn dessen Serin-518 zu Alanin (nicht-phosphoryliert) mutiert ist. Mutation zu Asparaginsäure (pseudo-phosphoryliert) inhibiert dies, woraus geschlossen wird, daß Phosphorylierung die Interaktion inhibiert. Allerdings präzipitiert das vollständige MerlinS518A, welches demnach geschlossen sein sollte, sogar noch stärker als der Wildtyp mit dem separaten N-Terminus (Shaw et al., 2001). Dieses Ergebnis zeigt, daß weitere Untersuchungen bezüglich der Regulation von Merlin nötig sind.

Da weder Ezrin, Radixin noch Moesin als Tumorsuppressor fungieren, ist davon auszugehen, daß die auftretenden strukturellen Unterschiede diese Eigenschaft von Merlin begründen. Betrachtet man die Verteilung der nicht-konservierten Aminosäuren zwischen Merlin und ERM Proteinen, fällt auf, daß diese meist auf der Oberfläche des Proteins liegen (Kang et al., 2002; Shimizu et al., 2002). Dies deutet auf Protein-Protein Interaktionen oder regulatorische Mechanismen hin, die Merlin von ERM Proteinen unterscheiden. Weiterhin besitzt Merlin nicht die in

der ERM Familie konservierte carboxyterminale F-Aktin Binderegion (Turunen et al., 1994), sondern weist im Aminoterminus eine derartige Funktion auf (Brault et al., 2001; James et al., 2001; Xu and Gutmann, 1998).

Eine veränderte Konformation und damit die verfügbare Oberfläche, sowie modifizierte elektrostatische Eigenschaften derselben, sind daher Parameter, über die die Interaktionen von ERM Proteinen und Merlin geregelt werden.

Merlin Interaktionspartner

Zytoskelett

Merlin kann *in vivo* und *in vitro* direkt über eine aminoternale F-Aktin bindende Domäne mit F-Aktin (Brault et al., 2001; James et al., 2001; Xu and Gutmann, 1998) und *in vitro* auch mit Mikrotubuli interagieren (Xu and Gutmann, 1998). Eine indirekte Interaktion von Merlin und dem Zytoskelett wird durch Bindung an andere Proteine wie β II-Spektrin (auch Fodrin) ermöglicht. Dieser Komplex wird über den Merlin C-Terminus und die Ankyrin-bindende Region in β II-Spektrin formiert und durch Phosphorylierung von Merlin Serin-518 verstärkt (Rong et al., 2004a; Scoles et al., 1998). Weiterhin kann die Bildung von Heteromeren mit ERM Proteinen eine Verbindung zum F-Aktin aufbauen (Gronholm et al., 1999; Huang et al., 1998; Meng et al., 2000; Nguyen et al., 2001), wie auch der Komplex aus Merlin FERM Domäne und dem Adapterprotein Paxillin (Fernandez-Valle et al., 2002; Turner, 2000). Durch das Tubulinmotorprotein Kinesin-1 erfolgt auch noch eine indirekte Kopplung zwischen Merlin und den Mikrotubuli (Hakimi et al., 2002).

Transmembranproteine

Die subzelluläre Verteilung von Merlin wird daneben noch durch Interaktion mit Transmembranproteinen reguliert. Die Bindung an den Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 (Morrison et al., 2001) und das neuronale Caspr/paranodin (Denisenko-Nehrbass et al., 2003) erfolgt direkt über die FERM Domäne. Der Kontakt mit dem Zellmatrix-Rezeptor β 1-Integrin (Obremski et al., 1998; Taylor et al., 2003) und der Rezeptor Tyrosinkinase ErbB2 (Fernandez-Valle et al., 2002) ist noch nicht genauer charakterisiert. An den Zell-Zell Kontakt vermittelndes E-Cadherin ist Merlin indirekt über β -Catenin gebunden (Lallemand et al., 2003; Maeda et al., 1999).

Vesikeltransport

Merlin interagiert auch mit Proteinen des intrazellulären Vesikeltransports. HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) reguliert den Transport von Endosomen (Katzmann et al., 2002). Eine Bindung von Merlin an HRS liegt an frühen Endosomen vor und lokalisiert im perinuklearen Raum (Sun et al., 2002). Syntenin, welches Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verbindet und den intrazellulären Vesikeltransport beeinflusst, interagiert direkt mit Merlin und soll dessen subzelluläre Lokalisierung beeinflussen (Grootjans et al., 1997; Jannatipour et al., 2001). Merlin bindet wie auch ERM Proteine an EBP50 (Gonzalez-Agosti et al., 1999; Murthy et al., 1998; Nguyen et al., 2001). EBP-50 (ERM-bindendes Phosphoprotein von 50kDa) ist ein regulatorischer Kofaktor für den Natrium/Protonen Kanal NHE3 und rekrutiert ERM Proteine indirekt an Transmembranproteine (Shenolikar and Weinman, 2001).

Weitere Interaktionspartner sind die Serin/Threonin Kinase PAK1 (Kissil et al., 2003), der GDP Dissoziationsinhibitor RhoGDI (Maeda et al., 1999) und SCHIP-1 (Schwannomin-interagierendes Protein-1, (Goutebroze et al., 2000)), das Homologie zu FEZ1 und UNC-76 besitzt, Proteinen, die am axonalen Wachstum und der neuronalen Faszikulation beteiligt sind (Bloom and Horvitz, 1997).

Die Entdeckung dieser und anderer Interaktionspartner sowie die Analyse der Konformation (Bretscher et al., 2002; Gusella et al., 1999; McClatchey, 2003; Sherman and Gutmann, 2001) gibt einen Einblick in die Prozesse, an denen Merlin beteiligt ist, doch ist es bisher nicht gelungen, den Mechanismus, mittels dessen Merlin als Tumorsuppressor fungiert, aufzuklären.

Funktion von Merlin

Die Überexpression von Merlin Isoform I reduziert die Proliferation bei hoher Zelldichte und unterdrückt das Tumorstadium in Nacktmäusen (Lutchman and Rouleau, 1995; Sherman et al., 1997). Dagegen verfügen weder andere Isoformen noch aus NF2 Patienten isolierte Mutanten über anti-proliferative Eigenschaften (Gutmann et al., 1998; Gutmann et al., 2001). Überdies wirkt Merlin der Transformation durch onkogenes Ras entgegen, was auf einen Einfluß unterhalb von Ras hinweist (Tikoo et al., 1994). Übereinstimmend damit wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Jun, Fos und ELK blockiert (Kim et al., 2002; Lim et al., 2003), deren Funktion notwendig für das Voranschreiten im Zellzyklus ist (Hazzalin and Mahadevan, 2002; Karin, 1995). Im Gegensatz dazu zeigen *Nf2*^{-/-} Maus Fibroblasten einen transformierten Phänotyp, charakterisiert durch den Verlust der

Kontaktinhibition des Wachstums und erhöhter Jun, JNK und ERK Phosphorylierung (Lallemand et al., 2003; Shaw et al., 2001). Gleichmaßen weisen primäre humane Schwannom Zellen erhöhte Werte für phosphoryliertes JNK und aktives Rac auf (Kaempchen et al., 2003).

Eine Konsequenz von Merlin Defizienz wie auch von onkogener Transformation ist der Verlust korrekt ausgebildeter Zell-Zell Kontakte (Lallemand et al., 2003; Wheelock and Johnson, 2003) und eine umstrukturiertes Aktin-Zytoskelett (Pawlak and Helfman, 2001; Pelton et al., 1998).

Merlin wird durch einen Prozeß, der von Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt ausgelöst wird, aktiviert und stellt die Kontaktinhibition des Wachstums in transformierten Zellen wieder her (Morrison et al., 2001). Als physiologischer Gegenspieler zu Merlin werden die ERM Proteine angesehen, die wie Merlin an CD44 binden und damit Teil eines Sensors für Kontaktinhibition sind (Morrison et al., 2001). ERM Proteine fungieren entgegengesetzt zu Merlin indem sie zelluläres Überleben (Gautreau et al., 1999), Motilität (Lamb et al., 1997; Tsuda et al., 2004) und Transformation (Tran Quang et al., 2000) unterstützen. Außerdem wird der Aufbau stabiler Zell-Zell Kontakte durch einen verzögerten Transport von E-Cadherin zur Plasmamembran durch aktives Ezrin gestört (Pujuguet et al., 2003).

Bei geringer Zelldichte binden Ezrin und hyperphosphoryliertes, inaktives Merlin an CD44. Steigende Zelldichte führt zu Hypophosphorylierung und Aktivierung von Merlin, so daß Proliferation und Tumorwachstum inhibiert werden. Zur Erfüllung dieser Aufgabe muß Merlin an CD44 gebunden sein, da eine Überexpression des zytoplasmatischen Teils von CD44 und damit Sequestrierung von Merlin die Tumorsuppressorwirkung blockiert. Gleichzeitig geht die Bindung zwischen Ezrin und CD44 verloren. Als auslösendes externes Signal dient über die Bindung an CD44 die Zellmatrixkomponente Hyaluronsäure (Morrison et al., 2001).

Für den Aktivierungsschritt von Merlin wird die Dephosphorylierung an Serin-518 (Shaw et al., 2001) verantwortlich gemacht. Die nicht-phosphorylierbare Alanin Mutante von Serin-518 (S518A) unterdrückt das Wachstum in weichem Agar, wogegen die pseudo-phosphorylierte Asparaginsäure Mutante (S518D) inaktiv ist (Surace et al., 2004). Wie diese Merlinformen den Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt vermitteln ist bisher nicht geklärt. Der Zell-Matrix Kontakt durch Hyaluronsäure bewirkt, daß das an CD44 gebundene Merlin hypophosphoryliert ist

(Morrison et al., 2001). Der von E-Cadherin aufgebaute Zell-Zell Kontakt wird zwar durch Merlin S518A vermittelt, doch kolokalisieren beide Mutanten bei hoher Zelldichte mit E-Cadherin (Lallemand et al., 2003).

Die Komplexität der von Merlin vermittelten Wachstumsinhibition wird noch durch ein anderes Beispiel deutlich. Einerseits wird die Zelladhäsion nach Überexpression von Merlinmutanten oder Reduktion der Proteinkonzentration durch ‚Antisense‘ Oligonukleotide deutlich vermindert (Huynh and Pulst, 1996; Koga et al., 1998; Stokowski and Cox, 2000). Andererseits zeigen primäre Schwannom Zellen aus NF2 Patienten eine erhöhte Integrin-abhängige Adhäsion im Vergleich zu Schwann Zellen mit funktionellem Merlin (Utermark et al., 2003).

Dies deutet darauf hin, daß Merlin in Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsprozessen unterschiedlich reguliert wird. Bisher ist die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Serin-518 das einzige Regulativ in Merlin. Daß weitere Modifikationen eine Rolle spielen, ist angesichts der unterschiedlichen Vorgänge, an denen Merlin beteiligt ist, durchaus denkbar. Mit einer Phosphopeptidanalyse wurde die Inkorporation von Phosphat an Serin- und Threoninresten ermittelt (Shaw et al., 1998).

Dieser zusätzlichen Threonin-Phosphorylierung ist bisher keine Funktion zugeordnet worden. Zudem ist die Phosphorylierung an Serin-518 Voraussetzung für die Bildung zweier weiterer Phosphopeptide von Merlin, da diese nicht in der S518A Mutante vorhanden sind (Shaw et al., 2001).

Wie bereits einführend erwähnt stellen Veränderungen im Aktin-Zytoskelett eine weitere Gemeinsamkeit von Merlin Defizienz und onkogener Transformation dar. Menschliche Schwannom Zellen weisen im Unterschied zu normalen Schwann Zellen modifizierte Streßfasern und ein abnormes ‚ruffling‘ der Membran auf. Diese Phänotypen weisen in Richtung der kleinen GTPasen der Rho Familie, und Expression von dominant negativem Rac oder Rho kann die Abnormalitäten teilweise umkehren (Pelton et al., 1998). Die Re-Expression von Merlin in Schwannom Zellen macht die Umwandlungen im Zytoskelett ebenso rückgängig (Bashour et al., 2002).

Inwieweit die Restrukturierung des Zytoskeletts und der Einfluß auf die Proliferation zwei separate Effekte von Merlin sind oder beide Teil des gleichen Prozesses sind, ist noch unklar. Ursprünglich wurden Veränderungen im Zytoskelett hauptsächlich mit Adhäsionsereignissen und die Proliferation mit Mitogenstimulation assoziiert. Mittlerweile ist deutlich geworden, daß sich Wachstumsfaktorrezeptoren und

Adhäsionsrezeptoren gegenseitig als Korezeptoren bedingen, um Adhäsion und Mitogensignale zu regulieren (Comoglio et al., 2003; Miranti and Brugge, 2002; Schwartz and Ginsberg, 2002). So potenzieren $\alpha\beta4$ Integrine die Funktion des HGF Rezeptors c-Met (Trusolino et al., 2001) und der FGF-Rezeptor erlaubt erst die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls N-CAM (Cavallaro et al., 2001). Auf diese Weise könnte Merlin mittels bestimmter Bindungspartner, die Knotenpunkte der Signaltransduktion von Adhäsion und Proliferation besetzen, einen Effekt auf beide Vorgänge ausüben. Mit dieser Annahme wäre es demnach möglich durch Studie des Zytoskeletts, Merlin Effektoren zu identifizieren, die auch die Proliferation beeinflussen und vice versa.

Alle der oben beschriebenen Signaltransduktionsschritte beinhalten enzymatisch katalysierte Reaktionen wie Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen und Hydrolyse (Hunter, 2000). Merlin kann nur, da es selbst keine bekannte katalytische Aktivität besitzt, durch kompetitive Bindung oder Bindungspartner mit katalytischen Fähigkeiten einen Einfluß nehmen. Bezüglich PAK1 wurde gezeigt, daß Merlin und Rac (Aktivator von PAK) um die Bindung an PAK konkurrieren. Bei hoher Zelldichte blockiert Merlin die Rac-bindende Domäne in PAK und verhindert dadurch die Aktivierung von PAK (Kissil et al., 2003). Da PAK die Phosphorylierung an Merlin Serin-518 katalysiert, kann Merlin die eigene Inaktivierung kontrollieren. Zusätzlich inhibiert Merlin die Interaktion von PI3-Kinase und PIKE (phosphatidylinositol 3-kinase enhancer), einer GTPase, die die Kinaseaktivität von PI3-Kinase verstärkt (Rong et al., 2004b). Konfluenz bewirkt auch die Verdrängung von Ezrin durch Merlin am zytoplasmatischen Teil von CD44 (Morrison et al., 2001). Ezrin ist wiederum für die von Rezeptortyrosinkinasen veranlaßte Signaltransduktion von Bedeutung, da es den für die Aktivierung von Ras notwendigen Austauschfaktor Sos bindet (Morrison et al., 2005).

Aufgrund der Vielzahl beschriebener Interaktionen von Merlin ist anzunehmen, daß Merlin diversen Regulationen unterworfen ist. Diese können die Expression von Merlin (den Bakker et al., 1999; Shaw et al., 1998) und seiner Bindungspartner sowie alternatives ‚Splicing‘ von Merlin betreffen (Welling et al., 2000). Insbesondere kommen für eine Regulation posttranslationale Modifikationen in Frage, die die Struktur oder die Eigenschaften der Proteinoberfläche verändern. Die systematische Untersuchung von Merlin Mutanten aus Patienten würde sich als sehr aufwendig gestalten, da Punktmutationen über das gesamte Protein verteilt sind. In Maus Fibroblasten besitzt der separate N-Terminus ebenfalls ein hohes antiproliferatives Potential in einem

Transformationstest, doch zeigt das vollständige Protein einen höheren Effekt, was auf einen Einfluß des C-Terminus hinweist (Tikoo et al., 1994). Zusätzlich haben Proliferationstests in Ratten Schwannom Zellen eine Synergie von N- und C-Terminus gezeigt (Sherman et al., 1997). Die bisher einzige bekannte Modifikation, die reversible Phosphorylierung an Serin-518, liegt im C-Terminus. Die publizierten Phosphopeptidanalysen und die Bedeutung des Aminoterminus lassen zum einen weitere Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, erwarten, die im N- und C-Terminus liegen. Mit deren Hilfe ließen sich die durch Merlin regulierten Prozesse besser aufgliedern und genauer studieren.

Zielsetzung

Hauptziel dieser Arbeit ist, posttranslationale Veränderungen an Merlin zu identifizieren, welche für die von Merlin ausgeübte Tumorsuppression essentiell sind. Als weiteres damit zusammenhängendes Ziel sollen für die Tumorsuppression wichtige Effektoren identifiziert werden. Insbesondere wird das Augenmerk auf mögliche mit Merlin interagierende Effektoren gerichtet sein, die das Aktin-Zytoskelett verändern. Es soll untersucht werden, ob die Wirkung auf das Zytoskelett mit der Tumorsuppressorfunktion in Zusammenhang steht.

Ergebnisse

Einleitung

Zur funktionellen Analyse der von Merlin vermittelten Kontaktinhibition würden sich insbesondere menschliche Schwann-Zellen eignen, da sie im pathologischen Verlauf von Neurofibromatose 2 (NF2) hauptsächlich betroffen sind und die charakteristischen Schwannome bilden. Der Nutzen dieses Systems wird aber durch die problematische Handhabbarkeit eingeschränkt; primäre Schwann-Zellen sind nur für kurze Zeit kultivierbar, schwierig zu transfizieren und aufwendig zu isolieren, um nur einige Nachteile zu nennen. Es wurde daher für diese Studie auf das von Morrison et al. (2001) beschriebene Modellsystem aus der Ratte zurückgegriffen.

Dessen Basis bildet die aus dem Tumor RT4 hervorgegangene, Ratten-Schwannoma Zelllinie RT4-D6P2T (Bansal and Pfeiffer, 1987; Imada and Sueoka, 1978; Tomozawa and Sueoka, 1978), die auf Grund der Transformation die Eigenschaft der Zelldichte-abhängigen Inhibition des Wachstums (Kontaktinhibition) verloren hat. Die Transformation wurde chemisch durch das alkylierende Mutagen Nitrosoethylharnstoff (NEU) induziert (Schubert et al., 1974) und führte u.a. zu einer aktivierenden Mutation im Neu Proto-Onkogen (auch ErbB2; kodiert für die Rezeptor-Tyrosinkinase p185erbB2 aus der EGF-Rezeptor Familie; (Bargmann et al., 1986; Nikitin et al., 1991). Diese Schwannoma Zelllinie ist nicht mit der Krankheit NF2 assoziiert und es liegt keine Mutation im *NF2* Locus vor, so daß weiterhin funktionelles Merlin exprimiert wird. Allerdings erfolgt keine Zelldichte bedingte Expressionssteigerung von Merlin wie es für Schwann-Zellen (Morrison et al., 2001) oder NIH-3T3 Fibroblasten (Shaw et al., 1998) charakteristisch ist.

Die RT4-D6P2T Zellen sind daher stabil mit einem induzierbaren Expressionsplasmid für Merlin transfiziert worden (reverses Tet System; RT4TetwtNF2). Dadurch kann die Merlinmenge willentlich erhöht und in die Balance von transformierenden versus suppressierenden Faktoren eingegriffen werden. Die Kontaktinhibition kann in RT4 Zellen durch konditionelle Erhöhung der Expression von Merlin (durch Gabe von Doxycyclin, einem Tetracyclin), auf den Grad, welcher bei hoher Zelldichte in Schwann-Zellen auftritt, und damit Nachahmung der physiologischen Vorgänge, wiederhergestellt werden. Dies gleicht dem Vorgang der Kontaktinhibition bei hoher Zelldichte, so daß sich dieses System zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der durch Merlin vermittelten Zelldichte-abhängigen Inhibition des Wachstums eignet. Die Wirkung von Merlin als Vermittler der Kontaktinhibition ist zusätzlich von einer Dephosphorylierung abhängig. Diese erfolgt bei

Konfluenz, kann aber auch bei geringer Zelldichte durch Zell-Matrix Kontakt induziert werden (Morrison et al., 2001). In beiden Fällen kommt es zur Reduktion der Proliferation.

Im folgenden Abschnitt werden einige grundlegende, bekannte Kennzeichen der Doxycyclin-induzierbaren RT4TetwtNF2 Zellen (Klon 5₄) beschrieben, um darauf aufbauend die neuen Ergebnisse darzustellen.

Merlin fungiert als Tumorsuppressor bei hoher Zelldichte

Krebszellen zeichnen sich u.a. durch zwei Eigenschaften aus, die *in vitro* untersucht werden können. Zum einen können sie nicht-adhären, also unabhängig von einem Substrat wachsen. Dies kann in einem Experiment bestimmt werden, in dem Zellen künstlich durch Einbetten in weichem Agar in Suspension gehalten werden. Doxycyclin-induzierbare RT4TetwtNF2 Zellen (Abb.1A) wachsen mit endogenem Merlin (-Dox) in Weichagar und bilden Kolonien. Überexpression von Merlin (+ Dox) wirkt der Transformation entgegen und reduziert dieses Wachstum um 28% (Abb. 1B). Zum anderen ist Verlust der Kontaktinhibition ein Charakteristikum von Krebszellen. Nicht-transformierte Zellen, die künstlich aus ihrem natürlichen Kontext entnommen und *in vitro* kultiviert werden, verhalten sie sich immer noch als Mitglieder einer regulierten Population und stoppen das Wachstum bei Konfluenz. Die transformierten RT4TetwtNF2 Zellen stellen mit endogenem Merlin nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht die Proliferation nicht ein, führen das Wachstum in dritter Dimension fort und bilden charakteristische Aggregate, sogenannte Fokusse. Überexpression von Merlin reduziert die Fokusbildung signifikant (Abb. 1C).

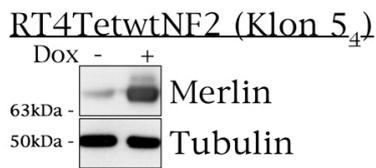
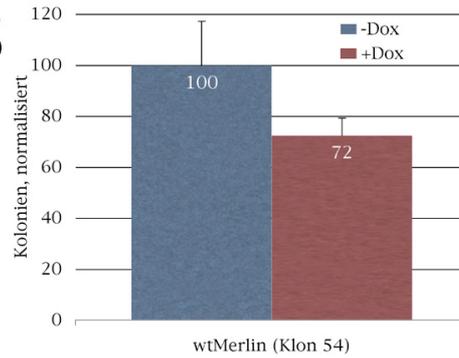
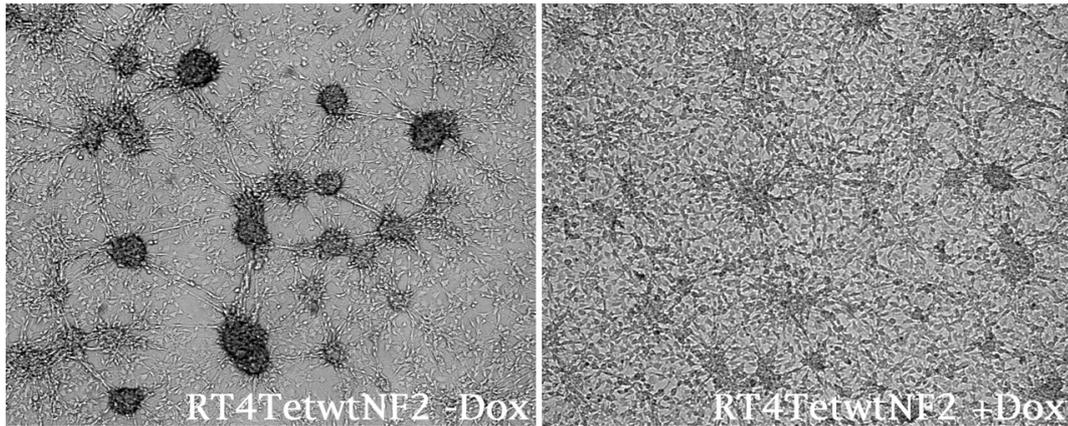
A**B****C**

Abbildung 1: Merlin inhibiert die Transformation. (A) Überexpression von Merlin in RT4TetwtNF2 Zellen (Klon 5₄) demonstriert im Western Blot mit anti-Merlin Ak (C-18). Ladekontrolle mit anti-Tubulin (TU-02). (B) Weichagar Wachstum wird durch Merlin reduziert. RT4TetwtNF2 Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin in Weichagar suspendiert. Das Koloniewachstum wird nach 10-15 Tagen ausgewertet. Koloniezahl wird auf '-Dox' Ansatz normalisiert. (C) Fokusbildung wird durch Merlin inhibiert. RT4TetwtNF2 Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin bei hoher Zelldichte gesät. Die Fokusbildung wird nach 10-15 Tagen begutachtet.

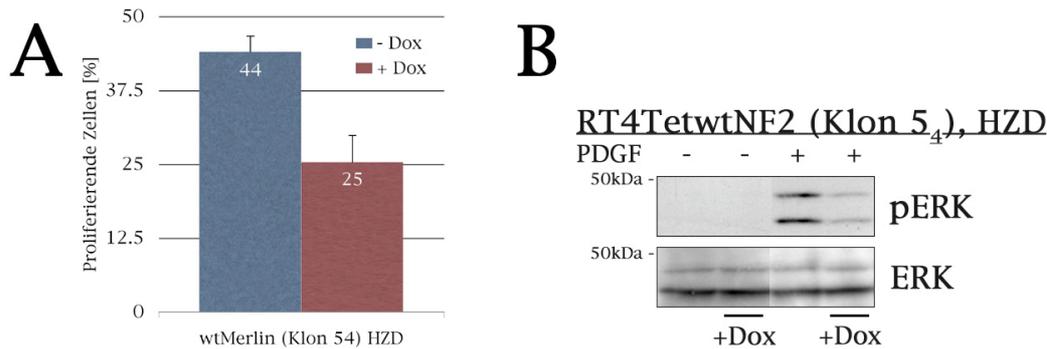


Abbildung 2: Merlin reduziert die Proliferation und beeinflusst die Signaltransduktion bei hoher Zelldichte. RT4TetwtNF2 Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin bei hoher Zelldichte ausgesät. (A) Die BrdU-Inkorporation erfolgt mit 50 μ M BrdU über 3h. Angeführt ist der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation. (B) PDGF-Stimulation erfolgt mit 10ng/ml über 5min. Die Phosphorylierung von ERK wird mit einem phosphospezifischen Ak nachgewiesen. Nach Strippen des Blots wird der ERK-Gehalt mit einem panERK Ak bestimmt.

Die so nachgewiesene Verminderung des ‘Zellaufkommens’ kann theoretisch auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Dafür könnte eine gesteigerte Apoptose, ein reduziertes Größenwachstum oder ein Anhalten im Zellzyklus verantwortlich sein. Merlin (+ Dox) hemmt bei hoher Zelldichte (HZD) die DNA-Synthese, gemessen an inkorporiertem BrdU (Abb. 2A, Reduktion um 43%). Dies resultiert nach Morrison aus einem Arrest des Zellzyklus in G1/S (Übergang Phase G1 in DNA-Synthese Phase S; (Morrison et al., 2001)). Wie wird diese Funktion nun vermittelt?

Zellteilung wird über genetische Programme reguliert, die unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren stehen. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird durch Signaltransduktionskaskaden bestimmt. Von zentraler Bedeutung für die Proliferation ist die Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade (McCormick, 1999). Die sequentielle Stimulation der Einzelkomponenten (de Vries-Smits et al., 1992; Howe et al., 1992; Warne et al., 1993) bewirkt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie (Marais et al., 1993), welche schließlich ihren Einfluß auf die Zellzyklusmaschinerie ausüben (Herber et al., 1994).

Merlin hemmt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie (Kim et al., 2002) und die darüber liegende Signaltransduktionskaskade (Lim et al., 2003; Morrison et al., 2001). Diese Ergebnisse haben zu der Spekulation geführt, daß Merlin die Tumorsuppressorfunktion u.a. auf diesem Weg vermittelt. Ein wichtiger

Wachstumsfaktor für Schwann-Zellen ist PDGF (platelet-derived growth factor; (Davis and Stroobant, 1990), der auch die Ras/Raf/MEK/ERK Signaltransduktionskaskade aktiviert (Sato et al., 1990). Überexpression von Merlin in RT4TetwtNF2 Zellen reduziert bei hoher Zelldichte die PDGF-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung von ERK (Abb. 2B).

Wie kommt es nun zur Aktivierung von Merlin und wie wird die Tumorsuppressorfunktion vermittelt? Wenn Merlin seine Funktion über einen Einfluß auf die Signaltransduktion ausübt, so muß der direkte Effekt innerhalb von kurzer Zeit nach Aktivierung von Merlin erfolgen. Das verwendete Modellsystem sollte daher eine kurzfristige Aktivierung von Merlin ermöglichen und die Auswirkung dieser Aktivität ebenso schnell meßbar machen.

Merlin interagiert bei hoher Zelldichte mit dem Transmembranrezeptor CD44 und wird durch Zell-Matrix Kontakt, insbesondere die Bindung von hochmolekularer Hyaluronsäure (HA) an CD44, aktiviert. Diese Aktivierung beinhaltet eine Dephosphorylierung von Merlin, welche sich im Polyacrylamidgel durch zwei unterschiedlich wandernde Merlinspezies ausdrückt (Morrison et al., 2001). Die Kultivierung von RT4TetwtNF2 Zellen bei geringer Zelldichte und Stimulierung mit hochmolekularer HA erlaubt daher zeitlich gesehen eine Untersuchung der Vorgänge, welche zur Aktivierung von Merlin führen und die als Reaktion auf diese Aktivierung ablaufen. Der Vorteil dieser Versuchsanordnung besteht darin, daß Nebeneffekte, die bei Konfluenz durch Zell-Zell Kontakt und andere Zellmatrixkomponenten entstehen, weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Tumorsuppressorfunktion wird durch Hyaluronsäure aktiviert und beeinflusst die Signaltransduktion

Der Vergleich von Dox-induzierten RT4TetwtNF2 Zellen bei hoher und geringer Zelldichte zeigt eine Zelldichte-induzierte Dephosphorylierung von Merlin, sichtbar in der verstärkt auftretenden schneller wandernden Bande (Abb. 3A; der Tubulingehalt zeigt gleiche Zellzahlen an; (Shaw et al., 1998). Wird die Kultivierung bei geringer Zelldichte (GZD) durchgeführt und differentiell über fünf Minuten mit HA stimuliert, ist der gleiche Effekt erkennbar. HA induziert ebenfalls Dephosphorylierung von Merlin (Abb. 3B).

Der Hypothese folgend kann bei geringer Zelldichte die Tumorsuppressoraktivität von Merlin durch hochmolekulare Hyaluronsäure aktiviert werden. Nach Doxycyclin-Induktion und HA-

Inkubation wird der Anteil proliferierender Zellen, gemessen am BrdU Einbau, im Vergleich zu nicht HA-inkubierten Zellen um 69% reduziert (von 26% auf 8% proliferierende Zellen, Abb. 3C). Ebenfalls ist ein Einfluß auf die PDGF-vermittelte ERK Phosphorylierung erkennbar (Abb. 3D). Bei Vorliegen der endogenen Merlinkonzentration führt PDGF zu starker Phosphorylierung von ERK (Spur 5). Nach Doxycyclin-Induktion und HA-Inkubation wird der Signaltransfer von PDGF zu ERK blockiert (Spur 8). Der separate Effekt von Doxycyclin-Induktion und HA-Inkubation auf die Phosphorylierung von ERK ist in den Spuren 6 und 7 zu sehen. Beide Behandlungen führen zu intermediären Minderungen von pERK nach PDGF Stimulation. Bezüglich Proliferation und Signaltransduktion können also mit dem Modellsystem Ergebnisse erhalten werden, wie sie bei Konfluenz auftreten.

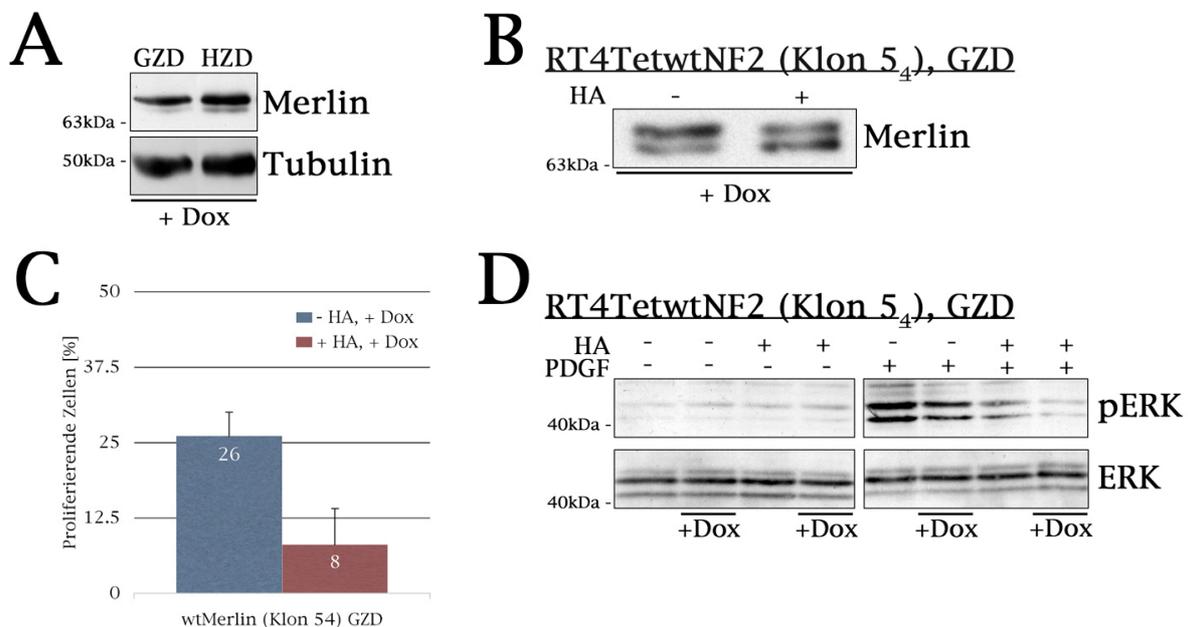


Abbildung 3: Die Tumorsuppressorfunktion von Merlin wird durch Hyaluronsäure (HA) aktiviert und bewirkt eine Hypophosphorylierung von Merlin. (A) RT4TetwtNF2 Zellen werden mit Doxycyclin bei hoher oder geringer Zelldichte ausgesät. Bei hoher Zelldichte erfolgt eine Hypophosphorylierung von Merlin, die zu einer höheren elektrophoretischen Beweglichkeit führt. (B-D) RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte ausgesät, Serumentzug und Induktion mit Doxycyclin erfolgen über Nacht. (B) HA Stimulation über 5min bewirkt Hypophosphorylierung von Merlin. (C) 12h Präinkubation mit HA reduziert die BrdU-Inkorporation (50µM BrdU über 3h). (D) 10min Präinkubation mit HA blockiert nach Dox-Induktion die PDGF-stimulierte (10ng/ml, 5min) ERK Phosphorylierung. Separate Dox-Induktion oder HA-Inkubation zeigen intermediäre Effekte auf die PDGF-stimulierte ERK Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von ERK wird mit einem phosphospezifischen Ak nachgewiesen. Nach Strippen des Blots wird der ERK-Gehalt mit einem panERK Ak bestimmt.

Neben einem Effekt auf die Proliferation wird Merlin auch ein Einfluß auf das F-Aktin Zytoskelett zugeschrieben. In Schwannoma Zellen können Veränderungen der Aktinstreßfasern beobachtet werden (Pelton et al., 1998), welche durch Wiedereinführung von Merlin revertiert werden (Bashour et al., 2002). Bei geringer Zelldichte binden inaktives Merlin aber auch die strukturell verwandten Proteine der ERM Familie (Ezrin, Radixin, Moesin) an den Hyaluronsäurerezeptor CD44 (Morrison et al., 2001; Sainio et al., 1997; Tsukita et al., 1994). HA führt nun zum einen zur Aktivierung von Merlin, zum anderen aber auch zu einer Minderung der Interaktion von CD44 mit den ERM Proteinen (Morrison et al., 2001). Da nur die ERM Proteine durch eine C-terminale Binderegion an F-Aktin binden können, stellt sich die Frage nach den Konsequenzen, wenn aktives Merlin an die Stelle der ERM Proteine tritt und diese Verbindung zum F-Aktin verloren geht. Die Kombination dieser Partner von CD44 ist besonders interessant, da es sich bei Merlin um einen Tumorsuppressor und bei Ezrin um ein Schlüsselprotein im Metastasierungsprozeß handelt (Khanna et al., 2004; Yu et al., 2004). Folglich könnten Veränderungen, die direkt mit dem Austausch von Ezrin und Merlin einhergehen, eine Funktion in der Tumorsuppression besitzen. Es soll daher untersucht werden, inwieweit aktiviertes Merlin das F-Aktin Zytoskelett beeinflusst.

Hyaluronsäure induziert Veränderungen im F-Aktin Zytoskelett

RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und die Merlin Expression mit Doxycyclin induziert. Nach Fixierung der Zellen wird Merlin über anti-Merlin Antikörper und F-Aktin mittels Phalloidin markiert und im Epifluoreszenzmikroskop untersucht.

Während nach Überexpression von Merlin viele Streßfasern (Abb. 4A, Pfeil) und kleinere Lamellipodien (Abb. 4A, Pfeilspitze) sichtbar sind, erfolgt nach der Aktivierung von Merlin durch HA (5min) eine Umstrukturierung, die sich in vermehrt auftretenden Lamellipodien (Abb. 4B, Pfeilspitzen) und veränderten Streßfasern (Abb. 4B, Pfeil) äußert. Beim Vergleich der HA-Einwirkung auf Zellen mit der endogenen Konzentration Merlin (-Dox) fallen ebenfalls Veränderungen im F-Aktin Zytoskelett auf (Abb. 4C). Ohne HA ist ein ausgeprägtes Streßfasersystem erkennbar (links, Pfeil), wogegen nach HA-Einwirkung kleinere Lamellipodien (rechts, Pfeilspitzen) und ungeordnete Streßfasern erkennbar sind (rechts, Pfeile). Insgesamt werden bei Überexpression von Merlin stärkere Umstrukturierungen des Zytoskeletts sichtbar.

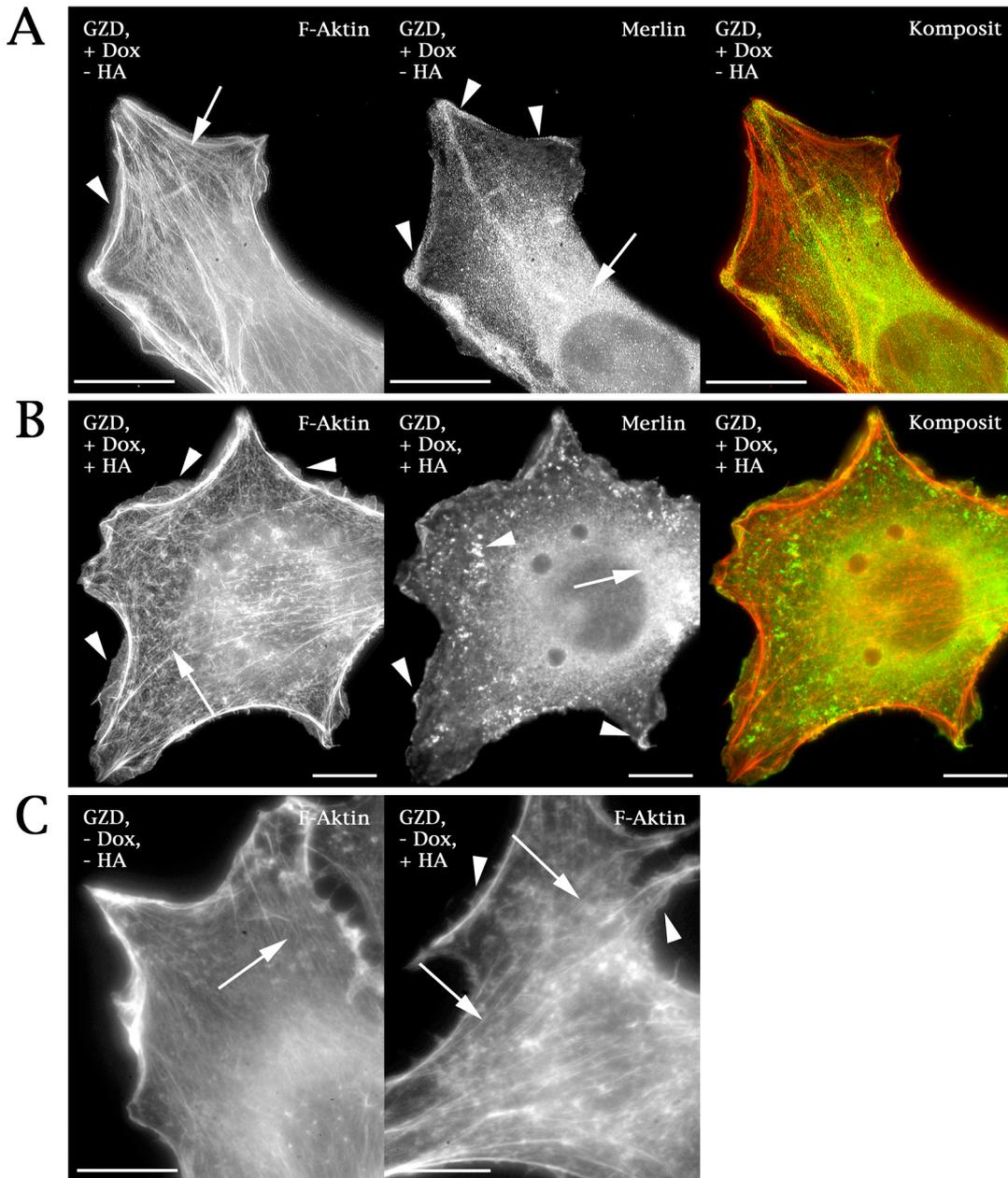


Abbildung 4: Hyaluronsäure bewirkt Veränderungen im F-Aktin Zytoskelett. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert, nach Serumentzug mit Doxycyclin induziert (A&B) und für 5min mit HA (100 μ g/ml) stimuliert (B&C-rechts). F-Aktin wird mit Phalloidin-Alexa594 und Merlin mit anti-Merlin (C-18) und Alexa488-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen Ak im Epifluoreszenz Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 10 μ m. Zellen in A und C-links weisen ein ausgeprägtes Streßfasersystem auf (Pfeile), wogegen nach HA Inkubation Umstrukturierungen erkennbar werden (B&C-rechts, Pfeile). Auffällig ist das verstärkte Auftreten von Lamellipodien (Pfeilspitzen) und die größere Fragmentierung der Streßfasern in B (Pfeile). Merlin lokalisiert im perinuklearen Raum (A&B, Pfeile) und an der Plasmamembran (A&B, Pfeilspitzen), bindet nach HA Inkubation aber verstärkt und in dichteren Aggregaten an die Plasmamembran.

Die subzelluläre Verteilung von Merlin (+ Dox) wird durch Hyaluronsäure (HA) ebenfalls verändert. In Abb. 4A ist Merlin einerseits diffus um den Zellkern herum sichtbar (Pfeil), andererseits auch in kleineren Punkten an der Plasmamembran (Pfeilspitzen). Nach Inkubation mit HA (5min) befindet sich ein Teil des Merlinproteins noch immer diffus um den Zellkern (Abb. 4B, Pfeil), insgesamt lokalisiert aber mehr Protein an der Plasmamembran, welches weiterhin in größeren Aggregaten sichtbar ist (Abb. 4B, Pfeilspitzen).

Diese Ergebnisse zeigen, daß es in dem verwendeten Modellsystem möglich ist, neben den proliferativen Änderungen auch die Signaltransduktion und den Einfluß auf das Zytoskelett zu untersuchen. Zuerst soll nun die Aktivierung von Merlin selbst betrachtet werden.

Dephosphorylierung an Serin-518 ist notwendig für die Aktivität von Merlin und wird durch Hyaluronsäure induziert

Merlin wird durch Dephosphorylierung aktiviert. Die kritische Phosphorylierung in Merlin scheint an Serin-518 zu erfolgen, welche durch den Rac/PAK Signalweg induziert wird (Kissil et al., 2002; Shaw et al., 2001; Xiao et al., 2002). Mutagenese von Serin-518 zu Alanin (A) oder Asparaginsäure (D) simuliert den unphosphorylierten oder den phosphorylierten Zustand und es wurde postuliert, daß es sich bei MerlinS518A um eine konstitutiv aktive Form handelt (Lallemant et al., 2003).

Die Phosphorylierung an Serin-518 kann mit einem phosphospezifischen Antikörper untersucht werden. Tatsächlich erfolgt bei Steigerung der Zelldichte Dephosphorylierung an S518 (Abb. 5A, oben). Weiterhin bewirkt HA in bei geringer Zelldichte kultivierten RT4TetwtNF2 Zellen nach fünf Minuten eine Dephosphorylierung von Merlin an Serin-518 (Abb. 5A, unten). HA führt zu einem Absinken des Gehalts an phosphoryliertem Merlin. Nach Entfernung dieses Antikörpers wird dieselbe Membran mit einem panMerlin Antikörper untersucht. Die Abnahme des Phosphat-Gehalts korreliert direkt mit einem Anstieg der hypophosphorylierten, schneller wandernden Bande (Abb. 5A, rechte Seite). Merlin, das bei geringer Zelldichte durch HA aktiviert wird, inhibiert die Proliferation und es ist wahrscheinlich, daß dafür die an Serin-518 dephosphorylierte Form verantwortlich ist.

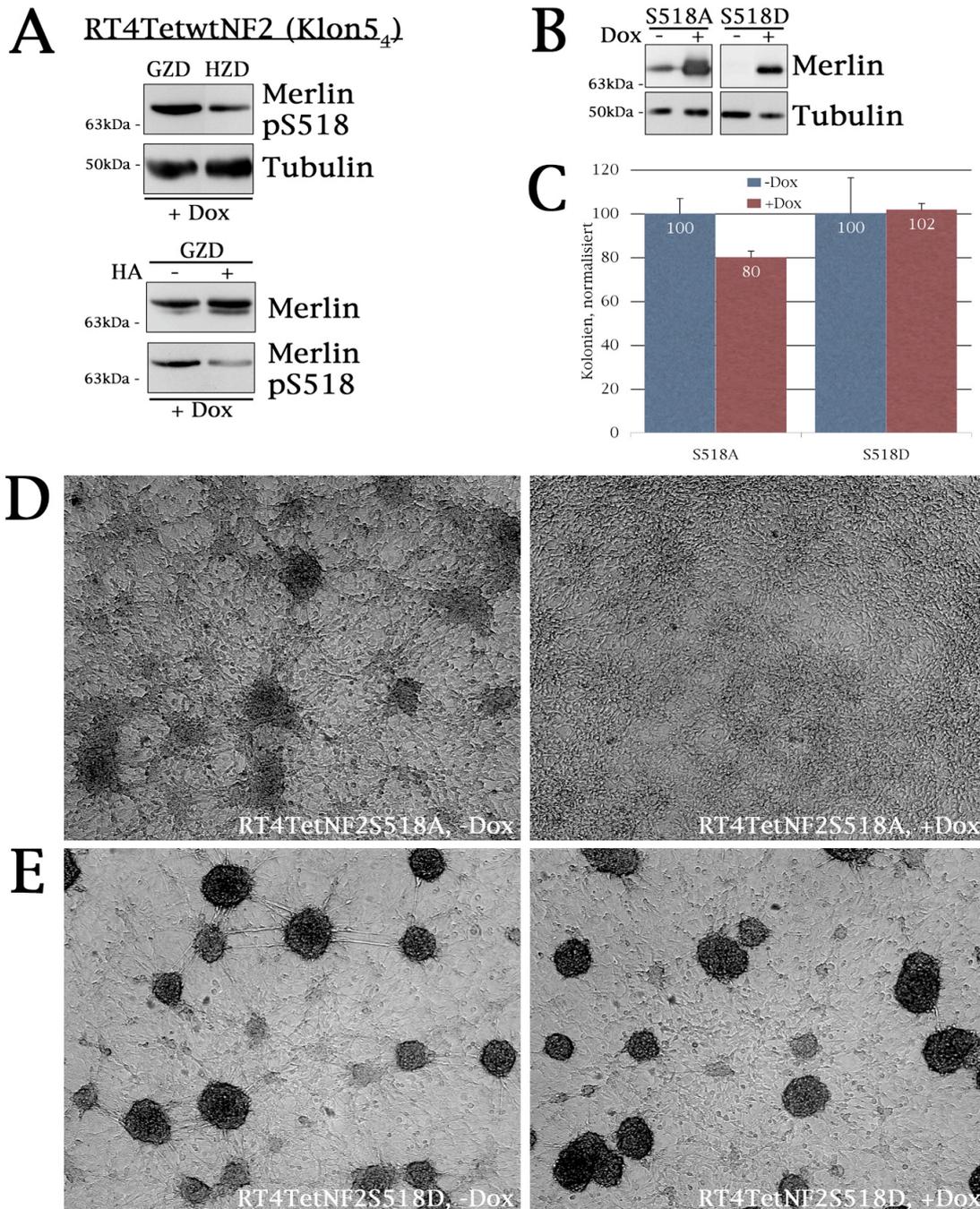


Abbildung 5: Die Merlin-Tumorsuppressorfunktion hängt von Dephosphorylierung von Serin-518 ab. (A) Konfluenz und HA bewirken Dephosphorylierung von Serin-518. (Obere Reihe) Gleiche Zahlen RT4TetwtNF2 Zellen werden bei hoher und geringer Zelldichte kultiviert (HZD & GZD). Merlin wird im Western Blot auf Phosphorylierung an S518 mit einem phosphospezifischen MerlinS518 Ak getestet. (Untere Reihe) Dox-induzierte RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug über 5min mit HA stimuliert (100 μ g/ml). Das Zelllysat wird im Western Blot zunächst mit einem phosphospezifischen MerlinS518 Ak und nach Strippen der Membran mit einem panMerlin (C-18) Ak beprobt. (B) Doxycyclin-Induktion von RT4TetNF2S518A&D Zellklonen. Merlinexpression im Western Blot visualisiert mit panMerlin (C-18) Ak, Ladekontrolle Tubulin.

(C) MerlinS518A reduziert das Weichagarwachstum. RT4TetNF2S518A&D Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin in Weichagar suspendiert. Das Koloniewachstum wird nach 10-15 Tagen ausgewertet. Koloniezahl wird auf ‘-Dox’ Ansatz normalisiert. (D&E) Fokusbildung wird durch MerlinS518A inhibiert. RT4TetNF2S518A&D Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin bei hoher Zelldichte gesät. Die Fokusbildung wird nach 10-15 Tagen begutachtet.

Welche Eigenschaften besitzen nun die ‘konstitutiv aktive’ Form von Merlin (S518A) und die ‘konstitutiv inaktive’ Form (S518D) bezüglich Tumorsuppression und Signaltransduktion? Für diese Untersuchung werden Doxycyclin-induzierbare RT4 Zellklone RT4TetNF2S518A und RT4TetNF2S518D generiert (Abb. 5B). Doxycyclin-induzierte Expression von MerlinS518A und S518D zeigt im Weichagar-Test, daß die Dephosphorylierung von S518 (S518A) notwendig für die antitransformative Aktivität ist (20% Reduktion) und die Simulation der Phosphorylierung (S zu D) diese inhibiert (Abb. 5C). Überexpression von MerlinS518A unterbindet weiterhin das Fokuswachstum in RT4 Zellen (Abb. 5D). MerlinS518D verhält sich dagegen vollkommen inaktiv (Abb. 5E). Dephosphorylierung von Merlin an Serin-518 ist notwendig, um bei hoher Zelldichte die Tumorsuppression zu aktivieren.

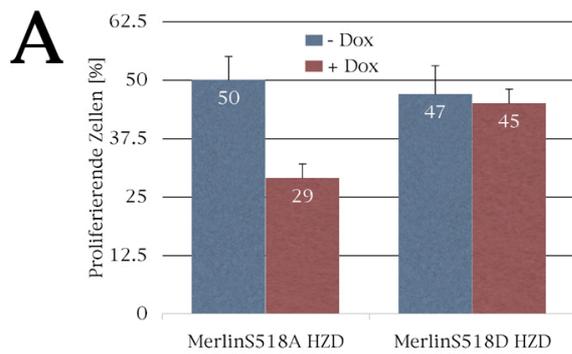
Dephosphorylierung an Serin-518 ist notwendig aber nicht hinreichend für die Tumorsuppressoraktivität

Da wtMerlin das Zellwachstum und die Signaltransduktion inhibiert, werden MerlinS518A&D ebenfalls auf diese Auswirkung hin untersucht. Bei hoher Zelldichte wird die Proliferation (BrdU-Inkorporation) ebenfalls durch MerlinS518A und nicht durch MerlinS518D inhibiert (Abb. 6A). Desweiteren reduziert MerlinS518A wie der Wildtyp die PDGF-induzierte Phosphorylierung von ERK (Abb. 6B).

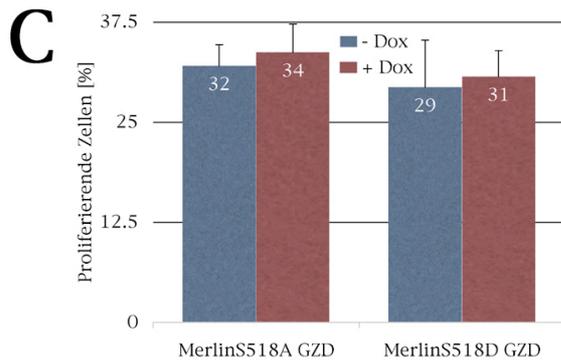
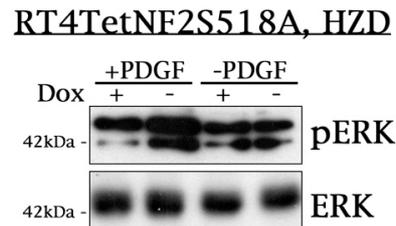
Bei Vorliegen einer konstitutiv aktiven Mutation muß Merlin aber auch als Tumorsuppressor bei geringer Zelldichte fungieren, wenn kein Zell-Matrix Kontakt durch Hyaluronsäure erfolgt (Merlin ist bereits dephosphoryliert). Erstaunlich ist allerdings, daß MerlinS518A bei geringer Zelldichte weder den BrdU-Einbau noch die PDGF-induzierte ERK-Phosphorylierung reduziert (Abb. 6C & D). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Dephosphorylierung von Serin-518 notwendig aber nicht hinreichend für die antiproliferative Aktivität von Merlin ist.

Eine längere Exposition des panNF2 Western Blots aus Abb. 5A läßt auch eine dritte, noch langsamer wandernde Bande erkennen (Abb. 6E). Diese weitere Veränderung der Laufeigenschaft von Merlin läßt sich

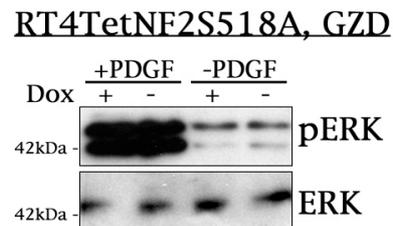
nicht durch nur eine Modifikation an Serin-518 erklären. Es ist auch anzunehmen, daß diese Modifikation ebenfalls eine Phosphorylierung ist, da Merlin an Serin und Threonin phosphoryliert wird (Shaw et al., 1998) und nach einer Phosphatase-Behandlung als eine Spezies im Western Blot nachweisbar ist (Morrison et al., 2001; Shaw et al., 2001). Da MerlinS518A kein dominant aktives Protein ist, ist außerdem wahrscheinlich, daß diese zusätzliche Modifikation/-nen an der Tumorsuppression beteiligt ist. Zum Auffinden dieser Stellen wird ein massenspektrometrischer Ansatz gewählt, und es werden Proteinsequenzvergleiche angestellt, um über Homologien Rückschlüsse auf mögliche Phosphorylierungsstellen zu ziehen.



B



D



E

RT4TetwtNF2(Klon5₄), GZD
längere Exposition:

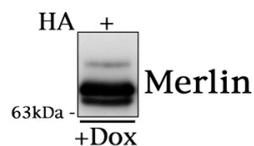


Abbildung 6: Dephosphorylierung von Merlin an Serin-518 ist notwendig aber nicht hinreichend. (A&B) RT4TetNF2S518A&D Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug wahlweise mit Doxycyclin induziert. (A) MerlinS518A&D haben keinen Einfluß auf die Proliferation. Die BrdU-Inkorporation erfolgt mit 50µM BrdU über 3h. Angeführt ist der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation. (B) MerlinS518A&D können die PDGF-induzierte ERK Phosphorylierung nicht blocken. PDGF-Stimulation erfolgt mit 10ng/ml über 5min. Die Phosphorylierung von ERK wird mit einem phosphospezifischen Ak nachgewiesen. Der ERK-Gehalt wird mit einem panERK Ak bestimmt. (C) wtMerlin muß mehrfach modifiziert sein, da eine posttranslationale Modifikation nicht zur Bildung von drei Merlinspezies führen kann. Dox-induzierte RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug über 5min mit HA stimuliert (100µg/ml). Längere Exposition eines pan Merlin (C-18) Western Blots.

Phosphorylierung von Merlin an Threonin T272 und T576

Die massenspektrometrische Analyse ist in Kooperation mit Dr. Lothar Jänsch durchgeführt worden (Abt. Zellbiologie, GBF, Braunschweig). Dazu werden Doxycylin-induzierte RT4TetwtNF2 Zellen bei hoher Zelldichte kultiviert, so daß hypo- und hyperphosphoryliertes Merlin gebildet werden. Da das überexprimierte Merlin mit einem FLAG-tag markiert ist kann dieses mit einer anti-FLAG Immunopräzipitation von der endogenen Form isoliert werden. Danach wird das Immunopräzipitat im Polyacrylamidgel aufgetrennt, um Antikörper und andere Verunreinigungen abzusondern und um die hypo- und hyperphosphorylierte Merlinbande zu separieren. Die so aufgereinigten Proteine werden dann mit Trypsin gespalten und für die Massenspektrometrie (MS) präpariert.

Matching peptides:									
User mass	DB mass	Δ mass (Dalton)	#MC	peptide	position	known modifications			
2384.669	2384.3223	-0.346	3	EFTIKPLDKKIDVFKFNSSK	270-289				

Potentially modified peptides, detected by mass difference and conforming to rules :									
User mass	DB mass	mass diff.	mod. diff.	Δ mass (Dalton)	potential mod.	#MC	peptide	position	known modifications
1901.099	1821.0520	80.0470	79.9663	-0.08	PHOS	2	EFTIKPLDKKIDVFK	270-284	

Abbildung 7: Massenspektrometrische Analyse von hypo- und hyperphosphoryliertem Merlin. Dox-induzierte RT4TetwtNF2 Zellen werden bei hoher Zelldichte kultiviert. Einen Tag nach Aussaat erfolgt Serumentzug über Nacht. Merlin wird über FLAG-IP und SDS-PAGE aufgereinigt. Hyper- und hypophosphoryliertes Merlin wird aus dem Gel isoliert, mit Trypsin gespalten und über MALDI-TOF-MS analysiert. Die erhaltenen Peptidmassen werden mit dem 'FindMod Tool' des ExpASY Servers im Vergleich mit Merlinsequenz (Genbank: NM_000268) auf mögliche Modifikationen untersucht. (User mass: experimentell erhaltene Masse in Da; DB mass: berechnete Datenbankmasse in Da; Δ mass(Dalton): Abweichung von Datenbankmasse; #MC: missed cuts, nicht von Trypsin gespalten Bindungen; mass diff.: Massendifferenz User mass zu DB mass; mod. diff.: Masse der Modifikation; potential mod.: Phos - Phosphorylierung; known modifications: MSO - oxidiertes Methionin, Cys_CAM - Cystein zu Carbamidomethyl-Cystein modifiziert).

Die aus der MS-Analyse gewonnenen Peptidmassen werden dann einem Vergleich mit der Proteinsequenz von Merlin (Genbanknr.: NM_000268) unterzogen. In diesem Prozeß wird die Masse von posttranslational modifizierten oder unmodifizierten

Sequenzfragmenten berechnet, die mit den experimentell bestimmten Peptidmassen übereinstimmen. In Abb. 7 sind die Peptide mit den Massen 1901,099Da und 2384,669Da aufgeführt, die von besonderem Interesse in Bezug auf Phosphorylierung sind. Die Masse 2384,669Da der hypophosphorylierten Bande ergibt sich durch das unmodifizierte Peptid von Aminosäure (AS) 270 bis 289. Die Masse 1901,099Da der hyperphosphorylierten Bande kann in der Merlinsequenz nur nach Modifikation erhalten werden, z.B. wenn im Peptid AS 270-284 das Threonin T272 phosphoryliert wird.

Die weitere Analyse wird über ScanProsite und den NetPhos 2.0 Server durchgeführt, Internet-Anwendungen, die Erkennungsmotive von Kinasen und anderen posttranslational modifizierenden Enzymen in Betracht ziehen. NetPhos 2.0 gibt Threonin-272 als Phosphorylierungsstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit an (0,93 von 1,0) und ScanProsite erkennt das Motiv TIK (AS 272-274) als PKC Phosphorylierungssequenz (Abb. 8A). Ein Sequenzvergleich mit den eng verwandten ERM Proteinen weist T272 auch als Merlin-spezifisch aus (Abb. 8B). Threonin-272 stellt demnach einen potentiellen Kandidaten als Phosphorylierungsstelle in Merlin dar, welche auch an der Tumorsuppression beteiligt ist.

A Scan Prosite

>PDOC00005 PS00005 PKC_PHOSPHO_SITE Protein kinase C phosphorylation site

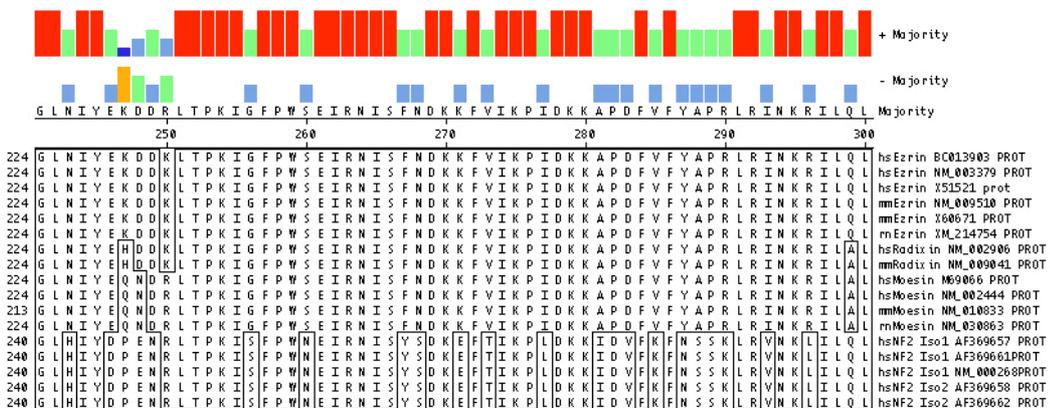
272 - 274 TIK

NetPhos 2.0

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	272	DKEFTIKPL	0.930	*T*

B



Merlin T272

Abbildung 8: (A) Phosphorylierungsvorhersage von MerlinT272 (Scan Prosite und NetPhos 2.0). (B) Proteinsequenzvergleich (MegAlign) von Merlin und ERM Proteinen zeigt, daß Threonin-272 nicht konserviert ist.

Mit Hilfe eines Motiv-spezifischen Antikörpers wird die Phosphorylierung von Threonin-272 weiter untersucht. Dieser erkennt ein phosphoryliertes Threonin (T) gefolgt von Aminosäure X und einem Arginin (R) oder Lysin (K) (genannt pTXR, die T272 Sequenz lautet TIK). Dieses Motiv ist siebenmal in Merlin enthalten und wird durch ScanProsite fünfmal als Phosphorylierungsstelle erkannt.

Der pTXR Antikörper erkennt tatsächlich Threonin-Phosphorylierung in Merlin. Das Doxycyclin-induzierbare Protein in bei geringer Zelldichte kultivierten RT4TetwtNF2 Zellen (Abb. 9A, rechts) wandert auf derselben Höhe wie Merlin (Abb. 9A, links). Bei der nicht-induzierten oberen Bande im pTXR Blot handelt es sich wahrscheinlich um

phosphorylierte ERM Proteine, die im linken Blot mit einem phosphospezifischen anti-ERM Antikörper nachgewiesen werden (ERM Proteine werden ebenfalls an einem TXR Motiv phosphoryliert: Ezrin T567, Moesin T558 und Radixin T564; (Bretscher et al., 2002)). Nach Immunopräzipitation des überexprimierten Merlin (FLAG-IP) wird ebenfalls ein Doxycyclin induziertes pTXR Signal detektiert, welches frei von weiteren Banden ist und durch panMerlin Antikörper erkannt wird (Abb 9A, links). Eine Threonin-Phosphorylierung findet daher an einem TXR Motiv in Merlin statt.

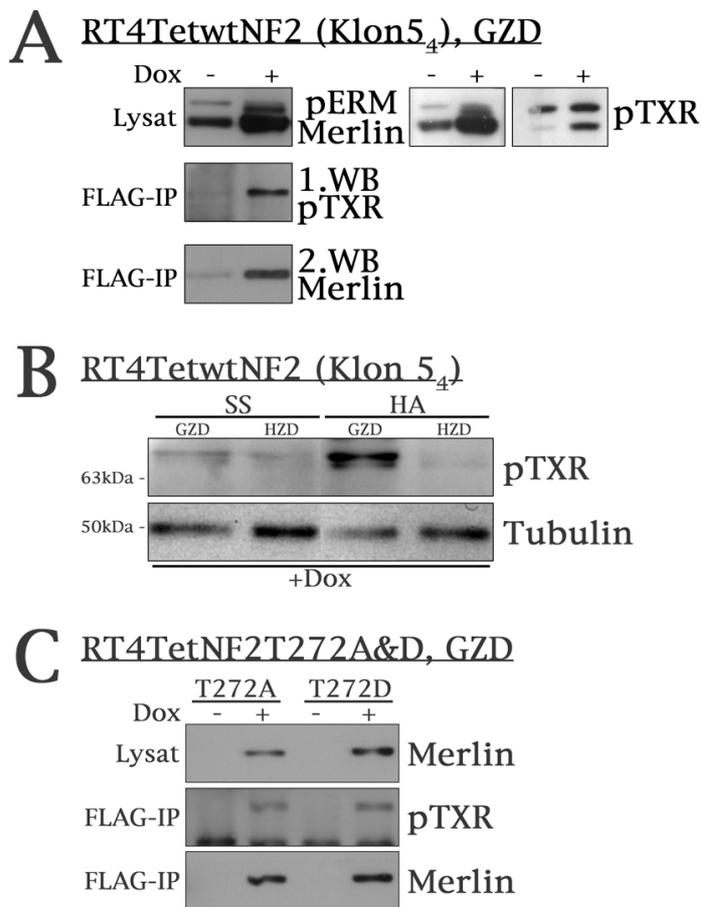


Abbildung 9: Merlin wird an Threonin phosphoryliert, aber nicht nur an Threonin-272. (A) RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert. Serumentzug und Doxycyclin-Induktion erfolgt über 12h. Merlin wird mittels FLAG-IP isoliert. Das Lysat wird im Western Blot mit panMerlin (C-18), pERM, pTXR Ak untersucht. Die IP wird zuerst mit pTXR und nach Strippen mit panMerlin Ak beprobt. (B) Doxycyclin-induzierte RT4TetwtNF2 Zellen werden bei hoher und geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug über 5min mit HA stimuliert (100µg/ml). Das Lysat wird mit pTXR und Tubulin Ak analysiert. (C) RT4TetNF2T272A&D Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und wahlweise mit Doxycyclin induziert. MerlinT272A&D wird mittels FLAG-IP isoliert. Die IP wird zuerst mit pTXR und nach Strippen mit panMerlin (C-18) Ak untersucht.

Da T272 aus konfluenten Zellen isoliert wurde, sollte die Phosphorylierung durch Zelldichte und/oder Hyaluronsäure reguliert werden. Dazu werden gleiche RT4TetwtNF2 Zellzahlen bei geringer oder hoher Zelldichte ausgesät und wahlweise für fünf Minuten mit Hyaluronsäure inkubiert. Normalisiert auf Tubulin enthalten die Lysate aus Zellen hoher Zelldichte weniger Threonin-Phosphat. Allerdings induziert HA bei geringer Zelldichte die Threonin-Phosphorylierung (Abb. 9B). Der Vergleich von hoher und geringer Zelldichte unterstreicht zum einen, daß T272 eine durch Konfluenz regulierte Phosphorylierung ist. Zum anderen erstaunt die HA induzierte Phosphorylierung. Dies bedeutet entweder, daß T272 bei initialer Ausbildung des Zell-Matrix Kontakts phosphoryliert wird, um danach bei Konfluenz dephosphoryliert zu sein. Oder HA phosphoryliert ein weiteres TXR Motiv, welches ebenfalls bei Konfluenz dephosphoryliert wird.

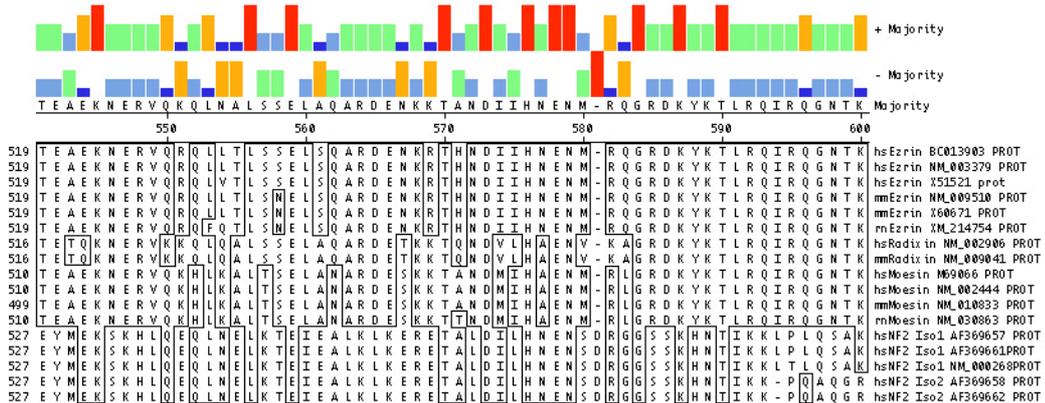
Die Mutanten MerlinT272A (Alanin \approx nicht-phosphorylierbar) und T272D (Asparaginsäure \approx phosphorylierter Zustand) werden verwendet, um zu bestimmen, ob neben T272 weitere Phosphorylierungen an Threonin vorliegen. Es werden Doxycyclin-induzierbare RT4TetNF2T272A und RT4TetNF2T272D Zelllinien generiert, in denen FLAG-markierte Merlinmutanten exprimiert werden. FLAG Immunopräzipitation und pTXR Western Blot zeigen, daß auch diese Mutanten noch an einem weiteren Threonin phosphoryliert sind (Abb. 9C). Dies legt nahe, daß Hyaluronsäure tatsächlich ein weiteres TXR Motiv phosphoryliert (siehe Abb. 9B) und es deckt sich mit dem Befund, daß in NIH-3T3 Zellen mehr Phosphat an Threonin als an Serin inkorporiert wird (Shaw et al., 1998).

Ein Kandidat für diese zusätzliche Threonin Phosphorylierungsstelle ist T576 (Abb. 10A). In den strukturell verwandten ERM Proteinen bewirkt eine Phosphorylierung dieses konservierten Threonin eine Aktivierung (Ezrin T567, Moesin T558 und Radixin T564; Matsui98JCB, Pietromonaco98JBC, Matsui99JCUB, Ng01EMBOJ). Die Aktivierung beinhaltet, daß die Interaktion zwischen N- und C-Terminus aufgehoben wird. Die Kristallstruktur von Moesin hat nach Vergleich mit Merlin gezeigt, daß eine ähnliche Regulation von Merlin möglich ist (Pearson00Cell). MerlinT576 wird über ScanProsite als PKC Phosphorylierungsstelle und über NetPhos 2.0 mit hoher Wahrscheinlichkeit (0,931 von 1,0) als phosphoryliert vorhergesagt (Abb. 10A).

Von Threonin-576 werden ebenso Doxycyclin-induzierbare RT4TetNF2T576A und RT4TetNF2T576D Zelllinien generiert, in denen

FLAG-markiertes Merlin an T576 entweder zu Alanin oder Asparaginsäure mutiert ist. Nach FLAG Immunopräzipitation und pTXR Western Blot zeigt sich auch für diese Mutanten, daß weiterhin Phosphat an Threonin inkorporiert wird (Abb. 10B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse bezüglich der Phosphorylierung von Merlin, daß dieses scheinbar auf eine komplexere Art und Weise posttranslational modifiziert wird, als bisher angenommen wird. Wie wirken sich aber diese Phosphorylierungen auf die Funktion von Merlin als Tumorsuppressor aus?

A

Merlin T576

Scan Prosite

>[PDOC00005](#) [PS00005](#) PKC_PHOSPHO_SITE Protein kinase C phosphorylation site

576 - 578 TiK

NetPhos 2.0

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	576	SKHNTIKKL	0.931	*T*

B

RT4TetNF2T576A&D, GZD

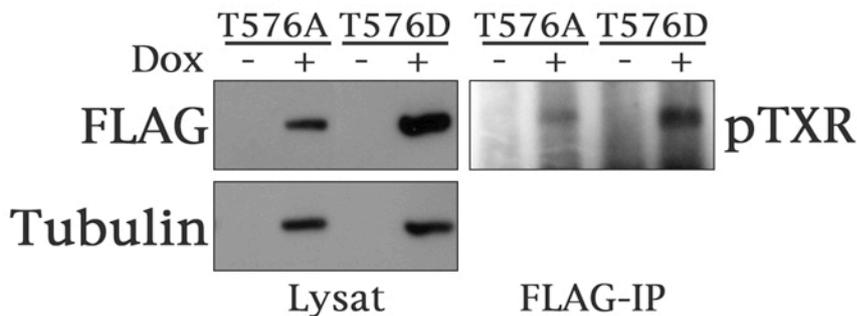


Abbildung 10: Merlin wird möglicherweise auch an Threonin-576 phosphoryliert. (A) Proteinsequenzvergleich (Megan) von Merlin und ERM Proteinen zeigt, daß Threonin-576 konserviert ist. Weiterhin wird T576 über Scan Prosite und NetPhos 2.0 als potentielle Phosphorylierungsstelle in Merlin vorhergesagt. (B) RT4TetNF2T576A&D Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug wahlweise mit Doxycyclin induziert. MerlinT576A&D wird mittels FLAG-IP isoliert. Die IP wird zuerst mit pTXR und nach Strippen mit panMerlin (C-18) Ak untersucht.

Dephosphorylierung von Merlin Threonin-272 ist notwendig für die Tumorsuppressoraktivität

Die Wirkung des Phosphorylierungsstatus von Threonin-272 wird mit verschiedenen stabil transfizierten, Doxycyclin-induzierbaren RT4TetNF2T272A&D Klonen getestet. Stellvertretend wird das Ergebnis an zwei Klonen beschrieben (Abb. 11A). Die anderen Klone haben zu ähnlichen Resultaten geführt. Doxycyclin-Induktion von RT4TetNF2T272A wirkt der Transformation entgegen und inhibiert das Wachstum von Fokussen (Abb. 11B), wogegen die Mutation T272D die Aktivität von Merlin inhibiert. RT4TetNF2T272D Zellen bilden auch nach Dox-Induktion Fokusse aus (Abb. 11C).

Dieser Inhibition der Transformation entspricht wie bei wtMerlin eine Reduktion der Proliferation (Abb. 11D). BrdU-Inkorporation wird bei hoher Zelldichte durch MerlinT272A um 50% reduziert (von 52% auf 26% proliferierende Zellen). Überexpression von MerlinT272D beeinflußt das proliferative Verhalten von RT4 Zellen dagegen nicht (-Dox, 54% zu +Dox, 56% proliferierende Zellen). Dephosphorylierung von MerlinT272 ist demnach ebenso notwendig wie von MerlinS518.

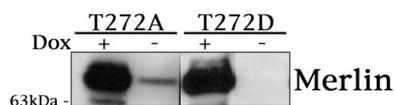
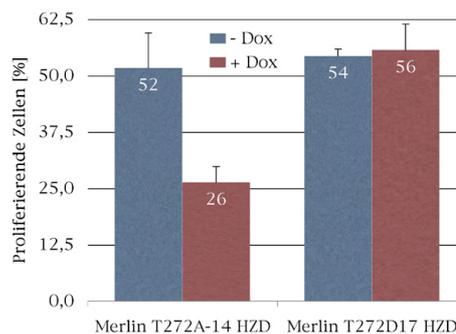
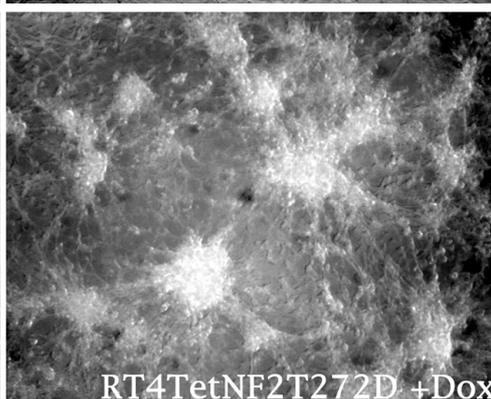
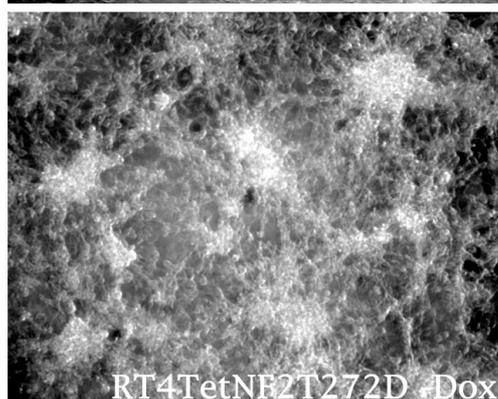
A**B****C****D**

Abbildung 11: MerlinT272A wirkt als Tumorsuppressor, wogegen MerlinT272D inaktiv ist. (A) Überexpression von MerlinT272A&D in RT4TetNF2T272A&D Zellen (Klone T272A-14 und T272D-17) demonstriert im Western Blot mit anti-Merlin Ak (C-18). (B-D) RT4TetNF2T272A&D Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin bei hoher Zelldichte gesät. (B&C) Fokusbildung wird durch MerlinT272A inhibiert. MerlinT272D ist inaktiv. Die Fokusbildung wird nach 10-15 Tagen begutachtet. (D) MerlinT272A inhibiert die Proliferation bei hoher Zelldichte. MerlinT272D ist inaktiv. Die BrdU-Inkorporation erfolgt mit 50 μ M BrdU über 3h. Angeführt ist der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation.

Phosphorylierung von Merlin Threonin-576 ist notwendig für die Tumorsuppressoraktivität

Auch von Merlin Threonin-576 werden Alanin- und Asparaginsäure-Mutanten konstruiert und Doxycyclin-induzierbare RT4TetNF2T576A&D Zellklone generiert (Abb. 12A). Dox-Induktion von RT4TetNF2T576A erhöht das Koloniewachstum im Weichagartest um 8% (Abb. 12B) und hat keinen Einfluß auf die Fokusbildung (Abb. 12C). Die T576A Mutante zeigt im Weichagartest und in der Fokusbildung die Eigenschaft von inaktivem Merlin. Dagegen verhält sich MerlinT576D als Tumorsuppressor und reduziert das Fokuswachstum (Abb. 12D) sowie das Koloniewachstum im Weichagartest um 21% (Abb. 12E). Alle weiteren getesteten Klone haben zu ähnlichen Ergebnissen geführt.

Die Tumorsuppressorfunktion von Merlin wird also durch Dephosphorylierung und Phosphorylierung gesteuert und ist nicht wie bisher angenommen nur von Dephosphorylierung an Serin-518 abhängig. Dephosphorylierung von T272 und S518 und Phosphorylierung von T576 wirken aktivierend.

Merlin reguliert Proliferation und beeinflusst die Zytoskelettstruktur. Da die Aktivierung von Merlin im Anschluß eine Verdrängung der ERM Proteine nach sich zieht, welche die Plasmamembran mit dem Zytoskelett verbinden, könnte dies schon einen Einfluß auf das Zytoskelett bewirken. Ob dies allerdings auch für die Auflösung der Streßfasern verantwortlich ist, ist fraglich. Daher wurde der Einfluß von aktivem Merlin auf Komponenten der Signaltransduktion untersucht. GTPasen der Rho Familie stellen auf Grund ihrer Wirkung auf das F-Aktin Zytoskelett und die Proliferation interessante Kandidaten dar (Bar-Sagi and Hall, 2000; Bishop and Hall, 2000; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Die Bildung von Streßfasern wird durch die Aktivität von Rho reguliert (Ridley and Hall, 1992) und Rho wirkt sich synergistisch im Ras induzierten Transformationsprozeß aus (Qiu et al., 1995b).

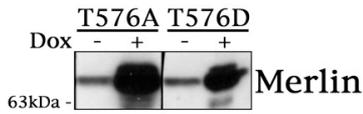
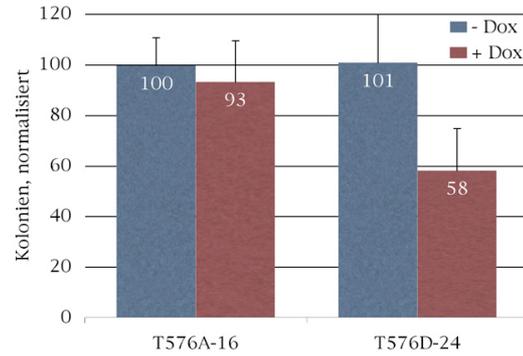
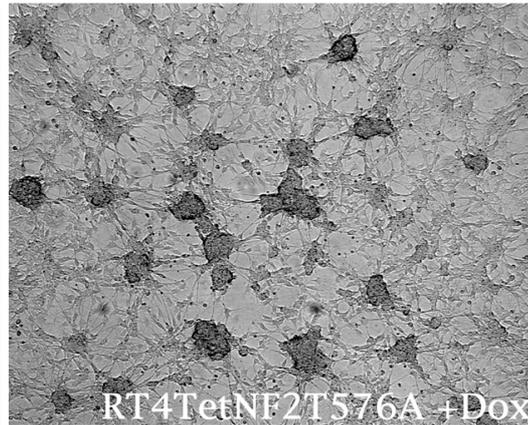
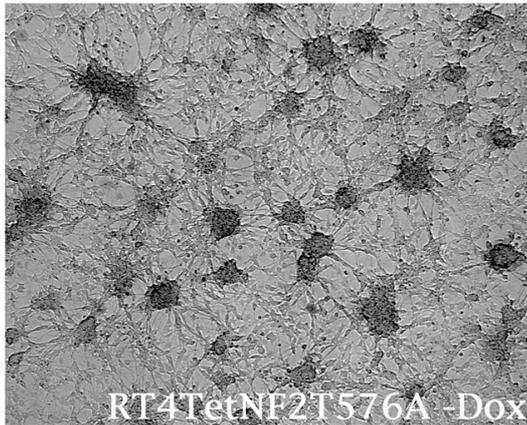
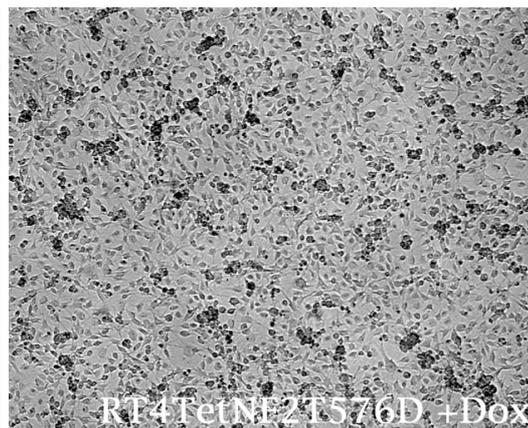
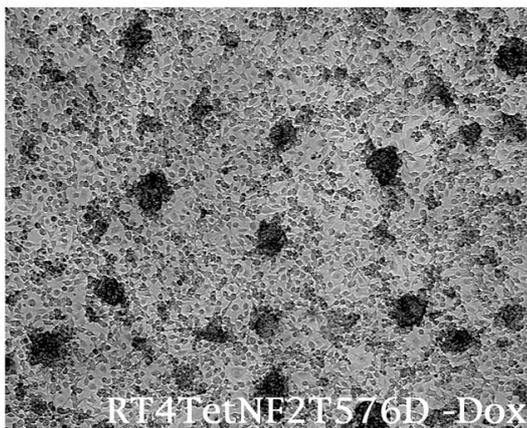
A**D****B****C**

Abbildung 12: MerlinT576D wirkt als Tumorsuppressor, wogegen MerlinT576A inaktiv ist. (A) Überexpression von MerlinT576A&D in RT4TetNF2T576A&D Zellen (Klone T576A-16 und T576D-24) demonstriert im Western Blot mit anti-Merlin Ak (C-18). (B) Weichagar Wachstum wird durch MerlinT576D reduziert. RT4TetNF2T576A&D Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin in Weichagar suspendiert. Das Koloniewachstum wird nach 10-15 Tagen ausgewertet. Koloniezahl wird auf '-Dox' Ansatz normalisiert. (C&D) Fokusbildung wird durch MerlinT576D inhibiert. RT4TetNF2T576A&D Zellen werden mit oder ohne Doxycyclin bei hoher Zelldichte gesät. Die Fokusbildung wird nach 10-15 Tagen begutachtet.

Merlin inhibiert das G-Protein Rho und liegt im Komplex mit p190RhoGAP vor

Der Aktivierungsgrad von Rho hängt von der Menge an gebundenem GTP ab. Rho-GTP kann in einer Affinitätspräzipitation (pulldown, PD) mit der Rho-bindenden Domäne von Rhotekin vom inaktiven Rho-GDP getrennt werden (siehe Material & Methoden). Abb. 13 zeigt, daß sich die auftretenden Zytoskelettveränderungen auf der Ebene von Rho widerspiegeln. Die alleinige Überexpression von Merlin beeinflusst die Aktivität von Rho nicht (-Dox, 0'HA & +Dox, 0'HA) wie auch keine sichtbaren Veränderungen der Streifasern erkennbar sind (vgl. Abb. 4A&C, +Dox-HA & -Dox-HA). Nach Induktion von Merlin (+ Dox) erfolgt dann tatsächlich innerhalb von fünf Minuten Hyaluronsäure-Inkubation eine stetige Inaktivierung von Rho (Reduktion von 100% auf 35%).

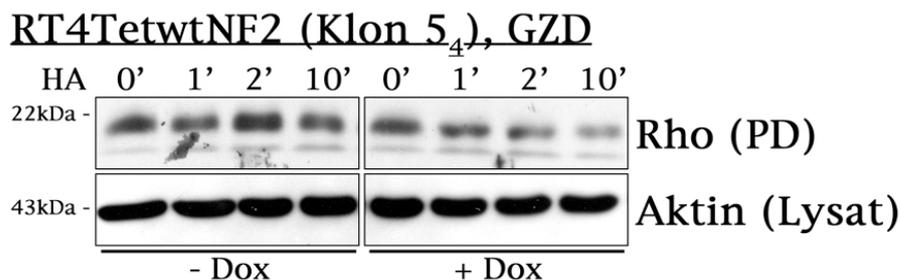


Abbildung 13: Merlin-abhängige Inhibition von Rho durch HA. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert, nach Serumentzug erfolgt Doxycyclin-Induktion für 12h, HA-Stimulation (100µg/ml) wird über 1, 2 & 5min durchgeführt. Aktives Rho-GTP wird in einer Affinitätspräzipitation mit GST-Rhotekin-RBD vom Lysat separiert. Das Präzipitat wird im Western mit anti-Rho Ak analysiert, Aktin-Gehalt im Lysat dient als Ladekontrolle.

Die Inaktivierung von Rho um 65% innerhalb von fünf Minuten ist bemerkenswert. *In vitro* Analysen haben gezeigt, daß der GTP-Gehalt einer GTPase mit einer Halbwertszeit von etwa 25 Minuten auf Grund der intrinsischen Hydrolyseaktivität der GTPase abnimmt (Schlichting et al., 1989; Schweins et al., 1997). Das Vorliegen aktiven Merlins führt also zu einer beschleunigten Inaktivierung von Rho, was auf den Einfluß eines GTPasen-aktivierenden Proteins (GAP) schließen läßt (Lancaster et al., 1994). Daher soll nachfolgend untersucht werden, ob Merlin mit einer GAP für Rho assoziiert ist.

Das menschliche Genom umfaßt schätzungsweise 69 RhoGAP-verwandte Proteine (Bernards, 2003). Meine Wahl fiel auf p190RhoGAP, da es wie Merlin in Gliazellen limitierend wirkt. Der Verlust von Merlin kann zur

Ausbildung von Oligodendrogliomen führen (Evans et al., 2000), und es wird spekuliert, daß Merlin an Differenzierungsprozessen von Schwann-Zellen und Oligodendrozyten beteiligt ist (Hung et al., 2002). p190RhoGAP kann ebenfalls die Bildung von Oligodendrogliomen unterbinden (Wolf et al., 2003) und reguliert die Differenzierung von Oligodendrozyten (Wolf et al., 2001).

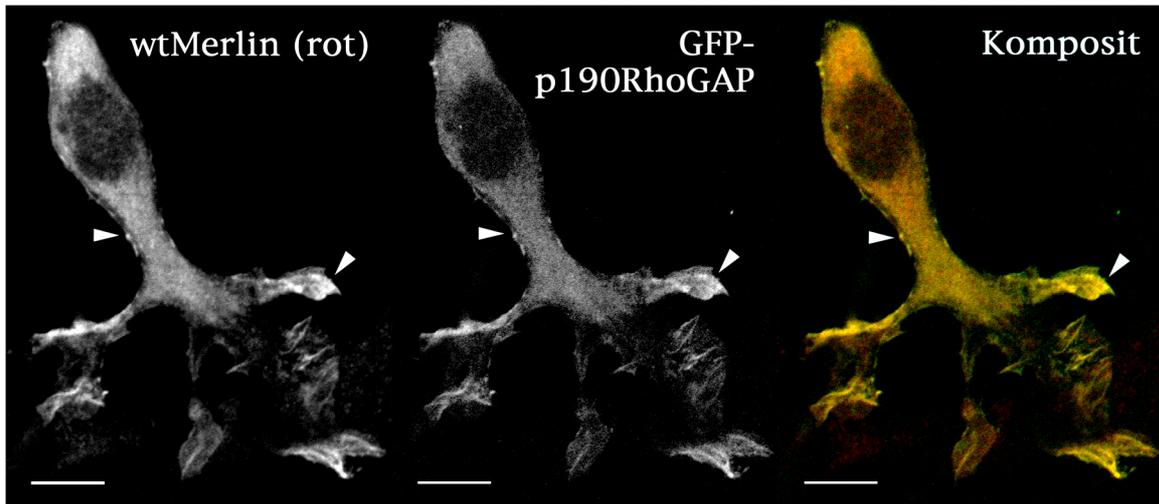


Abbildung 14: Merlin kolokalisiert mit GFP-p190RhoGAP. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert, transient mit GFP-p190RhoGAP transfiziert und nach Serumentzug für 12h mit Doxycyclin induziert. p190RhoGAP wird über GFP und Merlin mit anti-Merlin (C-18) und Alexa594-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen Ak im konfokalen LSMikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 10µm. Merlin und p190RhoGAP kolokalisieren in Membranregionen (Pfeilspitzen).

In einem mikroskopischen Ansatz wird zunächst die subzelluläre Verteilung von Merlin und p190RhoGAP untersucht. RT4TetwtNF2 Zellen werden transient mit GFP-p190RhoGAP transfiziert und mit Doxycyclin induziert. Nach Fixierung der Zellen und Antikörper-Markierung von Merlin werden die Präparate im konfokalen Laser scanning Mikroskop betrachtet. Abbildung 14 zeigt die Kolokalisierung von Merlin mit GFP-p190RhoGAP. Die Pfeilspitzen deuten auf die starke Überlagerung in Membranregionen hin.

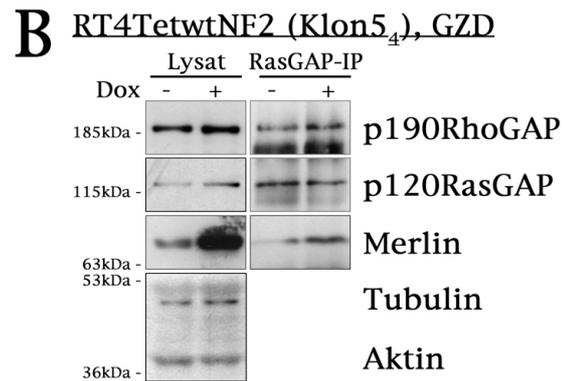
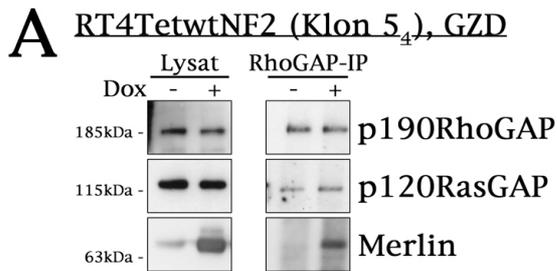


Abbildung 15: Merlin immunopräzipitiert mit p190RhoGAP und p120RasGAP. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert, nach Serumentzug erfolgt Doxycyclin-Induktion über 12h. p190RhoGAP (A) und p120RasGAP (B) werden über Immunopräzipitation isoliert. Die komplexierten Proteine werden im Western mit anti-p190RhoGAP, -p120RasGAP und -Merlin Ak nachgewiesen. Tubulin und Aktin dienen als Ladekontrolle.

In Immunpräzipitationen (IP) kann außerdem gezeigt werden, daß Merlin und p190RhoGAP nicht nur die gleiche subzelluläre Verteilung aufweisen sondern auch in einem Komplex zu finden sind. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte (GZD) kultiviert und mit Doxycyclin induziert. Nach Lyse der Zellen erfolgt eine IP mit Antikörpern gegen p190RhoGAP, welche Merlin co-präzipitieren (Abb. 15A). Die beschleunigte Inaktivierung von Rho durch Merlin kann mit der Komplexbildung von Merlin mit p190RhoGAP zusammenhängen.

Das Präzipitat enthält eine weitere GAP, p120RasGAP, deren direkte Bindung mit RhoGAP bereits beschrieben wurde (Settleman et al., 1992). Im folgenden wird untersucht, ob es sich dabei um separate Komplexe handelt oder ob Merlin auch mit p120RasGAP assoziiert.

Merlin assoziiert auch p120RasGAP und inhibiert das G-Protein Ras

RT4TetwtNF2 Zellen werden ebenso bei geringer Zelldichte (GZD) kultiviert und mit Doxycyclin induziert. Nach Lyse der Zellen erfolgt nun eine IP mit Antikörpern gegen p120RasGAP. Merlin co-präzipitiert tatsächlich auch mit p120RasGAP (Abb. 15B).

p120RasGAP stimuliert die GTPase-Aktivität von Ras (Trahey and McCormick, 1987; Vogel et al., 1988). Durch Wachstumsfaktoren wie PDGF wird RasGAP an die Plasmamembran rekrutiert (Molloy et al., 1989) und reguliert die Aktivierung von Ras (Gibbs et al., 1990) und ERK (van der Geer et al., 1997). Da Merlin ebenfalls die Aktivität von ERK reguliert, wird untersucht, ob die Formation des Merlin-p120RasGAP Komplexes einen Effekt auf Ras besitzt.

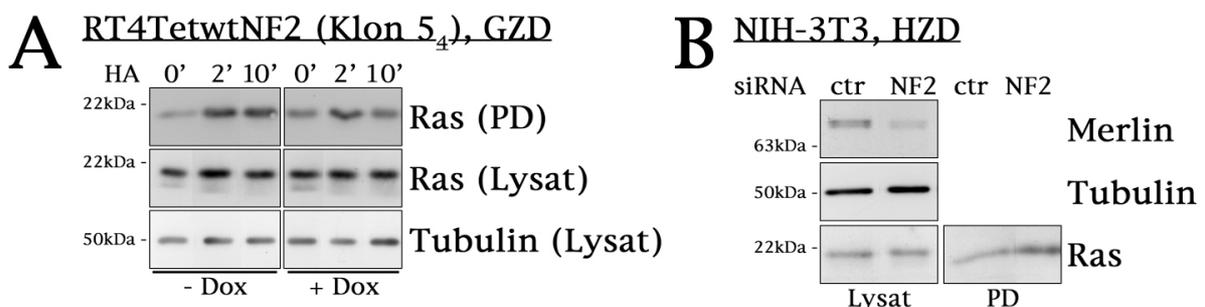


Abbildung 16: Merlin beeinflusst die Aktivität von Ras. (A) Merlin-abhängige Inhibition von Ras durch HA. RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert, nach Serumentzug erfolgt Doxycyclin-Induktion für 12h, HA-Stimulation (100µg/ml) wird über 2 & 10min durchgeführt. Aktives Ras-GTP wird in einer Affinitätspräzipitation mit GST-Raf-RBD vom Lysat separiert. Das Präzipitat wird im Western Blot mit anti-Ras Ak analysiert, Ras- und Tubulin-Gehalt im Lysat dient als Ladekontrolle. (B) Merlin RNAi führt zu Ras-Aktivierung. NIH-3T3 Zellen werden über 48h mit Merlin- und Kontroll-siRNA transfiziert. Der Ras-Assay wird bei hoher Zelldichte nach Serumentzug (über Nacht) durchgeführt. Die Lysate und der Ras-Pulldown (PD) werden im Western Blot analysiert. RNAi führt zu einer Reduktion der Merlinexpression um 66%, Tubulin und Ras dienen als Ladekontrolle. RNAi von Merlin bewirkt einen Anstieg des Ras-GTP Gehalts um 100%.

Ras-Aktivität hängt von gebundenem GTP ab und wird mit einer Affinitätspräzipitation gemessen. Als spezifischer Interaktionspartner für Ras-GTP dient die Ras-bindende Domäne von Raf (de Rooij and Bos, 1997). Doxycyclin-induzierte und nicht induzierte RT4TetwtNF2 Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und mit Hyaluronsäure (HA)

stimuliert. Abb. 16A zeigt die aktive, GTP-gebundene Fraktion von Ras (pulldown, PD) als Antwort auf eine Kurzzeitinkubation mit HA. Tubulin und Ras (Lysat) dienen als Kontrollen für gleichbleibende Proteinmengen in den einzelnen Versuchsansätzen. Ohne Induktion von Merlin (- Dox) führt HA zu einer Zunahme der Ras-Aktivität im untersuchten Zeitraum. Dies deutet auf die Aktivierung eines Guanin-Nukleotid Austauschfaktors (GEF) hin (Schmidt and Hall, 2002). Wird die Merlinexpression induziert (+ Dox) erfolgt nach zwei Minuten HA-Exposition ebenfalls zuerst eine Aktivierung von Ras, die nach zehn Minuten aber wieder auf den Basalwert reduziert wird. Diese schnelle Inhibition von Ras weist wie schon bei Rho auf die Aktivität einer GAP hin. Merlin interferiert demnach auch auf der Ebene von Ras in der Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade und nicht nur wie einleitend gezeigt auf der Ebene von ERK.

Die Hemmung der Ras Aktivität durch Merlin läßt sich in kontaktinhibierten NIH-3T3 Fibroblasten auch über einen RNAi Ansatz verifizieren. NIH-3T3 Zellen werden bei hoher Zelldichte kultiviert und mit Merlin-spezifischen sowie Kontroll-siRNA-Duplexen transfiziert. 48h nach Transfektion ist im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion des Merlingehalts erreicht (Abb. 16B, Reduktion um 66%). Ras-GTP (PD, pulldown) ist durch Inhibition der Merlinexpression im Vergleich zur Kontrolle um etwa 100% erhöht. Die Ras- und Tubulinexpression in den Lysaten dient als Ladekontrolle. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität des Protoonkogenproduktes Ras durch Merlin reguliert wird.

Zuletzt soll bestimmt werden, inwieweit die oben eingeführten aktiven und inaktiven Merlinmutanten von Serin-518 und Threonin-576 mit dem RasGAP-RhoGAP Komplex interagieren.

Aktives Merlin bindet an RhoGAP

Zu diesem Zweck werden RT4 Zellen mit Doxycylin-induzierbarem MerlinS518A&D und T576A&D bei geringer Zelldichte kultiviert. Nach Doxycylin Induktion wird eine anti-RhoGAP Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Alle Kontrolllysate zeigen, daß in jeder IP etwa die gleichen Proteinmengen enthalten sind.

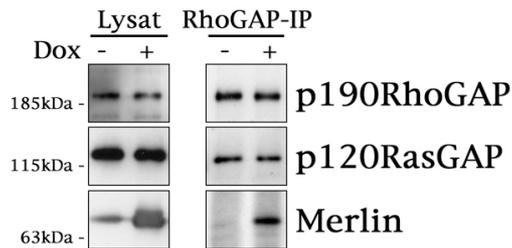
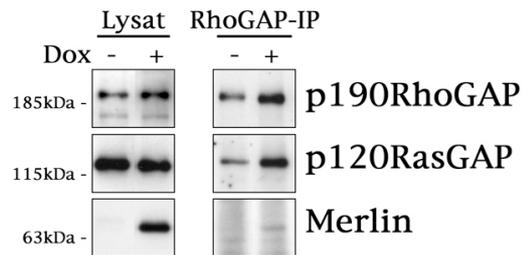
A RT4TetNF2S518A, GZD**B** RT4TetNF2S518D, GZD

Abbildung 17: Die Tumorsuppressorform MerlinS518A präzipitiert mit RhoGAP, MerlinS518D dagegen nicht. (A) RT4TetNF2S518A und (B) RT4TetNF2S518D Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug über 12h mit Doxycyclin induziert. p190RhoGAP wird über Immunpräzipitation isoliert. Die komplexierten Proteine werden im Western Blot mit anti-p190RhoGAP, -p120RasGAP und -Merlin Ak nachgewiesen.

Die Merlin Tumorsuppressorform Serin-518A ist in der RhoGAP IP enthalten, wogegen die inaktivierende Mutation zu Serin-518D die Komplexbindung stört (Abb. 17A&B). RasGAP präzipitiert in allen IPs mit RhoGAP. Bei den Threonin-576 Mutanten ergibt sich das gleiche Bild. Das als Tumorsuppressor aktive MerlinT576D präzipitiert mit RhoGAP. Dagegen ist MerlinT576A kaum nachweisbar (Abb. 18A&B). RasGAP ist in allen Präzipitaten enthalten.

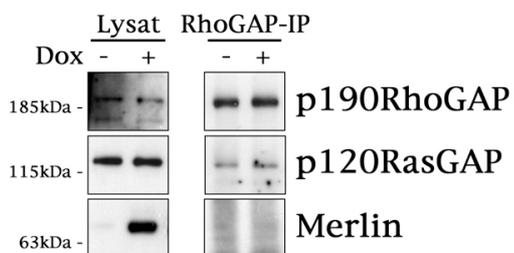
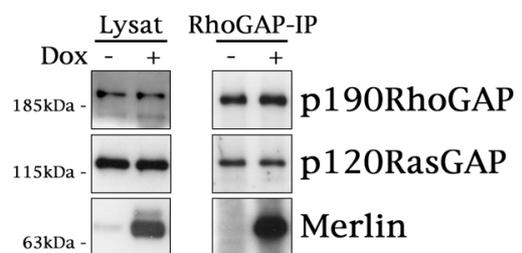
A RT4TetNF2T576A, GZD**B** RT4TetNF2T576D, GZD

Abbildung 18: Die Tumorsuppressorform MerlinT576D präzipitiert mit RhoGAP, MerlinT576A dagegen nicht. (A) RT4TetNF2T576A und (B) RT4TetNF2T576D Zellen werden bei geringer Zelldichte kultiviert und nach Serumentzug über 12h mit Doxycyclin induziert. p190RhoGAP wird über Immunpräzipitation isoliert. Die komplexierten Proteine werden im Western Blot mit anti-p190RhoGAP, -p120RasGAP und -Merlin Ak nachgewiesen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Merlin an Threonin-272 und Serin-518 dephosphoryliert und an Threonin-576 phosphoryliert sein muß, um als Tumorsuppressor aktiv zu sein. Aktives Merlin interferiert mit der Signaltransduktion auf der Ebene von Ras und Rho

oder darüber. Wildtyp-Merlin, sowie die aktiven Mutanten S518A und T576D präzipitieren mit p190RhoGAP. Darüber hinaus wurde Wildtyp-Merlin mit p120RasGAP in einem Komplex nachgewiesen. p120RasGAP und p190RhoGAP sind daher primäre Kandidaten für Merlin-Effektoren, die direkt die Signaltransduktion beeinflussen.

Diskussion

Im Prozeß der Kontaktinhibition ist es notwendig, daß die extrazelluläre Umgebung durch Zelloberflächensensoren interpretiert wird und dies an den Zellkern kommuniziert wird, um das Voranschreiten im Zellzyklus zu stoppen. Alternativ muß dieser Sensor während einer Wachstumsphase in einer inaktiven oder das Wachstum erlaubenden Konformation sein. Der Transmembranrezeptor CD44 ist ein Sensor, welcher zum einen das Wachstum stimulieren (Sherman et al., 1998) oder die Kontaktinhibition vermitteln kann (Morrison et al., 2001). Das Umschalten zwischen diesen beiden Modi wird durch extrazelluläre (Wachstumsfaktoren und Hyaluronsäure) und intrazelluläre (ERM Proteine und Merlin) Bindungspartner bestimmt. Die Aktivität von ERM Proteinen und Merlin wird durch Phosphorylierung reguliert. Um die Kontaktinhibition aufzubauen, muß das extrazelluläre Signal durch CD44 so weitergeleitet werden, daß ERM Proteine inaktiviert und Merlin aktiviert wird.

Für die Aktivierung von Merlin wurde bisher nur Dephosphorylierung von Serin-518 (Shaw et al., 2001) verantwortlich gemacht. Dies wurde durch Mutation von Serin-518 in nicht-phosphorylierbares Alanin und die Phosphorylierung imitierende Asparaginsäure untersucht. MerlinS518A inhibiert Wachstum in Weichagar, MerlinS518D dagegen nicht (Surace et al., 2004). MerlinS518D reduziert weiterhin die Affinität zu Bindungspartnern wie CD44 und HRS (Rong et al., 2004a). Schließlich bewirkt die Expression von MerlinS518A in NF2-defizienten Fibroblasten die korrekte Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und damit die Kontaktinhibition. Es ist nicht klar, ob dieser Effekt von Merlin direkt am Membranort ausgeführt wird, weil MerlinS518D ebenso an Zell-Zell Kontakten lokalisiert (Lallemand et al., 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit angestellten Untersuchungen von MerlinS518A haben gezeigt, daß dieses bei geringer Zelldichte keinen Zellzyklusarrest auslöst, wohl aber bei hoher Zelldichte. Auf der Suche nach zusätzlichen Modifikationen, die durch Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt ausgelöst werden konnten zu der bereits bekannten Phosphorylierungsstelle an MerlinS518 zwei weitere potentielle Threoninreste (T272 und T576) identifiziert werden, die sich in funktionellen Tests als wirksam erwiesen haben. Der bestehenden Hypothese entsprechend wird Merlin durch Dephosphorylierung an Serin-518 und Threonin-272 aktiviert. Es ist auch wahrscheinlich, daß beide Modifikationen synergistisch wirken, da Serin-518 bei Konfluenz dephosphoryliert wird und Threonin-272 in Zellen bei hoher Zelldichte mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wurde. Erstaunlich ist, daß die Tumorsuppressorfunktion aber auch durch Phosphorylierung an

Threonin-576 stimuliert und diese durch Dephosphorylierung an Threonin-576 inhibiert wird. Eine kombinierte Mutagenese dieser Aminosäuren in Alanin (pseudo-dephosphoryliert) und Asparaginsäure (pseudo-phosphoryliert) könnte es daher ermöglichen, einen dominant aktiven Tumorsuppressor zu erzeugen. Diese Experimente waren bei Abschluß des Textes noch nicht realisiert.

Möglicherweise ist die Phosphorylierung an Threonin-576 ein initialer Schritt, der für die nachfolgende Dephosphorylierung von Merlin notwendig ist. Dies wäre in Analogie zum intrazellulären Abschnitt von CD44, welcher in ruhenden Zellen nur an Serin-325 und nach PKC Aktivierung nur an Serin-291 phosphoryliert ist (Legg et al., 2002). Merlin liegt bei geringer Zelldichte an Serin-518 phosphoryliert vor. Der einleitende Zell-Matrix Kontakt durch Hyaluronsäure stimuliert innerhalb von fünf Minuten die Phosphorylierung an Threonin und die Dephosphorylierung von Serin-518. Im Konfluenzzustand sind der Phosphothreonin- sowie des Phosphoserin-518-Gehalt schließlich auf niedrigem Niveau. Über die hierfür in Frage kommenden Kinasen und Phosphatasen liegen bisher keine konkreten Hinweise vor. Die Peptidsequenz um Threonin-576 (TIK) wird als mögliche PKC Phosphorylierungsstelle identifiziert (ScanProsite, NetPhos 2.0) und es ist bekannt, daß Hyaluronsäure nach Bindung an CD44 die Serin/Threonin Kinasen ROCK und PKN γ (Bourguignon et al., 2004; Bourguignon et al., 2003) aktiviert. Darüber hinaus wurde die Mutation MerlinK578M, welche das Erkennungsmotiv der Kinase potentiell zerstört, in menschlichem Tumormaterial von Neurofibromatose Patienten nachgewiesen (Faudoa et al., 2000), was vermuten läßt, das diese Mutation auch die Funktion von Merlin stört.

Zieht man die strukturelle Ähnlichkeit der ERM Proteine und Merlin (Pearson et al., 2000) in Betracht, ist anzunehmen, daß diese auf ähnliche Weise reguliert werden. N- und C-Terminus der ERM Proteine (Magendantz et al., 1995) und von Merlin (Gronholm et al., 1999; Huang et al., 1998; Sherman et al., 1997) interagieren intramolekular miteinander. Die Aktivierung von ERM Proteinen beinhaltet Phosphorylierung und damit Einführung einer negativen Ladung am C-terminalen Threonin (MoesinT558, EzrinT567 und RadixinT564), die durch elektrostatische Abstoßung zum Verlust der N-C-Interaktion führt (Ishikawa et al., 2001; Matsui et al., 1998; Pearson et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß Phosphorylierung des konservierten MerlinT576 ebenfalls notwendig für die Aktivierung von Merlin ist. Zusätzlich zum C-terminalen MerlinT576 ist auch der N-terminale Bereich in der FERM Domäne, welcher in ERM Proteinen den Kontakt zu EzrinT567/RadixinT564/MoesinT558 vermittelt, in Merlin konserviert.

Phosphorylierung von Merlin^{T576} könnte somit ebenfalls wie Merlin^{S518} (Shaw et al., 2001) die N-C-Interaktion beeinflussen, indem die negative Ladung am Threonin-576 zur Abstoßung vom N-Terminus führt.

Wird die Oberfläche eines Proteins durch Veränderungen der Ladung (Phosphorylierung & Dephosphorylierung) und der Konformation moduliert, so ergeben sich Möglichkeiten, mit anderen Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Dies zeigt sich am Komplex/den Komplexen zwischen Merlin, RasGAP und RhoGAP. Die aktiven Formen Merlin^{S518A} und Merlin^{T576D} interagieren mit RhoGAP, wogegen deren inaktive Gegenstücke die Bindung inhibieren. Ob es sich um einen Gesamtkomplex oder separate Komplexe handelt, muß noch durch sequentielle Affinitätspräzipitation oder über chromatographische Methoden bestimmt werden. Ein erster Hinweis ist lediglich durch die Tatsache gegeben, daß Merlin bei Konfluenz verstärkt mit Paxillin interagiert (Fernandez-Valle et al., 2002), welches auch an RhoGAP bindet und dadurch den RhoGAP-RasGAP Komplex auflöst (Tsubouchi et al., 2002).

In kinetischen Untersuchungen von aktivem Ras und Rho wurde eine verstärkte, Merlin-abhängige Inaktivierung der G-Proteine nach Zell-Matrix Kontakt durch Hyaluronsäure ermittelt. Die Aktivität der G-Proteine wird durch GEFs (Schmidt and Hall, 2002), GAPs (Vetter and Wittinghofer, 2001; Wittinghofer et al., 1997) und GDIs bestimmt (Olofsson, 1999). Da die Inaktivierung von Ras und Rho beschleunigt abläuft läßt dies auf den Einfluß von RasGAP und RhoGAP schließen, welche die GTP Hydrolyse zu GDP stimulieren (Adari et al., 1988; Cales et al., 1988; Vogel et al., 1988). Die Beteiligung von einem Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitor (GDI; (Ueda et al., 1990) ist nicht wahrscheinlich, da dieser die GTPase im GDP- oder GTP-Zustand bindet und unter anderem vor Inaktivierung durch GAP schützen kann (Hancock and Hall, 1993). Die Beteiligung eines entsprechenden Austauschfaktors (GEF - guanine nucleotide exchange factor; (Whitehead et al., 1997) ist im Fall von Ras nicht auszuschließen. Verlust von Merlin in NIH-3T3 Fibroblasten durch RNAi führt ebenso zu einer Aktivierung von Ras wie die Stimulation von RT4 Schwannom-Zellen mit Hyaluronsäure, wenn diese die endogene Menge Merlin enthalten (- Doxycyclin). Dieser Hyaluronsäure und damit wahrscheinlich CD44 vermittelte Effekt deutet auf den Ezrin-Sos Komplex hin, der in unserem Labor als essentiell für Ras-vermittelte Signaltransduktion identifiziert wurde (Morrison et al., 2005). Der Hypothese zufolge liegt Ezrin bei Merlindefizienz CD44 gebunden vor und kann gemeinsam mit Sos die Aktivität von Ras steigern. Die

alleinige Verdrängung von Ezrin und Sos durch Merlin wäre nicht ausreichend, da sich das G-Protein in diesem Fall selbst langsamer inaktivierte (Halbwertszeit von etwa 25min statt der hier gemessenen <5min; (Schlichting et al., 1989; Schweins et al., 1997). Dies deutet auf eine Merlin-vermittelte GAP Aktivität hin, die die Inaktivierung von Ras vorantreibt. Welche physiologische Bedeutung die Hyaluronsäure-vermittelte Ras Antwort hat, ist bisher unklar. Die Tatsache, daß Ras unterschiedlich reguliert wird unterstreicht indes den Schaltercharakter des CD44 Sensors. Ein extrazelluläres Signal wirkt abhängig von der Menge exprimierten Merlins positiv oder negativ auf Ras.

Der Einfluß von Merlin auf GAP kann auf zwei Arten vermittelt werden. Entweder stimuliert Merlin die GAP-Aktivität direkt oder Merlin vermittelt den Kontakt zwischen GTPase und GAP. Bisher konnte gezeigt werden, daß Merlin und RhoGAP an der Plasmamembran kolokalisieren, der Region, an die Ras und Rho durch einen Lipidanker binden (Adamson et al., 1992) und wo diese aktiviert werden können (Aronheim et al., 1994). Weiterhin kolokalisiert Merlin mit Rho in Schwann-Zellen (Scherer and Gutmann, 1996). Weitere Einblicke sollte die Zusammensetzung des Komplexes erlauben: Die Assoziierung von RasGAP mit RhoGAP durch Phosphotyrosin-SH2 Interaktion ist beschrieben (Hu and Settleman, 1997; Moran et al., 1991). Die Bindung von p190RhoGAP an p120RasGAP reduziert die GAP Aktivität von RasGAP (Moran et al., 1991). Die Konkurrenz von Tyrosin-phosphoryliertem Paxillin und RhoGAP um RasGAP 'befreit' RhoGAP und es erfolgt Inhibition von Rho (Tsubouchi et al., 2002). Schließlich kann die mit Merlin präzipitierende 'GAP-Aktivität' direkt in einem 'GAP-assay' mit rekombinantem Substrat bestimmt werden (Self and Hall, 1995a; Self and Hall, 1995b). Mit diesen Experimenten sollte es letztlich gelingen, zu bestimmen, ob Merlin nur ein dominant negatives Ezrin ist, indem der Ezrin-Sos Komplex verdrängt wird, oder ob Merlin selbst eine katalytische Aktivität beisteuert.

RasGAP und RhoGAP stellen sehr interessante Bindungspartner von Merlin dar, da für diese separat Funktionen nachgewiesen wurden, die auch Merlin ausübt. RasGAP inhibiert die Wachstumsfaktor-induzierte Ras Aktivierung (Gibbs et al., 1990). Ein p120RasGAP 'knockout' bewirkt zeitlich verlängerte ERK Phosphorylierung und induziert Koloniebildung in Weichagar sowie Wachstum zu höherer Zelldichte (Koehler and Moran, 2001). Die GAP Domäne von p190RhoGAP inhibiert die Transformation von NIH-3T3 Fibroblasten durch onkogenes Ras (Wang et al., 1997) und vermittelt nach Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt die Inhibition von Rho (Arthur et al., 2000; Noren et al., 2003). Der Verlust von RhoGAP führt unter anderem zur

Entwicklung von Oligodendrogliomen, Tumoren des Zentralnervensystems (Tikoo et al., 2000; Wolf et al., 2003). Schließlich sollte nicht außerachtgelassen werden, daß Neurofibromatose 1 durch den Verlust von Neurofibromin, einer anderen RasGAP, ausgelöst wird (Ballester et al., 1990; Martin et al., 1990; Xu et al., 1990a; Xu et al., 1990b). Die Perspektive auf überlappende Regulationsmechanismen beider Neurofibromatosen sollte genauer untersucht werden.

Der Einfluß von Merlin auf der Ebene von Ras ist unerwartet, da in anderen Studien gezeigt werden konnte, daß Merlin unterhalb von Ras in die Signaltransduktion eingreift. Zum einen inhibiert Merlin die Transformation durch dominant aktives Ras (Tikoo et al., 1994), zum anderen blockiert es Phosphorylierung von ERK durch dominant aktives Ras auf der Ebene von MEK oder darüber (Morrison et al., 2005). Dies resultiert wahrscheinlich aus der Interaktion von Merlin mit PAK, wodurch dessen Aktivierung durch Rac inhibiert wird (Kissil et al., 2003). PAK wiederum agiert mit Ras synergetisch im Aktivierungsprozeß von Raf und MEK (Frost et al., 1997; Zang et al., 2002), so daß Merlin durch PAK-Interferenz Raf und MEK inhibieren kann.

Die Verbindung von Merlin mit den GTPasen Ras, Rac und Rho gibt zum einen Einblick in dessen anti-transformatives Potential und zum anderen in die Veränderungen des Aktinzytoskeletts, die nach Hyaluronsäure Behandlung entstehen. Die GTPasen Rho und Rac sind entscheidende Faktoren für die Ausbildung von F-Aktin Streßfasern (Ridley and Hall, 1992) und dynamischen, F-Aktin enthaltenden Membranregionen, genannt 'ruffling membrane' (Ridley et al., 1992). Der Verlust von Merlin in Schwannom Zellen bewirkt abnorme F-Aktin Streßfasern und Membran 'ruffles' während der Ausbreitung der Zellen (Pelton et al., 1998). Nun kolokalisiert Merlin mit F-Aktin (Gonzalez-Agosti et al., 1996; Xu and Gutmann, 1998) und soll über einen lateralen Bindungsmechanismus die Stabilität von Aktinfilamenten erhöhen (James et al., 2001). Die Veränderungen in den Schwannom Zellen allein durch den stabilisierenden Effekt erklären zu können, ist eher unwahrscheinlich, da es außerdem noch viele andere stabilisierende Proteine gibt (Small et al., 2002). Zumal jetzt in Form von N-WASP eine direkte Verbindung zum regulatorischen Apparat des F-Aktins gezeigt werden konnte. N-WASP wird durch eine weitere GTPase, Cdc42, aktiviert und induziert die Bildung von Filopodien (Miki et al., 1998; Rohatgi et al., 1999). Merlin inhibiert *in vitro* die N-WASP stimulierte Aktinpolymerisation und greift damit direkt auf die Signaltransduktion in Richtung F-Aktin zu (Manchanda et al., 2005). Außerdem kann der Schwannom Phänotyp durch Inhibition von Rho

oder Rac und durch Merlin Proteintransfer revertiert werden (Bashour et al., 2002; Pelton et al., 1998). In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, daß nach Aktivierung von Merlin ebenfalls Veränderungen des Zytoskeletts auftreten, die mit einer Merlin-vermittelten Inhibition von Rho einhergehen. Diese Ergebnisse suggerieren ebenso, daß Merlin nicht als Stabilisator fungiert, sondern die akzessorischen Proteine des F-Aktin-Zytoskeletts beeinflusst.

Diese Restrukturierung des Zytoskeletts könnte ein Nebeneffekt sein oder direkt den Signaltransfer beeinflussen und damit Teil der Tumorsuppressorfunktion sein. Bisher liegen einige Beweise vor, daß das Gleichgewicht zwischen filamentösem und globulärem Aktin die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF reguliert (Miralles et al., 2003; Sotiropoulos et al., 1999), der auch durch Merlin inhibiert wird (Lim et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Tumorsuppressorfunktion von Merlin nicht nur von Serin-518 abhängt, sondern zusätzlich von Threonin-272 und -576. Die aktive Form von Merlin interagiert mit p120RasGAP und p190RhoGAP, Inhibitoren von Ras und Rho, denen eine wichtige Stellung im onkogenen Transformationsprozeß und der Umstrukturierung des Zytoskeletts zukommt. Damit sind Merlin Effektoren identifiziert, deren weitere Charakterisierung es vielleicht erlaubt, die Hauptmerkmale von Merlin Defizienz, unkontrollierte Proliferation und Veränderungen des Zytoskeletts, auf Ebene der kleinen GTPasen Ras und Rho zu erklären.

Auffallend ist der Eingriff von Merlin auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion. Aktives Merlin verdrängt den Ezrin-Sos Komplex (Morrison et al., 2005), interferiert mit PAK (Kissil et al., 2003) und interagiert mit RasGAP und RhoGAP. Zusätzlich reduziert Merlin die Motilität von Zellen *in vitro* (Gutmann et al., 1999). Trotzdem führt die Merlininaktivierung im Verlauf von Neurofibromatose 2 primär zur Ausbildung von gutartigen kranialen und spinalen Tumoren. Möglicherweise beruht diese scheinbare Diskrepanz auf einer bisherigen Unterbewertung von Merlin in der Krebsentstehung. Diese Vermutung wird insbesondere durch Mausmodelle gestützt, in denen eine Synergie zwischen Verlust von *Nf2* und dem Tumorsuppressorgen *p53* bezüglich Tumorbildung und Metastasierung festgestellt werden konnte (McClatchey et al., 1998). Darüber hinaus wurde das recht lange als Strukturprotein angesehene Ezrin kürzlich als Schlüsselprotein in der Tumormetastasierung beschrieben (Khanna et al., 2004; Yu et al., 2004), was die oben erwähnte Gegenspietersituation von Ezrin und Merlin stützt. Eine weitere Untersuchung der ERM Proteine und Merlin

sollte daher zu einem besseren Verständnis der Krebsentstehung beitragen.

Material und Methoden

Gerätschaften

Agarose Gelelektrophorese-Apparatur, PeqLab GmbH, Erlangen
Bakterien-Brutschrank, Heraeus, Hanau
Bakterien-Schüttler, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
BioPhotometer Eppendorf, Hamburg
CDD-Digitalkamera (C4742-98), Hamamatsu
CO₂-Inkubator, Labotec, Göttingen
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135, Carl Zeiss
Feinwaage AE163 Mettler
Konfokales Laserscanning Mikroskop, Carl Zeiss
Kühlzentrifuge Avanti J-20, Beckman, Stuttgart
Kühlzentrifuge J2-HS Beckman, Stuttgart
Megafuge 1.0 Hereaus, Hanau
Mikroskop (ID2) Zeiss, Jena
Netzgerät Power-Supply BioRad, München
PAGE-Elektrophorese-Apparatur, Midi-Format (ca. 15x15cm), PeqLab GmbH, Erlangen
PCR-Maschine, MG Research
pH-Meter, Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine, Kodak, New Haven, USA
Schüttler Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim
Tisch-Kühlzentrifuge, Heraeus, Hanau
Tisch-Kühlzentrifuge Z233MK, Hermle, Gosheim
Tisch-Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg
Tisch-Zentrifuge Biofuge, Heraeus, Hanau
UV-Gerät Eagle Eye, Stratagene, Heidelberg
Waage, Sartorius, Göttingen
Westernblot Transferkammer, PeqLab GmbH, Erlangen

Verbrauchsmaterialien

Bakterien-Petrischalen, Greiner, Frickenhausen
Einfrierröhrchen, Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg
Objektträger, Labonord, Templemars, Frankreich
PCR-Reaktionsgefäße, Roth, Karlsruhe
Pipetten Pipetman, Gilson, Langenfelden
Röntgenfilm Hyperfilm ECL & MP, Amersham Buchler, Braunschweig
Sterilfilter, Renner GmbH, Darmstadt
Transfer Membran Immobilon-P (PVDF), Millipore, Bredford, USA
UV-Küvetten, Eppendorf, Hamburg
Whatman 3MM-Papier, Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen, Greiner, Frickenhausen

Reagenzien, Medien und Zusätze

Soweit nicht anders angegeben, werden Chemikalien vom Reinheitsgrad 'pro analysii' (p.a.) bzw. 'reinst' verwendet. Lösungen werden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Medien und Pufferlösungen werden autoklaviert (30min., 121°C) und/oder sterilfiltriert (0,22µm).

Acrylamid + N,N'-Methylenbisacrylamid(30%:0,8%), Roth, Karlsruhe
Agarose, PeqLab, Erlangen
Ampicillin, Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar, Otto Nordwald KG, Hamburg
Bromphenolblau, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovine serum albumin), PAA Laboratories, Marburg
Desoxycholinsäure, Roth, Karlsruhe
DMEM (Dulbeccos modified Eagle's medium), Gibco, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid), Fluka, Neu-Ulm
Doxycyclin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraacetat), Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)tetraacetat), Roth,
Karlsruhe
Essigsäure, Merck, Darmstadt
Ethanol, Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum), PAA Laboratories, Marburg
G418 Geneticin, Sigma, Taufkirchen
Glucose, Roth, Karlsruhe
Glycerin, Roth, Karlsruhe
Glycin, Roth, Karlsruhe
Harnstoff, Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt, Roth, Karlsruhe
Hygromycin B, Calbiochem
IPTG, Roth, Karlsruhe
Isopropanol, Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, Roth, Karlsruhe
Kanamycin, Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid, Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat, Roth, Karlsruhe
Methanol, Promochem GmbH, Wesel
Milchpulver, Saliter, Obergünzburg
Natriumacetat, Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
Natriumfluorid, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt

Natriumorthovanadat, Merck, Darmstadt
NP-40, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (phosphate buffered saline), Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml Penicillin, 10000µg/ml Streptomycin), Gibco, Karlsruhe
PMSF, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Puromycin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PVA (Polyvinylalkohol), Sigma, USA
Salzsäure, Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat), Roth, Karlsruhe
TEMED, Roth, Karlsruhe
Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan), Roth, Karlsruhe
Triton X-100, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin 0,25%, Difco Laboratories, Detroit
Trypton, Roth, Karlsruhe
Tween20, Roth, Karlsruhe
Xylenzanol, BioRad, München

Wachstumsfaktoren und Spezialreagenzien

ECL Western blotting Substrat, Amersham
Hyaluronsäure, Healon (MW: $4-5 \times 10^3$ kDa), Pharmacia&Upjohn, Erlangen
Lumi-Light Western blotting Substrat, Roche
PDGF (platelet-derived growth factor), BB Homodimer, Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, Roche
Protein A, G plus und A/G plus gekoppelte Agarose Matrix, Calbiochem

SeeBluePlus 2 prestained protein ladder (4-250kDa), Invitrogen, Karlsruhe
BenchMark prestained protein ladder (8-180kDa), Invitrogen, Karlsruhe
Prestained SDS molecular weight markers (30-180kDa), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
100bp DNA-ladder, Invitrogen, Karlsruhe
1kb DNA-ladder, Gibco, Karlsruhe

Antikörper und Konjugate

Primärantikörper
Aktin pAk I-19 (Quelle: Ziege), Santa Cruz
CD44 mAk 5G8, erkennt Exon 15 in Ratten CD44 (Quelle: Maus), (Sleeman et al., 1996a; Sleeman et al., 1996b)
ERK1 pAk K-23 (Quelle: Kaninchen), Santa Cruz
ERK1/2 pAk, pT202/pY204 (Quelle: Kaninchen), Cell Signaling
ERM pAk, Ezrin pT567/Radixin pT564/Moesin pT558 (Quelle: Kaninchen), Cell Signaling

Ezrin mAk 3C12, (Quelle: Maus), Neomarkers
Ezrin pAk C-19 (Quelle: Ziege), Santa Cruz
FLAG mAk M2 (Quelle: Maus), Sigma
GFP pAk FL (Quelle: Kaninchen), Santa Cruz
Merlin pAk C-18 (Quelle: Kaninchen), Santa Cruz
Merlin pAk, pS518 (Quelle: Kaninchen), Rockland
Moesin pAk C-15 (Quelle: Ziege), Santa Cruz
Radixin pAk C-15 (Quelle: Ziege), Santa Cruz
Ras mAk RAS10 (Quelle: Maus), Cell Signaling
RasGAP (p120) mAk B4F8 (Quelle: Maus), Sigma
Rho (-A,-B,-C) pAk (Quelle: Kaninchen), Upstate
RhoGAP (p190) mAk D2D6 (Quelle: Maus), Upstate
Threonin pAk, pTXR Motiv (Quelle: Kaninchen), Cell Signaling
Tubulin mAk TU-02 (Quelle: Maus), Santa Cruz
pTXR Motiv pAk (Quelle: Kaninchen), Cell Signaling

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG (Quelle: Ziege), HRP gekoppelt, Dako
Anti-Kaninchen IgG (Quelle: Ziege), Alexa488 gekoppelt, Molecular
Probes
Anti-Kaninchen IgG (Quelle: Ziege), Alexa594 gekoppelt, Molecular
Probes
Anti-Maus IgG (Quelle: Ziege), HRP gekoppelt, Dako
Anti-Maus IgG (Quelle: Ziege), Alexa488 gekoppelt, Molecular Probes
Anti-Maus IgG (Quelle: Ziege), Alexa594 gekoppelt, Molecular Probes
Anti-Ziege IgG (Quelle: Kaninchen), HRP gekoppelt, Dako
Anti-Ziege IgG (Quelle: Esel), Cy3 gekoppelt, Dianova

Phalloidin-Konjugate

Phalloidin, Alexa488 gekoppelt, Molecular Probes
Phalloidin, Alexa594 gekoppelt, Molecular Probes

Plasmide und Plasmidkonstrukte

pcDNA3 (G418, Invitrogen), pBabe (Puromycin) und pCEP4 (Hygromycin, Invitrogen) werden zur Selektion verwendet. pUHG17-1 (reverse tetracyclin-controlled transactivator), pUHC13-3 (rtTA-responsive luciferase reporter) und pUHD10-3 (rtTA-responsive cloning vector) stammen von Hermann Bujard (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). pUHD10-3(NF2.17) enthält Merlin Isoform 1 (RefSeq.: NM_000268) kloniert über *EcoRI* und stammt von Helen Morrison (Morrison et al., 2001). pEGFP-C1 mit p190RhoGAP (BglII, *EcoRI*) stammt von Keith Burridge (Noren et al., 2003).

Primer

Die Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. Herstellung von MWG (<http://www.mwg-biotech.com>).

Mutagenese:

NF2T272Afw: CGT ACA GTG ACA AGG AGT TTG CCA TTA AAC CAC TGG
ATA AGA AAA

NF2T272Arv: TTT TCT TAT CCA GTG GTT TAA TGG CAA ACT CCT TGT
CAC TGT ACG

NF2T272Dfw: CTC GTA CAG TGA CAA GGA GTT TGA TAT TAA ACC ACT
GGA TAA GAA AAT TGA

NF2T272Drv: TCA ATT TTC TTA TCC AGT GGT TTA ATA TCA AAC TCC
TTG TCA CTG TAC GAG

NF2T576Afw: CAG CAG CAA GCA CAA TGC CAT TAA AAA GCT CAC CTT
G

NF2T576Arv: CAA GGT GAG CTT TTT AAT GGC ATT GTG CTT GCT GCT
G

NF2T576Dfw: GGC AGC AGC AAG CAC AAT GAC ATT AAA AAG CTC ACC
TTG CA

NF2T576Drv: TGC AAG GTG AGC TTT TTA ATG TCA TTG TGC TTG CTG
CTG CC

Sequenzierung:

NF2 seq fw: AGG CCA AGT ATG GTG ACT ACG A

NF2 seq rv: TGC AGG TCC TGC TTC AGC TGA

Standardmethoden

Falls nicht anders angegeben sind Standardmethoden und Standardpuffer aus den Handbüchern Cell Biology (Celis, 1998), Current Protocols (Ausubel et al., 1987) und Molecular Cloning (Sambrook and Russel, 2001) entnommen.

Bakterienstämme

Escherichia coli

BL21(DE3): E.coli B, F-, dcm, ompT, hsdS(r_B- m_B-) gal (DE3)

TG 2: *supE*, *hsdΔ5*, *thi*, $\Delta(lac-proAB)$, $\Delta(srl-recA)306-$
Tn10(tet^R)/F'(traD36, proAB⁺, lacI, lacZΔM15)

XL1-blue supercompetent (Stratagene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*,
hsdR17, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' proAB, lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]

Chemisch kompetente Bakterien

E. coli werden durch eine CaCl_2 -Behandlung in den Zustand der Kompetenz gebracht, d.h. ihre Zellwand ist poröser und es kommt zu einer gesteigerten Aktivität extrazellulärer Enzyme. Gibt man schließlich Plasmid-DNA hinzu und setzt die Bakterien einem Hitzeschock aus kommt es zu einer Inkorporation der DNA.

10ml einer *E. coli* TG2 Vorkultur in SOB-Medium (20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl, 0,19g KCl, ad 1000ml H_2O) mit einer OD_{600} von 0,5 werden als Inokulum für eine 1000ml Hauptkultur in SOC-Medium (SOB-Medium, 10mM MgCl_2 , 10mM MgSO_4 , 20mM Glucose) verwendet. Nach einer Inkubation von 2,5h bei 37°C und 180Upm erfolgt zentrifugieren der Zellsuspension für 5min bei 16000Upm und 4°C . Das Pellet wird anschließend in 100ml eiskalter 0,1M CaCl_2 Lösung resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Zum weiteren aufkonzentrieren wird die Suspension für 5min bei 6000Upm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 10ml eiskalter 0,1M CaCl_2 Lösung aufgenommen. Nach 3h Inkubation auf Eis werden 1,2ml 87% Glycerin zugefügt, die Suspension wird aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Transformation von Bakterien

Es werden 10-100ng Plasmid-DNA und $100\mu\text{l}$ kompetente *E. coli* TG2 für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im 42°C Wasserbad für 30sec erfolgt eine erneute Inkubation auf Eis für 2-3min. Jetzt erfolgt die Zugabe von $800\mu\text{l}$ SOC-Medium (SOB-Medium, 10mM MgCl_2 , 10mM MgSO_4 , 20mM Glucose) und Inkubation für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Zellen werden anschließend für 3min bei 3000Upm pelletiert, er werden etwa $750\mu\text{l}$ verworfen, das Pellet resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

Die langfristige Lagerung erfolgt als Glycerinkultur bei -80°C . Dazu werden $0,75\text{ml}$ Kultur des gewünschten Klons mit $0,25\text{ ml}$ sterilem Glycerin (87%) versetzt.

DNA-Plasmidpräparation

Die Plasmidgewinnung erfolgt mit dem Qjagen® Plasmid Maxi Kit und Amersham Pharmacia GFX Micro Plasmid Prep Kit. Die Aufreinigung basiert auf folgenden Punkten:

Aus den Bakterien wird ein klares Lysat gebildet, indem mit SDS die Phospholipide und die Proteinkomponenten solubilisiert und durch NaOH die dadurch freigesetzten Proteine sowie Plasmid- und chromosomale DNA denaturiert werden. Durch saure Kaliumacetatlösung erfolgt Neutralisierung. Weiterhin bewirkt die hohe

Salzkonzentration, daß SDS ausfällt und mit ihm die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und andere Zelltrümmer. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert, da sie kovalent geschlossen ist und bleibt in Lösung, wodurch eine Trennung durch zentrifugieren oder filtrieren erfolgen kann. Die Plasmid-DNA wird dann auf einer Anionenaustauschersäule immobilisiert, von letzten Verunreinigungen befreit und schließlich eluiert.

Die DNA wird gefällt, indem 0,7Vol. Isopropanol zugefügt werden. Die Sedimentation erfolgt für 30min bei >15000g und 4°C, dann wäscht man mit 70% Ethanol und nimmt die DNA nach dem Verdampfen in TE, pH8,0 oder H₂O bidest. auf. Die Konzentration der DNA wird im Photometer bei $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. Dafür verdünnt man die Probe 1:200 mit H₂O bidest. und multipliziert den erhaltenen OD-Wert mit 10, um die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten (eine OD von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dsDNA).

Restriktionsenzymatische DNA Spaltung

Pro Mikrogramm zu spaltender DNA werden zwei bis drei Einheiten Restriktionsenzym unter Einhaltung der vom Hersteller vorgeschlagenen Puffer- und Inkubationsbedingungen verwendet. Die Qualität der Spaltung wird nach Zusatz von 5x DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 15% Ficoll® 400, 50mM EDTA, 0,4% SDS, 20 μl 50x TAE-Puffer) zu den Ansätzen in einer Agarose Gelelektrophorese bestimmt. Im Falle einer weiteren Verwendung der DNA-Fragmente zu Klonierungszwecken wird vor der Gelelektrophorese eine Phenol/Chloroform Fällung durchgeführt, die in weiteren Schritten störende Proteine abtrennt.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) Fällung und DNA Präzipitation

Eine Phenol/Chloroform Fällung dient der Entfernung von Proteinverunreinigungen aus DNA Proben. Durch die anschließende DNA Präzipitation erfolgt eine weitere Reinigung und eine Aufkonzentrierung der DNA.

Die PCI-Lösung (25:24:1) wird erhalten, indem TE-Puffer (10mM Tris base, pH8, 1mM EDTA) zu gleichen Teilen mit Phenol vermischt wird. Nachdem sich die wäßrige von der organischen Phase getrennt hat, wird die untere phenolhaltige Phase mit einem gleichen Anteil einer Chloroform:Isoamylalkohol Lösung (24:1) versetzt. Der zu reinigende Reaktionsansatz wird mit einem Teil PCI versetzt, gevortext und 10min mit 10000g zentrifugiert. Die obere DNA enthaltende, wäßrige Phase wird abgenommen und mit 3M Natriumacetat Lösung (pH 4,8-5) versetzt, bis eine Salzkonzentration von 200mM erreicht ist. Schließlich

wird durch Zugabe von Ethanol (2,5 faches Volumen) oder Isopropanol (1 faches Volumen) die Präzipitation des DNA-Salzes eingeleitet (5-10min bei Raumtemperatur). Das Präzipitat wird durch Zentrifugation bei 10000g für 15-20min abgetrennt und mit 70% Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nach Trocknung der DNA wird diese in Wasser oder TE-Puffer gelöst.

Agarose Gelelektrophorese

Zu einer 0,8-1.5% Lösung von Agarose in TAE-Puffer (50x TAE: 2M Tris-Base, 1M Natriumacetat, 50mM EDTA, pH 7,5) wird Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,1µg/ml gegeben. Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der DNA und läßt sich durch UV-Licht anregen, so daß die Lage der DNA nach der Elektrophorese im Gel bestimmt werden kann. Das ausgehärtete Gel wird mit TAE-Puffer überschichtet. Vor dem Auftragen wird den DNA-Proben 5x DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 15% Ficoll® 400, 50mM EDTA, 0,4% SDS, 20µl 50x TAE-Puffer) zugesetzt, danach erfolgt der Gellauf mit 10V/cm Gellänge.

Sequenzspezifische DNA Mutagenese

Um die in dieser Studie verwendeten Mutationen zu generieren, wurde der Stratagene QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die komplette Durchführung richtet sich im Allgemeinen nach den vom Hersteller gemachten Angaben. In Kürze: Die verwendeten Primer wurden unter Berücksichtigung der vom Hersteller angegebenen Parameter entworfen (Schmelztemperatur, GC-Gehalt, Länge, Reinheit) oder direkt mit dem Stratagene onlinetool ausgewählt (<http://labtools.stratagene.com/QC>). Die PCR besteht aus folgenden Komponenten: 5µl 10x Reaktionspuffer, 5-50ng dsDNA Matrize, je 125ng Primer 1 & 2, 1µl dNTP Mix, ad ddH₂O 50µl, 2,5U *PfuTurbo* Polymerase; und wird mit dem Standardprogramm durchgeführt: 1. 95°C, 30sec; 2. 95°C, 30sec; 3. 55°C, 1min; 4. 68°C, 1min/kb Plasmidlänge; 5. zurück zu 2. 16x. Die nach der Reaktion verbleibende methylierte Ausgangs-DNA wird mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (10U) zerschnitten, so daß in der sich anschließenden Transformation in *E.coli* XL1-blue nur funktionsfähige mutierte DNA vorhanden ist. Die transformierten Bakterien werden dann auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Zuletzt wird die Plasmid-DNA der einzelnen Klone isoliert und sequenziert.

DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wird von der Firma GATC (<http://www.gatc.de>) durchgeführt.

Zelllinien

RT4-D6P2T Ratten Schwannom (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury)

NIH-3T3 Maus Fibroblasten (ATCC)

Zellkultivierung

Die Kultivierung der RT4-D6P2T erfolgt in DMEM/10%FCS/Pen/Strep (Wachstumsmedium, WM) unter humider Atmosphäre mit 6% CO₂ bei 37°C. Ab maximal 80% Konfluenz erfolgt die Passage in neue Kulturschalen. Dazu die Zellen mit 2ml 0,25% Trypsin/EDTA pro 10cm Schale über 5min ablösen. Ein Aliquot wird in eine neue Schale mit temperiertem WM überführt.

Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung der RT4 Zellen erfolgt zunächst Wachstum bis etwa 70% Konfluenz. Die Zellen werden 5min trypsinisiert und zur Inaktivierung des Trypsins in Wachstumsmedium (WM; DMEM/10%FCS/Pen/Strep) überführt. Pelletieren erfolgt durch Zentrifugation in einer Heraeus Megafuge 1.0 für 5min bei 1200Upm. Nach Absaugen des WM werden die Zellen in eiskaltem Kryomedium (KM; DMEM/10%FCS/10%DMSO) resuspendiert, auf Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen sollte im Gegensatz zum Einfrieren schnell geschehen. Der Transport vom Kryolager zum Zelllabor erfolgt daher auf Eis und das Auftauen im 37°C Wasserbad. Man bringt die Zellen dann in temperiertes Wachstumsmedium (WM) und pelletiert diese durch Zentrifugation für 5min bei 1200Upm. Das Pellet wird anschließend in WM resuspendiert und die Zellen standardmäßig kultiviert.

Aktivierung von Natriumorthovanadat (PTP Inhibitor)

Die Salze der Vanadiumsäure (Vanadate) liegen abhängig vom pH-Wert vor. Bei einem pH>13 dominiert Orthovanadat [VO₄]³⁻, bei niedrigeren pH-Werten bilden sich protoniertes Orthovanadat und Metavanadat [VO₃]⁻ und Divanadat [V₂O₇]⁴⁻ sowie deren protonierte Varianten aus. Weitere Verringerung des pH unter 7 führt zur Bildung von Decavanadat [V₁₀O₂₈]⁶⁻ und dessen protonierten Formen.

Natriumorthovanadat wird als Phosphotyrosin-Phosphatase Inhibitor eingesetzt und zeigt die maximale Aktivität in dem hier als ‚aktivierte Form‘ bezeichneten Zustand, der bei einem pH-Wert um 10 vorliegt.

Eine 200mM Lösung von Natriumorthovanadat Na_3VO_4 wird mit 1N HCL oder 1N NaOH auf pH 10 eingestellt (Ausgangs pH hängt vom Herstellungsprozeß ab). Die jetzt gelbe Lösung wird bis zur Farblosigkeit gekocht. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert erneut auf 10 eingestellt und die Lösung erhitzt. Diese Schritte werden etwa drei- bis viermal wiederholt bis die Lösung bei pH 10 farblos bleibt. Die aliquotierte Lösung wird bei -20°C gelagert.

Proteinextraktion & Zellyse

Das Gesamtzellysate wird erhalten, indem nach Absaugen des Kulturmediums die Zellen in 2x Laemmli Lysis-Puffer aufgenommen werden (100mM Tris base pH 6,8, 4%SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin). Die enthaltene genomische DNA muß noch vor dem Aufkochen und Auftragen der Proben geschert werden, um die Trennung der Proteine nicht zu stören. Weiterhin werden durch Zusatz von 50mM DTT und anschließendem Erhitzen auf 95°C für 3-4min die Proteine reduziert und denaturiert (Heizblock/Schüttler Kombination verwenden, um hohen Wärmeübergang zu gewährleisten); zu ausgedehntes Erhitzen kann unter Umständen auch zur Aggregatbildung der Proteine führen. Zuletzt werden noch unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (14000g, 2min). Die Proben können bei -20°C gelagert werden.

Um störende genomische DNA und Kernproteine durch Zentrifugation entfernen zu können, wird die Proteinextraktion unter milderen Bedingungen durchgeführt, so daß der Zellkern i.A. intakt bleibt. Durch Wahl der Pufferkomponenten kann weiterhin ein unterschiedliches Maß an Proteinen und Komplexen solubilisiert werden. So lassen sich Puffer anwenden, die z.B. F-Aktin und einen Teil der assoziierten Proteine intakt halten und hauptsächlich zytosolische Komponenten solubilisieren. Generell kann aber nur auf einen begrenzten Schatz an Erfahrung und festem Wissen zurückgegriffen werden, so daß immer eine gewisse empirische Vorarbeit notwendig ist, um einen Puffer zu konzipieren, der den Anforderungen entspricht. Des weiteren sollten bei allen anschließenden Untersuchungen Kontrollen (z.B. Kontroll-IP) und komplementäre Experimente (z.B. Immunzytochemie) durchgeführt werden, um eine Artefaktbildung während der Extraktion auszuschließen.

Vor der Extraktion werden die Zellkulturplatten generell auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS oder TBS gewaschen. Dieser Schritt entfernt zum einen Serumproteine und reduziert durch die Abkühlung die gesamte zelluläre Aktivität (Proteine und Proteinkomplexe werden stabilisiert). Die Zellen werden dann mit dem Puffer von der Petrischale geschabt

und für 10-20min auf Eis belassen. Unlösliche Bestandteile werden in einer Zentrifugation abgetrennt (14000g, 5min, 4°C). Die Puffer zur Untersuchung der Rho-Aktivität, der co-Immunopräzipitation und der FLAG/NF2 Immunopräzipitation (IP) werden im Anschluß beschrieben. Zur Untersuchung des Aktivierungsgrades der Rho GTPase wird ein Mg²⁺ Lysis/Wash buffer (MLB) mit den folgenden Komponenten verwendet: 25mM HEPES, pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 2% Glycerin, 25mM NaF, 1mM Vanadate, Complete w/o EDTA (Fa. Roche, Proteaseinhibition). HEPES dient dabei als pH-Puffer (temperaturunsensitiver als Tris) und EDTA als Inhibitor von Metalloproteasen, Der Zusatz von NaCl verhindert, daß zu viele unspezifische Wechselwirkungen entstehen, und NP-40 bewirkt als nicht-ionisches Detergenz die Lyse der Plasmamembran und Solubilisierung von Zellbestandteilen. Eine hohe MgCl₂ Konzentration ist notwendig, um die kleine GTPase im Nukleotid-gebundenen Zustand zu konservieren. Glycerin fungiert als Proteinstabilisator, indem an Glycerin gebundene Wassermoleküle nicht mehr für Wechselwirkungen mit Proteinen zur Verfügung stehen; Proteine können in rein wäßriger Lösung eher zu einer Entfaltung tendieren. Schließlich werden NaF und Vanadate als Breitbandinhibitoren für Serin-/Threonin-Phosphatasen und Tyrosin-Phosphatasen eingesetzt.

In den co-Immunopräzipitationen (IP) wird ein Puffer mit folgenden Komponenten verwendet: 50mM HEPES, pH 7,4, 1% NP-40, 0,1% DOC (Desoxycholsäure), 100mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 20mM NaF, 5mM Vanadat, Complete w/o EDTA. Der Zusatz des ionischen Detergenz DOC erhöht den Grad der Proteinsolubilisierung. EDTA und EGTA sollen durch die Chelatbildung mit zweiwertigen Ionen nicht nur Metalloproteasen inhibieren, sondern auch das F-Aktin destabilisieren, um so die Proteinsolubilisierung zu erhöhen (Mg²⁺ unterstützt F-Aktin, Ca²⁺ unterstützt G-Aktin).

In der FLAG oder NF2 IP wird der folgende Puffer eingesetzt: 50mM HEPES, pH 7,4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% DOC, 0,1% SDS. Der erhöhte Gehalt ionischer Detergenzien unterbindet Protein-Protein Interaktionen und vermindert weiterhin die unspezifische Proteinbindung an die Agarosematrix (siehe Abschnitt Immunopräzipitation von Proteinen und Proteinkomplexen). Dieser Puffer gewährleistet damit eine spezifische Trennung des Antigens vom verbleibenden Zelllysate.

Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Anwendung kommt die diskontinuierliche pH-Elektrophorese nach (Laemmli, 1970). Eine ausführliche Beschreibung der angewendeten Methode ist in (Sambrook and Russel, 2001) enthalten. Je nach Trennbereich werden Trenngele mit 8-12% Acrylamid und ein Sammelgel von 5% Acrylamid verwendet. Der Laufpuffer enthält: 25mM Tris Base, pH 8,3, 250mM Glycin, 0,1% SDS.

Das Trenngel während der Polymerisation mit 70% Ethanol überschichten, um einen geraden Übergang zwischen Sammel- und Trenngel zu erzeugen. Nach Herausnahme des Kammes aus dem Sammelgel ist es notwendig, die Taschen mit Laufpuffer zu spülen, um so unpolymersiertes Acrylamid zu entfernen, welches mit dem Probenprotein reagieren könnte. Vor der Elektrophorese die Gele für 1-2h stehen lassen, um die Polymerisationsreaktion zu beenden. Allerdings dürfen die Gele auch nicht zu lange gelagert werden, da der pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel durch Diffusion zerstört wird und dadurch die Trennschärfe verringert wird. Die Proteinproben sollten schließlich kompakt am Boden der Tasche mit einer Hamilton-Pipette aufgetragen werden. Die Elektrophorese selbst wird mit 30mA/Gel im Sammelgel und unter Wasserkühlung mit 40-50mA/Gel im Trenngel durchgeführt.

Western Blotting und Immunodetektion

Zum gezielten Nachweis eines bestimmten Antigens in einem Zellextrakt kann ein Western Blot (Transfer von Proteinen auf eine stabile handhabbare Membran) mit anschließender Immunodetektion (Bindung des Antikörpers an das gesuchte Antigen und Nachweis der Interaktion mit einem zweiten Antikörper und sich anschließender Chemilumineszenz-Reaktion).

Der Proteintransfer vom Gel auf eine PVDF Membran (Millipore Immobilion-P) wird im 'tankblot'-Verfahren durchgeführt. Dazu wird die Membran zuerst in Methanol ‚aktiviert‘ (die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften des Methanols bewirken, daß die hydrophobe Membran benetzt werden kann). Danach die Membran und das Gel in Blotpuffer (25mM Tris Base, pH 8,3, 250mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) äquilibrieren (der Methanol verhindert, daß das Gel während des Transfers aufquillt). Jedes Gel wird mit einer Membran luftblasefrei in einem Sandwich aus vier Blatt ‚Whatman‘-Papier eingebaut. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine werden in Richtung Anode auf die Membran ‚geblottet‘. Der Transfer erfolgt über Nacht standardmäßig mit 30V, kann aber auch unter Kühlung mit bis zu 1,5A innerhalb von 2-3h durchgeführt werden.

Die sich nun anschließende Immundetektion beginnt mit dem Blockieren von noch vorhandenen Proteinbindestellen auf der Membran mit einer 5% Lösung von BSA oder Magermilchpulver in TBS-T (20mM Tris Base, pH7,6, 137mM NaCl, 0,1% Tween[®] 20, ad 1000ml H₂O) für 1h. Der Primärantikörper wird dann in dieser Block-Lösung für 1-2h inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird dann mit drei Waschschritten in TBS-T entfernt. Darauf folgt die Inkubation des in Block-Puffer gelösten Sekundärantikörpers für 0,5-1h und erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP (Peroxidase) katalysiert dann unter Emission von Licht (Chemilumineszenz) die Umsetzung der Substrate aus den hier verwendeten Kits Lumi-Light (Roche) oder ECL (Amersham); Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂ durch eine Peroxidase. Dieses Licht dient zur Exposition eines Röntgenfilms.

Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen wird mit dem auf Lipidbasis hergestellten Reagenz FuGENE 6 (Roche) durchgeführt. Die angewandten DNA- und Transfektionsreagenz-Mengen richten sich nach den vom Hersteller gemachten Angaben. In Kürze: Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion mit der gewünschten Zelldichte in Standardmedium ausgesät. Am Tag danach erfolgt die Transfektion, die DNA-Lipid Komplexe verbleiben über Nacht im Medium. Am zweiten Tag nach Aussaat der Zellen erfolgt ein Austausch des Standardmediums gegen serumfreies Medium, um Wachstumsfaktoren und andere die Zelle beeinflussende Substanzen zu entfernen, so daß am dritten Tag der entsprechende Assay durchgeführt werden kann.

Stabile Transfektion / Selektion von Zellklonen

Eine stabile Transfektion wird mit dem Ziel durchgeführt, Zellen zu erhalten, die alle ein gewünschtes neues Protein exprimieren. Dazu werden die Zellen zusätzlich zum GOI (gene of interest) mit einem Selektionsmarker transfiziert und anschließend durch ein Antibiotikum einem Selektionsdruck ausgesetzt. Das richtige Verhältnis zwischen GOI und Selektionsmarker (allgemein 4+1 ausreichend) läßt nur Zellen überleben, die auch das GOI exprimieren. Werden die Zellen vor der Selektion dünn genug ausgesät, können nach einiger Zeit Zellklone vereinzelt werden, die in ihrem genetischen Hintergrund sehr ähnlich sind.

Der Vorgang der Transfektion entspricht dem, der im Abschnitt ‚Transfektion eukaryontischer Zellen‘ beschrieben wurde. Die Zellen werden für die stabile Transfektion in 6cm Schalen oder 6-Loch Platten

ausgesät und am Folgetag transfiziert. Für eine spätere Klonierung werden die Zellen am Folgetag trypsiniert und auf fünf bis sechs 15cm Platten verteilt. Die Zugabe des Selektionsantibiotikums erfolgt, nachdem sich die Zellen angeheftet haben. Einzelne Zellklone werden nach der Selektionsphase in 12-Loch Platten überführt und dann mittels Western-Analyse auf die Expression des gewünschten Proteins hin untersucht.

Doxycyclin-induzierbare Genexpression in eukaryontischen Zellen

Die Transfektionen werden nach den Vorgaben des Herstellers mit Fugene6 (Roche) durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion werden $1,5 \times 10^5$ Zellen in einer 6-Loch Schale ausgesät. Die Plasmide pUHG17-1 (rtTA - reverse tetracyclin-controlled transactivator; (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) und pBabe (Puromycin Resistenz) werden im Verhältnis 2,5 μ g:0,5 μ g transfiziert. Am nächsten Tag wird der Ansatz trypsiniert und auf fünf bis sechs 15cm Platten verteilt. Die Selektion erfolgt mit Puromycin (1 μ g/ml). Vereinzelt Klone werden im Anschluß mit dem Luziferase Reporter Plasmid pUHC13-3 transient transfiziert und unter -/+ Doxycyclin Bedingungen (1 μ g/ml; mindestens acht Stunden bis über Nacht) auf die Reporteraktivität untersucht (Doxycyclin ist ein Tetracyclin und aktiviert rtTA). Ausgewählt werden Klone, die eine hohe Induktion mit Doxycyclin bei gleichzeitig vorhandener geringer basaler Aktivität aufweisen.

Ausgewählte rtTA-Klone werden dann mit dem rtTA-abhängigen Expressionsplasmid pUHD10-3 (NF2wt, NF2T272A&D, NF2S518A&D, NF2T576A&D) und pcDNA3 (Geneticin, G418 Resistenz) kotransfiziert. Selektion erfolgt mit 500 μ g/ml G418. Individuelle Klone werden unter -/+ Doxycyclin Bedingungen (1 μ g/ml; mindestens acht Stunden bis über Nacht) im Western blot auf die Expression der entsprechenden Proteine untersucht (NF2 C-18 oder FLAG Ak und Tubulin oder Aktin als Ladekontrolle).

RNA Interferenz

An Tag 1 werden NIH-3T3 Zellen mit einer Dichte von 7.000/cm² in Standardmedium ohne Antibiotika auf 10cm Platten ausgesät (eine Platte Kontroll-siRNA, eine Platte NF2-siRNA). Am zweiten Tag wird die Menge des Mediums reduziert (6well auf 2mL, 10cm Schale auf 4mL) und die siRNA mit Lipofectamine 2000 transfiziert (entsprechend der Vorschrift des Herstellers: 1000pmol siRNA in 0,5mL Opti-MEM, 30 μ L Lipofectamine 2000 in 0,5mL Opti-MEM und Inkubation bei Raumtemperatur für 5min, danach Vereinigung beider Lösungen und Inkubation für 20min bei Raumtemperatur, Transfektionsansatz zu den

Zellen geben). An Tag 4 werden die Zellen trypsiniert und mit einer Dichte von $8 \times 10^4/\text{cm}^2$ in 6cm Schalen ausgesät. An Tag 5 wird das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. An Tag 6 wird der Ras Assay durchgeführt (siehe unten ‚GTPasen-Aktivierungsgrad‘).

Duplex Sequenz mmMerlin (NM_010898, Zielsequenz in Merlin cDNA: bp1482 bis bp1505):

- Sense: 5' UACCGAGCUUCGACAUAUUAUG 3'
- Antisense: 5' AUA AUGUCGAAGCUCGGUAUG 3'

Immunopräzipitation von Proteinen und Proteinkomplexen

Mittels einer Immunopräzipitation (IP) sollen einzelne Proteine oder Proteinkomplexe aus einem Zelllysate isoliert werden. Man verwendet dazu spezifische Antikörper gegen das gewünschte Protein oder gegen molekulare Marker (tags) ektopisch exprimierter Proteine. Diese Immunkomplexe werden dann affinitätsgereinigt und anschließend im Western blot analysiert. Für die Affinitätsreinigung werden an Agarose immobilisiertes Protein A (aus Staphylokokken: gegen Maus IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgA, Kaninchen pAks, Mensch IgG₁, IgG₂ and IgG₄ gerichtet) oder Protein G (aus Streptokokken: gegen Maus IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgG₃, Ratte IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgG_{2c}, Kaninchen und Ziege pAks, Mensch IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄ gerichtet) verwendet (Protein G Plus hat durch eine Mutation die Affinität für BSA verloren). Während der gesamten IP Prozedur ist es erforderlich die Zellen und Lysate auf unter 4°C zu temperieren, um die Aktivität von Proteasen, Kinasen, Phosphatasen usw. zu reduzieren und um Proteinkomplexe zu stabilisieren.

Zellen werden zu Untersuchungen bei hoher Zelldichte mit $1-1,2 \times 10^6$ pro 10cm Schale und bei geringer Zelldichte pro 1-2 15cm Platten ausgesät. Am nächsten Tag wird den Zellen das Serum entzogen und wahlweise Doxycyclin zugefügt. Zwei Tage nach Aussaat werden die Zellen stimuliert (z.B. PDGF, 10ng/ml, 0,5-5min; Hyaluronsäure, 100µg/ml, 0,5-5min) und nach Abschnitt ‚Proteinextraktion & Zellyse‘ aufgeschlossen. Für 15cm Platten wird 1ml Puffer und für 10cm Platten 600µl verwendet. Bei parallelen Ansätzen in unterschiedlichen Plattenformaten wird die gleiche Menge Lysis-Puffer verwendet.

Nach Abtrennen der unlöslichen Bestandteile (14000g, 5min, 4°C) wird ein Zehntel des Lysates abgenommen, welches im folgenden Westernblot als Ladungskontrolle dient. Das Lysat wird mit der gleichen Menge 2x Laemmli Lysis-Puffer versetzt. Das verbleibende Zellpellet wird in der doppelten Menge Lysis-Puffer aufgenommen. Der Rest des Lysates wird mit 2µg des gewünschten Antikörpers versetzt und über 2h

bei 4°C rotiert. Als Kontrolle wird ein äquivalentes Lysat mit 2µg unspezifischem Antikörper versetzt und ebenfalls für 2h inkubiert.

Die für die anschließende Affinitätsreinigung der Proteinkomplexe verwendete Protein A/G plus gekoppelte Agarose (Calbiochem) wird für etwa 30min im entsprechenden Lysis-Puffer äquilibriert (insbesondere bei coIPs notwendig, um die Pufferbedingungen nicht zu verändern). Pro IP werden 20µl Agarosesuspension verwendet und für weitere 1,5h bei 4°C inkubiert.

Nach der Immunokomplex-Bildung erfolgen drei bis vier Waschschriffe mit dem entsprechenden Lysis-Puffer. Die jeweiligen Ansätze werden dazu für 1min bei 5000Upm (Tischzentrifuge, 4°C) zentrifugiert, um die Agarose abzutrennen. Nach Absaugen des Lysis Puffers wird die Agarose in frischem Puffer resuspendiert. Die Zentrifugation sollte nicht bei zu hohen Drehzahlen durchgeführt werden, da dies zu einer stärkeren Verunreinigung führt. Die Agarose wird dabei mit noch vorhandenen ungelösten Bestandteilen zu stark kompaktiert, so daß die anschließenden Waschschriffe weniger effektiv sind. Weiterhin sollte auch bei geringer Drehzahl darauf geachtet werden, daß die Agarose im frischen Puffer ausreichend resuspendiert wird (kurzes Schütteln des Reaktionsgefäßes), um einen wirksamen Austausch unspezifisch gebundener Proteine an den Lysis-Puffer zu gewährleisten. Nach dem letzten Waschschriff wird mittels einer Spritze/Wasserstrahlpumpe und einer Kanüle mit geringem Durchmesser möglichst der gesamte Lysis-Puffer abgesogen. Die Agarose wird dann in 2x Laemmli Puffer aufgenommen und bei -20°C bis zur PAGE aufbewahrt.

GTPasen-Aktivierungsgrad

Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades von GTPasen, also des GTP-Gehaltes, steht momentan nur ein Antikörper gegen Rab6 zur Verfügung (Nizak et al., 2003), so daß für alle anderen GTPasen eine andere Methode verwendet werden muß. Man macht sich dabei zu Nutze, daß GTPasen Effektoren nur an die aktive GTPase binden. Man kann durch Klonierung dieser Effektor-Domänen spezifische Sensoren für einzelne GTPasen generieren. Im Falle von Rho wird die Rho-bindende Domäne (RBD) des Proteins Rhotekin verwendet (Ren et al., 1999), zur Detektion von Ras die Ras-bindende Domäne (RBD) von Raf (de Rooij and Bos, 1997). Diese als GST-Fusion in E. coli rekombinant exprimierten Proteine werden an Glutathion-Agarose gekoppelt und zur Affinitätsreinigung von Rho-GTP oder Ras-GTP eingesetzt.

5,64x10⁵ Zellen werden in Normalmedium auf 15cm Schalen ausgesät (4.000/cm²). Am folgenden Tag wird das Serum entzogen und

wahlweise Doxycyclin zugesetzt. Einen Tag später erfolgt die Stimulation der Zellen (100µg/ml Hyaluronsäure über 0,5-5min) mit anschließender Lyse.

Die Kulturschalen werden vor der Lyse auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse erfolgt in 1ml MLB (siehe ‚Proteinextraktion & Zelllyse‘) und nach Abtrennen unlöslicher Bestandteile (14000g, 5min, 4°C) werden 10% des Lysates als Ladungskontrolle für den Western blot abgenommen und mit der gleichen Menge 2x Laemmli Lysis-Puffer versetzt. Das verbleibende Zellpellet wird in der doppelten Menge Lysis-Puffer aufgenommen. Der Rest des Lysates wird mit 30µl Rhotekin RBD-Agarose oder Raf RBD-Agarose (beide Upstate) versetzt und für 45min bei 4°C rotiert.

Als Kontrollen werden Reaktionen mit künstlich veränderten Lysaten durchgeführt. Dazu werden die GTPasen zweier Lysate mit GDP oder GTP γ S beladen. 0,5ml Lysat wird EDTA zu einer Konzentration von 10mM zugesetzt. Dieses bindet das koordinierende Mg²⁺ der GTPasen, so daß diese Nukleotid-frei vorliegen. Dann wird entweder GDP (Endkonzentration 1mM) oder nicht hydrolysierbares GTP γ S (Endkonzentration 0,1mM) zu den Ansätzen gegeben. In der Zelle liegt eine etwa zehnfach höhere GTP Konzentration vor, so daß durch künstliche Zugabe einer hohen GDP Menge die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, daß die GTPasen nun an GDP binden. Für den anderen Reaktionsansatz reichen daher geringere Mengen an GTP γ S. Nun erfolgt eine Inkubation über 30min bei 30°C und leichtem Schütteln. In den Ansätzen werden die GTPasen nun bevorzugt mit GDP oder GTP γ S beladen. Nach der Inkubation wird der Austausch durch Zugabe von MgCl₂ (Endkonzentration 60mM) gestoppt und die Nukleotide an der GTPase koordiniert (GDP Ansatz sollte kein Signal geben, wogegen im GTP γ S Ansatz verstärkt Rho/Ras an die RBD binden sollte). Die Kontrollen werden dann auch mit 30µl Rhotekin oder Raf RBD-Agarose versetzt und für 45min bei 4°C rotiert.

Die Agarose aller Ansätze wird im Anschluß dreimal mit 0,5ml MLB gewaschen. Dazu die Agarose durch sanfte Zentrifugation (5000Upm, 1min, 4°C) abtrennen, den alten Puffer absaugen und durch neuen ersetzen. Resuspension der Agarose durch Schütteln der Reaktionsgefäße. Nach dem letzten Waschschrift möglichst den kompletten Puffer mit einer Kanüle und Spritze/Wasserstrahlpumpe entfernen und die Agarose in 2x Laemmli Puffer aufnehmen und bis zur PAGE bei -20°C aufbewahren.

Proliferationsanalyse mittels BrdU-Inkorporation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wird der Einbau des Thymidin-Analogs, Bromodeoxyuridin (BrdU) in die DNA während der S-Phase detektiert. Die Visualisierung erfolgt immunozytochemisch mittels eines biotinylierten Maus anti-BrdU Primärantikörpers, Streptavidin-gekoppelter Peroxidase und anschließender Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB), so daß die Kerne proliferierender Zellen dunkelbraun erscheinen. Es wird der BrdU Staining Kit der Firma Oncogene (Cat#HSC24) verwendet.

Der Ablauf der Prozedur richtet sich nach den Vorgaben des Herstellers, in Kürze: Zellen werden in Standardmedium auf Glascoverslips (Durchmesser 12mm) ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium gegen DMEM+1% FCS ausgetauscht. Eine HA- und Doxycyclin-Inkubation wird ebenfalls am Folgetag nach der Aussaat begonnen und über Nacht durchgeführt. Die Markierung der Zellen erfolgt mit 50µM BrdU über 2h (BrdU Stammlösung in Wasser). Danach werden die Zellen mit 98% Ethanol (5min, -20°C) und anschließend Aceton (5min, -20°C) fixiert und denaturiert. Die Markierung wird mit einem biotinylierten Maus anti-BrdU Antikörper und Streptavidin-gekoppelter Peroxidase durchgeführt. Durch eine DAB-Umsetzung werden die proliferierenden Zellen visualisiert (dunkelbraun), die sich nicht teilenden Zellen werden mit Hämatoxylin gegengefärbt (violett). Die Proliferation wird als Prozentsatz der sich teilenden Zellen von der Gesamtkultur angegeben.

In vitro Transformationsanalyse (Wachstum in Weichagar)

Nach Trypsinierung werden die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert und gezählt. 1×10^4 Zellen werden in 3,2mL DMEM plus 0,4mL FCS resuspendiert. Die Hälfte dieses Ansatzes wird mit Doxycyclin versetzt. Zu jedem Ansatz werden danach 0,2mL erhitzter Weichagar (3,3% Stammlösung) gegeben. Nach kurzer Durchmischung werden 0,5mL Aliquots in 24-Loch Schalen plattiert und für zwei Minuten bei 4°C abgekühlt. Die Koloniebildung wird nach 10d ausgewertet.

In vitro Transformationsanalyse (Fokusbildung)

Während des Entartungs-/Transformationsprozeß einer normalen Zelle hin zur Tumorzelle erwirbt die Zelle die Fähigkeit in Zellkultur in mehreren Schichten zu wachsen. Nicht-transformierte Zellen bilden dagegen eine Ein-Zell Schicht. Da dieses Schichtwachstum nicht gleichförmig geschieht, sondern in einzelnen Herden, bilden sich nach

einiger Zeit die namensgebenden Fokusse aus. Dieses Modellsystem wurde z.B. zur Studie von Karzinogenen oder Tumorzellen eingesetzt (Cooper et al., 1980; Copeland et al., 1979).

Zellen werden mit einer Dichte von $1-1,2 \times 10^6$ Zellen pro 10cm Schale in Standardmedium ausgesät. Am Folgetag erfolgt die Zugabe von Doxycyclin. Zwei Tage später wird der Serumgehalt auf 5% FCS reduziert und erneut frisches Doxycyclin zugegeben. Das Medium wird nun alle zwei Tage über einen Zeitraum von 10-15d gewechselt (der Versuchszeitraum hängt von der Varianz der verwendeten Klone ab). Die Fokusbildung wird mikroskopisch mit einer 10x Linse untersucht.

Immunzytochemie

Die Zellen werden zu Untersuchungen bei geringer Zelldichte mit etwa $3000/\text{cm}^2$ und bei hoher Zelldichte mit etwa $20000/\text{cm}^2$ auf sterilen Deckgläsern ausgesät. Nach der Versuchsdurchführung werden die Zellen nach folgender Prozedur behandelt: Nach Absaugen des Kulturmediums erfolgt die Fixierung mit erwärmtem (37°C) Paraformaldehyd (4% in modifiziertem CB: 10mM PIPES, pH 7, 150mM NaCl, 5mM EGTA, 5mM MgCl_2 , 5mM Glucose) für 20min. Danach wird zweimal mit PBS/BSA (PBS mit einer Spur BSA, um die Deckgläser besser zu benetzen und ein Austrocknen der Proben zu verhindern) gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgt mit 0,05% Triton[®]X-100 in PBS für 1min. Nach viermaligem Waschen mit PBS/BSA und erfolgt das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS (140mM NaCl, 2,6mM KCl, 8,3mM Na_2HPO_4 , 1,5mM KH_2PO_4 , pH 7,4) für 30min. Danach wird die Primärantikörperinkubation für 1h durchgeführt. 15 μl Antikörperlösung werden auf Parafilm auftragen und die Deckgläser in einer Kammer mit humider Atmosphäre inkubiert (den Parafilm auf einen feuchten Filter platzieren, um so das Verdunsten der Ak-Lösung zu verhindern). Der Sekundärantikörper und Fluorochrom-gekoppeltes Phalloidin wird dagegen für 30min appliziert (da die Fluorochrome durch die Wirkung von sichtbarem Licht und UV-Strahlung ausbleichen, wird die Inkubation im Dunkeln durchgeführt). Vor und nach der Anwendung des Sekundärantikörpers wird zwei- bis dreimal mit PBS/BSA gewaschen. Dazu werden die Proben jeweils für 10min auf einen Schwenktisch gestellt. Die Präparate werden zuletzt mit ProLong[™] Antifade (Molecular Probe) Medium oder PVA (20% Polyvinylalkohol in PBS pH 7,2-7,4 (16h Rühren bei $50-60^\circ\text{C}$) dann 1 : 1 mit Glycerin mischen und warm filtrieren, bei 4°C lagern) auf Objektträgern fixiert und bei 4°C aufbewahrt (Mies et al., 1998; Osborn, 1998). Die Untersuchungen werden an einem inversen Laserscanning Mikroskop von Zeiss durchgeführt (Typ Axiovert 200M mit LSM 510 Meta und Software LSM 510 V.3.2 SP2). Das Mikroskop ist mit einem Argon-Laser

(458/477/488/514nm) und zwei Helium-Neon-Lasern (543/633nm) ausgerüstet.

Analysesoftware und Onlinetools

Zur Bildbearbeitung wird Adobe Photoshop 7.0 verwendet. Die Intensitätsbestimmung von Western Blot Banden erfolgt mit ImageJ. Zur DNA Analyse wie Sequenzierungen oder Alignments wird das Paket DNASTar von Lasergene benutzt (Seqman II, EditSeq). Protein Alignments werden mit MegAlign (DNASTar) generiert. Protein- und DNA-Datenbankeinträge werden über PubMed bezogen. Die Vorhersage der Phosphorylierungsstellen in Merlin wird mit Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) und NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) durchgeführt. Eine Berechnung von Proteinmodifikationen auf Basis der MS-Peptidmassen erfolgt mit FindMod auf dem ExPASy Server.

Literatur

Abercrombie, M., and Heaysman, J. E. (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* 6, 293-306.

Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A., and Tilbrook, P. A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267, 20033-20038.

Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J., and McCormick, F. (1988). Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* 240, 518-521.

Alfthan, K., Heiska, L., Gronholm, M., Renkema, G. H., and Carpen, O. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization. *J Biol Chem* 279, 18559-18566.

Arakawa, H., Hayashi, N., Nagase, H., Ogawa, M., and Nakamura, Y. (1994). Alternative splicing of the NF2 gene and its mutation analysis of breast and colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 3, 565-568.

Archer, S. Y., and Hodin, R. A. (1999). Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9, 171-174.

Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J., and Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.

Arthur, W. T., Petch, L. A., and Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10, 719-722.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., and Moore, D. D., eds. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).

Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851-859.

- Bansal, R., and Pfeiffer, S. E. (1987). Regulated galactolipid synthesis and cell surface expression in Schwann cell line D6P2T. *J Neurochem* *49*, 1902-1911.
- Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* *103*, 227-238.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* *56*, 779-827.
- Bargmann, C. I., Hung, M. C., and Weinberg, R. A. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* *45*, 649-657.
- Bashour, A. M., Meng, J. J., Ip, W., MacCollin, M., and Ratner, N. (2002). The neurofibromatosis type 2 gene product, merlin, reverses the F-actin cytoskeletal defects in primary human Schwannoma cells. *Mol Cell Biol* *22*, 1150-1157.
- Basu, T. N., Gutmann, D. H., Fletcher, J. A., Glover, T. W., Collins, F. S., and Downward, J. (1992). Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* *356*, 713-715.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* *1603*, 47-82.
- Bianchi, A. B., Hara, T., Ramesh, V., Gao, J., Klein-Szanto, A. J., Morin, F., Menon, A. G., Trofatter, J. A., Gusella, J. F., Seizinger, B. R., and et al. (1994). Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types. *Nat Genet* *6*, 185-192.
- Bianchi, A. B., Mitsunaga, S. I., Cheng, J. Q., Klein, W. M., Jhanwar, S. C., Seizinger, B., Kley, N., Klein-Szanto, A. J., and Testa, J. R. (1995). High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 10854-10858.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* *348 Pt 2*, 241-255.
- Bloom, L., and Horvitz, H. R. (1997). The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3414-3419.

Bocchetta, M., and Carbone, M. (2004). Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene* 23, 6484-6491.

Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K., and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238, 1386-1392.

Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R., and Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279, 26991-27007.

Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Zhu, H., and Diedrich, F. (2003). Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem* 278, 29420-29434.

Brault, E., Gautreau, A., Lamarine, M., Callebaut, I., Thomas, G., and Goutebroze, L. (2001). Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. *J Cell Sci* 114, 1901-1912.

Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R. G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 586-599.

Bruder, C. E., Hirvela, C., Tapia-Paez, I., Fransson, I., Segraves, R., Hamilton, G., Zhang, X. X., Evans, D. G., Wallace, A. J., Baser, M. E., *et al.* (2001). High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum Mol Genet* 10, 271-282.

Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.

Cales, C., Hancock, J. F., Marshall, C. J., and Hall, A. (1988). The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature* 332, 548-551.

Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M., and Christofori, G. (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 3, 650-657.

Cawthon, R. M., Weiss, R., Xu, G. F., Viskochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P., and et al. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62, 193-201.

Celis, J. E., ed. (1998). *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (Academic Press).

Cheng, J. Q., Lee, W. C., Klein, M. A., Cheng, G. Z., Jhanwar, S. C., and Testa, J. R. (1999). Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 238-242.

Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., *et al.* (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23, 281-282.

Cichowski, K., and Jacks, T. (2001). NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104, 593-604.

Clark, E. A., and Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.

Colman, S. D., and Wallace, M. R. (1994). Neurofibromatosis type 1. *Eur J Cancer* 30A, 1974-1981.

Comoglio, P. M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15, 565-571.

Cooper, G. M., Okenquist, S., and Silverman, L. (1980). Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells. *Nature* 284, 418-421.

Copeland, N. G., Zelenetz, A. D., and Cooper, G. M. (1979). Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell* 17, 993-1002.

Davis, J. B., and Stroobant, P. (1990). Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 110, 1353-1360.

Davis, P. K., and Brackmann, R. K. (2003). Chromatin remodeling and cancer. *Cancer Biol Ther* 2, 22-29.

- de Rooij, J., and Bos, J. L. (1997). Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14, 623-625.
- de Vries-Smits, A. M., Burgering, B. M., Leever, S. J., Marshall, C. J., and Bos, J. L. (1992). Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357, 602-604.
- Deguen, B., Goutebroze, L., Giovannini, M., Boisson, C., van der Neut, R., Jaurand, M. C., and Thomas, G. (1998). Heterogeneity of mesothelioma cell lines as defined by altered genomic structure and expression of the NF2 gene. *Int J Cancer* 77, 554-560.
- den Bakker, M. A., Riegman, P. H., Hekman, R. A., Boersma, W., Janssen, P. J., van der Kwast, T. H., and Zwarthoff, E. C. (1995a). The product of the NF2 tumour suppressor gene localizes near the plasma membrane and is highly expressed in muscle cells. *Oncogene* 10, 757-763.
- den Bakker, M. A., Tascilar, M., Riegman, P. H., Hekman, A. C., Boersma, W., Janssen, P. J., de Jong, T. A., Hendriks, W., van der Kwast, T. H., and Zwarthoff, E. C. (1995b). Neurofibromatosis type 2 protein co-localizes with elements of the cytoskeleton. *Am J Pathol* 147, 1339-1349.
- den Bakker, M. A., Vissers, K. J., Molijn, A. C., Kros, J. M., Zwarthoff, E. C., and van der Kwast, T. H. (1999). Expression of the neurofibromatosis type 2 gene in human tissues. *J Histochem Cytochem* 47, 1471-1480.
- Denisenko-Nehrbass, N., Goutebroze, L., Galvez, T., Bonnon, C., Stankoff, B., Ezan, P., Giovannini, M., Faivre-Sarrailh, C., and Girault, J. A. (2003). Association of Caspr/paranodin with tumour suppressor schwannomin/merlin and beta1 integrin in the central nervous system. *J Neurochem* 84, 209-221.
- Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A., and Antoniades, H. N. (1983). Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221, 275-277.
- Dumanski, J. P., Carlom, E., Collins, V. P., and Nordenskjold, M. (1987). Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9275-9279.
- Evans, D. G., Sainio, M., and Baser, M. E. (2000). Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet* 37, 897-904.

- Faudoa, R., Xue, Z., Lee, F., Baser, M. E., and Hung, G. (2000). Detection of novel NF2 mutations by an RNA mismatch cleavage method. *Hum Mutat* *15*, 474-478.
- Fernandez-Valle, C., Tang, Y., Ricard, J., Rodenas-Ruano, A., Taylor, A., Hackler, E., Biggerstaff, J., and Iacovelli, J. (2002). Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat Genet* *31*, 354-362.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* *3*, 453-458.
- Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., and Arpin, M. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* *164*, 653-659.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* *57*, 1083-1093.
- Frost, J. A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., and Cobb, M. H. (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* *16*, 6426-6438.
- Fukasawa, T., Chong, J. M., Sakurai, S., Koshiishi, N., Ikeno, R., Tanaka, A., Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Koike, M., and Fukayama, M. (2000). Allelic loss of 14q and 22q, NF2 mutation, and genetic instability occur independently of c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Cancer Res* *91*, 1241-1249.
- Gary, R., and Bretscher, A. (1995). Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* *6*, 1061-1075.
- Gautreau, A., Pouillet, P., Louvard, D., and Arpin, M. (1999). Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7300-7305.
- Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Dixon, R. A., and Vogel, U. S. (1990). Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein (GAP). *J Biol Chem* *265*, 20437-20442.

Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R., and Feinberg, A. P. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228, 187-190.

Gonzalez-Agosti, C., Wiederhold, T., Herndon, M. E., Gusella, J., and Ramesh, V. (1999). Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem* 274, 34438-34442.

Gonzalez-Agosti, C., Xu, L., Pinney, D., Beauchamp, R., Hobbs, W., Gusella, J., and Ramesh, V. (1996). The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 13, 1239-1247.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.

Goutebroze, L., Brault, E., Muchardt, C., Camonis, J., and Thomas, G. (2000). Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* 20, 1699-1712.

Grewal, S. I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., and et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589-600.

Gronholm, M., Sainio, M., Zhao, F., Heiska, L., Vaheri, A., and Carpen, O. (1999). Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 895-904.

Grootjans, J. J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Durr, J., and David, G. (1997). Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13683-13688.

Gu, Y., Turck, C. W., and Morgan, D. O. (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710.

Gusella, J. F., Ramesh, V., MacCollin, M., and Jacoby, L. B. (1996). Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Curr Opin Genet Dev* 6, 87-92.

Gusella, J. F., Ramesh, V., MacCollin, M., and Jacoby, L. B. (1999). Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1423, M29-36.

Gutmann, D. H., Geist, R. T., Xu, H., Kim, J. S., and Saporito-Irwin, S. (1998). Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum Mol Genet* 7, 335-345.

Gutmann, D. H., Hirbe, A. C., and Haipek, C. A. (2001). Functional analysis of neurofibromatosis 2 (NF2) missense mutations. *Hum Mol Genet* 10, 1519-1529.

Gutmann, D. H., Sherman, L., Seftor, L., Haipek, C., Hoang Lu, K., and Hendrix, M. (1999). Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet* 8, 267-275.

Hake, S. B., Xiao, A., and Allis, C. D. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 90, 761-769.

Hakimi, M. A., Speicher, D. W., and Shiekhattar, R. (2002). The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J Biol Chem* 277, 36909-36912.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hancock, J. F., and Hall, A. (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *Embo J* 12, 1915-1921.

Hara, T., Bianchi, A. B., Seizinger, B. R., and Kley, N. (1994). Molecular cloning and characterization of alternatively spliced transcripts of the mouse neurofibromatosis 2 gene. *Cancer Res* 54, 330-335.

Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 30-40.

Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosveld, G. (1983). Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* *306*, 239-242.

Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* *9*, 1295-1304.

Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., and Tsukita, S. (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* *135*, 37-51.

Hitotsumatsu, T., Kitamoto, T., Iwaki, T., Fukui, M., and Tateishi, J. (1994). An exon 8-spliced out transcript of neurofibromatosis 2 gene is constitutively expressed in various human tissues. *J Biochem (Tokyo)* *116*, 1205-1207.

Holley, R. W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* *258*, 487-490.

Holley, R. W., and Kiernan, J. A. (1968). "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *60*, 300-304.

Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C. J. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* *71*, 335-342.

Hu, K. Q., and Settleman, J. (1997). Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *Embo J* *16*, 473-483.

Huang, L., Ichimaru, E., Pestonjamas, K., Cui, X., Nakamura, H., Lo, G. Y., Lin, F. I., Luna, E. J., and Furthmayr, H. (1998). Merlin differs from moesin in binding to F-actin and in its intra- and intermolecular interactions. *Biochem Biophys Res Commun* *248*, 548-553.

Hung, G., Colton, J., Fisher, L., Oppenheimer, M., Faudoa, R., Slattery, W., and Linthicum, F. (2002). Immunohistochemistry study of human vestibular nerve schwannoma differentiation. *Glia* *38*, 363-370.

Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* *88*, 333-346.

Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* *100*, 113-127.

- Huynh, D. P., Nechiporuk, T., and Pulst, S. M. (1994). Alternative transcripts in the mouse neurofibromatosis type 2 (NF2) gene are conserved and code for schwannomins with distinct C-terminal domains. *Hum Mol Genet* 3, 1075-1079.
- Huynh, D. P., and Pulst, S. M. (1996). Neurofibromatosis 2 antisense oligodeoxynucleotides induce reversible inhibition of schwannomin synthesis and cell adhesion in STS26T and T98G cells. *Oncogene* 13, 73-84.
- Imada, M., and Sueoka, N. (1978). Clonal sublines of rat neurotumor RT4 and cell differentiation. I. Isolation and characterization of cell lines and cell type conversion. *Dev Biol* 66, 97-108.
- Ishikawa, H., Tamura, A., Matsui, T., Sasaki, H., Hakoshima, T., and Tsukita, S. (2001). Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy. *J Mol Biol* 310, 973-978.
- James, M. F., Manchanda, N., Gonzalez-Agosti, C., Hartwig, J. H., and Ramesh, V. (2001). The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J* 356, 377-386.
- Jannatipour, M., Dion, P., Khan, S., Jindal, H., Fan, X., Laganier, J., Chishti, A. H., and Rouleau, G. A. (2001). Schwannomin isoform-1 interacts with syntenin via PDZ domains. *J Biol Chem* 276, 33093-33100.
- Joslyn, G., Carlson, M., Thliveris, A., Albertsen, H., Gelbert, L., Samowitz, W., Groden, J., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., and et al. (1991). Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66, 601-613.
- Kaempchen, K., Mielke, K., Utermark, T., Langmesser, S., and Hanemann, C. O. (2003). Upregulation of the Rac1/JNK signaling pathway in primary human schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 12, 1211-1221.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.
- Kang, B. S., Cooper, D. R., Devedjiev, Y., Derewenda, U., and Derewenda, Z. S. (2002). The structure of the FERM domain of merlin, the

neurofibromatosis type 2 gene product. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *58*, 381-391.

Kang, Y., and Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* *118*, 277-279.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* *270*, 16483-16486.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 893-905.

Khanna, C., Wan, X., Bose, S., Cassaday, R., Olomu, O., Mendoza, A., Yeung, C., Gorlick, R., Hewitt, S. M., and Helman, L. J. (2004). The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* *10*, 182-186.

Khosravi-Far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S., and Der, C. J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* *15*, 6443-6453.

Kim, H., Lim, J. Y., Kim, Y. H., Park, S. H., Lee, K. H., Han, H., Jeun, S. S., Lee, J. H., and Rha, H. K. (2002). Inhibition of ras-mediated activator protein 1 activity and cell growth by merlin. *Mol Cells* *14*, 108-114.

Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159-170.

Kissil, J. L., Johnson, K. C., Eckman, M. S., and Jacks, T. (2002). Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization. *J Biol Chem* *277*, 10394-10399.

Kissil, J. L., Wilker, E. W., Johnson, K. C., Eckman, M. S., Yaffe, M. B., and Jacks, T. (2003). Merlin, the product of the Nf2 tumor suppressor gene, is an inhibitor of the p21-activated kinase, Pak1. *Mol Cell* *12*, 841-849.

Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10914-10921.

Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 820-823.

Koehler, J. A., and Moran, M. F. (2001). Regulation of extracellular signal-regulated kinase activity by p120 RasGAP does not involve its pleckstrin homology or calcium-dependent lipid binding domains but

does require these domains to regulate cell proliferation. *Cell Growth Differ* 12, 551-561.

Koga, H., Araki, N., Takeshima, H., Nishi, T., Hirota, T., Kimura, Y., Nakao, M., and Saya, H. (1998). Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17, 801-810.

Korn, E. D., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238, 638-644.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15, 1942-1952.

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

Lallemant, D., Curto, M., Saotome, I., Giovannini, M., and McClatchey, A. I. (2003). NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 17, 1090-1100.

Lamb, R. F., Ozanne, B. W., Roy, C., McGarry, L., Stipp, C., Mangeat, P., and Jay, D. G. (1997). Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol* 7, 682-688.

Lancaster, C. A., Taylor-Harris, P. M., Self, A. J., Brill, S., van Erp, H. E., and Hall, A. (1994). Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem* 269, 1137-1142.

Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T., and Isacke, C. M. (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* 4, 399-407.

Lekanne Deprez, R. H., Bianchi, A. B., Groen, N. A., Seizinger, B. R., Hagemeyer, A., van Drunen, E., Bootsma, D., Koper, J. W., Avezaat, C. J., Kley, N., and et al. (1994). Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 54, 1022-1029.

Lim, J. Y., Kim, H., Kim, Y. H., Kim, S. W., Huh, P. W., Lee, K. H., Jeun, S. S., Rha, H. K., and Kang, J. K. (2003). Merlin suppresses the SRE-dependent transcription by inhibiting the activation of Ras-ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 238-245.

- Lozano, E., Betson, M., and Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* 25, 452-463.
- Lutchman, M., and Rouleau, G. A. (1995). The neurofibromatosis type 2 gene product, schwannomin, suppresses growth of NIH 3T3 cells. *Cancer Res* 55, 2270-2274.
- Lutchman, M., and Rouleau, G. A. (1996). Neurofibromatosis type 2: a new mechanism of tumor suppression. *Trends Neurosci* 19, 373-377.
- Maeda, M., Matsui, T., Imamura, M., and Tsukita, S. (1999). Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene* 18, 4788-4797.
- Magendantz, M., Henry, M. D., Lander, A., and Solomon, F. (1995). Interdomain interactions of radixin in vitro. *J Biol Chem* 270, 25324-25327.
- Manchanda, N., Lyubimova, A., Ho, H. Y., James, M. F., Gusella, J. F., Ramesh, N., Snapper, S. B., and Ramesh, V. (2005). The NF2 tumor suppressor merlin and the ERM proteins interact with N-wasp and regulate its actin polymerization function. *J Biol Chem*.
- Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.
- Martin, G. A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P. C., Crosier, W. J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., Cawthon, R. M., and et al. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63, 843-849.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140, 647-657.
- McClatchey, A. I. (2003). Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nat Rev Cancer* 3, 877-883.
- McClatchey, A. I., Saotome, I., Mercer, K., Crowley, D., Gusella, J. F., Bronson, R. T., and Jacks, T. (1998). Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev* 12, 1121-1133.

McCormick, F. (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* 9, M53-56.

Meng, J. J., Lowrie, D. J., Sun, H., Dorsey, E., Pelton, P. D., Bashour, A. M., Groden, J., Ratner, N., and Ip, W. (2000). Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J Neurosci Res* 62, 491-502.

Mies, B., Rottner, K., and Small, J. V. (1998). Multiple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton, In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, J. E. Celis, ed. (Academic Press), pp. 469-476.

Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391, 93-96.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.

Miranti, C. K., and Brugge, J. S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, E83-90.

Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* 9, 293-311.

Molloy, C. J., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Marshall, M. S., Gibbs, J. B., and Aaronson, S. A. (1989). PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* 342, 711-714.

Moran, M. F., Polakis, P., McCormick, F., Pawson, T., and Ellis, C. (1991). Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 11, 1804-1812.

Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C. A., Gutmann, D. H., Ponta, H., and Herrlich, P. (2001). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 15, 968-980.

Morrison, H., Sperka, A., Saleh, H., Hongchuan, J., Manent, J., Giovannini, M., Ponta, H., and Herrlich, P. (2005). A superswitch turning off mitogenic stimuli: the tumor suppressor protein merlin (NF2) interferes with the ezrin-dependent cytoskeletal organization of signalling components; submitted.

- Muranen, T., Gronholm, M., Renkema, G. H., and Carpen, O. (2005). Cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling of the neurofibromatosis 2 tumour suppressor merlin. *Oncogene* 24, 1150-1158.
- Murthy, A., Gonzalez-Agosti, C., Cordero, E., Pinney, D., Candia, C., Solomon, F., Gusella, J., and Ramesh, V. (1998). NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 273, 1273-1276.
- Nagy, R., Sweet, K., and Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23, 6445-6470.
- Nakamura, F., Huang, L., Pestonjamas, K., Luna, E. J., and Furthmayr, H. (1999). Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol Biol Cell* 10, 2669-2685.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W. E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P. J., Bastiaens, P. I., and Parker, P. J. (2001). Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *Embo J* 20, 2723-2741.
- Nguyen, R., Reczek, D., and Bretscher, A. (2001). Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *J Biol Chem* 276, 7621-7629.
- Nikitin, A., Ballering, L. A., Lyons, J., and Rajewsky, M. F. (1991). Early mutation of the neu (erbB-2) gene during ethylnitrosourea-induced oncogenesis in the rat Schwann cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9939-9943.
- Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 300, 984-987.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

- Noren, N. K., Arthur, W. T., and Burridge, K. (2003). Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem* 278, 13615-13618.
- Obremski, V. J., Hall, A. M., and Fernandez-Valle, C. (1998). Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 37, 487-501.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11, 545-554.
- Olson, M. F., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394, 295-299.
- Osborn, M. (1998). Immunofluorescence Microscopy of cultured cells, In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, J. E. Celis, ed. (Academic Press), pp. 462-468.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506.
- Parry, D. M., MacCollin, M. M., Kaiser-Kupfer, M. I., Pulaski, K., Nicholson, H. S., Bolesta, M., Eldridge, R., and Gusella, J. F. (1996). Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet* 59, 529-539.
- Pawlak, G., and Helfman, D. M. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 41-47.
- Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P. A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101, 259-270.
- Pelton, P. D., Sherman, L. S., Rizvi, T. A., Marchionni, M. A., Wood, P., Friedman, R. A., and Ratner, N. (1998). Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* 17, 2195-2209.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.
- Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., and Elias, L. (1998). Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 273, 7594-7603.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.

Pujuguet, P., Del Maestro, L., Gautreau, A., Louvard, D., and Arpin, M. (2003). Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 14, 2181-2191.

Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995a). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459.

Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995b). A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11781-11785.

Rafelski, S. M., and Theriot, J. A. (2004). Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73, 209-239.

Reczek, D., and Bretscher, A. (1998). The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem* 273, 18452-18458.

Ren, X. D., Kiosses, W. B., and Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J* 18, 578-585.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L., and Wolffe, A. P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25, 338-342.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.

Rong, R., Surace, E. I., Haipek, C. A., Gutmann, D. H., and Ye, K. (2004a). Serine 518 phosphorylation modulates merlin intramolecular

association and binding to critical effectors important for NF2 growth suppression. *Oncogene* 23, 8447-8454.

Rong, R., Tang, X., Gutmann, D. H., and Ye, K. (2004b). Neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor merlin inhibits phosphatidylinositol 3-kinase through binding to PIKE-L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18200-18205.

Roos, K. L., and Dunn, D. W. (1992). Neurofibromatoses. *CA Cancer J Clin* 42, 241-254.

Rosenbaum, C., Kluwe, L., Mautner, V. F., Friedrich, R. E., Muller, H. W., and Hanemann, C. O. (1998). Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol Dis* 5, 55-64.

Rouleau, G. A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B., and et al. (1993). Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363, 515-521.

Rouleau, G. A., Wertelecki, W., Haines, J. L., Hobbs, W. J., Trofatter, J. A., Seizinger, B. R., Martuza, R. L., Superneau, D. W., Conneally, P. M., and Gusella, J. F. (1987). Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329, 246-248.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.

Ruggieri, M., and Huson, S. M. (1999). The neurofibromatoses. An overview. *Ital J Neurol Sci* 20, 89-108.

Ruttledge, M. H., Andermann, A. A., Phelan, C. M., Claudio, J. O., Han, F. Y., Chretien, N., Rangaratnam, S., MacCollin, M., Short, P., Parry, D., et al. (1996). Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am J Hum Genet* 59, 331-342.

Ruttledge, M. H., Sarrazin, J., Rangaratnam, S., Phelan, C. M., Twist, E., Merel, P., Delattre, O., Thomas, G., Nordenskjold, M., Collins, V. P., and et al. (1994). Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6, 180-184.

Sainio, M., Zhao, F., Heiska, L., Turunen, O., den Bakker, M., Zwarthoff, E., Lutchman, M., Rouleau, G. A., Jaaskelainen, J., Vaheri, A., and

Carpen, O. (1997). Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* 110 (Pt 18), 2249-2260.

Sambrook, J., and Russel, D. W., eds. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147, 1009-1022.

Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., and Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143, 1385-1398.

Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S., and Kaziro, Y. (1990). Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5993-5997.

Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.

Scherer, S. S., and Gutmann, D. H. (1996). Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells. *J Neurosci Res* 46, 595-605.

Schlichting, I., Rapp, G., John, J., Wittinghofer, A., Pai, E. F., and Goody, R. S. (1989). Biochemical and crystallographic characterization of a complex of c-Ha-ras p21 and caged GTP with flash photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7687-7690.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.

Schmucker, B., Ballhausen, W. G., and Kressel, M. (1997). Subcellular localization and expression pattern of the neurofibromatosis type 2 protein merlin/schwannomin. *Eur J Cell Biol* 72, 46-53.

Schmucker, B., Tang, Y., and Kressel, M. (1999). Novel alternatively spliced isoforms of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor are

targeted to the nucleus and cytoplasmic granules. *Hum Mol Genet* 8, 1561-1570.

Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W., and Brandt, B. L. (1974). Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-227.

Schwartz, M. A., and Ginsberg, M. H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4, E65-68.

Schweins, T., Scheffzek, K., Assheuer, R., and Wittinghofer, A. (1997). The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn²⁺ versus Mg²⁺. *J Mol Biol* 266, 847-856.

Scoles, D. R., Huynh, D. P., Morcos, P. A., Coulsell, E. R., Robinson, N. G., Tamanoi, F., and Pulst, S. M. (1998). Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nat Genet* 18, 354-359.

Seger, R., and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-735.

Seizinger, B. R., de la Monte, S., Atkins, L., Gusella, J. F., and Martuza, R. L. (1987). Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5419-5423.

Seizinger, B. R., Martuza, R. L., and Gusella, J. F. (1986). Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322, 644-647.

Sekido, Y., Pass, H. I., Bader, S., Mew, D. J., Christman, M. F., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1995). Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 55, 1227-1231.

Self, A. J., and Hall, A. (1995a). Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol* 256, 67-76.

Self, A. J., and Hall, A. (1995b). Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 256, 3-10.

Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.

Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L. C., and Weinberg, R. A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190:

implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 69, 539-549.

Shaw, R. J., McClatchey, A. I., and Jacks, T. (1998). Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem* 273, 7757-7764.

Shaw, R. J., Paez, J. G., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W. M., Saotome, I., O'Bryan, J. P., Gupta, V., Ratner, N., Der, C. J., *et al.* (2001). The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* 1, 63-72.

Shenolikar, S., and Weinman, E. J. (2001). NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F389-395.

Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* 12, 1058-1071.

Sherman, L., Xu, H. M., Geist, R. T., Saporito-Irwin, S., Howells, N., Ponta, H., Herrlich, P., and Gutmann, D. H. (1997). Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 15, 2505-2509.

Sherman, L. S., and Gutmann, D. H. (2001). Merlin: hanging tumor suppression on the Rac. *Trends Cell Biol* 11, 442-444.

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.

Shimizu, T., Seto, A., Maita, N., Hamada, K., Tsukita, S., and Hakoshima, T. (2002). Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain. *J Biol Chem* 277, 10332-10336.

Simons, P. C., Pietromonaco, S. F., Reczek, D., Bretscher, A., and Elias, L. (1998). C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 561-565.

Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P., and Ponta, H. (1996a). Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* 135, 1139-1150.

Sleeman, J. P., Arming, S., Moll, J. F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L. S., Kreil, G., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996b). Hyaluronate-

independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 56, 3134-3141.

Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12, 112-120.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159-169.

Stemmer-Rachamimov, A. O., Gonzalez-Agosti, C., Xu, L., Burwick, J. A., Beauchamp, R., Pinney, D., Louis, D. N., and Ramesh, V. (1997). Expression of NF2-encoded merlin and related ERM family proteins in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 735-742.

Stokowski, R. P., and Cox, D. R. (2000). Functional analysis of the neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet* 66, 873-891.

Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G. (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 14, 303-311.

Su, L. K., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-1737.

Sun, C. X., Haipek, C., Scoles, D. R., Pulst, S. M., Giovannini, M., Komada, M., and Gutmann, D. H. (2002). Functional analysis of the relationship between the neurofibromatosis 2 tumor suppressor and its binding partner, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Hum Mol Genet* 11, 3167-3178.

Surace, E. I., Haipek, C. A., and Gutmann, D. H. (2004). Effect of merlin phosphorylation on neurofibromatosis 2 (NF2) gene function. *Oncogene* 23, 580-587.

Taylor, A. R., Geden, S. E., and Fernandez-Valle, C. (2003). Formation of a beta1 integrin signaling complex in Schwann cells is independent of rho. *Glia* 41, 94-104.

Tikoo, A., Czekay, S., Viars, C., White, S., Heath, J. K., Arden, K., and Maruta, H. (2000). p190-A, a human tumor suppressor gene, maps to the chromosomal region 19q13.3 that is reportedly deleted in some gliomas. *Gene* 257, 23-31.

- Tikoo, A., Varga, M., Ramesh, V., Gusella, J., and Maruta, H. (1994). An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J Biol Chem* 269, 23387-23390.
- Tomozawa, Y., and Sueoka, N. (1978). In vitro segregation of different cell lines with neuronal and glial properties from a stem cell line of rat neurotumor RT4. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 6305-6309.
- Trahey, M., and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.
- Tran Quang, C., Gautreau, A., Arpin, M., and Treisman, R. (2000). Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *Embo J* 19, 4565-4576.
- Trofatter, J. A., MacCollin, M. M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M. P., Parry, D. M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A. G., Pulaski, K., and et al. (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 75, 826.
- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-654.
- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H., and Sabe, H. (2002). Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* 159, 673-683.
- Tsuda, M., Makino, Y., Iwahara, T., Nishihara, H., Sawa, H., Nagashima, K., Hanafusa, H., and Tanaka, S. (2004). Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279, 46843-46850.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., and Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401.
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2, E231-236.
- Turunen, O., Sainio, M., Jaaskelainen, J., Carpen, O., and Vaheri, A. (1998). Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta* 1387, 1-16.

Turunen, O., Wahlstrom, T., and Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* *126*, 1445-1453.

Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., and Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* *265*, 9373-9380.

Ueki, K., Wen-Bin, C., Narita, Y., Asai, A., and Kirino, T. (1999). Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* *59*, 5995-5998.

Utermark, T., Kaempchen, K., and Hanemann, C. O. (2003). Pathological adhesion of primary human schwannoma cells is dependent on altered expression of integrins. *Brain Pathol* *13*, 352-363.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* *11*, 2295-2322.

van der Geer, P., Henkemeyer, M., Jacks, T., and Pawson, T. (1997). Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap. *Mol Cell Biol* *17*, 1840-1847.

Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299-1304.

Viskochil, D., Buchberg, A. M., Xu, G., Cawthon, R. M., Stevens, J., Wolff, R. K., Culver, M., Carey, J. C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and et al. (1990). Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* *62*, 187-192.

Vogel, U. S., Dixon, R. A., Schaber, M. D., Diehl, R. E., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Sigal, I. S., and Gibbs, J. B. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* *335*, 90-93.

Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L., and et al. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* *249*, 181-186.

Wallar, B. J., and Alberts, A. S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* *13*, 435-446.

Wang, D. Z., Nur, E. K. M. S., Tikoo, A., Montague, W., and Maruta, H. (1997). The GTPase and Rho GAP domains of p190, a tumor suppressor

protein that binds the M(r) 120,000 Ras GAP, independently function as anti-Ras tumor suppressors. *Cancer Res* 57, 2478-2484.

Warne, P. H., Viciano, P. R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352-355.

Weiss, L. (1970). Cell contact phenomena. *In Vitro* 5, 48-78.

Welch, M. D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T. J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265-269.

Welling, D. B., Akhmametyeva, E. M., Daniels, R. L., Lasak, J. M., Zhu, L., Miles-Markley, B. A., and Chang, L. S. (2000). Analysis of the human neurofibromatosis type 2 gene promoter and its expression. *Otolaryngol Head Neck Surg* 123, 413-418.

Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 207-235.

Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1997). Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1332, F1-23.

Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* 14, 461-469.

Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M. R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett* 410, 63-67.

Wolf, R. M., Draghi, N., Liang, X., Dai, C., Uhrbom, L., Eklof, C., Westermarck, B., Holland, E. C., and Resh, M. D. (2003). p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev* 17, 476-487.

Wolf, R. M., Wilkes, J. J., Chao, M. V., and Resh, M. D. (2001). Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J Neurobiol* 49, 62-78.

Xiao, G. H., Beeser, A., Chernoff, J., and Testa, J. R. (2002). p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J Biol Chem* 277, 883-886.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

Xu, G. F., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R., and Tamanoi, F. (1990a). The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 63, 835-841.

Xu, G. F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., and et al. (1990b). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62, 599-608.

Xu, H. M., and Gutmann, D. H. (1998). Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 51, 403-415.

Yu, Y., Khan, J., Khanna, C., Helman, L., Meltzer, P. S., and Merlino, G. (2004). Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 10, 175-181.

Zang, M., Hayne, C., and Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.

Zucman-Rossi, J., Legoix, P., Der Sarkissian, H., Cheret, G., Sor, F., Bernardi, A., Cazes, L., Giraud, S., Ollagnon, E., Lenoir, G., and Thomas, G. (1998). NF2 gene in neurofibromatosis type 2 patients. *Hum Mol Genet* 7, 2095-2101.

Abkürzungen

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovine serum albumine
C	carboxy-
CCD	Charge coupled device
CD44	Cluster of differentiation 44
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOC	Desoxycholsäure
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
Erk	Extracellular-signal-regulated kinase
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
ERMAD	ERM association domain
FCS	Fetal calf serum
FERM	Four point one, ERM (domain)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibrinectin
G418	Geneticin
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP-dissociation inhibitor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescence protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hyaluronsäure
HGF	Hepathocyte growth factor
HRP	Horse radish peroxidase
Hs	Homo sapiens
ICAM	Intercellular adhesion molecule
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LN	Laminin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
N	amino-
NEU	Nitrosoethylurea
NF2	Neurofibromatose 2
P	Phosphat

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PO	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBD	Rho bindende Domäne
rtTA	reverse tetracyclin-controlled transactivator
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Peter Herrlich für sein großes Interesse und anregende Diskussionen danken. Seine Motivation und Herausforderung war Teil des Fortschritts der Arbeit. Besonderer Dank gilt Dr. Helen Morrison, die mit viel Engagement, Ideen, Diskussion und konstanter Unterstützung einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Bei Prof. Dr. Helmut Ponta möchte ich mich ebenso für Diskussionen und ständige Hilfsbereitschaft bedanken, und die erste Radfahrt in Frankreich. Ein Großteil der Kollegen hat in vielerlei Hinsicht beigetragen. Ihnen allen gilt mein Dank.

