

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Untersuchungen zum Mechanismus der  
liganden-vermittelten Transaktivierung des  
epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors**

**vorgelegt von  
Norbert Prenzel  
aus Münchberg**

**München, 2003**

### **Erklärung:**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung:**

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet

München, den 22.01.03

Norbert Prenzel

Dissertation eingereicht am: 01.02.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. A. Ullrich

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Ullrich

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Domdey

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2003

Meinen Eltern



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Rezeptortyrosinkinasen und deren Signalübertragung</b>	2
1.1.1	Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2	Rezeptoraktivierung und Signalübertragung	4
<b>1.2</b>	<b>Wachstumsfaktoren der EGF Familie und die proteolytische Prozessierung ihrer Vorläufer</b>	5
<b>1.3</b>	<b>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimäre G-Proteine</b>	7
<b>1.4</b>	<b>MAP Kinase Kaskaden und mitogene Signalübertragung</b>	8
<b>1.5</b>	<b>Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen</b>	11
1.5.1	RTK Aktivierung durch zelluläre Stresssignale	11
1.5.2	Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung	11
1.5.2.1	<i>Allgemeine mechanistische Betrachtungen zur EGFR Transaktivierung</i>	11
1.5.2.2	<i>Zelltypspezifische Elemente als Vermittler der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung</i>	12
1.5.2.3	<i>Die EGFR Transaktivierung vermittelt eine Vielzahl der GPCR-induzierten zellulären Ereignisse</i>	14
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung</b>	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	17
<b>2.1</b>	<b>Bezugsquellennachweis</b>	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Enzyme	18
2.1.3	Radiochemikalien	18
2.1.4	„Kits“ und Sonstiges	19
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Liganden	19
2.1.6	Medien und Puffer	19
2.1.7	Zellkulturmedien	20
2.1.8	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	20

2.1.9	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	22
2.1.9.1	<i>Bakterienstämme</i>	22
2.1.9.2	<i>Zelllinien</i>	22
2.1.9.3	<i>Antikörper</i>	23
2.1.10	Expressionsplasmide	25
2.1.10.1	<i>Ausgangsvektoren</i>	25
2.1.10.2	<i>Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren</i>	25
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	26
2.2.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	26
2.2.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	26
2.2.3	Enzymatische Behandlung von DNA	26
2.2.3.1	<i>Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen</i>	26
2.2.3.2	<i>Dephosphorylierung von 5'-Enden</i>	26
2.2.3.3	<i>Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase</i>	26
2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	27
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	27
2.2.6	DNA-Transfer in <i>E. coli</i> Bakterien	27
2.2.6.1	<i>Herstellung kompetenter E. coli Bakterien</i>	27
2.2.6.2	<i>Transformation von kompetenten E. coli Bakterien</i>	27
2.2.6.3	<i>Dauerkulturen von E. coli Bakterien</i>	27
2.2.7	Sequenzierung	27
2.2.8	Arbeiten mit RNA	28
2.2.8.1	<i>Präparation von RNA</i>	28
2.2.8.2	<i>Elektrophoretische Auftrennung von RNA</i>	28

## *Inhaltsverzeichnis*

---

2.2.8.3	<i>Northern Analyse</i>	28
2.2.8.4	<i>Transfer von RNA auf Nitrozellulosemembran</i>	28
2.2.8.5	<i>Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA</i>	29
2.2.9	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dATP	29
2.2.10	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	30
2.2.10.1	<i>PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten</i>	30
2.2.10.2	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	30
<b>2.3</b>	<b>Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen</b>	31
2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	31
2.3.2	Mykoplasmentest	31
2.3.3	Lipofectamine <sup>®</sup> -Transfektion von COS-7 Zellen	31
2.3.4	Kalziumphosphat-Transfektion	32
2.3.5	Bestimmung der Transfektionseffizienz	32
2.3.6	Retroviraler Gentransfer in Rat-1 Fibroblasten	32
2.3.7	Radioaktive Markierung von Zellen	33
<b>2.4</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	33
2.4.1	Triton X100-Lyse von Zellen	33
2.4.2	Proteinbestimmung	33
2.4.3	Immunpräzipitation von Proteinen	34
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	34
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow	35
2.4.6	Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	35
2.4.7	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	35
2.4.8	Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	35

<b>2.5</b>	<b>Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen</b>	36
2.5.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine	36
2.5.2	Bestimmung der katalytischen Aktivität der ERK2 MAP Kinase durch <i>in vitro</i> Kinase-Test	36
2.5.3	Bestimmung der katalytischen Aktivität der JNK MAP Kinase durch <i>in vitro</i> Kinase-Test	37
2.5.4	Messung der DNA-Synthese (Methyl-3H Thymidin Einbau)	37
2.5.5	Messung der Inositolphosphatakkumulation	37
2.5.6	Quantitative Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflußzytometrie	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	40
<b>3.1</b>	<b>Die Rolle der extrazellulären EGFR Domäne für die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung</b>	40
<b>3.2</b>	<b>Die Rolle von HB-EGF für die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalweiterleitung in COS-7 Zellen</b>	43
3.2.1	Die Rolle von HB-EGF bei der GPCR- und TPA-induzierten EGFR Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen	44
3.2.2	Die Rolle von HB-EGF bei der GPCR- und TPA-induzierten SHC und Gab1 Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen	46
<b>3.3</b>	<b>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induzieren die Metalloprotease-abhängige proteolytische Prozessierung von proHB-EGF</b>	49
3.3.1	Die GPCR-induzierte proteolytische Prozessierung von transient exprimiertem proHB-EGF in COS-7 Zellen	49
3.3.2	Die GPCR-induzierte proteolytische Prozessierung von endogenem proHB-EGF in COS-7 Zellen	52
<b>3.4</b>	<b>Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalweiterleitung ist abhängig von Batimastat-sensitiven Metalloproteasen</b>	54
3.4.1	Inhibition Zink-abhängiger Metalloproteasen beeinflusst die GPCR- und TPA-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen	54



3.4.2	Inhibition Zink-abhängiger Metalloproteasen blockiert die GPCR- und TPA-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen	55
3.4.3	Die GPCR-induzierte Inositolphosphatakkumulation in COS-7 Zellen ist ein HB-EGF- und Metalloprotease-unabhängiger Prozess	56
3.4.4	Kollagenasen sind nicht an der EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen beteiligt	58
<b>3.5</b>	<b>Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der GPCR-vermittelten Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, JNK und p38 in COS-7 Zellen</b>	<b>60</b>
3.5.1	Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten Erk2 Aktivierung in COS-7 Zellen	60
3.5.2	Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten JNK Aktivierung in COS-7 Zellen	62
3.5.3	Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten p38 Aktivierung in COS-7 Zellen	65
<b>3.6</b>	<b>Die Kalzium-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalgenerierung in COS-7 Zellen</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Die Rolle der EGFR Transaktivierung für die mitogene GPCR-induzierte Signalübertragung in humanen HaCaT Keratinozyten</b>	<b>69</b>
3.7.1	Die EGFR Transaktivierung in HaCaT Zellen	69
3.7.2	Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der GPCR-induzierten Erk2 Aktivierung in HaCaT Zellen	71
3.7.3	Die Rolle der EGFR Transaktivierung bei der Thrombin- und LPA-induzierten DNA Neusynthese in HaCaT Zellen	73
<b>3.8</b>	<b>Die Rolle der EGFR Transaktivierung für die GPCR-induzierte Signalübertragung in humanen MDA-MB 231 Brustkrebszellen</b>	<b>75</b>
3.8.1	Die EGFR Transaktivierung in humanen MDA-MB 231 Brustkrebszellen	75
3.8.2	Die GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in MDA-MB 231 Zellen ist Metalloprotease abhängig	77

3.8.3	Die EGFR Abhängigkeit der GPCR-vermittelten ERK2 Aktivierung in MDA-MB231 Zellen	78
3.8.4	Die GPCR-induzierte JNK und p38 Aktivierung in MDA-MB 231 Zellen verläuft EGFR unabhängig	79
3.8.5	Die EGFR Abhängigkeit der GPCR-vermittelten DNA Neusynthese in MDA-MB231 Zellen	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Liganden-unabhängige Mechanismen der EGFR Transaktivierung</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle der extrazellulären EGFR Domäne für die GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Rolle von Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren der EGF Familie bei der Transaktivierung des EGFRs</b>	<b>86</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle der Metalloprotease-vermittelten und Liganden-abhängigen EGFR Transaktivierung für die Signalübertragung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren</b>	<b>91</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>116</b>

---

# 1 EINLEITUNG

Vielzellige Organismen regulieren ihre Entwicklung und funktionelle Integrität durch das komplexe Zusammenwirken unterschiedlich differenzierter Zellen, die auf extrazelluläre Signale durch die Aktivierung spezifischer Signalwege reagieren. Entscheidende Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose werden durch verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter gesteuert, die an Zelloberflächenrezeptoren binden und diese aktivieren können (Ullrich und Schlessinger, 1990; Gutkind, 1998).

Die extrazelluläre Bindung von Liganden an spezifische Transmembranproteine koppelt Rezeptoraktivierung an intrazelluläre Signalkaskaden, reguliert die Genexpression und definiert so verschiedenste physiologische Vorgänge. Wird dieses fein abgestimmte Netzwerk durch Überexpression, Genamplifikation oder Genmutation wichtiger Signalmoleküle gestört, so führt dies häufig zu pathophysiologischen Veränderungen wie beispielsweise Krebs (Olayioye *et al.*, 2000; Bange *et al.*, 2001).

Zelloberflächenrezeptoren können aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in verschiedene Klassen eingeordnet werden. Neben den Rezeptortyrosinkinasen (RTK<sub>n</sub>), die über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität verfügen (van der Geer *et al.*, 1994), bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR<sub>n</sub>) mit mehr als 1000 Vertretern die größte Familie der Transmembranrezeptoren. GPCR<sub>n</sub> besitzen, im Gegensatz zu RTK<sub>n</sub>, keine eigene enzymatische Aktivität, sondern interagieren nach Aktivierung durch spezifische Liganden mit heterotrimären GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) die wiederum eine Vielzahl von zellulären Antworten regulieren (Gutkind, 1998).

## 1.1 Rezeptortyrosinkinasen und deren Signalübertragung

### 1.1.1 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind glykosylierte Transmembranproteine, die aus einem extrazellulären Bereich, einer hydrophoben Transmembranregion und einem intrazellulären Teil bestehen. Während die extrazelluläre Domäne für die Ligandenbindung verantwortlich ist, besteht der intrazelluläre Teil des Rezeptors aus der Kinasedomäne und verfügt zusätzlich zu möglichen Proteinphosphorylierungsstellen über strukturelle Motive, die Protein-Protein Interaktionen erlauben. Die Unterschiede in der Struktur, die sich hauptsächlich aus den Variationen der extrazellulären Domänen ergeben, wurden zur Einteilung der bislang 50 bekannten RTKs in 19 verschiedene Familien verwendet (van der Geer *et al.*, 1994; Abb. 1).

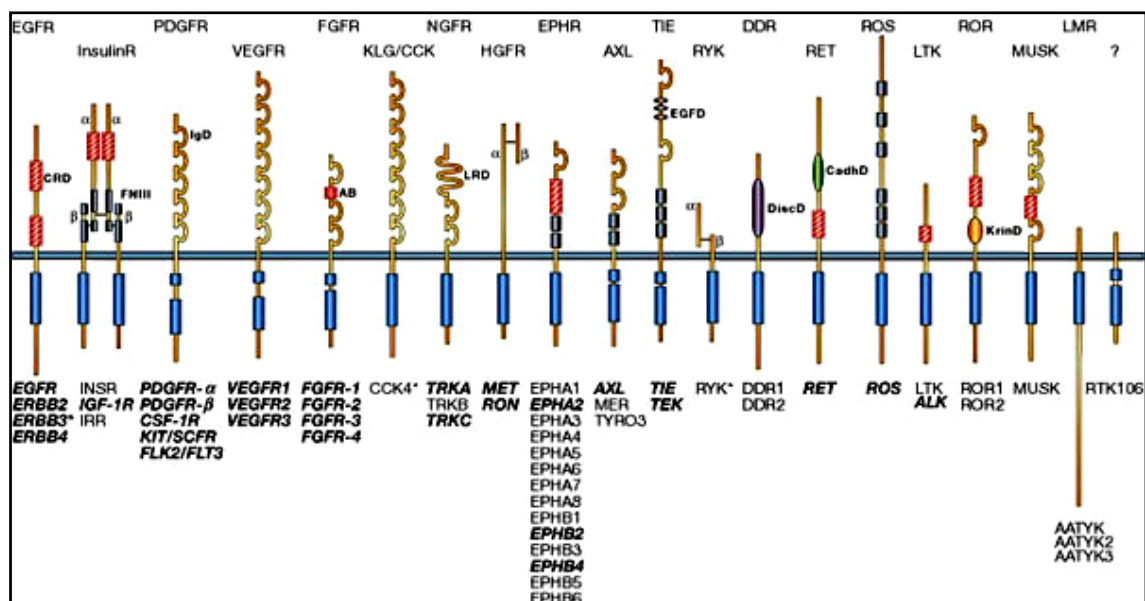


Abb.1: Die unterschiedlichen RTK-Familien.

Die Abbildung zeigt die 19 Subklassen, in welche RTKs aufgrund von Sequenzvergleichen in der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (modifiziert nach Wallasch, 1996).

---

So verfügt beispielsweise die EGFR (epidermal growth factor receptor) Familie über Cystein-reiche Domänen, während die FGF (fibroblast growth factor) Rezeptoren drei Immunglobulin-ähnliche Bereiche aufweisen. Diese Vielfalt an Strukturmotiven ist grundsätzlich entscheidend für das Erkennen der spezifischen Liganden durch den jeweiligen Rezeptor. Der zytoplasmatische Teil der RTKn setzt sich aus der Juxtamembranregion, der hochkonservierten Kinasedomäne und dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Ullrich und Schlessinger, 1990). Dabei enthält die Kinasedomäne die ATP-Bindungsstelle und katalysiert sowohl die Autophosphorylierung des Rezeptors, als auch die Tyrosinphosphorylierung von zellulären Substraten (Yarden und Ullrich, 1988). Der carboxyterminale Bereich von RTKn enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen, die nach Ligandenstimulation und Rezeptordimerisierung hochspezifische Bindungsstellen für andere Proteine darstellen (Heldin, 1995).

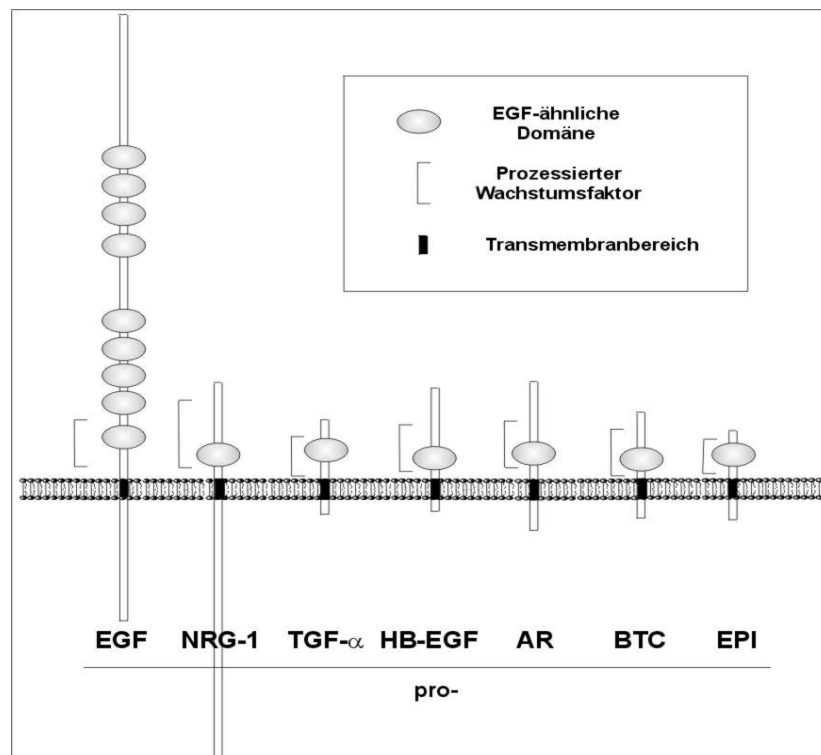
Die EGFR Familie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGFR (HERc, ErbB1; Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu; (Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3; Kraus *et al.*, 1989) und HER4 (ErbB4; Plowman *et al.* 1993). Neben HER2, für den bisher kein direkter Ligand beschrieben ist, nimmt HER3 innerhalb der Familie eine Sonderstellung ein, da dieser Rezeptor aufgrund von Punktmutationen innerhalb der katalytischen Domäne nur eine eingeschränkte enzymatische Aktivität aufweist (Guy *et al.*, 1994). Mitglieder dieser RTK Familie wurden mit verschiedenen Formen von Krebs in Verbindung gebracht und dienen dort entweder als prognostischer Marker oder als therapeutischer Angriffspunkt (Voldborg *et al.*, 1997; Prenzel *et al.*, 2001). Während HER2 Genamplifikation insbesondere für die Entstehung und Progression von Brustkrebs verantwortlich ist (Slamon *et al.*, 1987), wird der EGFR häufig in verschiedenen Krebsarten mit seinen Liganden überexprimiert. Die daraus resultierende erhöhte Rezeptoraktivität durch autokrine Wachstumsstimulation ist für Krebserkrankungen des Darms (Damstrup *et al.*, 1999), Lunge und Prostata (Seth *et al.*, 1999) und für epitheliale Zellen (Dong *et al.*, 1999) beschrieben.

### 1.1.2 Rezeptoraktivierung und Signalübertragung

Ligandenbindung an den extrazellulären Teil des Rezeptors führt zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren, die sich anschließend gegenseitig an spezifischen Tyrosinresten phosphorylieren. Mechanistisch werden diese Hormon-Rezeptor Interaktionen durch das sog. Bivalenzmodell erklärt, d.h. Liganden verfügen über einen hoch- und einen niedrig-affinen Bereich, mit denen sie zwei monomere Rezeptoren binden und einen ternären Komplex bilden können (Barbacci *et al.*, 1995; Tzahar *et al.*, 1997). Extrazelluläre Stimuli können auf diese Weise nicht nur Homo- sondern auch Heterodimere zwischen verschiedenen Rezeptoren einer Familie ermöglichen. Diese, vom stimulierenden Liganden abhängige, Heterodimerisierung erweitert das Spektrum an aktivierten intrazellulären Signalwegen beträchtlich. Eine Vielzahl von Studien konnten zeigen, dass die Mitglieder der EGFR Familie alle möglichen funktionellen Homo- bzw. Heterodimerkombinationen zur Signalübertragung nutzen. Interessanterweise sind insbesondere Heterodimere, die den EGFR bzw. HER2 enthalten für sehr starke biologische Antworten verantwortlich (Riese *et al.*, 1995; Wallasch *et al.*, 1995; Alroy und Yarden 1997). HER2, für den bisher kein direkter Ligand beschrieben wurde, ist somit auf Heterodimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern angewiesen und wird von den anderen Rezeptoren als Dimerisierungspartner bevorzugt (Graus-Porta *et al.*, 1997). HER2, dessen Überexpression alleine schon transformierend wirkt (Hudziak *et al.*, 1987) wird durch den EGFR nach EGF Stimulation transphosphoryliert (Stern *et al.*, 1988) oder kooperiert mit HER3 bei der Transformation von NIH3T3 Zellen (Alimandi *et al.*, 1995). Zusätzliche Variabilität erfährt das Rezeptornetzwerk aus den vier RTKs der EGFR Familie durch eine Vielzahl von Liganden, die spezifisch bestimmte Rezeptordimere und nachgeschaltete Signalwege aktivieren können.

## 1.2 Wachstumsfaktoren der EGF Familie und die proteolytische Prozessierung ihrer Vorläufer

Die Rezeptoren der EGFR Familie werden von EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren reguliert, die aufgrund struktureller Merkmale und Rezeptoraffinitäten in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Während EGF, TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) und Amphiregulin (AR) spezifisch den EGFR binden, regulieren HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), Epiregulin und Betacellulin die Aktivität des EGFRs und HER4. Die sog. Neureguline (auch: Heregulin/NDF (neu differentiation factor)) binden dagegen HER3 und HER4. Charakteristisch für alle Mitglieder dieser Ligandenfamilie sind eine oder mehrere Cystein-reiche EGF-ähnliche Domänen (Engel, 1989). Sechs dieser Cysteine bilden drei Disulfidbrücken aus, die aufgrund Ihrer Struktur entscheidend für die Bindung der Wachstumsfaktoren an den Rezeptor sind (Massagué und Pandiella, 1993). Grundsätzlich werden die Liganden der EGF Familie als glykosylierte transmembrane Vorläuferproteine synthetisiert (Abb. 2).



**Abb. 2: Die Familie der EGF-ähnlichen Liganden.**

Die Abbildung zeigt schematisch einige Vorläufer der EGF-ähnlichen Liganden und den Bereich, der nach proteolytischer Spaltung freigesetzt wird. Abk.: AR, Amphiregulin; EGF, Epidermal growth factor; HB-EGF, Heparin-binding EGF-like growth factor; NRG-1, Neu-regulin-1; TGF- $\alpha$ , Transforming growth factor- $\alpha$ ; Betacellulin, BTC; Epiregulin, EPI.

---

Durch die proteolytische Spaltung dieser Vorläufer an der Zelloberfläche werden lösliche und aktive Liganden gebildet, die anschließend in auto- oder parakriner Weise die entsprechenden Rezeptoren aktivieren können (Massagué und Pandiella, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Prozessierung von TGF- $\alpha$  oder HB-EGF durch Stimulation von Zellen mit Phorbol ester, Serum oder dem Kalzium-Ionophor Ionomycin induziert wird (Pandiella und Massagué, 1991a; Pandiella und Massagué, 1991b; Goishi *et al.*, 1995).

Zum Teil sind durch die Aminosäuresequenz der Ligandenvorläufer bereits strukturelle Elemente für die effiziente proteolytische Prozessierung vorgegeben. So konnten für proTGF $\alpha$ , proEGF und den NRG Vorläufer der C-terminus sowie die juxtamembrane Region als wichtige Bereiche für deren effiziente proteolytische Prozessierung identifiziert werden. Die proteolytische Reifung von proHB-EGF und proAmphiregulin verläuft dagegen unabhängig von deren zytoplasmatischen Domänen (Bosenberg *et al.*, 1992; Arribas *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2000; Vecchi *et al.*, 1998; Dethlefsen *et al.*, 1998).

Experimente mit synthetischen Inhibitoren konnten sowohl Serinproteasen als auch Metalloproteasen als kritische Elemente für die Freisetzung von EGF-ähnlichen Liganden identifizieren (Pandiella *et al.*, 1992; Arribas *et al.*, 1996; Dempsey *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigen ADAM17/TACE-gendefiziente Mäuse (Peschon *et al.*, 1998) vergleichbar phenotypische Veränderungen zu Mäusen mit einem TGF $\alpha$  Gendefekt (Luetteke *et al.*, 1993) oder Tieren ohne funktionellen EGFR (Sibilia *et al.*, 1995; Threadgill *et al.*, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass diese phenotypische Übereinstimmungen mit der Tatsache einhergehen, dass ADAM17<sup>-/-</sup> Zellen proTGF $\alpha$  nicht mehr prozessieren können. Weitere Hinweise auf eine zentrale Rolle der ADAM Proteasen bei der Bildung EGF-ähnlicher Liganden zeigten Mekada und Kollegen, die mittels Überexpression einer dominant negativen ADAM9 Mutante die Phorbol ester-induzierte proHB-EGF Prozessierung vollständig unterdrücken konnten (Izumi *et al.*, 1998).



### 1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimäre G-Proteine

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRn) bilden mit mehr als 1000 verschiedenen Mitgliedern die größte Gruppe unter den Zelloberflächenrezeptoren. Unter den Liganden, die diese Rezeptoren regulieren, sind Neurotransmitter, Hormone, Duft- und Geschmacksstoffe, biologisch aktive Lipide, Photonen und Wachstumsfaktoren (Gutkind, 1998). GPCRn, die auch als 7-Transmembranrezeptoren bekannt sind, weisen ein bemerkenswertes strukturelles Grundprinzip auf, bei dem sieben Transmembranhelices durch intra- bzw. extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, die für die Rezeptor-Effektor bzw. Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen verantwortlich sind (Dohlman *et al.*, 1987). Das Musterbeispiel für einen GPCR-regulierten Vorgang ist der Sehvorgang, der durch den Photorezeptor Rhodopsin vermittelt wird. Die lichtinduzierte Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zu seinem all-*trans*-Isomer führt hier zur Verlagerung der Transmembranhelices und resultiert in einer Konformationsänderung der intrazellulären Rezeptorschleifen, wodurch die Interaktion mit heterotrimären G-Proteinen ermöglicht wird (Farrens *et al.*, 1996; Bourne, 1997). Diese Interaktion ist für GPCRn, die im Gegensatz zu RTKn über keine eigene enzymatische Aktivität verfügen, essentiell um an verschiedene intrazelluläre Signalwege zu koppeln.

Die heterotrimären G-Proteine gehören zu einer Familie von GTPasen, die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bestehen. Während die  $\alpha$ -Untereinheit GDP bzw. GTP binden und zusätzlich GTP hydrolysieren kann, bilden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten ein funktionelles Dimer (Bourne, 1997). Im nicht-aktivierten Zustand assoziiert  $G\alpha$ -GDP mit dem  $\beta\gamma$ -Dimer. Aktivierung eines GPCR führt zur Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein und resultiert im GDP/GTP-Austausch in der  $G\alpha$ -Untereinheit. In Folge dieser Aktivierung dissoziiert  $G\alpha$ -GTP vom  $\beta\gamma$ -Dimer worauf beide funktionellen Untereinheiten mit ihren zellulären Effektoren wechselwirken können (Conklin und Bourne, 1993; van Biesen *et al.*, 1996).

Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz sind die 16 bekannten  $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Klassen eingeteilt:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/z}$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$  (Dhanasekaran *et al.*, 1998).  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_{i/z}$  Untereinheiten können unter anderem die Aktivität der Adenylatzyklase positiv bzw. negativ beeinflussen und so die Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) steuern (Lustig *et al.*, 1993; van Biesen *et al.*, 1996).

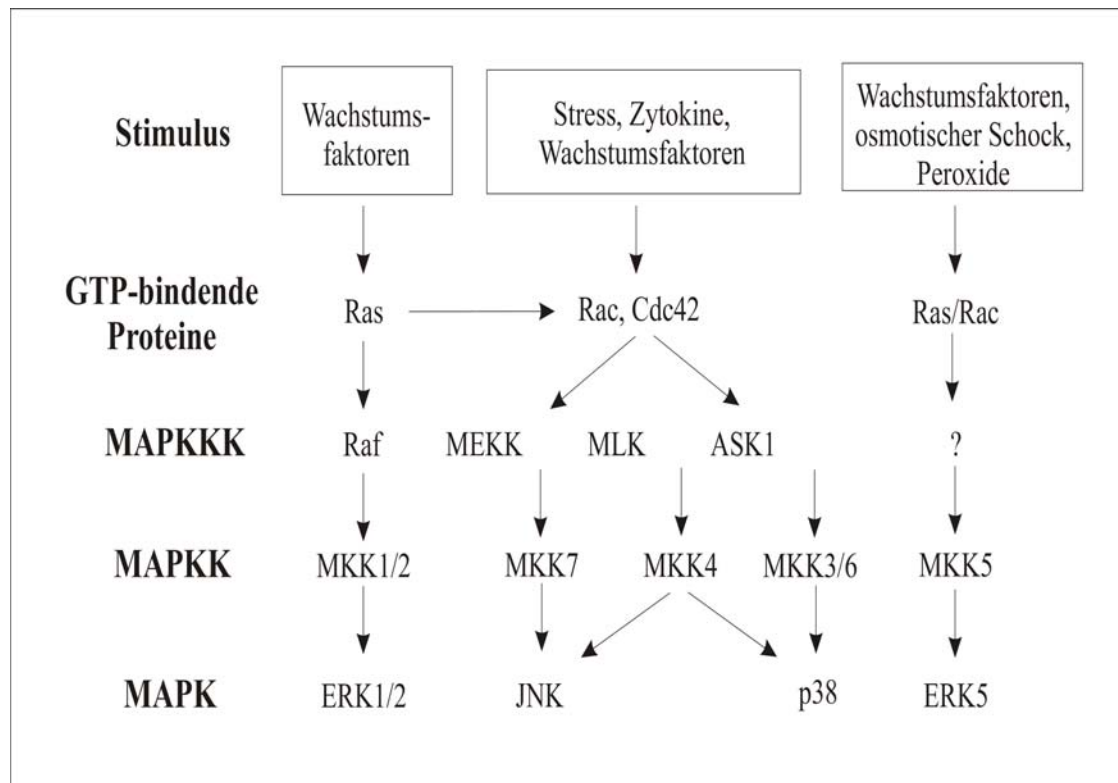
---

PhospholipaseC $\beta$ , ein Enzym, das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diazylglyzerin (DAG) spaltet und so die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung der Proteinkinase C reguliert, wurde dagegen als direkter G $\alpha_q$  Effektor beschrieben (Cockcroft und Thomas, 1992). G $\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten wurden wiederholt mit zytoskeletalen Veränderungen durch Aktin-Stressfaserbildung und der Ausbildung von Fokalkontakten in Verbindung gebracht (Buhl *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 1999).

#### 1.4 MAP Kinase Kaskaden und mitogene Signalübertragung

Zelloberflächenrezeptoren regulieren eine Vielzahl linearer evolutionär hochkonservierter Signalkaskaden, die Adapterproteine, kleine GTPasen und Kinasen beinhalten und extrazelluläre Ligandenstimulation mit Gentranskription in Verbindung bringen. Diese sog. Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Wege sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation von Wachstum, Differenzierung und zellulärer Transformation (Dhanesekaran und Reddy, 1998; van Biesen *et al.*, 1996). Musterbeispiel für eine MAPK Kaskade ist die Aktivierung der ERK Kinasen (Extrazellulär-regulierten Kinasen) durch Rezeptortyrosinkinasen. Nach der Rezeptorstimulation aktiviert der Austauschfaktor Sos die kleine GTPase Ras (Downward, 1997). Membranassoziiertes und aktiviertes Ras kann mit der Serin/Threoninkinase Raf-1 interagieren, die nach Translokation zur Plasmamembran phosphoryliert und aktiviert wird (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). Anschließend werden die dualspezifischen Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinasen 1 und 2) durch Raf-1 an bestimmten Serinresten phosphoryliert und modifizieren ERK1 und ERK2 an Tyrosin- und Threoninresten des regulatorisch wichtigen TEY-Motifs (Robinson und Cobb, 1997). Die MAP Kinasen translokieren daraufhin in den Zellkern, wo sie durch Serin/Threoninphosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (TFn) entscheidend zur Zellproliferation beitragen (Treisman, 1996; Robinson und Cobb, 1997).

Parallel zur ERK Kinase Kaskade werden in höheren eukaryotischen Systemen abhängig vom aktivierenden Stimulus eine Vielzahl anderer MAP Kinase Signalwege aktiviert (Abb. 3).



**Abb. 3: Die verschiedenen MAP Kinase Signalwege.**

Schematische Darstellung über die wichtigsten MAP Kinase Signalwege in eukaryontischen Zellen. Im Gegensatz zur gut charakterisierten Ras ERK Signalkaskade sind die an der JNK, p38 und ERK5 Aktivierung beteiligten Kinasen weniger gut bzw. noch nicht definiert (Schaefer und Weber, 1999).

Die beteiligten Proteinkinasen besitzen einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden Proteinen des ERK Signalweges. Die den ERK1 und 2 homologen Kinasen sind die nach ihrem Hauptsubstrat c-jun benannten JNK (c-jun N-terminal kinase) Kinasen, sowie die nach ihrer Molekülmasse bezeichneten p38 Kinasen (Davis, 2000; Ono und Han, 2000). Während ERK1/2 in der Regel durch Wachstumsfaktoren oder Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRn) aktiviert werden, wurde die Aktivierung von JNK1/2 und p38-Kinasen zunächst für verschiedene Formen des zellulären Stresses wie UV-Bestrahlung, osmotischem Schock oder proteininflammatorische Zytokine untersucht (Dérjard *et al.*, 1994; Su und Karin, 1996).

---

Zusätzlich zur Stress-induzierten JNK Aktivierung konnten weitere Studien zeigen, dass auch RTKn, wie beispielsweise der EGFR, und verschiedene GPCRn die Aktivität der JNK bzw. p38 Signalkaskade regulieren können (Minden *et al.*, 1995; Logan *et al.*, 1997; Kanda *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2001). Vergleichbar zum Erk Signalweg sind diese Signalkaskaden für zelluläre Vorgänge wie Apoptose, Entzündungsprozesse und die Tumorentwicklung absolut essentiell (Davis, 2000; Ono und Han, 2000).

Trotz ihrer Vielfalt und nahezu ubiquitären Expression ist die Bedeutung der GPCRn und ihrer Liganden für zelluläres Wachstum, Transformation und Differenzierung erst in den letzten Jahren intensiver untersucht worden (Crespo *et al.*, 1994; Dhanasekaran *et al.*, 1998; Gutkind, 1998). Bisher konnte gezeigt werden, dass viele Liganden wie Thrombin und Lysophosphatidylsäure (LPA) die Proliferation von Fibroblasten und anderen Zelllinien induzieren (LaMorte *et al.*, 1993; Dhanasekaran *et al.*, 1998). Von GPCRn aller Klassen wurde ein positiver Einfluß auf Zellwachstum meist durch Aktivierung des Ras-MAP Kinase Signalweges beschrieben (Dhanasekaran *et al.*, 1998; Gutkind, 1998).

Weiterhin wurden GPCR Liganden mit Tumorentstehung oder Tumorwachstum in Verbindung gebracht, z.B. wirkt LPA in Brustkrebszellen (Goetzl *et al.*, 1999) und in Ovarialkarzinomzelllinien als starkes Mitogen (Erickson *et al.*, 2001), während Neuropeptide wie Bombesin und Bradykinin die Zellproliferation beim kleinzelligen Lungenkrebs stimulieren (Sethi *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995). Die Expression des Thrombinrezeptors PAR (Protease aktivierter Rezeptor) konnte dagegen insbesondere mit der Invasivität von Brustkrebszellen assoziiert werden (Evan-Ram *et al.*, 1998; Henrikson *et al.*, 1999). Bestimmte aktivierende Mutationen in GPCRn wie z.B. beim  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptor induzieren bereits in Abwesenheit des entsprechenden Liganden unkontrolliertes Wachstum, so dass die zugehörigen Rezeptoren wie viele RTKn zu den Proto-Onkogenen gezählt werden (Allen *et al.*, 1991). Ebenso verfügen die meisten konstitutiv-aktiven  $G\alpha$ -Untereinheiten über ein gewisses onkogenes Potential, wobei dieses bei  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  am stärksten ausgeprägt ist (Lyons *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1994).

---

## 1.5 Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Um die Vielzahl extrazellulärer Signale auf eine eingeschränkte Anzahl von Signalwegen zu übertragen kommunizieren verschiedene Klassen von Zelloberflächenrezeptoren miteinander. In diesem komplexen Netzwerk konnten der EGFR bzw. HER2 als kritische Elemente für die Signalübertragung verschiedener GPCR, Zytokinrezeptoren, Integrine, Ionenkanäle und RTKn identifiziert werden (Gschwind *et al.*, 2001; Carpenter 1999; Prenzel *et al.*, 2001).

### 1.5.1 RTK Aktivierung durch zelluläre Stresssignale

Bereits 1989 konnte gezeigt werden, dass der EGFR und HER2 aktiviert und tyrosinphosphoryliert werden wenn Zellen einem sog. osmotischen Schock ausgesetzt werden (King *et al.*, 1989). Weitere nicht-physiologische Stimuli wie UV- und  $\gamma$ -Strahlung, Membrandepolarisation und eine Reihe von Oxidantien wurden ebenfalls mit der Regulation des Aktivierungszustandes dieser RTKn in Verbindung gebracht (Sachsenmeier *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996). Mechanistisch wurde für diese Art der Rezeptoraktivierung ein Liganden-unabhängiger Weg über die Inaktivierung von RTK antagonistischen Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) und die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies postuliert (Knebel *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997).

### 1.5.2 Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung

#### ***1.5.2.1 Allgemeine mechanistische Betrachtungen zur EGFR Transaktivierung***

Neben den Rezeptortyrosinkinasen regulieren auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zelluläres Wachstum, Differenzierung und Gentranskription über den Ras-MAP Kinase Weg (Dhanasekaran *et al.*, 1998).

Zudem ist bekannt, dass die Signalwege zur Ras Aktivierung beider Rezeptorklassen frühzeitig nach Ligandenstimulation konvergieren, und hierfür die Bildung von membranständigen Proteinkomplexen aus den Adapterproteinen SHC und Grb2

zusammen mit dem Austauschfaktor Sos kritische Elemente darstellen (Howe *et al.*, 1993; Crespo *et al.*, 1994).

Da diese Signalschritte durch den generellen Tyrosinkinaseinhibitor Genistein unterbunden werden konnten (Van Corven *et al.*, 1993) stellte sich die Frage welche Kinasen für die GPCR-induzierte MAP Kinase Aktivierung verantwortlich sind. 1996 konnte H. Daub den EGFR als essentielles Element der LPA, Endothelin-1 (ET-1) und Thrombin-vermittelten Signalgenerierung identifizieren (Daub *et al.*, 1996). Spezifische Inhibition des EGFRs durch das Rezeptor-selektive Tyrphostin AG1478 bzw. durch Expression einer dominant-negativen Rezeptormutante blockierte die GPCR-induzierte MAP Kinase Aktivierung, Gentranskription und Zellwachstum. Um diesen G-Protein-vermittelten Prozeß von der EGF-induzierten Rezeptoraktivierung zu unterscheiden wurde er als EGFR Transaktivierung beschrieben.

Generell zeichnet sich die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung durch einen schnellen und transienten Verlauf (Daub *et al.*, 1997; Keely *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998) und die Beteiligung der intrinsischen EGFR Kinaseaktivität aus (Tsai *et al.*, 1997; Zwick *et al.*, 1997, Eguchi *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass im Zellkulturmedium nach G-Protein Stimulation keine EGF-ähnlichen Liganden detektiert werden konnten (Tsai *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1998) führte allgemein zu der Annahme eines ausschließlich aus intrazellulären Elementen bestehenden Liganden-unabhängigen Mechanismus (Zwick *et al.*, 1999; Carpenter *et al.*, 1999).

#### ***1.5.2.2 Zelltypspezifische Elemente als Vermittler der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung***

Zusätzlich zum EGFR wurden eine Vielzahl zytoplasmatischer Proteine beschrieben, die die GPCR-induzierte MAP Kinase Aktivierung vermitteln wie etwa Pyk2 (Lev *et al.*, 1995; Dikic *et al.*, 1996) oder Mitglieder der Src Kinase Familie (Luttrell *et al.*, 1996; Dikic *et al.*, 1996). Zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und der Serin/Threoninkinase PKC wurden sie wiederholt in einer Reihe von Zelltypen für die EGFR Transaktivierung nach GPCR Stimulation verantwortlich gemacht (Zwick *et al.*, 1999).

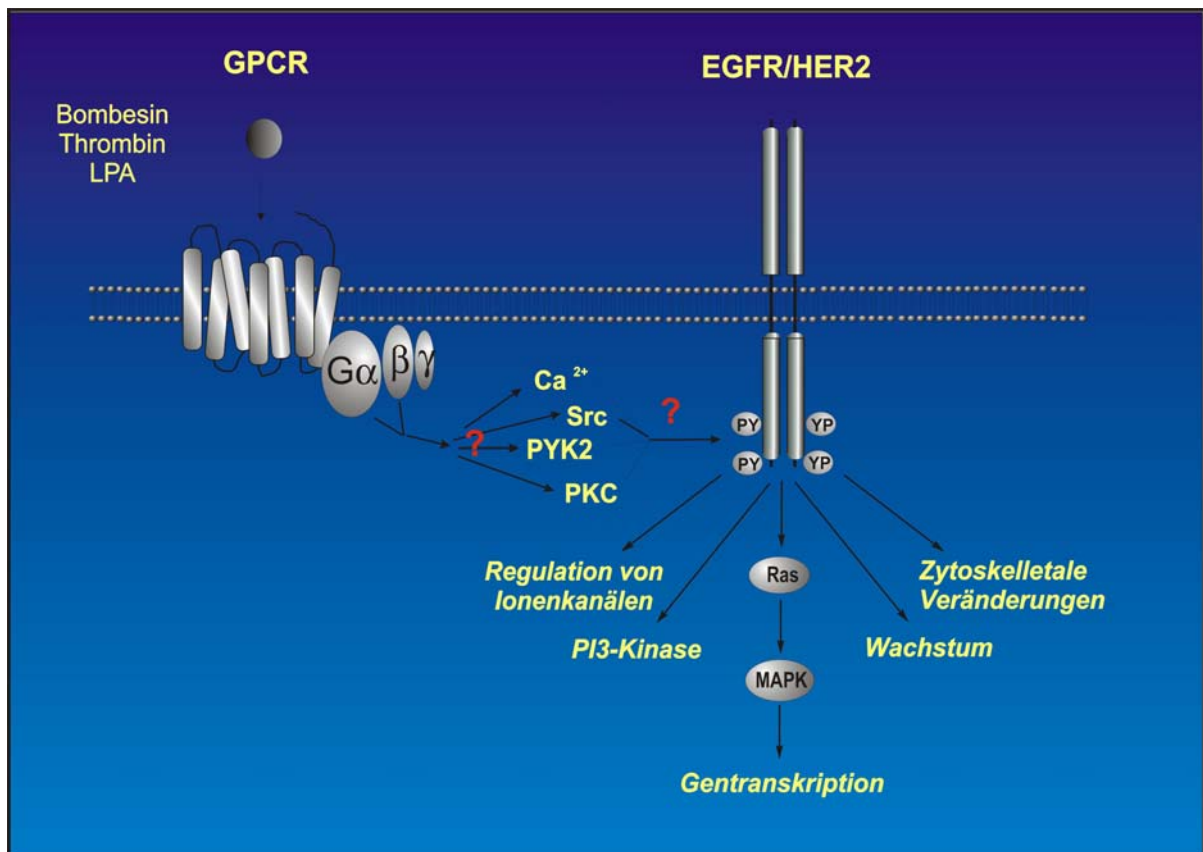
Src Kinasen wurden in verschiedenen Zelltypen als wichtige Elemente bei der GPCR-induzierten MAP Kinase Aktivierung identifiziert (Grosse *et al.*, 2000; Mannon *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Studien, die zeigen, dass die  $G_i$ -vermittelte EGFR Transaktivierung über  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und Src Kinasen verläuft (Luttrell *et al.*, 1997), konnten H. Daub und Kollegen in COS-7 Zellen keinen Effekt des Src Kinase Inhibitors PP1 auf die LPA-induzierte Transaktivierung feststellen (Daub *et al.*, 1997). In glatten Gefäßmuskelzellen ist die AngiotensinII (ATII)-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung PP1-sensitiv (Bokemeyer *et al.*, 2000) und Src komplexiert mit dem EGFR nach ATII Stimulation (Eguchi *et al.*, 1998). Die wichtige Rolle von Src wird weiterhin durch Arbeiten von Parsons und Mitarbeitern unterstrichen, die der Src Phosphorylierungsstelle an Tyr845 des EGFRs eine entscheidende Rolle für das LPA- und EGF-induzierte Zellwachstum unabhängig von der EGFR Kinaseaktivität zuweisen (Tice *et al.*, 1999).

$Ca^{2+}$  Ionen und die  $Ca^{2+}$ -abhängige zytoplasmatische Tyrosinkinase Pyk2 wurden vielfach mit der EGFR Transaktivierung in Verbindung gebracht (Prenzel *et al.*, 2001). Während alleine  $Ca^{2+}$  Einstrom EGFR Transaktivierung (Rosen und Greenberg, 1996) und, davon abhängig, die MAP Kinase Aktivierung induziert (Zwick *et al.*, 1997), ist  $Ca^{2+}$  ein kritischer Faktor für die ET1-, ATII- und Carbachol-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung (Eguchi *et al.*, 1998 & 1999; Matsubara *et al.*, 1998; Keely *et al.*, 2000). Die Rolle von Pyk2 wurde bisher in der Literatur kontrovers diskutiert. Einer Studie, die auf die kritische Rolle dieser Tyrosinkinase bei EGFR Transaktivierung hinweist (Soltoff, 1998), stehen Arbeiten entgegen, die die Pyk2 Aktivierung dem EGFR nachgeschaltet (Keely *et al.*, 2000), bzw. auf parallel zur EGFR Tyrosinphosphorylierung existierenden Wegen (Zwick *et al.*, 1999) hindeuten.

Hauptsächlich  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren wie der M1R vermitteln die EGFR Transaktivierung über die Serin/Threonin (Ser/Thr) Kinase PKC (Tsai *et al.*, 1997). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit anderen Liganden wie beispielweise UTP oder GRH (Gonadotrophin-releasing hormone) erzielt (Soltoff, 1998; Grosse *et al.*, 2000). Unklar bei diesen Untersuchungen bleibt allerdings wie die Ser/Thr Kinase PKC zur Erhöhung der EGFR Tyrosinphosphorylierung beitragen kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass verschiedene Elemente abhängig vom aktivierten GPCR und dem zellulären Kontext in unterschiedlichem Ausmaß an der EGFR Transaktivierung beteiligt sind (Abb. 4). Im Gegensatz dazu konnten Elemente, die Zelltyp-unabhängig die GPCR-induzierte Transaktivierung vermitteln, noch nicht charakterisiert werden.



**Abb. 4: Zelltypspezifische Elemente vermitteln die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung**

Eine Reihe von zytoplasmatischen Elementen werden, je nach aktiviertem GPCR und Zelltyp, für die G-Protein-vermittelte EGFR Transaktivierung verantwortlich gemacht.

### 1.5.2.3 Die EGFR Transaktivierung vermittelt eine Vielzahl der GPCR-induzierten zellulären Ereignisse

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren regulieren über die Transaktivierung des EGFR eine Vielzahl zellulärer Vorgänge (Abb. 4). Hauptaugenmerk dabei war der am besten charakterisierte MAP Kinase Signalweg über Ras zu den MAP Kinasen ERK 1 und 2.



Ausgehend von der Studie in Rat-1 Fibroblasten, in der die LPA-, Thrombin- und ET-1-induzierte EGFR Transaktivierung als essentieller Schritt zu ERK Aktivierung und mitogener Signalübertragung gezeigt wurde (Daub *et al.*, 1996), folgten eine Reihe von Untersuchungen in unterschiedlichen Zelltypen nach Stimulation verschiedenster GPCR (Tabelle 1).

GPCR Ligand	Zelltyp bzw. Gewebe	Referenz
ET-1, LPA, Thrombin	Rat-1	Daub <i>et al.</i> , 1996
Bradykinin	PC-12	Zwick <i>et al.</i> , 1997
Bombesin, Carbachol, LPA	COS-7	Daub <i>et al.</i> , 1997
AngiotensinII	Gefäßmuskelzellen	Eguchi <i>et al.</i> , 1998
Carbachol	T-84	Keely <i>et al.</i> , 1998
LPA	HeLa	Cunnick <i>et al.</i> , 1998
Substance P	U-373 MG	Castagliuolo <i>et al.</i> , 2000
IL-8	SK-OV-3	Venkatakrishnan <i>et al.</i> , 2000
ET-1	OVCA 433	Vacca <i>et al.</i> , 2000

**Tabelle 1: Die GPCR-induzierte ERK Aktivierung wird in unterschiedlichen Zellsystemen über die EGFR Transaktivierung vermittelt.**

Weiterhin konnten Eguchi und Kollegen zeigen, dass der EGFR ebenfalls die ATII-induzierte p38, nicht allerdings die JNK Aktivierung in glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt (Eguchi *et al.*, 2001). Neben den linearen MAP Kinase Wegen spielt die Regulation der PI-3 Kinase als wichtiger anti-apoptotischer Signalweg eine große Rolle. Die PI-3 Kinase Aktivierung nach LPA Stimulation wird in COS-7 Zellen durch den EGFR vermittelt (Daub *et al.*, 1997), da die Komplexbildung zwischen dem aktivierten EGFR, Gab1 und der regulatorischen PI-3K Untereinheit essentiell für deren Aktivierung sind (Laffargue *et al.*, 1999). Zelluläre Effektoren dieser Lipidkinase wie die Serin/Threonin Kinase Akt und die p70S6 Kinase wurden als weitere Elemente identifiziert, deren Aktivierung von der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach ATII bzw. ET-1 Stimulation abhängt (Eguchi *et al.*, 1999; Iwasaki *et al.*, 1999).

Durch einzelne Untersuchungen, die EGFR-vermittelte zytoskeletale Veränderungen wie z.B. die Ausbildung von Aktinstressfasern (Gohla *et al.*, 1998 & 1999) und die Regulation von Kaliumkanälen (Keely *et al.*, 1998) nach Stimulation von GPCRn zeigen, konnte die zentrale Rolle des EGFRs bei der Signalübertragung von 7-Transmembranrezeptoren unterstrichen werden (Abb. 4).

## 1.6 Zielsetzung

Die Ergebnisse von Henrik Daub und Esther Zwick (diese Arbeitsgruppe; d. AG) zeigten zusammen mit weiteren im vorigen Kapitel zitierten Arbeiten, dass die Transaktivierung des EGFRs nach GPCR Stimulation für eine Vielzahl zellulärer Ereignisse essentiell benötigt wird. Weiterhin ist inzwischen generell akzeptiert, dass die EGFR Transaktivierung ein allgemeines Charakteristikum der G-Protein-vermittelten Signalübertragung darstellt, welches abhängig von den verwendeten Zelltypen, unterschiedliche Elemente zur EGFR Tyrosinphosphorylierung benötigt (Zwick *et al.*, 1999; Carpenter 1999). Grundsätzlich wurde aufgrund des schnellen Verlaufs der Transaktivierung und der Tatsache, dass Liganden für den EGFR im Zellkulturüberstand nach GPCR Aktivierung nicht detektierbar sind ein ausschließlich intrazellulärer, liganden-unabhängiger, Mechanismus angenommen (Daub *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit sollten somit Elemente identifiziert werden, die die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung vermitteln, und ein allgemeines Zelltyp-unabhängiges mechanistisches Konzept zur G-Protein-vermittelten EGFR Transaktivierung erarbeitet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG1295	Calbiochem, Bad Soden
AG1478	Calbiochem, Bad Soden
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Batimastat (BB94)	British Biotech, Oxford
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
GF109203X	LC Laboratories, Grünberg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Hygromycin A	Sigma, Taufkirchen
Kalzium Ionophor	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
MBP (myelin basic protein)	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen

---

Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
PP1	Calbiochem, Bad Soden
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
TPA (tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin, TPCK-behandelt	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	>5000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ , $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-L-Methionin}$	>1000 Ci/mmol

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

### 2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

ECL Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
Kulturgefäße, Plastik	Nunclon, Dänemark
Kulturgefäße, Plastik	Falkon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Poly Prep <sup>®</sup> Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Dowex AG1-X8	Bio-Rad, München
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Roti-Quick-Kit	Roth, Karlsruhe
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
T7 Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

Bombesin	Sigma, Taufkirchen
Carbachol	Sigma, Taufkirchen
EGF (Maus)	Toyoba, Japan
LPA	Sigma, Taufkirchen
PDGF B/B	Boehringer, Mannheim
Thrombin	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E.coli* Bakterien

LB-Medium	1,0	%	Trypton
	0,5	%	Hefeextrakt
	1,0	%	NaCl
			pH 7,2

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	100	µg/ml
Chloramphenicol	30	µg/ml

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum wurde von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose 5% oder 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose 5% FCS, 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat.

RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin.

Einfriermedium  
90% FCS, 10% DMSO.

### 2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
			pH 6.96 (NaOH)
Denhardt (100x)	2,0	%	Polyvinylpyrrolidon
	2,0	%	Ficoll
	2,0	%	BSA
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glyzerin
	100,0	mM	EDTA pH 8,0
Laemmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β-Mercaptoethanol

---

Schägger-Probenpuffer (2x)	50	mM	Tris/HCl pH 6,8
	4,0	%	SDS
	12,0	%	Glyzerin
	2,0	%	$\beta$ -Mercaptoethanol
Schägger Kathodenpuffer	0,1	M	Tris/HCl pH 8,25
	0,1	M	Tricin
	0,1	%	SDS
Schägger Anodenpuffer	0,2	M	Tris/HCl pH 8,9
MOPS (10x)	200,0	mM	Morpholinopropansulfonsäure
	80,0	mM	Natriumacetat
	10,0	mM	EDTA pH 8,0
			pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	150,0	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	50	mM	Tris
	0,05	%	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
SSC (20x)	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
TAE (10x)	400	mM	Tris/Acetat
	10	mM	EDTA
			pH 8,0 (Eisessig)
TE	10,0	mM	Tris/HCl pH 8,0
	1,0	mM	EDTA pH 8,0

---

Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918,0 mM	Glycin
	1,0 %	SDS

### 2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und von Referenzen tabellarisch aufgeführt.

#### 2.1.9.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> 298 F'	F+, Kanr, Lambdar, recA-, tonA-lacI-	Genentech, San Francisco
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	F'F'/endA1, hsd17, (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), Kanr, Ampr,	Stratagene

#### 2.1.9.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
Bosc23	modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, amphotrophen Retroviren	Markowitz <i>et al.</i> , 1988
COS-7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
HaCaT	spontan immortalisierte humane Keratinocyten	Boukamp <i>et al.</i> , 1988
MDA-MB231	humane maligne Mammakarzinom- Zelllinie	ATCC HTB-26
Rat-1	immortalisierte Rattenfibroblasten	R. Friedrich



### 2.1.9.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

<b>Antikörper</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
EGFR 108.1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	Lax <i>et al.</i> , 1989
EGFR 1005	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid (AS 1006-1116) des humanen EGFRs	Santa Cruz, Biotech., Inc.
EGFR UBI	Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytoplasmatischen Domäne als Fusionsprotein	UBI, Lake Placid
EGFR ICR-R3 (EGFR-E)	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	Mateo <i>et al.</i> , 1997
ERK2	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz, Biotech., Inc.
Gab1	Kaninchen, polyklonal, gegen ein GST-Fusionsprotein mit den AS 23-189 von humanem Gab1	A. Lankenau und C. Wallasch, d. AG
HA Mannheim	Maus, monoklonal (Klon 12CA5) gegen das Hämagglutinin Epitop	Boehringer,
HB-EGF	Kaninchen, polyklonal, gegen die intrazelluläre Domäne des proHB-EGF	Santa Cruz, Biotech., Inc.
HB-EGF	Ziege, polyklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des proHB-EGF	R & D Systems
P-JNK	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs
JNK	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Biotech., Inc.

P-p38	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs
p38	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der von p38	Santa Cruz Biotech., Inc.
SHP-2	Kaninchen, polyklonal, gegen die aminoterminalen AS 28-219 der humanen SHP-2 als GST-Fusionsprotein	W. Vogel, d. AG.
SHP-2	Maus, monoklonal, gegen die aminoterminalen AS 1-177 der humanen SHP-2	Transduction Labs, Kentucky
SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 carboxyterminalen AS des humanen SHC als GST-Fusionsprotein	R. Lammers, d. AG.
VSV Mannheim	Maus, monoklonal, (Klon 12CA5) gegen das VSV Epitop	Boehringer,

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerretichperoxidase (HRP) konjugiert

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1 : 20000	BioRad (München)
Ziege gegen Maus	1 : 10000	Sigma /Taufkirchen)
Ziege gegen Maus	1 : 10000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 20000	BioRad (München)
Kaninchen gegen Schaf	1 : 20000	Dianova

## 2.1.10 Expressionsplasmide

## 2.1.10.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pRK5	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl	Genentech, San Francisco
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman, 1989
pGEX-2	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Pharmacia, Freiburg

## 2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pcDNA1-BombR	cDNA des murinen Bombesin Rezeptors unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Faure <i>et al.</i> , 1994
pRK5-HER-CD533	cDNA der dominant-negativen EGFR-Mutante HER-CD533 in pRK5	N. Redemann, d. AG.
pLXSN-M1R	cDNA des humanen M1R in pLXSN	M. Leserer, d. AG.
pcDNA3-HA-Erk2	cDNA der Hämagglutinin-getagten Erk2 in pcDNA3	H. Daub, d. AG
pcDNA3-VSV-HBEGF	cDNA des VSV-getagten HB-EGF Vorläufers	E. Zwick, d. AG

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) nach der Methode von Lee und Rasheed (1990) präpariert.

### 2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von COS-7 und HEK293 Zellen wurden größere und kleinere DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

### 2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA

#### 2.2.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden oder ü.N. beim Temperaturoptimum des Enzyms.

#### 2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

#### 2.2.3.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

## 2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE.

Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

## 2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAex II Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

## 2.2.6 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

### 2.2.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (1993) verwendet. Die Transformations-effizienz war größer als  $5 \times 10^6$  Klone/µg DNA.

### 2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>), 70 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 400 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/ Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

### 2.2.6.3 Dauerkulturen von *E.coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

## 2.2.7 Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde das T7 Sequencing Kit von Pharmacia nach Herstellerangaben genutzt.

## 2.2.8 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in Millipore<sup>TM</sup>-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

### 2.2.8.1 Präparation von RNA

Die Präparation von RNA aus Zellen und Geweben erfolgte mit Hilfe des RNEasy-Kits für die RNA Isolation nach Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden). Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

### 2.2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegellkammern (Lehrach *et al.*, 1977). 1,2 g Agarose wurden in 77 ml H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgekocht und 10 min bei RT abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 10 ml 10x MOPS und 13 ml Formaldehyd (37% (v/v)) aufgefüllt und das Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 10 µg Gesamt-RNA wurde mit 5 µl 10x MOPS, 8,75 µl Formaldehyd (37%(v/v)) und 25 µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl gebracht. Die Proben wurden 10 min bei 65°C erhitzt, anschließend mit 10 µl RNA-Probenpuffer versetzt, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Pro cm<sub>2</sub> Gelfläche wurden 0,8 Volt Spannung angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 200 ml Laufpuffer mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 30 min entfärbt. Die RNA wurde unter UV-Licht (λ=302 nm) detektiert und unter Einsatz eines Orangefilters photographiert.

### 2.2.8.3 Northern-Analyse

Für eine Northern-Analyse muß die in einem denaturierenden Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennte RNA auf einen Nitrozellulosefilter transferiert werden. Die im Formaldehyd/Agarosegel denaturierte, einzelsträngige RNA bindet an den Filter und wird durch Backen des Filters permanent an diesem fixiert.

### 2.2.8.4 Transfer von RNA auf eine Nitrozellulosemembran

Der Transfer der RNA auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch Kapillarkräfte (Thomas, 1983). Das RNA-Agarosegel wurde auf die minimal notwendige Größe zurecht-

geschnitten und 30 min in 20x SSC equilibriert. Auf eine gesockelte Glasplatte, die sich in einer mit 20x SSC gefüllten, flachen Glaswanne befand, wurden drei Lagen in 20x SSC getränktes und zurechtgeschnittenes 3MM Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt, so daß sie über den Rand der Glasplatte in den Puffer hingen. Darauf wurden 2 weitere, ebenfalls mit 20x SSC getränkte 3MM Whatmanpapiere in Gelgröße gelegt. Das Agarosegel wurde auf das oberste Whatmanpapier gebracht und luftblasenfrei mit einer in 2x SSC angefeuchteten Nitrozellulose gleicher Größe bedeckt. Anschließend wurden 3 weitere Lagen, in 2x SSC getränktes und etwa 20 Lagen trockenes 3MM Whatmanpapier aufgelegt. Der Transfer der RNA auf die Nitrozellulose erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose vorsichtig vom Agarosegel abgezogen und 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Danach wurde die Lage der einzelnen Geltaschen sowie die Positionen der 28S und 18S RNA unter UV-Licht mit einem Kugelschreiber markiert.

#### **2.2.8.5 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA**

Die gebackenen Nitrozellulosefilter wurden für mindestens 4 h bei 42°C in einer Vorhybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1% SDS) inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit gescherter Heringssperma-DNA (20 µg pro ml Hybridisierungslösung) für 10 min bei 100°C hitzedenaturiert und zur Vorhybridisierungs-lösung gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 42°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie zweimal ca. 20 min in 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen und weitere 15 min in 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Exposition der Filter auf Röntgenfilm in Kassetten mit Verstärkerfolie bei -80°C.

#### **2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP**

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde das „Random Primed Labeling Kit“ der Firma Boehringer verwendet, das auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) beruht. 100 ng DNA wurden zusammen mit 2,5 µl Hexanukleotiden in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gebracht.

Zum Reaktionsansatz wurden je 0,5 mM dTTP, dCTP und dGTP, 2 µl Reaktions-Mix, 5 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP, 1 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumen Dextranblau (0,04% Dextranblau, 1 mM EDTA pH 8,0) beendet. Die radioaktive Sonde wurde chromatographisch (Sephadex G50, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,02% SDS) vom überschüssigen, nicht eingebauten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP befreit und mit H<sub>2</sub>O eluiert. Der Farbstoff markiert die ungefähre Position der Sonde in der Chromatographiesäule.

## 2.2.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

### 2.2.10.1 *PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten*

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA  
1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol  
1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol  
5 µl 10x Taq Polymerase Puffer  
(20 mM Tris/Cl, pH 8,0, 0.1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))  
1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)  
1 µl Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Ansätze wurden mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und die Synthesereaktion in einem "Thermal Reactor" der Fa. Biometra durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min	94°C
Amplifikation 25-30 Zyklen:	1 min	94°C (Denaturierung)
	1 min	52°C (Hybridisierung)
	1 min	72°C (Synthese)
letzte Synthese:	3 min	72°C

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.2.11.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

### 2.2.10.2 *Aufreinigung von PCR-Produkten*

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „PCR Purification Kit" (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.



## 2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

### 2.3.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

### 2.3.3 Lipofectamine<sup>®</sup>-Transfektion von COS-7 Zellen

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>®</sup> lagert sich an DNA an und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen. COS-7 Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von 80 000 bzw. 180 000 in 12- bzw. 6-Loch-Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 4 bzw. 10 µl Lipofectamine<sup>®</sup> und 36 bzw. 90 µl serumfreies DMEM sowie eine Lösung B mit 0,4/1,5 µg Plasmid-DNA in 40/100 µl serumfreiem DMEM angesetzt. Die Lösungen A

und B wurden dann vorsichtig gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die COS-7 Zellen einmal mit 2 ml serumfreiem DMEM gewaschen. Anschließend wurden zu den Transfektionsansätzen 360/900 µl serumfreies DMEM zugegeben, gemischt und die fertigen Transfektionsansätze auf die Zellen pipettiert, von welchen das Medium kurz davor abgesaugt wurde. Nach 4 h im Brutschrank wurden jeweils 2000 µl DMEM mit 20% FCS auf die Zellen gegeben und für weitere 20 h inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch serumfreiem DMEM ersetzt.

### 2.3.4 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Bosc23-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalzium-phosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit  $\text{CaCl}_2$  und einer BES gepuffereten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos und Ruddle, 1981) Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressions-maximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale (8 ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 6  $\mu\text{g}$  DNA mit  $\text{H}_2\text{O}$  zu einem Volumen von 260  $\mu\text{l}$  verdünnt, mit 40  $\mu\text{l}$  einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 400  $\mu\text{l}$  BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

### 2.3.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der  $\beta$ -Galaktosidase wie unter 2.2.3 bzw. 2.3.4 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, und 10 min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blau-färbung transfizierter Zellen 60 min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert.

### 2.3.6 Retroviraler Gentransfer in Rat-1 Fibroblasten

Zu Herstellung von Rat-1 Linien, welche einen bestimmten Rezeptor stabil exprimieren, wurden Bosc23 Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit der zu exprimierenden Rezeptor-cDNA in einem retroviralen Expressionsvektor pLXSN nach der unter 2.3.4 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen zum Sammeln von Virusüberstand ü.N. mit 5 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde dann durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter sterilfiltriert. Zur Infektion von Rat-1 Fibroblasten wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und auf 6 cm Kulturschalen ausgesät. 3 ml des gesammelten Virusüberstands der transfizierten Bosc23 Zellen wurde auf die Rat-1 Zellen gebracht und in Gegenwart von 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Polybren bei 37°C für 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 4 h erneut infiziert.

Nach Abschluß der Infektionen wurde das Medium gewechselt und die Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Rat-1 Zellen erfolgt mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum

(3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

### 2.3.7 Radioaktive Markierung von Zellen

Zur radioaktiven Methioninmarkierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ü.N. mit 40  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionin in methioninfreiem DMEM inkubiert. Dabei wird in alle neu synthetisierten Proteine das radiaktiv markierte [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionin eingebaut.

## 2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.4.1 Triton X100-Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

### 2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1200  $\mu\text{g Protein/ml}$ ) eingesetzt.

### 2.4.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zelllysaten dienen spezifische, an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Anti-körper und Protein, erleichtert (Chenais *et al.*, 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder 3-10 µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zelllysaten gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodaß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein:	MG (in kD):	Protein:	MG (in kD):
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
β-Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

### 2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow

Die Technik zur Auftrennung kleiner Proteine nach Schägger und von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) beruht auf dem Prinzip der SDS-PAGE Gelelektrophorese nach Laemmli (Vgl. 2.4.4). Die Tricin-SDS Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von Proteinen einer Größe zwischen 1 und 100 kDa trotz einer geringen Acrylamidkonzentration von 10% im Trenngel. Im Gegensatz zu Glyzin das bei der SDS Gelelektrophorese nach Laemmli eingesetzt wird, ermöglicht der Gebrauch von Tricin die Konzentrierung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht im Sammelgel.

### 2.4.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5 min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einen Röntgenfilm aufgelegt und abhängig von der Signalstärke 12 h bis 1 Woche bei -80°C exponiert.

### 2.4.7 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni und Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

### 2.4.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN. Um die unspezifische Bindung von Antikorpfern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach zweimal 5 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen.

Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

## 2.5 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

### 2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 18 bis 24 h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.1) wurden die Zellen für 2 bis 10 min mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren oder einer Isotonischen KCl-Lösung zur Induktion der Membrandepolarisation stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 10 bis 30 min vorbehandelt. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (2.4.3) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.4) aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin ( $\alpha$ PY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.4.7) analysiert.

### 2.5.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase ERK2 durch *in vitro* Kinase-Test

Die endogene MAP Kinase wurde aus 30 bis 90  $\mu$ g Zellysat immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,25 ml HNTG-Puffer und einmal mit 0,4 ml Äquilibrierungspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30  $\mu$ l Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M Orthovanadat, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,5 mg/ml MBP, 50  $\mu$ M ATP) mit 1  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]-ATP gegeben und 10 min bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 30  $\mu$ l 2x Laemmli-Puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele in der Mitte durchgetrennt.

Die unteren Hälften, in denen sich das MAP Kinase Substrat MBP befand wurden mit Coomassielösung angefärbt, getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert bzw. mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet. Die obere Gelhälfte wurden wie unter 2.4.6 und 2.4.7 beschrieben auf Expression der MAP Kinasen hin analysiert.

### 2.5.3 Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase JNK durch *in vitro* Kinase-Test

Die endogene JNK Kinase wurde aus 100-300 µg Zelllysate immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,4 ml HNTG Puffer und einmal mit 0,4 ml Äquilibriumspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM Orthovanadat, 50 µM ATP) in Gegenwart von 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und des JNK Substrates GST-c-jun (1 mg/ml) die *in vitro* Kinasereaktion für 20 Minuten bei 30 °C im Inkubationsschüttler. Durch Zugabe von je 30 µl 2x Laemmli-Puffer wurde die Kinasereaktion gestoppt und die Immunkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend getrocknet und die GST-c-jun Phosphorylierung mit einem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet

### 2.5.4 Messung der DNA-Synthese ([Methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin Einbau)

HaCaT Keratinozyten bzw. MDA-MB 231 Zellen wurden subkonfluent in 12-Lochschalen ausgesät und nach 20h unter normalen Wachstumsbedingungen für weitere 24h unter Serumentzug kultiviert. Anschließend erfolgt für weitere 18h die Zugabe der entsprechenden Inhibitoren bzw. Wachstumsfaktoren. Nach 4-stündiger Inkubation mit jeweils 0,5 µCi [Methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen und DNA und Proteine durch Zugabe von 1ml 10% Trichloressigsäure pro Schale ausgefällt (20 min., 4°C). Nichteingebautes [Methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin verbleibt dabei im Überstand der anschließend abgesaugt wird. Die präzipitierten Makromoleküle wurden mit 200µl 0,2N NaOH/ 1%SDS resolubilisiert und das Lysat zu 10ml vorgelegtem Szintillationscocktail (Roth) gegeben. Die Zellkulturschalen wurden weiterhin mit 200 µl 0,2N HCl gewaschen, die anschließend ebenfalls zur Szintillationslösung gegeben wurde. Die Auswertung erfolgte der in Triplikaten angefertigten Meßergebnisse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 8.0.

### 2.5.5 Messung der Inositolphosphatakkumulation

Die Inositolphosphatakkumulation wurde wie bei Herrlich *et al.* (1996) beschrieben durchgeführt. Transient transfizierte COS-7 Zellen wurden über Nacht mit 4 µCi [3H] *myo*-Inositol/ml Wachstumsmedium inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Min. in HBSS ( Hank's buffered salt solution: 138mM NaCl, 6mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5mM Glukose, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 20mM Hepes, pH 7.4) unter Zugabe von 10mM LiCl inkubiert und anschließend für weitere 60 Minuten mit den entsprechenden Agonisten versetzt.

Nach PBS Waschschritten (2X) wurden die Zellen für 5 Minuten mit 0,3ml NaOH (0,1N) versetzt und mit 0,1 ml Ameisensäure (0,1N) aufgebrochen. Nach der Zugabe von 750µl Inositolphosphat-Verdünnungspuffer (5mM Natriumtetraborat, 0,5mM EDTA) wurden die Lysate auf regenerierte (Waschschritt 1: 10ml Regenerationspuffer (0,1M Ameisensäure; 3M Ammoniumformiat) anschl. 10ml Wasser (2X)) Dowex AG1-X8 Säulen (Biorad) gebracht. Danach wurden die Säulen mit Wasser sowie mit Glycerolphosphat-Elutionspuffer (5mM Natriumtetraborat, 60mM Natriumformiat) gewaschen. Die Inositolphosphate wurden anschließend mit 3 ml Inositolphosphat-Elutionspuffer (0,1M Ameisensäure, 0,2M Ammoniumformiat) in 10ml vorgelegte Szintillationsflüssigkeit (Roth) eluiert und in einem Szintillationscounter gezählt. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels Microsoft Excel 8.0.

### 2.5.6 Quantitative Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflußzytometrie

Zur Bestimmung der Zelloberflächenreaktivität von proHB-EGF wurden COS-7 Zellen in 6cm Schalen ausgesät (400000 Zellen/6cm Schale) und nach 20h bei 10% FCS für weitere 24 Stunden unter Serumentzug kultiviert. Nach der Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. Wachstumsfaktoren wurden die COS-7 Zellen mit PBS gewaschen und mit PBS/10mM EDTA von der Kulturschale abgelöst. Nach Zentrifugation (4°C, 5 Min., 3000rpm) wurden die Zellen in 200 µl PBS/NaN<sub>3</sub> resuspendiert und in Gegenwart des Primärantikörpers (Ziege αHB-EGF, R&D Systems) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung des nicht- bzw. unspezifisch-gebundenen Antikörpers wurden 800 µl FCS mit der Zellsuspension überschichtet und zentrifugiert (4°C, 5 Min., 3000rpm). Die Zellen wurden erneut in PBS/NaN<sub>3</sub> resuspendiert und der Sekundärantikörper (FITC-gekoppelter Hase αZiege, Sigma) für 20 Minuten auf Eis zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation durch FCS wurden die Zellen in 300µl PBS aufgenommen und die Zelloberflächenreaktivität von proHB-EGF durchflußzytometrisch untersucht.

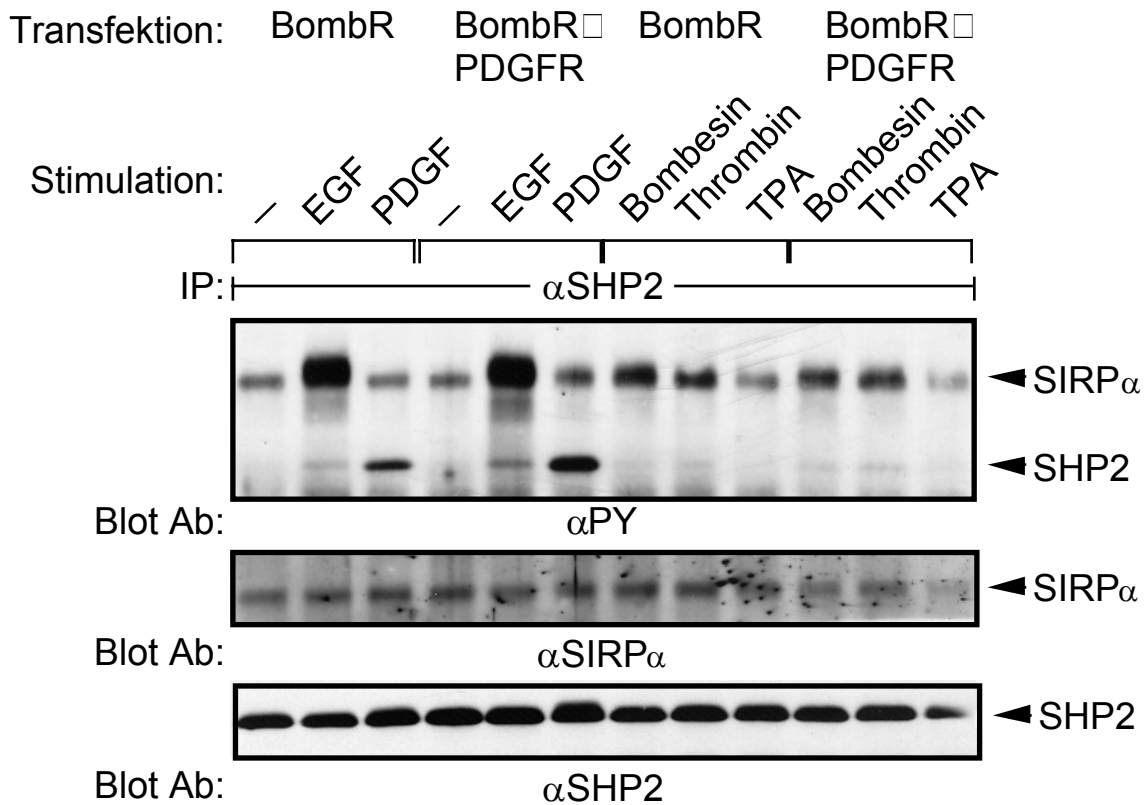


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Rolle der extrazellulären EGFR Domäne für die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung

Der Mechanismus der GPCR-induzierten Transaktivierung wurde aufgrund zweier experimenteller Beobachtungen ausschließlich auf intrazelluläre Elemente zurückgeführt. Zum einen handelt es sich um einen sehr schnellen Prozeß, so dass die Neusynthese von beteiligten Proteinen und die Sezernierung von EGFR aktivierenden Liganden ausgeschlossen wurde (Daub *et al.*, 1996; Keely *et al.*, 1998). Zum anderen konnten im Zellkulturüberstand nach GPCR Stimulation keine EGFR Liganden nachgewiesen werden (H. Daub, Dissertation; Eguchi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Dennoch sollte, sowohl in Rat-1 Fibroblasten, als auch in COS-7 Zellen die Rolle der extrazellulären EGFR Domäne für die Transaktivierung untersucht werden. In beiden Zellsystemen wurde ein chimärer Rezeptor (EP-R), bestehend aus dem extrazellulären Teil des humanen EGFR und der Transmembrandomäne und intrazellulärem Teil des PDGF $\beta$  Rezeptors (Seedorf *et al.*, 1991), exprimiert. E. Zwick (d. AG) konnte mit stabil exprimierenden Rat-1 Zellen zeigen, dass die EP-R Chimäre nach GPCR Stimulation tyrosinphosphoryliert wird und dies über die PDGFR-Kinaseaktivität der Chimäre vermittelt wird (Prenzel *et al.*, 1999, E. Zwick, Dissertation). Weiterhin stellte sich die Frage, ob der transaktivierte EP-R Signalfunktionen übernimmt, die für den PDGFR charakteristisch sind, wie z.B. die Tyrosinphosphorylierung der Proteintyrosinphosphatase (PTP) SHP-2 (Vogel *et al.*, 1993). Hierzu wurden COS-7 Zellen transient mit dem Bombesin Rezeptor (BombR) bzw. dem PDGFR (platelet derived growth factor receptor) transfiziert, 24 Stunden unter Serumentzug kultiviert und mit den jeweiligen Agonisten stimuliert. Nach der Zelllyse wurde SHP-2 mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und die Immunkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließende Immunoblotanalyse zeigt, dass weder die GPCR Agonisten Bombesin und Thrombin noch der PKC Aktivator Tetraborbolacetat (TPA) die Tyrosinphosphorylierung von SHP-2 induzieren (Abb. 5). Während EGF nur schwach aktivierend wirkt kann PDGF Stimulation die Tyrosinphosphorylierung der PTP deutlich erhöhen.

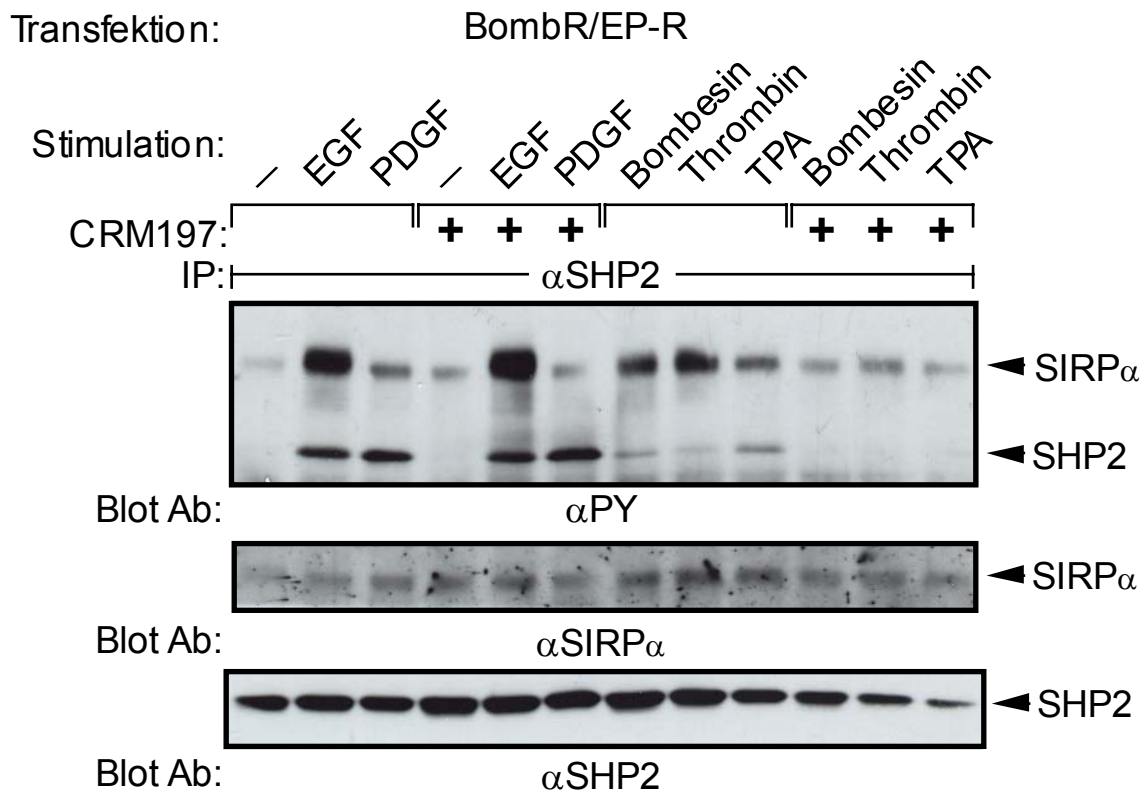
Ein weiteres, insbesondere nach EGF Stimulation, tyrosinphosphoryliertes und ko-präzipitiertes Protein konnte als SIRP $\alpha$  (Kharitonov *et al.*, 1997) identifiziert werden .



**Abb. 5: PDGF- und EGF-induzierte SHP2-Tyrosinphosphorylierung in COS-7/BombR bzw. COS-7/BombR PDGFR Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des BombR und des PDGFR (je 0.5 µg/Loch) kotransfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen für 5 Minuten mit EGF (2 ng/ml), PDGF (20 ng/ml), den GPCR Agonisten Bombesin (200 nM) oder Thrombin (2 U/ml) bzw. TPA (1 µM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde SHP-2 mit einem polyklonalem Antikörper (αSHP-2) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und die entsprechenden Blotabschnitte mit einem polyklonalen αSIRPα Antikörper bzw. mit einem monoklonalen αSHP-2 Antikörper immundetektiert.

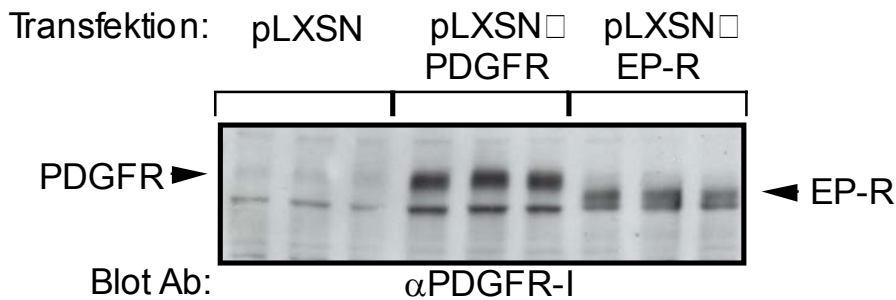
Wie bereits für Rat-1/EP-R Zellen gezeigt (E. Zwick, Dissertation), verändert die Expression der EP-R Chimäre auch in COS-7 Zellen dieses Stimulationmuster (Abb. 6).



**Abb. 6: GPCR-, PDGF- und EGF-induzierte SHP2-Tyrosinphosphorylierung in COS-7/EP-R Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des BombR und der EP-R Chimäre (je 0.5  $\mu$ g/Loch) kotransfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit CRM197 (10  $\mu$ g/ml) vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit EGF (2 ng/ml), PDGF (20 ng/ml), den GPCR Agonisten Bombesin (200 nM) oder Thrombin (2 U/ml) bzw. TPA (1  $\mu$ M) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde SHP-2 mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ SHP-2) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser abgelöst und der obere Teil der Membran mit einem polyklonalen  $\alpha$ SIRP $\alpha$  Antikörper analysiert während der untere Teil mit einem monoklonalen  $\alpha$ SHP-2 Antikörper immundetektiert wurde.

Die EGF-induzierte EP-R Aktivierung führt zu einer der PDGF vergleichbaren Stimulation der SHP-2 Tyrosinphosphorylierung. Im Gegensatz zu Abbildung 5, kann SHP-2 auch durch Bombesin, Thrombin und TPA aktiviert werden. Die Immundetektion mit einem SHP-2-spezifischen Antikörper zeigt, dass in beiden Experimenten gleiche Mengen an Protein analysiert wurden (Abb. 5 und 6 unten). Weiterhin wurde parallel zur Phosphotyrosinanalyse mit einem gegen die intrazelluläre des PDGF Rezeptors gerichteten Antikörper die Expression der verwendeten Konstrukte überprüft (Abbildung 7).



**Abb. 7: Expression des PDGFRs bzw. der EP-R Chimären in COS-7 Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des PDGFR oder der EP-R Chimäre (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Antikörper αPDGFR-I gegen die intrazelluläre Domäne des PDGFRs.

Da in den verwendeten Zellsystemen der endogen exprimierte PDGFR nicht transaktiviert wird zeigt dies, dass der extrazelluläre Teil des EGFRs die Transaktivierung des Rezeptors vermittelt. Diese gelungene "Signalumleitung" zeigt, dass bei dem intrazellulär angenommenen Mechanismus auch Liganden des EGFRs beteiligt sein könnten.

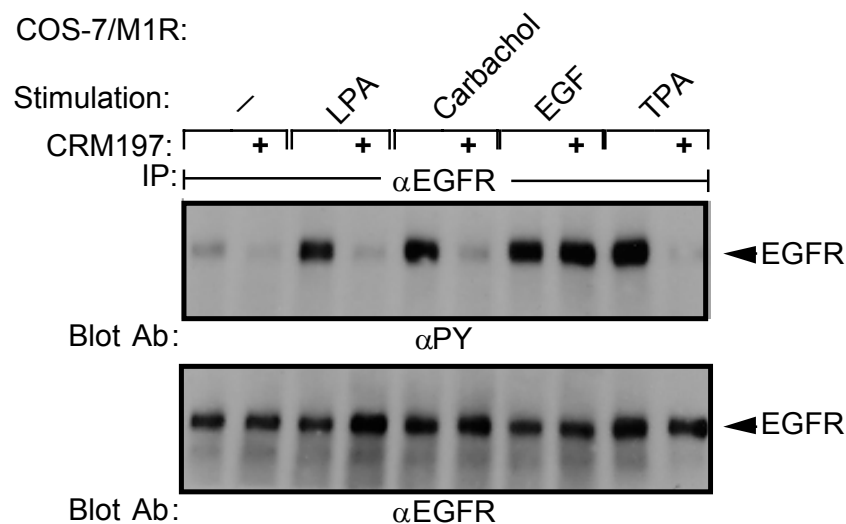
Ein spezifischer Inhibitor für den EGF-ähnlichen Liganden HB-EGF ist Diphtheria Toxin, bzw. das nicht-toxische Analog CRM197 (vgl. 3.2; Mitamura *et al.*, 1995). Abbildung 6 zeigt, dass Vorinkubation der COS-7/EP-R Zellen mit CRM197 sowohl die GPCR- als auch die TPA-induzierte SHP-2 Tyrosinphosphorylierung vollständig inhibiert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass HB-EGF an der EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen beteiligt ist.

### **3.2 Die Rolle von HB-EGF für die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalweiterleitung in COS-7 Zellen**

Wie bereits angesprochen deuten sowohl die Ergebnisse von E. Zwick mit Rat-1 Zelllinien als auch die Experimente mit COS-7 EP-R Zellen darauf hin, dass Liganden des EGFRs an der Transaktivierung beteiligt sind. Ein weiterer Hinweis darauf ist das Phänomen der interzellulären Transaktivierung zwischen ko-kultivierten Rat-1 Zelllinien die entweder den muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M1R) oder den humanen EGFR exprimieren (E. Zwick, Dissertation). Die Bedeutung von HB-EGF als mögliches Bindeglied der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung sollte im folgenden gezeigt werden.

### 3.2.1 Die Rolle von HB-EGF bei der GPCR- und TPA-induzierten EGFR Tyrosinphosphorylierung

Die nicht-toxische Diphtheria Toxin (DT) Punktmutante CRM197 interferiert mit der biologischen Aktivität von HB-EGF und proHB-EGF. Zum einen bindet DT an den membranständigen HB-EGF Vorläufer (proHB-EGF), vergleichbar mit einem Liganden an seinen Transmembranrezeptor, und wird mit diesem über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert (Naglich *et al.*, 1992). Mekada und Kollegen konnten zeigen, dass DT bzw. CRM197 die mitogene Wirkung des muren HB-EGF spezifisch unterdrücken kann, während es andere EGF-ähnliche Liganden nicht beeinflusst (Mitamura *et al.*, 1995). COS-7 Zellen wurden mit dem M1R transfiziert, 24h unter Serumentzug kultiviert, mit CRM197 vorbehandelt und mit den GPCR Liganden Carbachol, Lysophosphatidylsäure (LPA), TPA oder EGF stimuliert. Nach der Zellyse wurde der EGFR immunpräzipitiert und sein Phosphotyrosingehalt mit spezifischen Antikörpern analysiert. Abbildung 8 zeigt, dass CRM197 Vorbehandlung die EGFR Transaktivierung nach Stimulation endogener (LPA) bzw. überexprimierter (M1R) GPCR vollständig inhibiert.



**Abb. 8: HB-EGF Inhibition blockiert die GPCR- und TPA-induzierte EGFR-Transaktivierung in COS-7/M1R Zellen.**

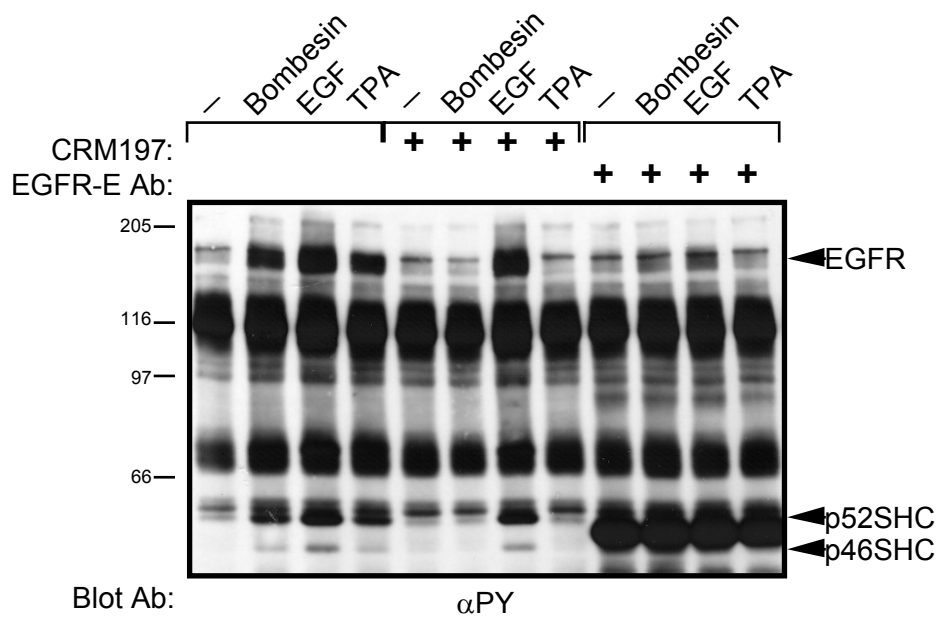
COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit CRM197 (10 µg/ml) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), TPA (1 µM) oder den GPCR Agonisten LPA (10 µM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zellysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (αEGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen αEGFR Antikörper immundetektiert.

Die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach TPA-vermittelter PKC Stimulation wird ebenfalls unterdrückt, während die EGF-induzierte EGFR Aktivierung, als Beweis für die CRM197 Spezifität, unbeeinflusst bleibt.

Um zu gewährleisten, dass vergleichbare Mengen an Protein immunpräzipitiert wurden, wurden die Filter nach Ablösen des Phosphotyrosinantikörpers gegen EGFR immundetektiert (Abb. 8, unten). Aus der vollständigen Inhibition der EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen kann geschlossen werden, dass in diesem Zellsystem ausschließlich HB-EGF und kein weiterer EGFR Ligand für die Signalübermittlung zwischen G-Protein Aktivierung und EGFR verantwortlich ist. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch in Endothelin Rezeptor überexprimierenden HEK293/ET<sub>A</sub>-R Zellen für die EGFR Transaktivierung nach Endothelin Stimulation (M. Leserer, d. AG).

Um zu zeigen, dass dieser HB-EGF-vermittelte Effekt über die extrazelluläre Rezeptordomäne vermittelt wird, wurden BombR-exprimierende COS-7 Zellen mit dem spezifischen, gegen die Ligandbindungsdomäne des humanen EGFRs gerichteten, ICR-3R Antikörper vorinkubiert (Mateo *et al.*, 1997). Nach Stimulation mit Bombesin, EGF oder TPA wurden Zelllysate auf den Phosphotyrosingehalt verschiedener zellulärer Proteine hin untersucht. Die Aktivierung des EGFRs nach Bombesin bzw. TPA Stimulation kann sowohl durch CRM197 als auch durch ICR-3R vollständig inhibiert werden (Abb. 9).

Wie in Abbildung 8 bleibt die EGF-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung durch CRM197 unbeeinflusst, wird allerdings erwartungsgemäß durch ICR-3R blockiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die EGFR Transaktivierung extrazellulär über HB-EGF vermittelt wird. Abbildung 9 zeigt zusätzlich die CRM197-vermittelte Abnahme der SHC Tyrosinphosphorylierung nach Bombesin bzw. TPA Stimulation, die anschließend in Immunpräzipitationsexperimenten näher untersucht wurde.



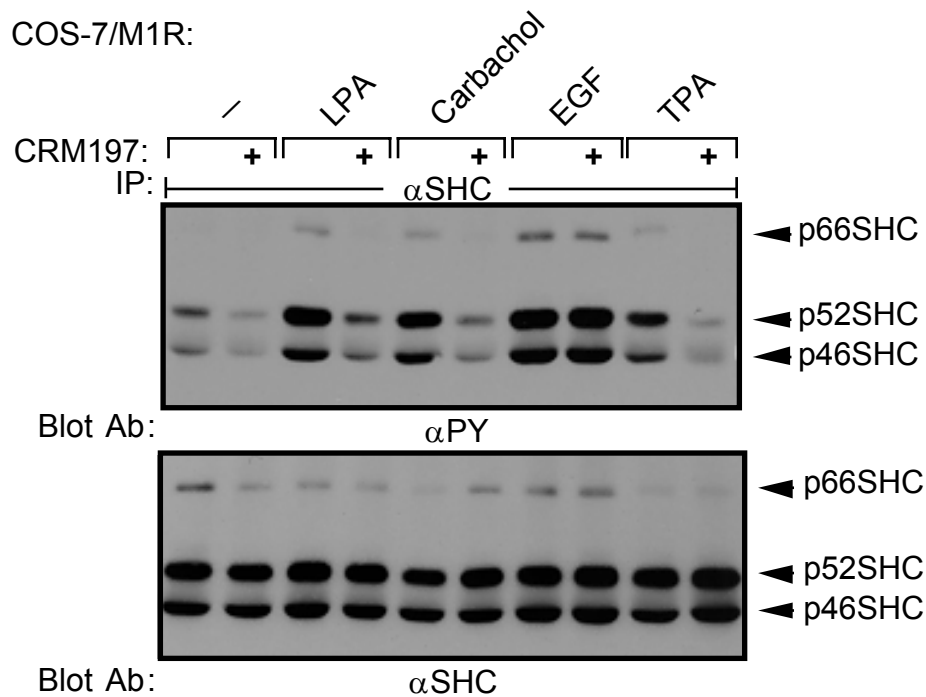
**Abb. 9:** HB-EGF vermittelt über die extrazelluläre EGFR Domäne die GPCR- und TPA-induzierte EGFR und SHC Tyrosinphosphorylierung in COS-7/BombR Zellen.

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des BombR (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit CRM197 (10 µg/ml) bzw. 1h mit einem gegen die extrazelluläre EGFR Domäne gerichteten Antikörper vorinkubiert. Anschließend wurde 3 min mit EGF (2 ng/ml), TPA (1 µM) oder dem GPCR Agonisten Bombesin (200 nM) stimuliert. Nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5 %iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte die Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY).

### 3.2.2 Die Rolle von HB-EGF bei der GPCR- und TPA- induzierten SHC und Gab1 Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen

Ausgehend von dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob HB-EGF ein notwendiger Faktor ist, der die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an verschiedene Signalwege "downstream" des EGFRs koppelt. Da die Tyrosinphosphorylierung und Membranrekrutierung der SHC Proteine für die Aktivierung des Ras-MAP Kinasesweges durch GPCR von entscheidender Bedeutung ist (Chen *et al.*, 1996), wurde zunächst die Tyrosinphosphorylierung dieser Adaptorproteine untersucht.

Transient mit dem M1R transfizierte COS-7 Zellen wurden mit den angegebenen Liganden für 5 Minuten stimuliert, lysiert und die verschiedenen SHC Isoformen mit einem polyklonalen Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse des Phosphotyrosingehalts zeigt ein ähnliches Aktivierungsmuster der SHC Isoformen (46, 52 und 66 kDa) durch die GPCR Liganden, TPA und EGF wie in Abbildung 9 für den EGFR (Abb. 10).



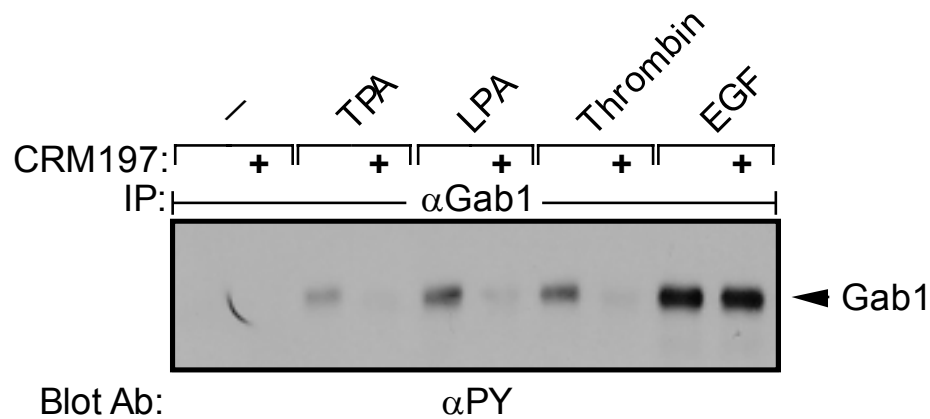
**Abb. 10: HB-EGF Inhibition blockiert die GPCR- und TPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung der SHC Adaptorproteine in COS-7/M1R Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit CRM197 (10 µg/ml) vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit EGF (2 ng/ml), TPA (1 µM) oder den GPCR Agonisten LPA (10 µM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurden die SHC Isoformen mit einem polyklonalen Antikörper (αSHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und mit einem monoklonalen αSHC Antikörper immundetektiert.

CRM197 Vorinkubation führt zur vollständigen Inhibition der SHC Tyrosinphosphorylierung und unterstreicht die kritische Funktion dieses Liganden für die GPCR-induzierte Signalübertragung in COS-7 Zellen.

Neben der Aktivierung der kleinen GTPase Ras stellt die Regulation der Phosphoinositide-3 Kinase (PI3-K) durch GPCR einen weiteren Weg zur Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signalwege dar. Für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die EGFR Transaktivierung und nachfolgende Assoziation und Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Gab1 essentielle Schritte bei der LPA-induzierten PI3-K Aktivierung darstellen (Vgl. 1.5.2.3; Daub *et al.*, 1997; Laffargue *et al.*, 1999). Abbildung 11 zeigt, dass Stimulation der endogen exprimierten GPCR für LPA und Thrombin zur deutlichen Zunahme des Phosphotyrosinsignals von Gab1 führt (Abb. 11).





**Abb. 11: HB-EGF Inhibition blockiert die GPCR- und TPA-induzierte Gab1 Tyrosinphosphorylierung in COS-7/M1R Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit CRM197 (10 µg/ml) vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit EGF (2 ng/ml), TPA (1 µM) oder den GPCR Agonisten LPA (10 µM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde Gab1 mit einem polyklonalen Antikörper (αGab1) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend folgte die Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY).

Im Gegensatz zur EGF-induzierten Gab1 Phosphorylierung wird dieses Signal durch CRM197 vollständig inhibiert und somit HB-EGF abhängig. Somit konnte gezeigt werden, dass wichtige Schritte der mitogenen Signalübertragung verschiedener GPCR über die extrazelluläre EGFR Domäne vermittelt werden und diese Funktion in COS-7 Zellen von HB-EGF übernommen wird. Wie bereits erwähnt (Vgl. 3.2.1) ist das Diphtheria Toxin Analog CRM197 allerdings in der Lage die biologische Funktion des murenen HB-EGF Liganden und des proHB-EGF Vorläufers zu inhibieren, d.h. es kann somit noch keine Aussage getroffen werden welche Form des Liganden die EGFR Transaktivierung vermittelt.

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob allein die Präsenz des Wachstumsfaktorvorläufers an der Zelloberfläche oder eventuell dessen proteolytische Prozessierung für die untersuchten Effekte verantwortlich ist.

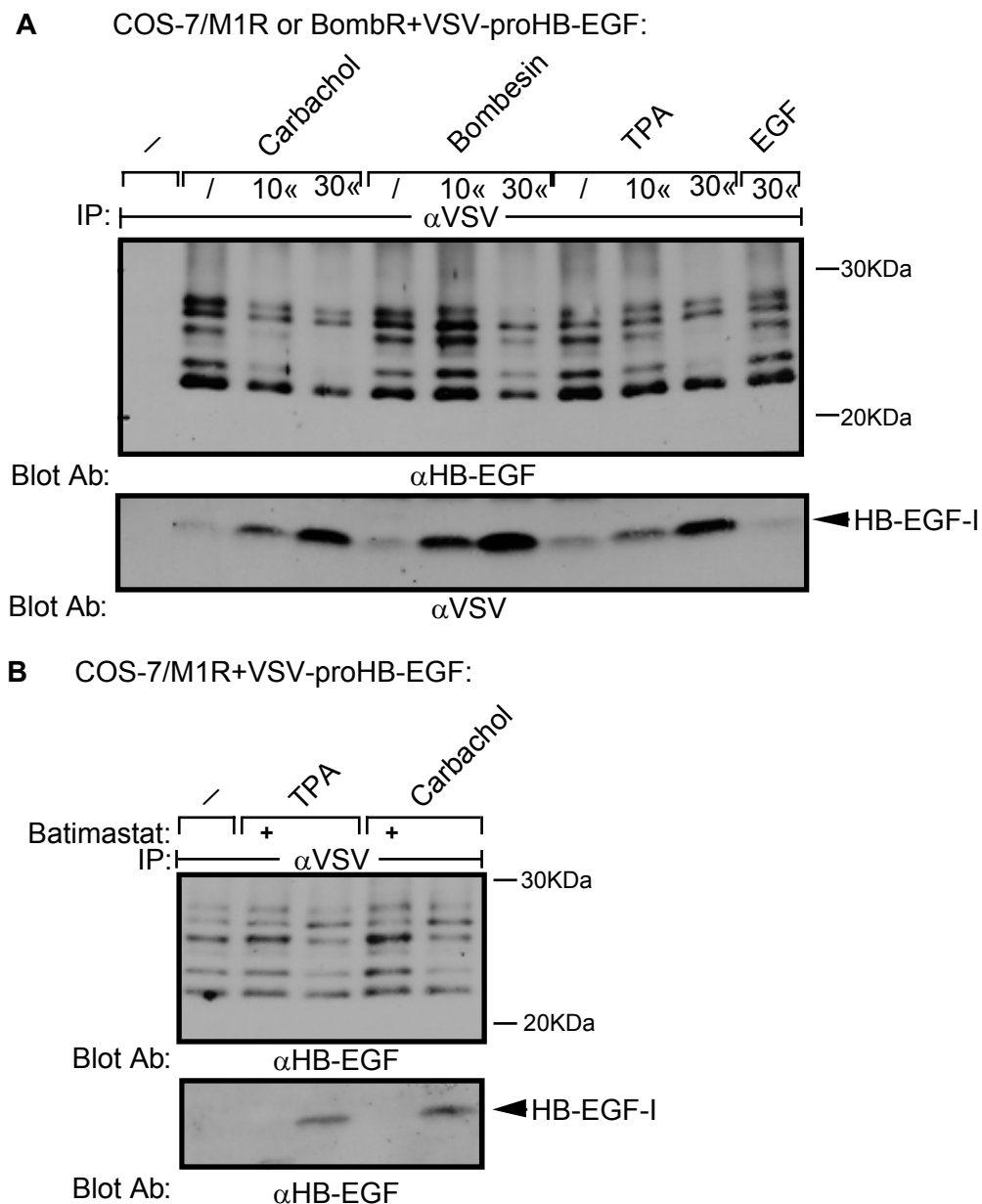
### **3.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induzieren die Metalloprotease-abhängige proteolytische Prozessierung von proHB-EGF**

#### **3.3.1 Die GPCR-induzierte proteolytische Prozessierung von transient exprimiertem proHB-EGF in COS-7 Zellen**

Um die Frage zu klären, ob GPCR Liganden in der Lage sind Prozessierungsprozesse auszulösen wurden COS-7 Zellen transient mit einem GPCR (M1R bzw. BombR) und proHB-EGF kotransfiziert. Zur besseren Detektion des HB-EGF Vorläuferproteins wurde dieses c-terminal mit einem "VSV-tag" versehen. Nach Stimulation der Zellen mit Bombesin, Carbachol, TPA oder EGF wurde proHB-EGF mit einem VSV Antikörper selektiv immunpräzipitiert und die Immunkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 12A zeigt das typische Bandenmuster für die Expression und proteolytische Prozessierung des proHB-EGF Proteins. ProHB-EGF wird als heterogene, stark glykosylierte Spezies mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa exprimiert (Spur 2, 5 und 8). Stimulation mit den GPCR Liganden bzw. dem Phorbolster TPA führt zu einer zeitabhängigen proteolytischen Prozessierung von proHB-EGF, im Immunoblot nachweisbar durch die Abnahme des Vorläufers bei gleichzeitiger Zunahme des in der Membran zurückbleibenden 9 kDa großen HB-EGF Fragmentes (Abb. 12A). Selbst eine 30-minütige Stimulation der COS-7 Zellen mit EGF konnte dagegen keine Abnahme des proHB-EGF Vorläufers induzieren (Abb. 12A, Spur 11).

Dieses Resultat war erstaunlich, da zum einen GPCR Aktivierung bislang nicht mit der proteolytischen Prozessierung von Liganden in Verbindung gebracht wurde und zum anderen die proHB-EGF Spaltung durch Carbachol und Bombesin im Vergleich zu dem sehr potenten Proteaseaktivator TPA ähnlich stark verlief.



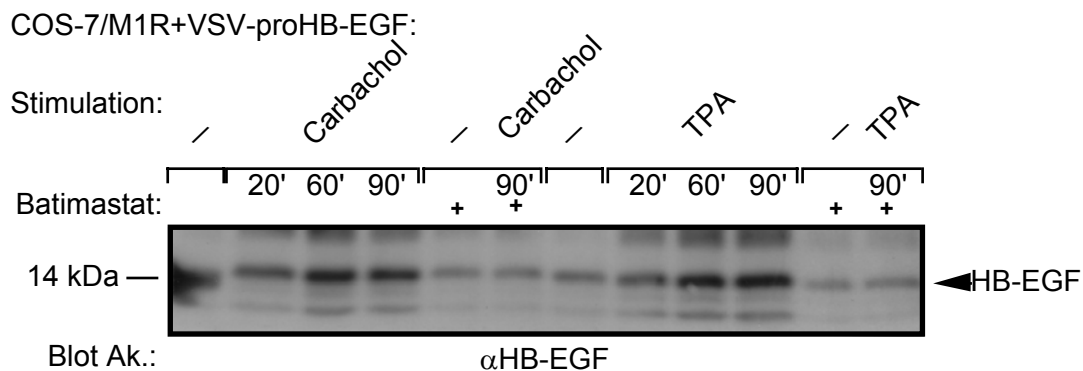
**Abb. 12:** GPCR-Liganden und TPA induzieren die Metalloprotease-vermittelte proteolytische Prozessierung von proHB-EGF.

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R bzw. BombR (je 0.5  $\mu$ g/Loch) mit einem Expressionsplasmid für VSV-proHB-EGF kotransfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen in Abb. 12B wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB94, 5  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend für die angegebene Zeit mit EGF (2 ng/ml), TPA (1  $\mu$ M) und den GPCR Agonisten Bombesin (200 nM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde proHB-EGF mit einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ VSV) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels Tris-Tricine-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte die Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-HB-EGF (Abb. 12B) bzw. einem monoklonalen Anti-VSV Antikörper (Abb. 12A).

Generell ist für die proteolytische Prozessierung von Transmembranproteinen bekannt, dass Zink-abhängige Metalloproteasen stets eine kritische Rolle spielen (Werb, 1997). Für die TPA-induzierte proHB-EGF Spaltung in Vero Zellen wurde ADAM9 (Adisintegrin and metalloprotease 9) als Metalloprotease identifiziert (Izumi *et al.*, 1998).

Daher wurden Experimente mit einem Inhibitor für Metalloproteasen Batimastat (BB94, Wojtowicz-Praga *et al.*, 1997) unternommen, der aufgrund seiner chemischen Struktur bereits in geringer Konzentration beide Hauptklassen von Metalloproteasen, MMPs (Matrix Metalloproteasen) und ADAMs inhibiert (Moss *et al.*, 2001). Abbildung 12B zeigt, dass Vorinkubation von COS-7 Zellen mit Batimastat vollständig die Carbachol- und die TPA-induzierte proteolytische Prozessierung des proHB-EGF Vorläufers unterbindet. Die Immunoblotanalyse zeigt weiterhin, dass Batimastat zusätzlich zur Inhibition der Prozessierung auch eine Akkumulation des proHB-EGF Vorläufers bewirkt.

Wie bereits eingangs diskutiert, war es unter endogenen Bedingungen nie möglich EGF-ähnliche Wachstumsfaktoren nach GPCR Aktivierung im Zellkulturüberstand zu detektieren (Daub *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1998), daher stellte sich nun die Frage, ob dies bei Überexpression von proHB-EGF in COS-7 Zellen möglich wäre.



**Abb. 13: Carbachol und TPA stimulieren die Metalloprotease-vermittelte Freisetzung von HB-EGF ins Zellkulturmedium.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (0.5 µg/Loch) mit einem Expressionsplasmid für VSV-proHB-EGF (1 µg/Loch) kotransfiziert. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB94, 5 µM) vorinkubiert und anschließend für die angegebene Zeit mit TPA (1 µM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. 50 µl des Zellkulturüberstands wurden mit 50 µl 2x Tricine-Probenpuffer versetzt, mittels Tris-Tricine-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte die Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-HB-EGF Antikörper.

Zur Detektion des prozessierten Wachstumsfaktors im Medium wurde ein Antikörper gewählt der die reife Form von HB-EGF erkennt. Carbachol und TPA Stimulation führt im Überexpressionssystem zu einer Sezernierung von HB-EGF in das Medium (Abb. 13).

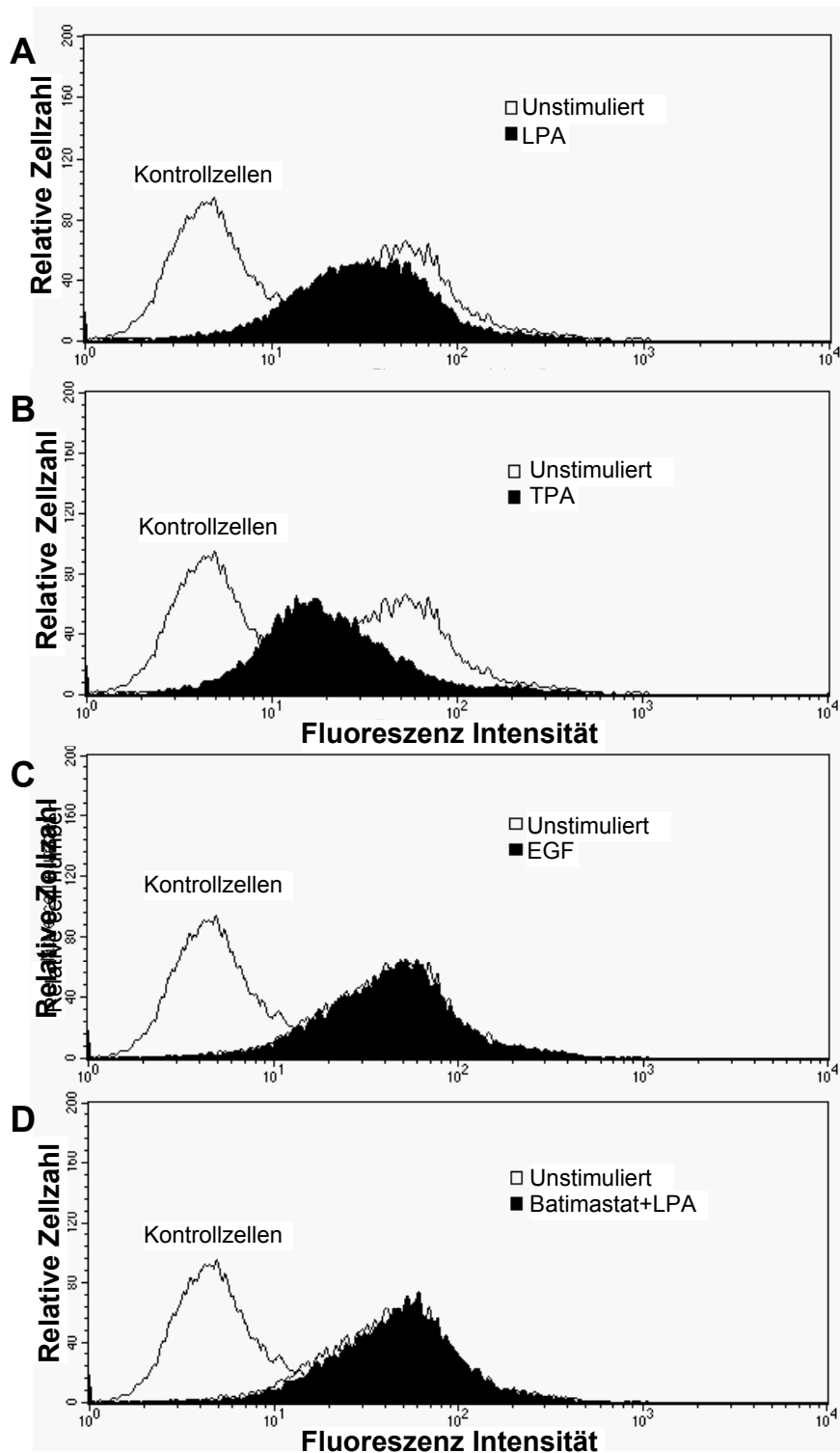
---

Im Gegensatz dazu konnte in COS-7/M1R Zellen keine HB-EGF Freisetzung aus endogen exprimiertem proHB-EGF detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Vergleichbar zu Abb. 12B wird die GPCR- als auch die TPA-induzierte proHB-EGF Prozessierung vollständig durch Batimastat inhibiert.

### 3.3.2 Die GPCR-induzierte proteolytische Prozessierung von endogenem proHB-EGF in COS-7 Zellen

Wie bereits in Abbildung 8 gezeigt inhibiert CRM197 in COS-7 Zellen die Funktion des endogen exprimierten HB-EGF und somit vollständig die EGFR Transaktivierung. Ausgehend davon sollte geklärt werden ob proHB-EGF in nicht-transfizierten COS-7 Zellen ebenfalls durch Stimulation der endogen exprimierten LPA Rezeptoren prozessiert wird. Dazu wurden COS-7 Zellen für 10 Minuten mit LPA (10  $\mu$ M), TPA (1  $\mu$ M) oder EGF (2 ng/ml) stimuliert, von der Zellkulturschale abgelöst und mit einem HB-EGF-spezifischen Antikörper versetzt. Die Quantifizierung des Zelloberflächen-proHB-EGF erfolgte durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Durchflußzytometrie. Die höhere Fluoreszenzintensität der unstimulierten Zellen im Vergleich zu kontrollbehandelten (ohne Primärantikörper) Zellen zeigt die Expression von endogenem proHB-EGF (Abb. 14A). Bereits eine 10 minütige LPA Stimulation von COS-7 Zellen führte zu einer Abnahme des proHB-EGF einhergehend mit einer geringeren Zelloberflächenreaktivität des Vorläufers (Abb. 14A) Konsistent mit den in Überexpression erhaltenen Daten blockiert Batimastat vollständig die G-Protein-vermittelte proteolytische Prozessierung (Abb. 14D), während EGF Stimulation nicht zu einer proHB-EGF Prozessierung führt (Abb. 14C).

Weiterhin wird gezeigt, dass, verglichen zur TPA Stimulation, die LPA-induzierte proHB-EGF Abnahme schwächer ist und dies Ursache dafür sein könnte HB-EGF nicht im Zellkulturmedium detektieren zu können.



**Abb. 14 A-D:** LPA und TPA induzieren die proteolytische Prozessierung von endogenem proHB-EGF in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät und nach 20 Stunden für weitere 24 h unter Serumentzug kultiviert. Nach Stimulation der Zellen für 10 min wurden diese mit PBS gewaschen, mit PBS/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und in Gegenwart des  $\alpha$ HB-EGF (Ziege) Antikörpers 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschritt und Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Hase anti-Ziege Antikörpers erfolgte die durchflußzytometrische Detektion.

Grundsätzlich konnte somit erstmals gezeigt werden, dass sowohl in Überexpression als auch im endogenen System, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nach Stimulation die proteolytische Prozessierung eines EGF-Liganden, in diesem Fall proHB-EGF, induzieren. Hierbei spielen eine oder mehrere Metalloproteasen eine kritische Rolle, da der Inhibitor Zink-abhängiger Metalloproteasen Batimastat (BB94), stets die Freisetzung des gereiften Wachstumsfaktors verhindern konnte.

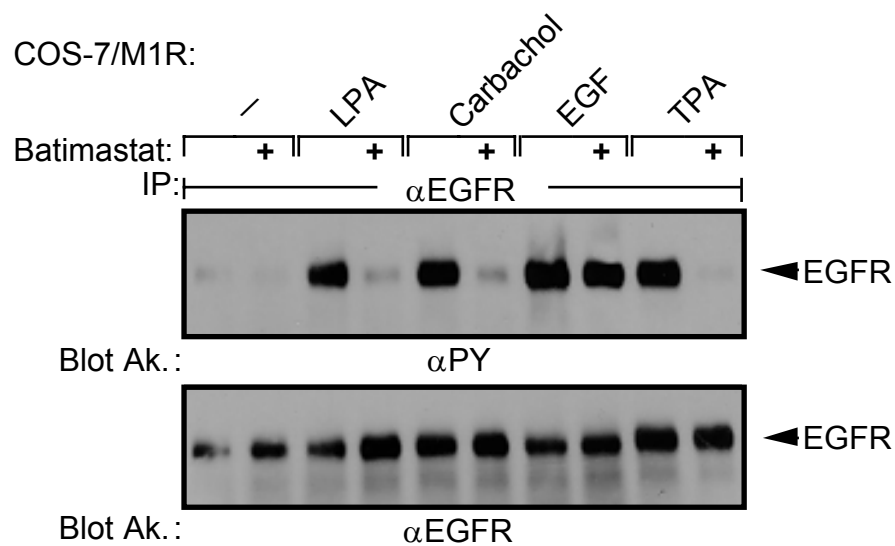
Im folgenden sollte geklärt werden, ob die EGFR Transaktivierung über Metalloproteasen vermittelt wird und es sich somit um einen Liganden-abhängigen Prozeß handelt.

### **3.4 Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalweiterleitung ist abhängig von Batimastat-sensitiven Metalloproteasen**

#### **3.4.1 Inhibition Zink-abhängiger Metalloproteasen beeinflusst die GPCR- und TPA-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen**

Um die Rolle von Metalloproteasen bei der GPCR-induzierten EGFR Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen, wurden COS-7/M1R Zellen mit Batimastat vorinkubiert und mit LPA, Carbachol, EGF oder TPA für 3 Minuten stimuliert. Anschließend wurde der Phosphotyrosingehalt des EGFRs mittels Immunoblot nachgewiesen. Das Ergebnis des Batimastat Experimentes ist mit der Inhibition der HB-EGF Funktion identisch (Vgl. Abb. 8 mit Abb. 15). Sowohl GPCR- als auch TPA-vermittelte Transaktivierung wird vollständig blockiert, während die EGF-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung nicht beeinflusst wird (Abb. 15).

Dieses Experiment unterstreicht somit, dass der proHB-EGF Vorläufer allein nicht ausreichend ist um die EGFR Transaktivierung zu vermitteln, sondern zeigt, dass die Metalloprotease-vermittelte Prozessierung ein absolut notwendiger Schritt für die Signalgebung zwischen G-Protein und EGFR ist.



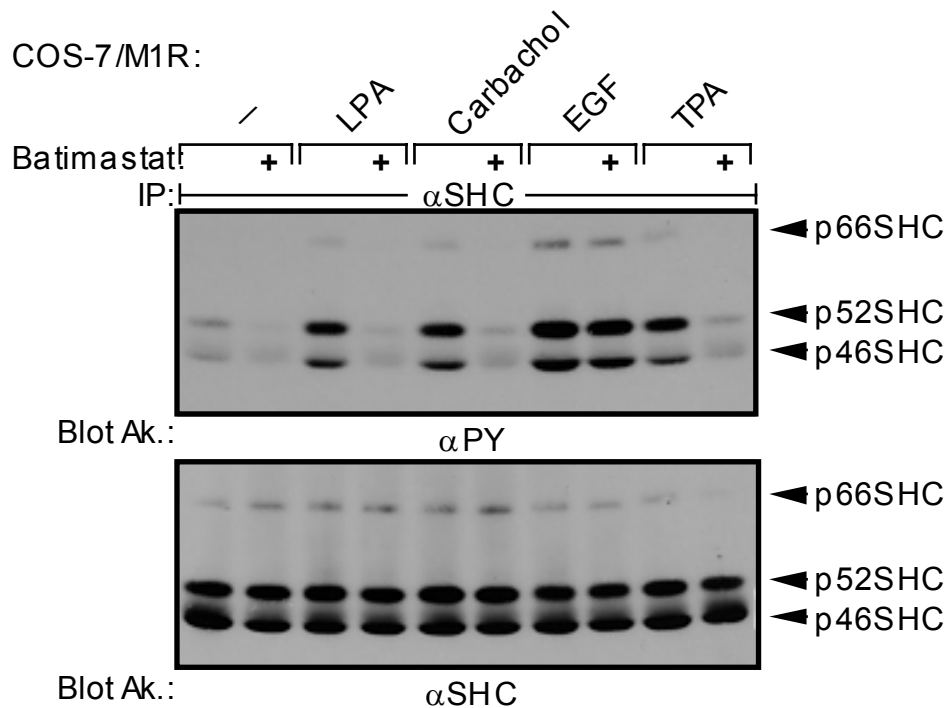
**Abb. 15: Batimastat inhibiert die GPCR- und TPA-induzierte EGFR-Transaktivierung in COS-7/M1R Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5 µg/Loch) transfiziert. Nach 24 h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5 µM) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), TPA (1 µM) oder den GPCR Agonisten LPA (10 µM) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zellysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (αEGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen αEGFR Antikörper immundetektiert.

### 3.4.2 Inhibition Zink-abhängiger Metalloproteasen blockiert die GPCR- und TPA-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in COS-7 Zellen

In Abbildung 16 konnte weiterhin gezeigt werden, dass Batimastat Vorinkubation die LPA-, bzw. Carbachol-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung vollständig verhindert (Abb. 16). Somit wird dieses in der mitogenen Signalübertragung durch GPCRn wichtige Adaptorprotein ebenfalls Metalloprotease-vermittelt aktiviert. Dies unterstreicht die Rolle von Metalloproteasen als kritische Elemente für die EGFR Transaktivierung und die zur Ras-MAP Kinase Aktivierung essentielle SHC Tyrosinphosphorylierung.





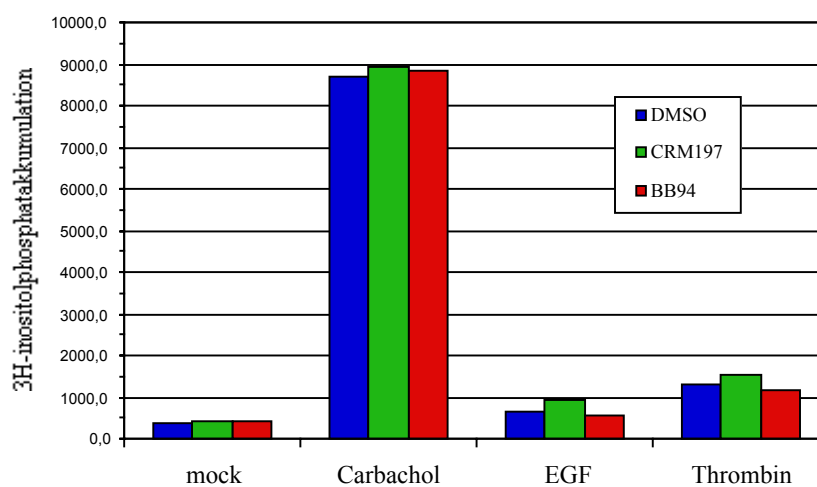
**Abb. 16: Batimastat inhibiert die GPCR- und TPA-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in COS-7/M1R Zellen.**

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5  $\mu\text{g}/\text{Loch}$ ) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), TPA (1  $\mu\text{M}$ ) oder den GPCR Agonisten LPA (10  $\mu\text{M}$ ) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurden die SHC Proteine mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha\text{SHC}$ ) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha\text{PY}$ ) wurde dieser abgelöst und mit einem monoklonalen  $\alpha\text{SHC}$  Antikörper immundetektiert.

### 3.4.3 Die GPCR-induzierte Inositolphosphatakkumulation in COS-7 Zellen ist ein HB-EGF- und Metalloprotease-unabhängiger Prozess

Neben der Aktivierung des Ras-MAP Kinase Weges sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch bei der Bildung von sekundären Botenstoffen wie etwa der Akkumulation von cAMP, Inositolphosphat ( $\text{IP}_3$ ) oder Diacylglycerin (DAG) beteiligt. Zum Beispiel wird die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ )-katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu  $\text{IP}_3$  und DAG insbesondere von  $\alpha$ -Untereinheiten G $_q$ -gekoppelter Rezeptoren reguliert, kann allerdings auch durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten G $_i$ -gekoppelter Rezeptoren induziert werden. Um auszuschließen, dass weder Batimastat noch das Diphtheria Toxin Analog CRM197 unspezifisch G-Protein-vermittelte Prozesse beeinflussen, wurde die PLC $\beta$  Aktivierung anhand der Akkumulation von Inositolphosphaten (IP Akkumulation) untersucht.

Hierzu wurden COS-7/M1R Zellen mit [ $^3\text{H}$ ]-*Myo*-Inositol markiert, stimuliert, lysiert und radioaktiv markiertes Inositolphosphat durch einen Ionenaustausch abgetrennt und quantifiziert. Wie zu erwarten steigert der transient exprimierte  $G_q$ -gekoppelte, M1R die IP Akkumulation beträchtlich während endogene Thrombin Rezeptoren nur geringfügig PLC $\beta$  aktivieren können (Abb. 17). Unabhängig von der verschiedenen starken IP Akkumulation wurden weder die Carbachol- noch die Thrombin-induzierten Effekte durch Batimastat oder CRM197 beeinflusst.



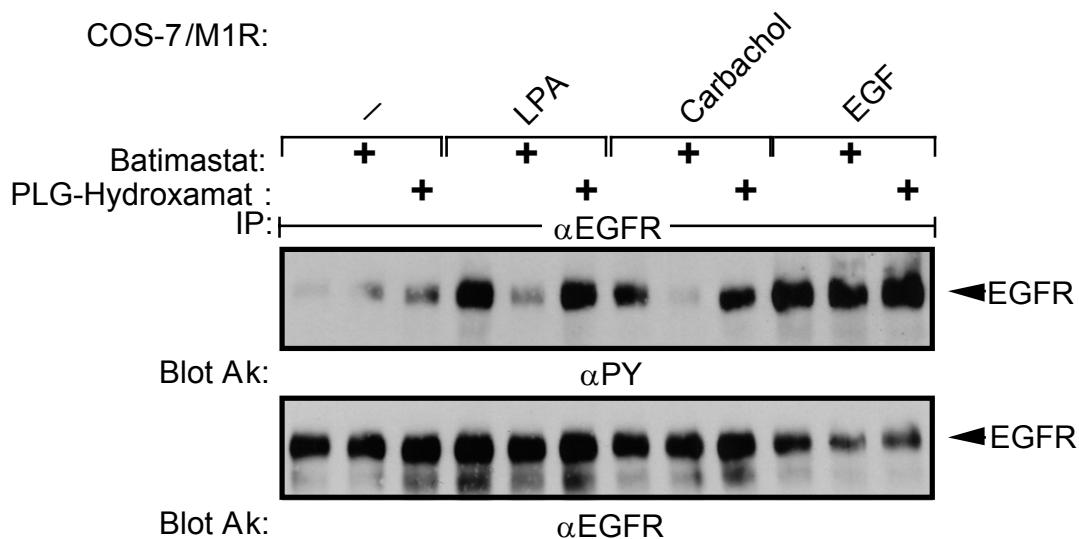
**Abb. 17: Die GPCR-induzierte Inositolphosphatakkumulation verläuft Metalloprotease- und HB-EGF-unabhängig.**

COS-7 Zellen wurden in 12-Loch Schalen mit cDNA des M1R (0.5  $\mu\text{g}/\text{Loch}$ ) transfiziert. Nach dem Serumentzug für 24 h wurden die Zellen für 30 min in HBSS Medium kultiviert, gegebenenfalls mit den angegebenen Inhibitoren versetzt und anschließend für 60 min mit Carbachol (1 mM), EGF (2 ng/ml) oder Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Nach der Zellyse wurde nach 2.5.5 die Inositolphosphatakkumulation bestimmt.

Dieses Resultat zeigt, dass die physiologisch wichtige Bildung von sekundären Botenstoffen durch Batimastat bzw. CRM197 nicht beeinflusst wird, wohingegen Prozesse der mitogenen Signalübertragung wie beispielsweise die GPCR-vermittelte Aktivierung des Ras-MAP Kinase Signalwegs vollständig unterbunden werden. Besonders im Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen, die mit Hyperproliferation und zellulärer Transformation verbunden sind, ist die Inhibition des GPCR Signals auf Ebene der Metalloprotease oder des EGFR Liganden daher von Vorteil.

### 3.4.4 Kollagenasen sind nicht an der EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen beteiligt

Um näher einzugrenzen welche Metalloproteasen für die proHB-EGF Prozessierung verantwortlich sind, wurde der Kollagenase (MMP1, MMP9, MMP13)-spezifische Inhibitor PLG-Hydroxamat (Moore *et al.*, 1986; Bode *et al.*, 1994) auf seine Fähigkeit hin untersucht die Transaktivierung zu blockieren. Selbst bei einer hohen Inhibitorkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  blockiert das PLG-Hydroxamat nicht die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach LPA bzw. Carbachol Stimulation (Abb. 18). Batimastat hingegen inhibiert in geringerer Dosis (5  $\mu\text{M}$ ), wie bereits gezeigt, vollständig die GPCR-induzierte Transaktivierung.

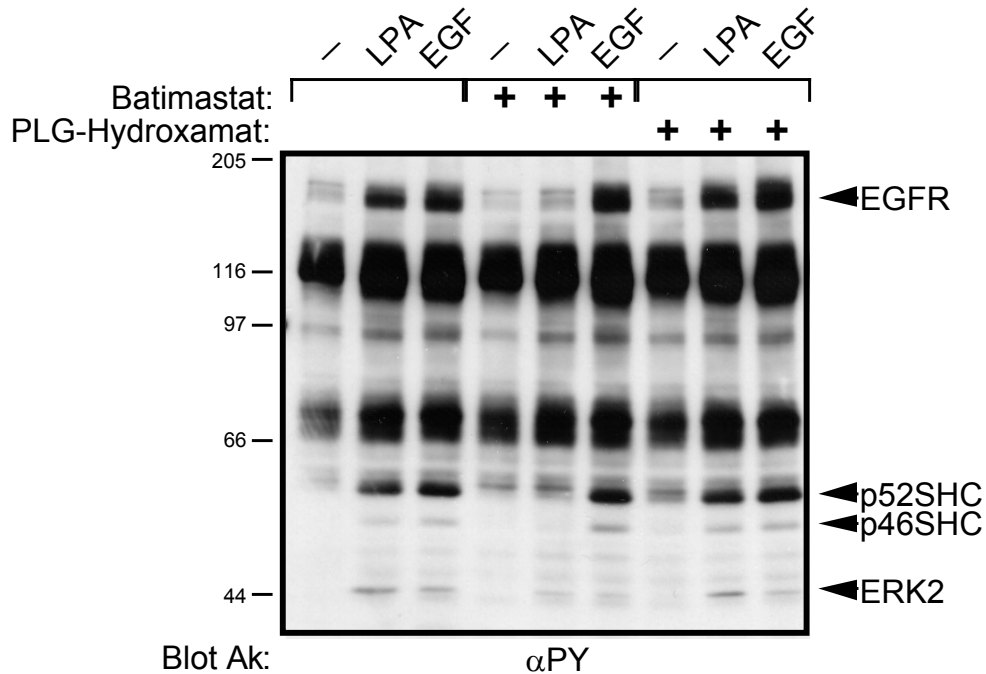


**Abb. 18:** Kollagenase Inhibition hat keinen Einfluss auf LPA- und Carbachol-induzierte EGFR Transaktivierung.

COS-7 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen transient mit cDNA des M1R (je 0.5  $\mu\text{g}/\text{Loch}$ ) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu\text{M}$ ) bzw. mit PLG-Hydroxamat (20  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu\text{M}$ ) oder Carbachol (1 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha\text{EGFR}$ ) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha\text{PY}$ ) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen  $\alpha\text{EGFR}$  Antikörper immundetektiert.

Mit den in Abbildung 18 zur EGFR Immunpräzipitation verwendeten Zelllysaten wurde weiterhin die Phosphorylierung weiterer Proteine mittels Immunoblotanalyse durchgeführt. Während das PLG-Hydroxamat weder die LPA- noch die EGF-induzierte

Tyrosinphosphorylierung beeinflusst, inhibiert Batimastat die LPA-induzierte EGFR und SHC Phosphorylierung (Abb. 19).



**Abb. 19:** Batimastat inhibiert die LPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine.

COS-7 Zellen wurden nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit PLG-Hydroxamat (20  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml) oder LPA (10  $\mu$ M) versetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte die Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY).

Zusätzlich zu den bereits ausführlich behandelten EGFR und SHC Proteinen wird nach BB-94 Vorinkubation auch die Aktivierung der MAP Kinase ERK2 nach LPA Stimulation deutlich inhibiert (siehe 3.5).

### 3.5 Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der GPCR-vermittelten Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, JNK und p38 in COS-7 Zellen

Die MAP Kinasen spielen sowohl bei der Regulation der Zellproliferation und Transformation als auch bei der Expression einer Vielzahl von Genen eine entscheidende Rolle (Schaefer und Weber, 1999; Davis, 2000; Ono und Han 2000). Aus diesem Grunde sollte die Rolle des EGFRs bei der Aktivierung der drei best charakterisierten MAP Kinase Wege nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren geklärt werden.

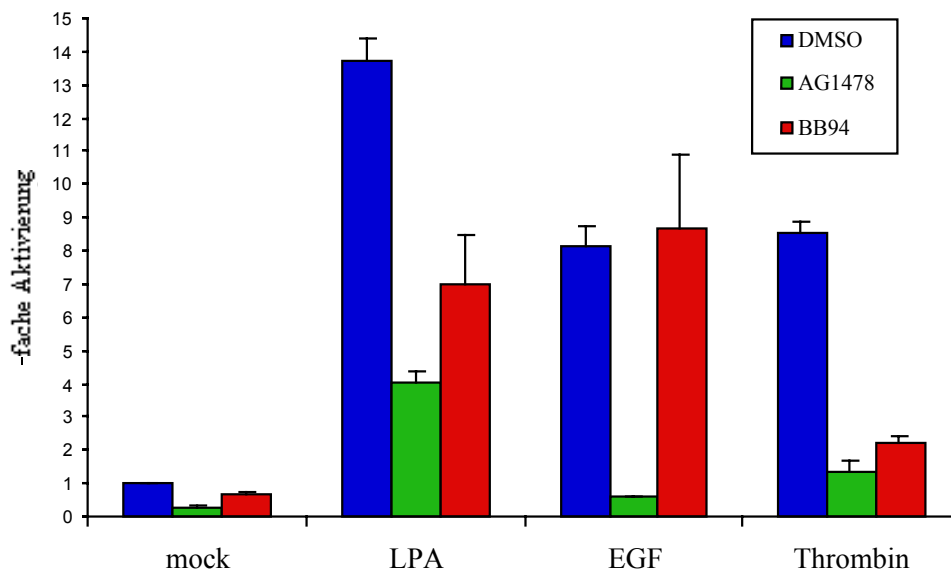
Wie bereits in der Einleitung erwähnt spielt die Transaktivierung des EGFRs für die Aktivierung der MAP Kinasen ERK2 und p38 nach Stimulation verschiedener GPCR eine entscheidende Rolle (Daub *et al.*, 1996; Zwick *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Eguchi *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser bereits bestehenden Publikationen sollte geklärt werden, ob auch in weiteren Zellsystemen die Metalloprotease-vermittelte EGFR Transaktivierung für die GPCR-induzierte MAP Kinase Stimulation benötigt wird.

#### 3.5.1 Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten ERK2 Aktivierung in COS-7 Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass Inhibition des EGFRs, durch die dominant negative HER-CD533 Mutante bzw. durch Behandlung mit Tyrphostin AG1478, die LPA- und Endothelin-induzierte ERK2 Aktivierung in Rat-1 Fibroblasten unterdrückt (Daub *et al.*, 1996). In COS-7 Zellen konnte so die Rolle des EGFRs für die LPA-, Carbachol- und Bombesin-induzierte ERK2 Aktivierung unter Beweis gestellt werden (Daub *et al.*, 1997). Unklar war allerdings in welchem Ausmaß die Inhibition von Metalloproteasen die GPCR-induzierte MAP Kinase Aktivierung unterdrücken kann. Zur Messung der ERK2 Aktivität wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt bei dem nach Immunpräzipitation der MAP Kinase ERK2 deren Aktivität anhand der Phosphorylierung des Substrates MBP (myelin basic protein) bestimmt wurde. Da die Kinasereaktion in Gegenwart von radioaktivem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt wurde, konnte die MBP Phosphorylierung nach SDS-PAGE autoradiographisch detektiert und quantifiziert

werden. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis eines MAP Kinaseassays nach Stimulation der endogen exprimierten Rezeptoren für LPA, Thrombin und EGF in COS-7 Zellen. Vorinkubation der Zellen mit AG1478 bzw. Batimastat interferiert deutlich mit der GPCR-induzierten ERK2 Aktivierung, während die EGF-induzierte MBP Phosphorylierung durch Metalloproteaseinhibition nicht beeinflusst wird (Abb. 20).



**Abb. 20:** Auswirkung der Inhibition des EGFRs bzw. von Metalloproteasen auf die GPCR-induzierte ERK2 Aktivierung in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden in 12-Loch-Schalen transient mit HA-ERK2 Expressionsplasmid (0.1 µg/Loch) transfiziert. Nach 24h Serumentzug wurden die Zellen wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5 µM) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 7 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10 µM) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zellysaten wurde HA-ERK2 mit einem monoklonalen Antikörper (αHA) immunpräzipitiert und ein *in vitro*-Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt (siehe 2.5.2). Phosphoryliertes MBP wurde autoradiographisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Die ERK2 Aktivität in 3 unabhängigen Versuchen quantifiziert und tabellarisch dargestellt.

Auffallend ist die nahezu vollständige Inhibition der Thrombin-induzierten ERK2 Aktivierung, während der hauptsächlich G<sub>i</sub>-gekoppelte LPA Rezeptor trotz EGFR-Inhibition noch ERK2 aktivieren kann. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass, abhängig von den aktivierten G Proteinen EGFR-unabhängige Wege zur GPCR-induzierten ERK Aktivierung beitragen.

---

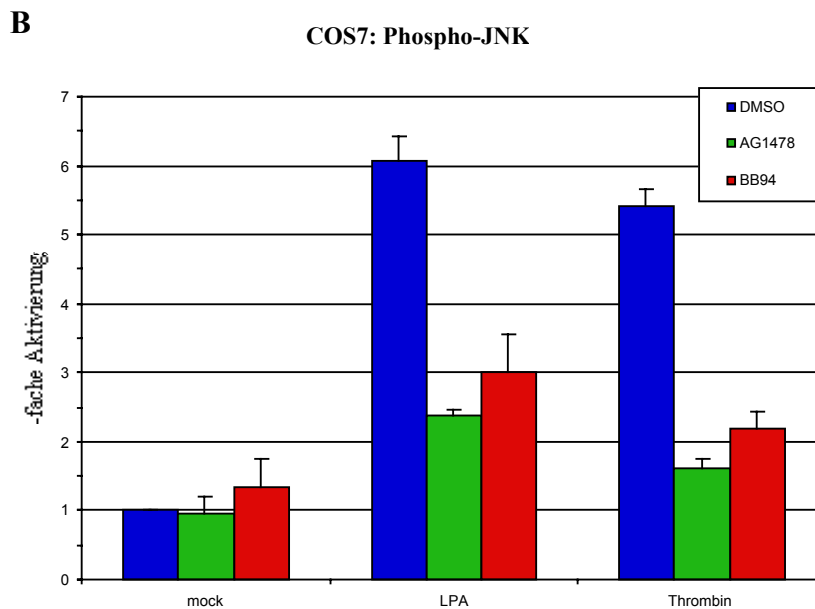
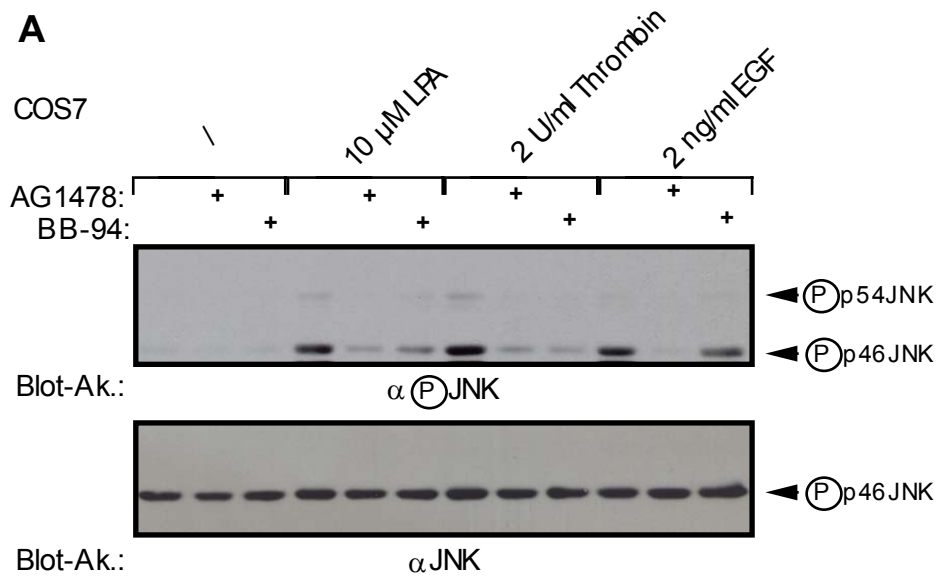
Um diesen Effekt zu untermauern wurden 3 unabhängige Versuche unternommen, quantifiziert und grafisch ausgewertet (Abb. 20). Es konnte somit gezeigt werden, dass neben der EGFR Kinaseaktivität auch Metalloproteasen wichtige Elemente dieses Signalweges sind.

### 3.5.2 Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten JNK Aktivierung in COS-7 Zellen

Neben der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade ist die über die GTPasen Rac- bzw. CDC42-vermittelte Stimulation der verschiedenen JNK Kinasen ein wichtiger Schritt zur Regulation der Genexpression (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995).

Neben der Aktivierung durch zellulären Stress sind sowohl RTKs als auch GPCRs in der Lage die JNK Kinasen zu aktivieren, wobei die unmittelbar an die Rezeptoraktivierung folgenden Schritte noch weitgehend unklar sind. Aus diesem Grund wurde die Rolle des EGFRs bzw. der Batimastat-sensitiven Metalloproteasen für die GPCR-induzierte JNK Aktivierung untersucht. Ähnlich wie ERK1 und 2 verfügen die JNK Kinasen über ein regulatorisch wichtiges TPY Motiv, d. h. die kombinierte Threonin- und Tyrosinphosphorylierung ist ausschlaggebend für die effiziente Aktivierung der Kinasen. Gegen dieses Motiv gerichtete phosphospezifische Antikörper erkennen selektiv die modifizierte Form von JNK und tragen somit zur Analyse des Aktivierungszustands maßgeblich bei.

COS-7 Zellen wurden wie angegeben mit Inhibitoren versetzt und für 10 Minuten mit LPA, Thrombin bzw. EGF stimuliert. Die Zelllysate wurden anschließend mit einem Anti-Phospho-JNK Antikörper analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl die GPCR Agonisten als auch EGF die Phosphorylierung der 46 kDa und 54 kDa JNK Isoformen deutlich erhöhen können (Abb. 21A). Die in Gegenwart der Inhibitoren deutlich reduzierte Aktivierung von JNK nach LPA- und Thrombin Stimulation weist erneut auf die kritische Rolle der Metalloprotease-vermittelten EGFR Transaktivierung hin. Im Gegensatz dazu kann Batimastat die EGF-induzierte JNK Aktivierung nicht beeinflussen.



**Abb. 21 A-B: Die LPA- und Thrombin-induzierte JNK Aktivierung in COS-7 wird durch die Metalloprotease-abhängige EGFR Transaktivierung vermittelt.**

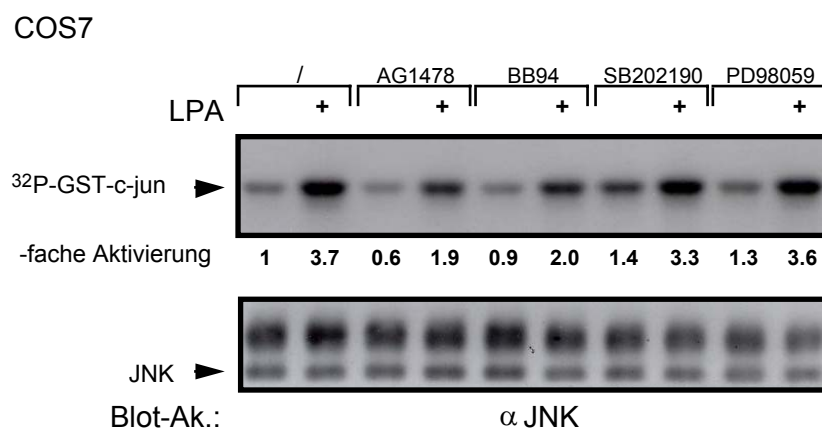
(A) COS-7 Zellen wurden nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-Phospho-JNK Antikörper ( $\alpha$ P-JNK). Nach Ablösen des Antikörpers erfolgte die Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen JNK Antikörper.

(B) COS-7 Zellen wurden in 3 unabhängigen Versuchen wie in (A) mit Wachstumsfaktoren versetzt, der Phosphorylierungsgehalt der 46 kDa JNK Isoform wurde quantifiziert und tabellarisch dargestellt.



Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen untersucht wurden, wurde der Blot anschließend mit einem gegen die 46 kDa Isoform von JNK gerichteten Antikörper analysiert (Abb. 21A unten).

Um den Effekt der Inhibitoren besser zu quantifizieren wurde das Chemilumineszenzsignal der 46 kDa JNK Isoform zweier unabhängiger Experimente mittels CCD Kamera detektiert und grafisch dargestellt (Abb. 21B). Während die Reduktion für LPA bei 50 bis 60 Prozent liegt, ist der Effekt auf die Thrombin-induzierte Stimulation mit 70-80 Prozent Inhibition noch deutlicher. Somit ist der Anteil EGFR- und Metalloprotease-abhängiger Wege bei der LPA- und Thrombin-vermittelten JNK Aktivierung quantitativ vergleichbar mit der ERK2 Regulation in COS-7 Zellen (Vgl. Abb. 20). AG1478, das neben der induzierten auch die basale EGFR Tyrosinphosphorylierung verringert ist in beiden Fällen der stärkere Inhibitor des Phospho-JNK Signals. Eine weitere Möglichkeit die JNK Aktivität zu bestimmen ergibt sich durch die Quantifizierung der JNK-induzierten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-jun nach Ligandstimulation. Zu diesem Zweck wird analog der ERK2 Aktivitätsbestimmung ein *in vitro* Kinaseassay in Gegenwart des JNK Substrates GST-c-jun und radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt. Stimulation von COS-7 Zellen mit LPA führte zu einer deutlichen Zunahme der c-jun Phosphorylierung (Abb. 22).



**Abb. 22:** Die LPA-induzierte JNK Aktivierung in COS-7 Zellen wird partiell durch die Metalloprotease-abhängige EGFR Transaktivierung vermittelt.

COS-7 Zellen wurden in 10cm-Schalen ausgesät, nach 24h Serumentzug wie angegeben mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M, 20') AG1478 (250 nM, 20'), dem p38 Inhibitor SB202190 (10  $\mu$ M, 30') bzw. dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M, 1h) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit LPA (10  $\mu$ M) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde JNK mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ JNK) immunpräzipitiert und ein *in vitro*-Kinaseassay mit GST-c-jun als Substrat durchgeführt (Siehe 2.5.3). Nach Auftrennung mittels 12.5%iger SDS-PAGE wurde auf Nitrozellulosemembran transferiert und phosphoryliertes GST-c-jun autoradiographisch sichtbar gemacht (oben). Parallele Immunoblotanalyse (unten) mit einem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper ( $\alpha$ JNK) zeigte, dass gleiche Mengen JNK analysiert wurden.

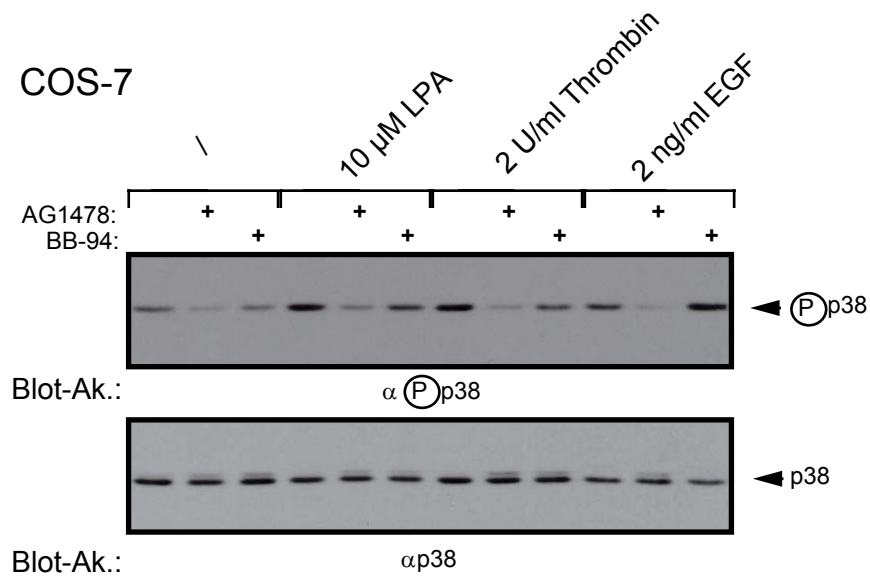
---

Vorinkubation mit dem EGFR Inhibitor AG 1478 bzw. mit Batimastat verringerte dieses Signal um ca. 50%, während die p38- bzw. ERK2-spezifischen Inhibitoren SB202190 und PD98059 kaum Auswirkung zeigen.

### 3.5.3 Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der Thrombin- und LPA-induzierten p38 Aktivierung in COS-7 Zellen

Eine Vielzahl von Liganden, Stressfaktoren und chemischen Substanzen regulieren neben der ERK und JNK Kaskade auch den p38 Signalweg, und koppeln so Rezeptorstimulation mit Genexpression, Zellwachstum oder Apoptose (Ono *et al.*, 2000). Zu Beginn dieser Arbeit war zwar bekannt, daß p38 nach Carbachol, Angiotensin II (ATII), Thrombin und Endothelin-1 (ET-1) aktiviert wird, unklar war allerdings welche Schritte unmittelbar nach GPCR Aktivierung erfolgen. Thrombin aktiviert beispielsweise den p38 Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen über eine Genistein-sensitive Tyrosinkinase (Kanda *et al.*, 2001).

Um die Rolle des EGFRs bei der LPA- und Thrombin-induzierten p38 Aktivierung in COS-7 Zellen zu untersuchen, wurden diese mit AG 1478 bzw. Batimastat vorinkubiert und anschließend für 10 Minuten mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren versetzt. Analyse der p38 Stimulation mit Phospho-spezifischen Antikörpern ergab eine deutliche Aktivierung dieser MAP Kinase nach GPCR bzw. EGF Stimulation, die nach EGFR- bzw Metalloprotease Inhibition wesentlich verringert wurde (Abb. 23).



**Abb. 23:** Die LPA- und Thrombin-induzierte p38 Aktivierung in COS-7 Zellen wird durch die Metalloprotease-abhängige EGFR Transaktivierung vermittelt.

COS-7 Zellen wurden nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5 μM) bzw. AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10 μM) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellysate und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-Phospho-p38-Antikörper (αP-p38). Parallel hierzu erfolgte die Immunoblotanalyse der Zellysate mit einem polyklonalen p38 Antikörper.

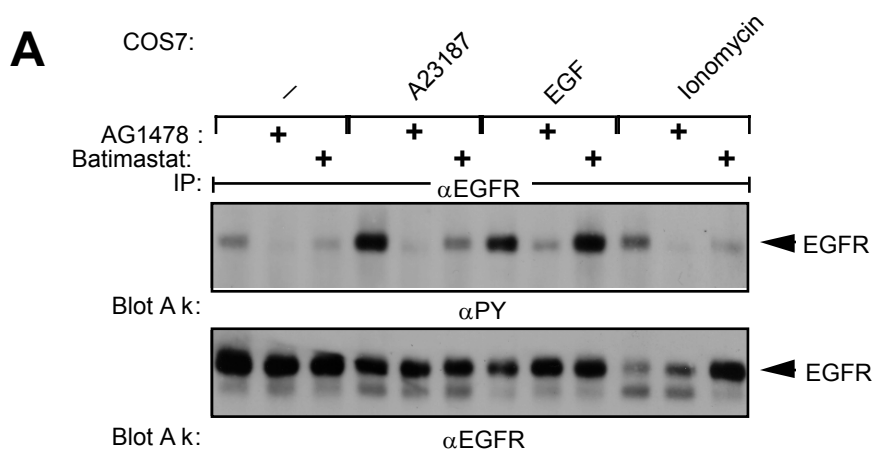
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der EGFR in COS-7 Zellen die Aktivierung der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 nach LPA bzw. Thrombin Stimulation vermittelt. Die Inhibition Zink-abhängiger Metalloproteasen durch Batimastat verringert die GPCR-induzierten Effekte deutlich, jedoch in geringerem Ausmaß als AG 1478. Dies kann auf die stärkere Inhibition der basalen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs durch das ATP-analoge Tyrphostin zurückgeführt werden. Weiterhin unterstreichen diese Daten die essentielle Rolle von Metalloproteasen für die Transaktivierung des EGFRs und weiterer wichtiger Signalschritte wie die SHC und Gab1 Tyrosinphosphorylierung bzw. ERK, JNK und p38 Aktivierung.

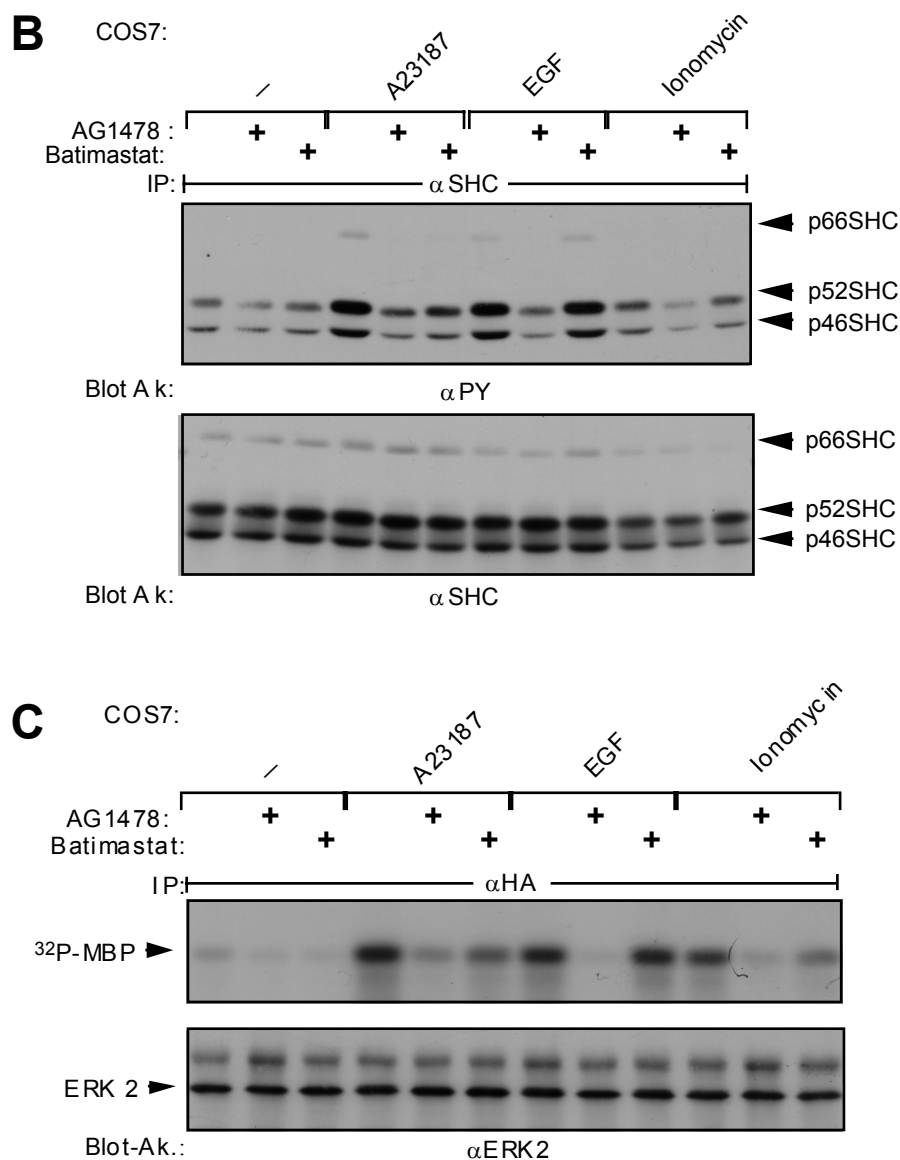
### 3.6 Die Kalzium-induzierte EGFR Transaktivierung und Signalgenerierung in COS-7 Zellen

Bereits veröffentlichte Daten von E. Zwick belegen, dass die durch KCl-induzierte Membranpolarisation von PC 12 Zellen und der daraus resultierende Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur EGFR Transaktivierung führt (Zwick *et al.*, 1997).

Diese Kalzium-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung koppelt Membrandepolarisation an den RAS-MAP Kinase Signalweg und c-fos Gentranskription (Zwick *et al.*, 1999).

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurde berichtet, dass der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch Membrandepolarisation oder Ionophor Behandlung zur Metalloprotease-vermittelten Prozessierung von proHB-EGF führt (Dethlefsen *et al.*, 1998). Ionophore sind hydrophobe Substanzen, die die Membrandurchlässigkeit bestimmter Ionen erhöhen, so führt die Behandlung mit Ionomycin bzw. mit A23187 zu einem Kalziumioneneinstrom. Im folgenden sollte somit geklärt werden, ob  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Effekte auf die Metalloprotease-vermittelte EGF Liganden Generierung und der daraus resultierenden EGFR Transaktivierung zurückzuführen sind. Abbildung 24 A-C zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte EGFR Transaktivierung, SHC Tyrosinphosphorylierung und ERK Aktivierung in COS-7 Zellen. EGFR Inhibition durch AG1478 blockiert die Ionophor-vermittelte Signalübertragung, wobei der relative Effekt für alle Signalschritte ähnlich deutlich ist. Batimastat inhibiert ebenfalls alle  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Effekte, allerdings, vergleichbar mit den GPCR-vermittelten Effekten in 3.5, in etwas geringerem Umfang.





**Abb. 24:** Kalzium-induzierte EGFR Transaktivierung, SHC Phosphorylierung und ERK2 Aktivierung in COS-7 Zellen verlaufen Batimastat abhängig.

(A) COS 7 Zellen wurden in 6cm Schalen nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), 15 min mit A23187 (5  $\mu$ M) bzw. Ionomycin (1.8 mM) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ EGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen  $\alpha$ EGFR Antikörper immundetektet.

(B) COS 7 Zellen wurden wie in (A) behandelt, lysiert, und die SHC Proteine mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ SHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser abgelöst und mit einem monoklonalen  $\alpha$ SHC Antikörper immundetektet.

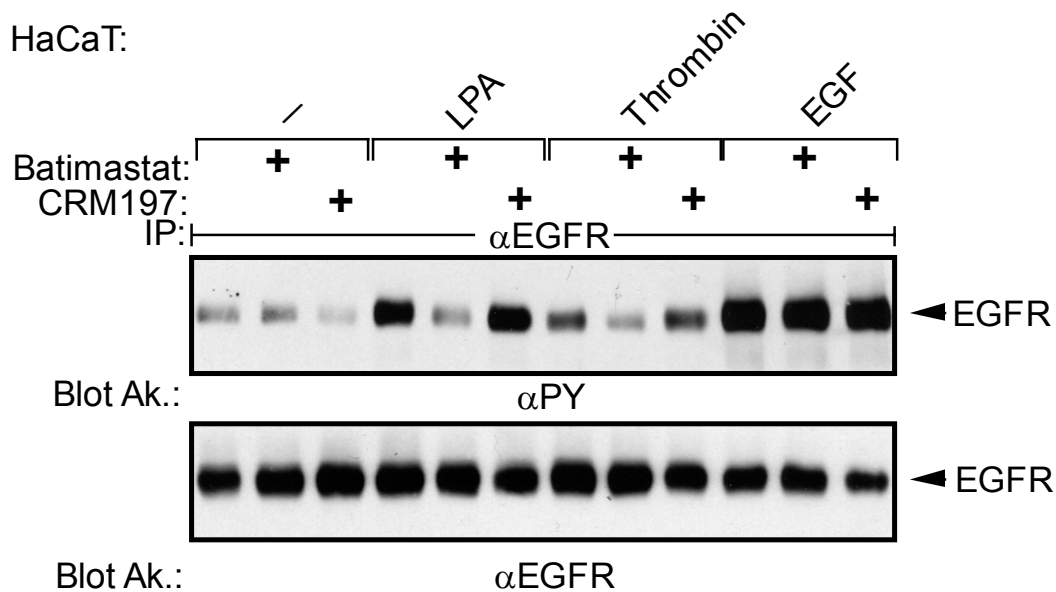
(C) COS 7 Zellen wurden wie in (A) behandelt, lysiert, und HA-ERK2 mit einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ HA) immunpräzipitiert, anschließend erfolgte der *in vitro* Kinaseassay mit MBP als Substrat und Autoradiographie wie in 2.5.2 beschrieben.

### 3.7 Die Rolle der EGFR Transaktivierung für die mitogene GPCR-induzierte Signalübertragung in humanen HaCaT Keratinozyten

Um zu zeigen, dass die EGFR Transaktivierung über die proteolytische Prozessierung von EGF-ähnlichen Liganden kein zelltypspezifischer sondern ein genereller Reaktionsmechanismus ist, wurden humane Keratinozyten (HaCaT) untersucht (Boukamp *et al.*, 1988). Von dieser Zelllinie war bereits bekannt, dass der EGFR durch LPA und Thrombin transaktiviert wird (Daub *et al.*, 1997), und nach EGFR Aktivierung das Zellwachstum, ERK2 Aktivierung und die Gentranskription induziert werden (Marques *et al.*, 1999). Von Interesse war somit, ob die EGFR Transaktivierung für die GPCR-induzierte mitogene Signalübertragung benötigt wird.

#### 3.7.1 Die EGFR Transaktivierung in HaCaT Zellen

Die humane nicht-transformierte Zelllinie HaCaT eignet sich zur Untersuchung der EGF-vermittelten Signalübertragung in Keratinozyten (Marques *et al.*, 1999). Da bereits bekannt war, dass LPA und Thrombin die EGFR Transaktivierung induzieren können (Daub *et al.*, 1997), stellte sich die Frage, ob Metalloproteasen und HB-EGF an diesem Signallschritt beteiligt sind. Hierzu wurden HaCaT Zellen in 6-Loch Schalen mit Batimastat oder dem Diphtheria Toxin Analog CRM197 vorinkubiert und mit LPA, Thrombin oder EGF stimuliert. Der humane EGFR wurde immunpräzipitiert und auf seine Tyrosinphosphorylierung hin untersucht. Im Gegensatz zu COS-7 Zellen führt LPA Stimulation in diesem Fall zu einer stärkeren EGFR Transaktivierung als Thrombin, die LPA-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung ist in etwa vergleichbar mit der durch 2 ng/ml EGF hervorgerufenen EGFR Aktivierung (Abb. 25). Batimastat interferiert selektiv mit dem GPCR Signal, während der EGF-stimulierte Effekt nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu COS-7 Zellen inhibiert CRM197 weder die EGF- noch die LPA- bzw. Thrombin-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung (Abb. 25).



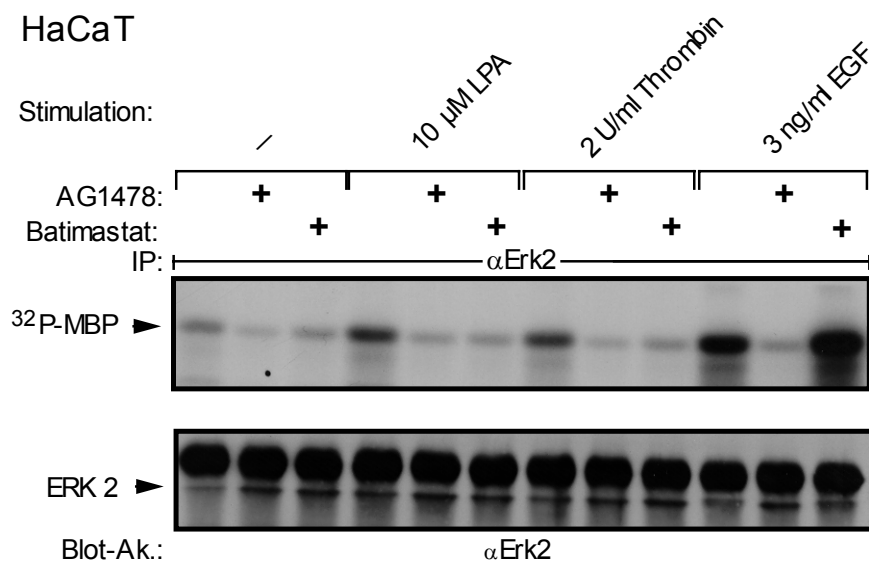
**Abb. 25:** Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung in HaCaT Zellen ist Batimastat-sensitiv.

HaCaT Zellen wurden in 6-Loch-Schalen nach 24h Serumentzug teilweise für 20 min mit CRM197 (10 µg/ml) bzw. Batimastat (5 µM) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10 µM) und oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (αEGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen αEGFR Antikörper immundetektiert.

Daraus kann geschlossen werden, dass die EGFR Transaktivierung in HaCaT Keratinozyten über Metalloproteasen vermittelt wird, möglicherweise allerdings ein von HB-EGF verschiedener EGF-ähnlicher Ligand beteiligt ist. Da humane Zellen allerdings im Vergleich zu COS-7 Zellen aufgrund einer veränderten proHB-EGF AS-Sequenz Vorläufer Diphtheria Toxin wesentlich schlechter binden, kann dieses Ergebniss lediglich als Hinweis nicht als Beweis gewertet werden. Da der EGFR in COS-7 Zellen für die GPCR-induzierte ERK2 Aktivierung essentiell ist (vgl. 3.5.1) war grundsätzlich von Interesse ob und in welchem Ausmaß die G-Protein vermittelte Stimulation von ERK2 in HaCaT Zellen von der EGFR Funktion abhängt.

### 3.7.2 Die Rolle des EGFRs und Zink-abhängiger Metalloproteasen bei der GPCR-induzierten ERK2 Aktivierung in HaCaT Zellen

Der EGFR und seine Liganden haben für epidermale Zellen mehrere Funktionen, so werden der Stimulation von Rezeptoren der EGFR Familie in HaCaT Zellen die Aktivierung der ERK Kinasen und der Gentranskription (Marques *et al.*, 1999) sowie anti-apoptotische Fähigkeiten (Stoll *et al.*, 1998; Jost *et al.*, 1999) zugeschrieben. Um die Rolle der EGFR Transaktivierung für die LPA- und Thrombin-induzierte ERK2 Aktivierung zu untersuchen wurden HaCaT Zellen für 20 Minuten mit AG 1478 bzw. Batimastat versetzt und anschließend weitere 7 Minuten mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert. Anschließende Immunpräzipitation und *in vitro* Kinaseassay zeigen, dass die starke Zunahme der MBP Phosphorylierung nach GPCR Stimulation durch die Inhibitoren deutlich blockiert werden kann, d.h. sowohl Metalloproteasen als auch der EGFR kritische Signalelemente des LPA- bzw. Thrombin Signalweges sind (Abb. 26).

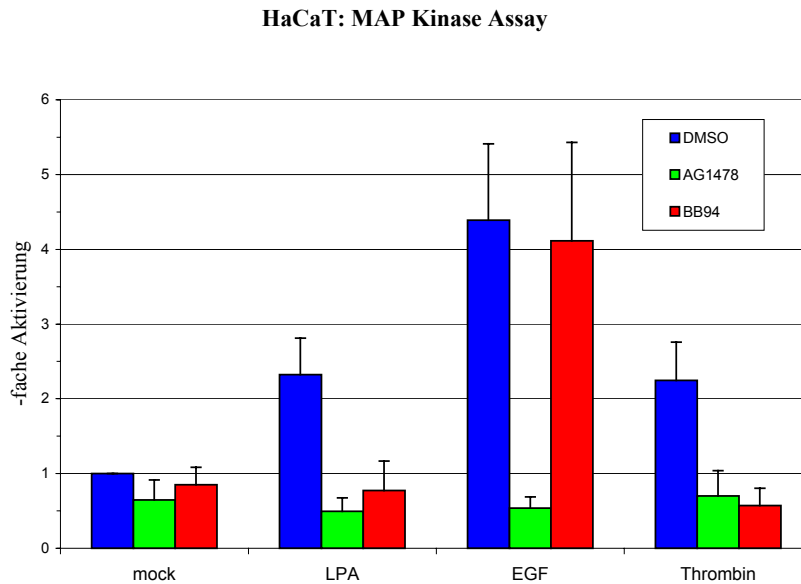


**Abb. 26:** LPA- und Thrombin-induzierte ERK2 Aktivierung in HaCaT Zellen verläuft über die Metalloprotease-vermittelte Transaktivierung des EGFRs.

HaCaT Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 7 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde ERK2 mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ ERK2) immunpräzipitiert und ein *in vitro*-Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt (siehe 2.5.2). Nach Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE wurde auf Nitrozellulosemembran transferiert und phosphoryliertes MBP autoradiographisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Parallele Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper ( $\alpha$ ERK2) zeigte dass gleiche Mengen ERK2 analysiert wurden.



Um die Beweiskraft dieses Experimentes noch zu unterstreichen wurden 3 weitere voneinander unabhängige Versuche unternommen und jeweils die Aktivierung der MAP Kinase ERK2 nach GPCR- bzw. EGF Stimulation quantifiziert (Abb. 27).



**Abb. 27:** LPA- und Thrombin-induzierte ERK2 Aktivierung in HaCaT Zellen verläuft vollständig über die Metalloprotease-vermittelte Transaktivierung des EGFRs.

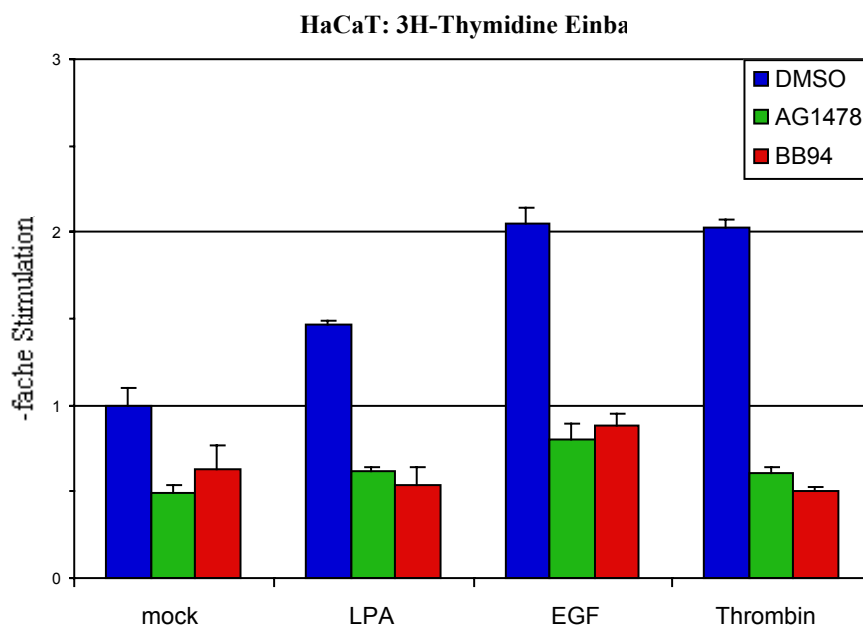
HaCaT Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 7 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zellysaten wurde ERK2 mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ ERK2) immunpräzipitiert und ein *in vitro*-Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt (siehe 2.5.2). Nach Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE wurde auf Nitrozellulosemembran transferiert und phosphoryliertes MBP autoradiographisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Parallele Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper ( $\alpha$ ERK2) zeigte dass gleiche Mengen ERK2 analysiert wurden. Die Abbildung zeigt die tabellarische Auswertung aus 3 unabhängigen Versuchen

Wie aus dieser tabellarischen Auswertung hervorgeht ist der EGFR dessen Inhibition die G-Protein-vermittelte ERK2 Stimulation vollständig unterdrückt, ein zentrales Element zur Aktivierung des Ras-MAP Kinase Signalweges in HaCaT Zellen.

Bisher wurde die EGFR Transaktivierung in COS-7 bzw. HaCaT Zellen mit der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine bzw. der Aktivierung wichtiger Kinasekaskaden in Verbindung gebracht. GPCRn für LPA und Thrombin induzieren in Verbindung mit der Ras-MAP Kinase Kaskade in einer Vielzahl von Zelllinien zelluläres Wachstum (Dhanesakaran *et al.*, 1998; Gutkind, 1998). Für Thrombin konnte beispielsweise eine mitogene Wirkung auf HaCaT Zellen gezeigt werden ohne dass die dafür notwendigen Mechanismen genauer aufgezeigt wurden (Algermissen *et al.*, 2000).

### 3.7.3 Die Rolle der EGFR Transaktivierung bei der Thrombin- und LPA-induzierten DNA Neusynthese in HaCaT Zellen

Neben der bekannten Funktion von EGF-ähnlichen Liganden als autokrine Wachstumsfaktoren für humane Keratinozyten (Piepkorn *et al.*, 1998) ist wenig über die mitogene Aktivität von GPCR Liganden für Keratinozyten bekannt. Aus diesem Grund wurde die GPCR-vermittelte Zellproliferation in HaCaT Zellen untersucht. Gehungerte HaCaT wurden mit dem EGFR Tyrphostin AG 1478 bzw. mit Batimastat versetzt und für 18 Stunden mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren stimuliert. Anschließend wurde für weitere 4 Stunden [Methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin zugegeben, die Zellen lysiert und die DNA-Neusynthese anhand des Einbaus des radioaktiv markierten Thymidin festgestellt. Sowohl AG1478 als auch Batimastat inhibieren die LPA-, EGF- und Thrombin-induzierte DNA Neusynthese vollständig (Abb. 28). Bereits der basale Thymidineinbau wird durch beide Substanzen um 50 bzw. 40 % reduziert, ein Effekt, der das autokrine Wachstum nach Ligandprozessierung durch den EGFR zum Ausdruck bringt.

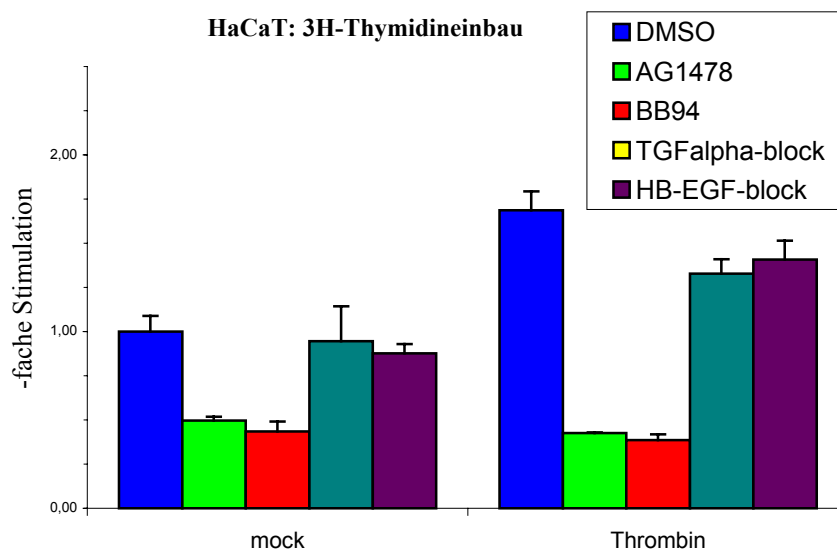


**Abb. 28:** Funktion des EGFRs und Batimastat-sensitiver Metalloproteasen bei der GPCR-induzierten DNA Neusynthese in HaCaT Zellen.

HaCaT Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Nach 18 Stunden wurde für weitere 4 Stunden [Methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin zugegeben, die Zellen lysiert und die DNA Syntheserate wie unter 2.5.4 angegeben bestimmt.

Im Gegensatz zu der EGF-induzierten und Batimastat-insensitiven ERK2 Aktivierung wird das EGF-vermittelte Zellwachstum durch BB94 vollständig blockiert. Somit ist auch der EGF-stimulierte Thymidineinbau abhängig von der Funktion Zink-abhängiger Metalloproteasen.

Um die Identität des EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors, der die mitogene Aktivität nach GPCR Stimulation vermittelt, zu ermitteln wurde die DNA-Neusynthese nach Thrombin Stimulation in Gegenwart blockierender Antikörper gegen HB-EGF und  $TGF\alpha$  ermittelt. Für beide Antikörper ergibt sich ein signifikanter allerdings nur partieller inhibitorischer Effekt auf die Thrombin Stimulation (Abb. 29). Während der  $TGF\alpha$  Antikörper die 1.9fache Stimulation auf 1.3 reduziert, ist es nach HB-EGF Inhibition noch eine DNA Neusynthese Rate von 1.4.



**Abb. 29:** HB-EGF und  $TGF\alpha$  vermitteln partiell die mitogene Signalübertragung in HaCaT Zellen.

HaCaT Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M), AG1478 (250 nM) oder einem blockierenden  $TGF\alpha$  (X  $\mu$ g/ml) bzw. HB-EGF (X  $\mu$ g/ml) Antikörper versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Nach 18 Stunden wurde für weitere 4 Stunden [Methyl- $^3$ H]Thymidin zugegeben, die Zellen lysiert und die DNA Syntheserate wie unter 2.5.4 angegeben bestimmt.

Aus diesem Ergebniss läßt sich somit schließen, dass mindestens zwei Liganden der EGF Familie für das GPCR-vermittelte Wachstum von HaCaT Zellen benötigt werden.

Die Ergebnisse mit nicht-transformierten HaCaT Keratinozyten bestätigen die Daten aus COS-7 Zellen und unterstreichen die grundlegende Funktion des EGFRs bei der GPCR-vermittelten mitogenen Signalübertragung. Die starke Abhängigkeit des GPCR-

---

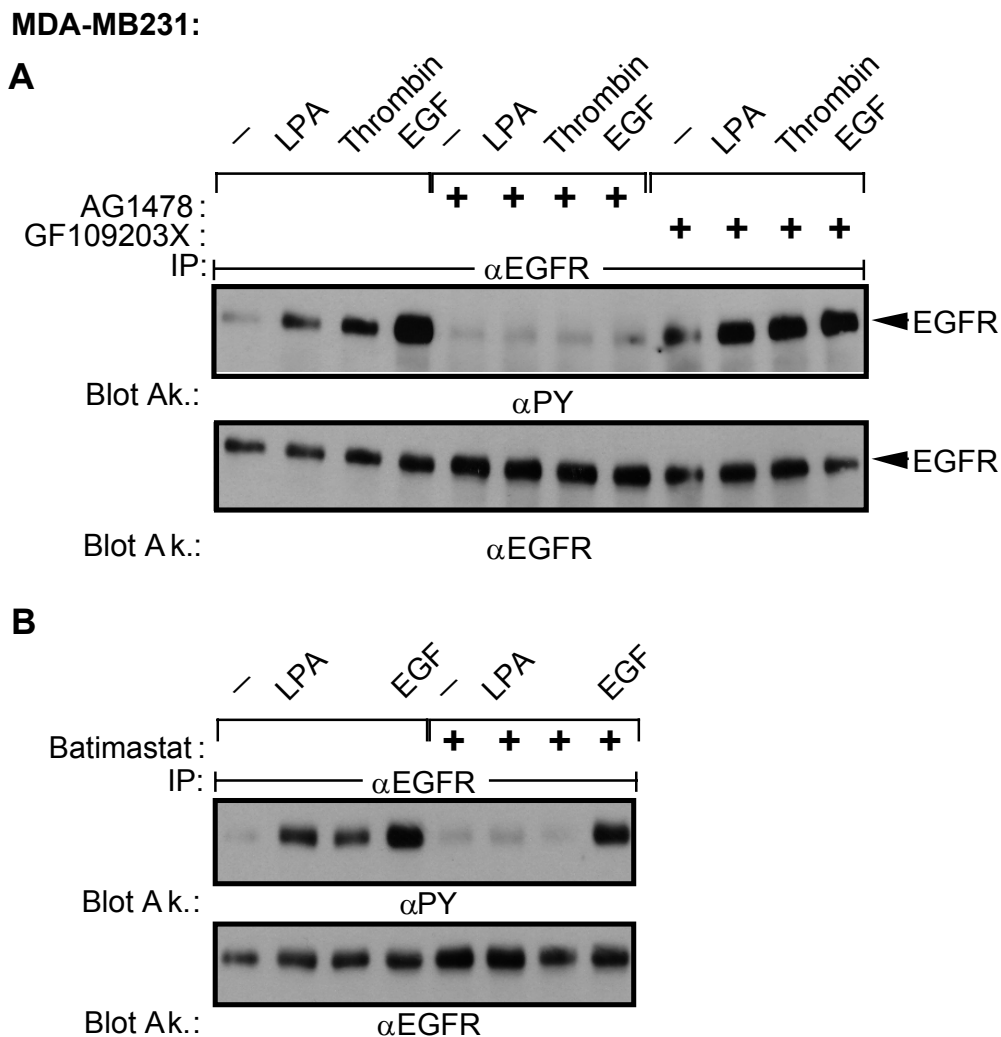
induzierten Zellwachstums von der EGFR Funktion führt zur Frage inwieweit dieser Mechanismus für hyperproliferative Krankheiten wie beispielsweise Krebs relevant ist. Aus diesem Grund wurden die humanen Brustkrebszellen MDA-MB 231 als weiteres Zellsystem untersucht.

### **3.8 Die Rolle der EGFR Transaktivierung für die GPCR-induzierte Signalübertragung in humanen MDA-MB 231 Brustkrebszellen**

Auf Grund der weit verbreiteten Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und deren Liganden und der damit verbundenen ubiquitären mitogenen Aktivität dieser Wachstumsfaktoren ist die Rolle verschiedener GPCR häufig im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und -progression in Verbindung gebracht worden (Gutkind, 1998; Fang *et al.*, 2000). Unter der Vielzahl von mitogenen Liganden sind beispielsweise LPA für Ovarialkarzinome (Erickson *et al.*, 2001) und Brustkrebszellen (Goetzl *et al.*, 1999), Bradykinin für Prostatakrebszellen (Barki-Harrington und Daaka, 2001) oder Thrombin in Verbindung mit dessen onkogenem Rezeptor PAR-1 (Martin *et al.*, 2001) für die Brustkrebsmetastasierung zu nennen (Henrikson *et al.*, 1999; Even-Ram *et al.*, 1998).

#### **3.8.1 Die EGFR Transaktivierung in humanen MDA-MB 231 Brustkrebszellen**

Neben den häufig verwendeten Modellsystemen wie COS-7 und HEK 293 Zellen waren zu Beginn dieser Doktorarbeit kaum Beispiele der EGFR Transaktivierung in humanen Krebszelllinien bekannt. Aus diesem Grund wurden die für Ihre stark metastasierenden Eigenschaften charakterisierten MDA-MB231 Zellen auf die LPA- bzw. Thrombin-induzierte Signalübertragung untersucht. Vergleichbar zu den bisher vorgestellten Zellsystemen können LPA, Thrombin und EGF die EGFR Tyrosinphosphorylierung deutlich erhöhen (Abb. 30A). Die GPCR-induzierte Transaktivierung konnte dabei vollständig durch AG1478, nicht allerdings durch den PKC Inhibitor GF109203X vermindert werden.



**Abb. 30 A-B:** Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung in MDA-MB 231 Zellen verläuft Batimastat- und AG1478-sensitiv.

MDA-MB 231 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit (A) AG1478 (250 nM) oder GF109203X (1  $\mu$ M) bzw. (B) BB-94 (5  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend 3 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zellysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ EGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser abgelöst und mit einem polyklonalen  $\alpha$ EGFR Antikörper immundetektiert.

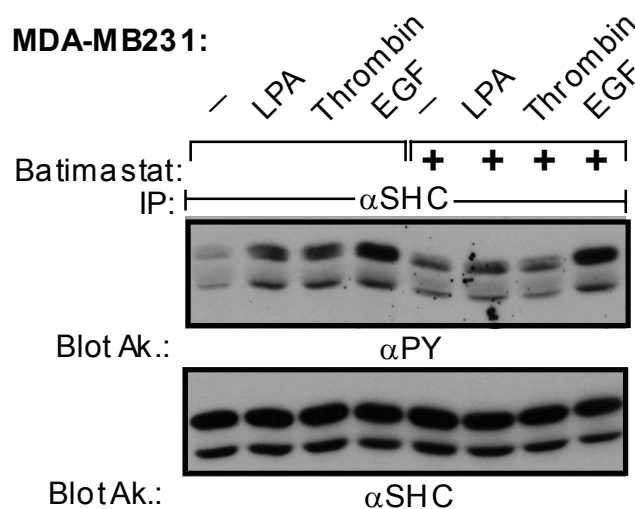
Wiederholt wurden für den  $G_q$ -gekoppelten M1R (Tsai *et al.*, 1997) und den UTP Rezeptor (Soltoff *et al.*, 1998) PKC als Vermittler der G-Protein-induzierten EGFR Transaktivierung diskutiert. Die Ergebnisse hier, in Verbindung mit der Tatsache, dass der M1R bzw. LPA Rezeptor in COS7 Zellen ebenfalls PKC-unabhängig die EGFR Transaktivierung vermitteln (H. Daub, Dissertation), lassen allerdings auf eine Zelltyp- und Rezeptor-abhängige Beteiligung dieser Threoninkinase schließen. Im Gegensatz dazu wird die G-Protein-vermittelte, allerdings nicht die EGF-induzierte, EGFR

Tyrosinphosphorylierung in Gegenwart des Metalloprotease Inhibitors Batimastat vollständig blockiert (Abb. 30B).

Die Ergebnisse unterstützen somit das Modell, dass die Signalübertragung zwischen GPCR und dem EGFR zelltypunabhängig über die Metalloprotease-vermittelte proteolytische Prozessierung von EGF Liganden verläuft.

### 3.8.2 Die GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in MDA-MB231 Zellen ist Metalloprotease abhängig

Wie bereits erwähnt (Vgl. 3.2.2) koppelt die SHC Tyrosinphosphorylierung GPCR Aktivierung an wichtige Schritte der mitogenen Signalübertragung (Chen *et al.*, 1996). Im folgenden Experiment sollte die Rolle von Metalloproteasen für die GPCR-vermittelte SHC Phosphorylierung untersucht werden. Immunpräzipitation mit spezifischen SHC Antikörper und Immundetektion mit Phosphotyrosinantikörper zeigt, dass die LPA- und Thrombin-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung durch Batimastat Vorinkubation blockiert wird (Abb. 31).



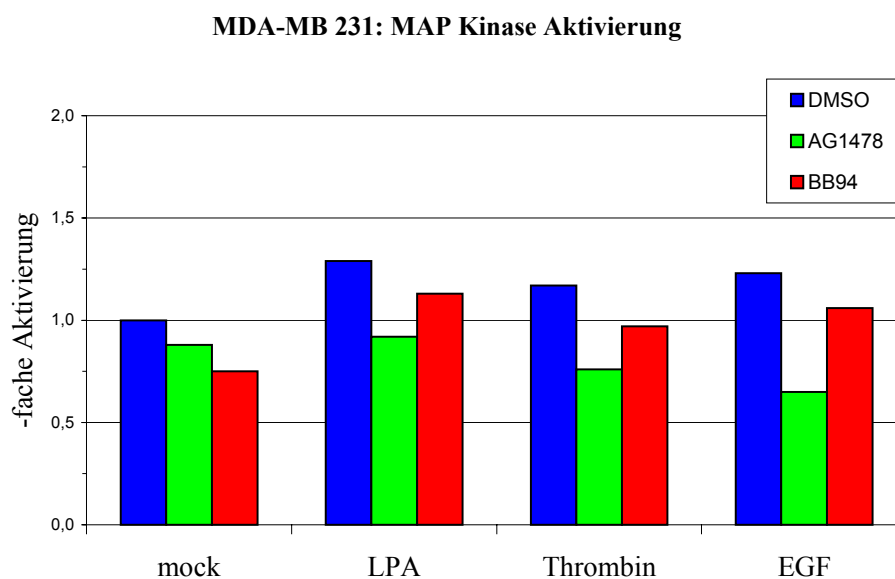
**Abb. 31: Batimastat inhibiert die GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in MDA-MB 231 Zellen.**

MDA-MB 231 Zellen wurden in 6-Loch-Schalen ausgesät, nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit EGF (2 ng/ml) oder den GPCR Agonisten LPA (10  $\mu$ M) bzw. Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zelllysaten wurden die SHC Proteine mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ SHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser abgelöst und mit einem monoklonalen  $\alpha$ SHC Antikörper immundetektiert.

Die Kontrollstimulation mit EGF bleibt hingegen vom Metalloprotease Inhibitor unbeeinflusst. Somit konnte gezeigt werden, dass der EGFR auch in Brustkrebszellen für frühe Signalschritte G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verantwortlich ist.

### 3.8.3 Die EGFR Abhängigkeit der GPCR-vermittelten ERK2 Aktivierung in MDA-MB231 Zellen

Analog der Vorgehensweise in HaCaT Zellen sollte nun die Beteiligung des EGFRs an der GPCR-induzierten ERK Aktivierung überprüft werden. Im Gegensatz zu nicht-transformierten Rat-1 Fibroblasten (Daub *et al.*, 1996) oder HaCaT Zellen (vgl. 3.7.2) können LPA und Thrombin die ERK Aktivität nur geringfügig erhöhen (Abb. 32). Sowohl das EGFR-spezifische Tyrphostin AG1478 als auch Batimastat können in diesem Fall die basale als auch die induzierte ERK Aktivierung unterschiedlich stark blockieren (Abb. 32).



**Abb. 32:** Auswirkung von BB94 und AG1478 auf die GPCR-induzierte ERK Aktivierung in MDA-MB 231 Zellen.

MDA-MB231 Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 7 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Aus den Zelllysaten wurde ERK2 mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ ERK2) immunpräzipitiert und ein *in vitro*-Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt (siehe 2.5.2). Nach Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE wurde auf Nitrozellulosemembran transferiert und phosphoryliertes MBP autoradiographisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Die Abbildung zeigt die tabellarische Auswertung des Versuchs.

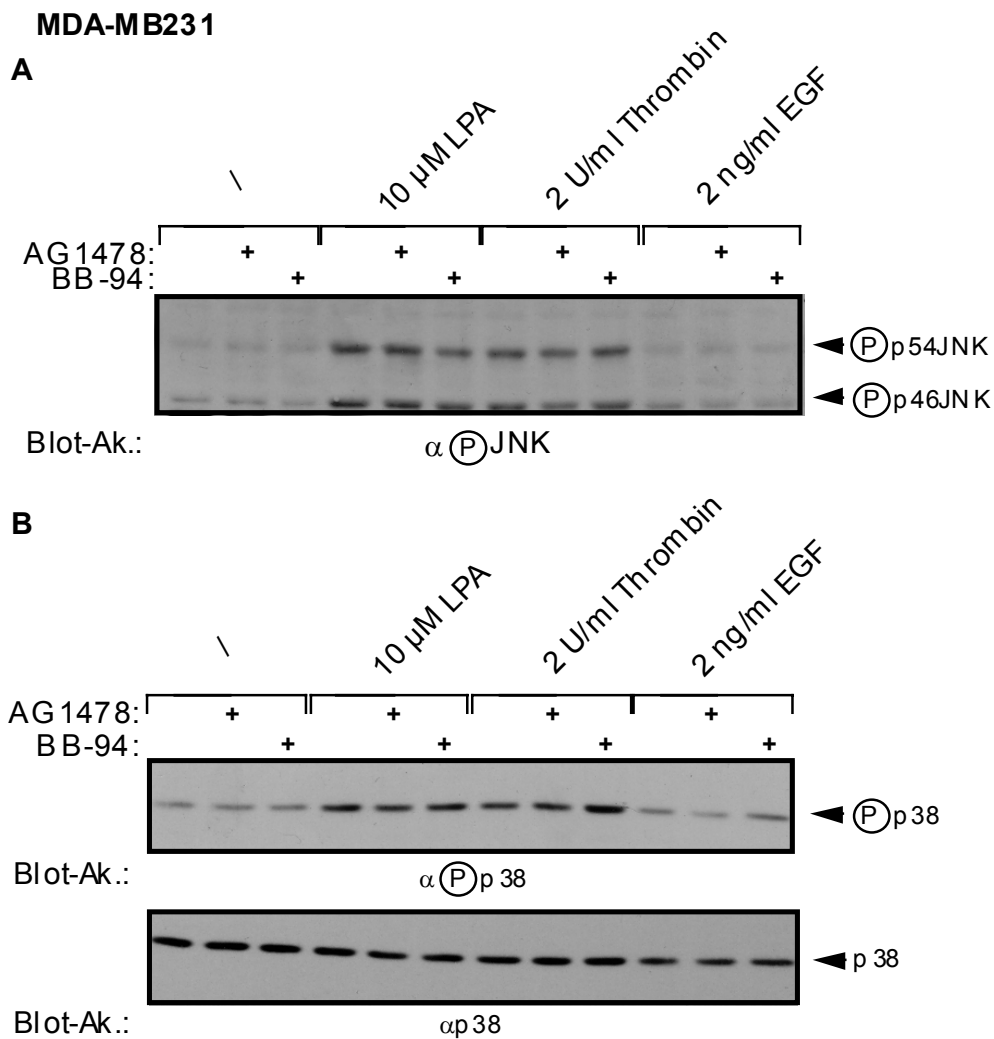
In diesem Versuch zeigt die Inhibition durch AG1478 einen wesentlich stärkeren Effekt als die Behandlung mit Batimastat, was auf eine grundsätzliche Rolle der basalen, ligand-unabhängigen, EGFR Tyrosinphosphorylierung in dieser Zelllinie hindeutet.

Die schwache Stimulation der ERK Kinase und deren auffallend hohe Grundaktivität lässt sich auf die konstitutive Aktivität des Ras Proteins, welches in MDA-MB231 Zellen eine Mutation aufweist, zurückführen (Kozma *et al.*, 1987). Anscheinend können unter diesen Bedingungen exogen zugeführte Wachstumsfaktorenaktoren nur schwache regulatorische Funktionen übernehmen.

#### 3.8.4 Die GPCR-induzierte JNK und p38 Aktivierung in MDA-MB231 Zellen verläuft EGFR unabhängig

In den Kapiteln 3.5.2 und 3.5.3 konnte gezeigt werden, dass die EGFR Transaktivierung neben dem ERK Signalweg auch die Induktion der Stress-aktivierten Protein Kinasen JNK und p38 vermittelt. In Abbildung 33 sollte geklärt werden, inwiefern diese Funktion zelltypspezifisch oder -unabhängig verläuft. MDA-MB 231 Zellen wurden nach AG1478 bzw. BB94 Vorinkubation mit den angegebenen Liganden versetzt, lysiert und mit phosphospezifischen Antikörpern gegen JNK bzw. p38 untersucht. Überraschenderweise ist EGF in diesem Zellsystem nicht in der Lage diese Kinasen zu aktivieren (Abb. 33). Die deutliche Stimulation der JNK bzw. p38 Aktivität durch die GPCR Liganden ist somit, und im Gegensatz zu COS-7 Zellen, weder Batimastat noch AG1478-sensitiv (Abb. 33).





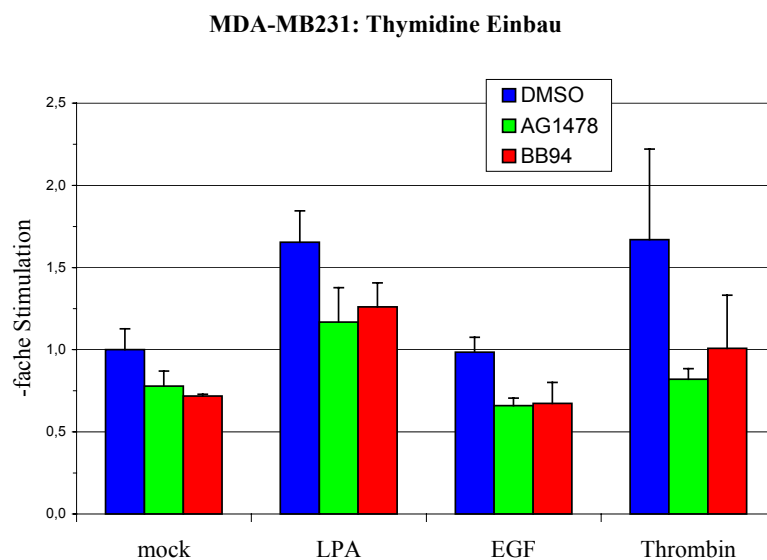
**Abb. 33 A-B: Die GPCR-vermittelte JNK bzw. p38 Aktivierung in MDA-MB 231 Zellen verläuft EGFR unabhängig.**

MDA-MB 231 Zellen wurden nach 24h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. AG1478 (250 nM) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) versetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte Immunoblotanalyse mit einem (A) polyklonalen Anti-Phospho-JNK Antikörper ( $\alpha$ P-JNK) bzw. (B) polyklonalen Anti-Phospho-p38 Antikörper.

Anscheinend fehlen der EGFR Signalmaschinerie in MDA-MB 231 Zellen wichtige zur JNK bzw. p38 Aktivierung notwendige Elemente. Ausgehend davon könnte generalisiert werden, dass der EGFR nach GPCR-induzierter Transaktivierung nur Signalschritte vermitteln kann, die, in diesem Zellsystem, auch nach EGF Stimulation aktivierbar sind.

### 3.8.5 Die EGFR Abhängigkeit der GPCR-vermittelten DNA Neusynthese in MDA-MB231 Zellen

Trotz der schwachen Aktivierung der ERK Kinasen und der EGFR-unabhängigen Aktivierung der JNK und p38 MAP Kinasen war von Interesse ob der EGFR eine Rolle bei der mitogenen Signalübertragung von GPCRn in Krebszellen spielt. Da das unkontrollierte Wachstum ein Hauptmerkmal von Krebszellen darstellt (Hanahan und Weinberg, 2000) sind die Mechanismen und die dafür benötigten Signalgeber von großer Bedeutung um therapeutische Interventionspunkte zu schaffen (Buolamwini 1999). Nach 24 Stunden Serumentzug wurden MDA-MB 231 Zellen mit AG 1478 bzw. Batimastat versetzt und für 18 Stunden mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren stimuliert. Anschließend wurde die DNA-Neusynthese anhand des Einbaus des radioaktiv markierten Thymidin festgestellt (Vgl. 3.7.3). Sowohl AG1478 als auch Batimastat inhibieren größtenteils die LPA- und vollständig die Thrombin-induzierte DNA Neusynthese (Abb. 34).



**Abb. 34:** Funktion des EGFRs und Batimastat-sensitiver Metalloproteasen bei der GPCR-induzierten DNA Neusynthese in MDA-MB 231 Zellen.

MDA-MB Zellen wurden in 12-Loch-Schalen ausgesät und nach 24 h Serumentzug wie angegeben für 20 min mit Batimastat (BB-94, 5  $\mu$ M) bzw. mit AG1478 (250 nM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit EGF (2 ng/ml), LPA (10  $\mu$ M) oder Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Nach 18 Stunden wurde für weitere 4 Stunden [Methyl- $^3$ H]Thymidin zugegeben, die Zellen lysiert und die DNA Syntheserate wie unter 2.5.4 angegeben bestimmt.

---

Bereits der basale Thymidineinbau wird durch beide Substanzen reduziert, ähnlich wie für die ERK Aktivität gezeigt, wird somit das autokrine Wachstum nach Ligandprozessierung durch den EGFR unter Beweis gestellt. Im Gegensatz zu 3.8.4 kann EGF zwar keinen Thymidineinbau induzieren, dennoch übernimmt der EGFR eine essentielle Funktion für die GPCR-vermittelte mitogene Signalantwort in humanen MDA-MB 231 Zellen.

## 4 Diskussion

Grundlegende Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der mitogenen Signalübertragung von Zelloberflächenrezeptoren sind absolut essentiell um physiologische und pathophysiologische Prozesse zu verstehen und therapeutische Interventionsmöglichkeiten aufzudecken.

Zu Beginn dieser Arbeit hatte H. Daub (diese Arbeitsgruppe) gezeigt, dass der EGFR nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an Tyrosinresten phosphoryliert wird, und dies ein grundlegender Schritt ist, GPCR Stimulation an die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, an Gentranskription und das Zellwachstum in Rat-1 Zellen zu koppeln (Daub *et al.*, 1996). Weiterhin konnte E. Zwick (diese Arbeitsgruppe) zeigen, dass in PC12 Zellen, die EGFR Transaktivierung auch nach Membrandepolarisation bzw. GPCR Aktivierung durch Bradykinin und Carbachol auftritt, und für die Signalweiterleitung benötigt wird (Zwick *et al.*, 1997). Nachdem in der Folgezeit in einer Vielzahl von Publikationen meist zelltypspezifische Elemente identifiziert wurden, die die EGFR Transaktivierung vermitteln, sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Mediatoren der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung identifiziert werden, und, falls möglich, ein allgemeingültiges zelltypunabhängiges Konzept zu diesem Mechanismus erarbeitet werden.

### 4.1 Liganden-unabhängige Mechanismen der EGFR Transaktivierung

Wie bereits erwähnt sind eine Vielzahl von Mediatoren beschrieben, die, abhängig von Zelltyp und aktivierten GPCR, die EGFR Transaktivierung vermitteln (Hackel *et al.*, 1999; Zwick *et al.*, 1999). Unter diesen Kandidaten sind die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Src Familie (Luttrell *et al.*, 1997; Bokemeyer *et al.*, 2000), die nach Stimulation mit Angiotensin II oder Carbachol mit dem EGFR assoziieren. In diesem Zusammenhang konnten auch Parsons und Mitarbeiter zeigen, dass die Mutation der Src Tyrosinphosphorylierungsstelle (Tyr845) am EGFR, LPA- und EGF-induziertes Wachstum inhibiert ohne die intrinsische Kinaseaktivität des EGFRs zu beeinflussen (Tice *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte allerdings gezeigt werden, dass die LPA-

induzierte EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen durch den Src Kinase Inhibitor PP1 kaum beeinflusst wird (Daub *et al.*, 1997).

Pyk2, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Tyrosinkinase der FAK Kinase Familie wurde für die Carbachol- bzw. UTP-vermittelte EGFR Tyrosinphosphorylierung verantwortlich gemacht (Keely *et al.*, 2000; Soltoff 1998). In PC12 Zellen hatte allerdings die Expression einer Kinase-inaktiven Pyk2 Mutante keinen Einfluss auf die GPCR-induzierte Transaktivierung (Zwick *et al.*, 1999).

Weiterhin wurde in verschiedenen Zellsystemen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine kritische Rolle für die G-Protein-vermittelte EGFR Transaktivierung zugeschrieben (Eguchi *et al.*, 1998; Matsubara *et al.*, 1998; Soltoff 1998). Neben Src und Pyk2 ist auch die Serin/Threonin Kinase PKC als Mediator GPCR-induzierter Signale zum EGFR diskutiert worden (Tsai *et al.*, 1997; Soltoff *et al.*, 1998; Grosse *et al.*, 2000), obwohl unklar ist wie die PKC Aktivierung, die bislang als eher negativ-regulatorisches Element der EGFR und der HER2 Tyrosinphosphorylierung beschrieben ist (Seedorf *et al.*, 1995), in diesem Zusammenhang, zur verstärkten EGFR Tyrosinphosphorylierung führen kann. Die Tatsache, dass zellulärer Stress, wie hyperosmotischer Schock (King *et al.*, 1989), UV-,  $\gamma$ -Strahlung und verschiedene Oxidantien, die Tyrosinphosphorylierung von RTKn regulieren (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996) war Ausgangspunkt für ein weiteres mechanistisches Modell zur EGFR Transaktivierung. Diese Rezeptoraktivierung wurde auf die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, sog. ROIs (reactive oxygen intermediates), und die daraus resultierende Inaktivierung Rezeptor-antagonistischer Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) zurückgeführt (Huang *et al.*, 1996; Knebel *et al.*, 1996). Aufgrund des zur EGFR Transaktivierung ähnlichen Verlaufs, dieses liganden-unabhängigen Prozesses wurde zunächst auch für die GPCR-vermittelte Transaktivierung ein intrazellulärer Mechanismus diskutiert (H. Daub, Dissertation; Daub *et al.*, 1996).

Ein weiteres Merkmal der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung ist der sehr schnelle Verlauf mit einer transienten Kinetik, der die Neusynthese und Sekretion von EGF-ähnlichen Liganden nach G-Protein Aktivierung auszuschliessen scheint (Daub *et al.*, 1996; Keely *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Weiterhin konnten auch keine EGF-ähnlichen Liganden im Zellkulturmedium nach GPCR Stimulation nachgewiesen werden (Eigene Daten, vgl. 3.3.1; Tsai *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1998).

---

Zusammenfassend ergab sich somit ein mechanistisches Konzept, das die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung ausschließlich durch intrazelluläre Elemente in Abwesenheit von EGF-ähnlichen Liganden vermittelt wird.

## **4.2 Die Rolle der extrazellulären EGFR Domäne für die GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung**

Ein experimenteller Ansatz, die mögliche Beteiligung der extrazellulären Domäne des EGFRs auszuschliessen, beinhaltet die Verwendung einer Rezeptorchimäre bestehend aus dem extrazellulären Teil des humanen EGFRs sowie der Transmembrandomäne und dem intrazellulären Teil des PDGFRs (EP-R) (Seedorf *et al.*, 1991). Ausgehend von der Beobachtung, dass der PDGFR in Rat-1 Zellen nicht transaktiviert wird (Daub *et al.*, 1996) war es umso erstaunlicher, dass diese EP-R Chimäre in Rat-1 Zellen nach GPCR Stimulation transaktiviert wird (E. Zwick, Dissertation; Prenzel *et al.*, 1999). Dieses Ergebniss zeigt somit, dass bei der Transaktivierung, entgegen den bestehenden Modellvorstellungen, der extrazellulären Domäne des EGFRs eine kritische Rolle zukommt. Ähnliche Versuche die GPCR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung des EP-Rs in COS-7 Zellen zu zeigen scheiterten, da der endogen exprimierte EGFR mit der Immunpräzipitation der Chimäre interferierte (eigene Daten, nicht gezeigt). Ein wichtiger Mediator der PDGF-induzierten Signalantwort ist die zytoplasmatische Tyrosinphosphatase SHP-2 (SH2-containing PTP-2) (Vogel *et al.*, 1993). In den EP-R-exprimierenden COS-7 Zellen konnte im Gegensatz zu kontroll-transfizierten Zellen die SHP-2 Tyrosinphosphorylierung nach GPCR Stimulation induziert werden (Vgl. 3.1). Somit leitet die Expression des EP-R das G-Protein Signal zu einer PDGF-spezifischen zellulären Antwort um. Weiterhin führt, wie in Abbildung 9 gezeigt, die Blockierung der extrazellulären Domäne des EGFRs zur vollständigen Inhibition der GPCR-vermittelten Transaktivierung. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage welche Mediatoren den sehr schnellen Prozeß der EGFR Transaktivierung über die extrazelluläre Domäne vermitteln.

### 4.3 Die Rolle von Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren der EGF Familie bei der Transaktivierung des EGFRs

Die experimentellen Befunde, dass die Signalstärke des transaktivierten EGFRs vergleichbar der Stimulation mit geringen Konzentrationen an EGF (1-3 ng/ml) ist (Eguchi *et al.*, 1998), der GPCR Ligand Carbachol EGFR Homodimerisierung auslöst (Tsai *et al.*, 1997) und die Transaktivierung und deren nachgeschaltete zelluläre Ereignisse von der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGFRs abhängen (Keely *et al.*, 1998; Zwick *et al.*, 1997; Cunnick *et al.*, 1998) weisen auf eine mögliche Beteiligung von EGF-ähnlichen Liganden bei der EGFR Transaktivierung hin. Diese mögliche Rolle von Liganden des EGFRs kann zum einen durch blockierende Antikörper unter Beweis gestellt werden, zum anderen steht mit Diphtheria toxin (DT) eine Substanz zur Verfügung, die spezifisch die biologische Aktivität von HB-EGF inhibiert (Mitamura *et al.*, 1996). DT, bzw. die nicht-toxische Mutante CRM197, bindet an den proHB-EGF Vorläufer und wird mit diesem durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert (Naglich *et al.*, 1992). Da die Affinität von DT zu proHB-EGF insbesondere bei Zelllinien der grünen Meerkatze, d.h. Affenzellen hoch ist (Hooper und Eidels, 1995), konnte CRM197 in dem Modellsystem COS-7 Zellen verwendet werden. Die vollständige Inhibition der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in COS-7 Zellen (vgl. 3.2.1) und in HEK 293 Zellen (M. Leserer, d. AG) zeigt die wichtige Rolle dieses Wachstumsfaktors, zumindest in diesen Zelllinien. Da CRM 197 allerdings weder in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT noch in den Brustkrebszellen MDA-MB 231 die GPCR-induzierte Transaktivierung signifikant blockieren konnte kann gefolgert werden, dass in diesem Fall weitere EGFR Liganden involviert sein müssen. Andererseits könnte für diese ausbleibenden Effekte auch verantwortlich sein, dass die Affinität von DT zu humanem proHB-EGF bereits 10fach geringer als zu proHB-EGF in Affenzellen ist (Hooper und Eidels, 1995). In Rat-1 Zellen, die resistent gegenüber Diphtheria toxin sind, konnten erwartungsgemäß keine inhibitorischen Effekte von DT auf die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit Thrombin bzw. Endothelin-1 detektiert werden (Eigene Daten, nicht gezeigt).

Ausgehend von dieser Beobachtung musste allerdings geklärt werden, ob die proteolytische Prozessierung von proHB-EGF ein notwendiger Schritt zur EGFR Transaktivierung ist. Die vollständige Inhibition durch CRM197 kann in diesem Zusammenhang zu keiner Aussage befähigen, da mit der Internalisierung des DT-proHB-EGF Komplexes auch die Prozessierung und biologische Aktivität des prozessierten Liganden blockiert wäre.

Interessanterweise können eine Reihe nicht-physiologischer Stimuli wie das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin, der PKC Aktivator TPA oder die Aktivatoren heterotrimerer G-Proteine  $\text{AlF}_4^-$  und  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  die proteolytische Prozessierung EGF-ähnlicher Wachstumsfaktoren induzieren (Dethlefsen *et al.*, 1998; Goishi *et al.*, 1995; Bosenberg *et al.*, 1993). Weiterhin sind Ionomycin als auch TPA in der Lage die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zu erhöhen (Rosen *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1998), bzw. können  $\text{AlF}_4^-$  und  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  den aktivierten Zustand von G-Proteinen nachahmen. In COS-7 Zellen können neben TPA auch Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie LPA, Carbachol und Bombesin die proteolytische Prozessierung von proHB-EGF induzieren (Vgl. 3.3). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass physiologisch relevante GPCR Liganden die Prozessierung eines EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors induzieren. Dies konnte für ektopisch-exprimiertes proHB-EGF durch die Abnahme des Vorläufers bzw. die Zunahme des membranständigen HB-EGF Fragmentes und des muren HB-EGF Liganden im Zellkulturmedium gezeigt werden (Vgl. 3.3.1). Die Prozessierung von endogen-exprimiertem proHB-EGF wurde durchflußzytometrisch durch die Abnahme der Zelloberflächenreaktivität des proHB-EGF Vorläufers nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen konnte auch, trotz der Abnahme des membranständigen Vorläufers, in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Tsai *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1998; H. Daub, Dissertation), kein HB-EGF im Zellkulturmedium detektiert werden. Dieses Ergebniss kann durch die besondere Fähigkeit von HB-EGF erklärt werden an die Heparansulfat-Proteoglykanmatrix zu binden (Higashiyama *et al.*, 1993; Raab und Klagsbrun, 1997). In diesem Szenario verbleibt HB-EGF nach der proteolytischen Freisetzung in der zellulären Mikro-Umgebung um sofort an den hochaffinen EGFR zu binden. Insbesondere die, im Vergleich zur durch TPA-induzierte, geringe Menge an prozessierten HB-EGF (vgl. 3.3.2) trägt vollständig zur EGFR Transaktivierung bei, so dass kein verbleibender Wachstumsfaktor im Medium nachgewiesen werden kann.



Bemerkenswert für das Überexpressions- als auch das endogene System ist der schnelle Verlauf der GPCR-induzierten Prozessierung von HB-EGF die bereits nach 5 bzw. 10 Minuten detektiert werden konnte.

Ausgehend von der Inhibition der Transaktivierung durch CRM197 in COS-7 Zellen, und der Tatsache, dass GPCR Liganden die Prozessierung des proHB-EGF Vorläufers bewirken, stellte sich die Frage ob die proteolytische Generierung des murenen Liganden für die EGFR Transaktivierung essentiell ist. Um diese Frage zu beantworten mußte geklärt werden welche Elemente die proHB-EGF Prozessierung regulieren. Zink-abhängige Metalloproteasen sind in diesem Zusammenhang häufig als die verantwortlichen Enzyme diskutiert worden (Arribas *et al.*, 1996; Dempsey *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998). Von besonderem Interesse auf dem Gebiet der Metalloproteasen sind die sog. MMPs (Matrix Metalloproteasen, Ellerbroek *et al.*, 1999) und die ADAM (Adisintegrin and metalloprotease, Moss *et al.*, 2001) Familie von Transmembranproteasen. Während MMPs für den Abbau der extrazellulären Matrix und die daraus resultierende Invasivität und Metastasierung von Krebszellen verantwortlich gemacht werden, sind die ADAM Metalloproteasen vermehrt mit der Prozessierung von Transmembranproteinen in Verbindung gebracht worden (Quaranta *et al.*, 2000; Werb *et al.*, 1998). Das Hydroxamsäurederivat Batimastat (BB94) zeigt aufgrund seiner chemischen Struktur und hohen Bindungskonstanten bereits im unteren mikromolaren Bereich Inhibition beider Enzymfamilien (Wojtowicz-Praga *et al.*, 1997; Parvathy *et al.*, 1998). Für die drei in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Zelllinien, COS-7, HaCaT und MDA-MB231 Zellen, führt die Batimastat Vorbehandlung zu einer vollständigen Inhibition der GPCR- als auch der TPA-induzierten EGFR Transaktivierung (vgl. 3.4.1, 3.7.1, 3.8.1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in ca. 40 untersuchten Krebszelllinien die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach GPCR Stimulation Batimastat-sensitiv ist (eigene Daten bzw. Daten der Transaktivierungsgruppe MPI, Daten nicht gezeigt), d.h der Transaktivierungsprozeß stets kritisch von der Aktivität von Metalloproteasen abhängt. Um die Beweisführung noch zu vervollständigen kann die GPCR-induzierte proteolytische Prozessierung des proHB-EGF in COS-7 Zellen durch BB-94 inhibiert werden. Beide aufeinanderfolgenden Signalschritte, G-Protein-vermittelte Ligandenprozessierung und EGFR Transaktivierung sind somit abhängig von Metalloproteasen, während die EGF-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung und Signalgenerierung Batimastat-unabhängig verlaufen.

Die Spezifität von Batimastat und der verwendeten DT Mutante CRM197 konnte unter Beweis gestellt werden, da die GPCR-vermittelte Inositolphosphatakkumulation, ein von der EGFR Transaktivierung unabhängiger Signalschritt (H. Daub, Dissertation), durch beide Substanzen unbeeinflusst bleibt (Vgl. 3.4.3).

Um die Identität der Metalloprotease weiter einzugrenzen wurden verschiedene Ansatzpunkte gewählt. Durch die kovalente Kopplung des inhibitorischen Hydroxamsäurerestes an die Konsensuserkennungssequenz Prolin-Leucin-Glycin (PLG) für Kollagenasen (MMP1, MMP9, MMP13) erhält man ein sog. PLG-Hydroxamat, das zur Aufreinigung bzw. zur spezifischen Inhibition dieser Matrix Metalloproteasen geeignet ist (Moore *et al.*, 1986; Bode *et al.*, 1994). Vorinkubation von COS-7 Zellen mit dieser Substanz beeinflusst die GPCR-induzierte Transaktivierung allerdings nicht, so daß Kollagenasen anscheinend nicht an der proHB-EGF Prozessierung beteiligt sind (Vgl. 3.4.3). Dennoch scheiden MMPs aufgrund dieser Beobachtung nicht als mögliche Vermittler der EGFR Transaktivierung aus, so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MMP3 *in vitro* und *in vivo* in der Lage ist proHB-EGF zu prozessieren (Suzuki *et al.*, 1997). Weiterhin konnte durch zymographische Analyse gezeigt werden, dass die, im Zellkulturmedium detektierbare, Aktivität der Gelatinase MMP9 durch die GPCR Liganden LPA bzw. Carbachol deutlich stimuliert wird (Eigene Daten, nicht gezeigt). Insbesondere der starke Carbachol-induzierte Effekt könnte auf eine Beteiligung der MMP9 an der Agonist-abhängigen Transformation durch den muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M1R) hindeuten (Gutkind *et al.*, 1991).

Neben MMPs sind insbesondere Mitglieder der ADAM Familie mit der Prozessierung von Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht worden (Werb und Yan, 1998). So zeigen ADAM17-defiziente „knock-out“ Mäuse (Peschon *et al.*, 1998) ähnliche phenotypische Veränderungen wie TGF $\alpha$  (Luetkeke *et al.*, 1993) bzw. EGFR gendefiziente Tiere (Sibilia und Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995). Da ADAM17-„Knock out“ Zellen nicht mehr in der Lage sind proTGF $\alpha$  zu prozessieren, und die zusätzlichen phenotypischen Veränderungen möglicherweise auf ein defektes Prozessieren weiterer EGF-ähnlicher Liganden zurückzuführen sind, könnte ADAM17 für die GPCR-vermittelte proHB-EGF Prozessierung verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass in ADAM17<sup>-/-</sup> Zellen allerdings eine Rekonstitution der Transaktivierung möglich ist (A. Gschwind, d. AG), läßt dies, zumindest in diesem Zelltyp, als eher unwahrscheinlich erscheinen.

Ein weiterer möglicher Kandidat, der den TPA-induzierten proteolytischen Abbau von proHB-EGF in Vero Zellen vermittelt, ist ADAM9 (Izumi *et al.*, 1998). Ausgehend von proteolytisch inaktiven Punktmutanten, die nicht in der Lage sind das zur Enzymaktivität essentielle Zink-Ion zu binden, konnten Mekada und Kollegen zeigen, dass die PKC $\delta$ -vermittelte proHB-EGF Prozessierung über ADAM9 verläuft (Izumi *et al.*, 1998). Transiente Expression von funktioneller ADAM9 bzw. von inaktiven Mutanten konnte dagegen die GPCR-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung nicht beeinflussen (Eigene Daten, nicht gezeigt). Dieses Ergebniss unterstreicht die Komplexität der Problemstellung, da proHB-EGF nach Stimulation verschiedener Signalwege anscheinend durch unterschiedliche Metalloproteasen prozessiert wird. Dies konnte kürzlich von Mekada und Kollegen weiter unter Beweis gestellt werden, die Elemente der Ras-MAP Kinase Kaskade als Mediatoren der LPA-induzierten proHB-EGF Prozessierung in Vero Zellen identifizieren konnten (Umata *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit den Daten in COS-7 Zellen wurde in dieser Studie gezeigt, dass ADAM9 nicht an der Prozessierung beteiligt ist.

Die Annahme, dass die proteolytische Prozessierung von Transmembranproteinen über die MAP Kinase Kaskaden reguliert werden, wurde aufgrund weiterer Publikationen (Gechtman *et al.*, 1999; Fan und Derynck, 1999) ebenfalls untersucht. Die Verwendung der spezifisch den ERK bzw. p38 MAP Kinasesignalweg blockierenden Inhibitoren PD98059 bzw. SB202190 in COS-7 und HaCaT Zellen führte zu unterschiedlichen Ergebnissen (Eigene Daten, nicht gezeigt). So zeigte insbesondere der p38 Inhibitor deutliche Effekte auf die LPA-induzierte Transaktivierung in COS-7, nicht allerdings in HaCaT Zellen. Überexpression der dominant negativen Mutanten der MEK Kinasen 3 und 6, die für die p38 Aktivierung benötigt werden, führte allerdings nicht zur Inhibition der LPA- bzw. Carbachol-induzierten EGFR Transaktivierung. Zusammengefasst kann somit gesagt werden, dass es Hinweise gibt, die die Ras MAP Kinase Kaskade mit der Prozessierung von EGF-ähnlichen Liganden in Verbindung bringen, dies allerdings im Rahmen dieser Arbeit weder widerlegt noch gestützt werden konnte.

#### 4.4 Die Rolle der Metalloprotease-vermittelten und Liganden-abhängigen EGFR Transaktivierung für die Signalübertragung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

1996 konnte erstmals gezeigt werden, dass der EGFR essentiell für die GPCR-induzierte Aktivierung des Ras-MAP Kinase Weges, der c-fos Gentranskription und zellulärem Wachstum ist (Daub *et al.*, 1996). Aufbauend auf dieser Studie wurden weitere Zellsysteme identifiziert in denen die EGFR Transaktivierung GPCR Aktivierung mit der Ras-ERK Kaskade (Cunnick *et al.*, 1998; Castagliuolo *et al.*, 2000), Gentranskription (Vaingankar und Martins-Green, 1998), Regulation von Ionenkanälen (Tsai *et al.*, 1997) und Veränderungen des Zytoskellets (Gohla *et al.*, 1998, 1999) verknüpft. Da die meisten dieser Arbeiten sich mit der Bedeutung der, bis dato liganden-unabhängigen, EGFR Transaktivierung in nicht-transformierten Zellen beschäftigen sollte die Rolle der Metalloprotease-vermittelten Transaktivierung für verschiedene zelluläre Ereignisse, über nicht-transformierte Zellen hinausgehend, auch in Krebszellen untersucht werden.

Die Inhibition der EGFR Transaktivierung durch die Diphtheria Toxin Mutante CRM197 bzw. Batimastat diente in diesem Zusammenhang als Ausgangspunkt. Neben dem EGFR-spezifischen Tyrphostin AG1478, ist den Ergebnissen zufolge Batimastat der einzige Inhibitor, der die GPCR-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung zelltypübergreifend blockiert. Weiterhin inhibiert BB-94 wichtige Signalschritte der Ras-ERK Kaskade wie die GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung oder die G-Protein-vermittelte ERK2 Aktivierung in COS-7 Zellen (Vgl. 3.4.2, 3.5.1). Diesen Einfluss der Metalloproteasen konnte weiterhin für HaCaT Keratinocyten und MDA-MB231 Zellen bestätigt werden, während die EGF-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung bzw. ERK Aktivierung unbeeinflusst blieb. Interessanterweise ist die Inhibition der unterschiedlichen zellulären Ereignisse durch das EGFR-spezifische Tyrphostin AG1478 stets stärker als durch den Metalloproteaseinhibitor Batimastat (Vgl. 3.5.1, 3.5.3, 3.6, 3.7.2). Dieser Effekt kann auf die unterschiedliche Wirkweise der Substanzen zurückgeführt werden. Der EGFR befindet sich in der Zellmembran, auch in Abwesenheit von Liganden, in einem Gleichgewicht aus Rezeptormonomeren und -dimeren, das zu einer ständigen basalen Rezeptortyrosinphosphorylierung führt (Ullrich *et al.*, 1990).

Überexpression des Rezeptors oder die Gegenwart von Liganden als autokrine Wachstumsfaktoren, verschieben dieses Gleichgewicht zugunsten der Rezeptordimeren so dass die Tyrosinphosphorylierung erhöht wird. Die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung ist somit ein zu der basalen Tyrosinphosphorylierung additiver Effekt, der durch Batimastat vollständig blockiert wird, während das ATP-Analog AG1478 die basale und zusätzlich die GPCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung inhibiert. Die unterschiedliche Wirksamkeit setzt sich somit für alle nachgeschalteten über den EGFR verlaufenden Prozesse fort. Der mögliche Vergleich der inhibitorischen Eigenschaften von AG1478 und BB94 kann allerdings auch ein älteres Modell von Lefkowitz und Kollegen relativieren die eher der basalen Tyrosinphosphorylierung des EGFRs und der damit verbundenen Aufgabe wichtige Adapterproteine und Kinasen zur Zellmembran zu rekrutieren die Hauptfunktion des EGFRs einräumten (Luttrell *et al.*, 1997). Die deutliche Inhibition der GPCR-induzierten ERK Aktivierung in COS-7 und HaCaT Zellen bzw. des LPA- und Thrombin-vermittelten Wachstums von HaCaT und MDA MB-231 Zellen durch Batimastat spricht eher für die Rolle des Liganden-vermittelt transaktivierten EGFR.

Zu Beginn dieser Arbeit war für eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bekannt, dass der EGFR die GPCR-induzierte ERK Aktivierung in einer Reihe von Zellsystemen vermittelt (Vgl. 1.5.2.3, Tabelle 1). Zusätzlich zu den mechanistischen Fragestellungen zur Transaktivierung war somit von grundsätzlichem Interesse ob der EGFR auch eine Rolle bei der Aktivierung der JNK bzw. p38 MAP Kinasen spielt. In COS-7 Zellen inhibieren Batimastat bzw. AG1478 die drei angesprochenen MAP Kinase Wege in unterschiedlichem Ausmaß. Während gezeigt wurde, dass die p38 Aktivierung, allerdings nicht die JNK Aktivierung durch AngiotensinII in Gefäßmuskelzellen Metalloprotease-vermittelt verläuft (Eguchi *et al.*, 2001), konnte in COS-7 Zellen nach LPA bzw. Thrombin Stimulation gezeigt werden, dass die Liganden-vermittelte EGFR Transaktivierung für ERK, JNK und p38 Stimulation benötigt wird. Wie bereits angesprochen ist auch für diese Signalwege die Inhibition durch AG1478 deutlicher, die Batimastat Effekte mit mehr als 50 % Inhibition zeigen allerdings, dass die EGFR Transaktivierung über Metalloproteasen einen der Hauptsignalwege der GPCR Signalübertragung in diesem Modellsystem darstellt.

---

Zusätzlich ist neben der Fragestellung nach dem molekularen Mechanismus der EGFR Transaktivierung auch die Funktion des EGFRs in physiologisch und pathophysiologischem Kontext von Interesse (Zwick *et al.*, 1999; Gschwind *et al.*, 2001).

Neben der Relevanz der EGFR Transaktivierung für die GPCR induzierte Aktivierung der MAP Kinasesignalwege konnte auch gezeigt werden, dass die LPA- bzw. Thrombin-vermittelte DNA Neusynthese in HaCaT Zellen und in der Brustkrebszelllinie MDA-MB231 vollständig über Batimastat-sensitive Prozesse reguliert wird. Während dieser Arbeit konnten auch weitere Studien die wichtige Rolle des EGFRs für GPCR-induziertes Wachstum für die Astrocytomazelllinie U-373MG (Castagliuolo *et al.*, 2000) und humane Ovarialkarzinomzellen nachweisen (Vacca *et al.*, 2000) ohne allerdings näher auf den Mechanismus der Transaktivierung bzw. den involvierten Liganden einzugehen. In HaCaT Zellen konnte mit blockierenden Antikörpern gegen TGF $\alpha$  bzw. HB-EGF das Thrombin-vermittelte Zellwachstum zum Teil inhibiert werden, so dass beiden Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Transaktivierung in diesem Zellsystem zukommen dürfte (Vgl. 3.7.3). Interessanterweise, und zur Bestätigung der Daten aus COS-7 Zellen, konnten Kalmes und Kollegen zeigen, dass die Thrombin-induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen über die Batimastat- und HB-EGF-vermittelte EGFR Transaktivierung verläuft (Kalmes *et al.*, 2000). Weiterhin ist Östrogen in MDA-MB231 Zellen ebenfalls in der Lage, GPCR-vermittelt, den EGFR zu transaktivieren (Filardo *et al.*, 2000). Da dieser Prozess ebenfalls über HB-EGF verläuft muß dieser Ligand als ein in verschiedenen Zelltypen bevorzugter Vermittler zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und dem EGFR dienen.

Zusammengefaßt ergibt sich somit ein Mechanismus der nach GPCR Aktivierung drei aufeinanderfolgende Schritte durch die Zellmembran beinhaltet (TMPS-Mechanismus, für triple membrane-passing signal mechanism), der GPCR Aktivierung mit der Regulation der ERK, JNK und p38 Signalwege, als auch mit zellulärem Wachstum in Verbindung bringt (vgl. 5, Abbildung 35).

## 4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein grundlegend neues mechanistisches Konzept der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung unter Beteiligung von EGFR Liganden und Zink-abhängigen Metalloproteasen erarbeitet werden. Ausgehend von der, erstmals beschriebenen, G-Protein-vermittelten proteolytischen proHB-EGF Prozessierung koppeln auf diese Weise G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, über drei, die Zellmembran durchlaufende Schritte (TMPS), an zentrale Elemente der mitogenen Signalübertragung.

Somit konnte im Gegensatz zu bestehenden Modellen, ein zelltypunabhängiger Mechanismus vorgeschlagen werden der zwei neue unerwartete Signalmediatoren miteinbezieht, die, da sie essentiell für das GPCR-induzierte Wachstum sind, mögliche neue Interventionspunkte für hyperproliferative Krankheiten darstellen.

Der Mechanismus der liganden-vermittelten EGFR Transaktivierung wirft eine Reihe neuer noch zu klärender Fragen auf:

1. Wie aktivieren GPCR Liganden membranständige Metalloproteasen? Möglicherweise verläuft diese Aktivierung, wie angedeutet über MAP Kinase Kaskaden (Umata *et al.*, 2001), oder Metalloproteasen werden, G-Protein vermittelt, zu den Substraten, in diesem Fall EGFR Ligandvorläufer, rekrutiert.
2. Welche Metalloproteasen vermitteln die GPCR-induzierte Prozessierung von EGF-ähnlichen Liganden? Trotz des wachsenden Verständnisses über die Regulation und Expression von Metalloproteasen sind bisher wenige Metalloproteasen ihrem *in vivo* Substrat zugeordnet. Spezifischere Inhibitoren, bzw. Analyse von "Metalloprotease Gen knock-out" Mäusen könnten hierfür wertvolle Informationen liefern.
3. Gibt es bei der GPCR-vermittelten Transaktivierung zelltypspezifische Unterschiede der involvierten Metalloproteasen bzw. EGFR Liganden?

---

Die Tatsache, dass HB-EGF nicht in allen Zelltypen die EGFR Transaktivierung vermittelt, und das in den vielen Krebszelllinien, die Transaktivierung zeigen, meist verschiedene EGFR Liganden exprimiert sind weist auf zelltypspezifische Unterschiede hin. Da allerdings der Metalloproteaseinhibitor Batimastat in allen bekannten Transaktivierungssystemen die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach GPCR Stimulation blockiert kann davon ausgegangen werden, dass die Metalloprotease-vermittelte Ligandenprozessierung ein zelltypunabhängiger genereller Prozeß ist.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Mechanismus der Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)- und dessen Rolle für die GPCR-induzierte mitogene Signalübertragung näher zu charakterisieren. Um ein allgemeines mechanistisches Konzept der EGFR Transaktivierung zu erarbeiten sollten Mediatoren identifiziert werden die zelltypunabhängig nach der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs erhöhen.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, entgegen den bestehenden Modellvorstellungen eines intrazellulären Mechanismus, die extrazelluläre Domäne des EGFRs eine wichtige Rolle bei der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung übernimmt. Expression eines chimären Rezeptors bestehend aus der extrazellulären EGFR Domäne und dem Transmembran- bzw. intrazellulären Teil des PDGF Rezeptors in COS-7 Zellen führte zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung von SHP-2 nach GPCR Stimulation.

Ausgehend von dieser Beobachtung stellte sich die Frage welche Elemente nach GPCR Stimulation die extrazelluläre Transaktivierung des EGFRs vermitteln. Mit Hilfe der selektiven Inhibition von HB-EGF, mittels der nicht-toxischen Diphtheria Toxin Mutante CRM197, konnte diesem EGF-ähnlichen Liganden in COS-7 Zellen eine kritische Funktion bei der GPCR- als auch der TPA-vermittelten EGFR Transaktivierung zugeordnet werden. Weiterhin führt CRM197 Vorinkubation zu einer Inhibition weiterer durch GPCR-aktivierter Signalschritte wie z.B. der SHC und Gab1 Tyrosinphosphorylierung.

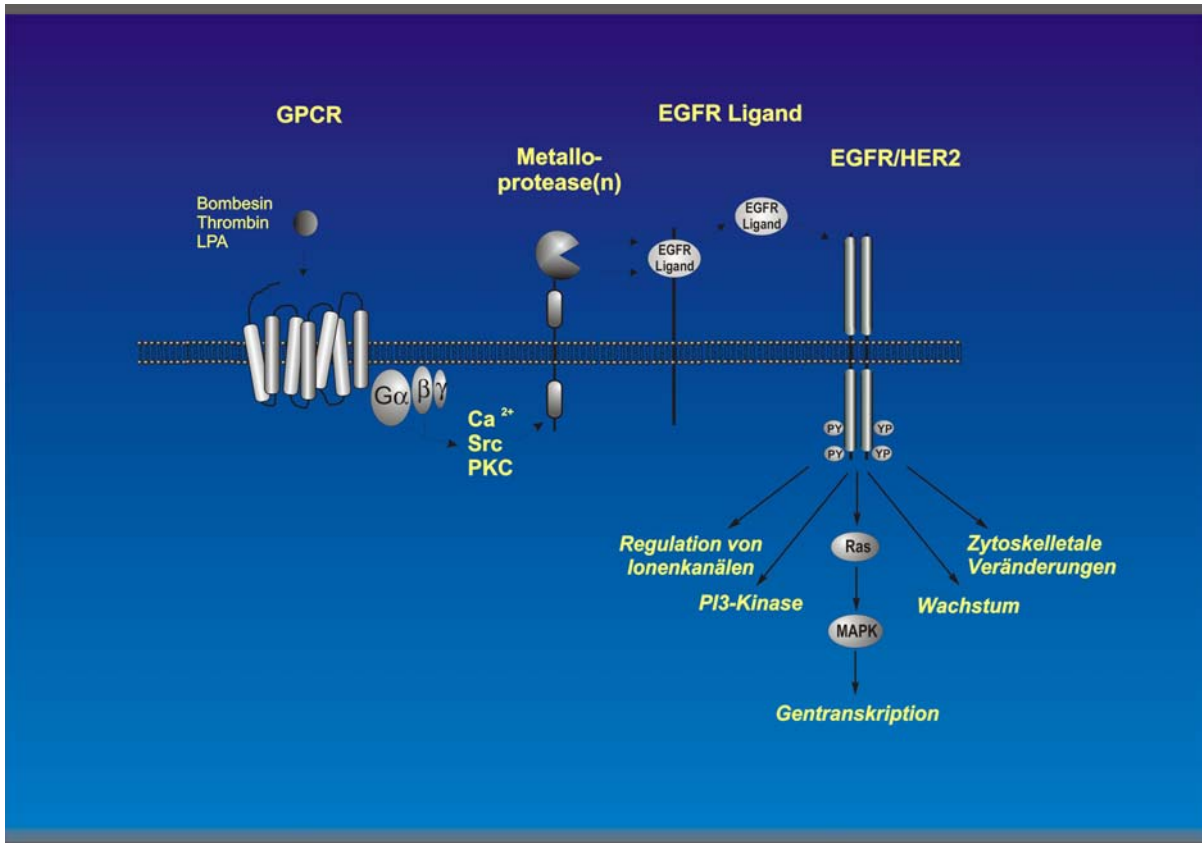
Ausgehend von der Rolle von HB-EGF bei der Transaktivierung konnte erstmals gezeigt werden, dass Stimulation verschiedener GPCRn zur proteolytischen Prozessierung des EGFR Ligandvorläufers proHB-EGF führen. Der Beweis, dass diese proHB-EGF Prozessierung einen kritischen Schritt des GPCR-EGFR Signalweges darstellt wurde über die Metalloproteaseabhängigkeit geführt. Wie für ähnliche Prozesse bereits beschrieben konnte gezeigt werden, dass der Metalloprotease Inhibitor Batimastat die GPCR-vermittelte proteolytische Prozessierung von proHB-EGF vollständig blockiert.

---

Weiterhin interferiert Batimastat mit der EGFR Transaktivierung nach LPA, Thrombin und Carbachol Stimulation von COS-7 Zellen. Der allgemeingültige Charakter dieses neuen Mechanismus konnte unterstrichen werden, da die GPCR-vermittelte EGFR Tyrosinphosphorylierung in verschiedenen Zelltypen stets Batimastat-sensitiv verlief. Im Gegensatz dazu ist das HB-EGF spezifische CRM197 nicht in der Lage in allen untersuchten Zelltypen die EGFR Transaktivierung zu blockieren. Somit kann geschlossen werden, dass verschiedene EGF-ähnliche Liganden zelltypabhängig diesen Effekt vermitteln.

Das mechanistische Modell, das sich daraus ergibt unterscheidet sich prinzipiell von dem, vor dieser Arbeit vorgeschlagenen liganden-unabhängigen, ausschließlich durch intrazelluläre Elemente vermittelten, Signalweg. Extrazelluläre Ligandenstimulation von GPCRen führt zur intrazellulären Aktivierung heterotrimärer G-Proteine und anschließenden proteolytischen Prozessierung eines EGFR Ligandenvorläufers durch Zink-abhängige Metalloproteasen. Der so generierte „mature“ Ligand wird daraufhin nicht ins Medium sezerniert sondern bindet und aktiviert den EGFR dessen Tyrosinphosphorylierung kritisch für die GPCR-induzierte Signalübertragung ist. Da dieses dreimalige Durchlaufen der Plasmamembran bei Signalübertragungsmechanismen bisher nicht bekannt war wurde der Ausdruck „TMPS (triple membrane passing signal) Mechanismus“ zur einfachen Umschreibung des Sachverhaltes gewählt.

Zusätzlich zu den neu gewonnenen mechanistischen Erkenntnissen konnten in dieser Arbeit weiterhin die drei bekanntesten MAP Kinase Kaskaden die zur ERK, JNK und p38 Aktivierung führen als Ziele der Batimastat- und Liganden-abhängigen EGFR Transaktivierung identifiziert werden. Weiterhin konnte der TMPS Mechanismus in nicht-transformierten HaCaT Keratinozyten und in MDA-MB 231 Brustkrebszellen als essentieller Weg der GPCR-induzierten Signalübertragung und Zellwachstum identifiziert werden. Zusammenfassend, und zum Vergleich mit dem bisherigen liganden-unabhängigen Modell (Abb. 4), ist der TMPS Mechanismus der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung in Abbildung 35 dargestellt.



**Abb. 35: Modell der Metalloprotease- und Ligandenabhängigen EGFR Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.**

Agonist Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren induziert die proteolytische Prozessierung von EGFR Ligandenvorläufern über Zink-abhängige Metalloproteasen. Der so gereifte Wachstumsfaktor aktiviert extrazellulär den EGFR der, durch seine intrinsische Kinaseaktivität weitere wichtige Signalschritte zur Aktivierung der Ras-MAP Kinase Kaskade bzw. der mitogenen Signalübertragung vermittelt.

## 6 Literaturverzeichnis

Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R. und Liebmann, C. (1999) Bradykinin B-2 receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5289-5297.

Algermissen, B., Sitzmann, J., Nurnberg, W., Laubscher, J.C., Henz, B.M. und Bauer, F. (2000) Distribution and potential biologic function of the thrombin receptor PAR-1 on human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 488-495.

Alimandi, M., Romano, A., Curia, M.C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S.A., Di Fiore, P.P. und Kraus, M.H. (1995) Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*, **10**, 1813-1821.

Allen, L.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. und Cotecchia, S. (1991) G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutations of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **88**, 11354-11358.

Alroy I. und Yarden Y. (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS lett.*, **410**, 83-86.

Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S. und Massague, J. (1996) Diverse Cell Surface Protein Ectodomains Are Shed by a System Sensitive to Metalloprotease Inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11376-11382.

Arribas, J., Lopez-Casillas, F. und Massague, J. (1997) Role of the Juxtamembrane Domains of the Transforming Growth Factor- $\alpha$  Precursor and the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Regulated Ectodomain Shedding. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17160-17165.

Bange, J., Zwick, E. und Ullrich, A. (2001) Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat. Med.*, **7**, 548-552.

Barbacci, E.G., Guarino, B.C., Stroh, J.G., Singleton, D.H., Rosnack, K.J., Moyer, J.D. und Andrews, G.C. (1995) The Structural Basis for the Specificity of Epidermal Growth Factor and Heregulin Binding. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9585-9589.

Barki-Harrington, L. und Daaka, Y. (2001) Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells. *J. Urol.*, **165**, 2121-2125.

Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D. und Marshall, M. (1998) Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene*, **17**, 1539-1547.

- 
- Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. und Parsons, S.J. (1999a) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8335-8343.
- Biscardi, J.S., Tice, D.A. und Parsons, S.J. (1999b) c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv. Cancer Res.*, **76**, 61-77.
- Blobel, C.P. (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 606-612.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S. und Tschesche, H. (1994) The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J.*, **13**, 1263-1269.
- Bokemeyer, D., Schmitz, U. und Kramer, H.J. (2000) Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney Int.*, **58**, 549-558.
- Bosenberg, M.W., Pandiella, A. und Massaqué, J. (1993) Activated Release of Membrane-anchored TGF- $\alpha$  in the Absence of Cytosol. *J. Cell Biol.*, **122**, 95-101.
- Bosenberg, M.W., Pandiella, A. and Massaqué, J. (1992) The Cytoplasmic Carboxy-Terminal Amino Acid Specifies Cleavage of Membrane TGF $\alpha$  into Soluble Growth Factor. *Cell*, **71**, 1157-1165.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. und Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771.
- Bourne, H.R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 134-142.
- Brown, C.L., Meise, K.S., Plowman, G.D., Coffey, R.J. und Dempsey, P.J. (1998) Cell Surface Ectodomain Cleavage of Human Amphiregulin Precursor Is Sensitive to a Metalloprotease Inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17258-17268.
- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N. und Johnson, G.L. (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24631-24634.
- Buomlamwini, J.K. (1999) Novel anticancer drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 500-509.

- Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W. und Collins, S. (2001) beta-Adrenergic Activation of p38 MAP Kinase in Adipocytes: cAMP Induction of the Uncoupling Protein 1 (UCP1) Gene Requires p38 MAP Kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27077-27082.
- Carpenter, G. (1999) Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol.*, **146**, 697-702.
- Carpenter, G. (2000) EGF Receptor Transactivation Mediated by the Proteolytic Production of EGF-like Agonists. *Science's STKE*.
- Castagliuolo, I., Valenick, L., Liu, J. und Pothoulakis, C. (2000) Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Mediates Substance P-induced Mitogenic Responses in U-373 MG Cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26545-26550.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752.
- Chen, Y., Grall, D., Salcini, A.E., Pelicci, P.G., Pouyssegur, J. und van Obberghen-Schilling, E. (1996) Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.*, **15**, 1037-1044.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. und Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immunocomplexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J. Immunol. Meth.*, **18**, 183-192.
- Chung, C.T. und Miller, R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 3580.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Lustig, K.D., Conklin, B.R., Herzmark, P., Taussig, R. und Bourne, H.R. (1992) Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.*, **288**, 1-14.
- Coffer, P.J., Burgering, B.M., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L. und Kruijer, W. (1995) UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene*, **11**, 561-569.
- Conklin, B.R., Bourne, H.R., Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L. und Khorana, H.G. (1993) Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*, **73**, 631-641.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. und Gutkind, J.S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**, 1137-1146.
- Coussens L., Yang-Feng T, L., Liao Y.C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J. und Francke U. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.

- Crespo, P., Xu, N.Z., Simonds, W.F. und Gutkind, J.S. (1994) Ras-Dependent Activation of Map Kinase Pathway Mediated by G- Protein Beta-Gamma-Subunits. *Nature*, **369**, 418-420.
- Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A.J., Fry, D.W., Jove, R. und Wu, J. (1998) Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen- activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14468-14475.
- Damstrup, L., Kuwada, S.K., Dempsey, P.J., Brown, C.L., Hawkey, C.J., Poulsen, H.S., Wiley, H.S. und Coffey, R.J., Jr. (1999) Amphiregulin acts as an autocrine growth factor in two human polarizing colon cancer lines that exhibit domain selective EGF receptor mitogenesis. *Br. J. Cancer*, **80**, 1012-1019.
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. und Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.*, **16**, 7032-7044.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. und Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557-560.
- Davis, R.J. (2000) Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- Della Rocca, G.J., Maudsley, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. und Luttrell, L.M. (1999) Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade - Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13978-13984.
- DellaRocca, G.J., vanBiesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D.K., Luttrell, L.M. und Lefkowitz, R.J. (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors - Convergence of G(i)- and G(q)- mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19125-19132.
- Dempsey, P.J., Meise, K.S., Yoshitake, Y., Nishikawa, K. und Coffey, R.J. (1997) Apical Enrichment of Human EGF Precursor in Madin-Darby Canine Kidney Cells Involves Preferential Basolateral Ectodomain Cleavage Sensitive to a Metalloprotease Inhibitor. *J. Cell Biol.*, **138**, 747-758.
- Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R.J. (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Dethlefsen S.M., Raab G., Moses M.A., Adam R.M., Klagsbrun M. und Freeman M.R. (1998) Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C. *J. Cell. Biochem.*, **69**, 143-153.
- Dhanasekaran, N. und Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.

Dhanasekaran, N., Tsim, S.T., Dermott, J.M. und Onesime, D. (1998) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene*, **17**, 1383-1394.

Dikic, J., Tokina, G., Lev, S., Courtneidge, S.A. und Schlessinger, J. (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, **383**, 547-550.

Dohlman, H.G., Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J. (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry*, **26**, 2657-2664.

Dong, J., Opresko, L.K., Dempsey, P.J., Lauffenburger, D.A., Coffey, R.J. und Wiley, H.S. (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6235-6240.

Dong, J. und Wiley, H.S. (2000) Trafficking and Proteolytic Release of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands Are Modulated by Their Membrane-anchoring Domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 557-564.

Downward, J. (1997) Routine role for Ras. *Curr. Biol.*, **7**, 258-260.

Eguchi, S., Iwasaki, H., Inagami, T., Numaguchi, K., Yamakawa, T., Motley, E.D., Owada, K.M., Marumo, F. und Hirata, Y. (1999) Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **33**, 201-206.

Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D. und Inagami, T. (2001) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7957-7962.

Eguchi, S., Iwasaki, H., Ueno, H., Frank, G.D., Motley, E.D., Eguchi, K., Marumo, F., Hirata, Y. und Inagami, T. (1999) Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells - Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36843-36851.

Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F. und Inagami, T. (1998)

Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8890-8896.

Ellerbroek, S.M. und Stack, M.S. (1999) Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays*, **21**, 940-949.

Engel, J. (1989) EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett.*, **251**, 1-7.



- Erickson, J.R., Hasegawa, Y., Fang, X., Eder, A., Mao, M., Furui, T., Aoki, J., Morris, A. und Mills, G.B. (2001) Lysophosphatidic acid and ovarian cancer: a paradigm for tumorigenesis and patient management. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **64**, 63-81.
- Even-Ram, S., Uziely, B., Cohen, P., Grisaru-Grabanovsky, S., Maoz, M., Ginzburg, Y., Reich, R., Vlodaysky, I. und Bar-Shavit, R. (1998) Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.*, **4**, 909-914.
- Fan, H. und Derynck, R. (1999) Ectodomain shedding of TGF- $\alpha$  and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.*, **18**, 6962-6972.
- Fang, X., Gaudette, D., Furui, T., Mao, M., Estrella, V., Eder, A., Pustilnik, T., Sasagawa, T., Lapushin, R., Yu, S., Jaffe, R.B., Wiener, J.R., Erickson, J.R. und Mills, G.B. (2000) Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **905**, 188-208.
- Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L. und Khorana, H.G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*, **274**, 768-770.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A. und Bourne, H.R. (1994) cAMP and  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7851-7854.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.". *Anal. Biochem.*, **137**, 266-267.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I. und Frackelton, A.R. Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1649-1660.
- Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C. und Levitzki, A. (1991) Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalonitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J. Med. Chem.*, **34**, 1896-1907.
- Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E. und Klagsbrun, M. (1999) The shedding of Membrane-anchored Heparin-binding Epidermal like Growth Factor Is Regulated by the Raf/Mitogen-activated Protein Kinase Cascade and by Cell Adhesion and Spreading. *J. Biol. Chem.*, **40**, 28828-28835.
- Gershoni, J.M. und Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.*, **131**, 1-15.

- Goetzl, E.J., Dolezalova, H., Kong, Y. und Zeng, L. (1999) Dual Mechanisms for Lysophospholipid Induction of Proliferation of Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, **59**, 4732-4737.
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T.M. und Schultz, G. (1999) Differential Involvement of G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13 in Receptor-mediated Stress Fiber Formation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17901-17907.
- Gohla, A., Harhammer, R. und Schultz, G. (1998) The g-protein g(13) but not g(12) mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to rho. *J. Biol. Chem.*, **273**, 4653-4659.
- Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E. und Taniguchi, N. (1995) Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol. Biol. Cell*, **6**, 967-980.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M. und Hynes, N.E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.*, **16**, 1647-1655.
- Grosse, R., Roelle, S., Herrlich, A., Hohn, J. und Gudermann, T. (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12251-12260.
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. und Ullrich A. (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*, **20**, 1594-1600.
- Gutkind, J.S. (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, **17**, 1331-1342.
- Gutkind, J.S., Novotny, E.A., Brann, M.R. und Robbins, K.C. (1991) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4703-4707.
- Guy, P., Platko, J., Cantley, L., Cerione, R. und Carraway KL III. (1994) Insect Cell-Expressed p180erbB3 Possesses an Impaired Tyrosine Kinase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8132-8136.
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. und Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 184-189.
- Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**, 669-672.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-223.

- Henrikson, K.P., Salazar, S.L., Fenton II, J.W. und Pentecost, B.T. (1999) Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br. J. Cancer*, **79**, 401-406.
- Herrlich, A., Kuhn, B., Grosse, R., Schmid, A., Schultz, G. und Gudermann, T. (1996) Involvement of G<sub>i</sub> and G<sub>s</sub> proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16764-16772.
- Higashiyama, S., Abraham, J.A. und Klagsbrun, M. (1993) Heparin-binding epidermal growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J. Cell. Biol.*, **122**, 933-940.
- Hooper, K.P. und Eidels, L. (1995) Localization of a critical diphtheria toxin-binding domain to the C-terminus of the mature heparin-binding EGF-like growth factor region of the diphtheria toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 710-717.
- Howe, L.R. und Marshall, C.J. (1993) Lysophosphatic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21<sup>ras</sup> and p74<sup>raf-1</sup>. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20717-20720.
- Huang, R.P., Wu, J.X., Fan, Y. und Adamson, E.D. (1996) UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell. Biol.*, **133**, 211-220.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1987) Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **84**, 7159-7163.
- Iwasaki, H., Eguchi, S., Ueno, H., Marumo, F. and Hirata, Y. (1999) Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology*, **140**, 4659-4668.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. und Mekada, E. (1998) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\gamma$ /ADAM9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.*, **17**, 7260-7272.
- Jost, M., Class, R., Kari, C., Jensen, P.J. und Rodeck, U. (1999) A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 443-449.
- Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A. und Clowes, A.W. (2000) Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ. Res.*, **87**, 92-98.
- Kanda, Y., Nishio, E., Kuroki, Y., Mizuno, K. und Watanabe, Y. (2001) Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*, **68**, 1989-2000.

- Keely, S.J., Calandrella, S.O. und Barrett, K.E. (2000) Carbachol-stimulated Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase in T84 Cells Is Mediated by Intracellular Ca<sup>2+</sup>, PYK-2, and p60src. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12619-12625.
- Keely, S.J., Uribe, J.M. und Barrett, K.E. (1998) Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T84 cells - implications for carbachol-stimulated chloride secretion. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27111-27117.
- Kharitonov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J. und Ullrich, A. (1997) A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature*, **386**, 181-186.
- King, C.R., Borrello, I., Porter, L., Comoglio, P. und Schlessinger, J. (1989) Ligand-independent tyrosine phosphorylation of EGF receptor and the erbB-2/neu proto-oncogene product is induced by hyperosmotic shock. *Oncogene*, **4**, 13-18.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. und Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, **15**, 5314-5325.
- Kozma, S.C., Bogaard, M.E., Buser, K., Saurer, S.M., Bos, J.L., Groner, B. und Hynes, N.E. (1987) The human c-Kirsten ras gene is activated by a novel mutation in codon 13 in the breast carcinoma cell line MDA-MB231. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5963-5971.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. und Aaronson, S.A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 9193-9197.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laffargue, M., Raynal, P., Yart, A., Peres, C., Wetzker, R., Roche, S., Payrastra, B. und Chap, H. (1999) An epidermal growth factor receptor/Gab1 signaling pathway is required for activation of phosphoinositide 3-kinase by lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32835-32841.
- LaMorte, V., Harootunian, A.T., Spiegel, A.M., Tsien, R.Y. und Feramisco, J.R. (1992) Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2. *J. Biol. Chem.*, **267**, 691-694.
- Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D. und Schlessinger, J. (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J.*, **8**, 421-427.
- Lee, S.Y. und Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high quality plasmid DNA. *BioTechniques*, **9**, 676-679.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boetker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751.

Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. und Schlessinger, J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, **376**, 737-745.

Levitzki, A. (1992) Tyrophostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. *FASEB J.*, **6**, 3275-3282.

Li, X., Lee, J.W., Graves, L.M. und Earp, H.S. (1998) Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.*, **17**, 2574-2583.

Logan, S.K., Falasca, M., Hu, P. und Schlessinger, J. (1997) Phosphatidylinositol 3-Kinase Mediates Epidermal Growth Factor-Induced Activation of the c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5784-5790.

Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O. und Lee, D.C. (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, **73**, 263-278.

Lustig, K.D., Conklin, B.R., Herzmark, P., Taussig, R. und Bourne, H.R. (1993) Type II adenylyl cyclase integrates coincident signals from Gs, Gi, and Gq. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13900-13905.

Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K. und Lefkowitz, R.J. (1997) G beta gamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor - A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4637-4644.

Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K. und Lefkowitz, R.J. (1996) An essential role for SRC tyrosine kinase SHC adapter protein complexes in G beta gamma subunit-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Investigat. Med.*, **44**, A271-A271.

Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grunewald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.R. und McCormick, F. (1990) 2 G-Protein Oncogenes in Human Endocrine Tumors. *Science*, **249**, 655-659.

Mannon, P.J. und Mele, J.M. (2000) Peptide YY Y1 receptor activates mitogen-activated protein kinase and proliferation in gut epithelial cells via the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.*, **350**, 655-661.

Markowitz, D., Goff, S. und Bank, A. (1988) A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.*, **62**, 1120-1124.

- 
- Marqués, M.M., Martinez, N., Rodriguez-Garcia, I. und Alonso, A. (1999) EGFR Family-Mediated Signal Transduction in the Human Keratinocyte Cell Line HaCaT. *Exp. Cell Res.*, **252**, 432-438.
- Martin, C.B., Mahon, G.M., Klinger, M.B., Kay, R.J., Symons, M., Der, C.J. und Whitehead, I.P. (2001) The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene*, **20**, 1953-1963.
- Massague, J. und Pandiella, A. (1993) Membrane-Anchored Growth-Factors. *Ann. Rev. of Biochem.*, **62**, 515-541.
- Mateo, C., Moreno, E., Amour, K., Lombardero, J., Harris, W. und Perez, R. (1997) Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology*, **3**, 71-81.
- Matsubara, H., Murasawa, S., Mori, Y., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Iwasaka, T. und Inada, M. (1998) Angiotensin II AT1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by calcium/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circulation*, **98**, 615.
- Maudsley, S., Pierce, K.L., Zamah, A.M., Miller, W.E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. und Luttrell, L.M. (2000) The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9572-9580.
- Miller, A.D. und Rosman, G.J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques*, **7**, 980-986.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. und Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. und Mekada, E. (1995) Diphtheria Toxin Binds to the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain of Human Heparin-binding EGF-like Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor and Inhibits Specifically Its Mitogenic Activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1015-1019.
- Moore, W.M. und Spilburg, C.A. (1986) Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column. *Biochemistry*, **25**, 5189-5195.
- Moriguchi, Y., Matsubara, H., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Oda, K. und Iwasaka, T. (1999) Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ. Res.*, **84**, 1073-1084.
- Morrison, D.K. und Cutler, R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 174-179.

Moss, M.L., White, J.M., Lambert, M.H. und Andrews, R.C. (2001) TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *DTT*, **6**, 417-426.

Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymology*, **155**, 335-350.

Murasawa, S., Mori, Y., Nozawa, Y., Gotoh, N., Shibuya, M., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Iwasaka, T., Inada, M. und Matsubara, H. (1998) Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ. Res.*, **82**, 1338-1348.

Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W. und Eidels, L. (1992) Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*, **69**, 1051-1061.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. und Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.*, **19**, 3159-3167.

Ono, K. und Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: Activation and function. *Cell. signalling*, **12**, 1-13.

Pandiella, A., Bosenberg, M.W., Huang, E.J., Besmer, P. und Massague, J. (1992) Cleavage of Membrane-anchored Growth Factors Involves Distinct Protease Activities Regulated through Common Mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24028-24033.

Pandiella, A. und Massague, J. (1991a) Cleavage of the Membrane Precursor for Transforming Growth Factor alpha is a Regulated Process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1726-1730.

Pandiella, A. und Massague, J. (1991b) Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5769-5773.

Parma, J., Duprez, L., Vansande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J. und Vassart, G. (1993) Somatic Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene Cause Hyperfunctioning Thyroid Adenomas. *Nature*, **365**, 649-651.

Parvathy, S., Karran, E.H., Turner, A.J. und Hooper, N.M. (1998) The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor-alpha convertase. *FEBS Lett.*, **431**, 63-65.

Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. und Black, R.A. (1998) An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science*, **282**, 1281-1284.

- Piepkorn, M., Pittelkow, M.R. und Cook, P.W. (1998) Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 715-722.
- Plowman, G., Culouscou, J., Whitney, G., Green, J., Carlton, G., Foy, L., Neubauer, M. und Shoyab, M. (1993) Ligand-Specific Activation of HER4/p180erbB4, a Fourth Member of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1746-1750.
- Prenzel, N., Fischer, O., Streit, S., Hart, S. und Ullrich, A. (2001) The Epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer*, **8**, 11-31.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. und Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, **402**, 884-888.
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M. und Ullrich, A. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer: Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.*, **2**, 184-190.
- Quaranta, V. (2000) Cell Migration through the Extracellular Matrix: Membrane-Type Metalloproteinases Make the Way. *J. Cell. Biol.*, **6**, 1167-1169.
- Raab, G. und Klagsbrun, M. (1997) Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1333**, F197-F199.
- Riese DJ, van Raaij, T., Plowman, G., Andrews, G. und Stern, D. (1995) The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5770-5776.
- Rio, C., Buxbaum, J.D., Peschon, J.J. und Corfas, G. (2000) Tumor Necrosis Factor-alpha-converting Enzyme Is Required for Cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10379-10387.
- Robinson, M.J. und Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180-186.
- Rosen, L.B. und Greenberg, M.E. (1996) Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1113-1118.
- Roudabush, F.L., Pierce, K.L., Maudsley, S., Khan, K.D. und Luttrell, L.M. (2000) Transactivation of the EGF Receptor Mediates IGF-1-stimulated Shc Phosphorylation and ERK1/2 Activation in COS-7 Cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 22583-22589.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1994) Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, **78**, 963-972.



- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. und Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **19**, 183-232.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1990) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*.
- Schaeffer, H.J. und Weber, M.J. (1999) Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2435-2444.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- Seedorf, K., Felder, S., Millauer, B., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1991) Analysis of platelet-derived growth factor receptor domain function using a novel chimeric receptor approach. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12424-12431.
- Seedorf, K., Shearman, M. und Ullrich, A. (1995) Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18953-18960.
- Seth, D., Shaw, K., Jazayeri, J. und Leedman, P.J. (1999) Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF-alpha in human prostate cancer cells. *Br. J. Cancer*, **80**, 657-669.
- Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J. und Rozengurt, E. (1992) Growth of small cell lung cancer cells: Stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **52**, 2737-2742.
- Sibilia, M. und Wagner, E.F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, **269**, 234-238.
- Slack, B.E. (2000) The m3 muscarinic acetylcholine receptor is coupled to mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and epidermal growth factor receptor kinase. *Biochem. J.*, **348**, 381-387.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. und McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Soltoff, S.P. (1998) Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P-2Y2 receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23110-23117.
- Stern, D. F. und Kamps, M. P. (1988) EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J.*, **7**, 995-1001.
- Stoll, S.W., Benedict, M., Mitra, R., Hiniker, A., Elder, J.T. und Nunez, G. (1998) EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene*, **16**, 1493-1499.

- 
- Su, B. und Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 402-411.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A. und Klagsbrun, M. (1997) Matrix Metalloproteinase-3 Releases Active Heparin-binding EGF-like Growth Factor by Cleavage at a Specific Juxtamembrane Site. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31730-31737.
- Thorne, B.A. und Plowman, G.D. (1994) The heparin-binding domain of amphiregulin necessitates the precursor pro-region for growth factor secretion. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1635-1646.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K. and Harris, R.C. *et al.* (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, **269**, 230-234.
- Tice, D.A., Biscardi, J.S., Nickles, A.L. und Parsons, S.J. (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1415-1420.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 205-215.
- Tsai, W., Morielli, A.D. und Peralta, E.G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.*, **16**, 4597-4605.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., Sela, M., Andrews, G.C. und Yarden, Y. (1997) Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.*, **16**, 4938-4950.
- Ullrich A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L., Whittle, N., Waterfield, M.D. und Seeburg, P.H. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Umata, T., Hirata, M., Takahashi, T., Ryu, F., Shida, S., Takahashi, Y., Tsuneoka, M., Miura, Y., Masuda, M., Horiguchi, Y. und Mekada, E. (2001) A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30475-30482.
- Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K.J. und Tecce, R. (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, **60**, 5310-5317.

- 
- Vaingankar, S.M. und Martins-Green M. (1998) Thrombin Activation of the 9E3/CEF4 chemokine involves tyrosine kinases including c-src and the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5226-5234.
- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E. und Lefkowitz, R.J. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.*, **17**, 698-714.
- Van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L. und Moolenaar, W.H. (1993) Pertussis Toxin-Sensitive Activation of P21(Ras) by G-Protein- Coupled Receptor Agonists in Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1257-1261.
- Van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 251-337.
- VanBiesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E. und Lefkowitz, R.J. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.*, **17**, 698-714.
- Vecchi, M., Baulida, J. und Carpenter, G. (1996) Selective Cleavage of the Heregulin Receptor ErbB-4 by Protein Kinase C Activation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18989-18995.
- Vecchi, M. und Carpenter, G. (1997) Constitutive Proteolysis of the ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase by a Unique, Sequential Mechanism. *J. Cell Biol.*, **139**, 995-1003.
- Vecchi, M., Rudolph-Owen, L.A., Brown, C.L., Dempsey, P.J. und Carpenter, G. (1998) Tyrosine Phosphorylation and Proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20589-20595.
- Venkatakrishnan, G., Salgia, R. und Grooman, J.E. (2000) Chemokine Receptors CXCR-1/2 Activate Mitogen-activated Protein Kinase via the Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Cancer Cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6868-6875.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. und Ullrich, A. (1993) Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, **259**, 1611-1614.
- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. und Poulsen, H.S. (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.*, **8**, 1197-1206.
- Wallasch, C. (1996) Bedeutung von HER3 für die Signaldefinition von HER2. *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. und Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerisation with HER3. *EMBO J.*, **14**, 4267-4275.
- Wang, J.Y., Miller, S.J. und Falls, D.L. (2001) The N-terminal Region of Neuregulin Isoforms Determines the Accumulation of Cell Surface and Released Neuregulin Ectodomain. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2841-2851.

- 
- Wang, Y.-H., Jue, S.F. und Maurer, R.A. (2000) Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulates Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor in GH3 Pituitary Cells. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1328-1337.
- Weiss, F.U., Daub, H. und Ullrich, A. (1997) Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **7**, 80-86.
- Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, **91**, 439-442.
- Werb, Z. und Yan, Y. (1998) A Cellular Striptease Act. *Science*, **282**, 1279-1280.
- Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B. und Hawkins, M.J. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest. New Drugs*, **15**, 61-75.
- Xu, N., Voyno-Yasenetskaya, T. und Gutkind, J.S. (1994) Potent transforming activity of the G<sub>13</sub>  $\alpha$  subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 603-609.
- Xu, Y., Fang, X.-J., Casey, G. und Mills, G.B. (1995) Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem. J.*, **309**, 933-940.
- Yarden, Y. und Ullrich, A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 443-478.
- Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K. und Ullrich, A. (1997) Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24767-24770.
- Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N. und Ullrich, A. (1999a) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *TIPS*, **20**, 408-412.
- Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H. und Ullrich, A. (1999b) Distinct calcium-dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20989-20996.

## 7 ABKÜRZUNGEN

'	Minute
“	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cDNA	komplementäre cDNA
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethelendiamintetraacetat
EGTA	N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötales Kälberserum
G418	Genetecin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinN'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

---

kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidylsäure
M1R	M1 muscarinischer Acetylcholinreceptor
MAP Kinase	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minute
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie-Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTB	Phosphotyrosine binding
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTX	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH2,3-Domäne	Src Homologie 2,3 Domäne
SHP-2	SH2-containing PTP-2
Sos	Son of sevenless
SRE	Serum response element
SRF	Serum response factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TF	Transkriptionsfaktor
TM	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymaktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

## CURRICULUM VITAE

Name: Norbert Prenzel  
Geburtsdatum: 4. Juni 1972  
Geburtsort: Münchberg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Gräfelfinger Strasse 116D  
81375 München

### Schulausbildung:

7/84 - 5/92: Gymnasium Münchberg-Abitur 1992.

### Akademische Ausbildung:

11/92 - 10/94: Studium der Chemie an der Universität Bayreuth - Vordiplom in Chemie (Organische Chemie, Anorganische Chemie, Physikalische Chemie, Physik)

11/94 - 5/97: Studium der Chemie an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg - Diplom in Chemie (Organische Chemie, Anorganische Chemie, Physikalische Chemie)

6/97 - 3/98: Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried, Abteilung für Molekularbiologie Prof. Dr. Axel Ullrich :  
*Untersuchungen zur Funktion des EGF Rezeptors bei der Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren*

4/98 – 10/02: Doktorarbeit am Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried, Abteilung für Molekularbiologie Prof. Dr. Axel Ullrich :  
*Untersuchungen zum Mechanismus der liganden-vermittelten Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors*

**Auszeichnungen:** Junior research award 2001 des Max-Planck Institutes für Biochemie

### **Präsentationen :**

11/99: BIOLOG 99: 1. Münchner Studentenkongress für Biowissenschaften:  
EGF Receptor Transactivation by G-protein-Coupled Receptors  
requires Metalloprotease-mediated cleavage of proHB-EGF

5/00: Gordon Research Conference Mammary Gland Biology (Il Ciocco, Italy):  
EGF Receptor Transactivation in cancer cells requires  
Metalloproteinase activity

### **Posterbeiträge:**

Zwick, E., Prenzel, N., Wallasch, C., Daub, H. und Ullrich, A., (1999). Distinct Calcium-dependent Pathways of EGFR Transactivation and PYK2 Tyrosine Phosphorylation in PC12 Cells. FEBS'99 26<sup>th</sup> Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Nizza, Frankreich.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H. und Ullrich, A., (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. Gordon Research Conference: Mechanisms of Cell Signaling-G-Proteins, Singapore.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M. und Ullrich, A., (1999). G-protein-coupled receptors transactivate the EGF receptor by metalloproteinase-mediated growth factor precursor processing Research Festival '99, Klinikum Grosshadern, München.

Prenzel, N., (2000). Gordon Research Conference: Mammary Gland Biology, EGFR transactivation by G-protein coupled receptors in cancer cells requires MMP activity, Il Ciocco, Italien.

### **Publikationen :**

Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. und Ullrich A. (1999). Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 184-189. (Übersichtsartikel)

Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N. und Ullrich, A. (1999). EGF receptor as central signal transducer of heterologous signalling systems. *Trends. Pharmac. Sci.* **20**, 408-412. (Übersichtsartikel)

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. und Ullrich A. (1999). Epidermal growth factor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase-cleavage of HB-EGF. *Nature* **402**, 884-888.

Hacker, H., Mischak, H., Hacker, G., Eser, S., Prenzel, N., Ullrich, A. und Wagner, H. (1999). Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* **18(24)**, 6973-6982.



Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M. und Ullrich, A. (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.* **2**, 184-190. (Übersichtsartikel)

Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. und Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20(13)**, 1594-1600. (Übersichtsartikel)

Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. und Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 8(1), 11-31. (Übersichtsartikel)

Gschwind, A., Prenzel, N. und Ullrich, A. (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.* **62(21)**, 6329-6336.

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für sein stetes Interesse, die großzügige Unterstützung, sein Vertrauen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Ihm für das Wissen, das er auch abseits des Transaktivierungsprojektes vermittelt hat, insgesamt für eine sehr lehr- und abwechslungsreiche Zeit.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Domdey für seine Bereitschaft bedanken, meine Dissertation als Doktorvater an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität zu betreuen.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. Henrik Daub, der nach der Betreuung meiner Diplomarbeit auch entscheidend zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat. Weiterhin möchte ich Frau Dr. Esther Zwick-Wallasch danken, für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und beim „review bzw. paper“-Schreiben. Ebenfalls für die enorme Fähigkeit mich derart lange zu ertragen und nach wie vor über meine Witze lachen zu können.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der Besetzung des Labors G29/30 bedanken, Johannes, Peter, Christoph, Henrik und Anil. Insbesondere bei Jo und Peter für die vielen langen, interessanten und fruchtbaren Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle die während meiner Dissertation am MPI in der Abteilung Ullrich gearbeitet haben und mit guten Ratschlägen, viel Humor, ernsten Diskussionen aber auch unvergessenen Festen und Weinproben zu einer guten Zeit beigetragen haben. Der Transaktivierungsgruppe, insbesondere Andreas Gschwind, Stefan Hart und Oliver Fischer, möchte ich danken für die Zusammenarbeit, gute Diskussionen und ihr Interesse an den neuen Projekten.

Dank gilt weiterhin meinen Freunden im Labor Jens, Johannes, Sylvia und Esther als auch den „Nicht-Martinsrieder“ Freunden, die oft vernachlässigt wurden, für den Rückhalt, schöne Stunden, gute Gespräche und viele lustige Momente.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern für Ihre grenzenlose Hilfe und Unterstützung während der langen Zeit des Studiums.