

# Protein-Phosphorylierung und Zellregulation II (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Edmond H. Fischer\*

## Einleitung

Im Vortrag, den Ed Krebs gerade hielt<sup>[\*\*\*]</sup>, beschrieb er die frühe Geschichte der Glycogenphosphorylase und ihre Regulation durch reversible Phosphorylierung. Rückblickend betrachtet war es ein glücklicher Zufall, daß wir uns genau dieses Enzym aussuchten. Erstens kommt es in großen Mengen im Skelettmuskel vor, so daß wir nie Materialprobleme hatten. Als wir zwanzig Jahre später seine Aminosäuresequenz zusammen mit Ko Titani und Ken Walsh<sup>[1]</sup> bestimmten, brauchten wir etwa zehn Gramm des kristallinen Enzyms, um die Analyse vollständig durchzuführen. Zweitens war die Phosphorylierungsreaktion unzweideutig und überführte ein total inaktives in ein voll aktives Enzym. Drittens war die Phosphorylierung vollständig; pro mol Enzymuntereinheit wurde ein mol Phosphat eingeführt. Viertens wurde nur eine Stelle phosphoryliert, und fünftens befand sich diese Stelle innerhalb eines freien N-terminalen Molekülarms, der leicht durch limitierte Proteolyse abgespalten werden konnte und den größten Teil des Moleküls inaktiv zurückließ. Dadurch war es sehr einfach, das Phosphopeptid zu isolieren und seine Struktur zu bestimmen<sup>[2]</sup>; trotzdem dauerte es relativ lang, da Mitte der fünfziger Jahre Sequenzen mit Hilfe der Papierchromatographie bestimmt wurden. Wir konnten zeigen, daß ein einziger Serinrest phosphoryliert worden war (Abb. 1). Es dauerte dann noch ein-

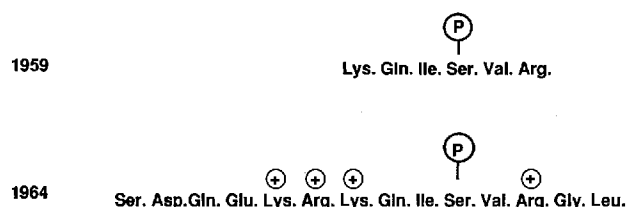


Abb. 1. Sequenz, die bei der Umwandlung von Phosphorylase b in a phosphoryliert wird, wie sie 1959 und 1964 bestimmt worden war.

mal fünf Jahre, um neun weitere Reste zu identifizieren<sup>[3]</sup>. Die längere Struktur enthielt mehrere positive Ladungen hauptsächlich stromaufwärts und bildete jene Erkennungssequenz, deren Bedeutung erst später erkennbar wurde<sup>[4, 5]</sup>.

Die Phosphorylierungsreaktion war so einfach, daß wir nicht im geringsten zweifelten, damit einen Prototyp solcher Umwandlungen beschrieben zu haben. Sechs Jahre vergingen, bis Joe Larner das nächste durch Phosphorylierung-Dephosphorylierung regulierte Enzym, die Glycogen-Synthase,

fand<sup>[6]</sup>. Er berichtete, daß dieses Enzym durch Phosphorylierung nicht aktiviert, sondern inaktiviert wird<sup>[7]</sup>; dadurch war garantiert, daß – wenn die Rückwärtsreaktion blockiert wird, sobald die Vorwärtsreaktion anläuft – das System nicht im Kreislauf nutzlos Energie vergeudet. Joe Larner fand jedoch schnell heraus, daß nicht nur ein Phosphatrest, sondern sechs Phosphatreste pro mol Synthase während der Umwandlung eingeführt wurden<sup>[8]</sup>. Zu dieser Zeit war die Vorstellung, daß nur ein einziges Phosphorylierungsereignis eine Änderung des Aktivitätszustandes bedingt, so eingefleischt, daß wir dachten: „Wie kann das möglich sein? Das impliziert, daß die Glycogen-Synthase aus sechs identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je etwa 15000 besteht.“ Und auch Joe Larner selbst dachte so<sup>[8, 9]</sup>. Natürlich wissen wir heute aufgrund seiner Arbeit, und der von Phil Cohen<sup>[10]</sup>, Peter Roach<sup>[11]</sup> und anderer, daß dieses Enzym an nicht weniger als sieben Stellen von sieben verschiedenen Protein-Kinasen phosphoryliert wird, die damals alle unbekannt waren (Abb. 2). Einige dieser Phosphorylie-

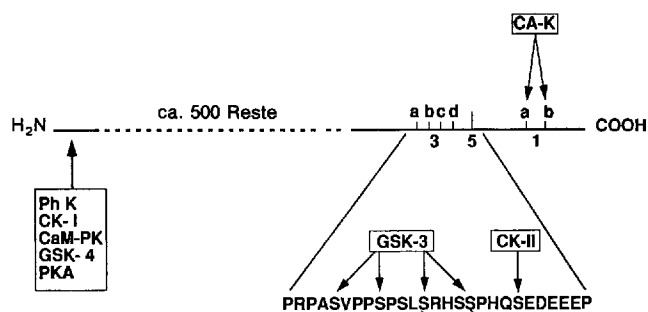


Abb. 2. Die Hauptphosphorylierungsstellen der Glycogen-Synthase. PhK, Phosphorylase-Kinase; CK, Casein-Kinase; CaM-PK, multifunktionelle Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase; GSK, Glycogen-Synthase-Kinase; PKA oder CA-K, cAMP-abhängige Protein-Kinase (aus [11]).

rungsereignisse folgten einem hochkomplizierten Programm aufeinanderfolgender Reaktionen, die in einer ganz bestimmten Reihenfolge ablaufen müssen. Das Enzym wird durch Phosphorylierung mittels der Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) inhibiert, jedoch nicht bevor zunächst ein Phosphatrest durch die Casein-Kinase 2 (CK-2) eingeführt wird. Dann erst kann die Phosphorylierung des nächsten Rests einsetzen, dann die des darauffolgenden, bis schließlich alle Stellen besetzt sind<sup>[12]</sup>. Man bedenke die unvorstellbaren Schwierigkeiten, die wir gehabt hätten, wenn wir uns diesem Enzym und nicht der Phosphorylase zugewandt hätten.

Wir wußten damals nicht, ob die Phosphorylierungsreaktion eine einmalige Erscheinung oder ein seltenes Ereignis ist, das nur auf die Kontrolle dieser Enzyme oder möglicherweise des Kohlenhydratmetabolismus beschränkt ist. Es war wohl bekannt, daß während der Glycolyse anorganisches Phosphat aus dem Medium verbraucht und für die Produktion von vielen Zucker-Phosphat-Zwischenprodukten benötigt wird. Konnte es sein, daß der Stickstoffmetabolismus

[\*] Prof. E. H. Fischer  
Department of Biochemistry, SJ-70  
University of Washington  
Seattle, WA 98195 (USA)  
Telefax: Int. + 206/685-1792

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1993. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

[\*\*\*] Siehe voranstehenden Artikel: E. Krebs, *Angew. Chem.* 1993, 105, 1173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, Nr. 8.

durch einen anderen Typ von kovalenter Modifikation, z.B. Amidierung/Desamidierung, oder der Lipidstoffwechsel durch Acetylierung/Desacetylierung reguliert werden? Oder hatten wir einen allgemeineren Reaktionstypus entdeckt, der bei vielen Systemen wirksam ist? Es wollte das Glück, daß die reversible Proteinphosphorylierung einer der am weitesten verbreiteten Mechanismen ist, durch den zelluläre Prozesse reguliert werden können<sup>[13, 14]</sup>.

## Regulation durch allosterische Effektoren und kovalente Modifikationen

An dieser Stelle taucht eine Frage auf. Ed Krebs hat schon gesagt, daß die Phosphorylase auch durch AMP aktiviert werden konnte. Warum werden zwei Mechanismen zur Kontrolle einer Enzymaktivität gebraucht, wenn sie beide zu einer aktiven Konformation führen (Abb. 3)? Nach dem von

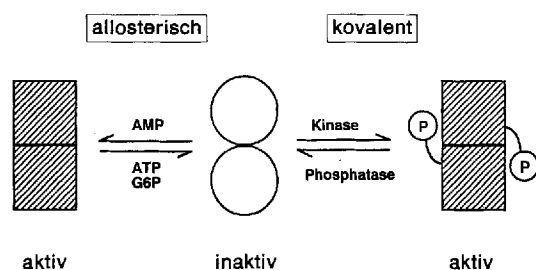


Abb. 3. Allosterische und kovalente Regulation von Phosphorylase.

Jaques Monod in den frühen sechziger Jahren vorgeschlagenen Allosterie-Modell reagiert das Enzym auf Effektoren, die während des normalen Zellcyclus gebildet werden und den allgemeinen inneren Zustand einer Zelle widerspiegeln: Prolifert die Zelle oder ruht sie, wird aktiv metabolisiert oder nicht, wie ist ihr Energiegleichgewicht, d. h. das Verhältnis von AMP zu ATP, etc. Träfe die Regel zu, daß Enzyme einer Endprodukt- oder Feedbackhemmung unterliegen, dann könnte man erwarten, daß die Phosphorylase von Glucose-6-phosphat (G6P), welches während der Reaktion akkumuliert wird, und von ATP, dem Endprodukt des Kohlenhydratmetabolismus, inhibiert wird. Ebenso würde sie durch AMP aktiviert werden, was der Fall ist. Aber viele Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus wären durch denselben Effektor beeinflusst, alle diese „Türen“ würden sich zur selben Zeit öffnen. Im Gegensatz dazu ist die Kinasereaktion hochspezifisch: Sie aktiviert nur die Phosphorylase ohne die Aktivität anderer Enzyme zu beeinflussen. Deshalb lernten wir als eine der größten Lektionen der letzten 30 Jahre, daß „kovalente Regulation“ vor allem auf extrazelluläre Signale anspricht (Abb. 4). Diese externen Signale sind Hormone oder Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren oder andere Stimuli wie Wirkstoffe (Drogen oder Arzneimittel), Licht, Riechstoffe und vielleicht Berührung bei Pflanzen. Jedes Signal wirkt auf seinen eigenen Membranrezeptor und verursacht entweder die Abgabe von sekundären Botenstoffen (second messengers, cAMP, cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Diacylglycerin (DAG), Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) etc.) bei Reaktionen, die durch G-Proteine reguliert werden, oder induziert die intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität der Rezeptoren selbst. Diese sekundären Botenstoffe oder internen Signale wirken auf

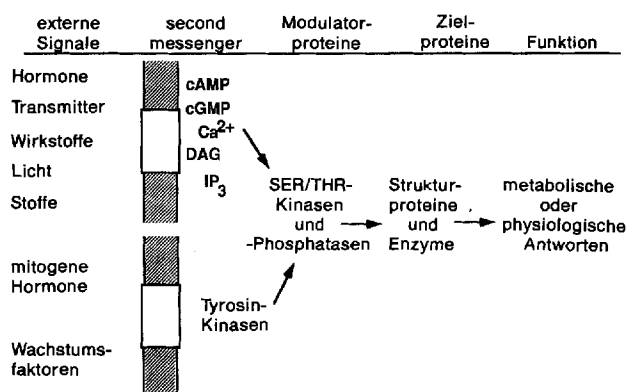


Abb. 4. Kontrolle zellulärer Prozesse durch Protein-Phosphorylierung. Kaskadensysteme, die von extrazellulären Stimuli ausgelöst werden.

Kinasen oder Phosphatasen ein, dann auf Zielenzyme, um schließlich eine physiologische Antwort auszulösen. Hier kann man alle Elemente eines Kaskadensystems finden, die von Ed Krebs beschrieben wurden: Enzyme wirken auf Enzyme, was auf eine enorme Amplifikation von externen Signalen hinausläuft. Zusätzlich wird dadurch die koordinierte Regulation von mehreren physiologischen Ereignissen durch pleiotrope Wirkung einiger beteiligter Enzyme möglich.

## Die Protein-Kinasen

Heute kennt man einige hundert Protein-Kinasen, die nach ihrer Regulationsweise oder Substratspezifität klassifiziert werden<sup>[15]</sup> (Tabelle 1). Innerhalb der großen Familie

Tabelle 1. Klassifikation von Protein-Kinasen (PKs).

- I. Second-messenger-abhängige Ser/Thr-PKs
  - A. cyclische Nucleotide: cAMP, cGMP-PKs
  - B.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase, MLCK, Calmodulin-Kinase II
  - C. Diacylglycerin (DAG)/ $\text{Ca}^{2+}$ -Protein-Kinase C
- II. Second-messenger-unabhängige Ser/Thr-PKs
  - A. Häm-, dsRNA-, (INF)-abhängige eIF2-PKs
  - B. CK-I, CK-II, GSK-3, S6-Kinasen
- III. PKs mit doppelter Spezifität (Ser/Thr und Tyr)
  - MAPK, MAPKK, Wee 1
- IV. Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs)
  - A. zelluläre oder virale (oncogene) PTKs
  - B. Rezeptorverknüpfte PTKs

der Ser/Thr-Kinasen gibt es einige, die von den oben genannten sekundären Botenstoffen abhängig sind, und andere, die von spezifischen Komponenten des Systems, das sie regulieren sollen, abhängig sind. Dies ist der Fall bei der Häm-regulierten Kinase, die die Initiation der Globinsynthese blockiert, wenn Häm oder Eisen fehlt; die Doppelstrang-RNA-abhängige Kinase wird bei viralen Attacken durch Interferon induziert. Es gibt auch „unabhängige Kinasen“ wie die Casein-Kinasen, für die bisher kein genauer Kontrollmodus gefunden werden konnte.

Als nächstes kommen die Kinasen mit gemischter Funktion, die entweder ihr Substrat an Tyrosin oder Serin/Threonin phosphorylieren oder die durch Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierung reguliert werden können. Dies ist der Fall bei den Enzymen, die Ed Krebs kürzlich beschrie-

Zum Schluß gibt es noch eine große Klasse von Tyrosin-Kinasen, die später diskutiert werden sollen. Nicht erwähnt werden die eher seltenen Histidin-Kinasen, wie die an der bakteriellen Chemotaxis beteiligten<sup>[18]</sup> und die doppelköpfige Kinase/Phosphatase, die die bakterielle Isocitrat-Dehydrogenase reguliert<sup>[19]</sup>.

Alle diese Enzyme verfügen über homologe katalytische Domänen, wegen der Struktur ihrer regulatorischen Segmente stark variiert. Sie haben übereinstimmende (Consensus-)Sequenzen, z.B. die an der ATP-Bindung beteiligten Abschnitte, durch die sie in Datenbanken identifiziert werden können<sup>[20, 21]</sup>. Die meisten werden durch Segmente reguliert, die ihre Aktivität blockieren, oft dadurch, daß sie Pseudosubstrat-Sequenzen enthalten, die mit ihrem katalytischen Zentrum interagieren und es damit abschirmen. Diese autoinhibierenden Domänen können in unterschiedlichen Untereinheiten lokalisiert sein, wie bei der zuerst von Ed Krebs, Don Walsh et al.<sup>[22]</sup> charakterisierten cAMP-abhängigen Protein-Kinase (cAMP-PK) oder in der gleichen Peptidkette, wie in der cGMP-PK, bei der die beiden Segmente im Lauf der Evolution fusioniert worden sind. Anfangs schien die Reaktion für die cAMP-PK einfach: Das Enzym bildet einen inaktiven Komplex aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten; cAMP induziert eine Konformationsänderung der regulatorischen Untereinheit, woraufhin das Enzym dissoziiert und die aktiven katalytischen Untereinheiten frei werden. Bald wurde klar, daß der inaktive Komplex noch eine wichtige Aufgabe hat: Er soll die Translokation der freien katalytischen Untereinheit in andere Zellkompartimente, vor allem den Kern, verhindern<sup>[23]</sup>. Wir wissen heute, daß die Regulation dieses Enzyms noch komplizierter ist: Die regulatorischen Untereinheiten selbst enthalten Strukturdeterminanten, die es ihnen ermöglichen, Ankerproteine an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle zu erkennen und mit hoher Affinität an sie zu binden<sup>[24-27]</sup>. Mehr als zwei Dutzend dieser Ankerproteine wurden identifiziert; sie finden sich besonders häufig in Hirn- und Schilddrüsengewebe. Es ist denkbar, daß sich einige davon in enger Nachbarschaft zu speziellen cAMP-generierenden Rezeptoren befinden. Durch eine gezielte Reaktion der Kinasen mit einer vorgegebenen Substratgruppe erhalte dadurch die hormonelle Antwort einen gewissen Grad von Selektivität<sup>[27]</sup> (Abb. 5).

The diagram illustrates a G-protein coupled receptor (GPCR) with two distinct binding sites, A and B, and two signaling pathways,  $\alpha$  and  $\beta$ . Binding site A, located on the  $\alpha$  pathway, is coupled to the production of cAMP, which then activates a set of effector proteins labeled 'Antwort A'. Binding site B, located on the  $\beta$  pathway, is also coupled to the production of cAMP, which then activates a different set of effector proteins labeled 'Antwort B'. The diagram shows that both pathways lead to the production of cAMP, which then activates different sets of effector proteins (Antwort A and Antwort B).

von Nishizuka et al. beschrieben worden ist<sup>[28, 29]</sup>. Je nach Subspezies enthält die PKC bis zu drei regulatorische Domänen, die für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , Diacylglycerin und Phospholipiden zuständig sind. Die Bindung dieser allosterischen Effektoren kann die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran auslösen, wo es an spezifische Ankerproteine binden könnte<sup>[30]</sup>. Dadurch wird möglicherweise bestimmt, welche Signalwege beeinflußt werden.

Zielweisende Untereinheiten sind besonders für die Serin/Threonin-Phosphatasen entscheidend, da diese Enzyme nicht darauf ausgerichtet sind, spezifische Sequenzen oder Struktur determinanten innerhalb ihrer Substrate zu erkennen. Im Gegensatz zu den Kinasen bestehen sie nur aus einigen Enzymtypen, die über breite und überlappende Spezifitäten verfügen<sup>[35–37]</sup>. Sie hängen also von regulatorischen Untereinheiten oder Bindungsproteinen ab, die sie zu dem jeweiligen Zellkompartiment führen, in denen sich entsprechende Substrate befinden. Dies ist zum Beispiel der Fall bei der Typ-1-Phosphatase, deren katalytische Untereinheiten an eine Glycogen-erkennende Untereinheit, eine Myosin-erkennende Untereinheit oder an ein inhibitorisches Molekül, den Inhibitor 2, binden kann. In jeder dieser Formen erkennt das Enzym einen spezifischen Satz von Substraten. Die Bildung und Dissoziation dieser Komplexe unterliegt hormoneller

Kontrolle<sup>[38-41]</sup>. Dieses Thema möchte ich im zweiten Teil dieses Vortrags entwickeln, der der Rolle der Regulations- und Lokalisationsdomänen für die Funktion der Tyrosin-Phosphatase gewidmet sein wird.

## Protein-Tyrosin-Phosphorylierung

Vor ca. 15 Jahren wurden drei bemerkenswerte Entdeckungen gemacht, die auf dem Gebiet der Zellregulation durch Protein-Phosphorylierung für besondere Aufregung sorgten. Erstens: die Gruppen von Ray Erickson<sup>[42, 43]</sup> sowie Varmus und Bishop<sup>[44]</sup> fanden, daß das Produkt des für die Oncogenität des Rous-Sarkoma-Virus verantwortlichen src-Gens eine Protein-Kinase ist. Zweitens: Tony Hunter und Bart Sefton berichteten, daß diese Kinase im Gegensatz zu allen vorher bekannten Enzymen ihr Proteinsubstrat ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert<sup>[45]</sup>. Drittens: Es wurde das nichttransformierende Homologe von v-src, das zelluläre c-src, identifiziert<sup>[46-50]</sup>. c-src codiert ein Produkt (pp60<sup>c-src</sup>), das sich von seinem oncogenen viralen Gegenstück unter anderem durch eine kurze Verlängerungssequenz am C-Terminus unterscheidet. Diese Sequenz enthält einen Phosphotyrosinrest, der die Enzymaktivität kontrolliert. Heute kennen wir mehr als ein Dutzend zelluläre und virale Tyrosin-Kinasen, und ihre Zahl steigt weiter<sup>[15, 50]</sup>.

Schließlich kam die bedeutende Entdeckung aus dem Labor von Stanley Cohen<sup>[51, 52]</sup>, daß der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) selbst eine Tyrosin-Kinase ist, deren Aktivität durch Bindung des Liganden induziert wird. Seitdem sind viele Rezeptorfamilien mit Tyrosin-Kinase-Aktivität identifiziert worden<sup>[53]</sup>. Alle haben eine äußere ligandenbindende Domäne, manche mit cysteinreichen Regionen, ein einziges Transmembransegment und eine Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Domäne (Abb. 6).

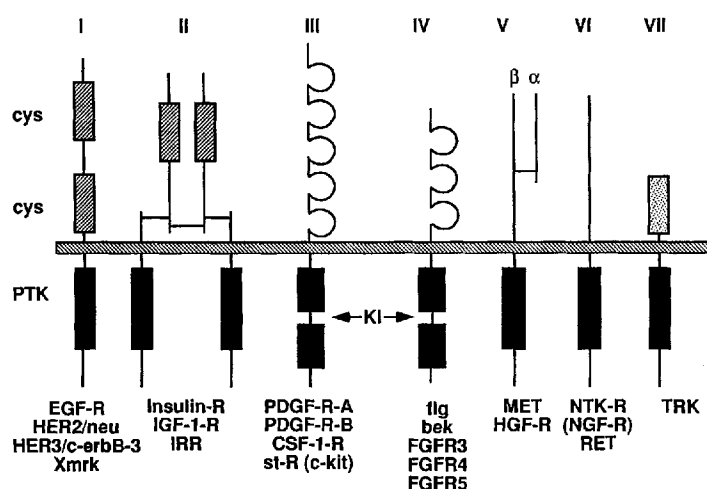


Abb. 6. Die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der Wachstumsfaktoren.

Genauso wie die Mutation der intrazellulären Tyrosin-Kinasen zu einer Zelltransformation führen kann, so kann eine Mutation eines Wachstumsfaktor-Rezeptors zu oncogenen Produkten führen. Die als erste identifizierte Mutation betraf das retrovirale Oncogen v-erb B<sup>[54, 55]</sup>, das durch Verkürzung der äußeren Domäne des EGF-Rezeptors, seines zellulären Vorläufers, generiert wurde. Seitdem wurden viele

weitere kloniert und charakterisiert; sie entstehen gewöhnlich durch Kappen des Moleküls an dem einen oder anderen oder beiden Enden, Fusion mit bestimmten viralen Elementen und anderen Mutationen.

Es ist kaum überraschend, daß mit der Zunahme der Beweise für die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung in Zellteilung und -transformation sich auch viele Gruppen für die Enzyme interessierten, die die Rückreaktion katalysieren, das heißt für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

## Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die ersten Anhaltspunkte für eine Phosphotyrosin-Dephosphorylierung kamen von Graham Carpenter, Stanley Cohen et al.<sup>[51, 56]</sup>. Sie nahmen A431-Zellmembranen, die den EGF-Rezeptor überexprimierten, und maßen nach deren Autophosphorylierung die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung. Ähnliche Beobachtungen wurden von Bart Sefton, Tony Hunter et al. gemacht, die Zellen untersuchten, die mit einer temperatursensitiven Mutante des Rous-Sarkoma-Virus transformiert worden waren<sup>[57]</sup>. Danach folgte eine Vielzahl von Studien durch mehrere Gruppen, unter anderen auch unsere eigene vor ca. sechs Jahren<sup>[58-60]</sup>. Begonnen wurde die Arbeit von Nick Tonks, einem hervorragenden Postdoc und Bürger Seattles in der zweiten Generation; er hatte gerade seinen Dokortitel bei Phil Cohen in Dundee erhalten, der selbst vor etwa zwanzig Jahren in unserem Labor gearbeitet hatte. Als wir begannen, nahmen wir an, daß, wenn Transformation durch Überexpression von Tyrosin-Kinasen ausgelöst würde oder durch Mutationen, die ihre Daueraktivität bedingen würden, dann könnte eine Überexpression der Phosphatasen diese Reaktionen blockieren oder umkehren. Diese Annahme erwies sich als zu einfach.

Innerhalb weniger Jahre wurde eine Tyrosin-Phosphatase in homogener Form aus menschlicher Placenta isoliert<sup>[61, 62]</sup>. Das Enzym war absolut spezifisch für Phosphotyrosinreste und äußerst aktiv. Es hatte eine spezifische Aktivität, die eine Zehnerpotenz über der der meisten viralen Tyrosin-Kinasen lag und bis zu drei Zehnerpotenzen über der bestimmter Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Diese hohe Aktivität ließ vermuten, daß das Enzym sehr exakt reguliert wird, so daß die für die normale Zellentwicklung nötigen mitogenen Signale zum Zuge kommen.

## Das leukocytengemeinsame Antigen CD45: eine Tyrosin-Phosphatase

Die Überraschung kam, als die Aminosäuresequenz des Enzyms von Ken Walsh und Harry Charbonneau bestimmt wurde, wobei keine Homologie zu allen anderen Protein-Phosphatasen gefunden wurde<sup>[63]</sup>. Eine Datenbanksuche zeigte jedoch, daß das Enzym strukturell mit einem weit verbreiteten und gut bekannten Oberflächenantigen verwandt war, dem leukocytengemeinsamen Antigen, auch als CD45 bekannt<sup>[64]</sup> (Abb. 7). Das leukocytengemeinsame Antigen repräsentiert eine große Familie von Transmembranmolekülen, die in allen hämatopoetischen Zellen, außer reifen Erythrocyten, vorkommen<sup>[65]</sup>. Ihr intrazellulärer Teil ist hochkonserviert und enthält zwei homologe Domänen

von je 30 kDa. Es wird vermutet, daß CD45 an der Regulation der Lymphocytenfunktion einschließlich der Cytotoxizität, Proliferation und Differenzierung sowie an der Modulation der Interleukin-2(IL2)-Rezeptor-Expression beteiligt ist.

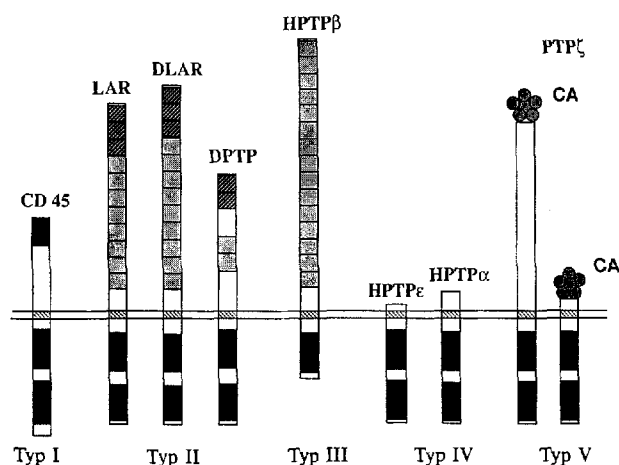


Abb. 7. Tyrosin-Phosphatase-Rezeptoren.

An dieser Stelle muß ich eine Parenthese mit biblischem Unterton einfügen. Hätten wir die Sequenz der Placenta-Phosphatase bestimmt, bevor die Sequenz von CD45 bekannt war, wäre niemand besonders interessiert gewesen – auch wir nicht –, weil es nur die Sequenz eines weiteren Enzyms gewesen wäre. Und es wären diejenigen gewesen, die am CD45 arbeiteten – Ian Trowbridge, Allen Williams, Matt Thomas und so weiter –, die nach der Sequenzbestimmung Datenbanken abgesucht und die überraschende Beobachtung gemacht hätten, daß ihr Rezeptor eine Tyrosin-Phosphatase ist. Das bedeutet, daß es sich in diesem Geschäft auszahlt, der letzte zu sein, so wie es in der Bibel heißt: Die Ersten werden die Letzten sein und die Letzten die Ersten.

Seit damals wurde eine große Vielfalt von Rezeptoren identifiziert<sup>[58–60]</sup>. Alle außer einem haben die gleiche doppelte katalytische Domäne in ihrem cytoplasmatischen Teil, verfügen aber über beträchtliche Diversivität in ihren äußeren Segmenten (Abb. 7). Einige haben die Strukturcharakteristika von Zelladhäsionsmolekülen, wie etwa die LARs, die mit dem leukocyten gemeinsamen Antigen verwandt sind und zuerst von Saito und Schlossmann kloniert wurden. Sie sind mit den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (N-CAMs) und Fasciclin II verwandt, was vermuten läßt, daß sie an homophilen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind und vielleicht die Morphogenese und Gewebeentwicklung modulieren. Andere enthalten Sequenzen von Fibronectin III und könnten an der Zell-Zell- oder an der Zell-Matrix-Signalübertragung beteiligt sein. Einige haben sehr kurze äußere Domänen. Die vielleicht interessantesten Rezeptoren sind jene, die vor kurzem von Schlessinger et al.<sup>[66]</sup> und Saito et al.<sup>[67]</sup> unabhängig voneinander kloniert worden sind. Am Ende des äußeren Segments befindet sich eine große globuläre Domäne, die fast identisch mit Carboanhydrase (CA) ist; der einzige Unterschied ist, daß sie nur eine der drei Histidinreste, die an der Bindung von  $Zn^{2+}$  beteiligt sind, enthält. Außer für CD45 wurde bisher kein Ligand für diese Strukturen gefunden.

## Die intrazellulären Tyrosin-Phosphatasen und ihre Rolle für Zellcyclus und -transformation

Auch niedermolekulare intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) weisen ein großes Maß an Strukturvariationen auf, die entweder vor oder hinter dem hochkonservierten katalytischen Zentrum liegen. Sie sind unzweifelhaft an Regulation und Lokalisation der Enzyme beteiligt (Abb. 8). Einige PTPs haben Segmente, die mit Cytoskelett-Proteinen, wie Bande 4.1, Ezrin und Talin, homolog sind; andere enthalten zwei src-Homologie-2(SH2)-Domänen, die es ihnen ermöglichen könnten, mit Phosphotyrosylresten an Autophosphorylierungsstellen von Wachstumsfaktorrezeptoren zu interagieren. Tyrosin-Phosphatasen kommen auch als Genprodukte (YOPs) von Virulenzplasmiden in Bakterien der Spezies *Yersinia* vor (wie etwa *Y. pestis*, die die Beulenpest auslöst).

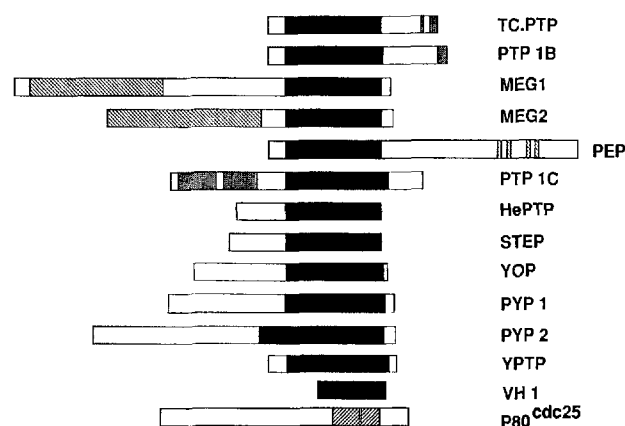


Abb. 8. Intrazelluläre Tyrosin-Phosphatasen, geordnet nach ihren konservierten katalytischen Domänen.

Ich möchte jetzt die Rolle diskutieren, die diese regulatorischen Domänen bei der Enzymlokalisierung und -funktion möglicherweise spielen, und mich dabei besonders auf das von Debbie Cool<sup>[68]</sup> klonierte menschliche T-Zell-Enzym (TC-PTP) konzentrieren (Abb. 9). Die regulatorische Domäne ist ausschließlich hydrophil bis auf die letzten 19 Reste, die – einer Transmembrandomäne ähnlich – sehr hydrophob sind. Es gibt auch eine sehr kurze Sequenz von fünf basischen Resten, die als Kernlokalisierungssignal dienen könnten<sup>[68]</sup>.

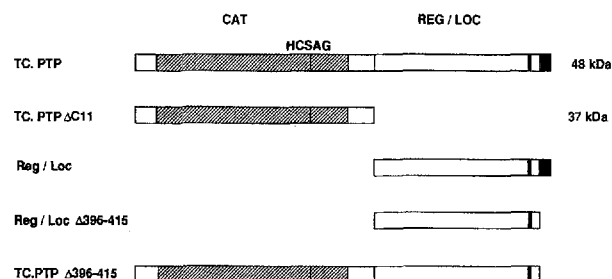


Abb. 9. Schematische Darstellung der humanen T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP) und einiger ihrer mutierten Formen. Gezeigt werden das Wildtyp-Enzym mit einer vollen Länge von 48 kDa, die gekappte 37kDa-Form, die nur die katalytische Domäne enthält, die für Regulation/Lokalisation verantwortliche Domäne (11 kDa) und zwei Mutantenformen, bei denen das hydrophobe 19 Reste lange Segment am C-Terminus (dunkles Feld) deletiert worden ist.

Das 11kDa-Segment des Enzyms wurde – wie auch andere Segmente von möglicher physiologischer Bedeutung – mutiert. Zuerst wurde ein Stopcodon gleich hinter der katalytischen Domäne eingeführt, was die Deletion des gesamten C-terminalen Endes bewirkte. Das gekappte Enzym ist löslich, das Wildtyp-Enzym hingegen partikulär. Es colokalisiert<sup>[69, 70]</sup> mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Expression des C-terminalen Endes als Fusionsprotein mit  $\beta$ -Galactosidase zeigt, daß die lösliche  $\beta$ -Galactosidase jetzt mit dem ER assoziiert ist. Wird nur die C-terminale hydrophobe Sequenz deletiert, so findet man das Enzym im Kern (J. A. Lorenzen, unveröffentlichte Ergebnisse).

Aus Zeitmangel werde ich nur die Unterschiede diskutieren, die man bei Zellcyclus und -transformation beobachtet, wenn das Wildtyp-Enzym oder die mutierte Form, die durch Einführung eines Stopcodons hinter der katalytischen Domäne entsteht, exprimiert wird. An BHK-Zellen, in denen das Wildtyp-Enzym überexprimiert wird, kann man keine offensichtliche Veränderung der Zellmorphologie beobachten. Im Gegensatz dazu werden 60–70 % der Zellen, die die gekappte Form exprimieren, vielkernig<sup>[71]</sup>, weil die Cytokinese nicht funktioniert.

Vielkernigkeit ist nichts Ungewöhnliches; sie kann durch Zellfusion, durch bestimmte Wirkstoffe oder durch Antikörper gegen die Myosin-ATPase induziert werden, da die Cytokinese ein Actomyosin-abhängiger Prozeß ist<sup>[12, 13]</sup>. Aber in allen Fällen geht sie, wenn die Kernteilung weitergeht, synchron vonstatten. Das Ungewöhnliche an diesen BHK-Zellen ist, daß bei ihnen sich die Zellteilung häufiger asynchron vollzieht (Abb. 10): Das heißt, ein Kern teilt sich und der andere nicht. Man kann die Kerne dieser Zellen daher in allen Phasen des Zellcyclus sehen. Wir wissen bis heute nicht, welche Signale zwischen den Kernen unterbrochen worden sind.

Mit der gleichen tumorauslösenden BHK-Zelllinie können Unterschiede im Zellverhalten bei Expression des Wildtyp-Enzyms oder des gekappten T-Zell-Enzyms auch bei der Zelltransformation beobachtet werden. Transformation beschreibt die Veränderung, die eine Zelle durchmacht, wenn

sie maligne wird und nicht länger den Zwängen, denen eine normale Zelle unterliegt, gehorcht. Eine normale Zelle wächst im Gegensatz zu einer transformierten Zelle nicht auf Flüssigagar, da sie eine feste Unterlage zur Adhäsion benötigt. Wie erwartet wächst die transformierte BHK-Zelllinie sehr gut auf Flüssigagar; aber sie wächst genausogut, wenn nicht besser, nach Transfektion mit dem Wildtyp-Enzym. Im Gegensatz dazu verhindert die Überexpression der gekappten Form des Enzyms das Wachstum unter diesen Bedingungen, als ob die Transformation unterdrückt würde (D. Cool, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine ähnliche Verstärkung im Tumorverhalten durch Überexpression der Wildtyp-Phosphatase wird beobachtet, wenn diese Zellen in thymuslose nackte Mäuse injiziert werden. Die so erzeugten Tumoren sind – verglichen mit Tumoren aus Kontroll-BHK-Zellen – hoch vaskularisiert. Die Tumorbildung in BHK-Zellen, die die gekappte Form enthalten, ist dagegen sehr reduziert, wenn überhaupt vorhanden. In einigen Tieren wurden überhaupt keine Tumoren gefunden.

Da das transformierende Agens in diesen BHK-Zellen bisher nicht definiert werden konnte, wurden diese Versuche in embryonalen Rat-2-Zellen, die mit dem gut charakterisierten viralen Oncogen v-fms transformiert worden waren, wiederholt<sup>[74]</sup>; v-fms wurde zuerst aus einem Sarkoma-Virus der Katze isoliert und gehört zur Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Familie (platelet-derived growth factor, PDGF) der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren<sup>[75]</sup>. Sein nicht-transformierender Vorläufer, das zelluläre Protooncogen c-fms, codiert den Rezeptor für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (CSF-1). Die Anlagerung von CSF-1 löst Signale aus, die zur Transkription von CSF-1-Genen führen, die wichtig für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von einkernigen Phagocyten sind<sup>[76]</sup>.

Im Gegensatz zu den spindelförmigen v-fms-transformierten Zellen zeigen Kontroll-Rat-2-Zellen die typische Pflasterstein-Morphologie nicht transformierter Zellen<sup>[74]</sup>. Zellen, die das komplette Enzym überexprimieren, haben das gleiche langgezogene Aussehen, wohingegen Klone, die die

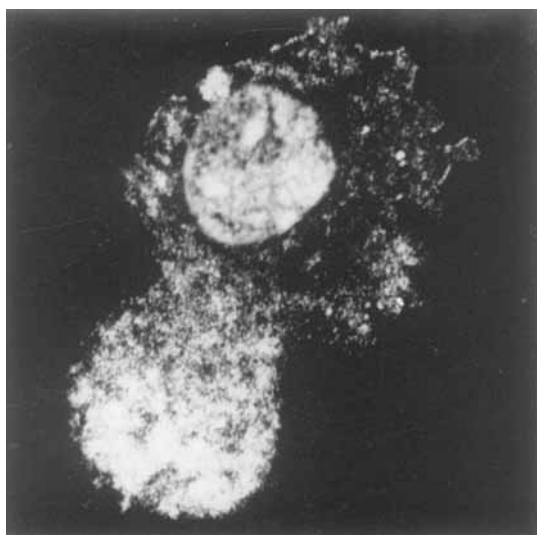


Abb. 10. BHK-Zellen, die die gekappte 37kDa-Form der T-Zell-Tyrosin-Phosphatase überexprimieren, zeigen asynchrone Kernteilung. Die Zelle hat sich um den unteren Kern, der kurz vor der Mitose steht, abgerundet. Der obere Kern zeigt die Interphase-Form [7, 71].

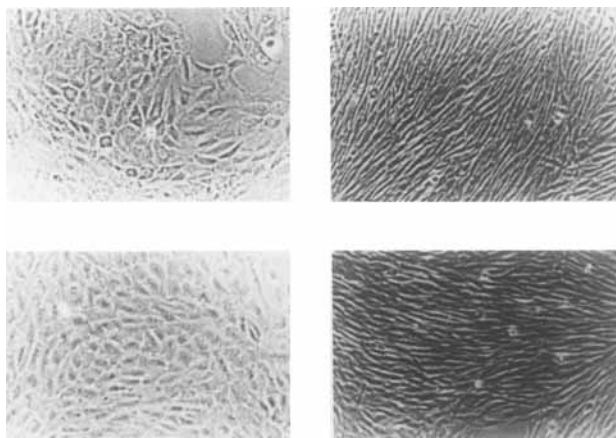


Abb. 11. Morphologie von nicht-transformierten Rat-2-Zellen (oben links) oder mit v-fms transformierte Zellen (oben rechts). Die mit v-fms transformierten Zelllinien wurden mit T-Zell-Tyrosin-Phosphatase (in voller Länge) cotransfiziert (unten rechts) oder mit der gekappten 37kDa-Form (unten links). Die Befunde zeigen, daß das Enzym in voller Länge die transformierte (spindelförmige) Morphologie nicht verändert, während Zellen mit gekapptem Enzym den nicht-transformierten Phänotyp aufweisen.

gekappte Form des Enzyms enthalten, den nichttransformierten Rat-2-Pflasterstein-Phänotyp aufweisen (Abb. 11). Die transformierten Zellen wachsen auf Flüssigagar, die anderen nicht. Um möglichst viel Tyrosin-Phosphatase zu exprimieren, wurde das Enzym in Retroviren verpackt, mit denen die Zellen infiziert wurden. Keine der Zellen, die das gekappte Enzym enthielten, wuchsen gut auf Flüssigagar. Daß diese Zellen in einen nicht-transformierten Zustand zurückgekehrt waren, zeigte auch ihr Cytoskelett (Abb. 12). In transformierten Zellen sind die Actin-Mikrofilamente zerrissen und fokale Adhäsionsstellen, d.h. die Strukturen, mit denen normale Zellen an ihrem Substrat anhaften, verlorengegangen. Die Actinfilamente sind in den Zellen, die das gekappte Enzym exprimieren, wieder normal, und viele fokale Adhäsionsstellen sind sichtbar (D. Cool, unveröffentlichte Ergebnisse).

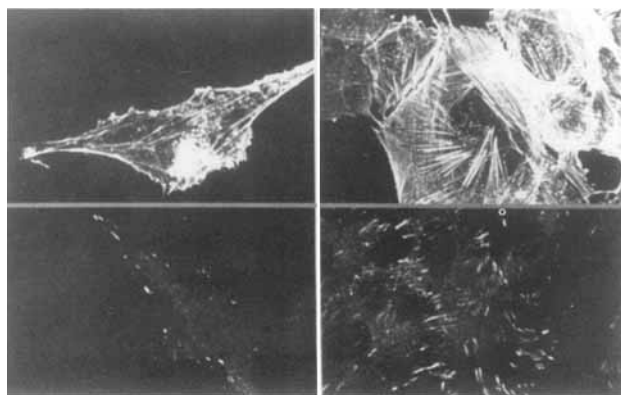


Abb. 12. Cytoskelett-Morphologie von v-fms-transformierten Rat-2-Zellen vor (links) und nach Detransformation durch Coexpression der gekappten (37 kDa) Form des T-Zell-Enzyms. Obere Bilder: Actin gefärbt mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin; untere Bilder: mit anti-Vinculin-Antikörpern gefärbt, zur Markierung der fokalen Adhäsionen (helle Flecken).

Ähnliche Unterschiede wurden beobachtet, wenn diese zwei Zelltypen in nackte Mäuse injiziert wurden, um die Tumorbildung zu beobachten. Alle Zellen, die die v-fms-Oncogene enthielten, bildeten große Tumoren, wie jene, die die Wildtyp-Phosphatase coexprimierten. Wie auch in BHK-Zellen beobachtet worden war, war die Fähigkeit zur Tumorbildung in den meisten Zellen mit gekapptem Enzym verlorengegangen.

## Abschließende Bemerkungen

Die oben genannten Befunde und jene, die ich aus Zeitmangel nicht erwähnen konnte, zeigen, daß Phosphatasen nicht einfach die „Aus“-Schalter in einem „An/Aus“-Schaltersystem aus Kinasen und Phosphatasen sind. In bestimmten Fällen und abhängig von der Form des beteiligten Enzyms, können Tyrosin-Phosphatasen synergistisch mit Kinasen arbeiten, und so eine spezifische physiologische Antwort hervorrufen. Das könnten sie durch Aktivierung der Kinasen der src-Familie bewirken, die durch Phosphorylierung am C-Terminus inaktiviert werden (Abb. 13). Die entscheidenden Faktoren, von denen abhängt, ob eine Phosphatase eine Kinasen-Reaktion verstärkt oder aufhebt, scheinen weniger von ihrem Aktivitätszustand als von ihrer sub-

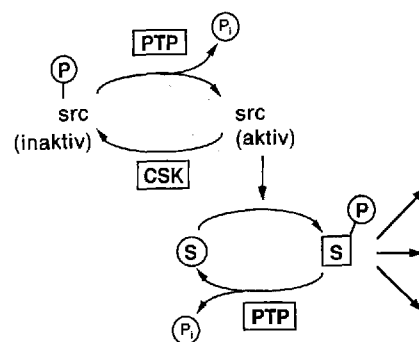


Abb. 13. Mögliche Doppelrolle der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) bei der Signal-Transduktion: Obere Reaktion, Aktivierung von Tyrosin-Kinasen der src-Familie durch Dephosphorylierung des C-terminalen Phosphotyrosylrestes. Untere Reaktion, Dephosphorylierung anderer Tyrosin-Phosphat-Substrate, um das System in seinen ursprünglichen Zustand zurückzuführen. CSK ist die zelluläre src-Kinase, die die Enzymaktivität durch Tyrosin-Phosphorylierung am C-Terminus unterdrückt.

zellulären Lokalisation bestimmt zu sein. Eine analoge Situation findet sich bei pp60<sup>v-src</sup>. Die Entfernung der Myristoylgruppe, die für die Bindung an die Plasmamembran nötig ist, beeinflusst die enzymatischen Eigenschaften nicht, führt aber zum Verlust der Fähigkeit zur Transformation<sup>[77]</sup>. Die Assoziation mit der Membran ist daher essentiell für die Oncogenität. Die oben genannten Befunde zeigen, daß – wenn man die Transformation durch die Phosphatasen kontrollieren wollte – man versuchen sollte, die Segmente, die an ihrer Lokalisation beteiligt sind, oder die Ankerproteine, die sie binden, zu manipulieren und nicht ihre katalytischen Domänen. Natürlich sind noch viele Fragen offen. Ich möchte nur einige nennen:

a) Was kontrolliert die Aktivität der Phosphatasen unter normalen Bedingungen? Es könnte einfacher sein, ein hohes Expressionsniveau für diese Enzyme in transformierten Zelllinien, bei denen die Signalübertragungswege aktiviert sind, zu erreichen, als in normalen Zellen; als ob eine Balance zwischen Kinasen und Phosphatasen bestünde.

b) Hängen die Unterschiede zwischen Wildtyp- und gekapptem Enzym allein von der Lokalisation ab, oder ist die Enzymspezifität auch beteiligt?

c) Können ähnliche Effekte auch mit anderen Oncogenen einschließlich der nicht-Tyrosin-Kinasen (zum Beispiel ras, raf, mos etc.) beobachtet werden?

d) Welches sind die einzelnen Schritte des Signalweges, die spezifisch von diesen Enzymen beeinflusst werden?

e) Und schließlich: Wenn Oncogenität das Ergebnis der Überexpression von Tyrosin-Kinasen sein kann, kann dann Oncogenität auch aus einer Unterexpression bestimmter Phosphatasen resultieren?

Alle Vorgänge, die Ed Krebs und ich hier beschrieben haben, hatten etwas gemeinsam; sie folgten auf molekularer Ebene einem ähnlichen Muster. Unter dem Einfluß eines äußeren Stimulus ist der Phosphorylierungszustand eines Proteins oder Enzyms verändert worden. Dieses wiederum hat eine zelluläre Antwort ausgelöst. Die Einsicht, daß bestimmte oncogene Agentien das gleiche Wirkprinzip haben, mag uns dem Verständnis der Zelltransformation etwas näher bringen. Und wer weiß, vielleicht wird – mit einem bißchen Glück – ein tieferes Verständnis dieser Signalwege auch einen neuen Weg zeigen, die Oncogenität zu kontrollieren.

Meine wissenschaftliche Karriere wurde geprägt durch die langdauernde Zusammenarbeit mit dem verstorbenen Eric A. Stein über  $\alpha$ -Amylasen und später mit Edwin G. Krebs, mit dem ich diesen Preis teile, über Protein-Phosphorylierung. Sie waren nicht nur hervorragende Kollegen, sondern auch in der ganzen Zeit zwei meiner besten Freunde. Auch allen jenen, die in meinem Labor über die Jahre gearbeitet haben, schulde ich großen Dank; sie gaben ihr Talent, ihre Ideen und ihre maximale Leistung, bevor sie ihre eigenen Karrieren begannen. Sollte ich alle nennen, wäre die Liste zu lang; hier seien nur einige Mitarbeiter in chronologischer Reihenfolge genannt: T. Yamamoto, M. Appleman, J. Hedrick, S. Shaltiel, S. Hurd, P. Cohen, L. Heilmeyer, B. Boeker, D. Gratecos, D. Malencik, C. Heizmann, H. Blum, M. Fosset, K. Lerch, J. Demaille, D. Brautigan, E. Villa-Moruzzi, L. Ballou, S. McNall und N. Tonks. Sie sind hervorragende Mitarbeiter gewesen; ohne sie und all jene, die ich nicht namentlich erwähnen konnte – auch meine jetzigen Mitarbeiter –, wäre nichts von allem wahr geworden.

Auch meiner Frau Beverly schulde ich großen Dank; sie blieb immer ruhig in allen Krisen, wenn ich in letzter Minute noch Vorträge vorzubereiten hatte oder zum Flughafen eilen mußte. Schließlich gebührt meiner Sekretärin Carmen Westwater großer Dank, die sich immer wieder durch zahllose Manuskriptentwürfe durcharbeitete und verlorene Briefe, Artikel und Flugzeugtickets wieder ans Licht zauberte. Aber alle jene, die mein Büro das „Bermuda-Dreieck“ nennen, übertreiben.

Mein Dank gilt dem National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, für die Unterstützung meiner Arbeit vom ersten Tag an und der Muscular Dystrophy Association für ihre zuverlässige Unterstützung.

Eingegangen am 12. Februar 1993 [A 913]  
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Berlin

- [1] K. Titani, A. Koide, J. Hermann, L. H. Ericsson, S. Kumar, R. D. Wade, K. A. Walsh, H. Neurath, E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4762–4766.
- [2] E. H. Fischer, D. J. Graves, E. R. Snyder Crittenden, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1698–1704.
- [3] C. Nolan, W. B. Novoa, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Biochemistry* **1964**, *3*, 542–551.
- [4] B. E. Kemp, D. J. Graves, E. Benjamini, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4888–4894.
- [5] R. B. Pearson, B. E. Kemp, *Methods Enzymol.* **1991**, *200*, 62–81.
- [6] M. Rosell-Perez, C. Villar-Palasi, J. Larner, *Biochemistry* **1962**, *1*, 763–768.
- [7] D. L. Friedman, J. Larner, *Biochemistry* **1963**, *2*, 669–675.
- [8] J. Larner, C. Villar-Palasi, *Curr. Top. Cell. Regul.* **1971**, *3*, 195–236.
- [9] C. H. Smith, N. E. Brown, J. Larner, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *3*, 81–88.
- [10] P. Cohen, *The Enzymes* **1986**, *17 A*, 461–497.
- [11] P. J. Roach in *Enzymes* (Hrsg.: P. D. Boyer, E. G. Krebs), Academic Press, Orlando, **1986**, S. 499–539.
- [12] P. J. Roach, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2961–2968.
- [13] E. G. Krebs, *The Enzymes* **1986**, *17*, 3–18.
- [14] A. M. Edelman, D. K. Blumenthal, E. G. Krebs, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 567–613.
- [15] T. Hunter, *Methods Enzymol.* **1991**, *200*, 3–37.
- [16] R. Seger, N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14373–14379.
- [17] J. Pines, T. Hunter, *New Biol.* **1990**, *2*, 389–401.
- [18] R. B. Bourret, K. A. Borkovich, M. I. Simon, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 401–441.
- [19] D. C. LaPorte, P. E. Thorness, D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10563–10568.
- [20] S. K. Hanks, A. M. Quinn, T. Hunter, *Science* **1988**, *241*, 42–52.
- [21] S. K. Hanks, A. M. Quinn, *Methods Enzymol.* **1991**, *200*, 38–62.
- [22] D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3763–3765.
- [23] M. Castagna, W. K. Palmer, D. A. Walsh, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *55*, 193–199.
- [24] M. Leiser, C. S. Rubin, J. Erlichman, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1904–1908.
- [25] C. B. Bergman, N. Bhattacharyya, C. S. Rubin, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4648–4656.
- [26] D. W. Carr, Z. E. Hausken, E. D. C. Frascr, R. E. Stofko-Hahn, J. D. Scott, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13376–13382.
- [27] J. D. Scott, D. W. Carr, *News Physiol. Sci.* **1992**, *7*, 143–148.
- [28] Y. Takai, A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3692–3695.
- [29] Y. Nishizuka, *Science* **1992**, *258*, 607–614.
- [30] D. Mochly-Rosen, H. Khaner, J. Lopez, B. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14866–14868.
- [31] M. Lee, P. Nurse, *Trends Genet.* **1988**, *4*, 287–290.
- [32] P. Nurse, *Nature* **1990**, *344*, 503–508.
- [33] C. Norbury, P. Nurse, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 441–470.
- [34] C. Norbury, P. Nurse, *Curr. Biol.* **1992**, *1*, 23–27.
- [35] P. Cohen, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 453–508.
- [36] P. Cohen, P. T. W. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21435–21438.
- [37] S. Shenolikar, A. Nairn, *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **1990**, *1*–121.
- [38] P. Stralfors, A. Hiraga, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 295–303.
- [39] M. J. Hubbard, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 457–465.
- [40] A. A. Chisholm, P. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *971*, 163–169.
- [41] A. A. DePaoli Roach, *Adv. Protein Phosphatases* **1989**, *5*, 479–500.
- [42] J. S. Brugge, R. L. Erikson, *Nature* **1977**, *269*, 346–347.
- [43] M. S. Collett, R. L. Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 2021–2024.
- [44] A. D. Levinson, H. Oppermann, L. Levintow, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* **1978**, *15*, 561–572.
- [45] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1311–1315.
- [46] M. S. Collett, J. S. Brugge, R. L. Erikson, *Cell* **1978**, *15*, 1363.
- [47] H. Oppermann, A. R. Levinson, H. E. Varmus, L. Levintow, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 1804–1808.
- [48] L. R. Rohrschneider, R. N. Eisenman, C. R. Leitch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4479–4483.
- [49] A. P. Czernilofsky, A. D. Levinson, H. E. Varmus, J. M. Bishop, E. Tischer, H. M. Goodman, *Nature* **1980**, *287*, 198–203.
- [50] *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer 1989* (Hrsg.: R. A. Weinberg) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, **1989**.
- [51] H. Ushiro, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8363–8365.
- [52] G. Carpenter, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 881–914.
- [53] Y. Yarden, A. Ullrich, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 443–478.
- [54] J. Downward, Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrase, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, M. D. Waterfield, *Nature* **1984**, *307*, 521–527.
- [55] L. Ullrich, L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, J. Downward, E. L. V. Mayes, N. Whittle, M. D. Waterfield, P. H. Seeburg, *Nature* **1984**, *309*, 418–425.
- [56] G. Carpenter, L. King, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4884–4891.
- [57] B. M. Sefton, T. Hunter, K. Beemon, W. Eckhart, *Cell* **1980**, *20*, 807–816.
- [58] E. H. Fischer, H. Charbonneau, N. K. Tonks, *Science* **1991**, *253*, 401–406.
- [59] H. Saito, M. Streuli, *Cell Growth Differ.* **1991**, *2*, 59–65.
- [60] H. Charbonneau, N. K. Tonks, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1992**, *8*, 463–493.
- [61] N. K. Tonks, C. D. Diltz, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6731–6737.
- [62] N. K. Tonks, C. D. Diltz, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6722–6730.
- [63] H. Charbonneau, N. K. Tonks, S. Kumar, C. D. Diltz, M. Harrylock, D. E. Cool, E. G. Krebs, E. H. Fischer, K. A. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5252–5256.
- [64] H. Charbonneau, N. K. Tonks, K. A. Walsh, E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7182–7186.
- [65] M. L. Thomas, *Annu. Rev. Immunol.* **1989**, *7*, 339–369.
- [66] G. Barnea, O. Silvernoinen, B. Shaanan, A. M. Honegger, P. D. Canoll, P. D'Eustachio, B. Morse, J. B. Levy, S. LaForgia, K. Huebner, J. M. Musacchio, J. Sap, J. Schlessinger, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *13*, 1497–1506.
- [67] N. X. Krueger, H. Saito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7417–7421.
- [68] D. E. Cool, N. K. Tonks, H. Charbonneau, K. A. Walsh, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 5257–5261.
- [69] D. E. Cool, N. K. Tonks, H. Charbonneau, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7280–7284.
- [70] N. F. Zander, J. A. Lorenzen, D. E. Cool, N. K. Tonks, G. Daum, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6964–6970.
- [71] D. E. Cool, P. R. Andreassen, N. K. Tonks, E. G. Krebs, E. H. Fischer, R. L. Margolis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5422–5426.
- [72] K. Fujiwara, T. D. Pollard, *J. Cell Biol.* **1976**, *71*, 848–875.
- [73] N. Sato, S. Yonemura, T. Obinata, S. Tsukita, *J. Cell. Biol.* **1991**, *113*, 321–330.
- [74] N. F. Zander, D. E. Cool, C. D. Diltz, L. R. Rohrschneider, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Oncogene* **1993**, *8*, 1175–1182.
- [75] S. K. McDonough, S. Larsen, R. S. Brodey, N. D. Stock, W. D. Hardy, Jr., *Cancer Res.* **1971**, *31*, 953–956.
- [76] C. J. Sherr, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *948*, 225–243.
- [77] M. L. Kamps, J. E. Buss, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4625–4628.