

Henri Michael von Blanquet
Dr. med.

Identifikation einer potentiellen Phosphorylierungsstelle des humanen Lymphocyte Phosphatase-Associated Phosphoproteins durch Seiten-gerichtete Mutagenese seiner cDNA

Geboren am 19. 02. 1964 in Genf
Reifeprüfung am 21. 05. 1985 in Weinheim a.d. Bergstraße
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1988 bis SS 1998
Physikum am 03. 04. 1991 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg an der Ruprecht-Karls-Universität und in Paris an der
Université René Descartes Paris V
Praktisches Jahr in Heidelberg am Universitätsklinikum
Staatsexamen am 05. 11. 1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. B. Schraven

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem von Schraven et al. (1994) beschriebenen Phosphoprotein LPAP (Lymphocyte Phosphatase Associated Phosphoprotein). LPAP ist ein Transmembranprotein, das exklusiv auf B- und T-Lymphozyten exprimiert wird und über seine Transmembranregion mit der Tyrosin-phosphatase CD45 assoziiert ist [Schraven et al., 1994; Bruyns, E. et al., 1995]. Die Funktion von LPAP ist bisher nicht bekannt [Schraven, B. et al., 1994; Bruyns, E. et al., 1998; Justement, L.B., 2000]. Es wurden daher Überlegungen angestellt, ob das über die Transmembranregion mit CD45 assoziierte LPAP, ein Molekül sein könnte, welches die enzymatische Aktivität von CD45 reguliert.

Es existieren vier LPAP-Varianten: LPAP29, LPAP30, LPAP31 und LPAP32 [Schraven, B. et al., 1994]. Von diesen werden alle bis auf LPAP29 vom gegen den LPAP N-Terminus gerichteten LPAP Kaninchen-Antiserum Nr. 82 erkannt. Erst die Dephosphorylierung von LPAP29 führt zum Nachweis dieses Proteins durch das gegen den LPAP N-Terminus gerichtete LPAP Kaninchen-Antiserum Nr. 82. Aufgabe dieser Arbeit war es daher, eine potentielle Phosphorylierungsstelle von LPAP zu identifizieren, die dafür verantwortlich sein könnte, daß ihre Dephosphorylierung dazu führt, daß das für die extrazelluläre LPAP-Domäne sensible N-terminale Antiserum wieder reagieren kann. Der zu untersuchende Bereich konnte durch bereits vorliegende Ergebnisse von vornherein auf die Sequenz GGSAEALLSDLHAF¹⁷⁰⁻¹⁸⁴ eingegrenzt werden, denn die Eigenschaft von dem N-terminalen Antiserum nicht erkannt zu werden zeigen zwei weitere LPAP-Varianten, ein am C-terminalen Ende um 36 Aminosäuren verkürztes LPAP-Molekül, LPAP Δ und eine LPAP-Deletionsmutante, die Mutante D2. Die Deletion von D2 umfaßt 30 Aminosäuren im C-terminalen Bereich und überlappt sich mit der Deletion von LPAP Δ um die 14 Aminosäuren GGSAEALLSDLHAF¹⁷⁰⁻¹⁸⁴. Zielsetzung dieser Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, ob im beschriebenen Überlappungsbereich die vermutete potentielle Phosphorylierungsstelle zu identifizieren ist und der Frage nachzugehen ob das für LPAP aufgrund des Verhaltens von LPAP29 vermutete Inside-Outside-Signaling der Regulationsmechanismus sein könnte, der die CD45-Dimerisierung [Weiss, A. und Schlessinger, J., 1998] molekular steuert.

Mittels Seiten-gerichteter Mutagenese wurden dazu mehrere Generation von LPAP-Mutanten erzeugt, deren Reaktionsverhalten nach *in-vitro* Transskription und Translation gegenüber dem N-terminalen Antiserum in der Immunpräzipitation überprüft wurde. Dabei konnte die intrazelluläre LPAP-Sequenz GGSAE¹⁷⁰⁻¹⁷⁴ als die für die Modifikation des N-Terminus verantwortliche Modifikationsstelle und S¹⁷² als potentielle Phosphorylierungsstelle von LPAP identifiziert werden.

Dephosphorylierung von LPAP führt unserer Hypothese nach über Inside-Outside-Signaling zu einer Konformationsänderung der extrazellulären LPAP-Domäne und einer Aufhebung der CD45-Monomerisierung. Es kommt zur CD45-Dimerisierung, die mit einer Abnahme der CD45-Phosphataseaktivität verbunden ist [Weiss und Schlessinger, 1998; Majeti, R. et al., 1998]. Nach Aktivierung und Induktion der Signalkaskade erscheint ein sich später anschließender Mechanismus zur unmittelbaren „Abschaltung“ physiologisch sinnvoll, der die ursprüngliche Homöostase in der Zelle wieder herstellt.

Erst die *in vivo*-Überprüfung unserer Ergebnisse wird zeigen, ob der von uns vorgeschlagene Mechanismus zutrifft. Erst experimentelle Ergebnisse auf die Frage, ob LPAP wie CD45 nach anfänglicher Exklusion [Leupin, O. et al., 2000] in die reife Immunologische Synapse zurückkehrt [Johnson, K.G. et al., 2000] wird klären, ob weitere von uns für LPAP und CD45 diskutierte funktionelle Zusammenhänge zutreffend sein könnten.